



FACULTADE DE CIENCIAS

GRADO EN BIOQUÍMICA

Mateo López Anca

**EVALUACIÓN DE UN NUEVO COMPUESTO
CONTRA EL GLIOBLASTOMA MULTIFORME
(GBM) *IN VIVO* MEDIANTE EL USO DE LÍNEAS
HUMANAS ESTABLECIDAS**

**AVALIACIÓN DUN NOVO COMPOSTO CONTRA O GLIOBLASTOMA
MULTIFORME (GBM) *IN VIVO* MEDIANTE O USO DE LIÑAS HUMANAS
ESTABLECIDAS**

**EVALUATION OF A NEW COMPOUND AGAINST GLIOBLASTOMA
MULTIFORME (GBM) *IN VIVO* USING ESTABLISHED HUMAN CELL LINES**

Trabajo Fin de Grado

Julio 2025

Resumen

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más frecuente y agresivo del sistema nervioso central en adultos. Su alta tasa de proliferación, capacidad invasiva, heterogeneidad molecular y resistencia terapéutica hacen que su pronóstico sea extremadamente desfavorable, con una media de supervivencia inferior a los 15 meses, incluso tras recibir un tratamiento óptimo. Frente a esta situación, es imprescindible la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos que ofrezcan alternativas más eficaces.

Con los avances a nivel molecular, la reciente ampliación de conocimientos a cerca de la gran heterogeneidad del GBM y el desarrollo de la medicina de precisión, así como la aparición de modelos *in vivo* alternativos a los más tradicionales, hace que cada vez sea más fácil el desarrollo de nuevos compuestos.

A partir de la década de 1970 comienza a emplearse, de forma extendida, el pez cebra (*Danio rerio*) como modelo animal, convirtiéndose en un organismo prometedor para la investigación biomédica debido a sus ventajosas características biológicas y genéticas, al igual que por facilidades económicas y logísticas, ideales para la investigación. Durante la última década, el pez cebra ha sido de gran utilidad como modelo *in vivo* para la realización de ensayos de xenotrasplante, particularmente de tumores de GBM, debido a su utilidad en los experimentos *in vivo*, permitiendo estudiar las interacciones del tumor con el ambiente, crecimiento tumoral, invasión y, en general, la fisiopatología del GBM. Asimismo, también permite la evaluación de toxicidad y efectividad de compuestos terapéuticos en ensayos preclínicos, pudiendo estudiar su respuesta frente al GBM.

A raíz de lo expuesto, en este trabajo se trató de evaluar *in vivo* el potencial terapéutico de un compuesto experimental (GBM48) utilizando embriones de pez cebra como modelo de xenotrasplante, así como de validar el pez cebra como modelo preclínico. Los resultados obtenidos refuerzan al pez cebra como una herramienta ideal para el análisis, rápido y eficaz, de terapias innovadoras frente al GBM y acorta la distancia entre el conocimiento molecular y genético del tumor y su aplicación clínica, convirtiéndose en una vía prometedora para el desarrollo de nuevos tratamientos personalizados para pacientes que padezcan esta enfermedad.

Palabras clave: glioblastoma; pez cebra; xenotrasplante; quimioterápico; modelo animal; medicina de precisión.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor of the central nervous system in adults. Its high proliferation rate, invasive capacity, molecular heterogeneity, and therapeutic resistance contribute to its prognosis extremely poor prognosis, with an average survival of less than 15 months, even after optimal treatment. Considering this, the search for new therapeutic compounds that offer more effective alternatives is essential.

With advances at the molecular level, the growing understanding of GBM's complexity, the rise of precision medicine, and the development of alternative *in vivo* models to traditional ones, the development of new compounds is becoming increasingly feasible.

Since the 1970s, the zebrafish (*Danio rerio*) has been increasingly used as an animal model, becoming a promising organism for biomedical research due to its advantageous biological and genetic characteristics, as well as economic and logistical feasibility. Over the past decade, zebrafish have proven to be highly useful as an *in vivo* model for xenotransplantation assays, particularly for GBM tumors, due to their ability to facilitate studies of tumor, allowing the study of tumor–microenvironment interactions, tumor growth, invasion, and overall GBM pathophysiology. Furthermore, they also allow for the evaluation of compound toxicity and therapeutic efficacy in preclinical trials, enabling the assessment of response to GBM.

Based on this rationale, the present study aimed to evaluate the *in vivo* therapeutic potential of an experimental compound (GBM48) using zebrafish embryos as a xenotransplantation model, while also validating the zebrafish as a preclinical tool. The results obtained strengthen the position of zebrafish as an ideal platform for the rapid and effective screening of innovative therapies against GBM. This model helps bridge the gap between molecular and genetic tumor characterization and its clinical application, offering a promising path toward the development of new personalized treatments for patients affected by this disease.

Keywords: glioblastoma; zebrafish; xenotransplantation; chemorherapeutic; animal model; precision medicine.

Resumo

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral primario máis frecuente e agresivo do sistema nervioso central en adultos. A súa alta taxa de proliferación, capacidade invasiva, heteroxeneidade molecular e resistencia terapéutica fan que o seu pronóstico sexa extremadamente desfavorable, cunha media de supervivencia inferior aos 15 meses, mesmo tras recibir un tratamento óptimo. Ante esta situación, faise imprescindible a busca de novos compostos terapéuticos que ofrezan alternativas máis eficaces.

Cos avances a nivel molecular, a recente ampliación do coñecemento sobre a gran heteroxeneidade do GBM e o desenvolvemento da medicina de precisión, así como a aparición de modelos *in vivo* alternativos aos tradicionais, fai que cada vez sexa máis fácil o desenvolvemento de novos compostos.

A partir da década de 1970 comezou a empregarse de forma estendida o peixe cebrá (*Danio rerio*) como modelo animal, converténdose nun organismo prometedor para a investigación biomédica polas súas vantaxes biolóxicas e xenéticas, así como polas súas facilidades económicas e lóxicas, ideais para a investigación. Durante a última década, o peixe cebrá foi de gran utilidade como modelo *in vivo* para a realización de ensaios de xenotrasplante, concretamente de tumores de GBM, debido a súa utilidade nos experimentos *in vivo*, permitindo estudar as interaccións do tumor co microambiente, o crecemento tumoral, a invasión e, en xeral, a fisiopatoloxía do GBM. Así mesmo, tamén permite a avaliación de toxicidade e a efectividade de compostos terapéuticos en ensaios preclínicos, avaliando a súa resposta fronte ao GBM.

Tendo isto en conta, neste traballo buscouse avaliar *in vivo* o potencial terapéutico dun composto experimental (GBM48) empregando embrións de peixe cebrá como modelo de xenotrasplante, así como validar o peixe cebrá como modelo preclínico. Os resultados obtidos reforzan o peixe cebrá como unha ferramenta ideal para a análise rápida e eficaz de terapias innovadoras fronte ao GBM, achegando o coñecemento molecular e xenético do tumor á súa aplicación clínica, e converténdoo nunha vía prometedora para o desenvolvemento de novos tratamentos personalizados para pacientes que padezan esta enfermidade.

Palabras clave: glioblastoma; peixe cebrá; xenotrasplante; quimioterápico; modelo animal; medicina de precisión.

ÍNDICE

1. Introducción	6
1.1. Clasificación del glioblastoma	7
1.2. Patogénesis molecular del GBM	10
1.3. Diagnóstico y tratamiento	18
1.4. Pez cebra como animal modelo para el xenotrasplante	21
2. Objetivos	24
3. Materiales y métodos	24
3.1. Mantenimiento, cuidado y obtención de embriones de pez cebra	24
3.2. Ensayos de toxicidad	25
3.3. Cultivo celular	27
3.4. Ensayos de xenotrasplante	28
3.5. Toma y análisis de imágenes	31
3.6. Tratamiento	31
4. Resultados	32
4.1. La NOAEL del compuesto GBM48 fue de 50 μM con el FET adaptado a xenograft	32
4.2. El compuesto GBM no redujo la proliferación de la línea celular establecida de glioblastoma U251wt	33
5. Discusión	35
6. Conclusión	38
7. Bibliografía	38

1. Introducción

Hoy en día, el cáncer es uno de los principales causantes de morbimortalidad en España, donde se estima que en el año 2025 se alcanzarán los 296.103 casos diagnosticados. A nivel mundial, según la OMS, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte, al que se le atribuyen casi 10 millones de defunciones en el año 2020 (Organización Mundial de la Salud, 2022). En las últimas décadas, el número de total de cánceres diagnosticados en España ha aumentado debido al aumento poblacional, el envejecimiento de la población, la exposición a factores de riesgo (como el tabaco, el alcohol y la obesidad, entre otros) y, en cánceres como el colorrectal, el de mama o el de próstata, debido a un aumento de la detección precoz (Sociedad Española de Oncología Médica [SEOM], 2025).

El término cáncer se refiere a un amplio rango de enfermedades genéticamente diversas, causadas por una desregulación del ciclo celular la cual desemboca en un crecimiento celular descontrolado y en la formación de tumores primarios. En muchas ocasiones, estas células adquieren la capacidad para infiltrarse en el torrente sanguíneo, diseminarse y llegar a otros tejidos del cuerpo para formar tumores secundarios. Esta dispersión de células, conocida como metástasis, es la causa principal de morbilidad y mortalidad por cáncer (Cabezas-Sáinz et al., 2020).

Poder comprender todos los procesos moleculares y celulares que hay detrás de este proceso es una parte esencial para el desarrollo de nuevos tratamientos para los distintos tipos de cáncer. El gran aumento en el conocimiento acerca de las funciones de la genómica y del sistema inmunitario en el cáncer (Fig. 1) ha permitido el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a las alteraciones moleculares y otras relacionadas con la supresión inmunitaria (Reimunde et al., 2021).

En España, los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) representan aproximadamente un 2% del total de los casos de cáncer en adultos ([SEOM], 2024). El glioblastoma (GBM) el glioma más frecuente, representando el 69% de todas las neoplasias malignas que afectan al cerebro. Se trata de un tumor primario de fase IV muy agresivo que tiene origen en las células gliales, específicamente en los astrocitos del sistema nervioso central (SNC). Los pacientes que lo padecen muestran un pronóstico desfavorable presentando una media de supervivencia de entre 12 y 14,5 meses después de haber recibido un tratamiento óptimo. Su crecimiento es rápido e invasivo, y tiene la capacidad de infiltrarse ampliamente en el cerebro (Biserova et al., 2021a; Khoshnevis et al., 2017).

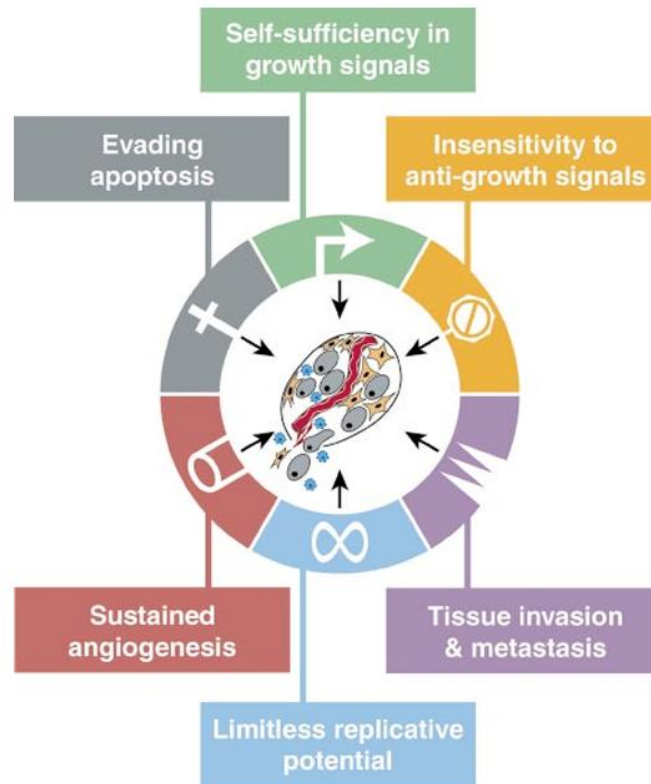


Figura 1. Las seis alteraciones básicas en la fisiología del cáncer. Cada una de estas alteraciones (autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad con las señales inhibitoras de crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis tisular) implica la modificación de algún mecanismo de defensa anticancerígeno integrado de células o tejidos (Hanahan & Weinberg, 2011)

En la actualidad, a pesar de la gran expansión de conocimiento a cerca del cáncer y de los esfuerzos por conseguir tratarlo con éxito, el GBM sigue siendo una enfermedad incurable, con un rango de supervivencia extremadamente precario. La mayoría de los tratamientos disponibles para el GMB no tienen apenas efectividad, lo que supone un reto para los investigadores y la medicina oncológica de precisión (Tsimberidou et al., 2020). El tratamiento individualizado surge como una alternativa esperanzadora, en la que, a través del análisis de biomarcadores genómicos e inmunitarios de la persona afectada, permitirá a los oncólogos evaluar y tomar las mejores decisiones sobre el tratamiento para cada paciente (Tsimberidou et al., 2020).

1.1. Clasificación del glioblastoma

Durante años, la clasificación de tumores del sistema nervioso central ha estado basada típicamente en comparaciones histológicas respaldadas por pruebas complementarias de tejidos (inmunohistoquímicas, ultraestructurales...). Con la evolución de la biología molecular y de la genética, los biomarcadores moleculares han ido cobrando especial importancia a la hora de proporcionar información, tanto auxiliar como definitiva, para el diagnóstico y la clasificación de este tipo de tumores (Louis et al., 2021).

Los gliomas se pueden clasificar, según el grado de infiltración del parénquima cerebral, en dos grandes grupos: los gliomas infiltrantes o difusos (GI), los cuales invaden el tejido sano que circundante de forma irregular, y los gliomas bien delimitados o circunscritos, estos infiltran el tejido de una forma más limitada. Tradicionalmente, los GI han sido clasificados en tres grupos (astrocitomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas) en función de sus características fenotípicas e histológicas (Carrato Moñino, 2019). A mayores, a cada tipo de tumor se le asigna un grado de malignidad, en función de la agresividad de la neoplasia. El GBM se corresponde con un tumor astrocitario primario de grado de malignidad IV. El grado 1 se correspondería con el menos agresivo, y, por el contrario, el grado 4 será asignados a aquellos tumores más letales. Aquellos GBM que progresan desde un tumor astrocitario e menor grado (II o III) se conocen como secundarios. Por lo tanto, el glioblastoma se caracteriza por ser una neoplasia infiltrativa difusa, siendo la forma más agresiva de los astrocitomas (Ortega-Aznar et al., 2013).

En el año 2021, la Organización Mundial de la Salud (OMS) realiza la última revisión hasta la fecha de la clasificación de tumores del SNC. La aparición de esta nueva clasificación y la del 2016 realizada por la OMS, supone un importante cambio en la forma de abordar en diagnóstico de tumores del SNC. En esta incorpora numerosos cambios respecto a las clasificaciones precedentes, incorporando como criterio de clasificación aspectos moleculares y genéticos (Fig. 2), con el fin de crear una mayor utilidad clínico-patológica. Bajo el concepto de diagnóstico integrado, esta nueva clasificación tiene en cuenta tanto componentes moleculares (genéticos) como histológicos (fenotípicos), siendo prioritaria la información proporcionada por los marcadores moleculares, los cuales determinarán el diagnóstico final del tumor (Louis et al., 2021).

Hasta la fecha, los gliomas se habrían clasificado en función de sus características histológicas. En el caso de los tumores astrocíticos infiltrantes de alto grado, los criterios histológicos incluirían hiper celularidad, atipia nuclear y actividad mitótica. A mayores, para el diagnóstico de GBM se requería alta proliferación microvascular y/o necrosis tumoral. A lo largo de los últimos años, se ha ido comprobando que estos criterios histológicos, en muchos casos, están poco relacionados con vías moleculares claves para el desarrollo de estos tumores y podrían representar múltiples subtipos tumorales. Además, se cree que dentro de cada entidad tumoral existe variabilidad clínica y biológica, lo que sugiere que la identificación de factores moleculares asociados a cada tipo tumoral sería indispensable para un mejor diagnóstico y para un posterior tratamiento de la neoplasia (Aldape et al., 2015; Louis et al., 2021).

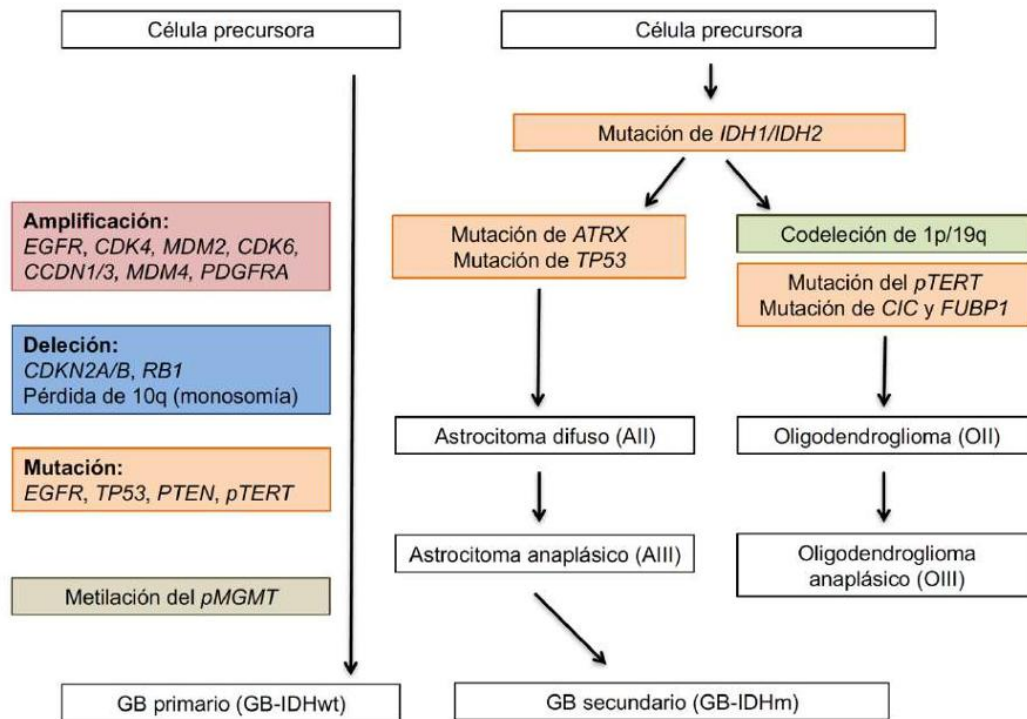


Figura 2. Principales alteraciones moleculares en los diferentes grupos de gliomas infiltrantes. La clasificación de los gliomas en este diagrama se encuentra ligeramente anticuada respecto a la última realizada por la OMS, pero representa adecuadamente el criterio de clasificación en base a los marcadores moleculares de cada glioma (Carrato Moñino, 2019).

Según la clasificación realizada por la OMS, tanto la del año 2016 como la más reciente, del 2021, el glioblastoma, típicamente definido como un astrocitoma difuso de grado 4, se clasifica en el conjunto de gliomas infiltrantes o difusos de tipo adulto. En función de esta nueva clasificación, se pueden distinguir dos grandes grupos caracterizados por la ausencia o no de la mutación de los genes codificantes para la isocitrato deshidrogenasa (IDH) 1 o 2:

- Glioblastoma con el gen de la isocitrato deshidrogenasa mutado (GBM, *IDH-mutated*): es la variante menos frecuente del glioblastoma (10% de los pacientes diagnosticados) y muestra un mejor pronóstico que los gliomas que no poseen mutación del gen (Aldape et al., 2015; Louis et al., 2021).
- Glioblastoma sin mutación en el gen de la isocitrato deshidrogenasa (GBM, *IDH-wildtype*): se corresponde con la variante más frecuente (90% de los GBM), afecta principalmente a adultos y muestra un pronóstico desfavorable (Louis et al., 2021).

En el marco de revisión de la clasificación de tumores cerebrales de la Organización Mundial de la Salud, se consideró reagrupar los glioblastomas con mutaciones en la IDH con otros gliomas con mutaciones para esta proteína, y restringir el término “glioblastoma” únicamente a los tumores sin mutaciones en la IDH (Louis et al., 2021).

Para los casos de ausencia de mutaciones para el gen de la IDH (GBM, *IDH-wildtype*), existen una serie de marcadores moleculares asociados a este tipo de GBM como la

presencia de ganancias y pérdidas combinadas de los cromosomas 7 y 10, siendo lo más típico la trisomía del cromosoma 7 y la monosomía del cromosoma 10. Otros factores genéticos serían la amplificación del gen codificante para el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la mutación de la región promotora de la transcriptasa inversa de la polimerasa (TERT) (Stichel et al., 2018).

En aquellos GBM con el gen IDH mutado, es muy común que esté asociada a este tipo de tumor la presencia de la proteína mutada ATRX. Esta proteína mutada actuará como marcador inmunohistoquímico para la línea astrocitaria, dado que en un gran porcentaje de casos está ligada con el GBM IDH-*mutated* (Aldape et al., 2015).

Para una mayor claridad en el diagnóstico, la OMS promueve el empleo de los sufijos NOS y NEC para los casos en los que convenga:

- NOS (en inglés, *Not Otherwise Specified*): indica que no se ha realizado un estudio molecular o ha fallado técnicamente por lo tanto no es suficiente para asignar un diagnóstico específico de la OMS.
- NEC (en inglés, *Not Elsewhere Classified*): indica que se han realizado con éxito las pruebas moleculares necesarias para el diagnóstico, pero la información obtenida no es suficiente para designar un diagnóstico de la OMS.

En este contexto, la OMS incorpora los parámetros moleculares previamente mencionados junto con el análisis histológico, dando lugar a una clasificación híbrida para un mejor y más preciso diagnóstico y clasificación de los tumores de la línea astrocitaria (Louis et al., 2021).

1.2. Patogénesis molecular del GBM

En las últimas décadas, la comprensión de la patogénesis molecular del glioblastoma ha avanzado de forma considerable, siendo esencial para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas al genotipo de los diferentes subgrupos de este tumor.

Existen una serie de factores principales por los cuales las células madre de los gliomas se ven afectadas:

1.2.1. Microambiente tumoral

El microambiente tumoral es el entorno que rodea a las células cancerosas. Consiste en todos los elementos no malignos presentes en el tumor que mantienen, favorecen o dificultan la evolución de la masa tumoral, desde las propias células tumorales hasta vasos sanguíneos, factores inmunes e inflamatorios y la matriz extracelular (Barar, 2012). En el GBM, las células que conforman el microambiente tumoral son desde microglía y macrófagos asociados al glioma hasta monocitos, células dendríticas, neutrófilos asociados a tumores, células supresoras derivadas de astrocitos. La formación de este microambiente se genera a partir de una situación proangiogénica y proinflamatoria, que eleva la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales dilatando las uniones

de la barrera hematoencefálica, permitiendo que el flujo sanguíneo se extravase del tejido endotelial y se infiltren leucocitos a la masa tumoral (Fig. 3) (Biserova et al., 2021a).

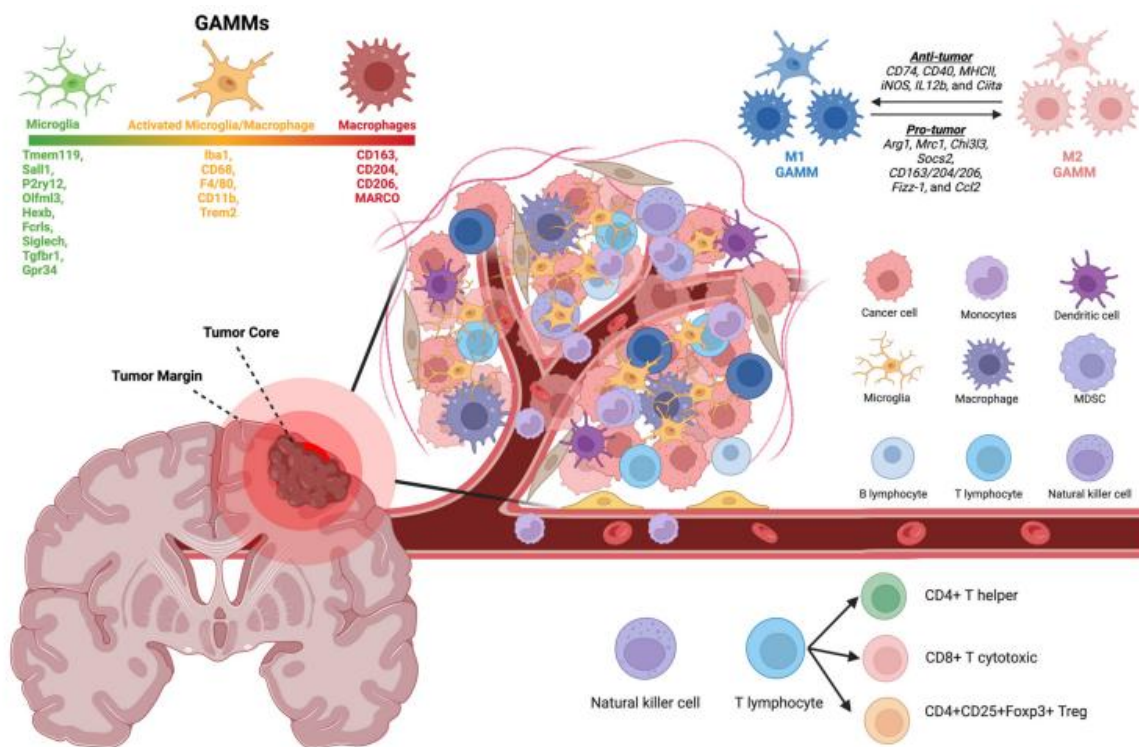


Figura 3. El microambiente inmunitario del GBM. Las células inmunitarias influyen en el microambiente del glioma e interactúan y evolucionan dinámicamente. Los cambios en las señales ambientales, la comunicación entre células y las influencias espaciales en referencia al tumor pueden alterar el panorama inflamatorio en los pacientes con GBM (Boyett et al., 2023).

El microambiente tumoral del GBM es altamente inmunosupresor, conformado por varios componentes celulares y moleculares que promueven el crecimiento tumoral y la resistencia a la terapia. La acumulación de células inmunosupresoras convierte al GBM en un tumor con un microambiente tumoral pobre, lo que plantea desafíos significativos para la inmunoterapia (De Domenico et al., 2025). En el microambiente tumoral del GBM se encuentran pocas células B y los niveles de infiltración de células T van a diferir en función del subtipo de tumor. Las células del sistema inmune adaptativo logran ejercer efectos antitumorales, por lo que la infiltración de células T se asocia con un pronóstico positivo del paciente, sugiriendo la participación de estas células en el control del crecimiento del tumor. El microambiente tumoral puede presentar un componente inmunorregulador que atenúa la función de las células T efectoras reduciendo la producción de granzima e interferón gamma (IFN γ). A mayores, el microambiente tumoral induce la expresión de moléculas inhibitorias en linfocitos T como la CTLA-4, la proteína 1 de muerte celular programada (PD1), la proteína 3 de la membrana de las células T (TIM3), la proteína 3 del gen de activación de los linfocitos (LAG3) e inmunorreceptor de células T con inmunoglobulina y dominios ITIM (TIGIT), haciendo que su función se vea afectada (Torres Rodríguez et al., 2022).

Por otra parte, se encuentran aquellas vías de señalización y elementos comunicadores que promueven el ambiente tumoral. Las interacciones más importantes son aquellas que ocurren entre las células madre del glioma (GSC, siglas en inglés de *Glioma Stem Cells*) y el endotelio a través de varios mensajeros vías moleculares como puede ser el óxido nítrico, GMPc y la vía de señalización Notch, siendo esta última la más importante de las interacciones. (Biserova et al., 2021a). En el endotelio, se expresan los ligandos DLL4 y JAG1, mientras que en las GSC se expresan los ligandos Notch-1 y Notch-2. La activación por estos ligandos resulta en la activación de los genes diana *Hes1* y *Hey1* los cuales están directamente relacionados con el desarrollo de las GSC. A su vez, las GSC estimulan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), promueven la proliferación endotelial, la angiogénesis, la transdiferenciación de las GSC en pericitos y la localización de células precursoras endoteliales derivadas de la médula ósea (Wang et al., 2024).

Otro de los factores esenciales presentes en el microambiente tumoral es la hipoxia. El bajo nivel de oxígeno va a permitir la autorrenovación e incluso aumentar el número de GSC. También estimula la proliferación, el crecimiento invasivo y la supervivencia de las células malignas. La hipoxia también reforzará la resistencia a los tratamientos para el GBM a través de numerosos procesos, como, por ejemplo, inhibiendo los radicales libres, haciendo que disminuya la eficacia de tratamientos con radiación. En el caso de tratamientos quimioterápicos, la hipoxia regula el gen de resistencia a múltiples fármacos *MDR1/ABCB1* (Biserova et al., 2021a; Erices et al., 2023).

La microglía asociada al tumor es otro agente promotor del desarrollo del tumor, ya que las GSC promueven la diferenciación de estos macrófagos al fenotipo M2, el cual promueve el crecimiento de las células tumorales del GBM, al igual que los neutrófilos asociados a tumores (Biserova et al., 2021a; Reimunde et al., 2021).

Por el contrario, las células dendríticas se encargan de presentar antígenos tumorales a los linfocitos T, induciendo una respuesta inmunitaria específica contra el tumor (Biserova et al., 2021a).

Los pericitos, encargados del sostén de los vasos sanguíneos, se caracterizan por expresar el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta ($PDGFR\beta$), la actina del músculo liso y la desamina. En el GBM, estas células pueden desarrollarse a partir de las GSC a través de la diferenciación mesenquimal, manteniendo el crecimiento tumoral y suministro de sangre. (Biserova et al., 2021a). Cuando se comienza a desarrollar la angiogénesis en los tumores de la glía, el número de pericitos comienza a aumentar al igual que la interrupción de la barrera hematoencefálica, ambas características son indicadoras de neovascularización (Sattiraju & Mintz, 2019).

Tanto en el borde invasivo como dentro del propio tumor hay presencia de astrocitos reactivos. Este tipo de células gliales podría actuar de dos formas distintas: los astrocitos reactivos reconocen a las células del glioma y apoyan su diferenciación; alternativamente, los astrocitos tratan de contrarrestar la destrucción invasiva de los tejidos cerebrales (Biserova et al., 2021a).

El papel patogénico de los astrocitos reactivos en el GBM continúa bajo estudio activo, pero ya se han reconocido diversos mecanismos a través de los cuales estas células facilitan la progresión del tumor. Estos procesos incluyen la producción de metaloproteinasa 2 (MMP-2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y un amplio espectro de citocinas y factores de crecimiento como interleucina 6 y 19 y, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1). También se ven involucrados en la modificación del metabolismo de la glutamina y de variedades de microARN, al igual que la regulación de las vías p53 y del factor nuclear kappa de las células B activadas (NF- κ B), las cuales interfieren positivamente en el desarrollo del glioma. La expresión de la proteína de uniones gap 43 Cx43 contribuye a la quimio resistencia del tumor (Biserova et al., 2021a; Guan et al., 2018).

1.2.2. Metabolismo

El cambio en las vías metabólicas es un rasgo característico del cáncer, incluido el GBM, y la reprogramación y comprensión de las vías metabólicas podría resultar útil para el desarrollo de nuevas opciones.

En muchos casos, el cáncer opta por la glucólisis aeróbica como vía metabólica para conseguir alcanzar sus requerimientos energéticos y anabólicos. La glucólisis aeróbica, más conocida como el efecto Warburg, se define como un aumento de la tasa de absorción de glucosa y la producción preferencial de lactato en presencia de oxígeno en las células cancerosas. En el cáncer, generalmente se acepta que la glucólisis aeróbica promueve el uso de NADH como subproducto del lactato para la obtención de biomasa y lactato para acidificar el microambiente, con el fin de facilitar la invasión tumoral (Biserova et al., 2021a; Reimunde et al., 2021).

En las células sanas, la fosforilación oxidativa es la vía dominante, lo que resulta en una mayor producción de ATP y bajas concentraciones intercelulares de lactato. En las células tumorales, el efecto Warburg pone de manifiesto la preferencia de las células tumorales por absorber mayores cantidades de glucosa y producir lactato independientemente de la presencia de oxígeno. La ruta de las pentosas fosfato en las células normales opera a un ritmo homeostático, utilizando la glucosa para producir compuestos importantes para la creación de nucleótidos y aminoácidos. En las células tumorales GBM, la vía es excesivamente activa y produce precursores de nucleótidos que son mecanismos posteriores útiles para aumentar el tamaño y el número de células tumorales. La modificación de la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato combinadas son fundamentales para la supervivencia y la proliferación de las células cancerosas (Fig. 4) (Cortes Ballen et al., 2024).

La expresión anormal de oncogenes y genes supresores de tumores en GBM se ha correlacionado con cambios en la expresión y actividad de los transportadores glucolíticos. La glucólisis aeróbica, que favorece la progresión del GBM, está controlada

por transportadores de glucosa, GLUT1-4, y enzimas glucolíticas clave, como HK1-3, PFK1, GAPDH, PKM2 y LDHA.

Asimismo, la glucólisis anaeróbica se ve influenciada por vías celulares reguladoras como: PI3K / AKT, LKB1 / AMPK, HIF-1/2, p53, EGFR, PDGFR y c-MYC, entre otras. Se han identificado tres vías centrales que se alteran en el 75% de los casos de GBM (Reimunde et al., 2021):

- Señalización del receptor de tirosina quinasa/RAS/fosfatidilinositol 3 quinasa (RTK/RAS/PI3K).
- Vía de señalización de p53.
- Redes de señalización del retinoblastoma (Rb).

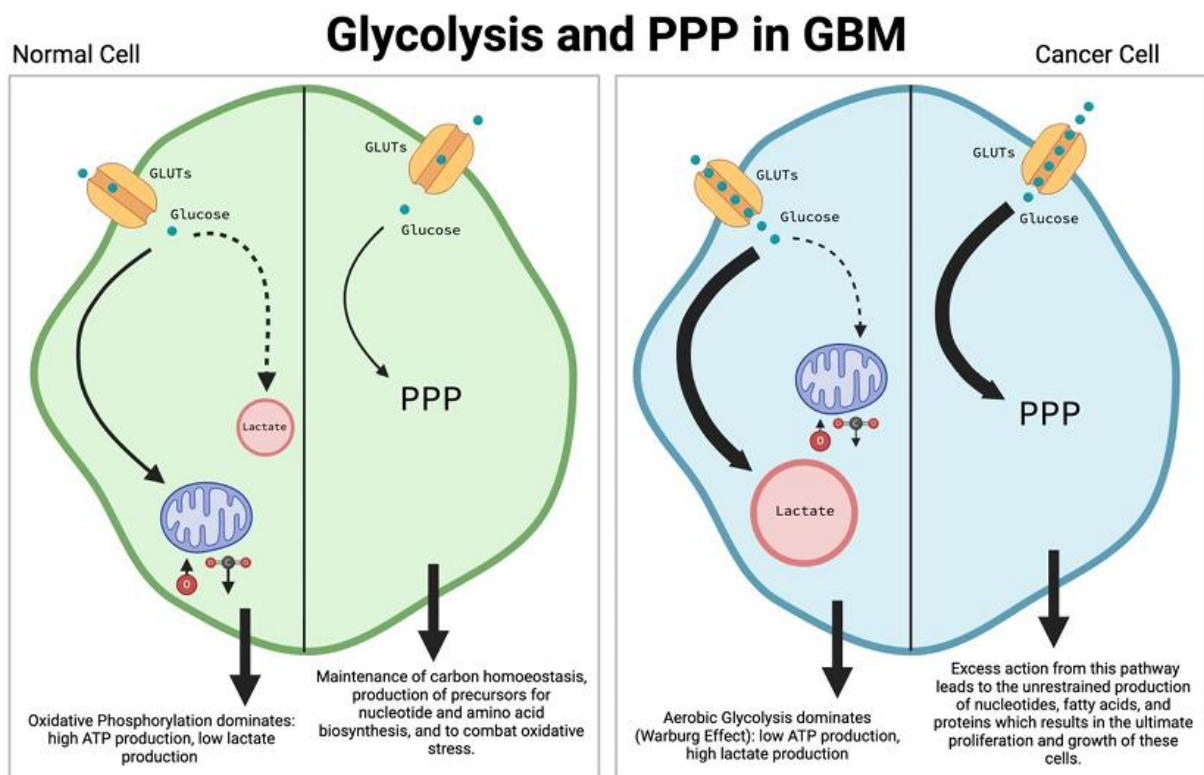


Figura 4. La alteración de la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato en GBM. Se muestran las diferencias entre células sanas (mayor producción de ATP y baja concentración de lactato) y las células tumorales (mayor absorción de glucosa y alta producción de lactato) (Cortes Ballen et al., 2024).

El análisis de 96 muestras de GBM mostró una sobreactivación en una serie de RTKs y mutaciones de ganancia de función, como el EGFR, observada en el 45% de los casos de GBM, las cuales desencadenan cascadas de RAS y AKT/PI3K. En consecuencia, se ha visto que estas cascadas de señalización o proliferativa y metabólica en el GBM se encuentran en un estado de activación superior al normal. La activación de la cascada de señalización mTOR por AKT conlleva a la regulación positiva de factores de transcripción como c-Myc, el cual aumenta la expresión de genes glucolíticos. AKT también puede aumentar la glucólisis mediante la transcripción de los GLUT, también regulados al alza en el GBM, y otras enzimas esenciales como la hexoquinasa II, involucrada en la glucólisis. Por todo ello, el estudio de las alteraciones en los oncogenes

y en los genes supresores de tumores que controlan el metabolismo es objetivo de interés en la búsqueda de tratamientos para la enfermedad (Reimunde et al., 2021).

Otros signos metabólicos adicionales de malignidad en GBM han sido asociados a las mitocondrias, orgánulo clave en la regulación del metabolismo energético, generación de radicales libres y la apoptosis (Reimunde et al., 2021). Una de las principales características de la carcinogénesis es la capacidad de evadir la apoptosis e identificar vías metabólicas que permiten la producción de energía (trifosfato de adenosina o ATP), lo que hace que la célula tumoral sea capaz de sobrevivir, reproducirse y desarrollar un perfil de resistencia. Estas funciones permiten a las mitocondrias percibir las condiciones de estrés celular y responder a ellas asegurando una adecuada plasticidad de adaptación. Se ha observado que, en una célula tumoral, no solo hay mitocondrias mutadas (mutaciones del ADNmt) sino también mitocondrias no mutadas (ADNmt de tipo salvaje) que determinan una condición de heteroplasmia. Esta condición es fundamental en el proceso de carcinogénesis porque permite, por un lado, garantizar una rápida adaptación tumoral, aumentando el grado de aptitud celular, y, por otro lado, parecería participar en la resistencia a la quimioterapia al desarrollar en esa subpoblación mitocondrial mutada una alteración funcional. En los gliomas se han encontrado diversas alteraciones de las actividades mitocondriales, como cambios estructurales y funcionales, que afectan la señalización mitogénica, hemodinámica, bioenergética y apoptótica (Caruso et al., 2024).

Las mutaciones en las isoformas mitocondriales de IDH1 e IDH2 vinculadas a NADPH han provocado un deterioro de la producción de energía en las mitocondrias y, por lo tanto, evidencia una clara disfunción de este orgánulo en los gliomas. La mutación de IDH1 produce grandes cambios a nivel de metabolismo celular, variando la expresión de distintas enzimas clave y mostrando un fenotipo glucolítico reducido en comparación con los GBM que no presentan la mutación. Por lo tanto, el estado de IDH indicará distintos fenotipos glucolíticos de GBM, lo que contribuirá a la toma de decisiones de un tipo de tratamiento concreto (Biserova et al., 2021a; Reimunde et al., 2021).

La cardiolipina es un fosfolípido concentrado en los sitios de contacto de las membranas mitocondriales externas e internas y en la cadena de transporte de electrones, y se asocia con complejos de la cadena respiratoria, cruciales para la función mitocondrial. Diversos estudios evidencian defectos en la cadena de transporte de electrones asociados a la biosíntesis de cardiolipina. Por lo tanto, el nivel de producción defectuoso de cardiolipina afecta indirectamente a la capacidad metabólica de la mitocondria y en la ejecución de la apoptosis (Reimunde et al., 2021).

1.2.3. Factores genéticos

En el desarrollo del glioblastoma, tres importantes eventos genéticos serán decisivos para impulsar el avance de esta neoplasia: la desregularización de la señal de los factores de crecimiento (EGF, PDGF, VEGF, etc.), la activación de la vía de fosfatidilinositol3-OH-quinasa (PI3K) y la inactivación de las vías supresoras de tumores p53 y retinoblastoma (Rb) (Reimunde et al., 2021).

La mutación de la IDH, como se ha explicado anteriormente, es el principal biomarcador empleado por la OMS para clasificar tumores del SNC, pudiendo distinguir entre el glioblastoma IDH de tipo salvaje (alrededor del 90% de los casos), glioblastoma con mutación IDH (aproximadamente el 10% de los casos) y glioblastoma no especificado de otro modo (NOS) si no se tiene información a cerca de este gen. La mutación IDH está ligada con la codelección 1p/19q y la metilación del promotor MGMT, el cual también es un biomarcador de diagnóstico común, pero estos son mutuamente excluyentes con la amplificación de EGFR (delección del cromosoma 7) y la delección de PTEN (pérdida del cromosoma 10) (Polivka et al., 2014; Reimunde et al., 2021; Stichel et al., 2018).

Como ejemplo de desregularización de la señalización del crecimiento en el GBM tenemos la mutación de la función y/o amplificación del EGFR. Se ha comprobado que en el 57% de los casos de GBM esta mutación se encuentra presente y, además, la alteración se encuentra asociada a un aumento de la agresividad del glioma. La mutación más frecuente de EGFR en GBM, EGFR^{VI}, promueve la proliferación celular al activar de forma constitutiva las vías Ras-MAPK y PI3K. Un efecto similar provoca la delección del cromosoma 10 (Reimunde et al., 2021).

A menudo, las proteínas encargadas de los puntos de control del ciclo celular son alteradas y se convierten una de las mutaciones genéticas más frecuentes que provocan algún tipo de cáncer. En este caso, el p53 es un supresor tumoral típico, conocido como “el guardián del genoma” encargado de regular muchos genes implicados en el ciclo celular y cascadas de apoptosis. La inactivación de p53 en el GBM ocurre a través de una variedad de mecanismos, principalmente a través de inhibidores como MDM2 y MDM4, delecciones de estabilizadores de p53 como p14/ARF o, la situación más común que aparece en el 85% de GBM, la aparición de una mutación en el gen TP53 (Ohgaki & Kleihues, 2009). Asimismo, la reducción del número de copias del inhibidor de quinasas dependiente de ciclina 2A y B, (CDKN2A/B) causado por la delección homocigota del gen CDKN2A-p16^{INK4a}, está relacionada con la activación de la vía Rb, implicada en el control de la proliferación celular, y con los microambientes tumorales observados en los gliomas. La mutación en el promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERTp) o del remodelador de la cromatina ATRX, conducen a un mayor alargamiento de los telómeros lo que conlleva a las células tumorales a superar la senescencia y alcanzar la inmortalidad. Otras alteraciones son responsables de la progresión y difícil tratamiento del GBM (Reimunde et al., 2021).

1.2.4. Epigenética

No sólo las mutaciones genéticas son las causantes del desarrollo y la progresión del GBM, si no que, como se ha comprobado en muchos otros tipos de cáncer, la epigenética también juega un papel esencial.

Típicamente, el GBM presenta una extensa hipometilación la cual permite la expresión de múltiples genes los cuales van a favorecer a una progresión celular rápida y descontrolada. Las regiones más afectadas por esta hipometilación incluyen la estructura

de repetición polimórfica D4Z4, loci oncogénicos como SAT2 y MAGE-A1 (Reimunde et al., 2021).

Los biomarcadores tanto de las mutaciones de las IDH como la metilación del promotor de MGMT son de gran interés significativo. Las mutaciones de IDH en el GBM dan lugar simultáneamente a la pérdida de la actividad enzimática nativa, así como a una nueva actividad en la producción de 2-hidroxiglutarato (2HG). Estas alteraciones enzimáticas desencadenan cambios epigenéticos que definen el fenotipo de metilación de la isla CpG del glioma, un fenotipo que se asocia con un mejor pronóstico. MGMT codifica una enzima de reparación del ADN conservada evolutivamente responsable de los daños inducidos por el ADN inducido por la temozolomida desintoxicante (TMZ). Clínicamente, la alta expresión de ARNm y proteínas de MGMT se ha asociado con la resistencia terapéutica a los agentes alquilantes del ADN en varios tipos de cáncer. Un mecanismo importante de la regulación de MGMT implica la metilación de las islas CpG en la región promotora (Yang et al., 2015). En aquellos casos de GBM con mutación en IDH, correlacionado con un mejor pronóstico, se ha observado que la presencia de esta mutación actúa como obstáculo en la progresión de glioma de bajo grado a GBM, ya que el estado epigenético de ciertos genes involucrados en procesos celulares cambia, como el caso de MGMT. Un glioma con esta mutación podría requerir un mayor número de alteraciones para llegar a desarrollar un fenotipo más agresivo que aquellos gliomas sin la mutación (Biserova et al., 2021b; Louis et al., 2021; Polivka et al., 2014; Reimunde et al., 2021).

La inactivación epigenética de muchos genes supresores de tumores también se ha observado en GBM. PTEN, p53, p14 y p16 se encuentran hipermetilados, junto con muchos otros genes implicados en procesos clave como el contacto intracelular (PCDH-A11), la vía MAPK (SOCS1) y la apoptosis (caspasa-8) (Reimunde et al., 2021).

En muchos GBM, se han visto implicadas las histonas desacetiladas (HDAC) puesto que se desregulación se ha visto implicada en la progresión e invasión del tumor, al igual que en la resistencia a la terapia. Esto cobra especial importancia en el caso de las GSC de GBM, donde la expresión desregulada de HDAC se ha relacionado con mecanismos de señalización alterados, como la vía Sonic Hedgehog (SHH), implicada en la resistencia a la radioterapia, y también con el mantenimiento de las funciones mitocondriales y adaptaciones metabólicas (Reimunde et al., 2021).

1.2.5. microARN

En las últimas décadas, se ha demostrado que los microARN regulan muchos procesos fisiológicos en las células y que están implicados en una gran variedad de patologías, incluido el cáncer. Alrededor del 50% de los genes codificados por microARN humano se encuentran en *loci* asociados con el cáncer y en casi todos los tumores muestran signos de expresión de microARN desregulados (Ruan et al., 2009). Estas alteraciones se relacionan frecuentemente con la regulación positiva de oncogenes y/o la regulación negativa de genes supresores de tumores, es decir, están relacionados con favorecer el desarrollo del tumor. También se han encontrado microARNs en vesículas extracelulares

de GBM en circulación, lo que significa que estos podrían servir convertirse en potenciales biomarcadores para diagnósticos no invasivos de GBM (Reimunde et al., 2021).

Se ha descrito el papel de diferentes microARNs en la regulación de vías clásicas y genes críticos para la génesis de GBM a nivel postranscripcional. En ellos se incluyen p53, EGFR, PDGFR, PTEN, PI3K y AKT y MGMT, entre otros (Sana et al., 2011). Se ha visto que la sobreexpresión de ciertos microARNs, como miR-7, miR-34a, miR-128, miR-124, miR-137 y miR-181 afecta negativamente al avance de GBM. Por el contrario, se han descrito múltiples microARNs, el más investigado miR-21, sobre los cuales una regulación positiva desempeñaría una función crucial en procesos deletéreos de GBM (Reimunde et al., 2021).

Paralelamente a la modulación de las vías de señalización oncogénicas y a los supresores de tumores, se ha demostrado que los microARNs regulan la expresión de genes metabólicos clave en el contexto del GBM. Al dirigirse a proteínas o enzimas clave que tienen papeles fundamentales en procesos como la glucólisis, la fosforilación oxidativa y el metabolismo de los lípidos, varios microARN pueden contribuir al cambio metabólico característico en el GBM.

Conociendo la gran implicación de los microARNs en los mecanismos moleculares que generan la aparición del GBM, no cabe duda de que un mayor conocimiento y comprensión de estos procesos llevarán a la aparición de nuevas posibilidades para la terapia frente el GBM (Reimunde et al., 2021).

1.3. Diagnóstico y tratamiento

Los glioblastomas son tumores infiltrativos, de márgenes irregulares sólidos y centro necrótico. Preferentemente se localizan a nivel supratentorial, con tendencia a afectar a la sustancia blanca subcortical y a los núcleos profundos de sustancia gris (Kim et al., 1996).

Por frecuencia, los lóbulos más afectados son el temporal y el frontal, normalmente como una lesión, aunque pueden encontrarse varias lesiones, en cuyo caso podremos distinguir dos tipos:

- GBM multifocal: múltiples lesiones interconectadas por parénquima.
- GBM multicéntrico: varios focos tumorales con parénquima no afecto entre ellos. Se consideran tumores sincrónicos (Kim et al., 1996).

En general, para diagnosticar un tumor cerebral necesitaremos la combinación de varias pruebas que nos permitirán determinar de la forma más precisa el diagnóstico, grado de actividad y extensión del tumor (SEOM, 2019).

Dentro de los métodos diagnósticos más relevantes destacaríamos, por una parte, la exploración física y neurológica, las cuales consisten en la valoración por parte del médico de la situación clínica y de los diferentes signos y síntomas del paciente, lo que permitirá tener una primera idea sobre la afectación neurológica y decidir que pruebas

efectuar. Dentro de este tipo de exploración se incluyen pruebas y aspectos básicos como movimientos de los ojos, visión, oídos, reflejos, coordinación y otros sentidos, entre otros (SEOM, 2019).

Por otra parte, las pruebas radiológicas se corresponden con técnicas de imágenes, imprescindibles para el diagnóstico de tumores cerebrales. Permiten conocer y determinar la extensión del tumor, número de lesiones, tamaño y zonas afectadas. A mayores posibilita detectar complicaciones secundarias como hemorragias (SEOM, 2019)

En el pasado, técnicas como la angiografía cerebral y la tomografía axial computarizada (TAC) fueron la base del diagnóstico de tumores cerebrales. En la actualidad, los estudios de imágenes más utilizados para realizar el diagnóstico del GBM son la resonancia magnética (RM), la resonancia magnética funcional (RMf), la espectroscopía por resonancia magnética (MRS) y la tomografía por emisión de positrones (PET). Todos estos métodos de imagen proveen la posibilidad de realizar un diagnóstico más preciso y estudiar la relación de la lesión tumoral con respecto a áreas cerebrales funcionales, lo que contribuye a un mejor planteamiento quirúrgico y una menor morbilidad postoperatoria (Lázaro & Ojeda, 2020.).

La resonancia magnética es la prueba diagnóstica de primera elección en el caso de los tumores cerebrales. La imagen se obtiene empleando campos magnéticos y precisa la inyección de un producto de contraste. Permite la obtención de las imágenes más precisas de los tumores, tanto en cuanto a su número como en cuanto a la localización y características (Sociedad Española de Radiología Médica [SERAM], 2022; Lázaro & Ojeda, 2020.).

La tomografía por emisión de positrones permite visualizar y cuantificar múltiples procesos bioquímicos de las células tumorales. Es una prueba que aporta información complementaria a pruebas como la RM. Puede determinar la extensión del tumor, sus características de comportamiento e incluso evaluar la eficacia de tratamientos y sus secuelas (Duclos et al., 2021; Lázaro & Ojeda, 2020.).

Por último, la biopsia es una prueba esencial para efectuar el diagnóstico. Es la única prueba que permite llevar a cabo el análisis al microscopio de una muestra del tumor para confirmar con seguridad el diagnóstico definitivo, lo que es imprescindible para planificar el tratamiento. En la biopsia se detectan células tumorales, su tipo y su agresividad. Para la realización de la biopsia ha de realizarse una toma de muestras, bien sea mediante una pequeña incisión en el cráneo y extrayendo la muestra con una aguja en una localización determinada previamente mediante técnicas de imagen (biopsia estereotáxica) o bien la muestra se toma en el propio momento de la cirugía (biopsia con cirugía abierta) (Lázaro & Ojeda, 2020; SEOM, 2019).

El tratamiento para un paciente con un tumor cerebral constará de una terapia específica para el tumor a la vez que un tratamiento para aliviar los síntomas causados por este (dolor de cabeza, pérdida de funciones motoras, sensitivas...). El tratamiento específico

usualmente comienza con una cirugía para extirpar la mayor parte del tumor posible, seguido de sesiones de radioterapia y quimioterapia (Kumari et al., 2023).

La cirugía es una de las principales herramientas y, en general, la primera en utilizarse para el tratamiento de la mayoría de los tumores cerebrales, siendo, en algunos casos, suficiente para controlar la enfermedad. La cirugía de GBM tiene como objetivo lograr una resección máxima dentro de un nivel de seguridad, evitando afectar a las funciones cerebrales. Dado que el GBM puede extenderse ampliamente a través de varias regiones cerebrales distintas, la resección del tumor requiere de una gran competencia neuroquirúrgica. Después de la cirugía del glioma, la extensión de la resección (EOR) es el factor crucial que indicará el pronóstico del paciente. En aquellas cirugías en las que la resección del tumor es completa, el pronóstico mejora significativamente. En varios estudios se ha comprobado que la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión están correlacionadas positivamente con el aumento de la EOR en pacientes de GBM. A mayores, la cirugía permite descomprimir los tejidos sanos (Kumari et al., 2023; SEOM, 2019).

Hay en día, la cirugía cuenta con nuevas tecnologías al igual que con técnicas novedosas que permiten realizar resecciones más completas con menor riesgo de secuelas. Entre las técnicas más empleadas por los neurocirujanos se encuentra la cirugía guiada por fluorescencia empleando ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) (Picart et al., 2019). La iMRI o resonancia magnética intraoperatoria, es una técnica complementaria que permite aumentar la precisión quirúrgica y la cual ha mostrado mejores pronósticos y una mejor EOR en comparación con casos en los que no se haya empleado. Otras técnicas auxiliares como la radioterapia intraoperatoria (IORT) o el microscopio confocal intraoperatorio (CIM) junto con las anteriormente mencionadas se corresponden con técnicas que tienen como objetivo incrementar la EOR y el pronóstico de los pacientes (Kumari et al., 2023).

Al final de la cirugía, se realizará una resonancia con la que el neurocirujano podrá estudiar el resultado de esta y que servirá de base para ver la evolución del tumor y el efecto de los diferentes tratamientos posteriores (SEOM, 2019).

La radioterapia es otra herramienta fundamental para el tratamiento de tumores cerebrales. Consiste en el envío de partículas ionizadas de alta energía contra las células del tumor con el objetivo de producir daños en el material genético de estas tratando de facilitar la muerte celular. Como consecuencia de este tratamiento, el tejido sano que rodea el tumor puede ser dañado. Para minimizar este efecto, se fraccionan las dosis a lo largo de varios días o semanas (SEOM, 2019).

Para pacientes menores de 70 años, se utiliza la radioterapia estándar o radiación de haz externo (RHE), y para aquellos con una edad superior a los 70 años y para pacientes con un mal pronóstico, se suele recomendar radioterapia hipofraccionada (HFRT). en la actualidad se continúa probando la radioterapia combinada con quimioterapia, inmunoterapia, biológicos, compuestos naturales, etc., con el fin de tratar mejorar la eficacia y el bienestar de los pacientes con GBM (Kumari et al., 2023).

Otra herramienta empleada para tratar los tumores cerebrales es la quimioterapia. Comúnmente se denomina quimioterapia al conjunto de fármacos empleados para el tratamiento específico del cáncer. En la actualidad, también se suman a la quimioterapia nuevos medicamentos como son los biológicos, los cuales son fármacos que tienen una diana concreta que podemos determinar y contra la que van dirigidos (Zhou et al., 2022). Hoy en día, en los esquemas de tratamiento quimioterápico, se combinan tanto quimioterápicos clásicos como medicamentos biológicos, puesto que combinados han demostrado mejorar su efectividad (SEOM, 2019).

El objetivo principal de la quimioterapia es destruir las células tumorales. En el caso de los tumores cerebrales existen dos dificultades importantes en cuanto al tratamiento con fármacos, estos son la existencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual actúa como barrera natural que protege al sistema nervioso central de sustancias tóxicas, y la resistencia del propio tumor a los fármacos antitumorales (SEOM, 2019).

En la actualidad, los pacientes con GBM tienen acceso a cuatro fármacos quimioterápicos: temozolamida (TMZ), carmustina, lomustina y ciclofosfamida (Kumari et al., 2023).

El potencial terapéutico de la TMZ depende de su capacidad para alquilar o metilar el ADN. En un ensayo en el que participaron 573 pacientes, la TMZ combinada con radiación aumentó de forma sustancial la mediana de supervivencia de los pacientes (27,2% frente a un 10,9% únicamente con radioterapia durante dos años). Además, se ha visto que metilación del promotor en MGMT actúa como biomarcador de pronóstico positivo para la quimioterapia con TMZ (Yang et al., 2015). La carmustina actúa como fármaco alquilante creando enlaces cruzados entre las hebras de ADN, impidiendo la transcripción o replicación del ADN. La lomustina es un fármaco alquilante que afecta a la reticulación ADN y metila los grupos amino. Por último, la ciclofosforamida puede reticular y alquilar al ADN, afectando a su función (Kumari et al., 2023).

Tanto la quimioterapia clásica como las terapias biológicas presentan efectos secundarios, siendo los efectos desde náuseas, vómitos, cansancio, pérdida del apetito, hasta leucopenia (pérdida de glóbulos blancos), anemia, plaquetopenia, etc. (SEOM, 2019).

1.4. Pez cebra como animal modelo para el xenotrasplante

Para la investigación, los sistemas *in vitro* han sido esenciales y han experimentado avances significativos en cuanto al estudio del cáncer y de su biología molecular. Sin embargo, los sistemas *in vivo* portadores de tumores siguen siendo necesarios para poder recrear el ambiente tumoral, tal como puede ser la interacción entre células tumorales e inmunitarias, factores endócrinos o metabólicos que alteren el desarrollo tumoral, al igual que son esenciales para el estudio de la farmacocinética, la biodistribución de quimioterápicos o eficacia de nuevos medicamentos (Reimunde et al., 2021).

A pesar de que los roedores, principalmente ratones, son el modelo animal más utilizado para estudios *in vivo*, cada vez más el pez cebra está siendo más utilizado para modelizar enfermedades como el cáncer o descubrir nuevos fármacos. El éxito del pez cebra como

organismo modelo viene dado por sus características biológicas inherentes y por cuestiones económicas (Fig. 5) (Cabezas-Sáinz et al., 2020; Fontana & Van Doan, 2024):

1. Alto nivel de fecundidad y rápido desarrollo. El alto número de embriones proporcionados por un único cruce, lo hace un animal capaz de proporcionar un alto poder de análisis estadístico.
2. Gran homología funcional y estructural entre el pez y el humano, compartiendo entre un 76 y un 82% de genes relacionados con enfermedades humanas.
3. Rápida y sencilla generación de mutantes y modelos transgénicos, siendo valiosas herramientas para el estudio de diferentes enfermedades, incluyendo neoplasias malignas.
4. Los embriones no presentan sistema inmune adaptativo durante los primeros 12-14 días de desarrollo.
5. Obtención de embriones y mantenimiento muy asequible.
6. Embriones transparentes, lo que permite visualizar y estudiar las células tumorales y su posible metástasis.
7. Muy útiles para la realización de ensayos de toxicidad y exposición a drogas. Únicamente añadiendo la sustancia a estudiar en el medio en el que esté el embrión se podrá realizar el estudio, requiriendo bajas concentraciones de tóxico y poco volumen de medio.
8. Permite la realización de xenotrasplantes sin exigir un gran número de células.
9. Permite la realización de ensayos de alto rendimiento.

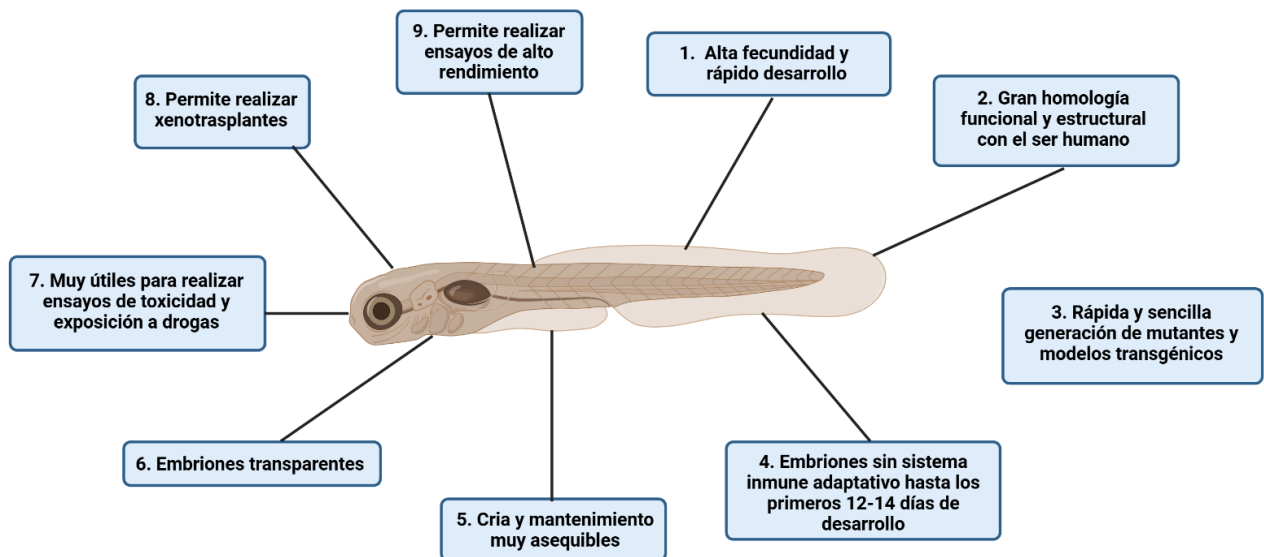


Figura 5. El pez cebra como modelo de xenotrasplante y sus ventajas (adaptado de Fontana & et Van Doan, 2024)

El xenotrasplante o *xenograft* es una técnica que consiste principalmente en trasplantar a un hospedador, células, tejidos u órganos de una especie diferente. El xenotrasplante en el pez cebra consiste en inyectar células tumorales marcadas en distintas posibles regiones del embrión de pez cebra y realizar un seguimiento sobre la evolución celular, comportamiento y estado de los embriones (Wyatt et al., 2017).

Se ha visto que el estadio ideal para inyectar los embriones es a los 2 días post-fertilización (dpf), ya que en ese momento del desarrollo los embriones todavía no tienen sistema inmune adaptativo lo que ayudará a la supervivencia de las células inyectadas (H. Meijer & P. Spaink, 2011). Además, los embriones son transparentes, lo que permite hacer un seguimiento de las células teñidas inyectadas pudiendo registrar la fluorescencia (Cabezas-Sáinz et al., 2020).

Otro factor importante es el sitio de inyección, el cual dependerá del tipo de célula a inyectar y la intención del estudio. Los principales sitios de inyección son (Fig. 6): (1) el saco vitelino es un compartimento acelular compuesto por lípidos del que el embrión se alimenta durante los 5 primeros dpf. (2) El ducto de Cuvier, o vena cardinal común, permite la inyección de células directamente a la circulación, por lo que es el sitio de inyección ideal para el estudio *in vivo* de procesos como la migración y la invasión. Las células son capaces de sobrevivir, dividirse, invadir y extravasarse cerca del tejido hematopoyético caudal (CHT), ubicado en la cola del embrión. (3) El espacio perivitelino está situado entre la peridermis y la capa sincitial del vitelo. Es avascular, por lo que la inyección de células tumorales permite identificar la formación de nuevos vasos. (4) Las inyecciones en la cavidad intraperitoneal se realizan en peces adultos, que sí tienen sistema inmune adaptativo. Normalmente este tipo de inyección se realiza en una línea de peces inmunocomprometidos (línea mutante Rag2), los cuales tienen cantidades reducidas de células T y B. De esta forma no se produce rechazo a las células humanas (Cabezas-Sáinz et al., 2020).

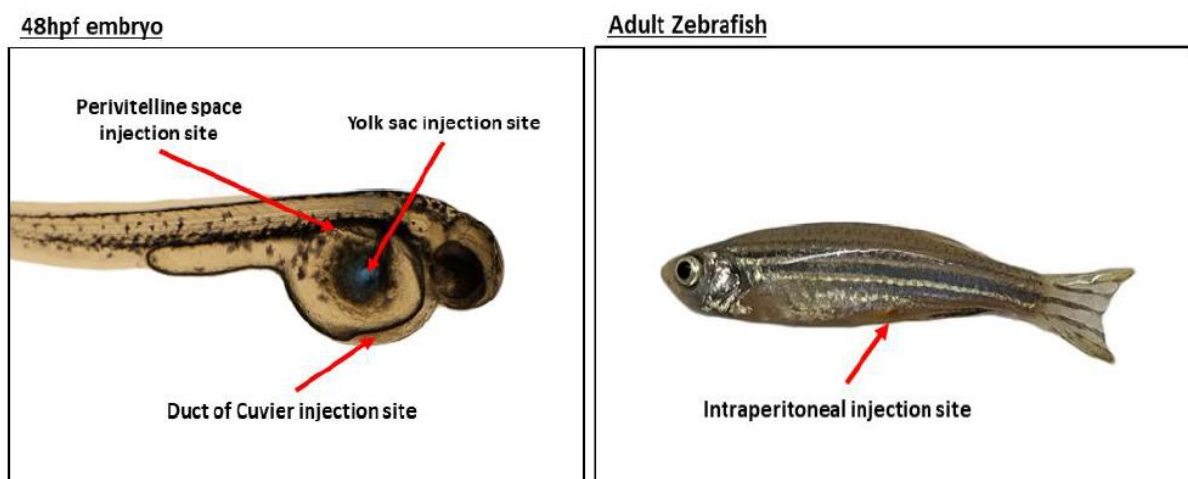


Figura 6. Principales sitios anatómicos de inyección en pez cebra (Cabezas-Sáinz et al., 2020).

Uno de los principales inconvenientes realizar *xenograft* con células humanas en pez cebra es la temperatura de incubación. Mientras que la temperatura ideal para el desarrollo

del pez cebra son los 28 °C, la temperatura óptima de proliferación y biológica para las células humanas es de 37 °C (Vittori et al., 2015). Es por ello por lo que se ha tratado de encontrar un punto de balance en el que ambas partes se puedan desarrollar sin demasiadas dificultades. La temperatura que se ha estandarizado como ideal para esta técnica son los 34 °C, a cambio de reducir el tiempo de incubación a entre 3 y 6 días (Cabezas-Sáinz et al., 2020).

2. Objetivos

El eje central de este proyecto consiste en la evaluación del potencial terapéutico de un compuesto novedoso (GBM48) para glioblastoma multiforme y a su vez comprobar la utilidad del pez cebra como animal modelo para la realización de ensayos *in vivo* de dicho tumor.

A continuación, se muestran, de forma desglosada y más detallada, los objetivos esenciales del estudio:

1. Evaluar la toxicidad del novedoso compuesto antitumoral (GBM48) y determinar la dosis sin efecto adverso observable (NOAEL) en embriones de pez cebra.
2. Desarrollar un modelo *in vivo* del GBM mediante la inyección de una línea tumoral establecida de GBM (U251wt) en embriones de pez cebra.
3. Validar la viabilidad del pez cebra como modelo preclínico para la evaluación de compuestos antitumorales mediante el análisis del efecto terapéutico del GBM48.

3. Materiales y métodos

3.1. Mantenimiento, cuidado y obtención de embriones de pez cebra

Los embriones de pez cebra fueron obtenidos del cruce de ejemplares adultos wild-type (WT), los cuales se encontraban en el animalario del Centro de Biomedicina y Veterinaria (Cebiovet), situado en los pabellones anexos al Hospital Veterinario Universitario Rof Codina, en la Facultad de Veterinaria del Campus de Lugo. Los peces estaban dispuestos en sus respectivas peceras, situadas en baldas conectadas por un sistema de tuberías que conformaban un sistema de renovación constante de agua impulsado por una bomba.

Se mantuvieron a una temperatura de 28°C y expuestos a ciclos de luz y oscuridad de 14 y 10 horas, respectivamente. Las condiciones relativas a la protección y cuidado de los animales fueron respetadas tal y como está estipulado por la Directiva 2010/63/UE (*Directive - 2010/63 - EN - EUR-Lex*, 2010).

Para la obtención de los huevos, se prepararon peceras con parideras. En ellas, la proporción recomendada de machos y hembras es de 2:1. El desove fue estimulado por

la exposición a la luz, después de pasar la noche en total oscuridad, una hora antes de la recogida de los huevos.

Los huevos se recogieron en placas de Petri 140 mm x 20 mm (DeltaLab, España) con agua de ósmosis autoclavada. A posteriori, se seleccionaron e incubaron a 28°C para, pasados 2 o 3 días, ser empleados en ensayos de xenotrasplante y/o toxicidad.

La selección de los huevos se realizó el día de la puesta. Con la ayuda de un microscopio óptico y una pipeta pasteur, se seleccionaron aquellos huevos que estén fecundados. Los huevos fecundados al microscopio se pueden visualizar de tal manera que, sobre el vitelo, se observen un cúmulo de células, preferentemente se seleccionaron aquellos en fase de blastodisco ya diferenciado.

3.2. Ensayos de toxicidad

El compuesto empleado para este proyecto se trata de un compuesto novedoso conocido como GBM48, este fue diseñado con el fin de tratar el GBM humano y no se conocen datos a cerca de él, a excepción de su masa molecular (496,9306 g/mol), puesto que está pendiente de patente. Para determinar la dosis sin efecto adverso observable (NOAEL) del GBM48, para su posterior aplicación en los ensayos de xenotrasplante, se realizaron ensayos de toxicidad en embriones de 3 dpf siguiendo el protocolo modificado de Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, donde se realizó un seguimiento del estado de los embriones (Fig. 7). (Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 2013)

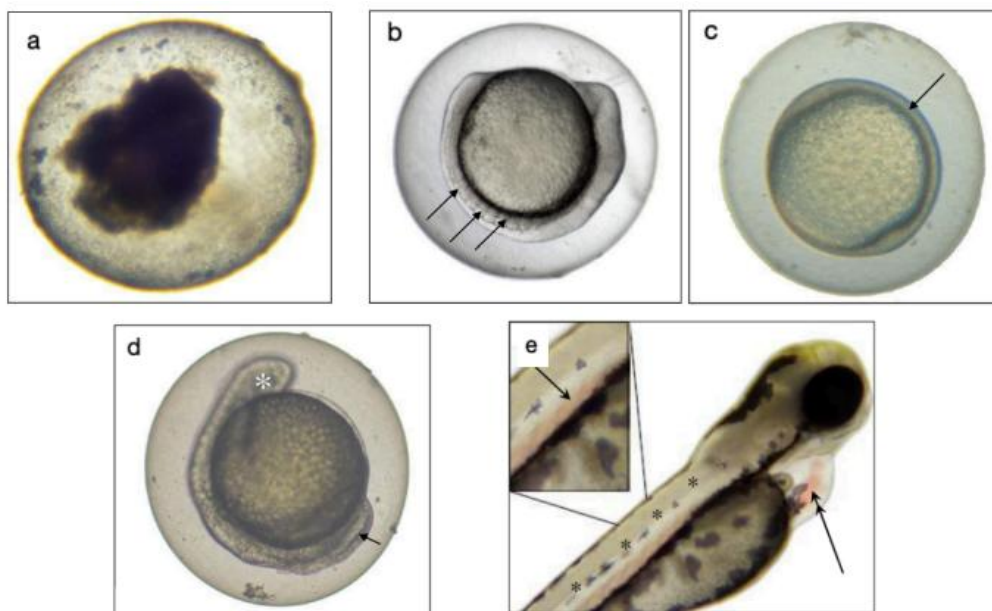


Figura 7. Indicadores de letalidad empleados por el Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (OECD 236 – 2013). (a) Presencia de coagulación en los huevos fertilizados (opacidad). (b) Formación correcta de los somitas (flechas). (c) Ausencia de formación los somitas (flecha). (d) No separación de la cola con el vitelo (flecha). (e) Carencia de latido o pulso cardíaco. (Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test).

3.2.1. Protocolo

El protocolo diseñado por la OECD consiste en una prueba para determinar la toxicidad de agentes químicos en embriones de pez cebra durante 120 horas después de la exposición inicial a la sustancia química.

Puesto que el compuesto empleado para este estudio es totalmente novedoso y no se disponía de información sobre su toxicidad, se realizaron una serie de pruebas piloto con las que se estimarían las concentraciones empleadas en el ensayo toxicológico. Una vez estimadas las concentraciones que serán empleadas se realizan las pruebas de toxicidad:

1. En primer lugar, se depositó un embrión, procedentes de la placa de embriones seleccionados, en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Thermo Scientific™). Cada embrión fue dispuesto en el pocillo empleando una micropipeta, con la punta cortada para permitir aspirar el embrión, con un volumen de 100 μ l.
2. A continuación, se añadieron otros 100 μ l correspondientes a cada una de las concentraciones, en orden creciente, en cada una de las filas de la placa (Fig 8). En el caso de la fila de control, los 100 μ l se corresponden con una disolución previamente preparada con una concentración de 0,975% de dimetilsulfóxido (DMSO). Las disoluciones del compuesto correspondientes a cada concentración son preparadas en viales de borosilicato de 8 ml (Fisherbrand™) para evitar que el compuesto se adhiriera a las paredes del frasco. Tanto estas disoluciones, como la de agua y DMSO, fueron preparadas al doble de la concentración deseada, ya que al añadir 100 μ l de la disolución en los 100 μ l de agua de ósmosis con el embrión, se obtuvo la concentración final. En el caso de las filas control, se buscó una concentración de DMSO del 0,975%, ya que se corresponde con el nivel más alto de DMSO empleada en las filas del compuesto, correspondida con la concentración más alta, 500 μ M.
3. Finalmente, se realizó un seguimiento toxicológico del estado de los embriones hasta los 5 dpf.

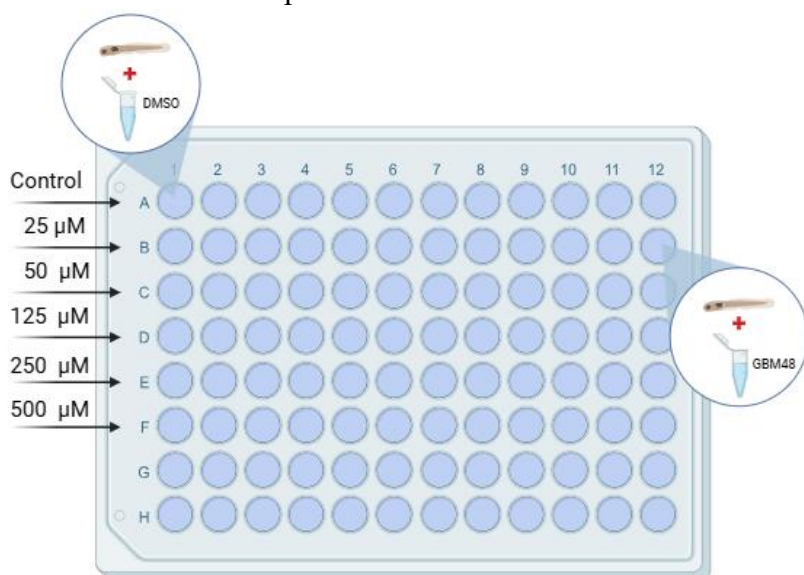


Figura 8. Preparación de la placa de 96 pocillos para realizar los ensayos de toxicidad. En la primera fila, los pocillos se cargan con agua + DMSO al 0,975%. El resto de pocillos se rellenaron con concentraciones crecientes de GBM48 como se indica en la figura (creado con BioRender.com (2025)).

3.3. Cultivo celular

Para este estudio se cultivó la línea celular establecida U251 wt, procedente de un tumor humano de GBM.

El procedimiento seguido se corresponde con el protocolo empleado por el Departamento de Genética de la USC del Campus de Lugo. Fue realizado bajo la máxima precaución posible, tratando de evitar posibles contaminaciones en los cultivos. Por ello, fue llevado a cabo en una cabina de bioseguridad de tipo II (Telstar BV-100), compuesta por un flujo laminar y varios filtros HEPA, de tal forma que tanto el operario como los cultivos y materiales estuvieron protegidos de cualquier tipo de contaminación que se pudiera haber dado durante la actividad.

Previamente a la realización del pase celular, la cabina de trabajo (Telstar BV-100) fue irradiada durante media hora con luz ultravioleta (UV) y, posteriormente, tanto el interior de la cabina (Telstar BV-100) como los materiales que entran en ella, incluidos las manos del operario, fueron desinfectados con etanol al 70%. A continuación, se procedió a realizar el pase o subcultivo (Fig.9):

1. Primeramente, se observó al estereomicroscopio de fluorescencia (Nikon) el nivel de confluencia del cultivo, el cual debería de ser en torno al 70-80% para realizar el pase.
2. Se puso a calentar al baño maría (J.P. Selecta, S.A) tanto el medio de cultivo como la tripsina, previamente sacados de la cámara fría (Kide), durante unos 20 minutos a 37°C.
3. Pasado el tiempo, se trasladaron los materiales a la cabina (Telstar BV-100) junto con el frasco de células que se encontraba en el incubador a 37°C, habiendo sido desinfectados previamente. Ya en la cabina (Telstar BV-100), se retiró el medio antiguo con una pipeta pasteur, tratando de no aspirar las células que se pudiesen encontrar pegadas al fondo. Inclinando el frasco, se apoyó la punta de la pipeta en la pared opuesta a la monocapa celular, y se aspiró. El medio antiguo se desechó en un bote de residuos biológicos situado dentro de la cabina (Telstar BV-100).
4. Para disgregar las células, se añadieron 2 ml de tripsina. Esta enzima ayudó a romper las uniones intercelulares y desprendió las células del fondo del frasco. Se dejó incubar las células unos 3 minutos en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ para que actuase la tripsina.
5. Mientras transcurrieron los 3 minutos de incubación, se aprovechó para rotular los frascos donde se realizará el subcultivo, poniendo: nombre de la línea células, número de pase, volumen de células que se va a añadir, nombre del usuario que lo realizó y fecha.
6. Pasado el tiempo, se retiró el frasco de la incubadora, se comprobó que las células se hubiesen disgregado observando el frasco a contraluz y se pasó a la cabina (Telstar BV-100). En los casos en los cuales no se las células sueltas, se dieron un par de golpes secos en el frasco y se comprobaron de nuevo.

7. En los nuevos frascos, ya rotulados, se añadió el medio con la ayuda de una pipeta serológica y un aspirador automático. El volumen añadido fue la diferencia de 5 ml totales menos el volumen de células que deseamos agregar.
8. En el frasco antiguo, se neutralizó la tripsina añadiendo el mismo volumen de medio que volumen de tripsina hubiésemos añadido, proporción 1:1. Para asegurar que toda la tripsina se neutralice, se añadieron 3 ml de medio de cultivo.
9. Con la pipeta serológica se resuspendió el medio repetidas veces, dejando caer lo aspirado por la base del frasco para asegurar de que no quedasen restos de células pegados.
10. A continuación, se añadió el volumen deseado de células en el frasco correspondiente. En este caso, se añadieron 0,3, 0,5 y 1 ml en frasco con 4,7, 4,5 y 4 ml de medio, respectivamente.
11. Finalmente, los nuevos frascos se arrastraron cuidadosamente en forma de cruz por el suelo de la cabina (Telstar BV-100) para que la distribución de las células fuese uniforme en toda la base y se guardaron en el incubador.

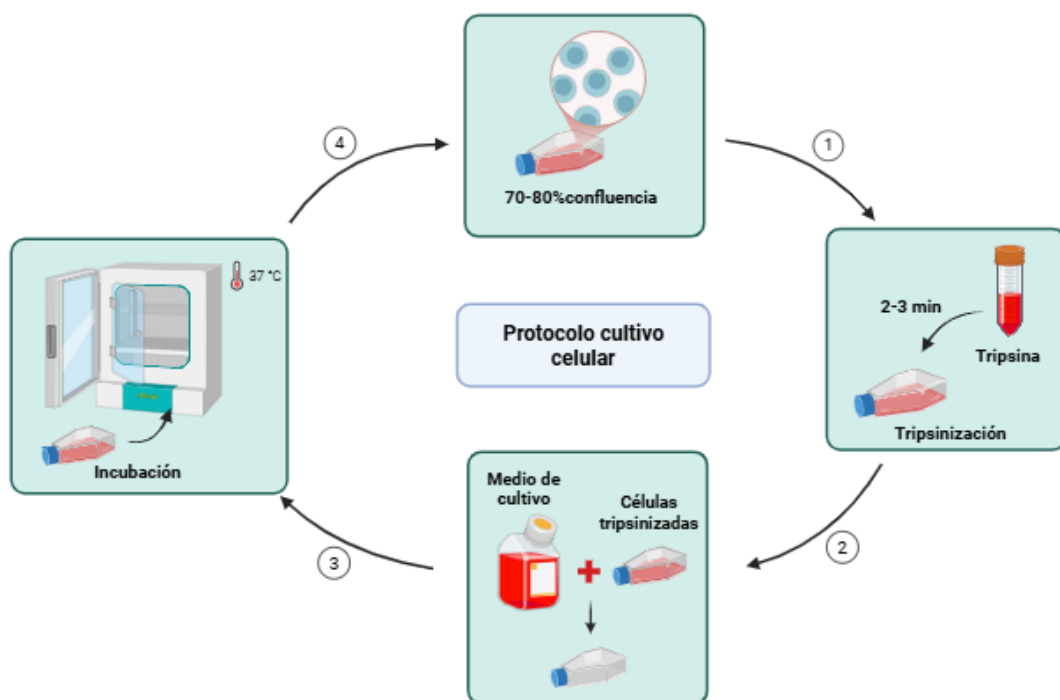


Figura 9. Protocolo de pase celular (creado con BioRender.com (2025)).

3.4. Ensayos de xenotrasplante

3.4.1. Protocolo de tinción celular

1. La cabina de cultivo celular (Telstar BV-100) fue preparada previamente como se ha explicado en el apartado de cultivo celular. Se introdujo el frasco seleccionado en la cabina (Telstar BV-100) junto con el resto del material.
2. Se desechó el medio antiguo al contenedor de restos biológicos y seguidamente se añadieron 2 ml de tripsina. Pasados unos 30 segundos, se retirarán de nuevo.

3. Se añadió 1 ml de tripsina y se introdujo el frasco en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ durante 3 minutos.
4. Mientras transcurrían los 3 minutos, se retuló el eppendorf con el nombre de la línea celular empleada, en este caso U251 wt.
5. Pasado el tiempo, se comprobó que las células se disgregaron de la base. Seguidamente, se añadió 1 ml de medio en el frasco para inactivar la tripsina.
6. A continuación, con una pipeta serológica y un aspirador automático, se resuspendió repetidamente, tratando de no formar burbujas, y seguidamente se añadió entre 1-1,5 ml al eppendorf.
7. El eppendorf con las células se introdujo en la centrífuga, la cual se puso a funcionar con un programa de 5 minutos, con una temperatura alrededor de los 20°C y a unas revoluciones de entre 1200 y 1500 rpm (aproximadamente a 189 g).
8. Pasado el tiempo de centrifugación, de nuevo en la cabina (Telstar BV-100), se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se desechó en el recipiente de residuos biológicos. A continuación, se añadió 1 ml de medio de cultivo nuevo y 5 µl del marcaje lipofílico Vybrant™ Dil por cada 10⁶ células resuspendidas. Una vez hecho esto, se dejó el eppendorf en la incubadora celular a 37°C durante 30 minutos. Tanto el marcaje lipofílico Vybrant™ Dil como el FBS/PVP al 2% se sacaron de la cámara fría (Kide) para atemperar durante el tiempo de espera de la centrifugación.
9. Transcurridos 30 minutos, se volvió a centrifugar el eppendorf que se encontraba incubando a 37°C con el mismo programa. Pasado el tiempo de centrifugación, en la cabina (Telstar BV-100), se retiró el sobrenadante lo máximo posible sin arrastrar ninguna célula, y se añadieron 10 µl de FBS/PVP al 2% y se homogenizó. De esta forma, las células ya estaban preparadas para ser inyectadas (Fig. 10).

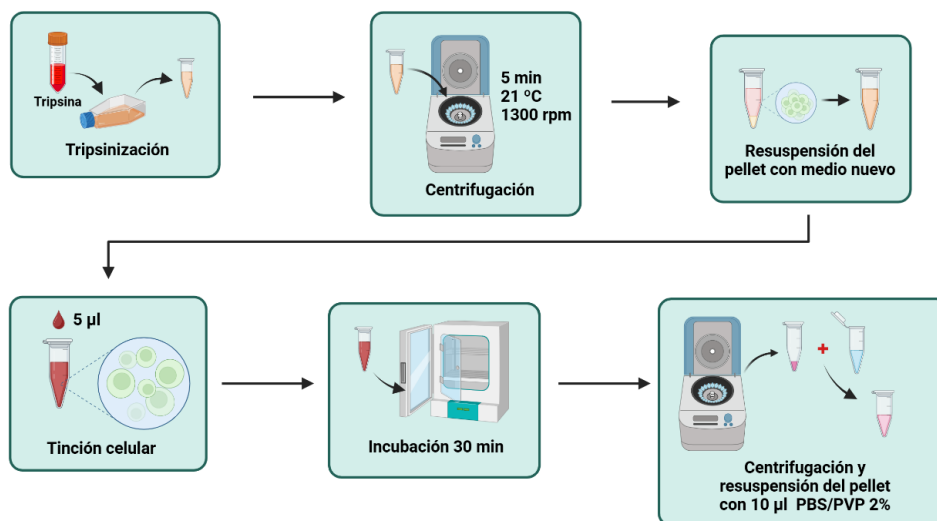


Figura 10. Protocolo de tinción celular lipofílica para xenotrasplante (creado con BioRender.com (2025)).

3.4.2. Protocolo de microinyección

Una vez preparadas las células, se preparó el material para inyectar. Esto incluye la preparación de las agujas de microinyección, una placa con un gel de agarosa al 2%, ajustar el microinyector IM-31 (Narishige, Japón) y micromanipulador MMN-33 (Narishige Japón) y abrir la bombona de N₂. Para fabricar las agujas se emplearon capilares de vidrio de borosilicato (Kwik-Fil™, World Precision Instrument, E.E.U.U.), a partir de los cuales se obtuvieron las agujas gracias a la acción del Puller PC-10 (Narishige, Japón). Para la preparación de la placa con el gel de agarosa, se añadió en una placa de Petri (DeltaLab, España) tampón TAE 0,5x junto con un 2% de agarosa, previamente calentado, y se dejó enfriar. A continuación, se describe el protocolo seguido (Fig. 11):

1. En primer lugar, se trasvasaron los embriones seleccionados de 48 horas postfertilización (hpf) a un vaso de precipitados, en un volumen aproximado de 20 ml de agua de ósmosis autoclavada. A ello se le añadieron entre 1-1,5 ml de tricaina (sal de metanosulfato de 3-aminobenzoato de etilo, Sigma-Aldrich®) al 4% para anestésarlos. A mayores, se preparó con agua de ósmosis y se rotuló una placa de Petri (DeltaLab, España) para añadir los embriones inyectados.
2. Seguidamente, se cargó la aguja de inyección con las células previamente marcadas con la ayuda de puntas de pipeta específicas para cargar microcapilares (Calibre Scientific). En el caso de que la parte final de la aguja no tuviese la apertura adecuada, se utilizaron unas pinzas para ajustarla.
3. A continuación, se colocó la aguja cargada en el micromanipulador MMN-33 (Narishige, Japón) y se ajustó la presión de inyección y de balance del microinyector IM-31 (Narishige, Japón). En este caso, la presión de inyección fue en torno a 15-25 kPa y la presión de balance a 0 kPa.
4. Después de comprobar que el anestésico haya surtido efecto, se colocaron sobre la placa de agarosa entre 5-10 embriones anestesiados.
5. Para microinyectar a los embriones, estos debieron de estar colocados de tal forma que el vitelo quedase hacia el lado opuesto de la aguja. Con ayuda del micromanipulador MMN-33 (Narishige, Japón) y moviendo ligeramente la placa hacia la aguja, se inyectaron las células en el ducto de Cuvier, es decir, en la circulación del embrión.
6. Finalmente, los embriones inyectados se transfirieron a una placa de petri (DeltaLab, España), que previamente fue rotulada y preparada, con la ayuda de

una pipeta pasteur y se introduce en el incubador a 34°C para poder realizar un seguimiento de la proliferación y metástasis de las células.



Figura 11. Protocolo de xenotrasplante en embriones de pez cebra de 2 dpf (creado con BioRender.com (2025)).

3.5. Toma y análisis de imágenes

3.5.2. Toma de imágenes

Una vez microinyectados los embriones, cada embrión fue observado y fotografiado con la ayuda del estereomicroscopio de fluorescencia AZ-100 (Nikon) y el software NIS-Elements (Nikon) a 1 y 4 días dpi (Fig. 12). Las imágenes que se tomaron de los embriones se corresponden con fotos de la cola, una en blanco y negro y otra con un filtro de fluorescencia. De esta forma, sobre la foto en blanco y negro se superpondrá la imagen de las células con el marcaje fluorescente.

3.5.3. Análisis de imágenes

Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa QuantiFish, en su versión 2.2.1 (Stirling et al., 2020) (Fig. 12). El programa permitió analizar tanto la intensidad de fluorescencia como el área, en función de la cantidad de píxeles positivos que se encontraban por encima del umbral mínimo establecido manualmente (valor del umbral = 15), de cada embrión. Con los datos de estos dos parámetros, el programa calculó un valor de intensidad integrada. Estos datos fueron proporcionados por el programa en un documento en formato “.csv”, a partir del cual se realizó el análisis estadístico.

3.6. Tratamiento

El día 1 postinyección (1 dpi), una vez tomadas las imágenes, los embriones fueron repartidos en una placa de 24 pocillos (Thermo Scientific™) de 5 en 5. Se distinguirán filas control, únicamente los embriones en 2 ml de agua de ósmosis al 0,975% de DMSO, y las filas bajo tratamiento.

Para preparar los pocillos con tratamiento, se añadieron los 5 embriones y 1 ml de agua de ósmosis y, a continuación, 1 ml de la disolución del tratamiento al doble de la concentración deseada, este caso a 100 μ M ya que la concentración deseada son 50 μ M, y lo mismo se hizo en los pocillos de las filas control con 1 ml de agua de ósmosis y otro ml de agua al 1,95% de DMSO, ya que se desea un 0,95% de DMSO.

Una vez preparada la placa, se guardó en el incubador a 34°C hasta el día 4 postinyección. En los días intermedios, fue recomendable revisar la placa y limpiar los pocillos en los que hubiese muerto algún embrión. Además, también fue recomendable renovar el agua y la disolución de GBM48 (Fig. 12).

3.7. Análisis estadístico

Con los datos de fluorescencia obtenidos en los experimentos, se compararon las diferencias entre el grupo de control y el grupo de tratamiento con GBM48. Para ello se realizó una prueba t de Student, ya que se disponían de dos grupos de datos, los cuales ambos seguían una distribución normal. El análisis estadístico fue realizado mediante el software GraphPad Prism versión 8.0.2. El límite de significancia estadística se estableció en un valor $p < 0,05$ (Fig. 12).

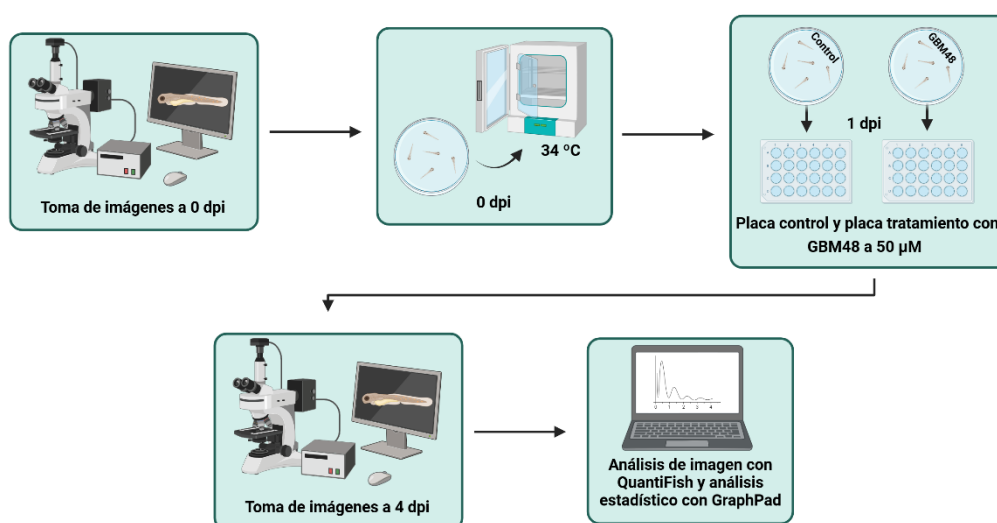


Figura 12. Resumen de los pasos para la toma y análisis de imágenes, tratamiento y análisis estadístico (creado con BioRender.com (2025)).

4. Resultados

4.1. La NOAEL del compuesto GBM48 fue de 50 µM con el FET adaptado a xenograft

Puesto que el compuesto GBM48 se trata de un compuesto novedoso el cual está pendiente de patentar, no se poseían datos acerca de su toxicidad. Para aproximar unas concentraciones para emplear en los ensayos de toxicidad se realizaron una serie de pruebas piloto. De cada una de las pruebas se realizó una réplica, en la cual por cada concentración se emplearon 6 embriones de 3 dpf y 6 embriones en la fila de control. De las 5 pruebas realizadas se decidió que las 5 concentraciones que se emplearían en los ensayos de toxicidad serían: 25 µM, 50 µM, 125 µM, 250 µM y 500 µM.

Una vez realizados los ensayos piloto se procedió a realizar los ensayos de toxicidad con las concentraciones previamente mencionadas, realizadas tal y como se muestra en la Figura 8. Los ensayos se realizaron bajo condiciones adaptadas al xenotrasplante, con embriones de 3 dpf, los cuales serán monitoreados los 5 días que dura el ensayo. Se realizaron un total de 5 réplicas, de las cuales, en función de la mortalidad (Fig. 13), se concluyó que la dosis sin efecto adverso (NOAEL) del GBM48 se correspondía con una concentración en torno a 50 μM . Por consiguiente, 50 μM fue la concentración empleada para la realización de los ensayos de xenotrasplante.

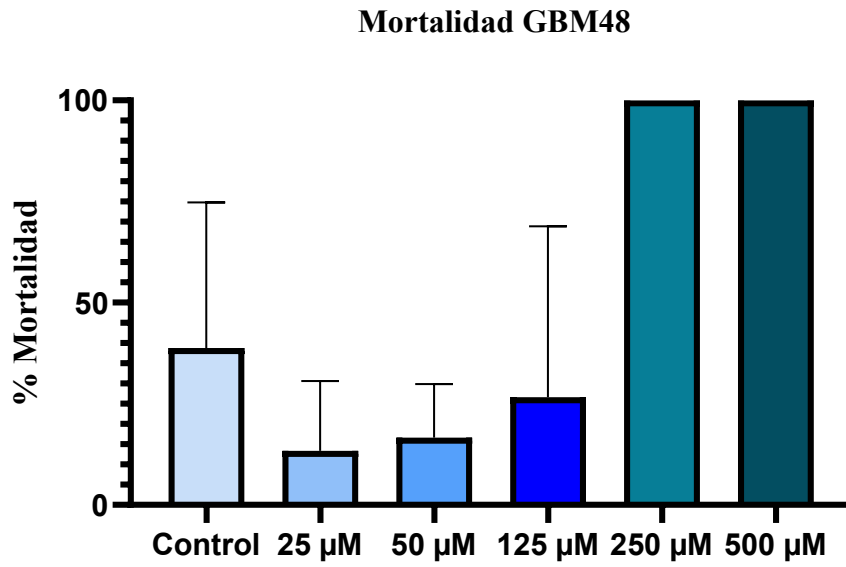


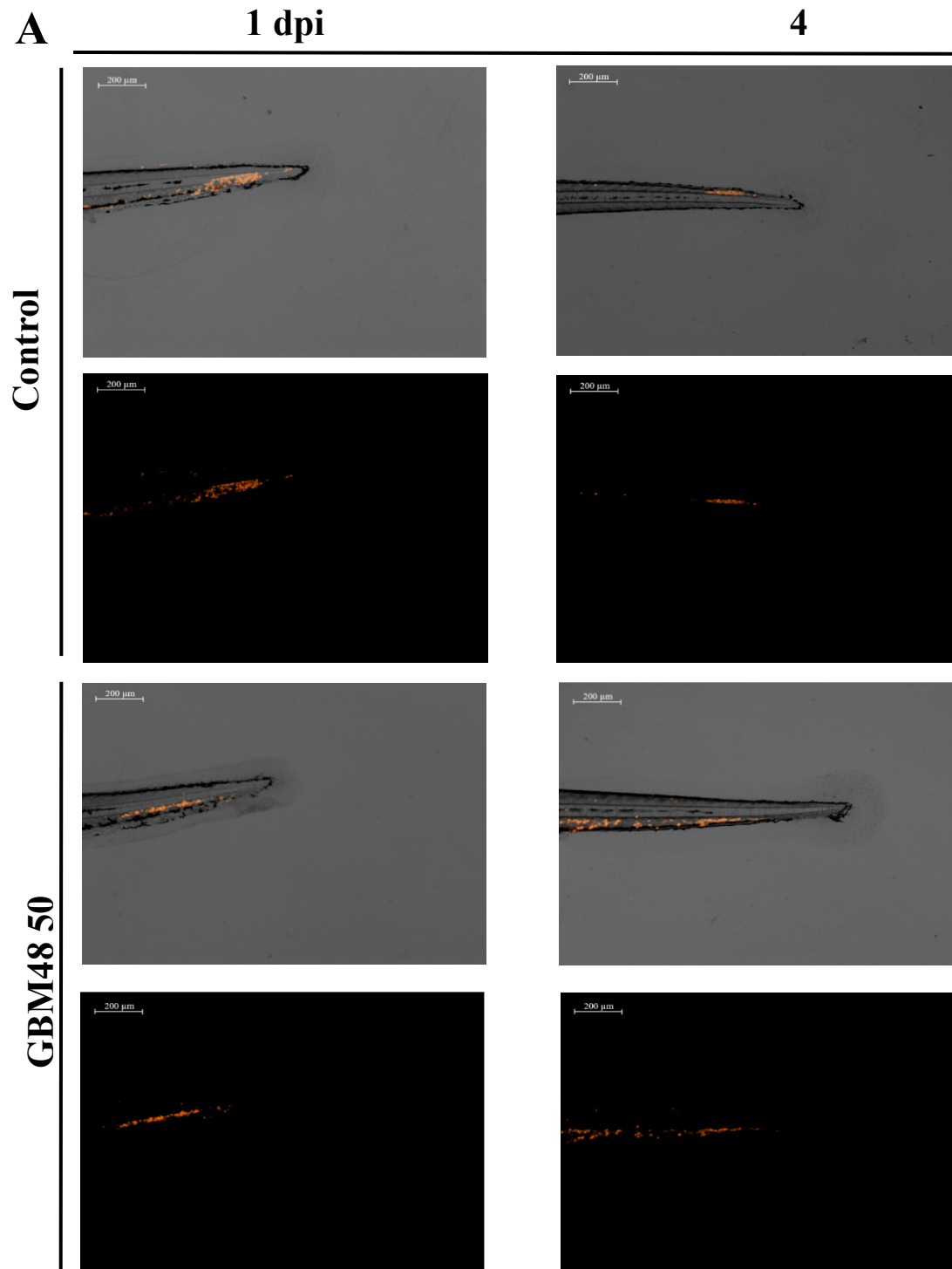
Figura 13. Porcentaje de mortalidad de embriones de pez cebra tras la exposición a diferentes concentraciones de GBM48 durante 5 días. En la gráfica se puede ver el % de mortalidad para cada una de las condiciones ensayadas a diferentes concentraciones ($\pm\text{DE}$, $n = 60$ embriones condición, a excepción del control donde $n = 132$ embriones)

4.2. El compuesto GBM no redujo la proliferación de la línea celular establecida de glioblastoma U251wt

Una vez realizados los ensayos de toxicidad y estimada la NOAEL del GBM48, se procedió a realizar los ensayos de xenotrasplante tratar a los embriones con GBM48 con el objetivo de evaluar la efectividad antitumoral frente a las células de la línea establecida de GBM humano U251wt. El efecto del compuesto fue comprobado mediante la realización de imágenes de los embriones a 1 dpi y 4 dpi empleando el estereomicroscopio de fluorescencia AZ-100 de Nikon, tanto en blanco y negro como únicamente capturando la fluorescencia de las células marcadas de manera que se pudo seguir la proliferación tumoral *in vivo* a lo largo del tiempo en las dos condiciones experimentales (control y tratamiento).

Tras la toma de imágenes, con la ayuda del programa QuantiFish (Stirling et al., 2020), se pudo cuantificar la señal de fluorescencia en cada embrión, pudiendo comparar la proliferación celular en cada condición experimental.

En general, los resultados obtenidos no mostraron una reducción significativa de la masa de células tumorales de la línea U251wt en los embriones tratados con GBM48 a 50 μ M a 4 dpi, sino que hay una diferencia significativa conforme aumentan, tal y como se puede observar en las imágenes y en la gráfica mostradas a continuación (Fig. 14).



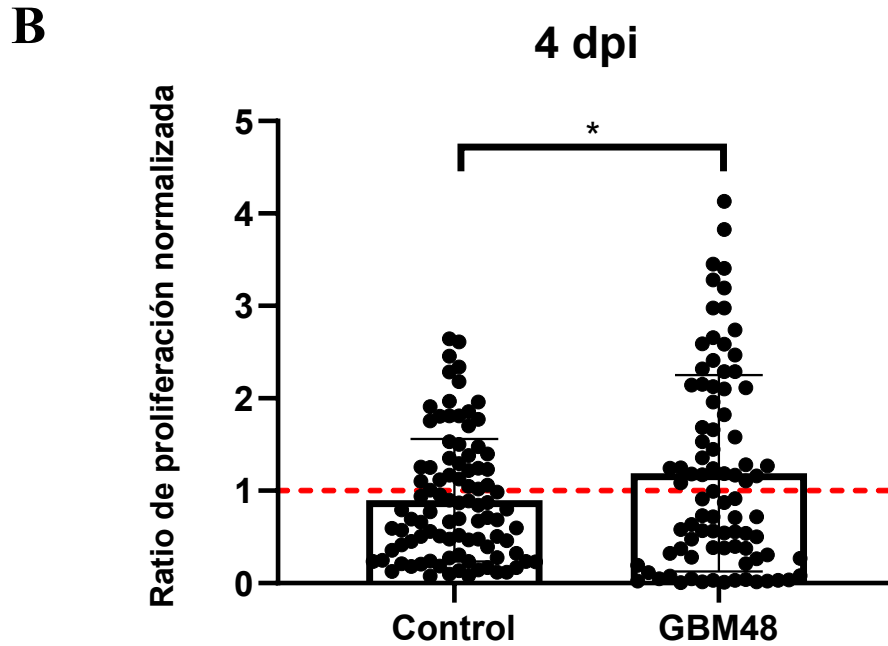


Figura 14. Efecto antitumoral del GBM48 frente a la línea celular establecida U251wt de GBM humano en pez cebra. A) Imágenes representativas de las células de la línea U251wt de GBM marcadas con DiI en embriones de pez cebra a 1 y 4 dpi tras haber sido expuestos a 50 μ M de GBM48. Escala = 200 μ m. B) Cuantificación de la ratio de proliferación celular normalizado junto con el error estándar de la media en embriones control y tratados con 50 μ M de GBM48 a 4 dpi (4 réplicas, n = 45-50 embriones/condición, $p^* < 0.05$).

5. Discusión

En la actualidad, la búsqueda de un tratamiento eficaz para el glioblastoma multiforme (GBM) se ha convertido en una tarea urgente. A pesar de los avances en la caracterización molecular de este glioma durante los últimos años, este es una neoplasia altamente agresiva y con un pronóstico devastador, el cual no acostumbra a superar el año de supervivencia tras recibir el diagnóstico (Cabezas-Sáinz et al., 2020).

En este contexto, este con este trabajo se pretende avanzar en la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos, concretamente empleando modelos *in vivo* alternativos como es en este caso el pez cebra, el cual presenta ventajas, especialmente logísticas, sobre otro tipo de modelos animales más tradicionales.

Siguiendo un orden cronológico y tomando como referencia los objetivos propuestos, se trató de evaluar la toxicidad del GBM48, un compuesto novedoso que actualmente se encuentra pendiente de patente y únicamente se conoce el peso molecular (496,9306 g/mol), y de conocer su NOAEL, es decir, su dosis sin efecto adverso observable. Los ensayos de toxicidad fueron realizados con embriones de pez cebra de 3 dpf en placas de 96 pocillos. Tras realizar una serie de pruebas piloto y, posteriormente, 5 réplicas del ensayo, la NOAEL estimada fue de 50 μ M. En la concentración superior, 125 μ M, hubo una gran variabilidad en las 5 réplicas en cuanto a la mortalidad, dándose casos en los que a penas había muertes, y en otros con una alta tasa de ellas. Es por ello por lo que la

elección fue 50 μM , a pesar de que es probable que a concentraciones intermedias con 125 μM , los efectos fuesen similares.

Durante la preparación de la disolución de stock de GBM48 se observó que, a las horas de prepararla, el compuesto se aglutinaba por las paredes del frasco. A mayores se pudo observar que la solubilidad en agua resultó relativamente dificultosa, puesto que fue necesario emplear métodos de agitación y de aplicación de calor previos a la preparación de los ensayos de toxicidad y de tratamiento. Por lo tanto, es posible que parte del compuesto de las disoluciones haya precipitado, reduciendo la concentración efectiva de la disolución preparada (la concentración real sería inferior a la calculada) al igual que el efecto del compuesto. Tanto los resultados de los ensayos toxicológicos como los de los tratamientos después del xenotrasplante se verían afectados en el caso de que esto hubiese ocurrido. Esto es algo recurrente en la bibliografía por lo que se pudo comprobar (Palmgrén et al., 2006).

Una vez realizados los ensayos de toxicidad, se prosiguió con lo que se corresponde con el núcleo del trabajo, los ensayos de xenotrasplante. Tras realizar el marcaje lipofílico de las células de la línea establecida de GBM U251wt, fueron inyectadas a embriones de 2 dpf en el ducto de Cuvier, de tal forma que en poco tiempo las células ya habrían metastatizado a la cola de los embriones. Las colas de los embriones inyectados fueron fotografiadas a 1 y 4 dpi, de tal forma que permitió realizar una comparativa entre los embriones control y los embriones bajo tratamiento, ambos inyectados con células de GBM. En los resultados se puede ver que la proliferación celular es mayor respecto a la condición control.

En cuanto a la absorción del fármaco, los ensayos de toxicidad realizados fueron mediante inmersión. Esto implica que la cantidad de compuesto que absorbe el animal no es posible de controlar, puesto que dependerá del embrión y de la naturaleza del compuesto. Como explican Bauer et al. (2021), la epidermis es un factor implicado en la absorción de compuestos, la cual permite el paso de moléculas diatómicas como el oxígeno, pero no lo hace con muchas moléculas de gran tamaño. A partir de las 60 hpf, la absorción oral adquiere cada vez más importancia en la absorción de compuestos. En el caso del GBM48, dado el desconocimiento a cerca de su estructura molecular y tamaño, cabe la posibilidad de que este se hubiese visto afectado por alguno de estos factores, lo cual implicaría que la dosis interna en animal sería muy baja y, en consecuencia, podría resultar en resultados falsos negativos.

A pesar de que los resultados obtenidos revelan un aumento en el crecimiento celular en el grupo de tratamiento respecto al grupo control, los ensayos de xenotrasplante fueron llevados a cabo a través de un protocolo modificado, debido a incompatibilidad de horarios y tiempo, reduciendo los días de tratamiento post-inyección del 6 dpi a 4 dpi. Es por ello por lo que puede darse el caso de que el propio compuesto promueva la proliferación tumoral, pudiendo causar daños en el sistema inmune innato del embrión y permitiendo un mayor desarrollo celular. Wehmas et al. (2016) observaron que empleando un compuesto antitumoral para GBM en peces cebrá, unas nanopartículas de óxido de

zinc, del cual se esperaba ver una actividad citotóxica, aumentó la proliferación y la migración celular un 19 y 35% respectivamente. Poniendo el caso como ejemplo y dado que no se ha cumplido el protocolo estrictamente tratando los embriones hasta los 6-7 dpi, no se puede confirmar con seguridad que el GBM48 no tenga efectos antitumorales.

En los experimentos de inmunotoxicidad tanto de Wei et al. (2024) como de Lu et al. (2023) se testaron los efectos tóxicos de una serie de compuestos, la emacimectina de benzoato (EMB) y el fármaco Nitazoxanida (NTZ) respectivamente, en embriones de pez cebra. En ambos estudios se marcaron con fluorescencia las células del sistema inmune innato (macrófagos y neutrófilos) y los embriones fueron sometidos a diferentes concentraciones crecientes de los compuestos. Los resultados coincidieron en una reducción significativa de las células inmunes, en el caso de la NTZ también se redujo el timo, siendo mayor la reducción de las células inmunes a mayor concentración del compuesto. Contrastando estos resultados con los obtenidos en este trabajo, se puede contemplar la posibilidad de que el GBM48 pudiera causar los mismos daños en el sistema inmune innato de los embriones de pez cebra, permitiendo a las células tumorales de GBM proliferar con más facilidad, en contraposición a los embriones control, en los que el sistema inmune actuaría contra las células tumorales, reduciendo el crecimiento de estas.

Respecto al sitio de inyección de los embriones, como ya se ha explicado, fue realizada en el ducto de Cuvier, es decir, directamente en la circulación del embrión. Sin embargo, el hecho de que las células inyectadas provengan de un tumor cerebral lleva a la idea de realizar la inyección ortotópica directamente en el cerebro del animal, proporcionando un factor más realista en el experimento. Ai et al. (2022) comprobaron que mediante xenotrasplantes ortotópicos en peces cebra las células reproducen adecuadamente las características del GBM, mostrando patrones patológicos iguales que en modelos murinos. Además, mediante scRNA-seq, se observó un perfil de expresión génica distinta a cultivos *in vitro*, mostrando un aumento en la expresión de genes relacionados con la migración celular y la hipoxia.

En cuanto a los datos analizados de la fluorescencia, no se descarta la posibilidad de una sobreestimación a cerca de la intensidad de esta. Dryer et al. (2023) analizaron y compararon diferentes ensayos de xenotrasplante, por una parte, empleando células con fluorescencia GFP constitutiva, y por la otra, empleando células con marcadas con DiI. En este segundo, se observó que el área del tumor se sobreestimaba significativamente con este tipo de marcaje en comparación con las células con GFP constitutivo. La razón podría ser debida a la transferencia de las moléculas de DiI de las células cancerosas no viables a los tejidos del hospedador, reteniendo la fluorescencia.

Por último, en vista a perspectivas de futuro respecto al pronóstico para el GBM son pobres a pesar del enorme esfuerzo por parte de la comunidad científica y de todos los avances habidos en el tratamiento para este glioma. Los estudios preclínicos *in vivo* son y serán esenciales para el desarrollo de un nuevo terapéutico al igual que también lo son para el análisis de las características biológicas y moleculares del GBM. En este contexto,

los modelos de xenotrasplante en pez cebra ha sido empleados dando lugar a exitosos resultados, generando nuevo conocimiento a cerca de esta patología. Tanto como para el caso, como en general, los modelos de pez cebra transgénicos y xenotrasplantados son una potente vía futura de evaluación de alteraciones de procesos biológicos relacionados con el GBM y de testar posibles nuevos diagnósticos y quimioterápicos frente este tumor invasivo (Alberti et al., 2024).

6. Conclusión

Con este trabajo se ha podido confirmar la utilidad del pez cebra como animal para la investigación preclínica, concretamente en el desarrollo de nuevas terapias contra el GBM y sirviendo de hospedador ideal para células de GBM, permitiendo el estudio de estas con los embriones. Las conclusiones a las que se ha llegado en este estudio son las siguientes:

- El pez cebra es un organismo válido para la realización de ensayos toxicológicos *in vivo*, posibilitando conocer la NOAEL del compuesto de estudio, GBM48.
- El pez cebra es un modelo válido para el estudio de la proliferación y metástasis de la línea celular establecida de GBM humano U251wt.
- La línea celular establecida U251wt resistió al tratamiento con el compuesto GBM48 recibido entre los días 1 dpi y 4 dpi, provocando una mayor proliferación de las células.

7. Bibliografía

- Ai, X., Ye, Z., Xiao, C., Zhong, J., Lancman, J. J., Chen, X., Pan, X., Yang, Y., Zhou, L., Wang, X., Shi, H., Zhang, D., Yao, Y., Cao, D., & Zhao, C. (2022). Establishing a clinically relevant orthotopic xenograft model of patient-derived glioblastoma in zebrafish. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 15(4). <https://doi.org/10.1242/DMM.049109>
- Alberti, G., Amico, M. D., Caruso Bavisotto, C., Rappa, F., Marino Gammazza, A., Bucchieri, F., Cappello, F., Scalia, F., & Szychlinska, M. A. (2024). Speeding up glioblastoma cancer research: Highlighting the zebrafish xenograft model. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25105394>
- Aldape, K., Zadeh, G., Mansouri, S., Reifenberger, G., & von Deimling, A. (2015). Glioblastoma: Pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica*, 129(6), 829–848. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1432-1>
- Barar, J. (2012). Targeting tumor microenvironment: The key role of immune system. *BioImpacts: BI*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.5681/BI.2012.001>
- Bauer, B., Mally, A., & Liedtke, D. (2021). Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13417. <https://doi.org/10.3390/IJMS222413417>

- Biserova, K., Jakovlevs, A., Uljanovs, R., & Strumfa, I. (2021a). Cancer stem cells: Significance in origin, pathogenesis and treatment of glioblastoma. *Cells*, 10(3), 1–20. MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10030621>
- Cabezas-Sáinz, P., Pensado-López, A., Sáinz, B., & Sánchez, L. (2020). Modeling cancer using zebrafish xenografts: Drawbacks for mimicking the human microenvironment. *Cells*, 9(9), 1–29. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells9091978>
- World Health Organization. (2020). Cáncer. Retrieved June 11, 2025, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Carrato Moñino, C. (2019). Clasificación actual según la OMS de los gliomas infiltrantes.
- Caruso, G., Laera, R., Ferrarotto, R., Garcia Moreira, C. G., Kumar, R., Ius, T., Lombardi, G., & Caffo, M. (2024). Mitochondrial dysfunction: Effects and therapeutic implications in cerebral gliomas. *Medicina*, 60(11), 1888. <https://doi.org/10.3390/medicina60111888>
- Cortes Ballen, A. I., Amosu, M., Ravinder, S., Chan, J., Derin, E., Slika, H., & Tyler, B. (2024). Metabolic reprogramming in glioblastoma multiforme: A review of pathways and therapeutic targets. *Cells*, 13(18), 1574. <https://doi.org/10.3390/cells13181574>
- De Domenico, P., Gagliardi, F., Roncelli, F., Snider, S., & Mortini, P. (2025). Tumor-infiltrating and circulating B cells mediate local and systemic immunomodulatory mechanisms in glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 172(3), 527–548. <https://doi.org/10.1007/s11060-025-04989-z>
- Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. (2010). EUR-Lex. Retrieved June 11, 2025, from <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>
- Dryer, Y., Berghausen, J., Creswell, K., Glasgow, E., & Brelidze, T. I. (2023). Comparison of tumor growth assessment using GFP fluorescence and DiI labeling in a zebrafish xenograft model. *Cancer Biology and Therapy*, 24(1), Article 2234140. <https://doi.org/10.1080/15384047.2023.2234140>
- Duclos, V., Iep, A., Gomez, L., Goldfarb, L., & Besson, F. L. (2021). PET molecular imaging: A holistic review of current practice and emerging perspectives for diagnosis, therapeutic evaluation and prognosis in clinical oncology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4159. <https://doi.org/10.3390/ijms22084159>
- Erices, J. I., Bizama, C., Niechi, I., Uribe, D., Rosales, A., Fabres, K., Navarro-Martínez, G., Torres, Á., San Martín, R., Roa, J. C., & Quezada-Monrás, C. (2023). Glioblastoma microenvironment and invasiveness: New insights and therapeutic targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7047. <https://doi.org/10.3390/ijms24087047>
- Fontana, C. M., & Van Doan, H. (2024). Zebrafish xenograft as a tool for the study of colorectal cancer: A review. *Cell Death & Disease*, 15(1), 23. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06291-0>

- Guan, X., Hasan, M. N., Maniar, S., Jia, W., & Sun, D. (2018). Reactive astrocytes in glioblastoma multiforme. *Molecular Neurobiology*, 55(8), 6927–6938. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0880-8>
- H. Meijer, A., & P. Spaink, H. (2011). Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. *Current Drug Targets*, 12(7), 1000–1017. <https://doi.org/10.2174/138945011795677809>
- Kim, J. H., Chang, K. H., Na, D. G., Kim, H. C., Roh, J. K., Han, M. H., & Kim, I. O. (1996). Radiologic findings of cerebral radiation necrosis: differentiation from tumor recurrence. *RadioGraphics*, 16(6), 1377–1395. <https://doi.org/10.1148/radiographics.16.6.8946545>
- Khoshnevis, M., Carozzo, C., Bonnefont-Rebeix, C., Belluco, S., Leveneur, O., Chuzel, T., Pillet-Michelland, E., Dreyfus, M., Roger, T., Berger, F., & Ponce, F. (2017). Development of induced glioblastoma by implantation of a human xenograft in Yucatan minipig as a large animal model. *Journal of Neuroscience Methods*, 282, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.03.007>
- Kumari, S., Gupta, R., Ambasta, R. K., & Kumar, P. (2023). Multiple therapeutic approaches of glioblastoma multiforme: From terminal to therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1878(4), Article 188913. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188913>
- SERAM - SERAM. (2022). La resonancia magnética (RM) es la técnica de elección en la detección y la caracterización no invasiva de los tumores cerebrales. Recuperado el 26 de junio de 2025, de <https://seram.es/la-resonancia-magnetica-rm-es-la-tecnica-de-eleccion-en-la-deteccion-y-la-caracterizacion-no-invasiva-de-los-tumores-cerebrales-segun-seram/>
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2025). El cáncer en cifras. Recuperado el 26 de junio de 2025, de <https://seom.org/prensa/el-cancer-en-cifras>
- Lázaro, J., & Ojeda, D. (2020). Medios diagnósticos y tratamientos actuales del glioblastoma multiforme [Diagnosis techniques and current treatments of multiform glioblastoma]. *Revista Progaleno*, 3(1), 2020. <https://orcid.org/0000-0002-3485-3429>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Lu, W., Yang, F., Meng, Y., An, J., Hu, B., Jian, S., Yang, G., Lu, H., & Wen, C. (2023). Immunotoxicity and transcriptome analysis of zebrafish embryos exposure to Nitazoxanide. *Fish & Shellfish Immunology*, 141, 108977. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108977>
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science*, 100(12), 2235–2241. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x>

- Ortega-Aznar, A., Jiménez-León, P., Martínez, E., & Romero-Vidal, F. J. (2013). Aspectos clinicopatológicos y moleculares de valor diagnóstico y pronóstico en gliomas. *Revista de Neurología*, 56(3), 161–170. <https://doi.org/10.33588/rn.5603.2012389>
- Palmgrén, J. J., Mönkkönen, J., Korjamo, T., Hassinen, A., & Auriola, S. (2006). Drug adsorption to plastic containers and retention of drugs in cultured cells under in vitro conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(3), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.06.005>
- Picart, T., Berhouma, M., Dumot, C., Pallud, J., Metellus, P., Armoiry, X., & Guyotat, J. (2019). Optimization of high-grade glioma resection using 5-ALA fluorescence-guided surgery: A literature review and practical recommendations from the neuro-oncology club of the French society of neurosurgery. *Neurochirurgie*, 65(4), 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2019.04.005>
- Polivka, J., Polivka, J., Rohan, V., Pesta, M., Repik, T., Pitule, P., & Topolcan, O. (2014). Isocitrate dehydrogenase-1 mutations as prognostic biomarker in glioblastoma multiforme patients in West Bohemia. *BioMed Research International*, 2014, Article 735659. <https://doi.org/10.1155/2014/735659>
- Reimunde, P., Pensado-López, A., Crende, M. C., Iglesias, V. L., Sánchez, L., Torrecilla-Parra, M., Ramírez, C. M., Anfray, C., & Andón, F. T. (2021). Cellular and molecular mechanisms underlying glioblastoma and zebrafish models for the discovery of new treatments. *Cancers*, 13(5), 1087. <https://doi.org/10.3390/cancers13051087>
- Ruan, K., Fang, X., & Ouyang, G. (2009). MicroRNAs: Novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Letters*, 285(2), 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.04.031>
- Sana, J., Hajduch, M., Michalek, J., Vyzula, R., & Slaby, O. (2011). MicroRNAs and glioblastoma: Roles in core signalling pathways and potential clinical implications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(8), 1636–1644. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01317.x>
- Sattiraju, A., & Mintz, A. (2019). Pericytes in glioblastomas: Multifaceted role within tumor microenvironments and potential for therapeutic interventions. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1147, p. 65). https://doi.org/10.1007/978-3-030-16908-4_2
- Stichel, D., Ebrahimi, A., Reuss, D., Schrimpf, D., Ono, T., Shirahata, M., Reifenberger, G., Weller, M., Hänggi, D., Wick, W., Herold-Mende, C., Westphal, M., Brandner, S., Pfister, S. M., Capper, D., Sahm, F., & von Deimling, A. (2018). Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathologica*, 136(5), 793–803. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1905-0>
- Stirling, D. R., Suleyman, O., Gil, E., Elks, P. M., Torraca, V., Noursadeghi, M., & Tomlinson, G. S. (2020). Analysis tools to quantify dissemination of pathology

- in zebrafish larvae. *Scientific Reports*, 10(1), 3149. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-59932-1>
- Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. (2013). OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-EN>
 - Torres Rodríguez, M. P., Murcia Garcia, K. A., Cruz Baquero, C. A., & Infante Cruz, A. del P. (2022). Inmunopatología del glioblastoma multiforme y su importancia en el ámbito clínico. *Revista Ciencias Biomédicas*, 11(2), 163–178. <https://doi.org/10.32997/rcb-2022-3738>
 - Tsimberidou, A. M., Fountzilias, E., Nikanjam, M., & Kurzrock, R. (2020). Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treatment Reviews*, 86, 102019. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102019>
 - Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2019). Tumores cerebrales. <https://seom.org/113-Informaci%C3%B3n%20al%20P%C3%ABlico%20-%20Patolog%C3%ADas/tumores-cerebrales>
 - Vittori, M., Motaln, H., & Turnšek, T. L. (2015). The study of glioma by xenotransplantation in zebrafish early life stages. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 63(10), 749–761. <https://doi.org/10.1369/0022155415595670>
 - Wang, S., Gu, S., Chen, J., Yuan, Z., Liang, P., & Cui, H. (2024). Mechanism of Notch signaling pathway in malignant progression of glioblastoma and targeted therapy. *Biomolecules*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/biom14040480>
 - Wehmas, L. C., Tanguay, R. L., Punnoose, A., & Greenwood, J. A. (2016). Developing a novel embryo–larval zebrafish xenograft assay to prioritize human glioblastoma therapeutics. *Zebrafish*, 13(4), 317. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1170>
 - Wei, Z., Wang, W., Xu, W., Tao, L., Li, Z., Zhang, Y., & Shao, X. (2024). Studies on immunotoxicity induced by emamectin benzoate in zebrafish embryos based on metabolomics. *Environmental Toxicology*, 39(1), 97–105. <https://doi.org/10.1002/tox.23942>
 - Wyatt, R. A., Trieu, N. P. V., & Crawford, B. D. (2017). Zebrafish xenograft: An evolutionary experiment in tumour biology. *Genes*, 8(9), 220. <https://doi.org/10.3390/genes8090220>
 - Yang, P., Zhang, W., Wang, Y., Peng, X., Chen, B., Qiu, X., Li, G., Li, S., Wu, C., Yao, K., Li, W., Yan, W., Li, J., You, Y., Chen, C. C., & Jiang, T. (2015). IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: Results of a prospective registry. *Oncotarget*, 6(38), 40896–40906. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5683>
 - Zhou, Q., Xu, Y., Zhou, Y., & Wang, J. (2022). Promising chemotherapy for malignant pediatric brain tumor in recent biological insights. *Molecules*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092685>