



TRABAJO FIN DE MÁSTER
MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA
CURSO 2021-2022
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO *EX OVO*
PARA EL DESARROLLO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Autora: Raquel Moll Boix

Tutora académica: Dra Camino de Juan Romero

Grupo: Neurobiología molecular y cáncer

Dña. MEURI DEL CAMINO DE JUAN ROMERO, doctora en el instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández- Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO),

CERTIFICA

Que el presente trabajo titulado:

“DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO *EX OVO* PARA EL DESARROLLO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

Dña. RAQUEL MOLL BOIX

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 19 de junio de 2022.

Fdo.: Dra. Meuri del Camino de Juan Romero

ÍNDICE

RESUMEN	5
PALABRAS CLAVE.....	5
ABSTRACT	6
KEYWORDS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Clasificación.....	8
1.2. Microambiente tumoral.....	10
1.3. Tratamientos existentes.....	12
1.4. El pollo como animal de experimentación.....	12
1.5. Exosomas como vehículos transportadores de fármacos.....	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Modelos xenógrafos en ratones para el estudio del GBM.....	15
2.2. Modelos en membrana corialantoidea para el estudio del GBM.....	17
3. OBJETIVOS	18
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	19
4.1. Cultivos celulares.....	19
4.2. Contaje de células para inyectar	19
4.3. Extracción de exosomas y marcaje.	20
4.4. Preparación y procesamiento de las muestras animales.....	20
4.4.1. Síntesis de microagujas para inyectar	21
4.4.2. Procesado en microtomo de parafina.....	21
4.4.3. Procesado en microtomo de congelación.....	21
4.5. Tinciones histológicas.....	22
4.5.1. Tinción Cristal Violeta de muestras en parafina	22
4.5.2. Tinción Hematoxilina-Eosina:.....	22
4.5.3. Inmunohistoquímica (IHC)	22
4.5.4. Inmunohistoquímica con recuperación antigénica.....	24

4.6. Adquisición y procesamiento de imágenes.....	25
5. RESULTADOS	25
5.1. Estrategia híbrida que combina células de GBM humanas y embrión de pollo.	25
5.1.1. Apertura de los huevos	27
5.1.2. Inyección tumoral.....	28
5.1.3. Sacrificio	29
5.2. Los embriones de pollo cultivados <i>ex ovo</i> revelan un desarrollo morfológico normal durante 13-16 días <i>in vitro</i>	30
5.3. Procesado de muestras.....	31
5.3.1. Microtomo de parafina	31
5.3.2. Microtomo de congelación	32
5.4. Las células de GBM humanas son capaces de injertarse y crecer en el cerebro de pollo embrionario.....	33
5.5. Los tumores obtenidos recapitulan las características de los tumores de GBM.	36
5.6. Los PDX no muestran un patrón de crecimiento invasivo en los cerebros de pollo.....	38
5.7. El PDX no presenta patrones de infiltración y transición epitelio-mesénquima.	39
5.8. Los tumores generados presentan activación moderada de la microglía confirmando la progresión tumoral.	40
5.9. Prueba de concepto.	41
5.9.2. Los exosomas son capaces de integrarse en las células tumorales GB-39.	42
5.9.3. Los exosomas muestran una direccionalidad preferencial a la zona tumoral en el modelo de embrión de pollo.....	44
5.10. Proyección futura	45
6. DISCUSIÓN.....	46
7. CONCLUSIONES	49
8. BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXO 1	55
Resumen de problemas y soluciones en el desarrollo del modelo.....	55

RESUMEN

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte en el mundo. El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor más agresivo y prevalente del sistema nervioso central, con una de supervivencia de tan solo 15 a 18 meses desde su diagnóstico. Pese a que se ha observado que su incidencia varía en relación con factores como la edad, la raza o el sexo, el GBM puede desarrollarse en cualquier persona. Además, la efectividad de los tratamientos tradicionales está condicionada por factores como el microambiente tumoral y el subtipo molecular de GBM que se desarrolle, siendo necesaria la búsqueda de nuevas terapias dirigidas y específicas a cada paciente.

Por estos motivos, la presente investigación se centró en el desarrollo de un nuevo modelo preclínico para el estudio del GBM basado en embriones de pollo *ex ovo*. En base a estudios previos de este grupo de investigación, se seleccionó la línea celular de GBM humana GB-39, para la generación de un xenoinjerto derivado de paciente (PDX) en el cerebro de los embriones de pollo.

Los embriones manifestaron un desarrollo morfológico normal en el tiempo que duraron los experimentos y los tumores generados en ellos fueron capaces de injertarse y proliferar, recapitulando las características de los tumores de GBM humanos. Además, el análisis de los marcadores de células microgliales Iba1 y CD11B sí confirmaron una activación moderada de la microglía que se correspondía con la progresión normal del tumor. Los análisis con los marcadores específicos GLAST y CD44, revelaron que los tumores no presentaban patrones de crecimiento invasivos ni infiltración con transición epitelio-mesénquima que pudiera derivar en metástasis.

Por último, se llevó a cabo una prueba de concepto, que consistió en la inyección e integración de exosomas, para comprobar el potencial del modelo en el estudio de la vehiculización de fármacos. Los datos recogidos en este proyecto confirman que el modelo desarrollado puede ser usado como modelo preclínico para testar *in vivo* tratamientos contra el GBM humano, pudiendo utilizarse en futuros estudios experimentales en el campo de la biomedicina.

PALABRAS CLAVE

Glioblastoma, Cáncer, Modelo preclínico, Pollo, PDX

ABSTRACT

Cancer remains one of the leading causes of death in the world. Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive and prevalent tumor of the central nervous system, reaching a survival period of only 15 to 18 months after diagnosis. Although it has been observed that its incidence varies in relation to factors such as age, race or gender, GBM can be developed by any person. Furthermore, the effectiveness of traditional treatments is conditioned by factors such as the tumor microenvironment and the molecular subtype of GBM, making necessary the search for new targeted therapies specific to each patient.

For these reasons, the present research focused on the development of a new preclinical model to study of GBM that is based on chicken embryos *ex ovo*. According to previous studies of this research group, the GBM human derived cell line GB-39 was selected for the generation of a patient-derived xenograft (PDX) in the brain of chicken embryos.

In this study, we observed that the embryos showed a normal morphological development during all experimental process. It was also possible to confirm, by histological and immunohistochemical analysis of the markers KI67, GFAP and S100B, that the PDX-generated tumors were able to engraft and proliferate, recapitulating the characteristics of human GBM tumors. In addition, analysis with GLAST and CD44 specific markers revealed that the tumors did not exhibit invasive growth patterns or infiltration with epithelial-mesenchymal transition that could lead to metastasis. However, analysis of the microglial cell markers Iba1 and CD11B did confirm moderate microglial activation consistent with normal tumor progression.

Finally, a proof of concept, consisting of the injection and integration of exosomes, was carried out to test the potential of the model in the study of drug delivery. The data collected in this project confirm that the developed model can be used as a preclinical model to test *in vivo* human GBM treatments, which will contribute to future experimental studies in the field of biomedicine.

KEYWORDS

Glioblastoma, Cancer, Preclinical model, Chicken, PDX.

1. INTRODUCCIÓN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor originado en el sistema nervioso central (SNC) más agresivo y prevalente. Los glioblastomas pueden desarrollarse en cualquier estructura neuroanatómica, pero lo más común en individuos adultos es que se desarrollen en los hemisferios cerebrales. El término multiforme hace referencia a la gran heterogeneidad celular que se crea en el microambiente tumoral y que lo caracteriza. El GBM alcanza una prevalencia del 48.6% y posee el menor porcentaje de supervivencia relativa respecto a todos los tumores malignos del SNC, asociándose generalmente a un pronóstico de supervivencia de 15 a 18 meses (**Fig. 1**) (1).

Se ha observado que el riesgo de desarrollar un tumor cerebral, o de otro tipo originado en el SNC, se incrementa con la edad. En el caso del GBM, a pesar de que puede desarrollarse a cualquier edad, existe un pico de incidencia en individuos adultos con edades comprendidas entre los 45 y los 80 años. En cuanto al género y la raza también se observan algunas diferencias, por ejemplo, la tasa de incidencia en individuos de raza blanca no hispana se eleva a 8 casos diagnosticados por cada 100.000 personas, mientras que en individuos asiáticos la incidencia baja a 3,4 casos. En los individuos negros no hispanos, la tasa de incidencia se eleva hasta valores de 19,9 casos diagnosticados cada 100.000 personas. Respecto a las diferencias por género encontramos que las mujeres presentan tasas de incidencia un 30% inferiores a las de los varones en individuos adultos. En niños, las tasas de incidencia son generalmente muy similares, por lo que las diferencias observadas relacionadas con el sexo podrían estar basadas en la distinta exposición a hormonas endógenas a lo largo de la vida (2).

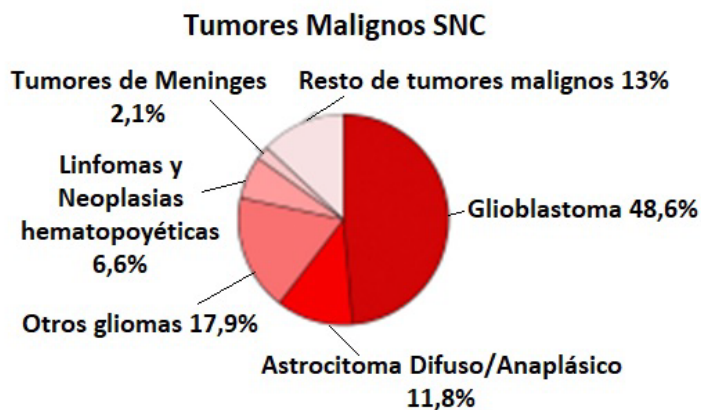


Figura 1. Tipos de tumores malignos del Sistema Nervioso Central (SNC). Porcentaje de prevalencia del GBM respecto al resto de tumores malignos del SNC (Modificado de Redon *et al.*, 2022) (1).

1.1. Clasificación

Los gliomas son los tumores cerebrales más comunes en adultos, derivan de las células gliales que conforman el tejido de soporte del cerebro y pueden desarrollarse tanto en el cerebro como en la médula espinal. En función del tipo de célula glial del que procedan se dividen en gliomas de la línea media difusos, ependimomas, oligodendrogliomas y astrocitomas (**Fig. 1**). Los primeros, que afectan principalmente a niños, se forman a partir de astrocitos originando tumores astrocíticos de alto grado que se infiltran en el tronco del encéfalo dirigiéndose hacia el hipotálamo, el tálamo, el bulbo raquídeo y la médula espinal. Los ependimomas surgen de la capa de células ependimarias del sistema ventricular, se subdividen en 9 subtipos en base a sus diferencias moleculares e histológicas y predominan principalmente en niños y adultos jóvenes. Los oligodendrogliomas se forman a partir de oligodendrocitos y se suelen desarrollar en el prosencéfalo, sobre todo en los lóbulos frontales. Generalmente afectan a individuos adultos. Por último, los astrocitomas que se originan a partir de astrocitos y se desarrollan frecuentemente a nivel de los hemisferios cerebrales. Los astrocitomas conforman un grupo heterogéneo y son los gliomas más frecuentes (3)

A partir de 1979, la Organización Mundial de la Salud (OMS) hizo una clasificación de los tumores primarios del sistema nervioso central basada en la célula de origen del proceso tumoral y criterios histopatológicos asociados al pronóstico. Estableciendo la siguiente gradación (4) :

-Astrocitomas pilocíticos (grado I), se corresponden con tumores de lento crecimiento y bajo potencial de conversión a un tumor de mayor malignidad.

-Astrocitomas difusos (grado II), para tumores de borde difuso, lento crecimiento y cierta tendencia de progresar a tumores malignos.

-Astrocitoma anaplásico (grado III), engloba tumores infiltrantes con células atípicas o anaplásicas y mayor número de mitosis.

-Glioblastoma (grado IV), se refiere a tumores de rápido crecimiento con alta tasa mitótica, con presencia de áreas de necrosis y vasos de neoformación.

La intensa investigación en el campo de la génesis tumoral ha permitido correlacionar determinadas alteraciones genéticas y epigenéticas con los subtipos moleculares, los cuales presentan una evolución clínica diferente. Dichas alteraciones,

sirven de marcadores tumorales de pronóstico y pueden dar idea de la posible variabilidad en respuesta a tratamientos, constituyéndose en marcadores tumorales predictivos. En este sentido, existe una nueva clasificación basada en la identificación de 840 genes analizando perfiles de expresión génica en 200 glioblastomas y que establece 4 subtipos con un perfil molecular diferenciado: proneural, neural, clásico y mesenquimal (**Fig. 2**) (5).

-Glioblastoma proneural: es la variante más frecuente y con mejor pronóstico dentro de los gliomas de grado II y III. Su alteración más común es la mutación de los genes IDH1, IDH2 y PDGFRA.

-Glioblastoma neural: presenta marcadores de expresión neuronal como el NEFL, GABRA1, SYT1, y SLC12A5.

-Glioblastoma clásico: presenta amplificación del cromosoma 7 y pérdida del cromosoma 10 (donde se encuentran genes asociados al control del ciclo celular y reparación del ADN como PTEN, DMBT1, FGFR2 y MGMT)(6), así como amplificación del EGFR en el 97% de ellos.

-Glioblastoma mesenquimal: presenta delección 17q11.2, región que codifica en gen NF1, así como marcadores mesenquimales. El subtipo mesenquimal junto con el clásico son los de peor pronóstico (**Fig. 2**) (5, 7).

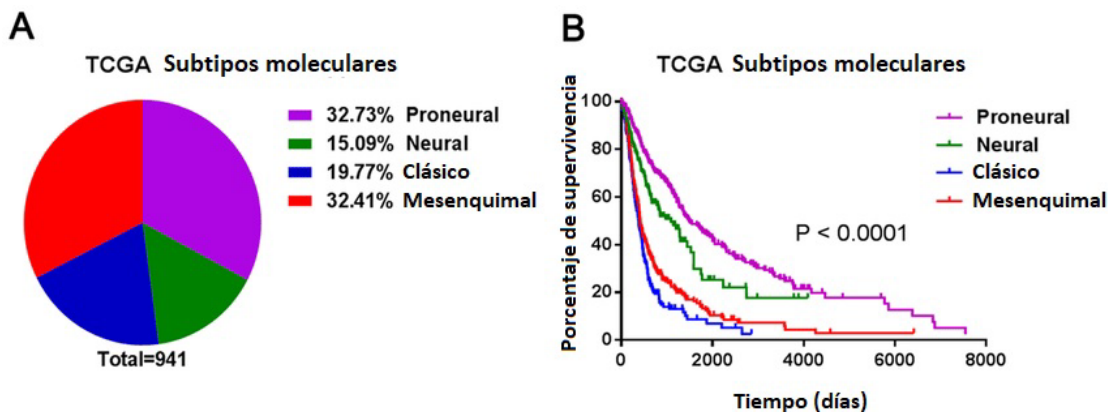


Figura 2. Prevalencia y características de los subtipos moleculares en todos los gliomas malignos. (A) Distribución de los subtipos moleculares TCGA en todos los gliomas malignos; (B) Análisis de supervivencia según los subtipos moleculares TCGA en todos los gliomas malignos. (Modificado de Lin *et al.*, 2014) (7).

Desde un punto de vista estrictamente clínico existe otra clasificación que subdivide el GBM en dos grupos. Si el glioma aparece *de novo* sin presentar antecedentes en la historia clínica del paciente se clasifica como GBM primario, mientras

que si surge de la progresión tumoral de un glioma de bajo grado se clasifica como GBM secundario (8).

1.2. Microambiente tumoral

Las células madre tumorales son aquellas que poseen la capacidad de autorrenovación y de diferenciación hacia los distintos linajes celulares que comprenden el tumor a partir del cual fueron aisladas, generando una fenocopia del tumor original (9). En el caso del GBM, se utiliza el término células iniciadoras de GBM (CIGs), estas poseen gran similitud con la célula madre adulta presente en los tejidos sanos, que en el caso del cerebro se denominan células madre neurales (CMN).

En la actualidad, no se sabe con certeza si el proceso de gliomagénesis comienza a partir de una célula madre multipotencial, un progenitor más comprometido o incluso a partir de una célula diferenciada. Dada la naturaleza glial del GBM, las células de origen podrían ser los progenitores gliales o incluso los astrocitos maduros. De esta forma, diferentes combinaciones de modificaciones genéticas como la sobreexpresión de EGFR o la activación de oncogenes como c-Myc, Ras y/o AKT darían lugar a un crecimiento tumoral (10).

En condiciones normales, las CMNs residen en los nichos vasculares, unos microambientes ricos en vasos sanguíneos y matriz extracelular. Dentro de estos nichos, se mantienen las señales adecuadas para asegurar la homeostasis, permitiendo tanto el mantenimiento de la población como la regeneración de neuronas y células gliales. Se ha correlacionado la influencia de estos nichos con el proceso de transformación maligna de las CIGs a partir de las CMNs. De esta manera, durante el proceso de gliomagénesis, se produciría la alteración de este equilibrio entre autorrenovación y diferenciación, lo que provocará un crecimiento descontrolado y una diferenciación incompleta de las células desencadenando el proceso tumoral (11). Aunque las células tumorales comparten el mismo origen, división tras división irán adquiriendo diferencias genéticas y epigenéticas que provocarán la heterogeneidad intratumoral, conduciendo a diferencias en su fenotipo y en su comportamiento biológico. El resultado será un microambiente tumoral donde se encontrarán distintas subpoblaciones de células

tumorales con diversas tasas de proliferación, diferente respuesta a los tratamientos y distinta capacidad carcinogénica (**Fig. 3**) (12).

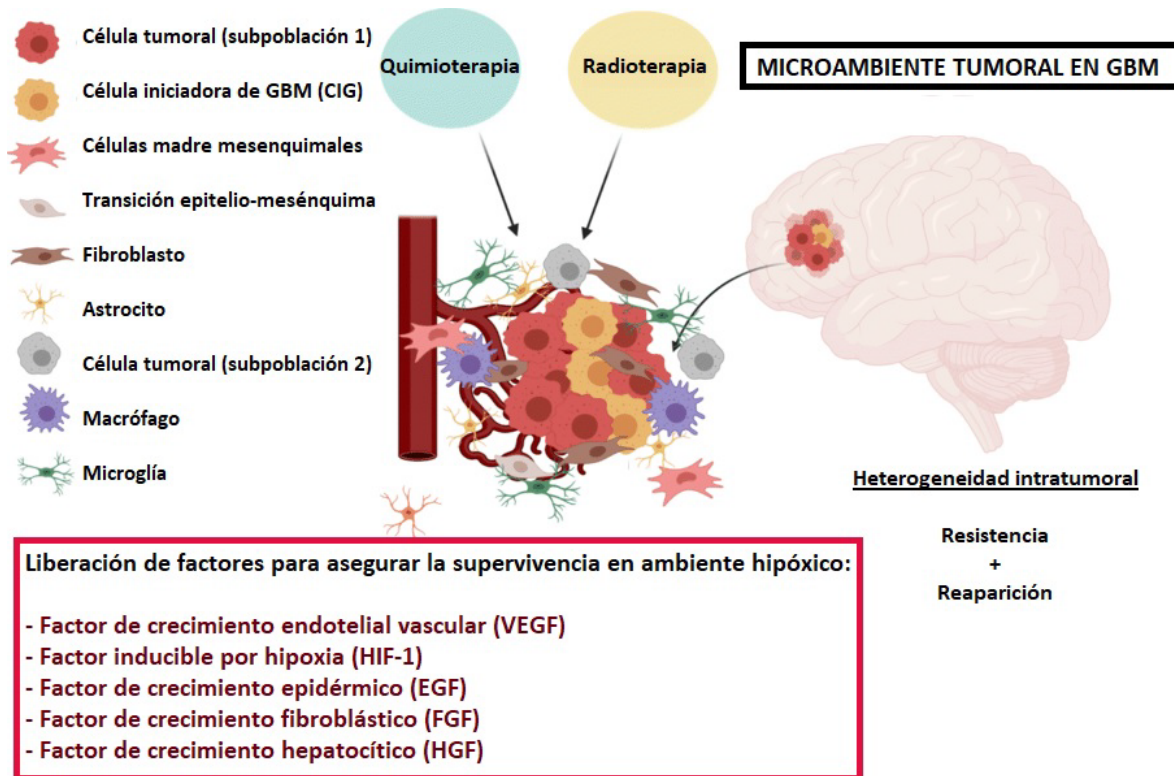


Figura 3. Representación del microambiente tumoral en GBM. Distribución de los distintos tipos celulares que se pueden encontrar junto con los factores de liberación predominantes en el ambiente hipóxico del tumor. (Modificado de Alves *et al.*, 2021)(12).

Una vez establecidas, las células tumorales llevarán a cabo distintas cascadas de señalización para asegurar su supervivencia, proliferación y la llegada de oxígeno y nutrientes. Con el fin de mantener la irrigación sanguínea en tumores sólidos como el GBM, se liberan factores de crecimiento vasculares como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (13). Otra estrategia para asegurar la supervivencia en este ambiente hipóxico es la liberación del factor inducible por hipoxia (HIF-1) que también favorece la angiogénesis (14). En el microambiente tumoral también se liberan factores de crecimiento involucrados en la génesis del glioma, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) que intervienen en la proliferación celular por estimulación autocrina y presentan un efecto sinérgico con VEGF (15). Es importante destacar que la liberación de quimioatrayentes, que incluyen ligandos del factor de crecimiento hepatocítico (HGF) (16), podrá favorecer la migración de las células del glioma para acabar formando metástasis secundarias (**Fig. 3**).

1.3. Tratamientos existentes

Actualmente, el tratamiento para este tipo de tumores tiene como primera opción la resección quirúrgica, la cual suele acompañarse con tratamientos adyuvantes de radioterapia o quimioterapia, basados en compuestos alquilantes como termozolamida (TMZ) o carmustina (BCNU) (17). Sin embargo, con las terapias actuales no se están obteniendo resultados del todo satisfactorios. En el caso de los tumores clasificados por la OMS como grado II, III y IV, al presentar un borde difuso, su exéresis quirúrgica suele ser incompleta. Debido a esto se precisa de un seguimiento por imagen y de tratamientos de carácter oncológico como radioterapia y quimioterapia. Estos tratamientos de apoyo conllevan multitud de efectos secundarios que comprometen la salud de los pacientes y en ocasiones pueden generar resistencia en las células tumorales. La heterogeneidad intratumoral es la responsable de muchas de las quimioresistencias o recidivas que se observan en este tipo de terapias, especialmente en tumores avanzados (18).

Es por esto, que en el campo de la biomedicina y de la biología molecular se está investigando la búsqueda de nuevos tratamientos y terapias dirigidas que sean más específicas y menos invasivas para los pacientes.

1.4. El pollo como animal de experimentación

Las aves sirven como modelos animales que permiten estudiar múltiples aspectos oncogénicos y teratogénicos. El desarrollo embrionario de las aves se realiza dentro de huevos y su uso experimental permite realizar estudios de una forma accesible y detallada. Uno de los modelos de investigación más usados son los embriones de pollo. Estos modelos de estudio animal se caracterizan por presentar múltiples ventajas, entre las cuales destacan que los huevos fertilizados de pollo presentan un bajo coste económico, tienen tiempos de desarrollo cortos de 20-21 días (**Fig. 4**), son fácilmente manipulables a diferencia de otras especies animales y requieren poco mantenimiento. Cabe destacar que resisten bien las manipulaciones experimentales microquirúrgicas, lo cual supone una gran ventaja como modelo animal experimental. Otra ventaja, es el hecho de que las intervenciones embrionarias en el pollo no requieren de permiso de experimentación animal, siempre y cuando el sacrificio

se produzca antes del día E19, (se describe el estadio embrionario con una E, seguido del día de desarrollo en que se encuentre el embrión) momento en que el huevo eclosionaría **(Fig. 4)** (19).

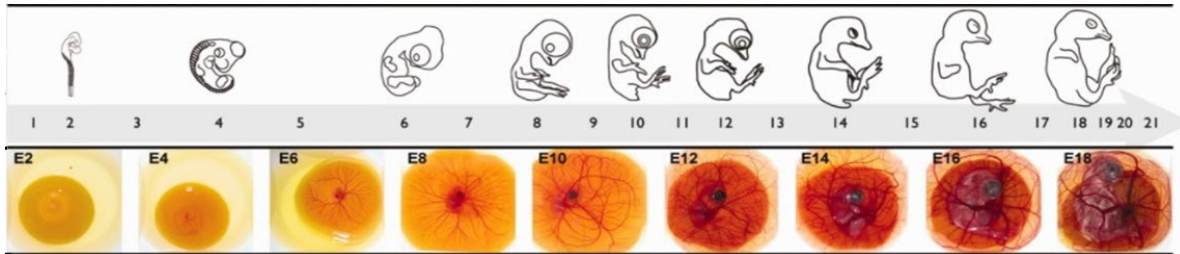


Figura 4. Línea temporal de desarrollo del embrión de pollo. En gris, la línea temporal en días. Correlación del desarrollo embrionario (dibujo superior) con imágenes de cultivo *ex ovo* con coincidencia de tiempo y sus estadios correspondientes. E, embrionario. (Modificado de Kristin H. Kain *et al.* 2013) (19).

Es necesario conocer y comprender la anatomía del huevo y del embrión de pollo para poder manipular y dar seguimiento a los diferentes experimentos que se lleven a cabo. El comúnmente llamado huevo, consiste en un ovocito gigante formado por un citoplasma formativo y un núcleo **(Fig. 5)** que se desarrolla en el tracto reproductivo de la gallina donde se llevará a cabo la fecundación y al progresar dará lugar al embrión. El vitelo o yema, está envuelto por una capa de vitelo proteico de color blanco y otra de vitelo lipídico de color amarillo **(Fig. 5)**. Tras la ovulación el ovocito rodeado por la membrana vitelina se irá recubriendo de las membranas terciarias, cuya función es nutrir al embrión y protegerlo. Estas membranas son la parte externa de la membrana vitelina, la cual tiene un importante papel en el intercambio de agua entre otras sustancias y la albúmina, que rodea al ovocito. Además, existen unas estructuras denominadas chalazas que actúan como ligamentos que inmovilizan al ovocito manteniéndolo en el centro. La membrana interna está formada por fibras de queratina que permiten la formación de una cámara de aire a nivel del polo obtuso, cuya función es mantener la presión en el interior del huevo a medida que se evapora el agua que contiene. La cáscara o cubierta externa, es una estructura compuesta por carbonato

cálcico cuya función es proteger al embrión, suministrarle calcio y, gracias a su porosidad, permitir la transpiración (Fig. 5).(20)

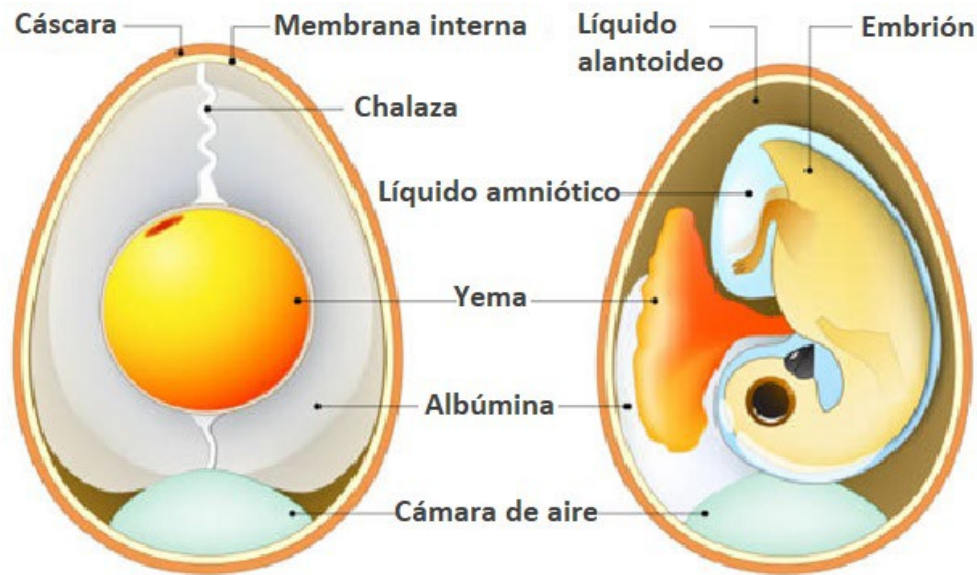


Figura 5. Sección transversal de huevo de pollo. Ilustración de la anatomía del huevo y del embrión.

El principio de las 3 Rs (21), insta a utilizar modelos animales con fines experimentales a modelos animales que se encuentren en estadios menos evolucionados de su desarrollo o que sean evolutivamente inferiores a otras especies. Por esta razón, el embrión de pollo ha sido ampliamente utilizado como modelo preclínico que permite obtener datos preliminares *in vivo* que serán la base de estudios en modelos animales más complejos como puede ser el ratón.

1.5. Exosomas como vehículos transportadores de fármacos.

Los exosomas son vesículas extracelulares con un tamaño entre 40-100 nm que pueden ser secretadas por la mayoría de las células. Se forman en los endosomas multivesiculares (MVEs) y poseen una membrana lipídica bicapa derivada de la membrana celular (Fig. 6). En su interior pueden transportar algunas proteínas, ARNm, microARN y otras sustancias, jugando un papel clave en la comunicación celular y el transporte macromolecular intercelular (Fig. 6) (22). En las nuevas terapias dirigidas, a diferencia de las nanopartículas u otros polímeros sintetizados artificialmente para transportar fármacos, los exosomas pueden emplearse como vehículos portadores naturales de medicamentos de forma más eficiente. Gracias a sus propiedades de membrana lipídica, no generarán toxicidad y el contenido almacenado en su interior

estará protegido de ser reconocido como extraño y degradado. Esto los convierte en muy buenos sistemas de entrega capaces de dirigirse a células o tejidos específicos (22).

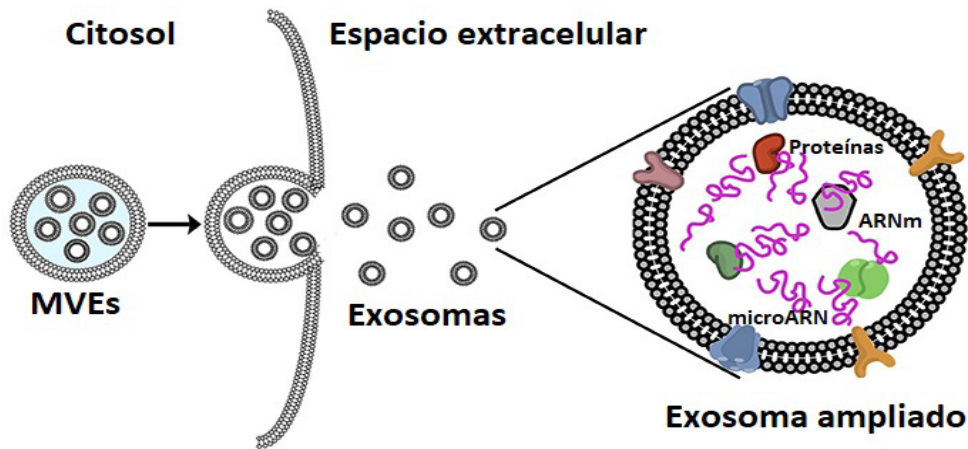


Figura 6. Biogénesis de los exosomas. Exosomas siendo liberados al exterior celular y ampliación de exosoma con su contenido. (Modificado de Romero, 2019) (23).

2. ANTECEDENTES

2.1. Modelos xenógrafos en ratones para el estudio del GBM

A pesar de que existen multitud de estudios *in vitro* a través de cultivos celulares, es necesario recurrir a modelos animales para el estudio *in vivo* del tumor. Estos permiten tener en cuenta otra serie de parámetros como la invasión, la angiogénesis o la metástasis que son cruciales en el desarrollo tumoral.

Actualmente, los estudios de tumores del SNC se basan en el trasplante de células tumorales de cerebro humanas o de roedores que son cultivadas en animales receptores inmunodeficientes. También se pueden inducir nuevos tumores cerebrales en modelos de roedores adultos y especialmente en la progenie de hembras preñadas con la administración de mutágenos vía intravenosa. La exposición de los ratones a nitrosoureas como la N-metilnitrosourea (MNU) o N-etilnitrosourea (ENU) provoca la aparición de gliomas (24). Sin embargo, al tratarse de agentes carcinogénicos pueden provocar mutaciones al azar en cualquiera de los genes del organismo o generar más de un tumor primario, siendo su baja reproducibilidad la principal desventaja.

Los modelos xenógrafos se basan en la implantación de células tumorales de un paciente en un modelo animal, generalmente ratones. Estos modelos permiten imitar

de forma exacta el comportamiento del tumor en condiciones naturales. Según el lugar de implantación pueden clasificarse en dos tipos: modelo heterotópico, donde el tumor se implanta en un lugar diferente a donde se desarrollaría de forma natural, y modelo ortotópico, donde las células tumorales se implantan en el lugar donde se desarrollaría el tumor de forma real (25). Inicialmente se realizaban modelos heterotópicos donde las células se inyectaban de forma subcutánea fuera de la región u órgano donde se generaría el cáncer. En el desarrollo de tumores cerebrales el implante celular ortotópico es el que produce mejores resultados.

Existen una serie de factores a tener en cuenta en el éxito del trasplante de glioma asociados al huésped. La edad de los individuos de experimentación es importante, ya que se ha observado que los animales neonatales tienden a aceptar el trasplante intracerebral de las células tumorales con mayor porcentaje de éxito que los animales adultos. Otro punto a tener en cuenta es el rechazo inmunológico, la inmunosupresión con corticoesteroides o irradiación puede ser útil en el caso de roedores inmunocompetentes para el trasplante de algunos tumores subcutáneos pero no suele ser eficaz para prevenir el rechazo del implante de glioma humano en el cerebro de los roedores (26). Para trasplantes ortotópicos se suelen emplear cepas de ratones inmunodeprimidos como los *nude* atímicos, alcanzándose porcentajes de producción tumoral del 76-100% (27). La inoculación intracerebral en cepas murinas de células de glioblastoma da como resultado tumores que portan mutaciones activadoras en la vía Ras junto con la pérdida de supresores de tumores como *p53*, que es idéntico al GBM humano (28). La ventaja es que estos modelos proporcionan un crecimiento tumoral predecible y fiable. Sin embargo, no muestran algunas características histológicas distintivas de los GBM, como proliferación microvascular, focos necróticos en el tumor ni patrones de crecimiento invasivo (29).

Otros modelos, como los de ratones inmunocompetentes humanizados han demostrado ser herramientas útiles para investigar los efectos terapéuticos y la interacción entre las células tumorales y el microambiente tumoral, imitando más fielmente la patología de los tumores humanos (30). Se basan en crear un ratón con sistema inmunitario humano "ratón humanizado". Para ello, se han cruzado ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), que son deficientes tanto en linfocitos T y B, con ratones diabéticos no obesos (NOD) con deficiencias en células asesinas naturales

(NK), macrófagos y el sistema del complemento (31). Los ratones NOD/SCID han sido mejorados con la eliminación de algunas interleucinas como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 junto con la pérdida de células NK de ratón (32). Además, Takenaka *et al* identificaron la proteína reguladora de la señal alfa (Sirpa) que interactúa fuertemente con el CD47 humano. La unión de Sirpa a CD47 inhibe los macrófagos, impidiendo así su actividad fagocítica, permitiendo un mayor nivel de injerto tras la implantación de células humanas (33).

El modelo de injerto embrionario es otra variante de modelo xenógrafo y proporciona una alternativa rápida y valiosa para estudiar la biología de los tumores cerebrales humanos en ratones inmunocompetentes. En este caso, para garantizar el éxito del xenoinjerto en un ratón con un sistema inmune competente, se debe realizar la microinyección con células de GBM humanas en el ventrículo cerebral de los embriones de ratonas preñadas, aprovechando que todavía no han desarrollado completamente su sistema inmunitario. Esto permite que el injerto persista desarrollando un tumor en los cerebros postnatales de ratones inmunocompetentes (34). Este modelo es idóneo para experimentos en los que se requiera estudiar la interacción entre tumor y sistema inmune.

2.2. Modelos en membrana corialantoidea para el estudio del GBM.

Hasta la fecha, los estudios experimentales documentados en embriones de pollo se realizan en la membrana corialantoidea (CAM, del inglés *chorioallantoic membrane*) y son empleados en una amplia gama de estudios biológicos. Por ejemplo, se utilizan para estudiar el proceso de angiogénesis *in vivo* (35), debido a su rica red vascular, alta oxigenación y rápido desarrollo. Son idóneas para investigar enfermedades cardiovasculares (36), retinopatía (37) y tratamientos antiangiogénicos (38). También han llevado a cabo estudios en CAM para investigar la angiogénesis relacionada con tumores como el GBM. Dado que el sistema inmunitario del embrión de pollo se desarrolla gradualmente con el tiempo, es posible realizar xenoinjertos de tejido tumoral mientras el sistema inmunitario aún es inmaduro. Estudios previos han confirmado que el injerto antes de que se observen las primeras células T en el timo en ED 10-11 ofrece una tasa de rechazo más baja (39). El xenoinjerto tumoral en CAM es

una herramienta muy útil para estudiar y comprender el proceso de angiogénesis relacionado con el tumor (40).

Se han documentado diferentes estudios en los que se ha observado el potencial angiogénico y metastásico de las líneas celulares de GBM. Para ello, se implantaron muestras de biopsias de glioblastoma en la superficie o se inyectaron en la circulación de la CAM (40, 41). Los estudios en la membrana de los embriones de pollo también permiten investigar el potencial antiangiogénico de diferentes moléculas utilizadas como fármacos antiangiogénicos en el tratamiento adyuvante de GBM. Todos estos estudios han confirmado la utilidad y versatilidad del ensayo CAM para estudiar la progresión tumoral del glioblastoma humano (42).

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es **desarrollar y caracterizar un tumor de glioblastoma multiforme en un nuevo modelo *ex ovo* en embriones de pollo**. Para el cumplimiento del objetivo principal, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar una búsqueda bibliográfica para determinar las condiciones y parámetros requeridos para llevar a cabo el experimento con éxito.
2. Cultivar líneas celulares de GBM de origen humano para su inyección en el modelo animal y de las que se extraerán los exosomas.
3. Establecer las condiciones experimentales de un nuevo modelo para el estudio de GBM utilizando embriones de pollo *ex ovo*.
4. Evaluar la formación del tumor a partir de las células implantadas en el cerebro de los embriones mediante determinación morfológica e inmunohistoquímica.
5. Realizar una prueba de concepto del modelo animal generado para su uso en biomedicina, empleando exosomas marcados con fluorescencia.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1. Cultivos celulares

Las líneas celulares se mantuvieron realizando pases semanales en campana de flujo laminar. Se empleó una solución comercial de Tripsina (Capricorn scientific) y medio de cultivo DEMEM F12 (Biowest) suplementado con suero bovino fetal 10% FBS (Corning, South american origin, heat inactivated) y con Estreptomicina-Penicilina 1% (Biowest). Las condiciones de incubación fueron 37°C y 5% de CO₂ en frascos de 25 cm² para el mantenimiento y frascos de 75 cm² en el aislamiento de exosomas.

4.2. Contaje de células para inyectar

Para preparar las células que se inyectaron en los embriones, se añadió 1 ml de Tripsina a un frasco de 25 cm² con una confluencia del 80% y se incubó durante 5 minutos. A continuación, se resuspendieron las células en 6 ml de tampón fosfato Salino (PBS) estéril 1X (biowest) y se pasó a un tubo de centrifuga estéril de 15 ml, dando lugar a un volumen final de 7 ml. De este volumen se extrajeron 15 µl para hacer un conteo y el resto se precipitó en una centrifuga (Beckman, GS-6) a 1200 rpm, durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Las células de GBM se inyectan a una concentración de 5.000 células/µl. Se realizó un conteo en cámara de Neubauer (**Fig. 7A**) que permite saber la proporción de células /ml que tenemos en los 7 ml del tubo de centrifuga. El cálculo se realizó mediante el contaje de cuatro campos exteriores, marcados con la letra L, de la cámara (**Fig. 7B**) y después se obtuvo la media de dichos contajes de la forma que se detalla (**Fig. 7C**).

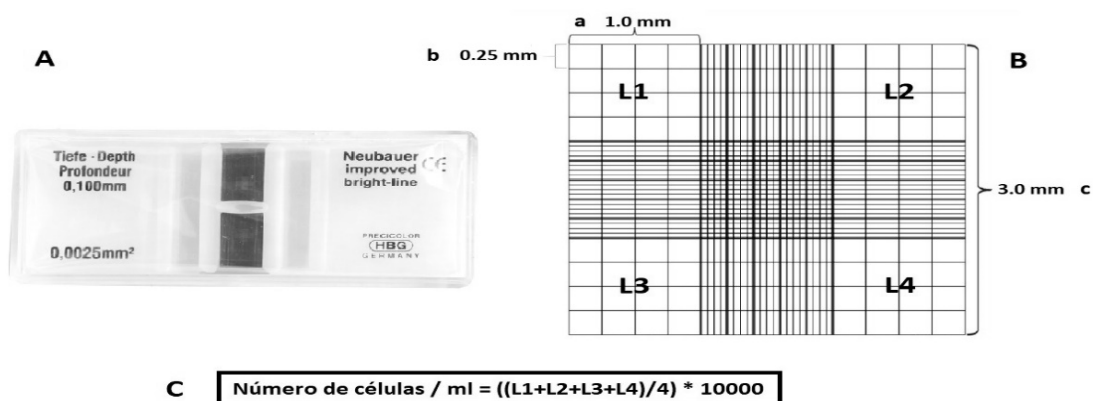


Figura 7. Contaje de células en cámara de Neubauer. (A) Cámara de Neubauer; (B) Visualización de las celdas de contaje de la cámara incluidas las dimensiones; (C) Fórmula para estimar el número de células de la muestra. Ln. Campos de contaje. Barras de escala. a, 1mm; b, 0.25mm; c, 3mm.

Tras centrifugar los 7 ml de células, se descartó el sobrenadante por decantación y se resuspendieron con 100 μ l de PBS estéril. Se llevó todo el volumen a un tubo de 1,5 ml, el cual se corresponde con una concentración aproximada de 10000 células/ μ l. De éste se pasó un volumen de 25 μ l junto con 25 μ l de PBS estéril a otro tubo de 1,5 ml para tener la concentración de 5.000 células/ μ l que se inyectó en los embriones.

4.3. Extracción de exosomas y marcaje.

Se extrajeron exosomas de la línea celular GB39 empleando la técnica de centrifugación diferencial para su purificación. Se sembraron 12 frascos de 75 cm², añadiendo 12 ml de medio libre de exosomas (F12, DMEM), y se dejó crecer las células 4 días hasta conseguir aproximadamente un 90% de confluencia.

El primer paso fue extraer el medio de 12 frascos de 75 cm² en 6 tubos de 50 ml y centrifugarlos (centrífuga Thermo scientific, ST 40R) a 4000 rpm, 20 minutos a 4°C. Se pasó el sobrenadante de los frascos a tubos de centrifuga, se equilibró con agua MiliQ y se hicieron varios pasos de ultracentrifugación (Optima™ L-90K Class S, Beckman Coulter) con rotor tipo 70 Ti, a 4°C. De esta forma se eliminaron las microvesículas de mayor tamaño, se precipitaron los exosomas y finalmente se lavaron con PBS. Los exosomas extraídos de nuestras líneas celulares fueron resuspendidos en PBS y posteriormente teñidos (Ref:C0103, Green CMFDA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para los experimentos de incorporación de exosomas en células de GBM, se tiñeron las vesículas de rojo con el kit (CellVue Claret Far Red Fluorescent, MINCLARET) según el protocolo proporcionado por el fabricante.

4.4. Preparación y procesamiento de las muestras animales

Los huevos fecundados fueron comprados a la granja santa Isabel S.L. A su llegada se pusieron a incubar en una incubadora con volteo automático (River Systems, ET 49) a 37°C durante 4 días. Tras su apertura se mantuvieron en condiciones de 60% de humedad, 37°C y 5% de CO₂ en un incubador (NUAIRE, EA-020).

Los animales fueron sacrificados en estadios de desarrollo que van desde 10 días post fertilización (d.p.f) hasta 16 d.p.f. Tras el sacrificio, las cabezas fueron seccionadas

y se procedió a una fijación en formaldehído (36,5%-38%, Sigma). Pasadas 24 horas, las cabezas se lavaron en PBS y se diseccionaron los cerebros. Las muestras se prepararon siguiendo dos protocolos distintos en base a si iban a ser procesadas en microtomo de parafina o en microtomo de congelación.

4.4.1. Síntesis de microagujas para inyectar

Se utilizaron capilares de 10 cm. Con un diámetro externo de 1,5mm y un diámetro interno de 0,86 mm (Shutter Instruments). Las microagujas empleadas en la inyección se sintetizaron empleando un extractor de micropipetas (Flaming Micropipette Puller P-97; Sutter Instrument CO.) con los siguientes parámetros: calor 600, tracción 130 y velocidad 80.

4.4.2. Procesado en microtomo de parafina

Primeramente, se llevó a cabo una deshidratación de las muestras en campana de gases. Para ello, se hizo una batería de deshidratación pasando las muestras a concentraciones crecientes de Etanol (AppliChen) 70%, 95%, 100% (x2), Xilol (VWR Chemicals) (x2) con tiempos de espera de 2h. Dejando las muestras toda la noche en el último paso de Xilol. A continuación, las muestras se sumergieron en parafina en horno a una temperatura de 60°C y se dejó toda la noche.

Después, se incluyeron las muestras en casetes de biopsia en el centro de inclusión en parafina (Thermo Scientific, HistoStar). Por último, se realizaron los cortes de las muestras en secciones de 8 µm empleando un microtomo de parafina (Microm, HM 325) que se recogieron en portaobjetos (EpreDia) en series de 5.

4.4.3. Procesado en microtomo de congelación

Los cerebros fueron crioprotectidos embebiéndolos en una solución de sacarosa (Merck) al 30%. Se mantuvieron los cerebros en dicha solución dentro de un tubo de centrifuga de 50 ml hasta que bajaron al fondo del tubo, de esta forma se reemplaza el agua por la sacarosa y así se ayuda a prevenir el daño por congelación a través de la formación de cristales de hielo (agua). Soluciones de sacarosa de 1.8M o superiores evitan la vitrificación, es decir, la formación de cristales de hielo dañinos, sin importar cuán lenta sea la congelación (43) por alcanzar una densidad mayor a la del medio). Se

repitió este paso con una solución al 60% de sacarosa. A continuación, se embebieron los cerebros en O.C.T. (Tissue-Tek, #4583) usando moldes de embeber específicos para este proceso (Peel-A-Way, #2219) y se enfriaron en nitrógeno líquido. Las muestras fueron almacenadas en congelador a -20°C y se cortaron en secciones de 15 µm en series de 5, empleando un criotomo o microtomo de congelación (Leica, CM1950) con una temperatura en cámara de corte de -21°C.

4.5. Tinciones histológicas

4.5.1. Tinción Cristal Violeta de muestras en parafina

En primer lugar, se hizo una batería de desparafinación para volver a rehidratar las muestras, pasando por las siguientes concentraciones: Xilol (x2), Etanol 100% (x2), Etanol 95% y Etanol 70% con tiempos de 5 minutos en campana de gases. A continuación, se realizó un lavado con agua destilada y se tiñó con Cristal Violeta (Ref: C-3886, Sigma) 5 minutos. Tras esto, se realizaron varios lavados con agua destilada para quitar el exceso de tinción.

Por último, se hizo una batería de alcoholes para deshidratar las muestras pasando por Etanol 70%, Etanol 95%, Etanol 100% (x2), Xilol (x2) con tiempos de 2 minutos en cada paso. Una vez terminado el proceso de tinción, se procedió al montaje de las muestras empleando un cubreobjetos (Epredia) y medio de montaje Entellan (Sakura, #4583).

4.5.2. Tinción Hematoxilina-Eosina:

Las tinciones de hematoxilina-eosina se realizaron en las instalaciones del departamento de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Elche. Se empleó una plataforma automatizada para Hematoxilina y Eosina (Dako CoverStainer, CS-100), que realizó todo el proceso de desparafinación, tinción, deshidratación y secado.

4.5.3. Inmunohistoquímica (IHC)

Las muestras procesadas en parafina se desparafinaron en coplin mediante batería de Xilol (10 minutos), Xilol (5 minutos), Etanol 100% (5 minutos), Etanol 90% (5

minutos), Etanol 70% (5 minutos), después se pasaron a un coplin con PBS. Las muestras congeladas se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente y se pasaron a un coplin con PBS.

Los pasos detallados a continuación son comunes para las muestras procesadas en parafina y para las muestras procesadas en O.C.T.

Se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PB que se obtuvo mezclando una parte de fosfato sódico monobásico (J.T.Baker, Avantor), cuatro partes de fosfato sódico dibásico (Honeywell, Fluka) y cinco partes de agua destilada, en agitador (fisherbrand). Se bloqueó 2 horas a temperatura ambiente con suero de caballo normal 10%, suero bobino de albúmina 2%, Triton 0,25%, PB, en un volumen final de 10 ml.

Posteriormente, se delimitaron las muestras de los portaobjetos con el bolígrafo inmunoestatizante PAP-PEN (Kisker) y se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda con los siguientes anticuerpos primarios a concentración 1/300:

Anticuerpo monoclonal	Especie	Marca	REF	LOT
Ki67	Conejo	Invitrogen	MA5-15690	WD3195086A
GFAP	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	SC-6170	L159
Iba1	Ratón	Invitrogen	MA5-36257	XA3487147F
CD44	Ratón	Acris	AM01076FC-N	0307
CD11B (Fluorescente)	Ratón	Caltag Lab	MHCD11B04	06020800
GLAST	Conejo	Invitrogen	PA5-72895	XB3493966A
S100B	Ratón	Abnova	MAB16930	Q-05-01033

Tabla 1: Anticuerpos primarios empleados en IHC. Se especifica la especie, la marca, la referencia y el lote.

Al día siguiente se dejaron las muestras 1 hora a temperatura ambiente y se hicieron 6 lavados de 10 minutos con PBS-Tritón 0,25%.

Seguido de esto, se incubó 2 horas en cámara húmeda y en oscuridad con los siguientes anticuerpos secundarios fluorescentes a concentración 1/1000:

Anticuerpo secundario recombinante	Fluoróforo (longitud de onda)	Marca	REF	LOT
Cabra anti-Conejo	ROJO (568)	Invitrogen	A11011	453569
Conejo anti-Cabra	ROJO (555)	Invitrogen	A27017	2409160
Burro anti-Ratón	VERDE (488)	Invitrogen	A21206	913921

Tabla 2: Anticuerpos secundarios empleados en IHC. Se especifica el color visible del fluoróforo mediante el relleno de la celda. La especie reactiva del anticuerpo secundario, la marca, la referencia y el lote aparecen también representados.

Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 4 lavados de 10 minutos con PBS-Tritón 0,25%, seguido de un lavado con PB de 10 minutos. Después, se incubó cada portaobjetos con 200 µl del marcador fluorescente DAPI (5µM) 5 minutos en cámara húmeda, se consiguiendo así un marcaje azul de los núcleos de todas las células, ya que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN. A continuación, se hicieron 3 lavados de 5 minutos con PB. Por último, se llevó a cabo una batería de deshidratación en campana de gases colocando las muestras en un coplin y pasando por las siguientes concentraciones: Etanol 70%, Etanol 90%, Etanol 100% (X2) 2 minutos en cada paso y Xilol (X2) 5 minutos. Y se procedió al montaje y almacenamiento de las muestras a 4°C en oscuridad.

4.5.4. Inmunohistoquímica con recuperación antigénica.

En el caso de algunos anticuerpos que no funcionaron sobre las muestras de parafina se llevó a cabo un protocolo de IHC modificado con recuperación antigénica. Para ello, después de la desparafinización y el lavado con PBS, se hizo además un pretratamiento con Citrato Sódico 0,01M, pH=6. Se puso a ebulir la solución de Citrato Sódico en un microondas, después se introdujeron las muestras en un cestillo de vidrio de 10 portaobjetos y continuó ebullendo en el microondas por 15 minutos. Después, se dejó enfriar a temperatura ambiente 15 minutos. Tras este paso opcional se hicieron 4 lavados de 10 minutos con PBS-Triton 0,25% y se continuó con el bloqueo de las muestras.

4.6. Adquisición y procesamiento de imágenes

Para determinar la morfología, las imágenes fueron recogidas empleando un microscopio invertido (Leica, DM2000LED) usando el programa de análisis (LASX). El procesamiento de las imágenes se realizó mediante el uso del programa de edición PIXLR.

Las imágenes para determinar marcadores específicos se recogieron empleando un microscopio invertido Axio observer, ZE155 (Zeiss) y el programa de análisis correspondiente (*Zen-pro*, Zeiss).

5. RESULTADOS

5.1. Estrategia híbrida que combina células de GBM humanas y embrión de pollo.

Dado que el microambiente tumoral es importante en el desarrollo del tumor (44), nosotros razonamos que sería más interesante introducir las células tumorales en el cerebro del embrión de pollo que colocarlas sobre la CAM. Esta nueva aproximación experimental permite no solo ver el efecto que tiene la irrigación y los factores que puedan venir por la sangre sobre el desarrollo del tumor, sino que también permite el estudio de la señalización de las células circundantes (45).

El proceso de desarrollar un tumor de GBM de origen humano en el cerebro de embriones de pollo empieza con el encargo y envío de los huevos fertilizados (E0), la llegada se producirá al día siguiente (E1) y se mantienen en una incubadora de volteo durante 4 días (**Fig. 8**). En el E4 será cuando se lleve a cabo la apertura de los embriones, después de la cual se incubarán *ex ovo* en una estufa de cultivo hasta el final del experimento. Unos días más tarde, en E6 se realiza la microinyección de células tumorales de GBM de origen humano en el cerebro de los embriones (**Fig. 8**). Por último, se procederá al sacrificio antes del día 19 (día límite según establece la normativa), normalmente entre los días E11 y E16.

Dado que el cerebro en desarrollo del pollo no tiene aún activa la respuesta inmune adaptativa, nuestra hipótesis es que el entorno inmunitario inmaduro de los cerebros de pollo embrionarios podría tolerar el injerto de células humanas de GBM.

Como punto de partida usamos la línea GB-39, una línea inmortalizada de células GBM humanas de grado IV. Nuestro grupo de investigación obtuvo 7 líneas celulares de GBM que fueron aisladas a partir lavados quirúrgicos de pacientes con glioblastoma durante la resección del tumor (**Fig. 8**) (46).

Estas muestras fueron proporcionadas por el Biobanco del Hospital General Universitario de Elche, lo que permite un proceso de codificación de las muestras de los pacientes preservando su anonimato. (46).

La línea celular GB-39 fue la seleccionada para este proyecto por poseer mayor resistencia a la Temozolamida (TMZ) y Carmustina (BCNU), ambos tratamientos clásicos en quimioterapia para tratar el GBM (47).

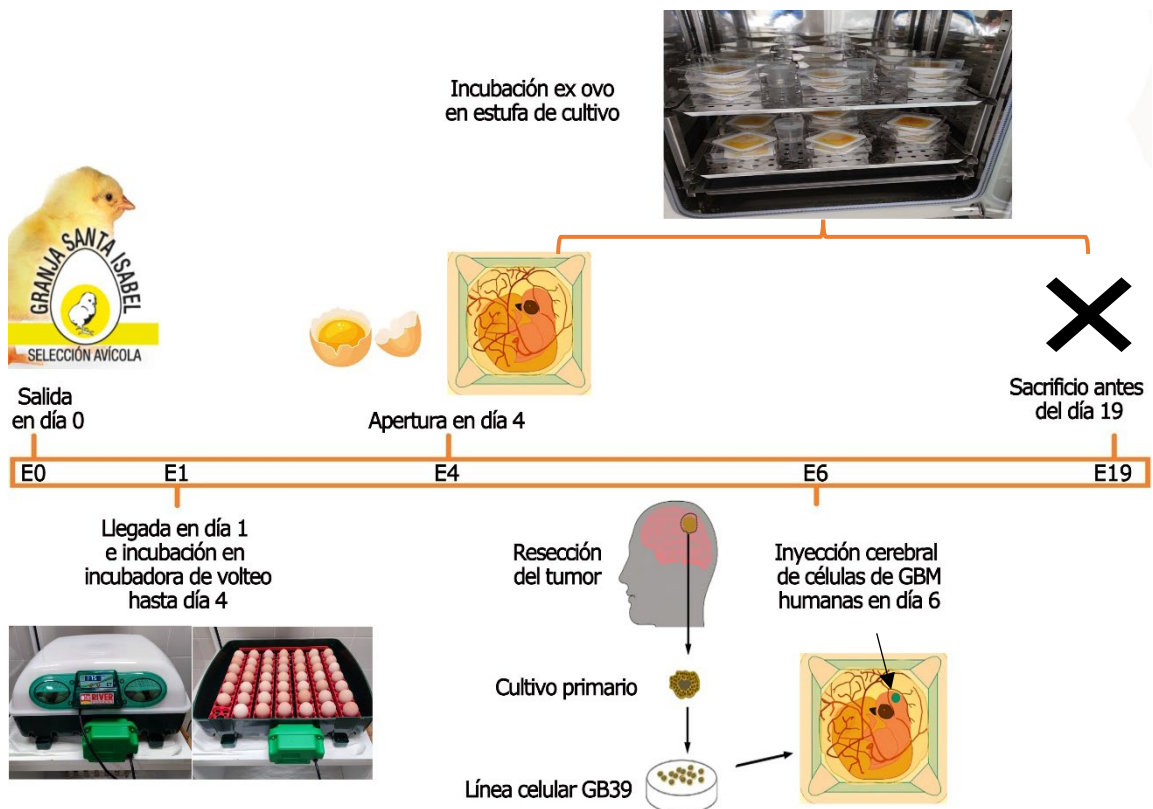


Figura 8: Cronograma experimental detallado. Se especifica el proceso a seguir y la línea temporal desde el momento en que los huevos fecundados salen de la granja hasta la creación del xenoinjerto derivado de paciente (PDX) y sacrificio. (Modificado de Xiaolin Ai *et al.*, 2022) (45).

La generación del nuevo modelo de pollo se realizó en Laboratorio de Investigación de FISABIO en el Hospital General Universitario de Elche, donde se realizaron las labores de mantenimiento de los animales y las aproximaciones

experimentales. El proceso se compone de varios pasos, cuyas condiciones tuvieron que establecerse para una mayor optimización.

5.1.1. Apertura de los huevos

Los huevos de pollo son fecundados en la granja Santa Isabel S.L. (Granada) y enviados el mismo día. Su llegada tiene lugar 24 horas después de su fecundación (E.1) y en ese mismo momento, se introducen en una incubadora con volteo automático a 37°C durante los 3 días posteriores. La apertura de los huevos se llevó a cabo en el día 4 del estadio de desarrollo de los embriones (E.4) (**Fig. 8**). Se trata de un proceso que requiere gran cuidado donde primeramente se saca el huevo de la incubadora de volteo y con suavidad se limpia con etanol al 70% toda la superficie. Esto se hace para que, una vez abierto el huevo, entre el menor número de patógenos posible en contacto con el contenido. De esta forma se reducen las posibles contaminaciones posteriores.

Una vez limpio el huevo, se coloca en posición horizontal con el borde más largo paralelo al suelo y se deja en esta posición durante 5 minutos. De esta forma, la cámara de aire del huevo se coloca en la parte superior y el embrión de pollo se distribuye dentro del huevo para colocarse en contacto con dicha cámara de aire (48).

La apertura del huevo se realiza dentro de una campana de flujo laminar. A partir del momento de la apertura del huevo, el embrión se mantendrá en condiciones de esterilidad y solo se expondrá al exterior en ambiente controlado.

Para el método de cultivo *ex ovo* descrito en el presente trabajo, el contenido de los huevos preincubados se transfirió cuidadosamente a una bandeja de plástico cuadrada previamente esterilizada (12cm x 12cm) (**Fig. 9**).

Este proceso se realiza con gran precisión ya que se tiene que asegurar que el embrión quede situado en el centro de la yema para su correcta supervivencia. Una vez extraído el embrión, se coloca la bandeja dentro de una placa de Petri cuadrada, girada 90° para permitir la aireación del embrión. Dado que existe una vía de intercambio de aire con el exterior que puede ser fuente de contaminaciones, se añadieron 4 gotas de Penicilina/Estreptomina al 1%. Los embriones se incubaron en estufa de cultivo a 37°C, con CO₂ al 5% y al 60% de humedad hasta finalizar el proceso.

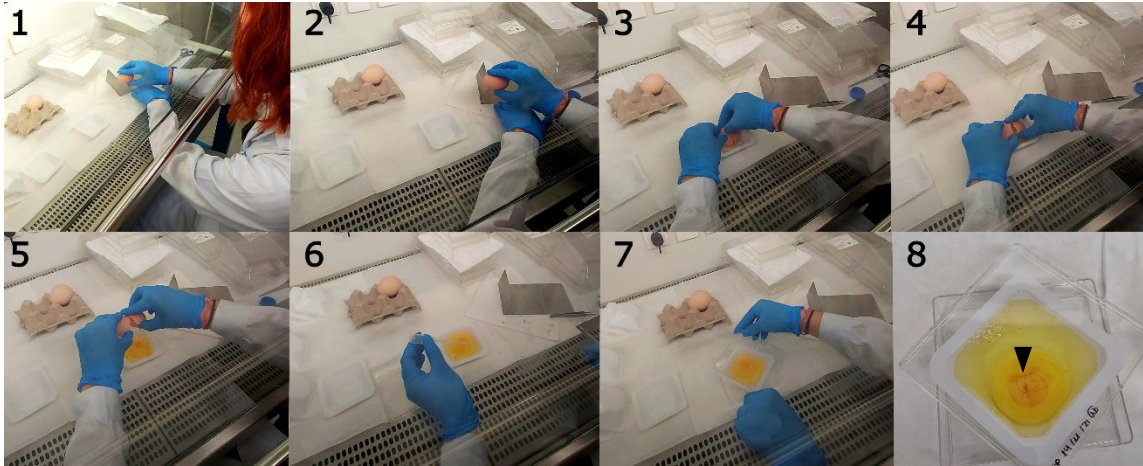


Figura 9: Proceso completo de apertura de los huevos. Línea de tiempo con imágenes secuenciales del proceso de apertura. Imágenes 1-2 rotura de cáscara; 3-5 deposición del embrión en la bandeja de plástico; 6 tratamiento con Penicilina/Estreptomicina; 7 colocación de la bandeja dentro de la placa de Petri; 8 aspecto final del embrión *ex ovo* antes de introducirlo al incubador. Punta de flecha indicando la posición del embrión en desarrollo.

5.1.2. Inyección tumoral

La segunda fase del proceso consiste en introducir las células tumorales dentro de la cavidad ventricular del cerebro de pollo en desarrollo. Las células tumorales se extrajeron de los cultivos celulares la mañana de la inyección, se prepararon 3 tubos de 1,5 ml con una concentración aproximada de 5000 células/ μl . A cada tubo con células tumorales se le añadió 0,5 μl de colorante Verde rápido CFC para poder visualizar las células en el momento de la inyección y se inyectó 1 μl (aproximadamente 5000 células) a cada embrión. Para ello se necesitan unas microagujas que permitan el paso de las células disgregadas produciendo el menor impacto posible en el cerebro. Partiendo de capilares que tenían una longitud de 10 cm, un diámetro externo de 1,5mm y un diámetro interno de 0,86 mm, se hicieron varias pruebas cambiando los parámetros de calor, tracción y velocidad del extractor de micropipetas hasta conseguir microagujas con las dimensiones idóneas para la inyección.

El proceso de inyección de las células, llevado a cabo en campana de flujo laminar, consistió en la punción con la microaguja entre las zonas frontal y parietal del cerebro de los embriones que se encontraban en el E6 de desarrollo. Nos ayudamos de unas pinzas de punta redonda para inmovilizar al embrión y ejecutar una única inyección exitosa, ya que efectuar varias punciones puede afectar gravemente a la supervivencia de los embriones. La microaguja de vidrio va unida a un tubo de aspiración quirúrgica que permite insuflar aire de forma controlada con la boca. Se hizo una punción en el cerebro del pollo colocando el extremo de la aguja en el interior de la cavidad ventricular del pollo y, mediante el adaptador, se insufló aire en la microaguja desplazando un volumen de 1 μ l al interior del cerebro del embrión (**Fig. 10**). Una vez inyectados se volvieron a añadir 4 gotas de Penicilina/Estreptomicina al 1% y se colocaron nuevamente en el incubador.

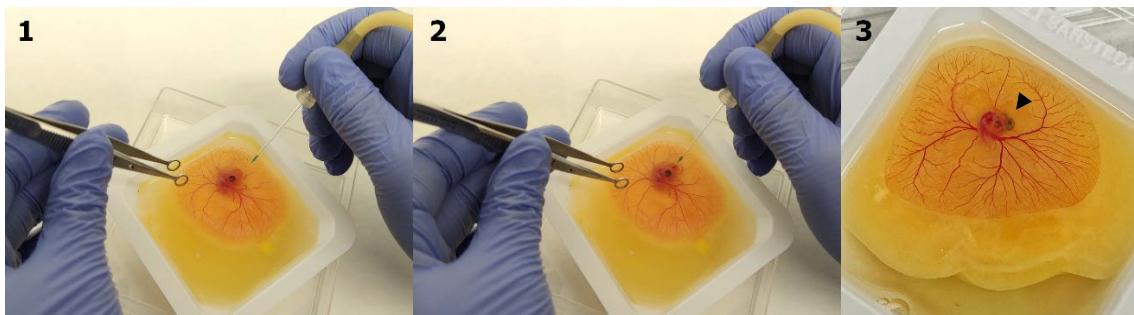


Figura 10: Línea temporal de la inyección cerebral de células humanas de GBM en embrión de pollo. Imágenes 1-2 momento de la inyección con la microaguja y las pinzas de punta redonda para inmovilizar el embrión; Imagen 3 Embrión inyectado en cavidad ventricular. La punta de flecha indica la visualización del xenoinjerto de células humanas de GBM con colorante verde rápido CFC.

5.1.3. Sacrificio

La normativa establece que el sacrificio ha de efectuarse antes del día 18-19 (Ley 32/2007), momento en que los embriones se encuentran a término. Por ello todos los sacrificios se llevaron a cabo entre los días 11 y 16 del desarrollo embrionario, E11 y E16. El sacrificio se llevó a cabo seccionando las cabezas y fijándolas en formaldehído, después se dejaron 24h en PBS 1X y se diseccionaron empleando una lupa para extraer los cerebros. Con el fin de poder realizar análisis histológicos, los cerebros fueron identificados y cada uno fue procesado de forma distinta según se realizaran los cortes en micrótopo de parafina o en micrótopo de congelación, (**Tabla 3**).

Nombre	Sacrificio (E)	Tipo de procesado	Tipo de corte
CK-10	13	Parafina	Microtomo de parafina
CK-11	13	Parafina	Microtomo de parafina
CK-12	16	Parafina	Microtomo de parafina
CK-13	16	Parafina	Microtomo de parafina
CK-14	16	Parafina	Microtomo de parafina
CK-15	11	O.C.T.	Criotomo
CK-16	11	O.C.T.	Criotomo
CK-17	11	O.C.T.	Criotomo
CK-18	11	Parafina	Microtomo de parafina
CK-19	11	Parafina	Microtomo de parafina
CK-20	11	Parafina	Microtomo de parafina
CK-21	11	Parafina	Microtomo de parafina
CK-22	11	Parafina	Microtomo de parafina
CK-23	11	Parafina	Microtomo de parafina
CK-24	13	Parafina	Microtomo de parafina
CK-25	13	Parafina	Microtomo de parafina
CK-26	13	Parafina	Microtomo de parafina
CK-27	13	Parafina	Microtomo de parafina
CK-28	13	Parafina	Microtomo de parafina
CK-29	13	O.C.T.	Criotomo
CK-30	13	O.C.T.	Criotomo

Tabla 3: Clasificación de los cerebros de pollo. (E) día de desarrollo en el que se hizo el sacrificio; Tipo de procesamiento y aparato con el que se hicieron los cortes.

5.2. Los embriones de pollo cultivados *ex ovo* revelan un desarrollo morfológico normal durante 13-16 días *in vitro*

El desarrollo y la morfología se compararon con las etapas normales del embrión de pollo descritas por Hamburger y Hamilton (49). Como se muestra en la **Figura 11**, los embriones eran fácilmente detectables en E4, revelando un desarrollo normal. Durante la incubación, la yema se expandió sobre la bandeja de plástico que contenía el embrión *ex ovo*, y los vasos sanguíneos comenzaron a extenderse suavemente sobre la yema. Además, la observación continua mostró un desarrollo morfológico normal de los embriones hasta E13, correlativo al estadio 39 de HH.



Figura 11: Morfología en distintos estadios de desarrollo del embrión de pollo. (A) Embrión en E4; (B) Embrión inyectado en E6 con aumento de angiogénesis; (C) Embrión en E13 con formación normal de extremidades y gran vascularización.

5.3. Procesado de muestras

Las muestras fueron procesadas de dos formas distintas, según si iban a ser cortadas en microtomo de parafina o microtomo de congelación. Las muestras embebidas en parafina se emplearon para la caracterización morfológica, ya que la parafina conserva mejor la estructura, y para inmunohistoquímica. Sin embargo, las elevadas temperaturas utilizadas en el proceso de embeber en parafina pueden dañar los epítomos que son reconocidos por los anticuerpos empleados en la inmunohistoquímica. Esto puede generar señales de fluorescencia más bajas o menos específicas. Para evitar este problema, algunas muestras se procesaron embebiéndolas en O.C.T. y cortándolas en microtomo de congelación. Por lo tanto, decidimos usar ambas técnicas para una mejor caracterización del tumor.

5.3.1. Microtomo de parafina

Las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina como se describe en el apartado de diseño experimental. En el paso de la inclusión será importante tener en cuenta la orientación del cerebro. Para este estudio los cerebros fueron seccionados de forma coronal, empezando por la zona frontal, empleando un microtomo de parafina (**Fig. 12A**). Se realizaron cortes de 8 μm en series de 5 y con ayuda de un pincel de punta fina se fueron introduciendo en un baño de agua caliente (60°C) (**Fig. 12B**), para que se extendieran, facilitando así su recogida en los portaobjetos. De este modo obtuvimos una representación completa de cada muestra procesada pudiendo comparar la morfología de los dos hemisferios cerebrales (**Fig. 12C**).

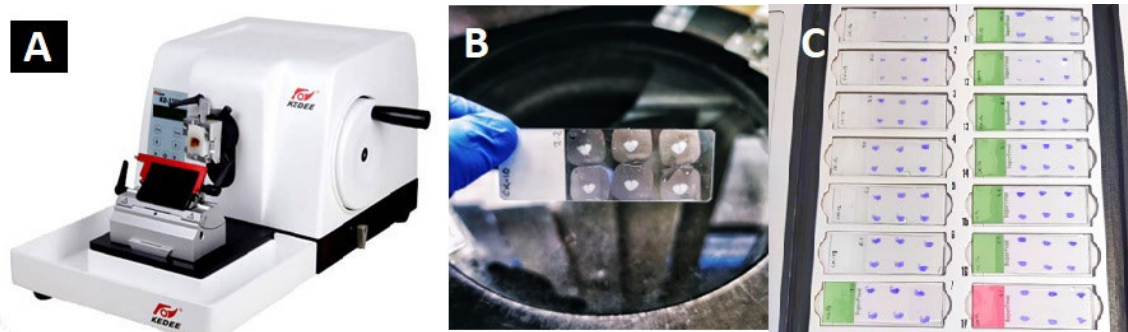


Figura 12: Procesamiento en Microtomo de parafina. (A) Microtomo de parafina; (B) recogida de las muestras en baño caliente con portaobjetos; (C) Cortes seriados de cerebro de embrión de pollo, procesados en parafina y teñidos con cristal violeta.

5.3.2. Microtomo de congelación

Para procesar las muestras en un criotomo o microtomo de congelación (**Fig. 13B**) es esencial crioprotegerlas previamente. Para ello se embebieron los cerebros en soluciones de sacarosa crecientes como se detalla en el apartado de procedimiento experimental 4.4.3. A continuación, se usaron unos moldes de plástico (22 mm x 22mm x 20mm) donde se embebieron las muestras en medio O.C.T. Debido a su composición de aguas de glicoles y resinas, este medio preserva los cortes histológicos a temperaturas entre -20C y -80C. Además, reduce la tinción de fondo no deseada ya que no deja residuos en los portaobjetos. Un paso clave nuevamente es conseguir la orientación deseada del cerebro en el momento de incluirlo en O.C.T., para posteriormente realizar los cortes en forma coronal. Nos ayudamos de la punta de una micropipeta de plástico para orientarlo y lo enfriamos en Nitrógeno líquido, para conseguir una fijación rápida con la orientación deseada (**Fig. 13A**). Las muestras se almacenaron a -80°C y se procesaron empleando un criotomo donde se seccionaron las muestras a 15 µm. En este caso la técnica de corte es más complicada puesto que trabajamos dentro de una cámara fría a -21°C. Esto implica que debemos estar abriendo y cerrando con rapidez una compuerta transparente que nos da acceso a la zona de corte para recoger las muestras (**Fig. 13C**). Además, a diferencia del microtomo de parafina, no se usa un baño caliente para extender los cortes y facilitar su adhesión a los portaobjetos, sino que nos ayudamos colocando una pieza de vidrio anti-enrollamiento sobre el corte para mantenerlo extendido y que no se pliegue en el momento previo a adherirlo al portaobjetos (**Fig. 13C**). Por las razones comentadas anteriormente, las

muestras procesadas con esta técnica serán idóneas para caracterizarlas de forma inmunohistoquímica empleando marcadores específicos de células tumorales de GBM.

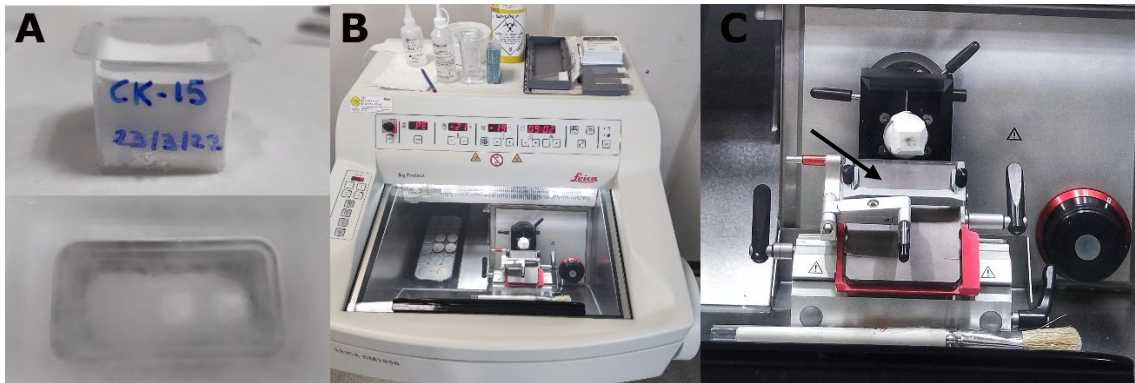


Figura 13: Procesamiento en microtomo de congelación. (A) Muestras embebidas en O.C.T. en moldes especiales y fijadas con Nitrógeno líquido; (B) Microtomo de congelación o criotomo; (C) Ampliación de la cámara fría del criotomo con muestra; Flecha indicando pieza anti-enrollamiento.

5.4. Las células de GBM humanas son capaces de injertarse y crecer en el cerebro de pollo embrionario.

Las células de GBM derivadas de pacientes se consideran un mejor estándar en la investigación del cáncer en comparación con las líneas celulares derivadas del tumor (50). Se ha demostrado que las células GBM (subtipo proneural) derivadas de pacientes mantienen las propiedades de las células madre del cáncer cuando se cultivan (51). Para validar nuestro modelo de xenoinjerto, se llevó a cabo en primer lugar un análisis morfológico. Los animales se analizaron en E11, E13 y E16 para determinar la presencia de xenoinjertos de GBM derivados de pacientes (PDX) (**Tabla 3**). Las muestras fueron examinadas mediante la técnica de cristal-violeta que permitió ver la presencia de una masa de células con crecimiento descontrolado en el hemisferio cerebral inyectado (**Fig. 15D**). En algunos casos, debido a su gran tamaño, el tumor era visible de forma macroscópica (**Fig. 15 B y C**). También se realizó un análisis histológico microscópico con tinción hematoxilina-eosina para determinar con mayor precisión las zonas de tejido sano, caracterizadas por presentar núcleos pequeños y una estructura organizada, y tejido tumoral donde se pueden observar núcleos celulares grandes, aglomeración celular y pérdida de estructura (**Fig. 14**).

Los cerebros fueron cortados de forma coronal desde la parte rostral a la caudal del cerebro (**Fig. 15A**). Se tomaron fotos seriadas del tumor que permiten su

reconstrucción y así visualizar el aumento significativo del volumen de la corteza cerebral, correspondiente al PDX (**Fig. 15D**). Estos resultados confirmaron que el cerebro embrionario de pollo es capaz de soportar el injerto y el crecimiento de los tumores derivados de pacientes.

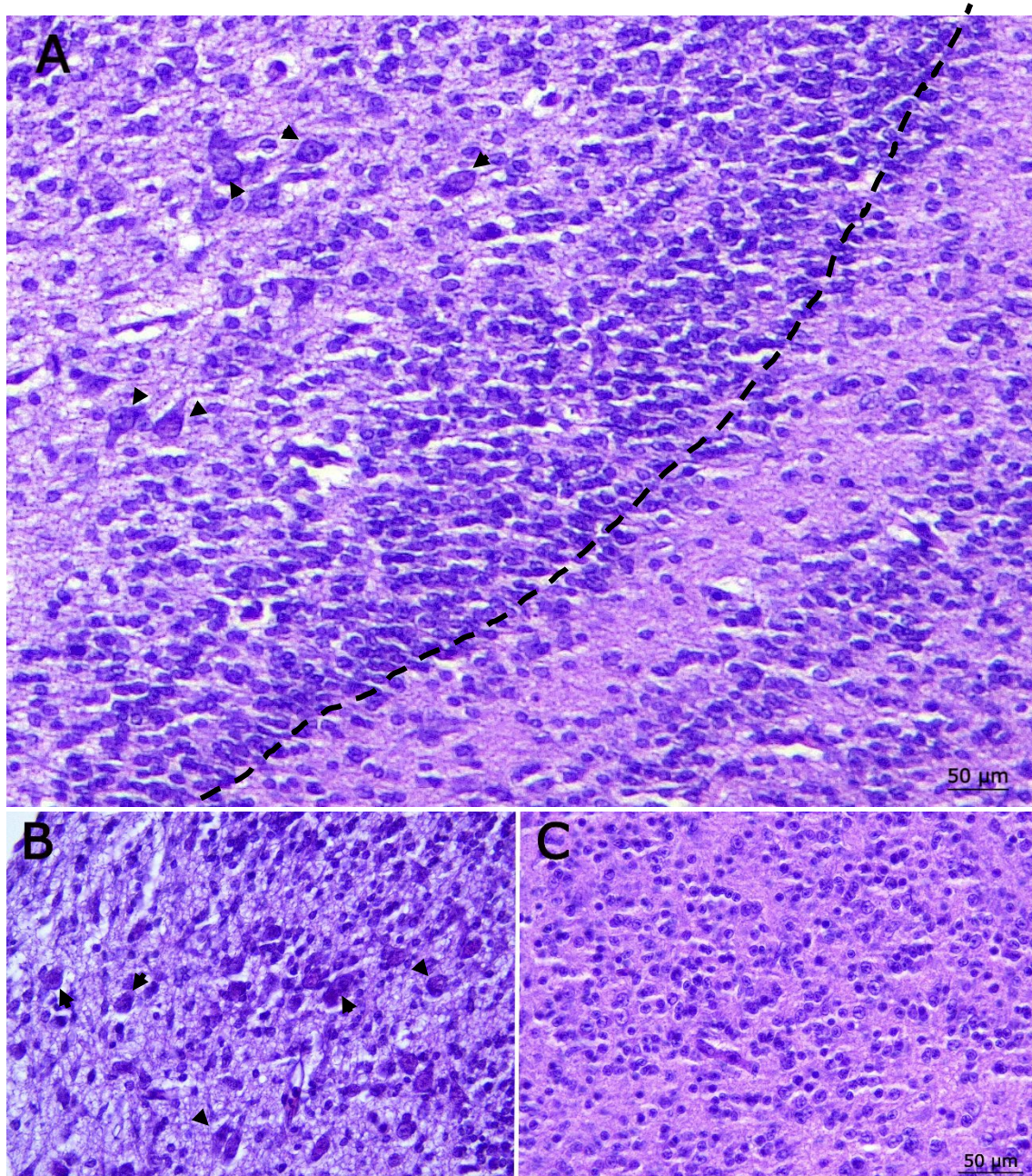


Figura 14: Cortes histológicos de cerebro de embrión de pollo con PDX. (A) Transición tejido cerebral sano a tejido tumoral; (B) Zona tumoral con presencia de células tumorales con grandes núcleos y pérdida de estructura; (C) Zona no tumoral sin pérdida de estructura y con presencia de células con núcleos pequeños. Puntas de flechas indicando los núcleos de células tumorales con volumen aumentado y pérdida de redondez. Línea de puntos delimitando la transición entre tejido sano (derecho) y tejido tumoral (izquierdo). Escala 50 μm .

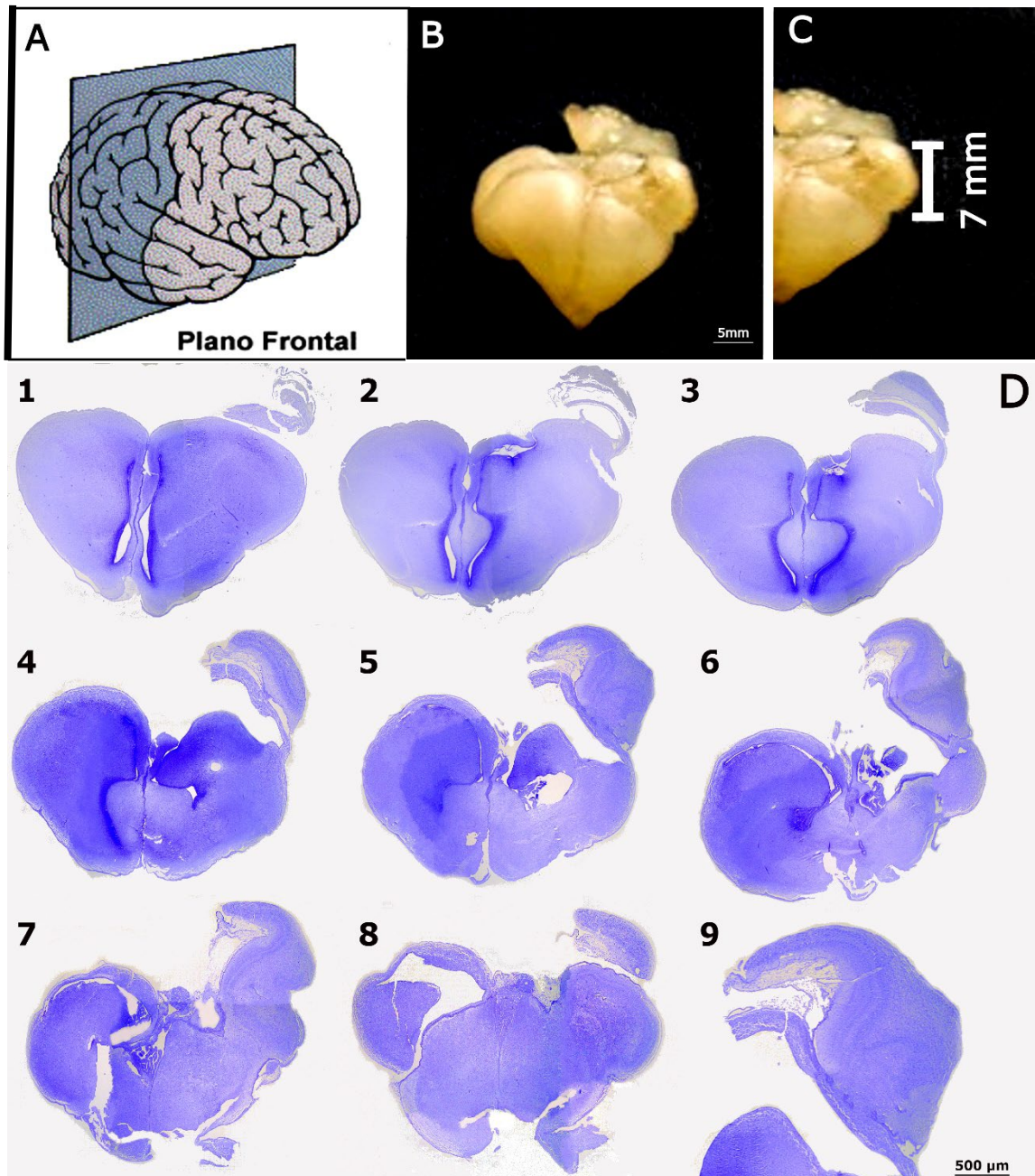


Figura 15: PDX en el cerebro de un embrión de pollo. (A) Ilustración del corte coronal llevado a cabo en un microtomo de parafina; (B) Vista macroscópica de un cerebro de embrión de pollo (CK-13) tras la disección con desarrollo de tumor en hemisferio derecho; (C) Ampliación del hemisferio izquierdo con el tumor con su medida (7mm); (D) Caracterización morfológica del desarrollo de un tumor de GBM en hemisferio izquierdo del cerebro de un embrión de pollo. Imágenes 1-8, secciones seriadas de cortes coronales de cerebro (CK-13) teñidos en cristal violeta que muestran el desarrollo del tumor; Imagen 9, ampliación del tumor; Barras de escala (b) 5mm; (d) 500µm.

5.5. Los tumores obtenidos recapitulan las características de los tumores de GBM.

En el diagnóstico de GBM se utilizan típicamente Ki67, GFAP y S100B (52). Ki67, es una proteína nuclear que se asocia con la proliferación celular, es decir se verá expresada en células que se encuentren en división y crecimiento. El análisis de la proliferación en el modelo de PDX generado, indicó que no todas las células tumorales eran Ki67+ (**Fig. 16**), esto es similar a otros modelos de PDX generados en otros modelos animales como por ejemplo el ratón (34).

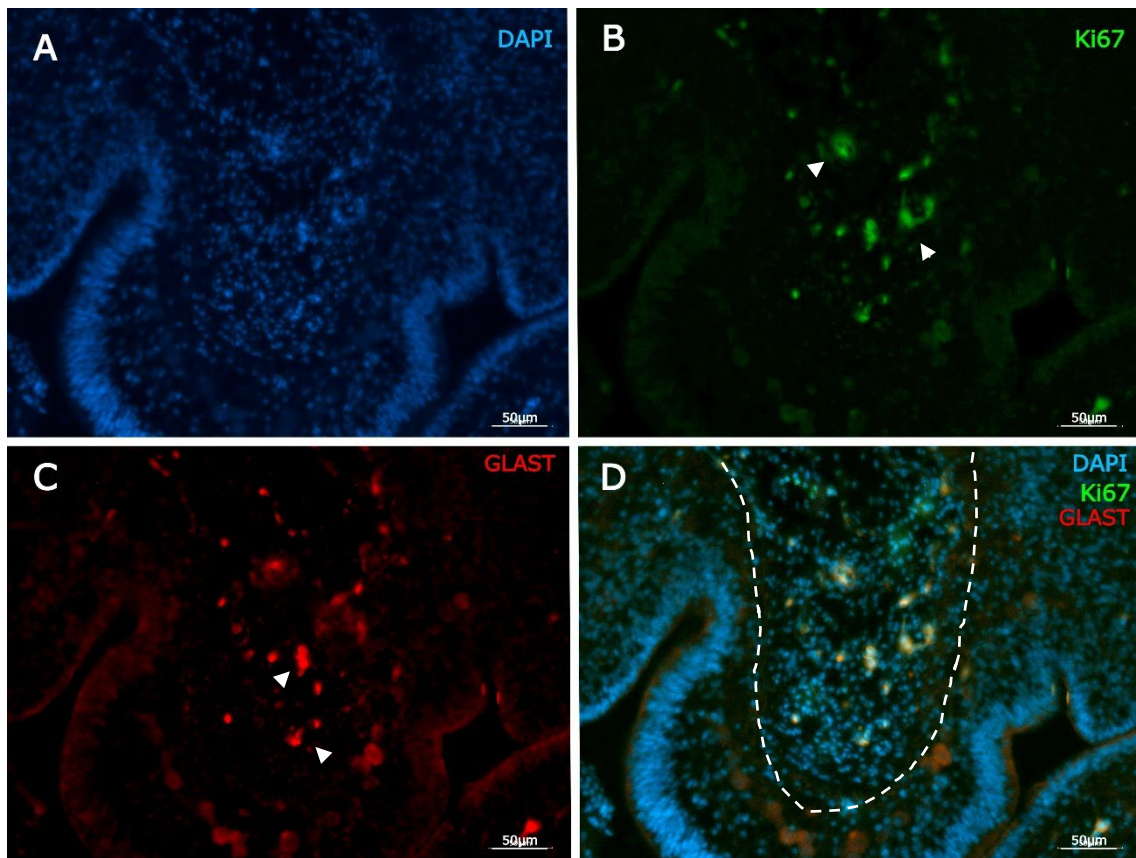


Figura 16. El PDX en pollo posee las características tumorales del GBM. (A) Imagen de la zona tumoral donde se aprecia los núcleos celulares en color azul (DAPI); (B) Marcaje en verde (Ki67) y (C) Marcaje en rojo (GLAST); Ambos indicativos de la presencia de células tumorales; (D) Combinación de la expresión de DAPI, Ki67 y GLAST; Flechas indicando el marcaje positivo; Línea de puntos delimitando zona tumoral; puntas de flecha blancas indican las células con inmunoreactividad positiva. Escala 50 µm.

GFAP es una proteína ácida fibrilar glial se expresa en los astrocitos del SNC, está relacionada con la formación de filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular. Su sobreexpresión es un marcador de astrogliosis reactiva (53). Mientras que S100B Es una proteína glial específica expresada principalmente por astrocitos, entre sus funciones se encuentran la extensión de neuritas, estimulación de flujos de calcio,

astrocitosis (aumento anormal en la cantidad de astrocitos debido a la destrucción de las neuronas cercanas) y proliferación axonal. En el SNC en desarrollo actúa como factor neurotrófico, respaldando el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de neuronas (53). Cuando se eleva es un biomarcador proteico indicativo de daño cerebral. El tumor generado en el cerebro de pollo presento una alta inmunoreactividad contra GFAP y S100B, como es característico de los tumores gliales, corroborando el hecho de que el tumor generado era de tipo glioblastoma (**Fig. 17**).

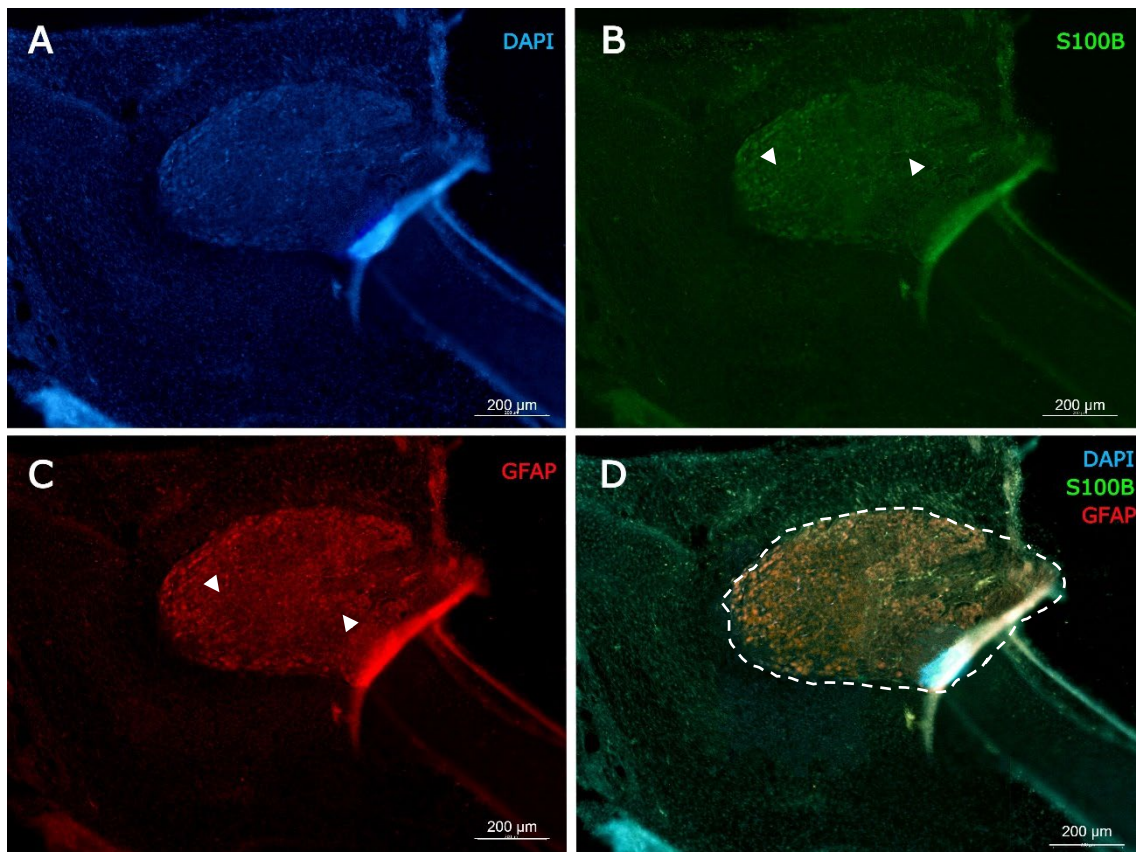


Figura 17. El PDX en pollo posee las características tumorales del GBM. (A) Imagen en mosaico con tumor completo donde se aprecia los núcleos celulares en color azul (DAPI); (B) Marcaje en verde (S100B) y (C) Marcaje en rojo (GFAP); Ambos indicativos de la presencia de células tumorales; (D) Combinación de la expresión de DAPI, S100B y GFAP. Puntas de flechas indicando marcaje positivo. Línea de puntos delimitando el tumor. Escala 200 µm.

Tomando todos estos datos en conjunto, el análisis de inmunofluorescencia de las masas tumorales identificó la expresión de antígenos específicos humanos que se encuentran presentes en la GBM de pacientes y se usan para su diagnóstico. Esto corroboró la validez de nuestro modelo como sistema *in vivo* para estudiar el GBM.

5.6. Los PDX no muestran un patrón de crecimiento invasivo en los cerebros de pollo.

A continuación, analizamos el patrón de invasión del PDX (**Fig. 18**) en el tejido de pollos embrionarios por inmunotinción. GLAST (Transportador de Glutamato-Aspartato), es una proteína de membrana expresada por astrocitos con un papel relevante en la captación de glutamato. Los astrocitos hipóxicos en condiciones patológicas como la isquemia revierten mediante estos transportadores la captación y liberan glutamato, adaptándose al microambiente tumoral hipóxico (54). GLAST se expresa en las superficies de las células de GBM y las ayuda a migrar e invadir el tejido circundante sano (55). Utilizando GLAST como marcador de células astrogliales, vimos que las células tumorales se agrupaban en el ventrículo lateral de los embriones en desarrollo (**Fig. 18**). Sin embargo, no encontramos células tumorales adyacentes a la membrana apical de las células gliales radiales GLAST + del huésped, ni "células tumorales líderes" que empezaran a invadir el neuroepitelio del huésped, como revela la continuidad del borde tumoral.

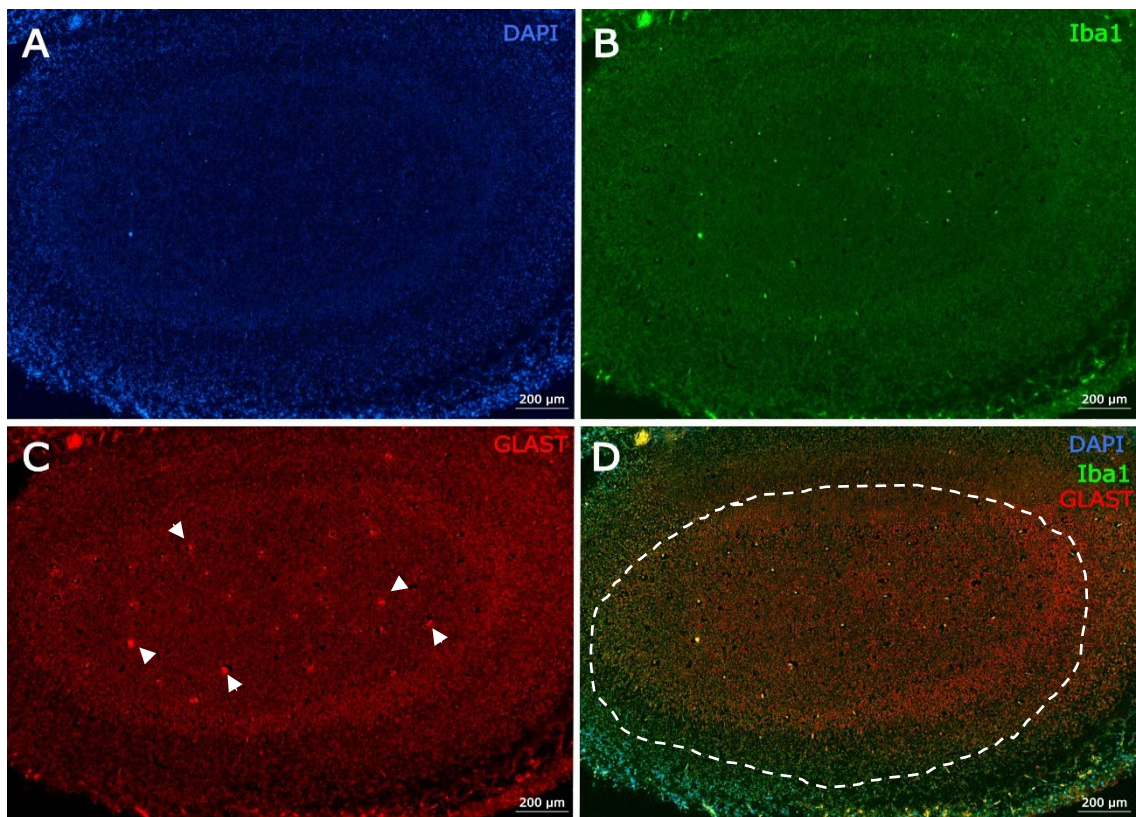


Figura 18. El PDX en pollo no muestra invasividad. (A) Imagen en mosaico con tumor completo donde se aprecia los núcleos celulares en color azul (DAPI); (B) Marcaje en verde (Iba1) y (C) Marcaje en rojo (GLAST) las células tumorales están contenidas dentro de la zona tumoral; (D) Combinación de la expresión de DAPI, Iba1 y GLAST. Puntas de flechas indicando marcaje positivo. Línea de puntos delimitando el tumor. Escala 200 µm.

5.7. El PDX no presenta patrones de infiltración y transición epitelio-mesénquima.

La transición epitelial-mesénquima, (EMT, del inglés *epithelial-mesenchymal transition*), se produce al ocurrir una serie de cambios en la expresión génica de las células epiteliales que las lleva a adquirir un fenotipo de célula mesénquima. Esto provoca que las células epiteliales pierdan su organización y las interacciones intercelulares para adquirir una capacidad migratoria aumentada, invasividad y resistencia a la apoptosis. Lo que desencadenará la degradación de la membrana basal y la formación de células mesénquimas con capacidad migratoria e invasiva de tejidos circundantes (56). Por esta razón, nos preguntamos si en los tumores generados mediante este sistema, se producían patrones de infiltración y transición epitelio-mesénquima. Esto se comprobó mediante el análisis del marcador CD44, una glicoproteína de adhesión transmembrana compleja que participa en una amplia variedad de funciones celulares, incluida la adhesión celular, la migración, la proliferación, la apoptosis y la angiogénesis. Las cuales son características de la malignidad en condiciones patológicas.

CD44 se expresa en una amplia variedad de células, predominantemente las hematopoyéticas y mesenquimáticas, y juega un papel importante en la iniciación y progresión del tumor (57). En el análisis inmunohistoquímico observamos muy pocas células CD44 + y la señal registrada quedaba restringida al interior del tumor (**Fig. 19**). Esto sugiere que no existen patrones de infiltración con transición epitelial-mesénquima que pueden derivar en metástasis. Sin embargo, para descartar por completo esta posibilidad, habría que analizar conjuntamente la expresión de E-Cadherina y la N-Cadherina, también relacionadas con la adhesión celular, y otras proteínas relacionadas con la EMT como Snail o Prrx1.

Los datos recogidos están en concordancia con lo observado para el marcador GLAST (**Fig. 18**) y no muestran que se esté produciendo invasividad y migración desde las áreas tumorales hacia otras zonas. (**Fig. 19**).

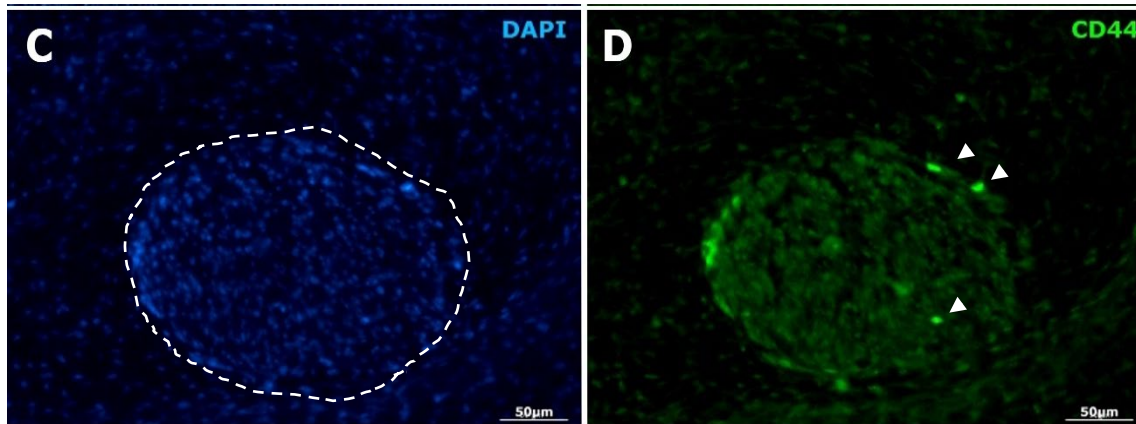


Figura 19. El PDX no presenta patrones de infiltración ni TEM. (C) Tumor donde se aprecian los núcleos celulares en color azul (DAPI); (D) Marcaje en verde (CD44). Puntas de flechas indicando el marcaje positivo. Línea de puntos delimitando el tumor Escala 50 μm .

5.8. Los tumores generados presentan activación moderada de la microglía confirmando la progresión tumoral.

Las células microgliales comprenden hasta el 30% de la masa tumoral total del GBM, constituyendo un componente importante del microambiente de estos tumores (58). La microglía es un tipo de célula cuya función principal es actuar como célula inmune y dar soporte a las neuronas (neuroglia). En los gliomas, las células microgliales son capaces de generar respuestas inmunitarias innatas, como la fagocitosis y la citotoxicidad. Además, se ha observado que la microglía infiltrada en el tumor favorece la proliferación y dispersión de las células del glioma a zonas cerebrales sanas, al incrementar la actividad de las proteinasas y degradar la matriz extracelular en la zona tumoral (59). Por lo tanto, la cantidad de infiltración microglial del tumor se asocia a un peor pronóstico.

Como marcadores microgliales se emplearon Iba1 que es una proteína que se expresa de forma específica en macrófagos y células de la microglía y CD11B que es una glicoproteína transmembrana que se expresa en la superficie de los monocitos, macrófagos, neutrófilos, granulocitos, linfocitos activados y un subconjunto de los linfocitos citolíticos naturales (60). Al realizar el análisis inmunohistoquímico pudimos observar cierta activación de la microglía en las zonas tumorales (**Fig. 20**). Esto sugería que el tumor desarrollado era capaz de generar respuestas inmunitarias innatas. En concordancia con los datos obtenidos con GLAST y CD44, la cantidad de microglía

infiltrada en el tumor no era suficiente para poder prever una dispersión del glioblastoma, dando lugar a metástasis.

Estos resultados muestran esta característica no metastásica del tumor, que probablemente venía dada por la línea celular inyectada, y confirman que el modelo es capaz de mostrar ciertos comportamientos de las células tumorales que los modelos *in vitro* no permiten estudiar.

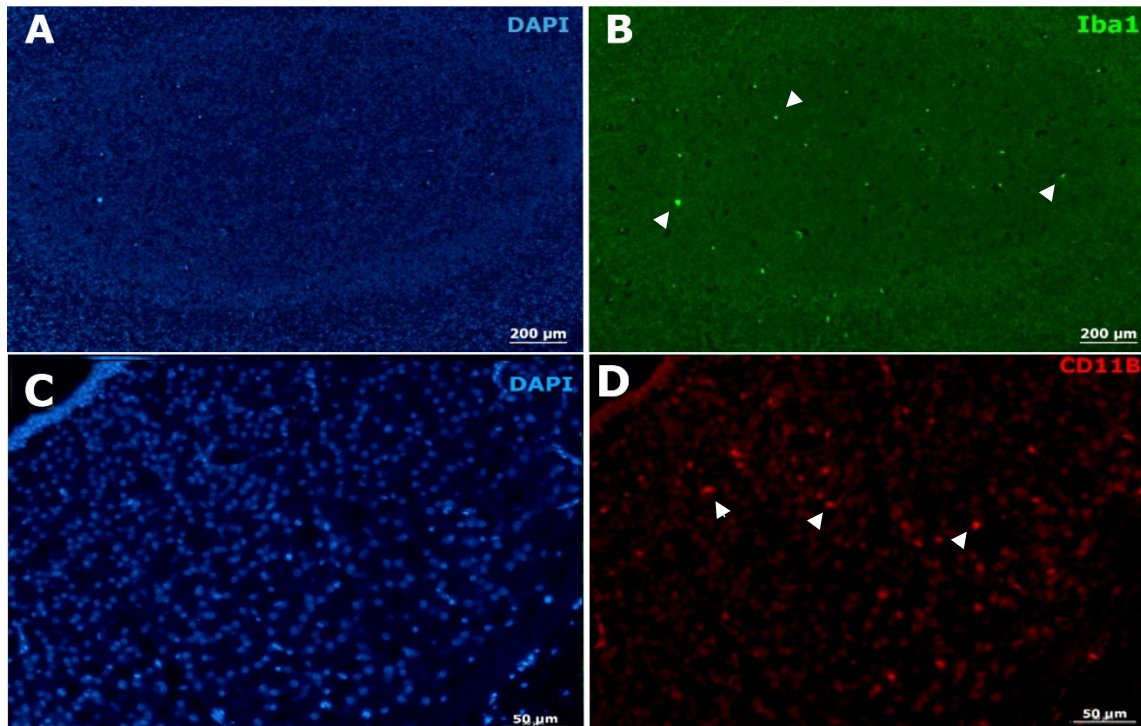


Figura 20. Activación de la microglía en la progresión del tumor. (A) Imagen en mosaico con tumor completo donde se aprecia los núcleos celulares en color azul (DAPI); (B) Marcaje en verde (Iba1) y (C) Tumor donde se aprecia los núcleos celulares en color azul (DAPI); (D) Marcaje en rojo (CD11B). Puntas de flechas indicando el marcaje positivo; Escalas (A) y (B) 200 μm ; (C), (D) 50 μm .

5.9. Prueba de concepto.

Finalmente, llevamos a cabo una prueba de concepto para comprobar que nuestro modelo podía ser usado como modelo preclínico para testar *in vivo* tratamientos contra el GBM humano.

Como los exosomas pueden ser cargados con fármacos y tienen capacidad de integrarse en sus células de origen, nos preguntamos si podríamos comprobar en nuestro modelo que la vehiculización de fármacos a través de exosomas podría llevarse a cabo. Además, se ha descrito que los exosomas son capaces de integrarse con mayor afinidad a la célula de la que proceden (61). Por lo tanto, los estudios en pollo nos permitirían comprobar a su vez si esto era así también en estudios en *in vivo*. Por lo

tanto, en un primer experimento se comprobó la integración de los exosomas en las células tumorales *in vitro*. Mientras que, en un segundo experimento se comprobó *in vivo*, inyectando exosomas marcados en nuestro modelo, si estos eran capaces de direccionarse hacia las zonas tumorales del cerebro (Fig. 21).

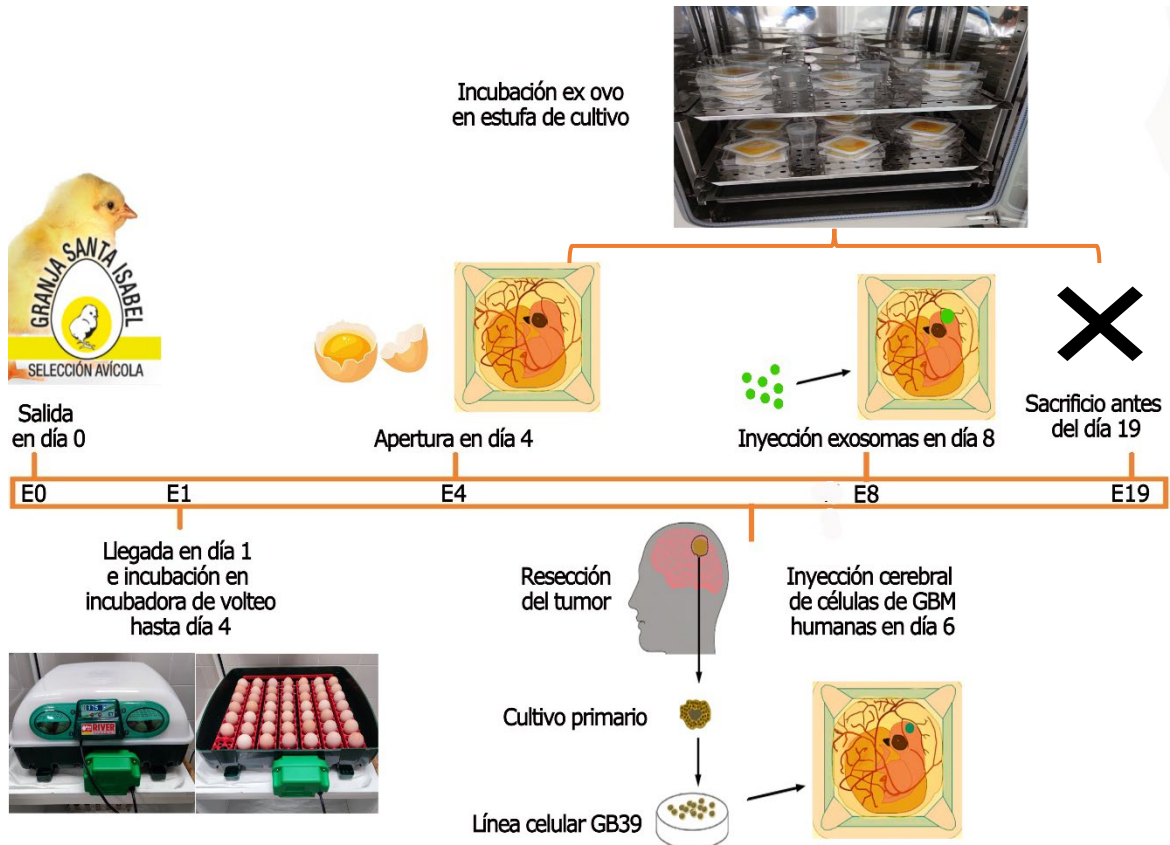


Figura 21. Cronograma detallado del PDX incluyendo la prueba de concepto con exosomas. (Modificado de Xiaolin Ai *et al.*, 2022) (45).

Los exosomas se extrajeron de las células GB-39 mediante una serie de centrifugaciones diferenciales como se detalla anteriormente. Los exosomas empleados en la integración se marcaron con colorante rojo de fluorescencia, mientras que los exosomas inyectados en el cerebro de los embriones de pollo se marcaron con colorante verde fluorescente tal y como se detalla en el apartado de diseño experimental.

5.9.2. Los exosomas son capaces de integrarse en las células tumorales GB-39.

En primer lugar, se comprobó la integración de los exosomas en células tumorales GB-39. Para ello, empleamos exosomas extraídos de las células tumorales de GBM de la línea celular GB-39. Se seleccionaron los de esta línea en base a previas observaciones de nuestro grupo donde se vio que las células tumorales GB-39 poseían

exosomas de mayor tamaño. Esto supone una ventaja para estudios preclínicos futuros donde se utilicen exosomas en la vehiculización de fármacos, ya que permitirá cargar mayor cantidad de medicamento en ellos (62)

Las células GB-39 se cultivaron y pasadas 24 horas se añadieron los exosomas con marcaje rojo a diferentes tiempos. Como no sabíamos el momento exacto en que los exosomas se iban a integrar en las células, éstas se fijaron a distintos intervalos de tiempo (1 hora, 5 horas y 24 horas) tras la adición de los exosomas. Después de fijar las células con exosomas se hizo una inmunohistoquímica con E-cadherina, marcando la membrana celular de color verde y con DAPI para marcar el núcleo de color azul. Después, se observaron las células en el microscopio invertido Axio, donde se obtuvieron imágenes en 2D (**Fig. 22A-D**) y mediante un apilamiento en Z, se hizo una reconstrucción en 3D al tomar imágenes de las células a diferente altura (**Fig. 22E**). Esto nos permitió ver por un lado que los exosomas se había integrado en la célula tumoral y por otro la posición relativa de los exosomas dentro de la célula. La reconstrucción de fotos sobre el eje Z mostró que los exosomas se habían integrado en las células entre la interfase del núcleo y la membrana celular (**Fig. 22**).

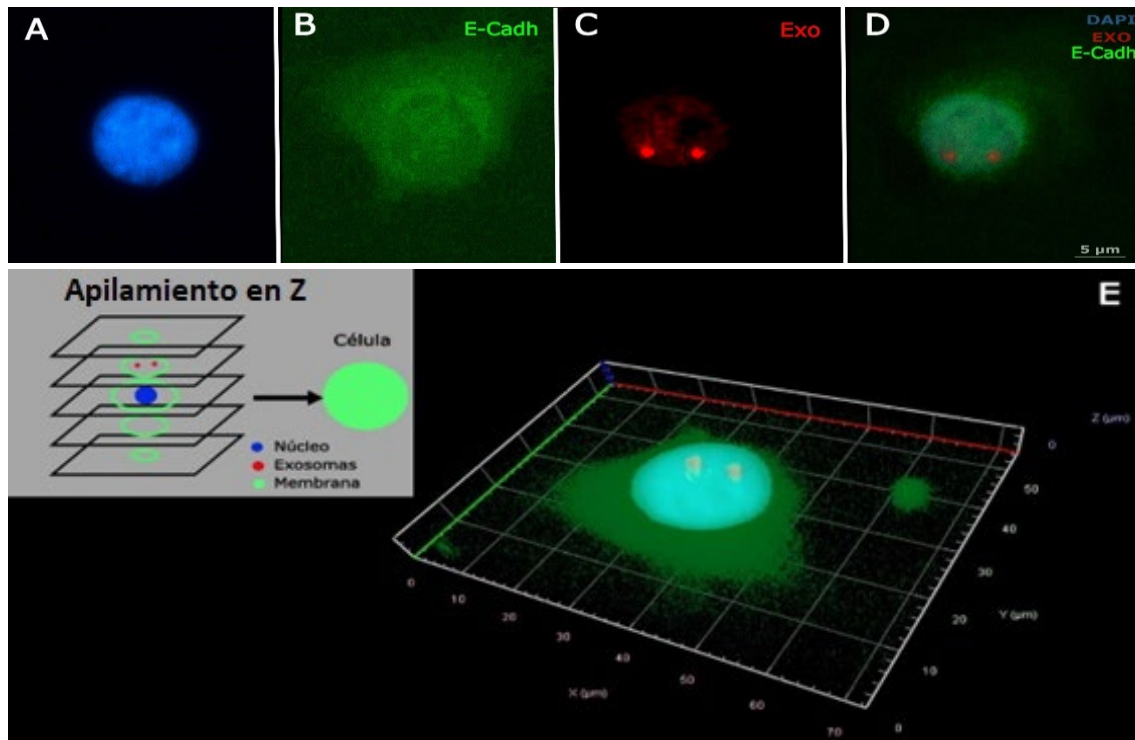


Figura 22: Integración de los exosomas en célula tumoral GB-39. (A) Marcaje del núcleo en color azul (DAPI); (B) Marcaje de E-Cadherina en membrana celular en color verde (E-Cadh); (C) Marcaje en rojo de los exosomas integrados dentro de la célula (Exo); (D) Combinación de la expresión de DAPI, E-Cadh y Exo; (E) Reconstrucción 3D de apilamiento en Z de célula tumoral GB-39. Marcaje de E-Cadherina en la membrana celular de color verde. Marcaje del núcleo de color azul (DAPI). Marcaje de los exosomas en color rojo. Escala 5 μm .

5.9.3. Los exosomas muestran una direccionalidad preferencial a la zona tumoral en el modelo de embrión de pollo.

Se ha comprobado que los exosomas tienen direccionalidad a su célula de origen y que además poseen una excelente biocompatibilidad, baja inmunogenicidad, baja toxicidad y capacidad para superar barreras biológicas. Todas estas cualidades los convierte en buenos vehículos de administración de fármacos en terapias contra el cáncer (63).

Tras comprobar que los exosomas eran capaces de integrarse en las células tumorales GB-39, nos planteamos si podríamos inyectar exosomas *in vivo* y ver una acumulación de ellos en las zonas tumorales. Para ello, se inyectaron exosomas marcados con fluorescencia verde en el cerebro de embriones de pollo en E8, dos días después de la inyección de células tumorales de GBM (**Fig. 21**). La inyección se realizó en campana de flujo laminar empleando microagujas de vidrio con las medidas anteriormente descritas. Mediante un microscopio de fluorescencia observamos que los exosomas marcados estaban presentes en la zona tumoral (**Fig. 23**).

Estos datos corroboraron la capacidad de los exosomas de direccionarse, dentro de un modelo *in vivo*, hacia las células GB-39 localizadas en las áreas tumorales en nuestro modelo de embrión de pollo.

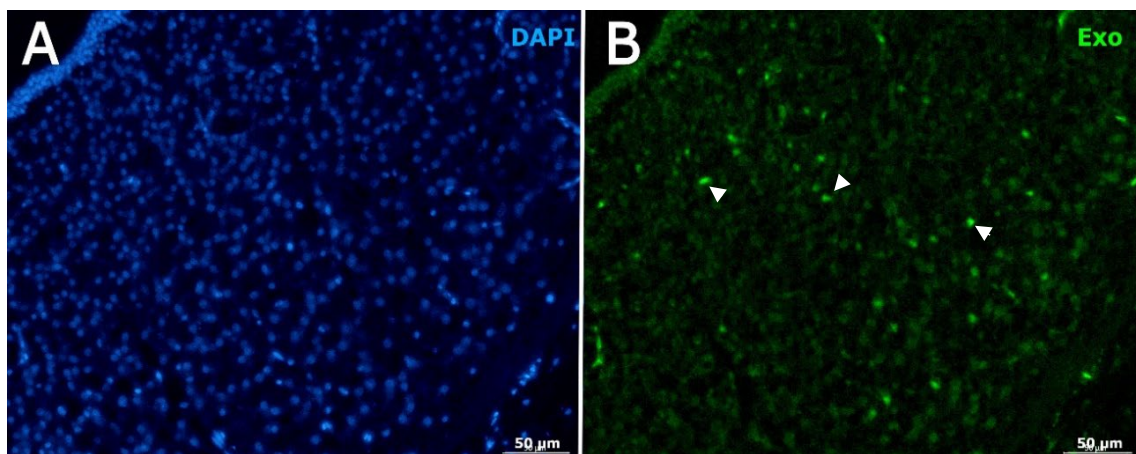


Figura 23: Marcaje positivo de exosomas en las zonas tumorales. (A) Zona tumoral donde se aprecian los núcleos celulares en color azul (DAPI); (B) Marcaje en color verde de exosomas en la zona tumoral (Exo). Flechas indicando el marcaje positivo. Escala 50 µm.

5.10. Proyección futura

Los datos recogidos en este proyecto podrían extrapolarse a futuros estudios experimentales en el campo de la biomedicina, donde se podría utilizar este nuevo modelo animal basado en embriones de pollo para estudiar posibles tratamientos contra el GBM.

Esto permitiría desarrollar terapias específicas a cada paciente en base al tipo de tumor que haya desarrollado. Concretamente, este modelo permitiría la generación de una cohorte de embriones a los que se les inyecta las células de un mismo paciente y donde se puede estudiar qué tipo de tratamiento es más efectivo para ese paciente en concreto (**Fig. 24**). Estos tratamientos podrían ser administrados de forma directa o mediante su vehiculización a través de nanopartículas o incluso exosomas.

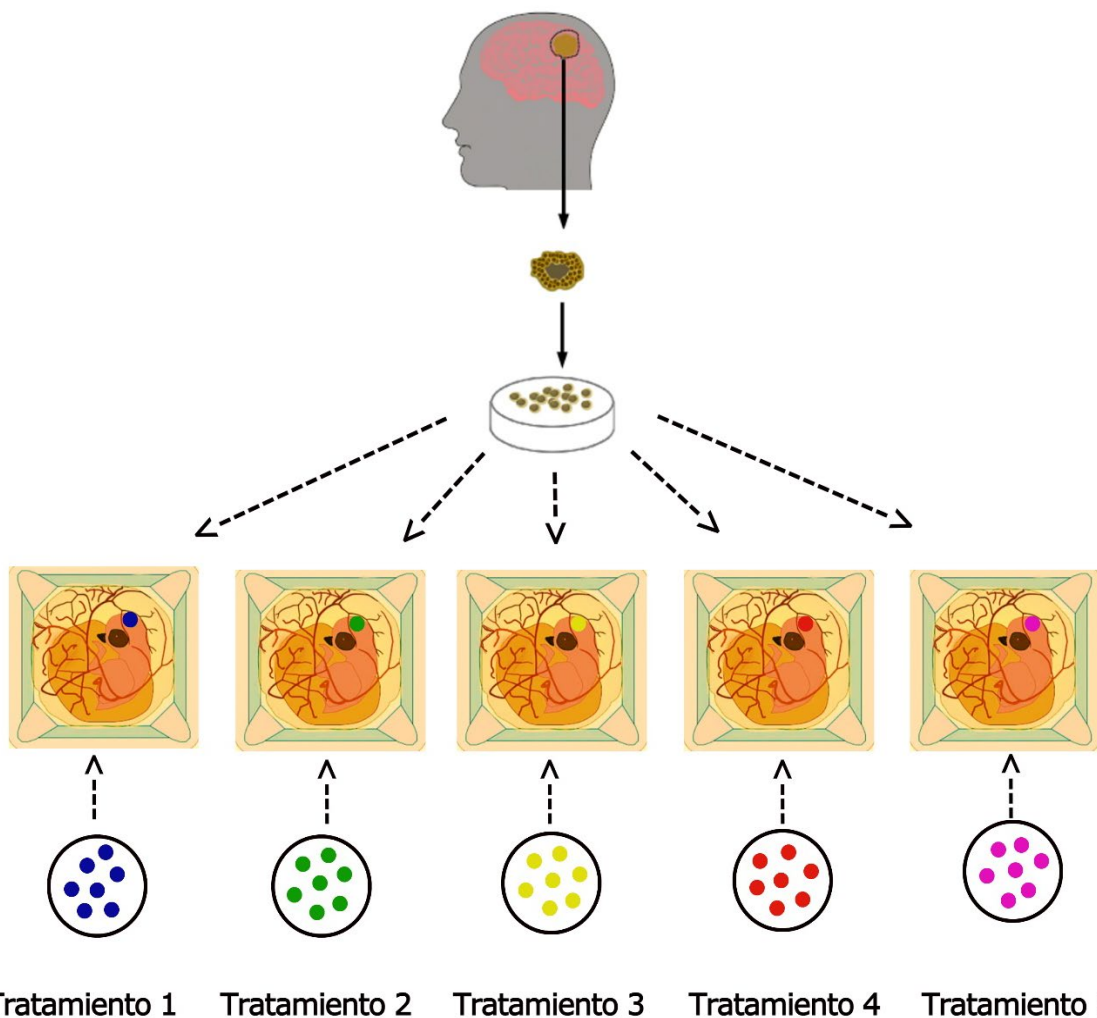


Figura 24. Terapia específica futura para el tratamiento del GBM empleando nuestro modelo animal basado en embriones de pollo. (Modificado de Xiaolin Ai *et al.*, 2022) (45).

Las principales ventajas que aporta este nuevo modelo animal son la posibilidad de desarrollar réplicas de tumores de origen humano, teniendo en cuenta factores importantes como el microambiente tumoral, la angiogénesis o la capacidad de invasividad y metástasis. También permite desarrollar tratamientos eficaces y específicos a cada paciente, probando distintos fármacos o terapias combinadas vehiculizadas mediante exosomas u otro tipo de nanopartícula de origen natural o sintético, evaluando la regresión del tumor en respuesta al tratamiento. Por último, este nuevo modelo animal para el estudio del GBM, permite acortar los tiempos de espera respecto a otros modelos animales de estudio. Este procedimiento posibilita, en un tiempo máximo de 19 días de desarrollo embrionario, generar un tumor que recapitule las características del paciente y probar varios tratamientos simultáneamente.

6. DISCUSIÓN

El empleo de modelos animales en el estudio e investigación del desarrollo tumoral es un factor clave para entender de manera global la génesis de los tumores y su microambiente. Así como muchos otros factores relacionados que también influyen de manera indirecta, y que escapan a la experimentación *in vitro*.

El hecho de que el GBM sea un tumor altamente agresivo y que la esperanza de vida de los pacientes que lo sufren sea muy corta, hace necesario el desarrollo de modelos animales de estudio que permitan, en el menor tiempo posible, reproducir el mismo tumor generado en el paciente y asignar una terapia específica y efectiva acorde a cada tipo de tumor y a cada paciente.

Por este motivo, la finalidad de este trabajo fue desarrollar y caracterizar un nuevo modelo de experimentación animal basado en embriones de pollo para el estudio del GBM. Basándonos en estudios anteriores, se escogió el embrión de pollo como modelo animal por ser económicos y requerir pocos cuidados, además poseen una buena resistencia a manipulaciones microquirúrgicas y no requieren permiso de experimentación animal. Cabe destacar que el hecho de realizar un PDX en el cerebro de los embriones, y no en la CAM como se había realizado hasta ahora, proporciona una

mejor aproximación para el estudio del GBM. Esta aproximación permite tener en cuenta factores importantes que afectan al desarrollo del tumor como el microambiente tumoral, la angiogénesis y la capacidad de invadir otros tejidos o metastatizar.

De manera general, se observó que el desarrollo normal de los embriones no se veía afectado por su crecimiento *ex ovo*, ya que durante todos los estadios embrionarios se pudo observar un desarrollo morfológico normal correspondiente a las etapas descritas por Hamburger y Hamilton.

En algunos casos el tumor era visible de forma macroscópica en los cerebros diseccionados y también, se pudo observar mediante una reconstrucción de fotos seriadas de distintas secciones del cerebro, el desarrollo de la masa tumoral en uno de los hemisferios cerebrales. Estos resultados confirman que el cerebro embrionario de pollo permite el injerto y el crecimiento de células tumorales derivadas de paciente.

El análisis histológico de los tumores de GBM humanos se caracteriza por la presencia de pleomorfismo nuclear y celularidad densa en un ambiente de alta microvascularización (64). Los análisis histológicos de las muestras de los cerebros procesados confirmaron la presencia de células tumorales con núcleos de mayor tamaño y con pérdida de redondez, así como la pérdida de estructura de las zonas tumorales respecto a las zonas de tejido sano.

Los marcadores típicamente utilizados en el diagnóstico del GBM, KI67, GFAP y S100B, fueron detectados en los tumores generados, corroborando así el hecho de que los tumores eran de tipo glioblastoma.

En los tumores de GBM humanos, encontramos que las metástasis extracraneales son un evento poco común dentro del desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, entorno al 2% de los pacientes diagnosticados con GBM han descrito invasión a otros tejidos u órganos como pulmón, hígado, hueso o ganglios linfáticos (65). En el análisis inmunohistoquímico de GLAST, observamos que las células tumorales se agrupaban en el ventrículo lateral de los embriones en desarrollo, pero no invadían el neuroepitelio del huésped. Es más, la tenue señal del marcador CD44 que observamos quedaba restringida al interior del tumor, confirmando que no existen patrones de infiltración con transición epitelial-mesenquimal que puedan derivar en metástasis hacia otros tejidos u órganos.

En lo que respecta a los gliomas, sabemos que las células microgliales son capaces de generar respuestas inmunitarias innatas. Se ha observado una correlación entre tumores muy agresivos, con fuertes patrones de infiltración e invasividad a otros tejidos, y niveles altos de células microgliales. Por lo tanto, una fuerte activación de la microglía estaría indicando un entorno inflamatorio y patológico. Los análisis inmunohistológicos de los marcadores específicos de microglía Iba1 y CD11B en las zonas tumorales revelaron una señal moderada correspondiente a la progresión del tumor. En concordancia con los demás resultados, esta señal no indicaba que se estuviera produciendo una invasividad e infiltración que pudiesen derivar en metástasis en este momento de desarrollo del tumor.

La prueba de concepto realizada mostró que nuestro modelo animal era óptimo para realizar estudios clínicos basados en la vehiculización de fármacos con exosomas en el tratamiento del GBM. Primeramente, comprobamos que los exosomas de la línea celular GB-39, empleados en este experimento, eran capaces de integrarse correctamente en las células tumorales de GBM. En segundo lugar, comprobamos por primera vez *in vivo*, su capacidad de dirigirse de forma específica a las zonas del cerebro donde se habían generado los tumores de GBM.

Los datos recogidos en la realización de la prueba de concepto corroboran que nuestro modelo basado en embriones de pollo es válido para el estudio *in vivo* del GBM. Estos hallazgos junto con el nuevo modelo que hemos desarrollado abren la puerta a futuros estudios experimentales en el campo de la biomedicina para el tratamiento del GBM. Pudiendo establecer terapias específicas para cada paciente según el tipo de tumor que posea y que permitan en un tiempo relativamente corto, acceder al mejor tratamiento posible. La generación de PDX en estos nuevos modelos de embriones de pollo *ex ovo*, permite testar varios tratamientos al mismo tiempo y ver cómo reaccionan al tumor. Además, nuestros experimentos con exosomas abren la puerta a la vehiculización de fármacos mediante vesículas extracelulares. Esto permitiría alcanzar el tumor de forma más eficaz y evitar además los posibles efectos secundarios de la aplicación directa de los fármacos.

7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación, se concluye lo siguiente:

1. Se ha conseguido desarrollar un nuevo modelo animal para el estudio del GBM que consiste en un PDX en el cerebro de embriones de pollo.
2. El modelo animal basado en embriones de pollo cultivados *ex ovo* manifiesta un desarrollo morfológico normal durante 13-16 días *in vitro*.
3. Las células de GBM humanas son capaces de injertarse y proliferar en el cerebro de pollo embrionario desarrollando tumores.
4. Los tumores obtenidos recapitulan las características de los tumores de GBM humanos.
5. Los PDX no muestran un patrón de crecimiento invasivo en los cerebros de los embriones de pollo en los que se basa nuestro modelo.
6. Los PDX no presentan patrones de infiltración y transición epitelio-mesénquima en los cerebros de embriones de pollo en los que se basa nuestro modelo.
7. Los PDX revelan activación moderada de la microglía confirmando la progresión del tumor.
8. Los exosomas de la línea celular GB-39 son capaces de integrarse en su célula de origen.
9. Los exosomas inyectados *in vivo* en el cerebro de los embriones de pollo presentan direccionalidad hacia las zonas tumorales.
10. La prueba de concepto llevada a cabo, mediante la inyección e integración de exosomas, confirma que nuestro modelo puede ser usado como modelo preclínico para testar *in vivo* tratamientos contra el GBM humano.
11. Los datos recogidos en este proyecto podrán extrapolarse a futuros estudios experimentales en el campo de la biomedicina para el tratamiento del GBM.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Luis F Rendon 1 2 IAT, David J Cote 3 6, Aaron Gabriel 7, Timothy R Smith 3, Marike L D Broekman, Rania A Mekary. "Statins and Gliomas: A Systematic Review of the Preclinical Studies and Meta-Analysis of the Clinical Literature". *Drugs*. 2022;82(3).
2. Kimberly D. Miller MPH QTOP, MPH, Carol Kruchko BA, et al. "Brain and other central nervous system tumor statistics". 2021. *A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library*.
3. Goldman SA. "Gliomas - Trastornos neurológicos". Manual MSD versión para profesionales. Sana Biotechnology. 2021.
4. Louis DN OH, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO. "Classification of Tumours of the Central Nervous System". 2022.
5. Roel G W Verhaak 1 KAH, Elizabeth Purdom, Victoria Wang, et al.. "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1". *Cancer cell*. 2010;17(1).
6. Carlos A Castañeda^{1 a}, Sandro Casavilca^{1,b}, Enrique Orrego^{1,c}, Pamela García-Corrochano^{1,d}, Pedro Deza^{1,e}, Hugo Heinike^{1,e}, Miluska Castillo^{1,f}, Carolina Belmar-Lopez^{1,g}, Luis Ojeda. "Glioblastoma: Análisis molecular y sus implicancias clínicas". 2015.
7. Ning Lin WY, Kaiming Gao, Yinyi Wang, Junxia Zhang, Yongping You. "Prevalence and clinicopathologic characteristics of the molecular subtypes in malignant glioma: a multi-institutional analysis of 941 cases". *PLoS one*. 2014;9(4).
8. María Lucinda Aguirre Cruz JS. "Tumores cerebrales". 2008.
9. Sheila K. Singh CH, Ian D. Clarke, Jeremy A. Squire, Jane Bayani, Takuichiro Hide, R. Mark Henkelman, Michael D. Cusimano & Peter B. Dirks. "Identification of human brain tumour initiating cells". *Nature*. 2004;432(7015):396-401.
10. Robert M Bachoo 1 EAM, Keith L Ligon, Norman E Sharpless, Suzanne S Chan, Mingjian James You, Yi Tang, Jessica DeFrances, Elizabeth Stover, Ralph Weissleder, David H Rowitch, David N Louis, Ronald A DePinho. "Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis". *Cancer cell*. 2002;1(3).
11. Theresa A. Ulrich, 2 Elena M. de Juan Pardo, Sanjay Kumar. "The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells". 2010.
12. Ana Laura V. Alves INFG, Adriana Cruvinel Carloni, Marcela Rosa, Luciane Sussuchi da Silva, Adriane Evangelista, Rui Manuel Reis Barretos, Viviane Aline Oliveira Silva. "Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives". 2021.
13. Melissa T Bu PC, Lizhong Ding, Willy Hugo. "The roles of TGF- β and VEGF pathways in the suppression of antitumor immunity in melanoma and other solid tumors". *Pharmacology & therapeutics*. 2022.

14. Domènech M, Hernández A, Plaja A, Martínez-Balibrea E, Balañà C. "Hypoxia: The Cornerstone of Glioblastoma". *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(22):12608.
15. Franco-Hernández C, Martínez-Glez V, Rey JA. "Molecular biology of glioblastomas". *Neurocirugía*. 2007;18(5):373-82.
16. Kim Y, University of Michigan D, United States, ayouhappy@gmail.com. "Regulation of Cell Proliferation and Migration in Glioblastoma: New Therapeutic Approach". *Frontiers in Oncology*. 2013;0.
17. Valenzuela R. "Nuevas terapias en el manejo de gliomas de alto grado". *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2017;28(3):401-8.
18. Andriy Marusyk MJ, Kornelia Polyak. "Intratumor Heterogeneity: The Rosetta Stone of Therapy Resistance". *Cancer cell*. 2020;37(4).
19. Kristin H. Kain JWIM, Celestial R. Jones-Paris, Rebecca T. Thomason, John D. Lewis, David M. Bader, Joey V. Barnett, Andries Zijlstra. "The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research". 2014 - *Developmental Dynamics*.
20. Julio Contreras Rodríguez PMS, Inmaculada Santos Rodríguez y Concepción Rojo Salvador. "El embrión de pollo como modelo de experimentación: ven y descubre la embriología". 2022.
21. Burch WMSRaRL. "The Principles of Humane Experimental Technique". 1959.
22. Pieter Vader 1 XOB, Matthew J A Wood. "Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy". *Trends in molecular medicine*. 2014;20(7).
23. Romero H. "Exosomes: Helping you stay in touch with your trillions of closest friends". 2019.
24. T Bilzer¹, G Reifemberger, W Wechsler. "Chemical induction of brain tumors in rats by nitrosoureas: molecular biology and neuropathology". *Neurotoxicology and teratology*. 1989;11(6).
25. Augusto Rojas Martínez EACC, Hugo A. Barrera Saldaña. "Diferencia de efectos de la terapia génica en tumores ortotópicos y heterotópico". 2002.
26. Naoki Kobayashi M.D.1 NAMD, Nancy R. Clendenon Ph.D.1, and Li-Wen Ko. "An improved rat brain-tumor model". *Journal Of Neurosurgery*. 2022.
27. S D Finkelstein¹, P Black, T P Nowak, C M Hand, S Christensen, P W Finch. "Histological characteristics and expression of acidic and basic fibroblast growth factor genes in intracerebral xenogeneic transplants of human glioma cells". *Neurosurgery*. 1994;34(1).
28. Tünde Szatmári¹, Katalin Lumniczky, Szilvia Désaknai, Stéphane Trajcevski, Egon J Hídvégi, Hirofumi Hamada, Géza Sáfrány "Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy". *Cancer science*. 2006;97(6).

29. Upasana Sahu RFB, Yoshihiro Otani, Ryan McCormack, Balveen Kaur. "Rat and Mouse Brain Tumor Models for Experimental Neuro-Oncology Research". *J Neuropathol Exp Neurol*. 2022.
30. Tomoyuki Koga, Isaac A. Chaim, Jorge A. Benitez, Sebastian Markmiller, et al. "Longitudinal assessment of tumor development using cancer avatars derived from genetically engineered pluripotent stem cells". *Nature communications*. 2020;11(1).
31. Gayle C. Bosma, R. Philip Custer, Melvin J. Bosma "A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse". *Nature*. 1983;301(5900).
32. Leonard D. Shultz, Fumihiko Ishikawa, Dale L. Greiner. "Humanized mice in translational biomedical research". *Nature reviews Immunology*. 2007;7(2).
33. Katsuto Takenaka, Tatiana K Prasolava, Jean C Y Wang, Steven M Mortin-Toth, Sam Khalouei, Olga I Gan, John E Dick y Jayne S Danska. "Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells". *Nature immunology*. 2007;8(12).
34. Nadin Hoffmann VF, Rui Cruz Pereira, Silvia Rancati, Roberta Pelizzoli, Davide De Pietri Tonelli. "A Xenotransplant Model of Human Brain Tumors in Wild-Type Mice". *iScience*. 2020;23(1).
35. Domenico Ribatti, Roberto Tamma, Tiziana Annese. "Chorioallantoic membrane vascularization. A meta-analysis". *Experimental cell research*. 2021;405(2).
36. Warren Burggren MRA. "Angiogenesis in the Avian Embryo Chorioallantoic Membrane: A Perspective on Research Trends and a Case Study on Toxicant Vascular Effects". *Journal of cardiovascular development and disease*. 2020;7(4).
37. Sara Rezzola 1 AL, Michela Corsini, Francesco Semeraro, Tiziana Annese, Marco Presta, Domenico Ribatti. "Angiogenesis-Inflammation Cross Talk in Diabetic Retinopathy: Novel Insights From the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane/Human Vitreous Platform". *Frontiers in immunology*. 2020;11.
38. Ribatti D. "The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane in the Study of Angiogenesis and Metastasis". 2010.
39. Lowenthal JW CT, McWaters PG, York JJ. "Development of T cell immune responsiveness in the chicken". *Immunology and cell biology*. 1994;72(2).
40. El D. "Chorioallantoic Membrane Microtumor Model to Study the Mechanisms of Tumor Angiogenesis, Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation". *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2016;1430.
41. Ribatti D. "The CAM assay in the study of the metastatic process". *Experimental cell research*. 2021;400(2).
42. Ribatti D. "The chick embryo chorioallantoic membrane as an experimental model to study in vivo angiogenesis in glioblastoma multiforme". *Brain research bulletin*. 2022;182.

43. Gareth Griffiths, Alasdair McDowall, Ruth Back, Jacques Dubochet. "On the preparation of cryosections for immunocytochemistry". *Journal of Ultrastructure Research*. 2022;89(1):65-78.
44. Theresa A Ulrich¹, Elena M de Juan Pardo, Sanjay Kumar. "The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells". *Cancer research*. 2009;69(10).
45. Xiaolin Ai, Zengpanpan Ye, Chaoxin Xiao et al. "Clinically relevant orthotopic xenograft models of patient-derived glioblastoma in zebrafish". *Disease models & mechanisms*. 2022;15(4).
46. Maria Paz Ventero, Maria Fuentes-Baile, Cristina Quereda, Elizabeth Perez-Valeciano, Cristina Alenda, Pilar Garcia-Morales, Danilo Esposito, Pilar Dorado, Víctor Manuel Barbera, Miguel Saceda. "Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3". *PLoS one*. 2019;14(4).
47. Mary Elizabeth Davis. "Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical journal of oncology nursing*". 2016;20(5 Suppl).
48. Bram Meijlink¹, Ilya Skachkov², Antonius F W van der Steen³, Nico de Jong³, Klazina Kooiman. "The Preparation of Chicken Ex Ovo Embryos and Chorioallantoic Membrane Vessels as In Vivo Model for Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging and Microbubble-Mediated Drug Delivery Studies". *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2021(168).
49. V Hamburger, HL Hamilton. "A series of normal stages in the development of the chick embryo". 1951. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1992;195(4).
50. Juliet A Williams. "Using PDX for Preclinical Cancer Drug Discovery: The Evolving Field". *Journal of clinical medicine*. 2018;7(3).
51. Rosaria Maria Rita Gangemi, Fabrizio Griffiero, Daniela Marubbi et al. "SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity". *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27(1).
52. Shan Bian, Marko Repic, Zhenming Guo et al. "Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation". *Nature methods*. 2018;15(9).
53. Aysegül İlhan-Mutlu¹, Ludwig Wagner, Georg Widhalm et al. "Exploratory investigation of eight circulating plasma markers in brain tumor patients". *Neurosurgical review*. 2013;36(1).
54. Pellegatta S, Pisati F, Cantini G, Frattini Vr, Poliani PL, Finocchiaro G. "The neural stem cell marker GLAST, is involved in proliferation and invasion by glutamate release" | *Cancer Research | American Association for Cancer Research*. *Cancer research*. 2011.
55. Cristina Corbetta NDI, Maria Grazia Bruzzone, Monica Patanè, Bianca Pollo, Gabriele Cantini, Manuela Cominelli, Ileana Zucca, Federica Pisati, Pietro Luigi Poliani, Gaetano Finocchiaro, Serena Pellegatta. "Altered function of the glutamate–aspartate transporter GLAST, a potential therapeutic target in glioblastoma" - Corbetta - 2019 - *International Journal of Cancer - Wiley Online Library*. 2018.

56. Benedetti¹ I, Reyes² N. "Epithelial-mesenchymal transition in the progression of prostatic adenocarcinoma". 2022
57. Yong Xiao KY, Zhen Wang, Mengjie Zhao, Yanxiang Deng, Wei Ji, Yuanjie Zou, Chunfa Qian, Yong Liu, Hong Xiao, and Hongyi Liu. "CD44-Mediated Poor Prognosis in Glioma Is Associated With M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages and Immunosuppression" | Surgery. 2022.
58. W Roggendorf¹, S Strupp, W Paulus. "Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors". *Acta neuropathologica*. 1996;92(3).
59. Kimberleve Rolon YK, Luis Cubano, Mikhail Inyushin. "Microglia Activate Migration of Glioma Cells through a Pyk2 Intracellular Pathway". 2015.
60. Gabrusiewicz K, Rodriguez B, Wei J, Hashimoto Y, Healy LM, Maiti SN, et al. "Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype". 2016.
61. Yongho Jang,^{a1}Haemin Kim,^{b1}Semi Yoon, et al. "Exosome-based photoacoustic imaging guided photodynamic and immunotherapy for the treatment of pancreatic cancer". *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2021;330.
62. Salomé Araujo AM, Enrique Rodriguez, María Fuentes, Elizabeth Pérez, Pilar García, Ricardo Mallavia, Miguel Saceda, Camino de Juan. "Glioblastoma derived small extracellular vesicles: Nanoparticles for glioma treatment". Under review. 2022.
63. Xudong Wang 1 XZ, Youxiu Zhong 1, Jiuheng Shen 1, Wenlin An. Biomimetic "Exosomes: A New Generation of Drug Delivery System. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*". 2022;10.
64. Lenin Fabián Palacios Paredes CS. "High-Grade Gliomas of the Adult: Molecular Biology". 2020.
65. J. Undabeitia¹ MC, M. Arrazola^{1,2}, C. Pendleton³, I. Ruiz⁴, E. Úrculo. "Multiple extraneural metastasis of glioblastoma multiforme". *Anales Sis San Navarra*. 2015;38(1):157-61.
66. Smith DTW. "Cuidado e incubación de los huevos fértiles". 2013.

ANEXO 1

Resumen de problemas y soluciones en el desarrollo del modelo.

Al realizar los distintos experimentos para desarrollar este nuevo modelo animal (**Tabla 4**), nos enfrentamos a distintas adversidades a las que fuimos dando solución perfeccionando nuestro modelo.

Algunos de los problemas que nos encontramos es que las variaciones en la temperatura en los primeros estadios son un punto crítico en la sincronización del desarrollo embrionario. De la literatura sabemos que los huevos fecundados pueden almacenarse hasta 7 días a unos 12°C antes de ponerlos a incubar (66). Sin embargo, detectamos que, si no se ponían inmediatamente a incubar a 37°C a su llegada de la granja, se producía en los embriones un desfase en el desarrollo. Pudiendo encontrar en el mismo día de desarrollo E4, embriones con un desarrollo correspondiente a E2, otros que se asemejaban a un E4 e incluso algunos a E6. Esto supuso un problema ya que había que realizar las aperturas e inyecciones varios días consecutivos en base al tamaño de los embriones. Para solventar la desincronización que se producía en el desarrollo embrionario, se minimizó el tiempo de espera eliminando el almacenamiento. De esta forma, se ponían a incubar el mismo día de la llegada, manteniendo unas condiciones de temperatura y humedad lo más controladas posible.

Otro problema al que nos enfrentamos fueron las contaminaciones. En los primeros experimentos se detectaron varias contaminaciones que provocaron el colapso de los embriones. Por este motivo, en experimentos posteriores, se añadieron tras la apertura y en el momento de la inyección 4 gotas de Penicilina/Estreptomicina al 1% a cada embrión. Esto dobló la supervivencia de los embriones reduciendo la mitad el número de contaminaciones.

Por último, pudimos detectar que había una correlación entre los meses más fríos y el número de huevos que llegaban sin fecundar. Como se puede apreciar en la **tabla 4**, las bajas tras la apertura donde se engloban los embriones no fecundados son más altas en los meses más fríos. Mientras que, en el mes de abril, con la llegada de la primavera y la subida de la temperatura ambiental, el número de bajas por no fecundación fue 0. Con estos datos podemos sugerir que la mejor época para llevar a cabo estos experimentos

es en los meses con temperaturas intermedias correspondientes a las estaciones de primavera y otoño.

Fecha	Llegada huevos fecundados	Apertura		Bajas	Inyección Células GBM		Bajas	Inyección Exosomas marcados		Bajas	Sacrificio	
		Nº	(E)		Nº	(E)		Nº	(E)		Nº	(E)
Noviembre	36	36	E4	12	24	E6	19	No		0	2	E13
											3	E16
Enero	36	35	E4	16	X	X	X	X		X	X	
Febrero	30	28	E4	10	18	E6	X	X		X	X	
Marzo	48	38	E4	19	21	E6	16	No		0	3	E11
Abril	48	48	E4	8	30	E6	12	18	E8	5	6	E11
											6	E13

Tabla 4: La siguiente tabla detalla los experimentos realizados con embriones de pollo y sus respectivos datos. Se recogen las fechas en las que se llevaron a cabo los experimentos; los distintos procesos experimentales que se realizaron; se representa como Nº al número de individuos y como (E) al estadio en días en el que se encontraban; se refleja el número de bajas tras cada intervención donde se engloban bajas por colapso del embrión, por no fecundación y por contaminaciones. Se representa con una X y sombreado en negro la finalización de dos experimentos por dañarse el incubador y colapsar todos los embriones.