Universidad Europea

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster Universitario en Biotecnología Clínica



Caracterización fitoquímica del extracto RZEROX1 y evaluación de su efecto sobre la expresión de genes asociados al ciclo celular y a mecanismos de resistencia en células T98G de glioblastoma multiforme

Autor: María Fernanda Vallejo Artieda
Tutor: Dra. Josefa Quiroz Troncoso

Villaviciosa de Odón, 05 de octubre de 2026

Universidad Europea

Índice

CÁPITULO 1: INTRODUCCIÓN 11

1.1 Relevancia clínica del Glioblastoma Multiforme 11

1.2 Tratamientos actuales 12

1.3 Extractos naturales como alternativa a las terapias convencionales 13

CÁPITULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO 15

2.1 Hipótesis 15

2.2 Objetivo general 15

2.3 Objetivos específicos 15

CÁPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS 16

3.1 Obtención y preparación del extracto RZEROX1 16

3.2 Modelo *in vitro*: células T98G de glioblastoma 16

3.3 Caracterización fitoquímica y capacidad antioxidante del extracto RZEROX1 17

3.3.1 Cuantificación actividad antioxidante mediante la eliminación de radicales DPPH 17

3.3.2 Cuantificación de flavonoides totales 17

3.3.3 Cuantificación de fenoles totales 18

3.4 Análisis de la expresión génica 19

3.4.1 Extracción ARN total 19

3.4.2 Cuantificación de ARN 19

3.4.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc) 19

3.4.4 Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR 20

3.5. Análisis estadístico 20

CÁPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN 21

4.1 Optimización de las concentraciones de trabajo para la cuantificación de flavonoides y fenoles totales 21

4.2 Caracterización fitoquímica 23

4.3 Análisis de la expresión génica 23

CÁPITULO 5: CONTRIBUCIÓN A LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS) 25

CÁPITULO 6: CONCLUSIONES 26

CAPÍTULO 7: PERSPECTIVAS Y LÍNEAS FUTURAS 27

CÁPITULO 8: BIBLIOGRAFÍA 29

CAPÍTULO 9. ANEXOS 33

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación general de los polifenoles: Flavonoides y No Flavonoides..... 14
Figura 2. Optimización de la concentración de trabajo para el ensayo de flavonoides totales. .. 21
Figura 3. Optimización de la concentración de trabajo para el ensayo de fenoles totales. 22
Figura 4. Modulación de la expresión génica en células T98G tratadas con RZEROX1..... 24

Índice de tablas

Tabla 1. Valores de la caracterización fitoquímica normalizados por gramo de extracto seco y capacidad antioxidante del extracto RZEROX1 23

Índice de anexos

Anexo 1. Secuencias de los cebadores empleados en los ensayos de RT-qPCR. 33

Listado de abreviaturas (por orden alfabético)

3D: Tridimensional

ABCG2: ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2 (Proteína de Resistencia al Cáncer de Mama / BCRP)

ACTB: Beta-actina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico Complementario

AKT: Proteína quinasa B

AMPK: Proteína Quinasa Activada por AMP

ARN: Ácido Ribonucleico

BHE: Barrera Hematoencefálica

CCND1: Ciclina D1

CD151: Antígeno CD151

CD44: Antígeno CD44

CDKN1A: Inhibidor de Quinasa Dependiente de Ciclina 1A (p21 CIP1/WAF1)

CDKN1B: Inhibidor de Quinasa Dependiente de Ciclina 1B (p27 KIP1)

dNTPs: Desoxirribonucleótidos Trifosfato

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

EMEM/MEM: Medio Esencial Mínimo de Eagle (Eagle's Minimum Essential Medium)

EQ: Equivalentes de Quercetina

FBS: Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)

GBM: Glioblastoma

GCLC: Subunidad Catalítica de la Glutamato-Cisteína Ligasa

GSCs: Células Madre de Glioblastoma (Glioblastoma Stem Cells)

HIF1α: Factor Inducible por Hipoxia 1 Alfa

IDH1: Isocitrato Deshidrogenasa 1

LAPTM4B: Proteína Membrana Lisosomal Asociada a Tetraspanina 4B

miR: MicroARN

mTOR: Diana de la Rapamicina en Mamíferos

NEAA: Aminoácidos No Esenciales

NF-κB: Factor Nuclear Kappa B

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

PBS: Tampón Fosfato Salino

PES: Polietersulfona

PI3K: Fosfoinosítido 3-quinasa

PTEN: Homólogo de Fosfatasa y Tensina

qPCR: PCR Cuantitativa en Tiempo Real

RI: Radioterapia / Radiación Ionizante

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

RT-qPCR: Transcripción Reversa seguida de PCR Cuantitativa

SNC: Sistema Nervioso Central

SYBR: SYBR Green (Fluoróforo intercalante para qPCR)

TEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox

TGF-β: Factor de Crecimiento Transformante Beta

TMZ: Temozolomida

TP53: Proteína Tumoral p53

VEGFR2: Receptor 2 del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

Wnt: Vía de señalización Wnt (Wingless-related integration site)

RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor primario más agresivo del sistema nervioso central (SNC), caracterizado por su elevada capacidad invasiva y resistencia a las terapias convencionales. Frente a esta problemática, los extractos naturales ricos en polifenoles representan una estrategia prometedora debido a su capacidad para actuar sobre múltiples dianas biológicas. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar capacidad antioxidante del extracto natural RZEROX1 y su efecto sobre la expresión de genes asociados al ciclo celular y a mecanismos de resistencia celular en células de glioblastoma. Para ello, se realizó la caracterización fitoquímica cuantitativa de fenoles y flavonoides totales, junto con la determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo DPPH. Por otro lado, la modulación de la expresión génica en células de glioblastoma tratadas con RZEROX1 se analizó mediante RT-qPCR. El extracto presentó un contenido de flavonoides totales de 0,144 ± 0,006 mg EQ/g extracto seco, un contenido de fenoles totales de 20,73 ± 2,07 mg EAG/g extracto seco y una destacada actividad antioxidante de 36,49 ± 4,06 µM TEAC. A nivel molecular, RZEROX1 redujo significativamente los niveles de *CCND1* e indujo la sobreexpresión de los inhibidores *CDKN1A* y *CDKN1B*, sugiriendo la inducción de arresto en el ciclo celular. Paralelamente, se observó un ligero incremento en la expresión de *ABCG2* y *GCLC*, reflejando una probable respuesta celular adaptativa. En conclusión, el fitocomplejo RZEROX1 podría sugerirse como un agente bioactivo capaz de revertir el perfil proliferativo en células de glioblastoma mediante la modulación de reguladores del ciclo celular, sentando las bases para futuras evaluaciones más profundas.

Palabras clave: Glioblastoma, extractos naturales, fenoles, flavonoides, antioxidante, ciclo celular.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive primary central nervous system (CNS) tumor, characterized by high invasiveness and resistance to conventional therapies. Given this limitation, natural extracts rich in polyphenols represent a promising strategy due to their multi-target capacity on biological pathways. In this context, the primary objective of this study was to evaluate the antioxidant capacity of the natural extract RZEROX1 and its effect on the expression of genes associated with the cell cycle and cellular resistance mechanisms in glioblastoma cells. To this end, quantitative phytochemical characterization of total phenols and flavonoids was performed, alongside antioxidant capacity determination via DPPH assay. Furthermore, gene expression modulation in glioblastoma cells treated with RZEROX1 was analyzed using RT-qPCR. The extract exhibited a total flavonoid content of 0.144 ± 0.006 mg QE/g dry extract, a total phenol content of 20.73 ± 2.07 mg GAE/g dry extract, and a notable antioxidant activity of 36.49 ± 4.06 μM TEAC. At the molecular level, RZEROX1 significantly reduced *CCND1* expression levels and induced the upregulation of the cell cycle inhibitors *CDKN1A* and *CDKN1B*, suggesting cell cycle arrest induction. Parallelly, a slight increase in *ABCG2* and *GCLC* expression was observed, reflecting a probable adaptive cellular response. In conclusion, the RZEROX1 phytocomplex represents a bioactive agent capable of reversing the proliferative profile in glioblastoma cells through cell cycle regulator modulation, laying the groundwork for deeper future evaluations.

Keywords: Glioblastoma, natural extracts, phenols, flavonoids, antioxidant, cell cycle.

CÁPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Relevancia clínica del Glioblastoma Multiforme

El cáncer constituye uno de los principales retos para los sistemas de salud a nivel mundial. Según las estimaciones de la OMS, en 2024 se diagnosticaron aproximadamente 20,6 millones de nuevos casos, y se produjeron 9,8 millones de muertes por esta enfermedad. (Organización Mundial de la Salud 2026).

En este sentido, los tumores del sistema nervioso central (SNC) son un reto terapéutico, a nivel mundial, hay 324 095 nuevos casos y 248.964 fallecimientos (Organización Mundial de la Salud 2026). Entre estos tumores, el glioblastoma multiforme (GBM) es conocido por su elevada agresividad y resistencia a los tratamientos actuales (Orozco-Mera et al. 2023).

El GBM es uno de los tumores cerebrales maligno primarios del SNC más frecuente y agresivos en la población adulta. Su incidencia es mayor entre los 45 y 70 años y suele localizarse en los hemisferios cerebrales (Pouyan et al. 2025). Este tipo de tumor está caracterizado por una progresión agresiva y mal pronóstico. A pesar de los tratamientos existentes, la supervivencia global mediana de los pacientes es entre 12 a 18 meses de supervivencia, y únicamente el 3-5% sobrevive más de tres 3 años (Gregucci et al. 2024) (Orozco-Mera et al. 2023).

A nivel molecular, el glioblastoma presenta una elevada heterogeneidad y alteraciones en diferentes vías implicadas en la proliferación y supervivencia. Entre estas vías se han descrito alteraciones en PI3K/AKT/mTOR, Wnt, NF-κB y TGF-β, así como cambios en la expresión de reguladores del ciclo celular. La desregulación de *CCND1*, junto con alteraciones en inhibidores del ciclo como *CDKN1A* y *CDKN1B*, puede favorecer la pérdida del control sobre la transición G1/S y contribuir a la proliferación celular. Asimismo, alteraciones en genes supresores tumorales como TP53 y PTEN pueden favorecer la supervivencia de las células tumorales frente al daño celular (Barzegar Behrooz et al. 2022). Estas alteraciones permiten a las células tumorales su comportamiento agresivo y a su capacidad de adaptación frente a las terapias disponibles.

Además de las alteraciones en el control del ciclo celular, las células de glioblastoma tienen la capacidad para adaptarse al estrés oxidativo (Chang et al. 2025), acción de suma importancia para su supervivencia. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están presentes en los procesos de señalización celular. Se sabe que a concentraciones bajas de ROS estimula la proliferación y la vascularización. Sin embargo, su acumulación excesiva puede provocar daño oxidativo en proteínas, lípidos y ADN (Jurkowska et al. 2025). Para evitar alcanzar niveles citotóxicos de

ROS, las células tumorales activan sistemas antioxidantes que contribuyen al mantenimiento del equilibrio redox (Glorieux et al. 2024). Entre los más comunes es el metabolismo del glutatión. La síntesis está presente el gen *GCLC*, gen que codifica la subunidad catalítica de la glutamato-cisteína ligasa (Niu et al. 2024). La regulación de este sistema puede favorecer la adaptación de las células tumorales frente al estrés oxidativo y contribuir a su supervivencia. (Jurkowska et al. 2025). Otro ejemplo es el gen *ABCG2* pertenece a la familia de transportadores ABC y participa en el eflujo de xenobióticos desde el interior celular. Su sobreexpresión puede disminuir la acumulación intracelular de determinados agentes terapéuticos y contribuir, por tanto, a mecanismos de resistencia farmacológica (Lin et al. 2014).

En conjunto, la progresión del glioblastoma no depende solo de alteraciones que favorecen la proliferación celular, sino también de mecanismos que permiten a las células tumorales adaptarse a condiciones de estrés. La desregulación de genes implicados en el control del ciclo celular puede facilitar una proliferación constante. Y la activación de sistemas antioxidantes ayudan a mantener el equilibrio redox y limitar el daño provocado por niveles elevados de ROS. Además, la expresión de transportadores de membrana, como ABCG2, capaces de favorecer el eflujo de xenobióticos y reducir su acumulación intracelular ayudan a la adaptación de las células de glioblastoma frente agentes terapéuticos.

1.2 Tratamientos actuales

Hoy en día, el tratamiento estándar del GBM se basa en el protocolo Stupp, que combina la resección mediante cirugía, radioterapia y quimioterapia temozolomida (TMZ). A pesar de este protocolo, el pronóstico continúa siendo desfavorable debido, entre otros factores, a la elevada heterogeneidad tumoral, la capacidad infiltrativa del glioblastoma y la aparición de mecanismos de resistencia al tratamiento (Fletcher-Sananikone et al. 2021). En este sentido, se han explorado fármacos alternativos como la lomustina o el bevacizumab. Sin embargo, los resultados clínicos son aún insatisfactorios debido a la resistencia del tumor (Schaff y Mellinghoff 2023),

La falta de eficacia de los tratamientos actuales frente al glioblastoma se debe a características propias del tumor y del sistema nervioso central. Por ejemplo: la elevada presión intratumoral, la heterogeneidad de la vascularización y la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE), que limita la penetración de compuestos terapéuticos en el tejido cerebral (Ahmed et al. 2023).

Además, la expresión de transportadores de eflujo puede reducir la concentración intracelular de ciertos fármacos y limitar su eficacia. (Otręba et al. 2022).

Estas limitaciones demuestran la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas que logren mitigar la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

1.3 Extractos naturales como alternativa a las terapias convencionales

La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas ha impulsado el estudio de compuestos bioactivos de origen natural como un posible potencial de moléculas con actividad antitumoral. De hecho, las fuentes naturales han estado estrechamente vinculadas a la salud y la medicina humana desde tiempos remotos. Por ejemplo, como cita Gimmona en su trabajo, aproximadamente el 60% los fármacos quimioterapéuticos actuales provienen de plantas, microorganismos, algas, organismos acuáticos, etc. (Giammona et al. 2024).

En el contexto del GBM, existen diversos estudios que han buscado utilizar extractos naturales para maximizar la eficacia farmacéutica o minimizar los efectos secundarios de los tratamientos convencionales, en ensayos con humanos se utilizó plantas como la lavanda, la salvia y la hierba de limón y se observó que la administración aumentaba la supervivencia en los pacientes, por otro lado, existe un estudio donde se usó ratones y se les administro diferentes extractos de hierbas crudas y se reportó aumento de la supervivencia y reducción en el volumen del tumor (Mian, Nambiar, y Kaliaperumal 2022).

Bajo este contexto, el interés de los extractos naturales se debe, en gran medida, a los metabolitos secundarios con actividad biológica. Aunque estos compuestos no son esenciales en las funciones vitales de los organismos que los producen, son fundamentales para la adaptación al estrés y a la defensa frente a patógenos (Badmi, Gogoi, y Doyle Prestwich 2023). Estos metabolitos participan en la resistencia a patógenos, la tolerancia al estrés ambiental y la competencia alelopática. En el ámbito de la salud humana, la relevancia de estas moléculas radica en sus múltiples propiedades biológicas, como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiinflamatorios, antioxidantes y citotóxicos (Kowalski y Baj 2025).

Entre los compuestos secundarios de mayor interés son los polifenoles. Son un grupo de compuestos que se clasifican como Flavonoides y no flavonoides (Figura 1) (Di Lorenzo et al. 2021). Estos fitoquímicos poseen propiedades antioxidantes y efectos beneficiosos en la salud humana. Entre ellos, el grupo de los flavonoides han mostrado un mayor potencial anticancerígeno. Se ha demostrados que son capaces de modular la actividad de las enzimas encargadas de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS), inducir la apoptosis y la

autofagia, e inhibir la progresión de las células tumorales (Kopustinskiene et al. 2020). Estas propiedades son las que vuelven especialmente importantes a los flavonoides en la búsqueda de nuevas estrategias oncológicas.

Por estos motivos, la caracterización del contenido fenólico y flavonoide de un extracto es un primer paso para estudiar su posible potencial biológico.

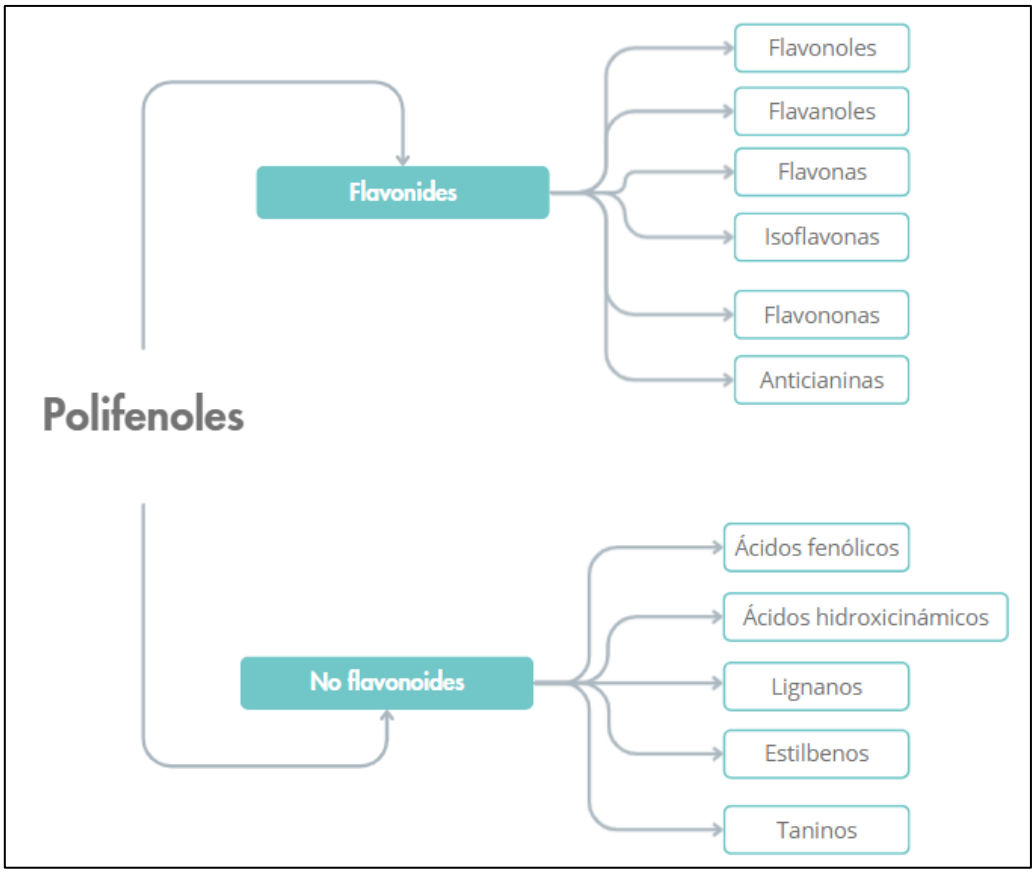


Figura 1. ***Clasificación general de los polifenoles: Flavonoides y No Flavonoides.***

Fuente: *(La autora, 2026).*

En este contexto, el presente Trabajo de Fin de Máster tiene como objetivo caracterizar fitoquímicamente el extracto natural RZEROX1 y evaluar su efecto sobre la expresión de los genes asociados en la proliferación celular, el estrés oxidativo y la resistencia a agentes quimioterapéuticos en células T98G de glioblastoma.

CÁPITULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

2.1 Hipótesis

El extracto RZEROX1 presenta compuestos con actividad antioxidante y su exposición a células T98G de glioblastoma induce cambios en la expresión de genes asociados al ciclo celular y a mecanismos de resistencia celular.

2.2 Objetivo general

Caracterizar fitoquímicamente el extracto RZEROX1 y evaluar su efecto sobre la expresión de genes asociados al ciclo celular y a mecanismos de resistencia celular en células T98G de glioblastoma.

2.3 Objetivos específicos

1. Cuantificar el contenido de fenoles totales presentes en el extracto RZEROX1 mediante el método de Folin-Ciocalteu.
2. Cuantificar el contenido de flavonoides presentes en el extracto RZEROX1 mediante el método de cloruro de aluminio.
3. Determinar la capacidad antioxidante del extracto RZEROX1 mediante el ensayo de DPPH.
4. Analizar los cambios en la expresión de genes relacionados con la proliferación tumoral celular y la expulsión de agentes quimioterapéuticos en células de glioblastoma tratadas con el extracto RZEROX1 mediante RT-qPCR.

CÁPITULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención y preparación del extracto RZEROX1

El extracto, proporcionado por la empresa RZEROX1 Prevention®, se recibió en formato líquido. Dado que su formulación está orientada a una posible administración oral, el extracto fue sometido previamente a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. Posteriormente, la muestra se liofilizó para facilitar su conservación y preparación para los ensayos experimentales. La digestión y liofilización se llevaron a cabo previamente en el laboratorio, razón por la cual el protocolo de ambas técnicas no consta en el presente trabajo.

Para los ensayos de caracterización fitoquímica, se utilizó una alícuota de 514,8 mg de extracto liofilizado, que se reconstituyó en PBS 1X hasta alcanzar una concentración de 100 mg/mL. Para los ensayos celulares, se utilizó una segunda alícuota de 330 mg, reconstituida en 1 mL de PBS 1X. Ambas alícuotas procedían del mismo lote de extracto.

Posteriormente, la alícuota destinada a cultivo celular se esterilizó mediante filtración secuencial a través de membranas de PES de 0,45 µm y 0,25 µm, utilizando filtros de jeringa estériles de 13 mm (Sterile Syringe Filter, Branchia, Labbox Labware S.L., Premià de Dalt, España)

3.2 Modelo *in vitro*: células T98G de glioblastoma

La línea celular T98G (Cytion - 305030) derivada de un glioblastoma humano, se utilizó como modelo *in vitro* para evaluar la respuesta molecular al tratamiento con RZEROX1. Esta línea presenta mutaciones en los genes importantes para la regulación de la proliferación y la supervivencia celular, entre ellos TP53 y PTEN (Jurkowska et al. 2025). Las células se recibieron junto de un certificado que acreditaba la ausencia de contaminación por micoplasma.

Las células se mantuvieron en cultivo bajo una cabina de bioseguridad de clase II (NuAire, Plymouth, EE. UU.). Se incubaron a 37 °C, 95 % de humedad relativa y 5 % de CO_2. Para su crecimiento se empleó medio EMEM/MEM (Medio Esencial Mínimo), suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS), 1 % de NEAA (Aminoácidos no esenciales) y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina).

El medio de cultivo se reemplazó cada 48 horas. Las células fueron subcultivadas una vez que alcanzaron aproximadamente un 80 % de confluencia. Para ello, se realizó una disgregación enzimática utilizando tripsina-EDTA al 0,25 % durante 3 minutos a 37 °C. La actividad

enzimática se neutralizó mediante la adición de medio de cultivo completo y la suspensión celular se centrifugó a 300–400 × g durante 3 min.

3.3 Caracterización fitoquímica y capacidad antioxidante del extracto RZEROX1

3.3.1 Cuantificación actividad antioxidante mediante la eliminación de radicales DPPH

La capacidad antioxidante del extracto RZEROX1 se determinó mediante el ensayo de eliminación del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), siguiendo un protocolo previamente estandarizado para microplacas de 96 pocillos (Quiroz Troncoso 2024).

Para la interpolación de los datos, se realizó una curva de calibración de Trolox, empleando ocho concentraciones (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 µM), mientras que, por otro lado, el extracto a evaluar se lo utilizó en una concentración de 5 mg/mL sacados de la alícuota de 514,8 mg.

En cada pocillo se añadieron 65 µL de muestra o estándar. Posteriormente se adicionaron 195 µL de solución de DPPH a 200 mg/L preparado en metanol absoluto. Las placas se incubaron en oscuridad por 30 min. Se midió la absorbancia a 517 utilizando un lector de microplacas BIOBASE-EL 10A (Shandong, China).

Las cuantificaciones se realizaron mediante tres ensayos independientes con tres replicas técnicas cada uno.

Se utilizó la siguiente fórmula para expresar los resultados:

$$Porcentaje\ de\ inhibición\ (\%) = \left(\frac{Absi\ (control) - Abso\ (muestra)}{Abs\ (control)}\right) \times 100$$

Abs i: absorbancia sin extracto (absorbancia inicial).

Abs o: absorbancia con extracto (absorbancia final).

$$\mu\ TEAC = \left(\frac{muestra\ \left(\frac{ug}{mL}\right) \times vol.dilución\ (mL) \times D\ (factor\ de\ dilución)}{masa\ extracto\ seco\ (mg)}\right)$$

3.3.2 Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó mediante el método colorimétrico del cloruro de aluminio, usando quercetina como estándar de referencia. S utilizó un protocolo previamente descrito con modificaciones (Quiroz Troncoso, 2024).

Se preparó la curva de calibración a partir de un stock de quercetina (5 mg/mL) realizando diluciones seriadas en metanol absoluto (5; 3,5; 2; 1,5; 1 y 0,5 mg/mL) con un volumen final de 40 µL.

El extracto RZEROX1 se evaluó a diferentes concentraciones (15; 20; 25; 30; 35 *y* 40 mg/mL) para determinar el intervalo adecuado de trabajo. Para cada estándar y muestra se añadieron 30 µL de nitrito de sodio al 5 % (p/v) y 400 µL de agua destilada. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 30 µL de cloruro de aluminio al 10 % (p/v). Después de 5 min, se añadió 200 µL de NaOH 1 M y 200 µL de hidróxido de sodio 1M, y se procedió a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (BIOBASE-EL 10A, Shandong, China) a una longitud de onda de 405 nm.

Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de quercetina por g de extracto seco (mg EQ/g). Las cuantificaciones se realizaron mediante tres ensayos independientes con tres replicas técnicas cada uno.

3.3.3 Cuantificación de fenoles totales

La cantidad de fenoles totales se obtuvo mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como estándar de referencia.

Previamente, se preparó una solución de carbonato de sodio al 20% (p/v) en agua destilada, la cual se llevó a ebullición y se dejó reposar durante 24 horas antes de su uso.

Para la curva de calibración, se preparó una solución stock de ácido gálico a 0,5 mg/mL en agua destilada, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas a diferentes concentraciones (0; 2,5; 10; 15; 20; 25; 30 mg/µL). El extracto se evaluó a diferentes concentraciones (0,5; 1; 1,5; 2 *y* 2,5 mg/mL).

El procedimiento se basó en la adición de 50 µL de estándar y extracto en una placa p96, seguido de 10 µL de Folin-Ciocalteu y se dejó reaccionar por 15 minutos. A continuación, se incorporaron 150 µL de la solución de carbonato de sodio y se dejó reposar en oscuridad por 2 horas. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.

Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por g de extracto seco (mg EAG/g). Todas las cuantificaciones se realizaron mediante tres ensayos independientes con tres replicas técnicas cada uno.

3.4 Análisis de la expresión génica

3.4.1 Extracción ARN total

El ARN total se extrajo a partir de células T98G previamente tratadas durante 72 horas con el extracto de RZEROX1 a concentraciones de 7 y 8 mg/mL, concentraciones que en trabajo previo en el laboratorio se observó que correspondían a Concentración Inhibitoria (IC) 30 y 50, respectivamente.

Tras tratamiento, las células se lavaron con PBS 1× y se recuperaron mediante la adición de tripsina. La suspensión celular se centrifugó a 300 × g durante 5 min y el precipitado celular se utilizó para la extracción de ARN total con el kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.2 Cuantificación de ARN

La concentración y pureza del ARN se determinaron mediante un espectrofotómetro NanoPhotometer® (Implen GmbH, Múnich, Alemania). Para la cuantificación se utilizó agua libre de ARNasas como blanco y se analizaron 2 µL de cada muestra.

Se registró la concentración de ARN (ng/µL), y las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230, con el fin de evaluar la pureza de las muestras.

3.4.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La síntesis de ADNc se realizó utilizando con el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific). Para cada reacción se empleó 1 µg de ARN total, ajustando el volumen a 11 µL con agua libre de nucleasas estéril, y se añadió 1 µL de random primers. Posteriormente, la mezcla se incubó en el termociclador CFX Opus 96 (Bio-Rad Laboratories) a 70 °C durante 5 minutos (1 ciclo).

Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de ADNc mediante la adición de la master mix, compuesta por 1 µL de RevertAid Reverse Transcriptase, 1 µL de RiboLock RNase Inhibitor, 10 mM de dNTPs (2 µL) y 4 µL de Reaction Buffer. La master mix se preparó para cinco reacciones, obteniéndose un volumen final de 40 µL. Consecutivamente, se añadieron 8 µL de esta mezcla a cada tubo de muestra.

La síntesis se realizó en el termociclador utilizando el siguiente programa: 25 °C durante 5 minutos, 42 °C durante 60 minutos y 70 °C durante 10 minutos. Finalmente, las muestras de ADNc se almacenaron a −20 °C hasta su posterior uso.

3.4.4 Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR

La expresión de los genes *CCND1, CDKN1A, CDKN1B, ABCG2* y *GCLC* se cuantificó mediante RT-qPCR utilizando el SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, USA).

Las secuencias de los cebadores se muestran en el Anexo 1. Cada reacción se preparó en un volumen final de 10 µL, utilizando SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories), cebadores forward y reverse a una 1 µM y 10 ng de ADNc.

La amplificación se realizó en un sistema de qPCR CFX Opus 96 (Bio-Rad Laboratories) utilizando el siguiente programa: 96,5 °C durante 2 minutos, seguida de 41 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, para el alineamiento se aplicó una gradiente de temperatura de 55 °C a 63 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C durante 7 minutos y un mantenimiento a 15 °C durante 1 minuto.

La expresión relativa de cada gen se calculó mediante el método 2^-ΔΔCt, utilizando ACTB como gen de referencia y las células no tratadas como control.

Para cada muestra se calculó el Ct medio de los triplicados técnicos.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante un ANOVA de dos vías, seguida de una prueba post hoc Dunnet de comparaciones múltiples, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los análisis se realizaron con GraphPad Prism – Versión 8.

CÁPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Optimización de las concentraciones de trabajo para la cuantificación de flavonoides y fenoles totales

Dado que no se disponía de datos previos sobre la caracterización fitoquímica del extracto RZEROX1. En los ensayos de flavonoides y fenoles totales, se evaluaron distintas concentraciones del extracto, con el objetivo de identificar aquellas que estuvieran dentro del intervalo lineal de la curva patrón. El aumento de la concentración de RZEROX1 mostró un incremento de la señal en ambos ensayos. Todas las concentraciones evaluadas estuvieron dentro del intervalo de la curva patrón de cada técnica. Esto permitió establecer un rango de trabajo para futuras determinaciones analíticas del extracto. Además, permitió seleccionar las concentraciones empleadas para la cuantificación de flavonoides y fenoles totales.

En el ensayo de flavonoides totales, la absorbancia aumentó progresivamente al incrementar la concentración de RZEROX1 (Figura 2A). Los valores oscilaron entre aproximadamente 0,4 nm para una concentración de 15 mg/mL y 0,6 nm para 30 mg/mL. La curva de calibración de quercetina mostró valores de absorbancia entre 0,082 nm y 0,86 nm (Figura 2B). Todas las concentraciones evaluadas de RZEROX1 se situaron dentro de este intervalo de respuesta. Al obtener estos rangos de absorbancia y concentraciones en relación a la cuantificación de flavonoides totales se seleccionó la concentración de 20 mg/mL. Esta concentración es un valor intermedio del rango de respuesta del ensayo y evitó trabajar en los extremos de la curva de calibración.

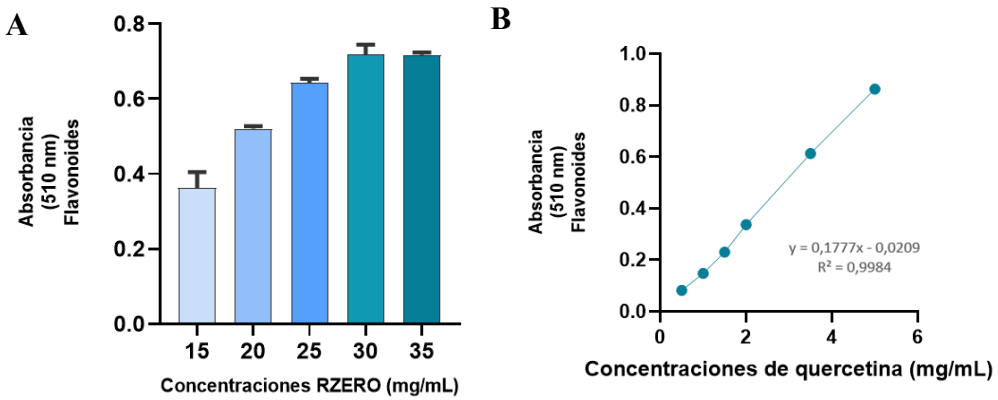


Figura 2. ***Optimización de la concentración de trabajo para el ensayo de flavonoides totales.***

A) *Absorbancia obtenida en el ensayo de flavonoides totales mediante el método colorimétrico del cloruro de aluminio, medida a 510 nm.* ***B)*** *Curva de calibración de quercetina, mostrando la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de determinación (R^2) . Las gráficas en las barras representan la media ± DE de 3 réplicas independientes con 3 réplicas técnicas cada una.*

Por otro lado, en el ensayo de fenoles totales, la absorbancia de igual manera aumentó progresivamente al incrementar la concentración de RZEROX1 (Figura 3A). Los valores se encontraron entre 0,38 nm para una concentración de 0,5 mg/mL y 0,79 nm para 2,5 mg/mL. La curva de calibración de ácido gálico mostró valores de absorbancia entre 0,034 nm y 0,58 nm (Figura 3B). En este caso las concentraciones de 2,5; 2 y 1,5 mg/mL de ácido gálico quedaron por fuera del intervalo de la curva patrón, es por eso que se seleccionó la concentración de 1 mg/mL, concentración que se encuentra en un punto intermedio sin llegar al extremo de la curva.

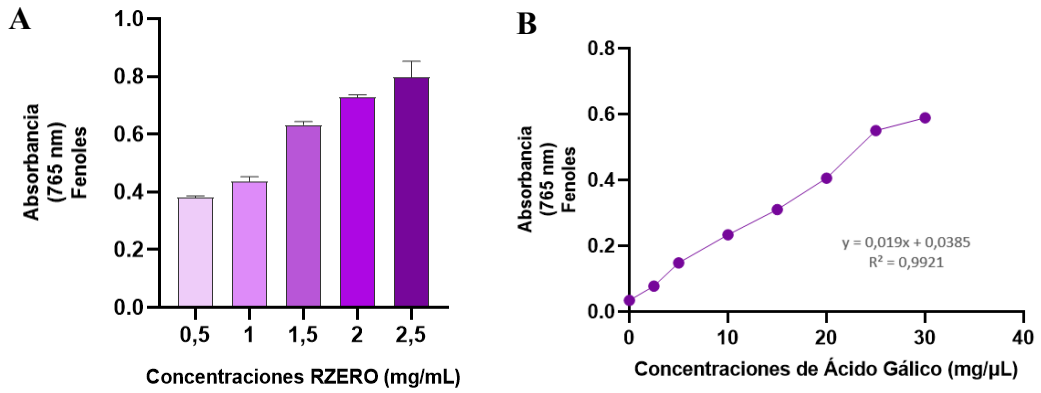


Figura 3. ***Optimización de la concentración de trabajo para el ensayo de fenoles totales.***

A) *Absorbancia obtenida en el ensayo de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, medida a 765 nm.* ***B)*** *Curva de calibración de ácido gálico, mostrando la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de determinación (R^2). Las gráficas en las barras representan la media ± DE de 3 réplicas independientes con 3 réplicas técnicas cada una.*

La estandarización previa de la concentración de trabajo es un paso de suma importancia de la caracterización fitoquímica mediante métodos colorimétricos, Estas técnicas dependen de que la señal obtenida se mantenga dentro del intervalo de respuesta de la curva de calibración. Trabajar con concentraciones demasiado bajar puede reducir la sensibilidad del ensayo, mientras que concentraciones elevadas pueden estar en rangos de saturación y comprometer la precisión de la cuantificación. Por este motivo, la selección de una concentración intermedia permite obtener resultados más fiables y comparables. Este enfoque también se ha aplicado en diferentes estudios con otros extractos vegetales, como *Biophytum sensitivum* Linn y *Hippophae rhamnoides* L. (Gao et al. 2000; Pallab et al. 2013). En nuestro caso RZEROX1, esta optimización permitió establecer condiciones analíticas adecuadas para cuantificar el contenido de flavonoides y fenoles totales del extracto.

4.2 Caracterización fitoquímica

En la Tabla 1 se resumen los resultados obtenidos para el contenido de flavonoides totales, fenoles totales y la capacidad antioxidante del extracto RZEROX1. El contenido de flavonoides totales fue de 0,144 ± 0,006 mg EQ/g de extracto seco, mientras que los fenoles totales alcanzaron 20,73 ± 2,07 mg EAG/g de extracto seco. La capacidad antioxidante determinada mediante el ensayo DPPH y a una concentración fija de 5 mg/Ml fue de 36,49 ± 4,06 µM TEAC. El cual equivale a un 84 % de inhibición del radical DPPH.

Ensayo	***Concentración óptima del extracto***	***Media ± DE***	***Unidades***
Flavonoides Totales	20 mg/mL	0,144 ± 0,006	mg EQ/g extracto seco
Fenoles Totales	1 mg/mL	20,73 ± 2,07	mg EAG/g extracto seco
Capacidad Antioxidante (DPPH)	5 mg/mL	36,49 ± 4,06	µM TEAC

Tabla 1. Valores de la caracterización fitoquímica normalizados por gramo de extracto seco y capacidad antioxidante del extracto RZEROX1.

La caracterización fitoquímica de RZEROX1 mostró la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, así como capacidad antioxidante frente al radical DPPH. Estos resultados ayudan a conocer un perfil global del extracto, aunque no identificar los compuestos responsables de dichas reacciones. La composición fitoquímica de un extracto puede variar en función de múltiples factores, como la especie vegetal, la parte utilizada, las condiciones ambientales y el método de extracción. Por ello, la comparación directa con otros extractos debe interpretarse con cautela (Tenyang et al. 2024). En este sentido, Tenyang et al. (2024) describieron una amplia variabilidad en el contenido de fenoles y flavonoides entre extractos de *Allium cepa* y *Xylopia aethiopica*. Estos trabajos muestran cómo las características propias de la materia prima y del procedimiento de obtención pueden influir de manera importante en los valores obtenidos.

4.3 Análisis de la expresión génica

La expresión relativa de cinco genes diana se analizó mediante RT-qPCR tras 72 h de tratamiento con RZEROX1. Se evaluaron *CCND1, CDKN1A* y *CDKN1B*, relacionados con la

regulación del ciclo celular; *ABCG2*, asociado al eflujo de xenobióticos; y *GCLC*, implicado en la síntesis de glutatión y la respuesta frente al estrés oxidativo. Las células se trataron con 7 y 8 mg/mL de RZEROX1, correspondientes a las concentraciones IC30 e IC50 determinadas previamente por el laboratorio. La expresión génica se calculó respecto al control no tratado.

El tratamiento con 7 mg/mL (concentración previamente asociada a la IC30) y 8 mg/mL (concentración previamente asociada a la IC50) afectó a la expresión de los genes analizados respecto al control no tratado (Figura 4). El mayor aumento se observó en *CDKN1A*, cuya expresión aumentó aproximadamente 16 veces con la IC30 y 19 veces con la IC50. *ABCG2* y *CDKN1B* también mostraron un aumento de la expresión, alcanzando aproximadamente 5,5 y 3,5 veces respecto al control en la condición IC50, respectivamente. Por su parte, *GCLC* presentó un incremento de aproximadamente 3,3 veces en la concentración más alta. En contraste, *CCND1* mostró una disminución de la expresión relativa, con valores próximos a 0,4 respecto al control.

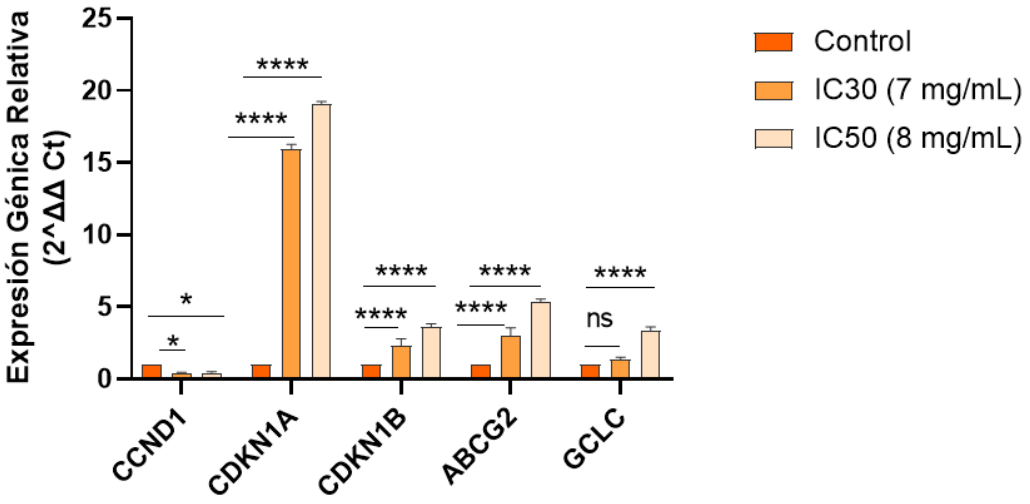


Figura 4. ***Modulación de la expresión génica en células T98G tratadas con RZEROX1.***

La expresión relativa de CCND1, CDKN1A, CDKN1B, ABCG2 Y GCLC se determinó mediante RT-qPCR tras 72 h de tratamiento con las concentraciones IC30 (7 mg/mL) e IC50 (8 mg/mL), normalizando frente a ACTB por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$*. Las barras representan la media ± DE. Las diferencias se analizaron mediante un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc Dunnett de comparaciones múltiples. Los asteriscos indican significancia estadística frente al control (*p < 0,05; ****p < 0,001).*

La disminución de *CCND1*, con el aumento de *CDKN1A* y *CDKN1B*, muestra un patrón de expresión de una menor progresión del ciclo celular (Barzegar Behrooz et al. 2022). Sin embargo, estos resultados muestran cambios a nivel transcripcional y no permiten confirmar

por sí solos una modulación del ciclo celular. Por otra parte, el aumento de *ABCG2* y *GCLC* podría indicar la activación de mecanismos de respuesta celular frente al tratamiento. *ABCG2* participa en el eflujo de xenobióticos, mientras que *GCLC* interviene en la síntesis de glutatión y en la respuesta frente al estrés oxidativo (Lin et al. 2014; Niu et al. 2024).

La regulación de la transición G1/S es un mecanismo central en el control de la proliferación celular. La ciclina D1, codificada por *CCND1*, favorece la progresión del ciclo celular, mientras que p21 y p27, codificadas por *CDKN1A* y *CDKN1B*, actúan como inhibidores de complejos ciclina-CDK. Como se ha mencionado anteriormente, la modificaciones en este equilibrio se han relacionado con la progresión del glioblastoma (Hume et al. 2021; YOO et al. 2025).

Por otra parte, la respuesta de *ABCG2* Y *GCLC* refleja la capacidad adaptativa del glioblastoma frente al estrés químico. El transportador *ABCG2* en el GBM impide que los quimioterapéuticos se acumulen en el tejido tumoral, ya que los expulsa hasta el torrente sanguíneo (Otręba et al. 2022), se ha observado que al utilizar TMZ disminuye la dosis efectiva dentro de la célula, lo que favorece la supervivencia del tumor (Lin et al. 2014). Paralelamente, la sobreexpresión de *GCLC* incrementa los niveles de glutatión (GSH), dando a las células un fenotipo de resistencia frente a la citotoxicidad de los tratamientos (Niu et al. 2024).

En resumen, estos cambios sugieren que RZEROX1 induce respuestas transcripcionales asociadas tanto al control del ciclo celular como a mecanismos de adaptación celular. Sin embargo, los resultados no permiten establecer si estas respuestas son directamente en cambios funcionales en proliferación, resistencia farmacológica o capacidad antioxidante. Por este motivo, sería necesario realizar análisis con estudios de ciclo celular, cuantificación proteica de los marcadores implicados y ensayos funcionales de resistencia y estrés oxidativo entre otros.

CÁPITULO 5: CONTRIBUCIÓN A LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE (ODS)

Los resultados de este trabajo se asocian con varios objetivos de desarrollo sostenible de la Agenda 2030. En primer lugar, al ODS3, Salud y Bienestar. Al aportar conocimiento científico de como los extractos naturales, puede llegar a modular funciones en una enfermedad tan compleja como lo es el GBM. Aunque los resultados son preliminares, pueden servir como base para futuros estudios orientados al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Este trabajo también se vincula con el ODS 9, Industria, Innovación e Infraestructura. La caracterización de RZEROX1 y el análisis de su efecto a nivel molecular aporta al desarrollo de conocimiento en el ámbito de la biotecnología aplicada a la investigación oncológica.

Por último, el estudio puede relacionarse con el ODS 12, Producción y Consumo Responsables. Al explorar el potencial de compuestos de origen natural como fuente de moléculas bioactivas. No obstante, esta contribución debe interpretarse con cautela, ya que en este trabajo no se ha evaluado de forma directa la sostenibilidad del proceso de obtención ni su impacto ambiental.

CÁPITULO 6: CONCLUSIONES

En relación con los objetivos planteados, este trabajo permite concluir que:

1. RZEROX1 presentó contenido de fenoles y flavonoides, junto con capacidad antioxidante frente al radical DPPH.
2. El tratamiento con RZEROX1 modificó la expresión de genes relacionados con el control del ciclo celular, con disminución de *CCND1* y aumento de *CDKN1A* y *CDKN1B*.
3. El tratamiento con RZEROX1 aumentó los niveles de *ABCG2* y *GCLC*. Este aumento podría sugerir la activación de mecanismos de respuesta celular asociados al eflujo de xenobióticos y al estrés oxidativo.
4. Los cambios en la expresión génica deben validarse mediante la cuantificación de las proteínas correspondientes y ensayos funcionales, como el análisis del ciclo celular y la respuesta al estrés oxidativo.

CAPÍTULO 7: PERSPECTIVAS Y LÍNEAS FUTURAS

Los resultados de este trabajo han abierto nuevas perspectivas que podrían realizarse en un futuro.

i. La primera de ellas sería, confirmar si los cambios transcripcionales observados en la RT-qPCR se traducen en variaciones en los niveles de proteínas.
ii. En relación con el ciclo celular, se propondría realizar estudios de citometría de flujo para cuantificar de manera directa las fases del ciclo celular y a su vez lograr identificar la activación de vías de muerte celular.
iii. También, sería de suma importancia identificar cualitativa y cuantitativamente las moléculas bioactivas del extracto RZEROX1 mediante cromatografía líquida acoplada a una espectrometría de masas.
iv. Y, por último, convendría escalar las pruebas a modelos celulares 3D para evaluar la capacidad del extracto para atravesar la BHE. Como se mencionó anteriormente, es uno de los pasos importante para que un fármaco enfocado en el GBM pueda funcionar.

CÁPITULO 8: BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, M. H., M. Canney, A. Carpentier, y A. Idbaih. 2023. «Overcoming the blood brain barrier in glioblastoma: Status and future perspective». *Revue Neurologique* 179(5): 430-36. doi:10.1016/j.neurol.2023.03.013.

Badmi, Raghuram, Anupam Gogoi, y Barbara Doyle Prestwich. 2023. «Secondary Metabolites and Their Role in Strawberry Defense». *Plants* 12(18): 3240. doi:10.3390/plants12183240.

Barzegar Behrooz, Amir, Zahra Talaie, Fatemeh Jusheghani, Marek J. Łos, Thomas Klonisch, y Saeid Ghavami. 2022. «Wnt and PI3K/Akt/mTOR Survival Pathways as Therapeutic Targets in Glioblastoma». *International Journal of Molecular Sciences* 23(3): 1353. doi:10.3390/ijms23031353.

Chang, Yuanhao, Jin Chang, Jiayu Ji, Jing Sun, Huimin Hu, Bo Pang, Qi Zhang, et al. 2025. «Novel Thioredoxin reductase 1 inhibitor BS1801 relieves treatment resistance and triggers endoplasmic reticulum stress by elevating reactive oxygen species in glioma». *Redox Biology* 86: 103827. doi:10.1016/j.redox.2025.103827.

Di Lorenzo, Chiara, Francesca Colombo, Simone Biella, Creina Stockley, y Patrizia Restani. 2021. «Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability». *Nutrients* 13(1): 273. doi:10.3390/nu13010273.

Fletcher-Sananikone, Eliot, Suman Kanji, Nozomi Tomimatsu, Luis Fernando Macedo Di Cristofaro, Rahul K. Kollipara, Debabrata Saha, John R. Floyd, et al. 2021. «Elimination of radiation-induced senescence in the brain tumor microenvironment attenuates glioblastoma recurrence». *Cancer research* 81(23): 5935-47. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-0752.

Gao, X., M. Ohlander, N. Jeppsson, L. Björk, y V. Trajkovski. 2000. «Changes in Antioxidant Effects and Their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea Buckthorn (Hippophae Rhamnoides L.) during Maturation». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(5): 1485-90. doi:10.1021/jf991072g.

Giammona, Alessandro, Mauro Commisso, Marcella Bonanomi, Sofia Remedia, Linda Avesani, Danilo Porro, Daniela Gaglio, Gloria Bertoli, y Alessia Lo Dico. 2024. «A

Novel Strategy for Glioblastoma Treatment by Natural Bioactive Molecules Showed a Highly Effective Anti-Cancer Potential». *Nutrients* 16(15): 2389. doi:10.3390/nu16152389.

Glorieux, Christophe, Shihua Liu, Dunyaporn Trachootham, y Peng Huang. 2024. «Targeting ROS in Cancer: Rationale and Strategies». *Nature Reviews Drug Discovery* 23(8): 583-606. doi:10.1038/s41573-024-00979-4.

Gregucci, Fabiana, Kathryn Beal, Jonathan P. S. Knisely, Paul Pagnini, Alba Fiorentino, Elisabetta Bonzano, Claire I. Vanpouille-Box, et al. 2024. «Biological Insights and Radiation-Immuno-Oncology Developments in Primary and Secondary Brain Tumors». *Cancers* 16(11): 2047. doi:10.3390/cancers16112047.

Hume, Samuel, Claudia P. Grou, Pauline Lascaux, Vincenzo D'Angiolella, Arnaud J. Legrand, Kristijan Ramadan, y Grigory L. Dianov. 2021. «The NUCKS1-SKP2-p21/p27 axis controls S phase entry». *Nature Communications* 12: 6959. doi:10.1038/s41467-021-27124-8.

Jurkowska, Halina, Ewa Jasek-Gajda, Konrad Kaleta, Leszek Rydz, Dominika Szlęzak, y Maria Wróbel. 2025. «Oxidative Stress and Iron Addiction: A Comparative Study of 1321N1 Astrocytoma and T98G Glioblastoma Cells with Differential Expression of L-Cysteine-Metabolizing Enzymes». *Biomolecules* 15(10): 1478. doi:10.3390/biom15101478.

Kopustinskiene, Dalia M., Valdas Jakstas, Arunas Savickas, y Jurga Bernatoniene. 2020. «Flavonoids as Anticancer Agents». *Nutrients* 12(2): 457. doi:10.3390/nu12020457.

Kowalski, Radosław, y Tomasz Baj. 2025. «Secondary Metabolites from Natural Products: Extraction, Isolation and Biological Activities». *Molecules* 30(21): 4233. doi:10.3390/molecules30214233.

Lin, Fan, Mark C. de Gooijer, Eloy Moreno Roig, Levi C. M. Buil, Susan M. Christner, Jan H. Beumer, Thomas Würdinger, Jos H. Beijnen, y Olaf van Tellingen. 2014. «ABCB1, ABCG2, and PTEN Determine the Response of Glioblastoma to Temozolomide and ABT-888 Therapy». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 20(10): 2703-13. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0084.

Mian, Shan Yasin, Abhishek Nambiar, y Chandrasekaran Kaliaperumal. 2022. «Phytotherapy for the Treatment of Glioblastoma: A Review». *Frontiers in Surgery* 9: 844993. doi:10.3389/fsurg.2022.844993.

Niu, Kaifeng, Zixiang Chen, Mengge Li, Guannan Ma, Yuchun Deng, Ji Zhang, Di Wei, Jiaqi Wang, y Yongliang Zhao. 2024. «NSUN2 lactylation drives cancer cell resistance to ferroptosis through enhancing GCLC-dependent glutathione synthesis». *Redox Biology* 79: 103479. doi:10.1016/j.redox.2024.103479.

Organización Mundial de la Salud. 2026. «Cancer Today». https://gco.iarc.who.int/today/ (11 de agosto de 2026).

Orozco-Mera, Javier, Fernando Peralta-Pizza, Oscar Escobar-Vidarte, Brenda Coll-Tello, y Aurelio Ariza. 2023. «Signaling Pathways in the Relapse of Glioblastoma». *Oncology* 37(3): 107-17. doi:10.46883/2023.25920986.

Otręba, Michał, Jerzy Stojko, Agata Kabała-Dzik, y Anna Rzepecka-Stojko. 2022. «Perphenazine and prochlorperazine decrease glioblastoma U-87 MG cell migration and invasion: Analysis of the ABCB1 and ABCG2 transporters, E-cadherin, α-tubulin and integrins (α3, α5, and β1) levels». *Oncology Letters* 23(6): 182. doi:10.3892/ol.2022.13302.

Pallab, KalitA, Barman Tapan, Kal Tapas, y Kalita Ramen. 2013. «ESTIMATION OF TOTAL FLAVONOIDS CONTENT (TFC) AND ANTI OXIDANT ACTIVITIES OF METHANOLIC WHOLE PLANT EXTRACT OF BIOPHYTUM SENSITIVUM LINN».

Pouyan, Ashkan, Masoud Ghorbanlo, Masoud Eslami, Majid Jahanshahi, Ehsan Ziaei, Ali Salami, Khatere Mokhtari, et al. 2025. «Glioblastoma Multiforme: Insights into Pathogenesis, Key Signaling Pathways, and Therapeutic Strategies». *Molecular Cancer* 24(1): 58. doi:10.1186/s12943-025-02267-0.

Quiroz Troncoso, Josefa Antonia. 2024. «Optimización estadística de subproductos de interés en la salud humana derivados de Synsepalum dulcificum D. y plantas similares, utilizando machine learning». PhD Thesis. Universidad Politécnica de Madrid. doi:10.20868/UPM.thesis.84628.

Schaff, Lauren R., y Ingo K. Mellinghoff. 2023. «Glioblastoma and other Primary Brain Malignancies in Adults. A Review». *JAMA* 329(7): 574-87. doi:10.1001/jama.2023.0023.

Tenyang, N., B.Z. Haman, A.J. Tawai, Z.G. Tabanty, G. Douka, R. Ponka, y H.M. Womeni. 2024. «Leaves of Allium cepa and Xylopia aethiopica fruits as potent sources of natural antioxidant for stabilization of viscera FISH oil during accelerated storage». *Heliyon* 10(10): e31225. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e31225.

YOO, KYUNGHYUN, HYE HYEON YUN, SOON-YOUNG JUNG, CHANG-NIM IM, TAE-RYONG RIEW, MUN-YONG LEE, Y JEONG-HWA LEE. 2025. «KRIBB11 Exerts Anticancer Effects on A172 Glioblastoma Cells via the Cdh1/SKP2/p27 and HSF1/p53/p21 Pathways». *Cancer Genomics & Proteomics* 22(3): 467-77. doi:10.21873/cgp.20514.

CAPÍTULO 9. ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de los cebadores empleados en los ensayos de RT-qPCR.

Para cada gen se indican los primers forward y reverse. CCND1, CDKN1A, CDKN1B, ABCG2 y GCLC corresponden a los genes diana, y ACTB (β-actina) al gen de referencia utilizado para la normalización.

Gen	***Secuencia forward***	***Secuencia reverse***	***Tm o T annealing***
	Genes diana		
CCND1	CAAGGCCTGAACCTGAGGAG	GATGGAGTTGTCGGTGTAGC	60°C
CDKN1A	CGATGCCAACTGGTCAGGAC	GTCACACCCACCTCCCAG	60°C
CDKN1B	TAACCCGGGACTTGGAGAAG	GCTTCCTTACTCGTCACGTT	60°C
ABCG2	CAGGTCTGTTGGTCAATCTCACA	TCCATATCGTGGAATGCTGAAG	60°C
GCLC	GACAAAACACAGACCCAACCC	CAGCACTCAAAGCCATAATCA	60°C
	Gen de referencia		
ACTB	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT	60°C