



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Licenciatura en Química Farmacéutico-Biológica



**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE CULTIVO CELULAR EN 3D
PARA EL ESTUDIO DEL GLIOBLASTOMA**

T E S I S

Que para obtener el título de
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

Presenta

JESSICA ITZEL GARCÍA SÁNCHEZ

JURADO DE EXAMEN

Directora: Dra. Patricia García López

Asesora: Dra. Lizett Castrejón Delgado

Asesora: M. En C. María Teresa Griselda Fuentes Lara

Sinodal: Dra. Martha Asunción Sánchez Rodríguez

Sinodal: QFB. Ana Miguel Mejía



Ciudad de México, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos institucionales

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacología de la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología y fue apoyado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) con el número de proyecto: CF-2023-I-2771

Dedicatoria

En memoria de mi abuela y mi segunda madre, Luisa, porque la promesa de encontrar la cura del cáncer sigue en pie.

A mis padres, Antonio y Claudia, porque me han sabido guiar para ser una persona de bien, incansable y honesta. Gracias por todo su amor y apoyo, gracias por las noches de desvelo compartidas, por los regaños y las celebraciones; gracias por nunca dejarme sola y siempre sostener mi mano en este camino a pesar de las adversidades.

A mi hermano, Luis, la vida no sería la misma sin tu compañía, consejos y risas, gracias por ser mi compañero de aventuras, espero poder verte también en este lugar cuando termines tu carrera, eres mi gran orgullo.

A toda mi familia, los amo infinitamente, esta tesis también lleva su nombre.

A Dios, porque ha iluminado mi camino para llegar hasta aquí y me ha permitido tener la valentía de cambiar lo que sí podía, la fortaleza para aceptar lo que no y la sabiduría para comprender la diferencia.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza” donde cumplí mi sueño de niña, ser científica; hice amigos entrañables que jamás olvidaré y me formé como profesionista.

Al Instituto Nacional de Cancerología, por acogerme en sus instalaciones y permitirme hacer ciencia con la clara convicción de mejorar la vida de los demás.

A la Dra. Patricia García López, por ser una guía en este camino, por confiar en mí y apoyarme en esta aventura, gracias por hacerme parte de su equipo y brindarme sus consejos y experiencia.

A los integrantes del laboratorio 8 de farmacología del INCAN, que más que ser mis compañeros y tutores, se convirtieron en mis amigos, gracias por su cariño y apoyo, mi estancia en el hospital no habría sido la misma sin ustedes.

A mis asesoras de tesis, la Dra. Lizett y la Mtra. Griselda, por confiar en mí y guiarme en la realización de este proyecto; y los miembros de mi jurado, la Dra. Martha y la QFB. Ana, gracias por haberme enseñado tanto durante mi camino por la universidad, les agradezco infinitamente su amistad y apoyo en este proyecto.

A Ricardo, por su apoyo y amor, porque desde que te conocí me has hecho feliz y me has permitido amarte con el corazón.

Glosario

ATCC: American Type Cell Culture

BHE: Barrera Hematoencefálica

CONCORD-3: Programa mundial de vigilancia global de tendencias de supervivencia del cáncer 2000-14

GBM: Glioblastoma multiforme

Gy: Grays

ICI: ICI 182 780 o Fulvestrant

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía de México

MEC: Matriz extracelular

MGMT: O6-methylguanine-DNA methyltransferase

MRP/ABCC1: Multidrug resistance protein o ATP binding cassette sub-family C member 1

P-gp/MDR1/ABCB1: glucoproteína de permeabilidad 1 o multidrug resistance protein 1 (MDR1) o ATP-binding cassette sub-family B member 1, ABCB1), también clúster de diferenciación 243 (CD243)

SNC: Sistema Nervioso Central

TMZ: Temozolomida

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos y dedicatorias	2
Glosario	5
Índice de figuras	7
Resumen	9
Introducción	10
Marco teórico	11
Generalidades	11
Tumores del Sistema Nervioso Central	12
Clasificación del Sistema Nervioso Central	12
Glioblastoma.....	14
Tratamiento y sus retos	14
Modelos de cultivo 3D de cáncer.....	16
Características de los esferoides de tumor.....	19
Resistencia a los fármacos.....	21
Métodos de formación.....	22
Técnicas de análisis	23
Planteamiento del problema	25
Pregunta de investigación	25
Hipótesis	26
Objetivo general	26
Objetivos particulares.....	26
Material y métodos	26
Diseño de estudio.....	26
Universo de estudio	26
Variables	27
Técnicas e instrumentos	27
Líneas celulares	27
Método de Liquid Overlay con poli-HEMA.....	27

Método de Liquid Overlay UBA	<u>28</u>
Ensayo de viabilidad LIVE/DEAD.....	<u>29</u>
Evaluación de la respuesta farmacológica.....	<u>29</u>
Diseño estadístico	<u>29</u>
Resultados.....	<u>29</u>
Discusión.....	<u>37</u>
Conclusiones.....	<u>39</u>
Perspectivas.....	<u>39</u>
Referencias.....	<u>39</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia del cáncer en el mundo y en México.....	<u>11</u>
Figura 2. Incidencia de los tumores del SNC en México y el mundo.....	<u>12</u>
Figura 3. Clasificación de los tumores del SNC	<u>13</u>
Figura 4. Mecanismos de resistencia del GBM a TMZ.....	<u>15</u>
Figura 5. Modelos preclínicos y su relevancia fisiológica	<u>17</u>
Figura 6. Comparación entre los modelos 2D y 3D	<u>18</u>
Figura 7. Características de un esferoide	<u>20</u>
Figura 8. Cinética de crecimiento de los esferoides	<u>21</u>
Figura 9. Métodos de siembra para la formación de esferoides	<u>23</u>
Figura 10. Técnicas de análisis para caracterizar esferoides	<u>24</u>
Figura 11.	
Figura 11-A. Imágenes en campo claro de los esferoides (ensayos 1-3)	<u>30</u>
Figura 11-B. Imágenes en campo claro de los esferoides (ensayos 4-6)	<u>31</u>
Figura 12. Diámetros basales de los esferoides sembrados en diferentes ensayos.....	<u>32</u>
Figura 13	
Figura 13-A Imágenes de campo claro de la cinética de crecimiento	<u>33</u>

Figura 13-B Gráfica de la cinética de crecimiento de los esferoides	<u>33</u>
--	-----------

Figura 14

Figura 14-A Panel en campo claro de los esferoides tratados (comparación).....	<u>34</u>
Figura 14-B Comparación de los diámetros de los esferoides alcanzados al final de los tratamientos.....	<u>35</u>
Figura 14-C Panel de imágenes tomadas con epifluorescencia de los esferoides al final del experimento marcados con el kit LIVE/DEAD	<u>36</u>
Figura 14-D Porcentaje relativo de células marcadas con homodímero de etidio (células muertas) de los esferoides de cada grupo tratado.....	<u>36</u>

Resumen

Antecedentes: El glioblastoma es el tipo de tumor cerebral primario más común y de mayor agresividad, tiene una supervivencia global de 14 meses, una tasa de supervivencia menor al 5% a 5 años y una recaída en el 100% de los pacientes. El glioblastoma presenta alta resistencia a la quimioterapia, para su investigación se requieren modelos experimentales que permitan el avance en su tratamiento. Una propuesta es el uso de modelos de cultivo en tres dimensiones (3D), denominados esferoides; los cuales son un modelo que aprovecha la tendencia natural de las células tumorales a agregarse. Este permite la investigación *in-vitro* para la evaluación de fármacos en un microambiente y comportamiento espacial de las células tumorales.

Objetivo: Establecer un modelo de cultivo en 3D de glioblastoma que permita evaluar la respuesta farmacológica de Temozolomida y su combinación con el antiestrogénico Fulvestrant, a través del crecimiento del esferoide y su viabilidad celular.

Metodología: Para establecer el cultivo en 3D, se utilizó la línea celular de glioblastoma C6, las cuales fueron sembradas a diferentes densidades para definir el número adecuado de células en la formación de los esferoides; se utilizó colágeno I como componente de matriz extracelular (MEC). Para la evaluación del perfil de crecimiento, se siguió el diámetro de los esferoides mediante imágenes de microscopía de campo claro. La viabilidad celular se determinó con imágenes de microscopía utilizando marcadores fluorescentes de células vivas y muertas a través de un kit LIVE/DEAD. Para evaluar la funcionalidad del modelo en 3D, se evaluó el tamaño y la viabilidad celular al final de la exposición de los tratamientos individuales o combinados de Temozolomida y Fulvestrant.

Resultados: Se estableció que el cultivo con 3000 células de la línea celular de glioblastoma C6, sembradas en cajas de baja adherencia y utilizando colágeno tipo I como componente de matriz extracelular fueron las condiciones adecuadas para generar un modelo en 3D. La respuesta a los tratamientos mostró un diámetro menor de los esferoides cuando fueron expuestos a Temozolomida, y esta disminución en el diámetro fue mayor cuando Temozolomida fue combinada con Fulvestrant, resultados que fueron correlacionados con los marcadores de viabilidad.

Conclusión: Se establecieron las condiciones experimentales para el cultivo en 3D de células de glioblastoma, resultando reproducible y funcional como modelo para la evaluación del tratamiento de Temozolomida y su combinación con el antiestrogénico Fulvestrant.

Palabras clave: esferoides, modelo preclínico, glioblastoma, Temozolomida, ICI, Fulvestrant, LIVE/DEAD.

1. Introducción

Una de las enfermedades actuales cuyo desarrollo se considera un problema de salud pública es el glioblastoma (GBM), un tumor cerebral que se considera raro ya que su incidencia es de menos de 10 por cada 100,000 personas, presenta un mal pronóstico con una tasa de supervivencia global de entre 14 a 15 meses después del diagnóstico (1). Tiene una supervivencia global a los 5 años del 4 al 17% de acuerdo con el tercer ciclo del estudio CONCORD-3 (2) y afecta tanto a hombres como mujeres con una edad media de 62 años (3).

El mayor avance en la investigación de distintos tipos de cáncer ha sido a través de modelos preclínicos, entre los que se encuentran las líneas celulares inmortalizadas, esferoides y organoides, organismos como *Drosophila melanogaster*, ratones genéticamente modificados, cerdos y xenoinjertos derivados de pacientes, entre otros (4).

Dadas las cifras de alarma del glioblastoma se necesitan más investigaciones científicas básicas y el desarrollo de modelos biológicos eficientes para abordar las limitaciones clínicas actuales asociadas con su diagnóstico y el tratamiento (5).

En la actualidad el uso del cultivo celular en 2D se ha convertido en el estándar de oro para investigar nuevos tratamientos; sin embargo, es importante destacar las limitantes de este método. Por otro lado, existen los modelos preclínicos en animales, que, aunque no presentan las mismas dificultades que el modelo en 2D, no son métodos totalmente fieles cuando se comparan con un individuo o paciente, además de ser un modelo costoso (6-9).

En este sentido, los esferoides o tumoresferas son un modelo que imita mejor las características de un tumor sólido, pero con líneas celulares (10), los cuales se definen como agregados celulares que se han desarrollado a partir de un pequeño número de células que han sido cultivadas en un medio no adherente, la disposición de estas células le permite desarrollar características fisicoquímicas que se asemejan más a un tumor sólido que un cultivo en monocapa (11).

Una característica importante de los esferoides es la distribución de las células en diferentes estadios del ciclo celular a lo largo de toda la extensión de esta masa, por lo que se puede encontrar un gradiente en los niveles de saturación de oxígeno, concentración de lactato y cantidad de nutrientes, lo cual se traduce en un modelo que imita las características de un microambiente tumoral, permitiendo evaluar de manera más eficiente el efecto de los fármacos en un tumor. (12)

Por lo tanto, en el presente trabajo experimental se planteó como objetivo establecer un modelo de cultivo en 3D con líneas celulares de glioblastoma que permita la evaluación de Temozolomida y el antiestrogénico Fulvestrant.

2. Marco Teórico

2.1 Generalidades

El cáncer se considera una enfermedad epidémica que cuesta cerca de 8 millones de vidas al año en todo el mundo (4). En México en el 2021 se registraron 1,122, 249 defunciones en el país, de las cuales 8 % (90 123) se debió a tumores malignos (figura 1); además según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía de México (INEGI) a partir de los 50 años hay un incremento más dinámico en la tasa de defunción por tumores malignos, tanto en hombres como en mujeres, aunque a partir de los 60 años, la tasa en cada grupo de edad es superior en los hombres (figura 1) (13).

Entre los tipos de cáncer principales que afectaron a la población de 0 a 19 años, se enlistan, en primer lugar, leucemia; el tumor maligno de las meninges, del encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central; el tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas; así como linfomas no Hodgkin (13).

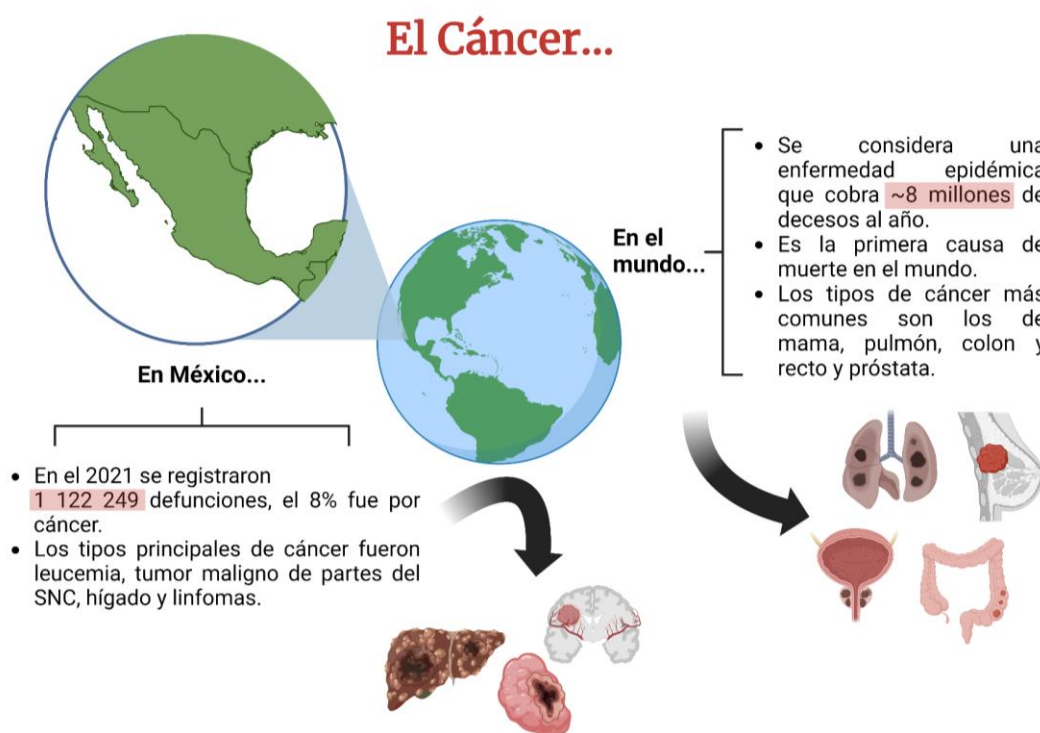


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer en México y en el mundo (13)

2. 2 Tumores del Sistema Nervioso Central

Este tipo de cáncer representa el 2% de todas las neoplasias y hasta el 2017 tenía una tasa de incidencia a nivel global de 10.8 casos por cada 100 000 personas (figura 2) (14); en el caso de México, los estudios sobre su epidemiología son reducidos y sólo se tiene registro de los casos a nivel hospitalario; sin embargo, se estima que en el 2018 hubo aproximadamente 3,451 casos de tumores del SNC (15).

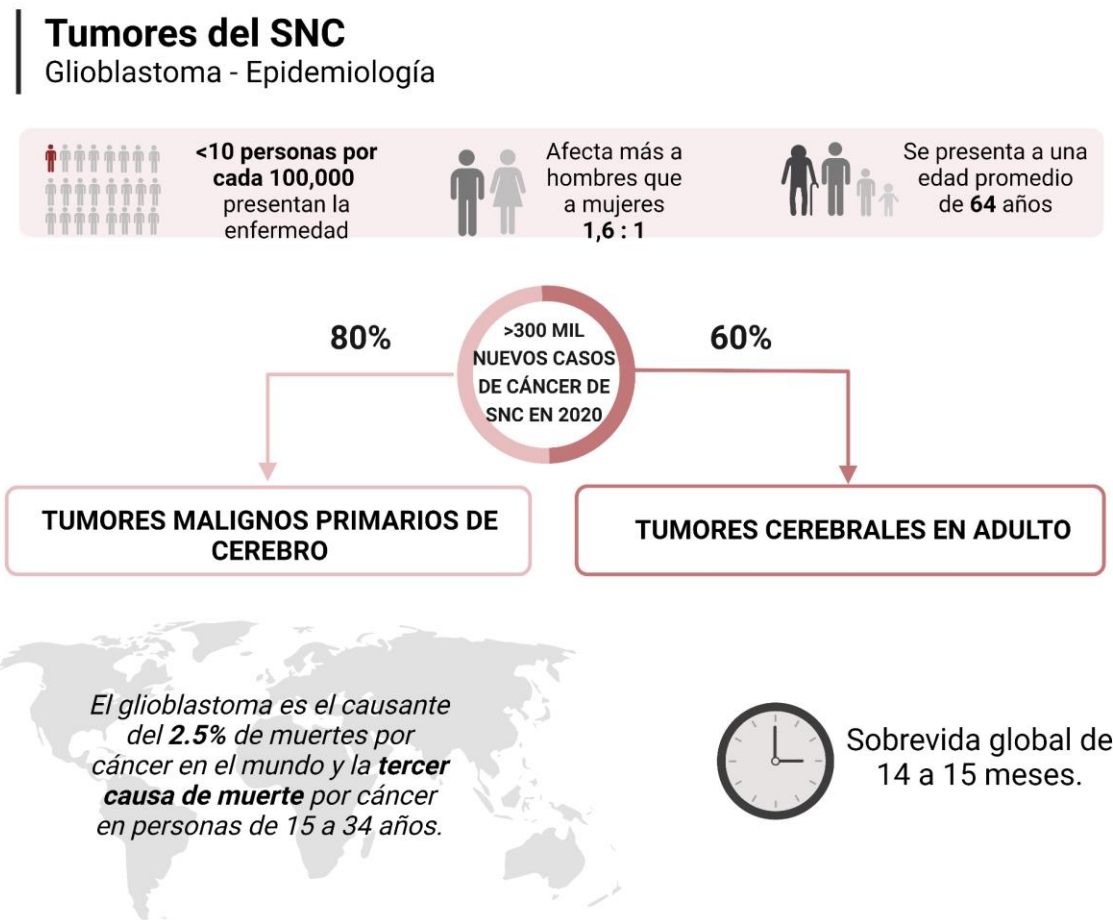


Figura 2. Incidencia y supervivencia global de los tumores del SNC y glioblastoma en el mundo (14)

2.2.1 Clasificación de los tumores del Sistema Nervioso Central

Existen distintos criterios para la clasificación de estos tumores, en primer lugar, al ser un grupo tan heterogéneo de neoplasias, se suelen clasificar en dos grandes grupos, las lesiones primarias que son originadas a partir de células propias del SNC y las lesiones secundarias,

que aparecen como resultado de un proceso de metástasis desde otras partes del cuerpo (16).

Generalmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene un criterio de clasificación histopatológico que se divide en 4 grupos (figura 3): los grupos I y II considerados de bajo grado y los grupos III y IV que son aquellos de alto grado (16).

- **Grado I** corresponde a los tumores circunscritos y que tienen poca probabilidad de convertirse en neoplasias de mayor grado,
- **Grado II** son aquellos tumores que presentan ya un borde difuso y es más probable que puedan llegar a progresar; tanto el grado I como el grado II se consideran de lento crecimiento
- **Grado III** son tumores que se infiltran y tienen un número aumentado de mitosis, así como células atípicas,
- **Grado IV** son los más agresivos, de rápido crecimiento y pueden incluso presentar zonas de necrosis y formación de nuevos vasos sanguíneos; el GBM pertenece a este grupo (17).

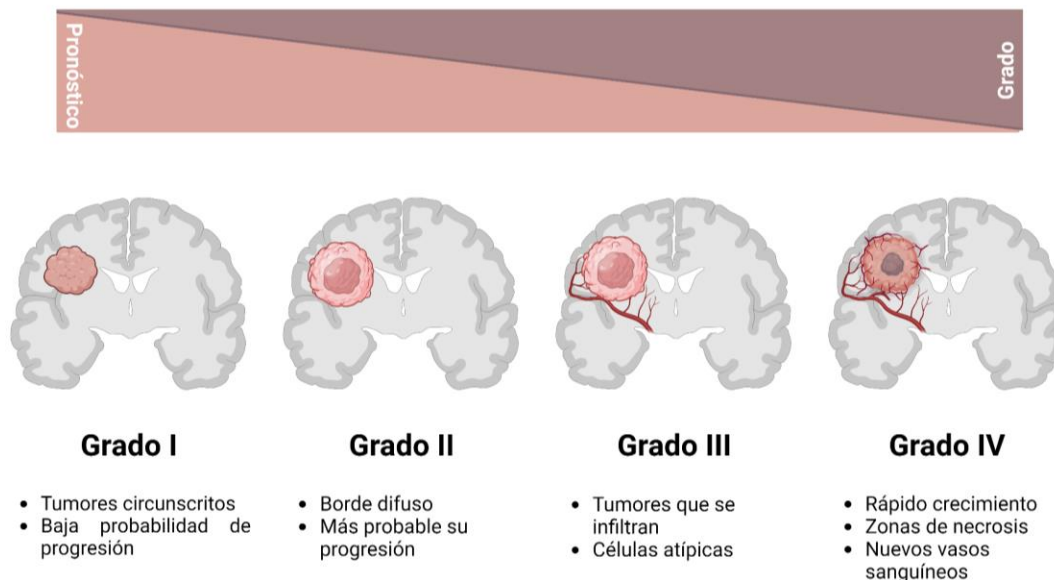


Figura 3. Clasificación de los tumores del SNC según criterios de la OMS. Sinning M., 2021 (17)

2.3 Glioblastoma

El glioblastoma (GBM) es un tipo de cáncer de rápido desarrollo y muy agresivo que afecta al sistema nervioso y/o al cerebro, las tumoraciones de este cáncer se forman a partir del tejido glial del encéfalo y la médula espinal (1).

El GBM es parte de un tipo de cáncer llamado glioma, estos gliomas y su clasificación pueden variar dependiendo de sus características, localización y severidad, entre ellos se incluyen por ejemplo los astrocitomas, oligodendrogliomas y los gliomas mixtos, etc. (18).

Debido a que no es posible definir al cáncer como un solo tumor sino como un sistema inmensamente variable se busca elegir siempre el modelo más representativo de la enfermedad; sin embargo, ha sido una tarea sumamente compleja (4).

Entre una larga lista, de características del glioblastoma que han dificultado la comprensión completa de procesos de patogénesis, respuestas terapéuticas y reacciones adversas, está la incapacidad de los modelos *in vitro* de imitar la heterogeneidad de las células de cáncer, además de su microambiente y compartimentos estromales (4).

El GBM puede ocurrir a cualquier edad, pero la edad promedio de diagnóstico es de 64 años y es más común en hombres que en mujeres. La supervivencia es escasa, con aproximadamente un 40% de supervivencia en el primer año posterior al diagnóstico y un 17% en el segundo; además el GBM es el causante del 2.5% de muertes por cáncer y la tercera causa de muerte por cáncer en personas de 15 a 34 años (1).

2.3.1 Tratamiento y sus retos

El tratamiento para este tipo de gliomas está constituido por radioterapia, quimioterapia y cirugía (19).

El cuadro de tratamiento inicia por la intervención quirúrgica; sin embargo, la remoción del tumor o tumores puede dejar lugar a células residuales (19) que pueden ser capaces de migrar y seguir proliferando. Además de la cirugía, el tratamiento se acompaña con 60 Grays (Gy) de radioterapia (2Gy/día) y quimioterapia con el agente alquilante Temozolomida (TMZ) por 6 semanas, con dosis de mantenimiento por 5 días cada 28 días hasta completar seis ciclos iguales. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos titánicos por tratar el avance de la enfermedad, la media de supervivencia sigue sin superar los 15 meses (19). Algunos de los problemas que se presentan con los agentes quimioterapéuticos es atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), la limitada respuesta a la terapia y la neurotoxicidad que provocan ciertos tratamientos (19).

El tratamiento estándar de la quimioterapia para el GBM es la TMZ (20) cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la replicación del ADN; la TMZ es un profármaco que, gracias a su biotransformación, alquila la cadena de ADN; Sin embargo, uno de los mecanismos de resistencia a este fármaco es mediado por la enzima MGMT (metilguanina-O6-metiltransferasa) la cual remueve los aductos del ADN (figura 4). Otro de los mecanismos de resistencia que se presenta con la administración de TMZ es la acumulación insuficiente de fármaco en el SNC por la presencia de transportadores dependientes de ATP como lo son el P-gp/MDR1/ABCB1 y el MRP/ABCC1 expresadas en la barrera hematoencefálica (BHE), además de la sobreexpresión de estas proteínas en la BHE (18).

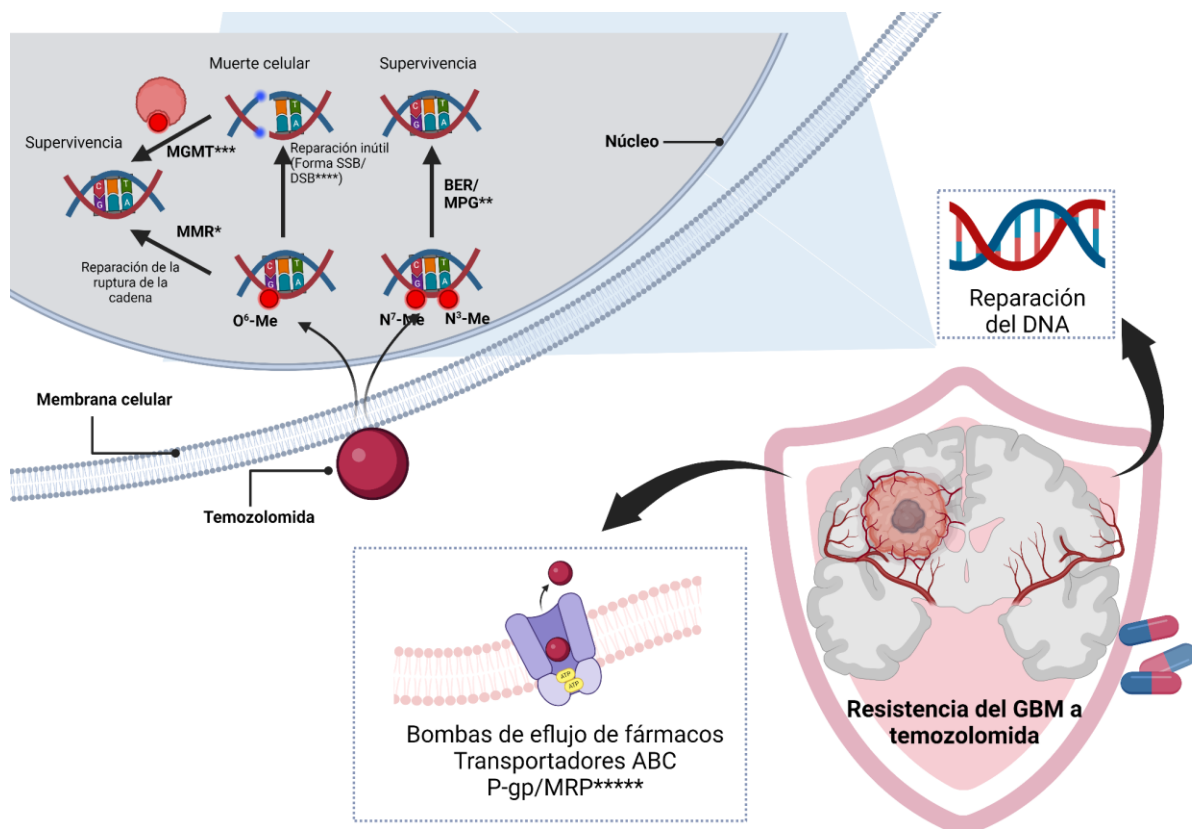


Figura 4. Mecanismos de resistencia del glioblastoma. Los transportadores de eflujo de fármacos (P-gp/MRP) son expresados en la BHE y algunos agentes terapéuticos (entre ellos TMZ) son reconocidos por éstos, lo que contribuye a la multiresistencia a fármacos por la acumulación limitada de fármacos al interior de las células tumorales (21) Mismatch repair-Reparación por apareamiento erróneo (MMR), Base excision repair (BER)/N-Methylpurine DNA Glycosylase (MPG), O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT), single-stranded breaks (SSBs)/double-stranded breaks (DSBs), P-glycoprotein (P-gp)/Multidrug Resistance Protein (MRP).

TMZ tiene una actividad alquilante en la cadena de ADN en tres sitios preferentes, la posición N7 y O6 de la guanina y en la posición O3 de la adenina; si estos sitios no son reparados llevan a la ruptura de la cadena; MGMT es una enzima endógena reparadora del ADN que ayuda a la estabilidad genómica a través del sistema MMR; el efecto de la enzima MGMT se asocia como el mayor contribuyente de la resistencia a TMZ, bajo las condiciones de tratamiento con TMZ, la enzima MGMT puede remover los grupos metilo en la posición O6-metilguanina que dona TMZ, lo que permite la reparación de la cadena de ADN y eventualmente, la supervivencia de las células tumorigénicas (22). Los aductos provocados por la metilación en las posiciones N7 de la guanina y O3 de la adenina son reparadas por el sistema de reparación por escisión de bases (BER) iniciado por la enzima MPG (23-24).

Debido al pobre pronóstico de los pacientes con GBM, diversas investigaciones han intentado diseñar nuevas moléculas que permitan mejorar la supervivencia global de los pacientes, pero los resultados no han sido alentadores. Una de las líneas de investigación que se ha desarrollado en los últimos años para el tratamiento del GBM es el reposicionamiento de fármacos; el cual se define como nuevas aplicaciones de fármacos que fueron diseñados para otras enfermedades (18). En el laboratorio donde se realizó el presente trabajo se estudian fármacos de reposicionamiento como quimio-sensibilizantes que incrementan el efecto de temozolomida. Uno de estos fármacos es el agente antiestrogénico Fulvestrant (ICI 182,780), el cual ha demostrado una acción sinérgica cuando es combinado con cisplatino o temozolomida más radioterapia (25, 26).

Fulvestrant ha sido descrito como un agente radiosensibilizante y se utiliza como antiestrogénico en el tratamiento de cáncer de mama (25); algunos de los mecanismos propuestos por los que este fármaco sensibiliza a las células tumorales se encuentran la activación de la caspasa, la regulación de factores de crecimiento, la inhibición de proteínas anti apoptóticas y la inducción de la apoptosis mediada por p53 (25, 26).

Por otro lado, en algunas líneas celulares se ha reportado también que Fulvestrant induce al arresto celular en la transición de la fase G2/M, provocando una inestabilidad genómica, dando como resultado una hipersensibilidad a la radiación (25,27).

2.4 Modelos de cultivo 3D de cáncer

En los últimos años se han establecido algunos modelos que permitan mejorar el avance de la investigación biomédica básica en cáncer. Existen diversos modelos de estudio *in vivo* e *in vitro* (figura 5); sin embargo, estos sistemas presentan diferencias a los tumores reales,

además que presentan limitantes que no permiten comprender los mecanismos de la patogénesis tumoral, las respuestas a diversos fármacos y las reacciones adversas que pueden llegar a presentarse (4).

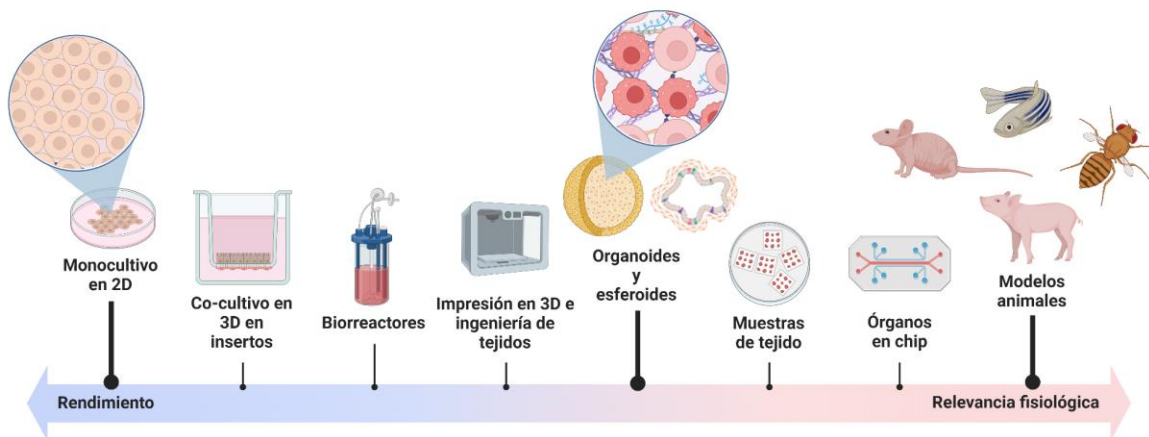


Figura 5. Modelos preclínicos más utilizados en la investigación biomédica básica; ordenados a la izquierda, aquellos con mayor rendimiento; y hacia la derecha, los que tienen mayor relevancia fisiológica. Imagen modificada de: Kim, S. (2021) BioRender (28).

El modelo de cultivo en monocapa o 2D con líneas celulares inmortalizadas es uno de los más populares en los laboratorios de investigación oncológica; sin embargo, este modelo presenta diferencias cruciales con los tumores sólidos (figura 6) entre las que se encuentran la disminución de interacciones célula-célula, la nula formación de matriz extracelular y la aparente sensibilidad a la mayoría de fármacos (7); sin embargo, estas diferencias son producto del crecimiento forzado de estas células sobre una superficie plana y adherente, lo que provoca un cambio en su metabolismo y funcionamiento; además el microambiente del cultivo celular puede afectar el fenotipo de las células, y por lo tanto afectar también la respuesta celular a los fármacos (7).

Debido a las desventajas de los modelos en 2D se han establecido los modelos en 3D de organoides (4).

Los modelos tridimensionales *in vitro* se han utilizado como modelo intermedio entre líneas celulares inmortalizadas que son sembradas en dos dimensiones y tumores sólidos.

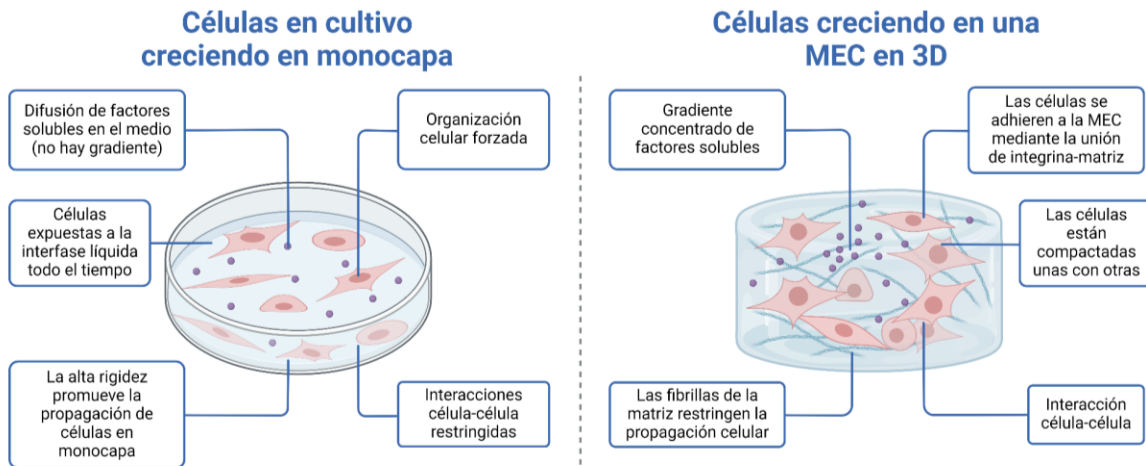


Figura 6. Comparación de las principales características entre el modelo 2D y el modelo 3D. Modificado de: Kim, S. (2022) BioRender (28)

Los modelos esféricos de cáncer además forman la gran mayoría de modelos *in vitro* en 3D que se han utilizado durante los últimos cuarenta años (29).

Weiswald y colaboradores han propuesto una clasificación simple para los cuatro principales modelos en 3D que se utilizan en la investigación básica, basada en los métodos de formación y la composición biológica básica de los modelos, entre estos modelos se encuentran (29):

- El modelo de esferoide multicelulares de tumor, que fueron descritos por primera vez hace casi 50 años y obtenidos a partir de líneas celulares que habían sido cultivadas bajo condiciones de no adherencia.
- Las tumoresferas, modelo que se basa en la expansión de células stem en un medio libre de suero y que ha sido suplementado con algunos factores de crecimiento,
- Las esferas de tumor derivadas de tejido y los esferoides multicelulares organotípicos, ambos obtenidos a partir de tejido tumoral disociado por métodos mecánicos.

En un modelo *in vivo*, los tumores sólidos crecen con una conformación tridimensional que resulta en una exposición heterogénea al oxígeno, así como a los nutrientes y otras fuentes de estrés químicas o físicas. Esta distribución física y su limitada difusión de oxígeno, nutrientes metabolitos y moléculas de señalización no pueden ser imitadas en un modelo en dos dimensiones (30).

Ahora también se sabe que la interacción en 3D de célula-célula *per se* influye en la estructura celular, mecanismos de adhesión, mecanotransducción y la señalización en respuesta a factores solubles, que a su vez afectan la función celular de manera distinta a los formatos tradicionales de cultivo celular en 2D (31).

Para investigar de manera eficiente la patobiología del cáncer humano, es necesario mantener o recrear la arquitectura típica de tres dimensiones de los tumores sólidos, así como el microambiente en 3D que permite imitar los distintos tipos de heterogeneidad celular observada en diferentes contextos *in vivo*. Es por eso por lo que los sistemas en 3D que están formados únicamente por células de cáncer y adhesiones homotípicas célula-célula pueden expresar distintos fenotipos como lo son células quiescentes o proliferativas dependiendo de los gradientes químicos inducidos (29).

2.4.1 Características de los esferoides de tumor

Los esferoides son colonias celulares agrupadas en forma de esfera que permiten el estudio de un modelo más parecido a un tumor *in vivo*, pero con las ventajas de los ensayos *in vitro* (32).

Una de las características más importantes que definen a un esferoide es lo que se le conoce como “compartimentalización” es decir, las zonas virtuales en las que se divide la masa total de un esferoide conformada por una zona exterior altamente proliferativa atribuida al constante contacto con mayores concentraciones de oxígeno y nutrientes, después aparece la zona de células quiescentes debido a la disminución de estos dos factores; y por último, debido a esta falta de oxígeno se empieza a presentar hipoxia, lo que lleva a las células a su muerte, es decir, la zona central está conformada en su mayoría por células necróticas (figura 7) (32).

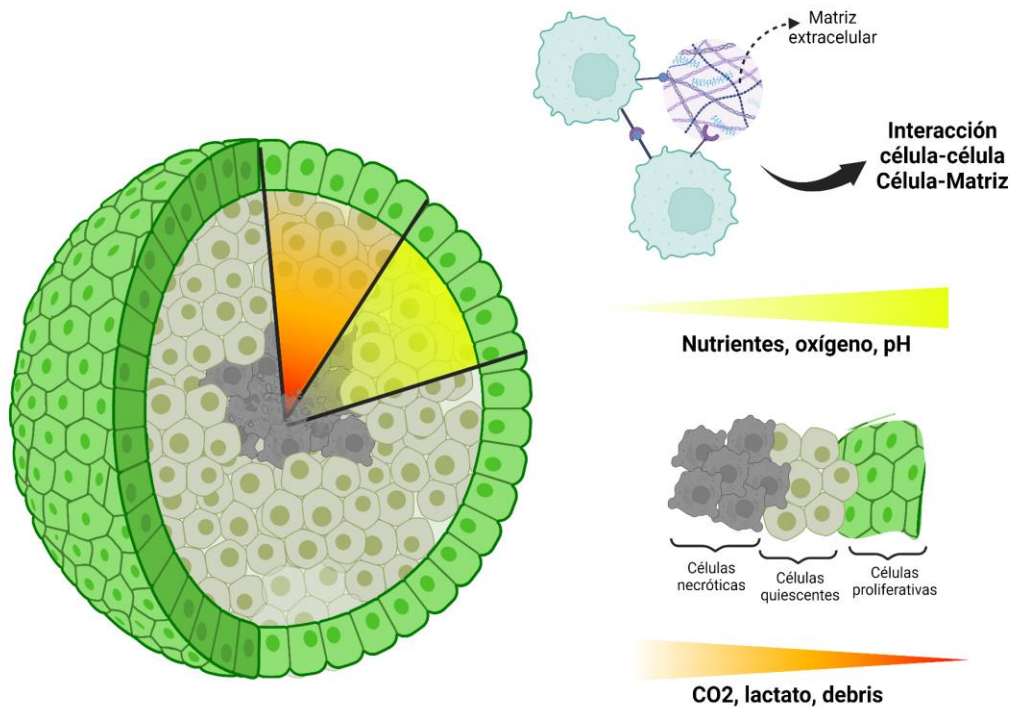


Figura 7. Características de los esferoides de tumor, se presentan las características fisicoquímicas principales. Khanna S (2020) (32).

La zona más ácida del esferoide es el centro necrótico donde se encuentran las mayores concentraciones de lactato, lo que corresponde con el efecto Warburg que está descrito para diferentes tipos de cáncer, en el cual el microambiente tumoral juega un papel crucial en la caracterización de un esferoide. Hay algunos autores que consideran que la interacción entre célula-célula y célula-matriz extracelular puede llevar a efectos metabólicos distintos a los que se suele encontrar en los cultivos en dos dimensiones (33).

Por otro lado, la matriz extracelular (MEC) es el componente no celular del tejido que le brinda soporte tanto bioquímico como estructural y aunque pareciera sólo un relleno intercelular, la realidad es que es un componente fisiológicamente activo pues es responsable de diversos procesos de comunicación célula-célula, proliferación y adhesión. Está compuesta principalmente por diversas proteínas que le confieren diferentes características morfológicas y propiedades fisiológicas al interior del tejido, estas proteínas van desde colágeno, proteoglicanos y fibronectina hasta laminina (34).

El tipo de colágeno fibrilar más abundante en la MEC es el colágeno de tipo I, que puede encontrarse en diversidad de tejido conectivo (36).

Diversos autores concluyen que la presencia de colágeno permite la formación de esferoides más compactos y homogéneos (37) ya que el colágeno actúa como el esqueleto del esferoide, le permite compartir características viscoelásticas con los tumores *in vivo*, además que en el caso de las líneas celulares de glioblastoma, que suelen agruparse en agregados celulares de manera espontánea, permiten una mejor compactación y distribución de proteínas y nutrientes como en los tumores sólidos (38).

Para el análisis de la morfología de un esferoide, existen diversos modelos matemáticos que han descrito su dinámica de crecimiento, la mayoría de las líneas celulares se ajustan al modelo de Gompertz (39) donde las células se agrupan y comienzan un crecimiento lento para pasar a un desarrollo casi exponencial, alcanzando una meseta donde el esferoide alcanzará su tamaño final (figura 8).

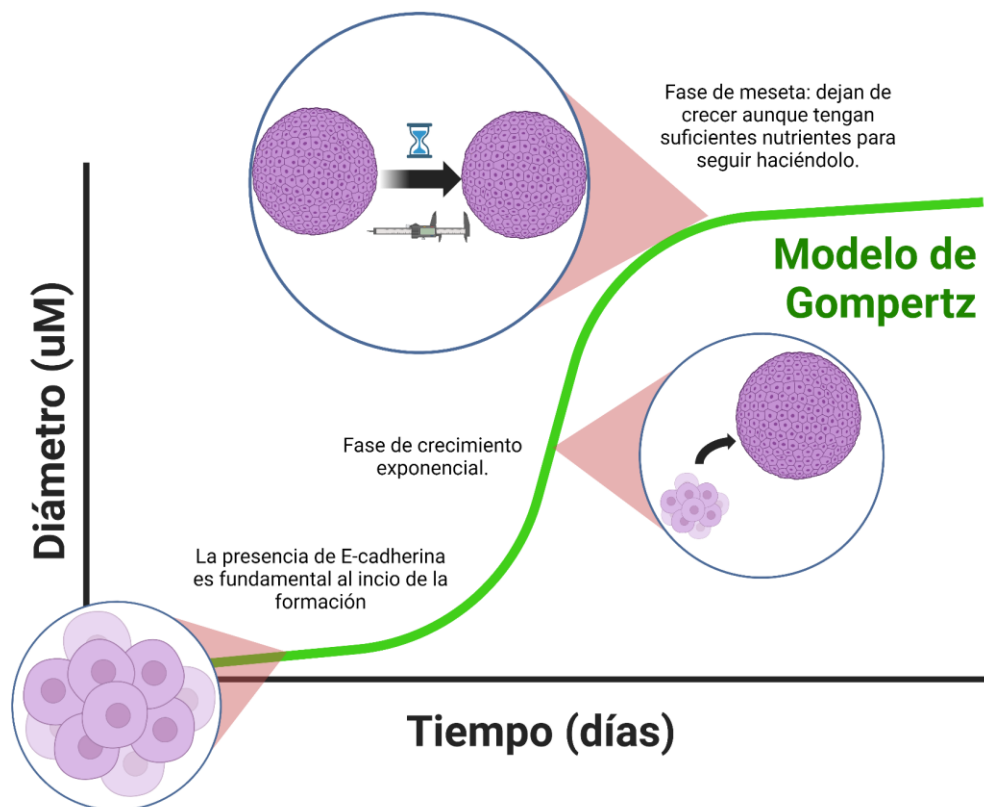


Figura 8. Dinámica de crecimiento de un esferoide de tumor donde se muestran las tres fases principales por las que pasa un esferoide en la etapa de formación. Wallace DI (2013) (37)

2.4.2 Resistencia a los fármacos

Otra característica importante de los tumores avasculares que puede imitar un esferoide es el desarrollo de un gradiente de oxígeno y nutrientes, debido a la organización y compactación de las células que lo componen (40). En este sentido, un nivel reducido de oxígeno provoca quiescencia en las células, que es uno de los retos más grandes en el tratamiento del cáncer puesto que es uno de los factores más importantes por los que los tumores son resistentes a la terapia (41).

2.4.3 Métodos de formación de esferoides

Existen diferentes metodologías para llegar a formar modelos 3D de manera eficiente y práctica, se dividen principalmente en aquellos que necesitan un método de andamiaje para formarse como es el colágeno o el MatriGel (42).

Entre los que no requieren de métodos de andamiaje se destacan los modelos que se siembran en cajas de ultra baja adherencia (UBA), que son placas con tratamientos como poli-HEMA que no permiten que las células sembradas se adhieran a la superficie de la caja; el método de hanging drop o gota colgante, donde se colocan gotas de medio en la tapa de una caja Petri y ahí se siembran las células para después voltear la tapa y permitir que las esferas se formen por gravedad; levitación magnética, y por último, biorreactores giratorios (figura 9) (42).

Por otro lado, aquellos que utilizan métodos de andamiaje, destacan los métodos de encapsulación en matriz, sembrados embebidos en la matriz y recubiertos por más matriz y dispositivos de microfluidos (42, 43).

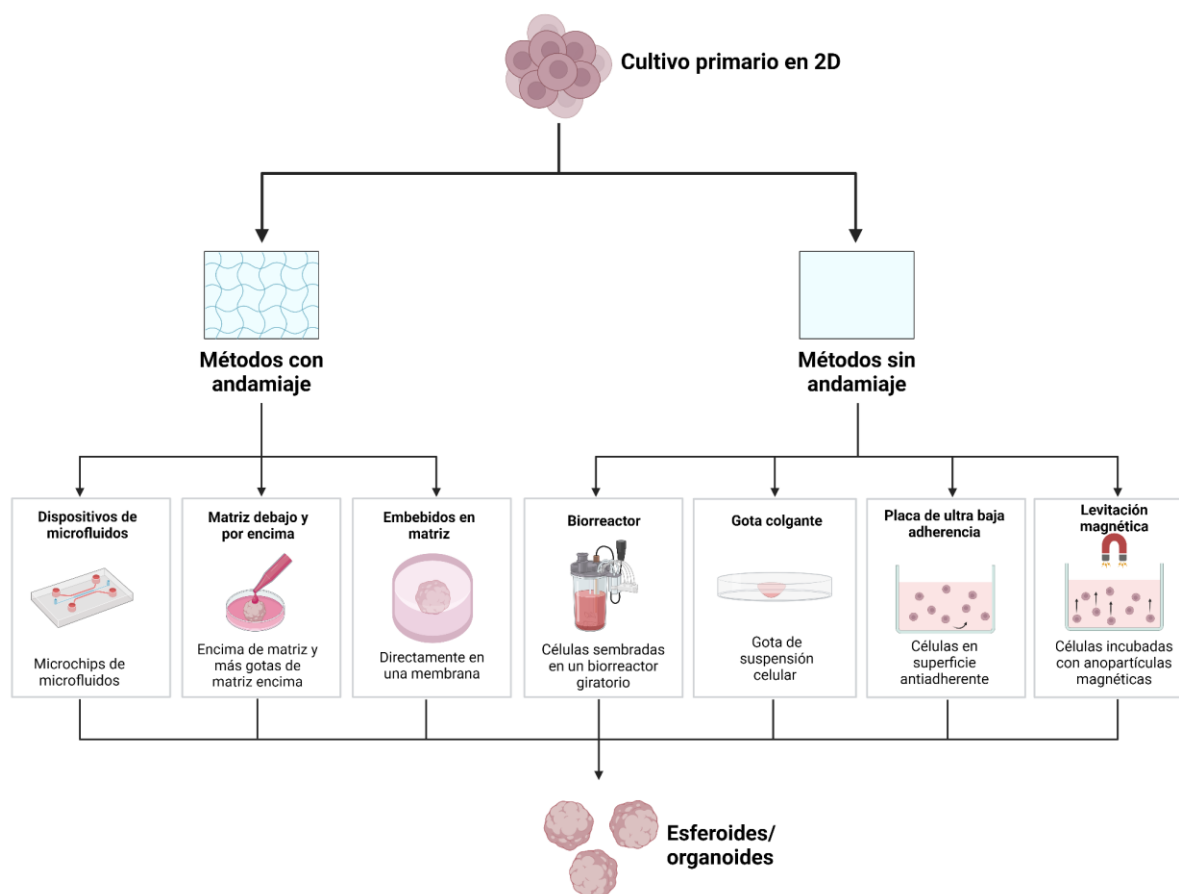


Figura 9. Métodos de formación de esferoides multicelulares de tumor. Modificado de Kim, S. (2021) BioRender (28).

2.4.4 Técnicas de análisis

Hay numerosos parámetros morfológicos que pueden ayudar a darle seguimiento al desarrollo del modelo desde su siembra como puede ser la integridad de los esferoides, el volumen o diámetro, transparencia (que nos habla del nivel de compactación) y la cinética de crecimiento (44) pero también entra en juego otras metodologías para caracterizar este modelo, como la PCR o Western Blot para buscar proteínas específicas de quiescencia, necrosis o incluso proteínas de la MEC; espectroscopía, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica y citometría de flujo para buscar marcadores específicos dependiendo de cada línea y cada tipo de modelo 3D que se utilice (45). Por otro lado, en cuanto a la respuesta de los esferoides a la terapia puede ser evaluada a través de los cambios que surjan en diversos parámetros morfológicos (46) como son el diámetro, la circularidad, la integridad de la membrana, la actividad intracelular de las mitocondrias e incluso pueden medirse los efectos con tinciones inmunofluorescentes (figura 10); sin embargo, al momento

de elegir el método de evaluación es importante tomar en cuenta que no todos los métodos serán eficientes por la dificultad que la organización celular del esferoide predispone a la penetración algunas moléculas (47).

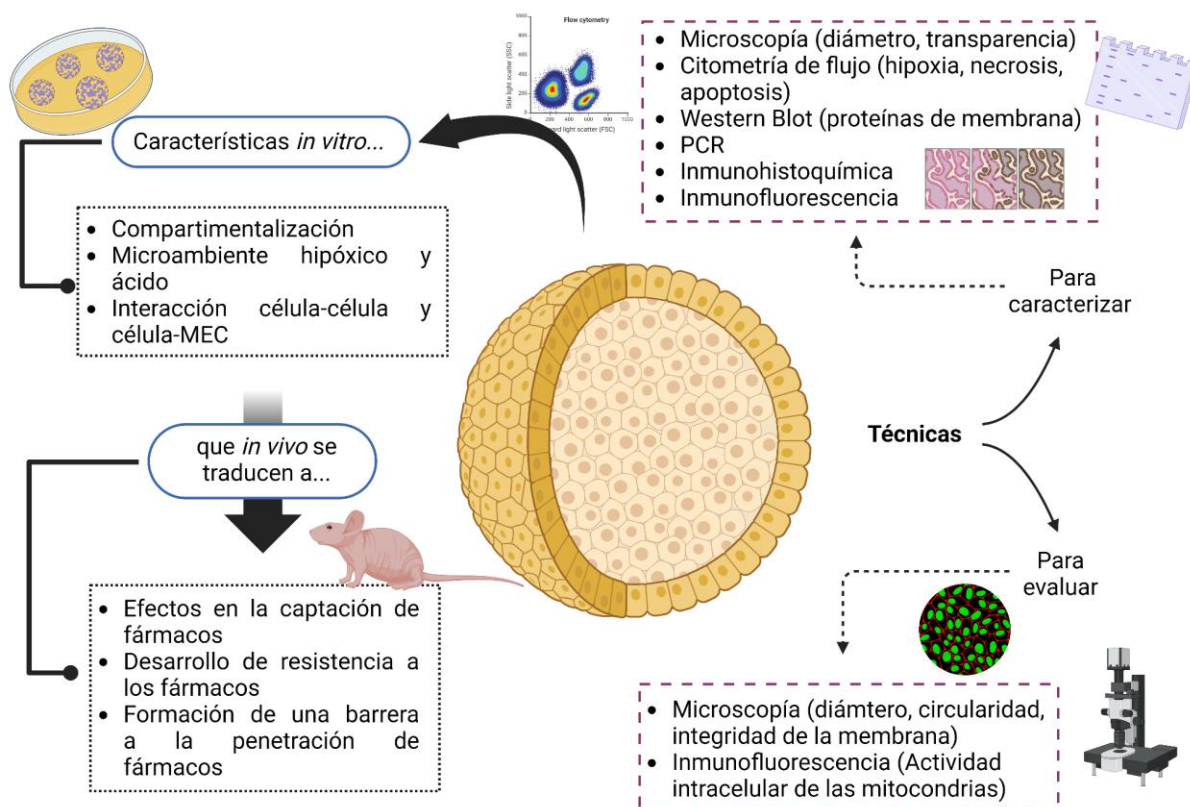


Figura 10. Técnicas de análisis para caracterizar esferoides y evaluar parámetros farmacológicos (45).

Los modelos en 3D reproducen la arquitectura tridimensional de los tumores, permitiendo una mejor representación de la complejidad celular y la heterogeneidad tumoral. Además, los modelos en 3D posibilitan interacciones celulares más complejas y la formación de estructuras celulares, así como la simulación del microambiente tumoral con elementos como la matriz extracelular y la vascularización. Estas diferencias que resaltan la superioridad de los modelos en 3D para proporcionar una representación más fiel de la biología tumoral *in vivo* (48). Por último, cabe destacar que en la investigación biomédica básica se cuenta con modelos que abarcan el estudio del cáncer desde distintos puntos de vista por ejemplo el uso de xenoinjertos de tumor derivado del paciente (PDX) como modelo de cultivo destaca por su capacidad para reproducir la complejidad celular del tumor original y preservar la heterogeneidad tumoral. Sin embargo, se reconocen limitaciones, como tasas bajas de implantación, procesos prolongados de reconstitución inmune, altos costos y tiempos

extensos para generar modelos humanizados (49); por lo que los modelos tridimensionales (3D), al replicar de manera más precisa la arquitectura tisular *in vivo*, pueden ser una alternativa a los PDX y otros modelos *in vivo*. Estos modelos en 3D ofrecen una representación más cercana de las características de los tumores humanos, posicionándolos como herramientas valiosas en la evaluación de la terapia contra el cáncer.

Atendiendo a la necesidad de modelos con mayor fidelidad para estudiar al glioblastoma es importante destacar que también se busca la reducción del uso de animales siguiendo el modelo de las 3Rs propuesto por Russel y Burch desde el siglo pasado (50).

La implementación de los modelos 3D es relevante desde el punto de vista científico, pero también desde el punto de vista ético, tan sólo en Norteamérica se utilizaron poco más de 110 millones de animales, entre ratas y ratones, para la investigación científica en un año, de 2017 a 2018, cifras alarmantes puesto que se estima que al menos el 40% de estos animales fueron sometidos a procedimientos dolorosos (51).

3. Planteamiento del problema

Durante años el modelo elegido por innumerables investigadores para la evaluación de nuevos tratamientos en cáncer incluido el glioblastoma ha sido el modelo en 2D; sin embargo, debido a las limitaciones que se presentan con esta metodología es necesario buscar alternativas que permitan el estudio de los efectos farmacológicos de agentes quimioterapéuticos con resultados más significativos fisiológicamente; sobre todo en enfermedades con baja supervivencia global como el glioblastoma. Una alternativa aparente a esta situación es el desarrollo de modelos de cultivo en 3D, que nos permitan evaluar la respuesta de propuestas farmacológicas como el caso de Temozolomida, el fármaco de primera línea utilizada para el glioblastoma, y su combinación con el antiestrogénico Fulvestrant, a través del crecimiento de los esferoides y su viabilidad celular.

4. Pregunta de investigación

¿Factores como el número de células de glioblastoma, la presencia de colágena y factores de baja adherencia influyen en la formación de esferoides de glioblastoma como modelo en 3D para evaluar el efecto del tratamiento de Temozolomida y Fulvestrant?

5. Hipótesis

El establecimiento de un modelo de cultivo tridimensional (3D) de glioblastoma reproducirá las condiciones del microambiente tumoral y de quimio-resistencia, por lo que se espera que el crecimiento y viabilidad de los esferoides se vea afectado por el tratamiento con temozolomida y el antiestrogénico Fulvestrant, con una reducción en el tamaño de los esferoides y una disminución en la viabilidad celular en comparación con los controles.

6. Objetivo general

Establecer un modelo de cultivo en 3D de células de glioblastoma que permita evaluar la respuesta farmacológica del tratamiento con Temozolomida y el antiestrogénico Fulvestrant a través el crecimiento del esferoide y su viabilidad celular.

6.1 Objetivos particulares

- Evaluar las variables experimentales como el número de células de glioblastoma, la presencia de colágena y factores de baja adherencia en la formación de esferoides de glioblastoma.
- Determinar la viabilidad celular del modelo en 3D utilizando marcadores de fluorescencia que miden la actividad metabólica de las células.
- Evaluar en el modelo en 3D, la respuesta farmacológica de Temozolomida y su combinación con el antiestrogénico Fulvestrant, a través del crecimiento del esferoide y su viabilidad celular.

7. Material y métodos

7.1 Diseño de estudio

El estudio que se realizó es prospectivo, longitudinal, comparativo y experimental

7.2 Universo de estudio (población o muestra)

Células de glioma de rata (C6) obtenidas de la American Type Cell Culture (ATCC).

7.3 Variables

- Independientes: número de células, composición del medio de cultivo para el esferoide, tipo de placas de siembra para los esferoides, exposición de los esferoides a Temozolomida y Fulvestrant.
- Dependientes: Tamaño final del esferoide, viabilidad del esferoide, proporción de células vivas y muertas en el esferoide, respuesta de los esferoides los fármacos de Temozolomida y su combinación con Fulvestrant.

7.4 Técnicas e instrumentos

7.4.1 Líneas celulares

Se utilizó una línea celular de glioma, la línea C6 de rata obtenida del ATCC (CCL-107) cultivada en cajas de 75 cm² y mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado al 5% de suero fetal de bovino, en una incubadora Nuair us autoflow UN4750 bajo una atmósfera con concentración de 5% de CO₂, alta humedad y a 37°C.

7.4.2 Formación de esferoides por el método de Liquid Overlay en placas de 96 pocillos con fondo cóncavo recubiertas de poli-HEMA

Se preparó el polímero poli-HEMA a una concentración de 2 g/100 mL en etanol al 95% grado cultivo celular, se disolvió a 60°C en un tubo Falcon de 15 mL durante 2 h y se sonicó a 30°C durante 1 h en un baño de ultrasonido digital SCIENTZ SB-120DTN.

Con el reactivo preparado se vertieron 50 uL de poli-HEMA por pocillo en una placa de 96 pozos para ELISA y se mantuvo en orbitación en un agitador angular PREMIERE RM-3 durante toda la noche para permitir que el etanol se evaporara y toda la placa se recubriera.

Antes de realizar el cultivo se expuso la placa a luz UV dentro de la campana de flujo laminar para esterilizarla.

Las células cultivadas en monocapa a una confluencia de entre el 80 y 90% se despegaron de la caja con ayuda de Tripsina al 2.5% (2.5% Trypsin 10X de Gibco REF 15090-046) en una solución de PBS-EDTA (1:100) y se neutralizó con medio RPMI 1640 enriquecido con SFB, se contaron las células y se sembraron 5,000 células por pozo para la línea C6, todos los pozos debían contener un volumen final de 150 uL de medio E8 (Essential 8 TM Basal Medium de Gibco REF A15169-01) suplementado y 3 ug/mL de colágeno tipo I, una vez sembradas las células se orbitó la caja en un rotador digital UNICO L-RT30C a 230 rpm

durante 2 ½ h y al finalizar el proceso se incubaron a 37°C y una atmósfera al 5% CO₂ en una incubadora Nuair us autoflow UN 4750 durante 10 días, donde se realizó el registro fotográfico.

7.4.3 Formación de esferoides por el método de Liquid Overlay en placas de 96 pocillos de ultra baja adherencia con fondo cóncavo

Las células de glioblastoma C6, cultivadas en monocapa a una confluencia de entre el 80 y 90%, se despegaron de la caja con ayuda de Tripsina al 2.5% (2.5% Trypsin 10X de Gibco REF 15090-046) en una solución de PBS-EDTA (1:100) y se neutralizó con medio RPMI 1640 enriquecido con SFB. Las células se contaron y se sembraron 5,000 y 3,000 células/pozo, todos los pozos deben contener un volumen final de 150 uL de medio E8 (Essential 8 TM Basal Medium de Gibco REF A15169-01) suplementado y 3 ug/mL de colágeno tipo I, una vez sembradas las células, las cajas se centrifugaron durante 4 minutos a 600 x G en una centrífuga para placas GILSON (MOD. CENTRY 101 REF. 26203) y al finalizar se incubaron a 37°C y una atmósfera al 5% CO₂ en una incubadora Nuair us autoflow UN 4750 durante 24 horas, donde se realizó el registro fotográfico.

Una vez establecido el método de siembra se sembraron nuevos esferoides para llevar un seguimiento fotográfico cada 24 horas durante 4 días, teniendo así 4 diámetros crecientes, se realizó un análisis normalizado del diámetro del esferoide durante cada día para determinar en qué porcentaje aumentó diariamente y al final del experimento con las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Aumento diario} = \frac{D.d - D.b}{D.b} \times 100$$

$$\% \text{ Aumento neto} = \frac{D.f - D.b}{D.b} \times 100$$

Donde:

- D.b = Diámetro basal, que es el diámetro en micras del esferoide 24 horas después de la siembra,
- D.d = Diámetro diario, que es el diámetro de cada esferoide en el día 2 y 3 medido en micras,
- D.f = Diámetro final, que es el diámetro del esferoide en el día 4 medido en micras.

7.4.4 Evaluación de viabilidad de los esferoides (LIVE/DEAD)

Se realizó el ensayo de viabilidad/muerte siguiendo la metodología incluida en el inserto del kit LIVE/DEAD (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells de Thermo Fisher Scientific REF. L-3224) con una concentración de calceína AM 2 μM y de homodímero de etidio 4 μM sobre esferoides recolectados a los 4 días de siembra, se incubaron durante 30 minutos a 37°C y 5% CO₂, y se realizó el registro fotográfico por epifluorescencia con el microscopio (Olympus Modelo IX51) y el software (Olympus cellSens Imaging Software), el análisis de imagen se realizó con un software de edición (FIJI: ImageJ).

7.4 Evaluación de la respuesta farmacológica de Temozolomida y su combinación con el antiestrogénico Fulvestrant en el modelo de esferoides.

Para este ensayo, los esferoides formados con el método Liquid Overlay en placas de 96 pocillos de ultra baja adherencia con fondo cóncavo descrito anteriormente, fueron expuestos a los siguientes tratamientos: vehículo, temozolomida (TMZ) (100 μM), Fulvestrant (10 μM) y la combinación TMZ + Fulvestrant (100 μM y 10 μM respectivamente), después de 96 horas de exposición, el diámetro y la viabilidad del esferoide fueron evaluados siguiendo la metodología descrita anteriormente.

7.5 Diseño estadístico

Para la evaluación de los tratamientos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey en el software Graphpad Prism 8.

Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

8. Resultados

8.1 Evaluación de variables para el establecimiento del modelo en 3D

En la figura 11-A y 11-B se muestran los resultados de la evaluación de las variables que fueron probadas para la estandarización del método de sembrado denominado Liquid Overlay para formación de los esferoides utilizando los dos tipos de cajas (placas de 96 pocillos con fondo cóncavo recubiertas de poli-HEMA y placas de baja adherencia con fondo cóncavo), diferente número de células/pozo (5000, 2500 y 3000 células). El ensayo 1 realizado en cajas recubiertas de poli-HEMA no permitió la formación de esferoides; por otro lado, los ensayos con cajas de fondo plano y 5000, 2500 y sin colágena (ensayos 2 a 5) dieron como

resultado esferoides de tamaño $>400\ \mu\text{M}$, sin un borde bien delimitado y con presencia de células que no se adhieren al esferoide; a excepción del último ensayo (figura 11-B), en el cual se sembraron 3,000 células/pozo en placas de Ultra baja Adherencia (UBA) y con $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de colágeno tipo I, en el que se observó una mejoría en la morfología del esferoide, debido a esto se eligieron éstas como las condiciones óptimas de formación.

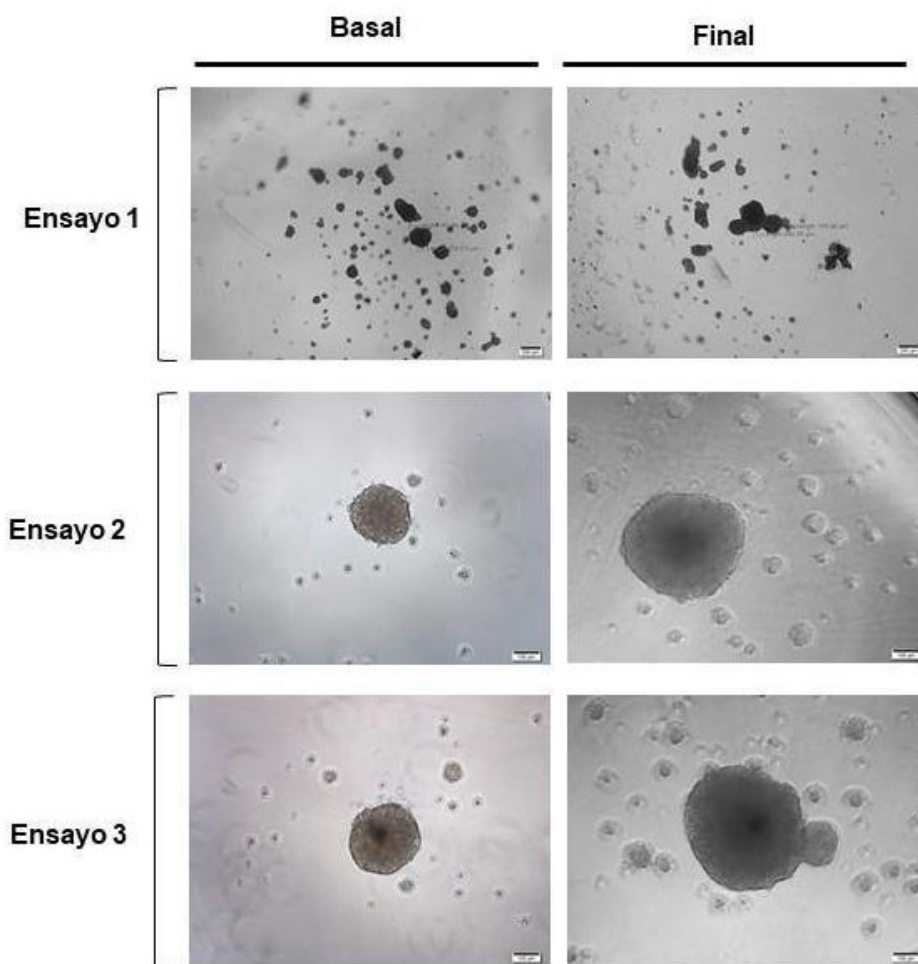


Figura 11-A. Imágenes en campo claro de los esferoides basales (24 horas después de la siembra) y finales (96 horas después de la siembra). Cada imagen es representativa de un grupo de 16 esferoides por cada ensayo.

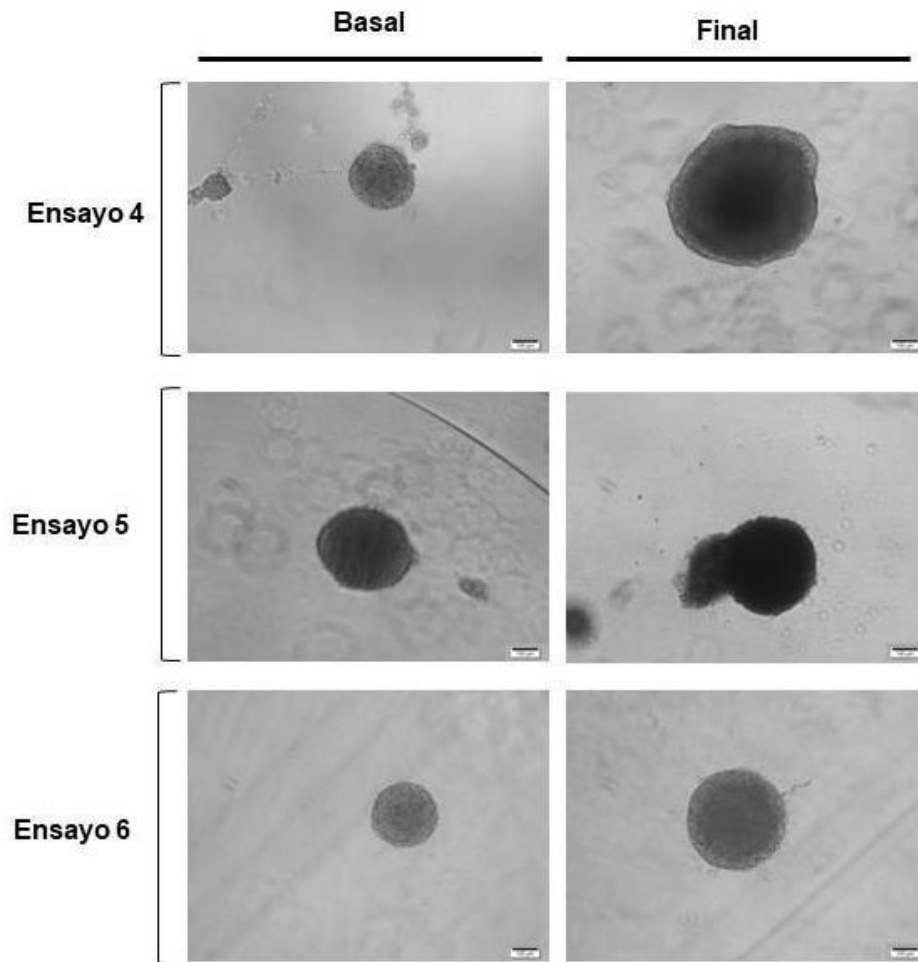


Figura 11-B. *Imágenes en campo claro de los esferoides a 24 horas de la siembra y 96 horas después de la siembra. Cada imagen es representativa de un grupo de 16 esferoides por cada ensayo.*

La figura 12 muestra los resultados del diámetro de los esferoides formados una vez que todas las variables de cultivo fueron controladas, 3000 células/pozo en placas de 96 pozos de UBA y cultivadas con medio con 3 μ g/mL de colágeno I. Se observa que no hubo diferencia significativa entre los diámetros basales de los esferoides sembrados en repeticiones realizadas en diferentes días con las mismas condiciones, probando así que el método de siembra puede utilizarse para obtener esferoides en serie y de manera precisa. *Cada punto representa el promedio de 3 esferoides elegidos al azar de cada ensayo +/- D.E*

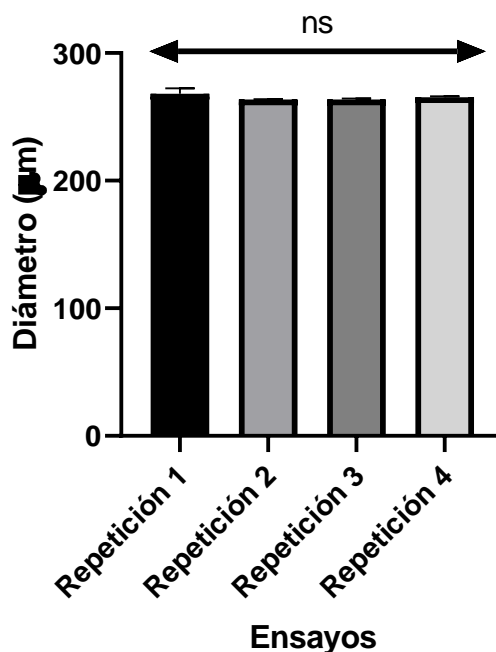


Figura 12. Diámetros basales de los esferoides sembrados en diferentes repeticiones. ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Tukey, ($p > 0.05$).

8.2 Formación de esferoides

8.2.1 Seguimiento del tamaño en función del tiempo

La figura 13-A nos muestra el crecimiento del esferoide sembrado con las condiciones controladas en función del tiempo. Se observa como el diámetro del esferoide aumenta en relación con los días de formación. Se eligió un esferoide al azar y se realizó su seguimiento durante el tiempo del experimento.

La figura 13-B es la representación gráfica del perfil del crecimiento del esferoide con respecto al tiempo. Para llevar a cabo el seguimiento del crecimiento de los esferoides se tomaron imágenes microscópicas de campo claro que fueron medidas cada 24 horas a partir de la siembra obteniéndose diámetro aumentó del 20.93% en el día 2, el día 3 el aumento fue del 28.83% y en el día 4 el esferoide aumentó un 44.14%, Los esferoides no rebasaron las 400 micras de diámetro. Se eligieron 3 esferoides al azar sin tratamiento y se realizó el seguimiento de las imágenes durante el tiempo total del experimento.

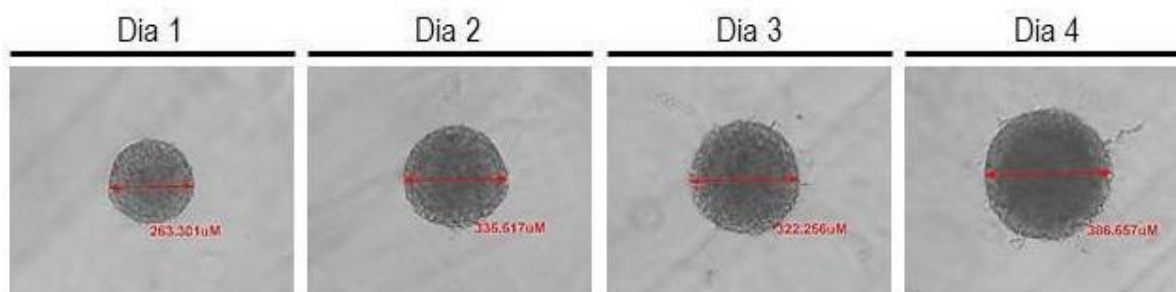


Figura 13-A. Imágenes de campo claro de los esferoides control durante 4 días.

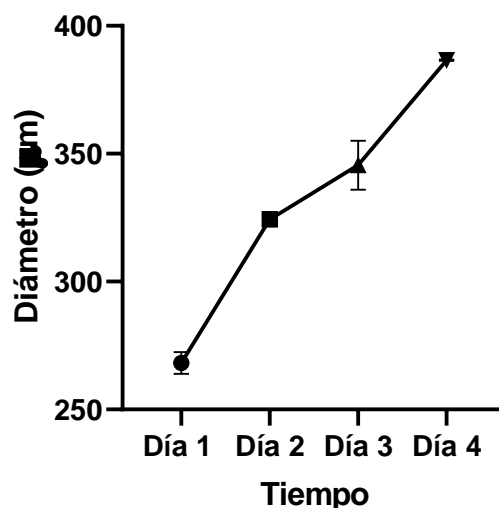


Figura 13-B. Crecimiento de los esferoides determinado por su diámetro en micras y en función con el tiempo después del día 1 de su formación.

8.3 Evaluación de la respuesta farmacológica de Temozolomida y su combinación con el antiestrogénico Fulvestrant en el modelo de esferoides.

En la figura 14 se muestra el efecto sobre el tamaño del esferoide después de la aplicación de los fármacos Temozolomida solo o combinado con el antiestrogénico Fulvestrant. En la figura 14-A se presentan las imágenes en campo claro de los esferoides al inicio y final de los tratamientos, mientras que en la figura 14-B, se presenta el diámetro promedio de tres esferoides, observando que al inicio del tratamiento todos los esferoides mostraron un tamaño de ~260 μm cada barra representa el promedio de 3 esferoides \pm D.E., y al final de la exposición se observa una disminución del diámetro cuando los esferoides son expuestos a Temozolomida y una disminución aún mayor cuando son expuestos al tratamiento combinado de Temozolomida y Fulvestrant. La proporción de células vivas y muertas marcadas con calceína y el homodímero de etidio respectivamente se muestran en la figura 14-C y 14-D

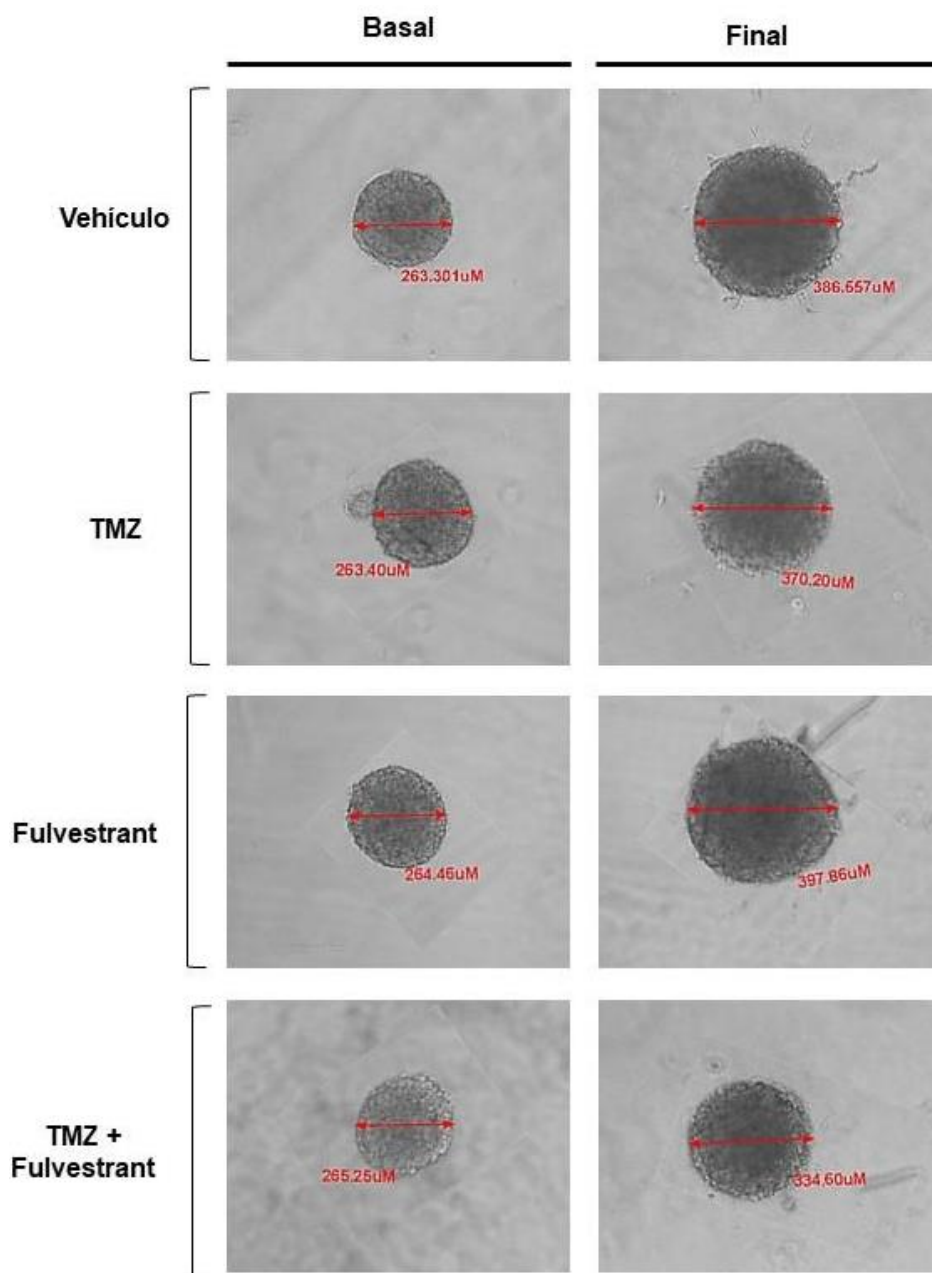


Figura 14-A. Imágenes de campo claro de los esferoides representativos de cada grupo tratado. TMZ: Temozolomida.

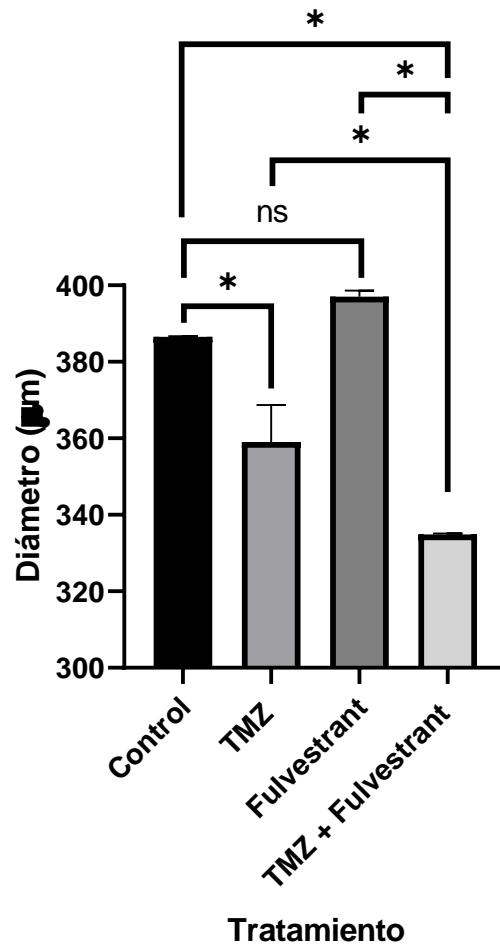


Figura 14-B. Diámetros de los esferoides después de cuatro días de tratamientos. ANOVA de una vía, análisis post hoc de Tukey, * $p > 0.05$, ns: sin significancia

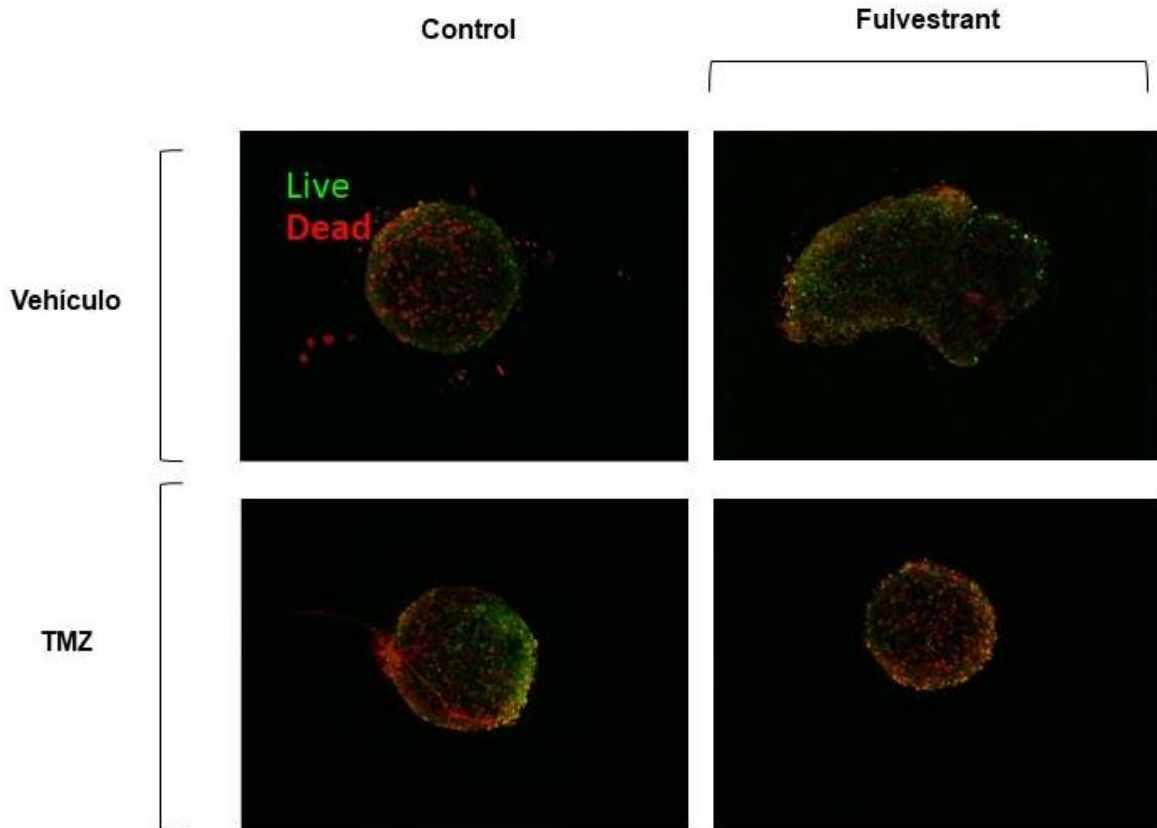


Figura 14-C. Imágenes tomadas con epifluorescencia de los esferoides al final del experimento marcados con Calceína-AM (Células vivas-Live) (verde) y homodímero de etidio (Células muertas-dead) (rojo).

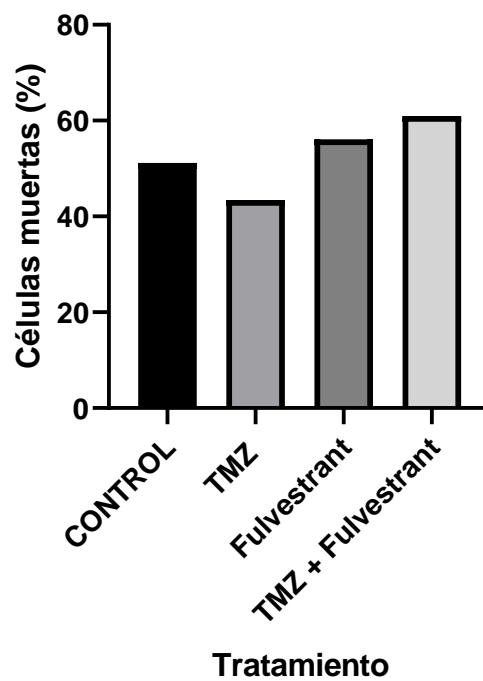


Figura 14-D. Porcentaje relativo de células marcadas con homodímero de etidio (células muertas) de los esferoides de cada grupo tratado. Cada barra representa la medición de un sólo esferoide.

9. Discusión

El glioblastoma es una enfermedad con una supervivencia global reducida, por lo que es necesario establecer modelos que permitan su estudio para mejorar el tratamiento al que se remite a los pacientes con esta enfermedad.

Durante años se ha optado por el estudio del cáncer a través de modelos *in vitro* como el cultivo en monocapa (2D) y sus resultados se han trasladado a modelos *in vivo* con animales; sin embargo, ambas opciones a pesar de que arrojan respuestas significativas en la investigación, suponen limitaciones que van desde la falta de relevancia fisiológica hasta el alto coste de producción por lo que este trabajo propuso el establecimiento de un modelo intermedio entre el 2D y el modelo animal que permita el estudio del glioblastoma a través de ensayos reproducibles, con bajo costo de producción, mayor relevancia fisiológica y sin el uso de animales de laboratorio (6-9).

Se estableció un modelo de esferoides multicelulares de tumor con una línea de glioblastoma (C6) probándose diferentes métodos de cultivo; durante el proceso de selección de variables, se descartaron aquellos ensayos en donde se obtuvieron esferoides de gran tamaño, sin un borde bien delimitado y con presencia de células que no se adhirieron al esferoide principal.

Se observa que en el método en el que se utilizó el polímero poli-HEMA como recubrimiento de baja adherencia para cajas de 96 pocillos, como reportó Naber y colaboradores en un estudio del 2011 (52) para obtener esferoides de cáncer de mama (con la línea MCF10A), no se formaron los esferoides con la línea celular de glioblastoma; a pesar de que los autores sugirieron que este método podía ser utilizado con otras líneas celulares, se obtuvieron esferoides de tamaños y forma irregulares. Por otro lado, al probarse distintos número de células, de 2500 a 5000 células/pozo como reportaron Pinto y colaboradores (53) en un artículo de revisión, en el que sugieren diferentes números de células iniciales para obtener esferoides con bordes bien delimitados, un sólo esferoide por pozo y con un tamaño óptimo para iniciar la exposición a fármacos, se determinó que el número óptimo de células para iniciar el cultivo fue de 3000 células, pues se obtuvieron esferoides de morfología regular, esta información se complementó con los datos que exponen Singh y colaboradores (37) para formar esferoides que no superasen las 400 micras de diámetro, con la finalidad de poder observar el efecto de fármacos utilizados en el tratamiento del glioblastoma, como TMZ y Fulvestrant evaluados en este.

De las diferentes combinaciones que se realizaron al cambiar el número de células inicial, el tipo de caja para la siembra y el método, con y sin andamiaje citando el trabajo de Tevis y colaboradores, en el cual propusieron imitar el microambiente tumoral a través de un ensayo basado en el método de andamiaje para esferoides de cáncer de mama (línea MDA-MB-231) que sembraron con colágena, un componente de la matriz extracelular que permite la comunicación intercelular y mejorar la estructura de estos modelos 3D (54) por lo que en nuestro ensayo se determinó que las mejores condiciones de siembra fueron 3000 células por pocillo en cajas de UBA y medio con una concentración final de colágeno tipo I de 3 μ g/mL.

Al establecer un modelo de estudio, la caracterización de éste es crucial para obtener un punto de partida y poder comparar diferentes características morfológicas al momento de determinar el efecto de los fármacos. Esta caracterización se llevó a cabo a través del perfil de crecimiento del esferoide que no rebasó las 400 micras de diámetro, lo cual es útil para obtener resultados confiables y reproducibles, así como un mayor impacto en el estudio de citotoxicidad de fármacos como se propuso en un artículo de 2020 (37), donde se expone que aquellos esferoides que superan esta media de diámetro suponen un aumento en la proporción de células quiescentes que son, *per se*, resistentes a los fármacos y una reducción de las células proliferativas (los blancos de la terapia), así como una mayor área de hipoxia debido a la compactación de estas masas celulares, lo que reduce los niveles de oxígeno en el centro del esferoide y lleva a las células del núcleo a la muerte (37).

Una vez caracterizado el modelo se probaron dos fármacos con este modelo, temozolomida (TMZ) que se utiliza como estándar en el tratamiento del glioblastoma y Fulvestrant, un antiestrogénico que se ha propuesto como sensibilizante al cisplatino en algunas líneas celulares como cáncer de cérvix en el laboratorio donde se realizó el presente proyecto de investigación (20,26). En la comparación entre grupos se demostró una reducción significativa en el diámetro del esferoide con la combinación de temozolomida más Fulvestrant en comparación al grupo control, el cual solo fue expuesto al vehículo; incluso con los tratamientos aplicados de manera individual, lo que puede sugerir un efecto sensibilizante como lo proponen algunos autores (20,26) en estudios con líneas de cáncer de cérvix.

Cuando se realizó el ensayo de viabilidad celular con calceína AM y el homodímero de etidio, que tiñen células vivas y muertas respectivamente, una vez comparada la intensidad de fluorescencia de cada esferoide por separado, se obtuvo la proporción de células muertas por grupo y se observó que no hay diferencia entre el control y las esferas tratadas con Fulvestrant solo, lo cual concuerda con algunos estudios donde evaluaron el efecto en líneas de cáncer de mama (50); ambos autores sugieren que este antiestrogénico presenta un efecto citostático o anti proliferativo al ser expuestas a Fulvestrant (56). Se observó un ligero incremento en el número de células muertas cuando los esferoides fueron expuestos a la

combinación de ambos fármacos (TMZ+Fulvestrant). Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para corroborar los resultados; como la determinación de la viabilidad celular utilizando un método cuantitativo, además evaluar la cantidad de células vivas y muertas utilizando microscopía de lámina de luz (Lightsheet) y microscopía confocal que permita observar la estructura del esferoide y, por último, la evaluación de los mecanismos moleculares presentes en el modelo 3D después de la exposición a fármacos.

10. Conclusiones

- Las condiciones de cultivo de los modelos en 3D que permitieron la formación de los esferoides de glioblastoma fueron: iniciar con 3000 células, la presencia de colágeno tipo I como método de andamiaje y condiciones de Ultra Baja Adherencia.
- La evaluación de la respuesta a los tratamientos farmacológicos en el modelo en 3D demostró que la aplicación de Temozolomida presenta una disminución en el tamaño de los esferoides y una menor viabilidad celular, y al aplicar la combinación de Temozolomida y Fulvestrant, el efecto fue mayor; mostrando la utilidad del modelo en 3D de glioblastoma para la evaluación farmacológica.

11. Perspectivas

- Evaluar los mecanismos moleculares después de la exposición a los fármacos en el modelo 3D.
- Determinar la viabilidad celular de los esferoides, utilizando un método cuantitativo sensible, después de los tratamientos farmacológicos.
- Evaluar el número de células necróticas y apoptóticas en el modelo 3D
- Realizar ensayos de viabilidad por microscopía de lámina de luz para realizar la comparación del número de células vivas y muertas de los grupos tratados con los fármacos individuales y su combinación.

12. Referencias

1. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee ShU. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017; 18(1): 3-9. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.1.3.

2. Fabio Girardi, Melissa Matz, Charles Stiller, Hui You, Rafael Marcos Gragera, Mikhail Y Valkov, Jean-Luc Bulliard, Prithwish De, David Morrison, Miriam Wanner, David K O'Brian, Nathalie Saint-Jacques, Michel P Coleman, Claudia Allemani, CONCORD Working Group, Global survival trends for brain tumors, by histology: analysis of individual records for 556,237 adults diagnosed in 59 countries during 2000–2014 (CONCORD-3), *Neuro-Oncology*, Volume 25, Issue 3, March 2023, Pages 580–592. doi:10.1093/neuonc/noac217
3. Grech N, Dalli T, Mizzi S, Meilak L, Calleja N, Zrinzo A. Rising incidence of glioblastoma multiforme in a well-defined population. *Cureus* [Internet]. 2020 [citado el 27 de noviembre de 2023];12(5). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32572354/>
4. Sajjad H, Imtiaz S, Noor T, Siddiqui YH, Sajjad A, Zia M. Cancer models in preclinical research: A chronicle review of advancement in effective cancer research. *Animal Model Exp Med*. 2021;4(2):87–103. Doi: 10.1002/ame2.12165
5. Johnson BW, Takahashi K, Cheng YY. Preclinical models and resources to facilitate basic science research on malignant mesothelioma – A review. *Front Oncol* [Internet]. 2021;11 doi: 10.3389/fonc.2021.748444
6. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*; 2016; 14(4):910. Doi: 10.5114/aoms.2016.63743
7. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 [citado el 27 de noviembre de 2023];21(17):6225. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6225>
8. Van Norman GA. Limitations of animal studies for predicting toxicity in clinical trials. *JACC Basic Transl Sci*; 2019, 4(7):845–54. Doi: 10.1016/j.jacbts.2019.10.008
9. Bracken MB. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *J R Soc Med*; 2009; 102(3):120–2. Doi: 10.1258/jrsm.2008.08k033
10. Sutherland RM, Durand RE. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. En: *Spheroids in Cancer Research*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1984. p. 24–49.
11. Dini S, Binder BJ, Fischer SC, Mattheyer C, Schmitz A, Stelzer EHK, et al. Identifying the necrotic zone boundary in tumor spheroids with pair-correlation functions. *J R Soc Interface*. 2016; 13(123):20160649. Doi: 10.1098/rsif.2016.0649
12. Gallardo Pérez JC, Espinosa Castilla M, Meléndez Zajgla J, Maldonado Lagunas V. Esferoides tumorales multicelulares en la evaluación de estrategias terapéuticas anticancerosas. *Rev Esp Fisiol*. 2006;25(4):101-107.

13. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO) DATOS NACIONALES. [Internet]. COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 77/23; 2023. [citado el 27 de noviembre de 2023]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2023/EAP_Cancer.pdf
14. Alegría-Loyola MA, Galnares-Olalde JA, Mercado M. Tumores del sistema nervioso central. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2017; 55(3):330-340.
15. Sánchez-Barriga JJ. Tendencias de mortalidad por tumores del sistema nervioso central en las siete regiones socioeconómicas y en los 32 estados de México entre 2000 y 2017. *Rev Neurol.* 2022;74(10):315-324. doi: 10.33588/rn.7410.2021398.
16. Contreras LE. Epidemiología de tumores cerebrales. *Rev Med Clin Condes.* 2017;28(3):332-338. doi: 10.1016/j.rmclc.2017.05.001.
17. Sinning M. Clasificación de los tumores cerebrales. *Rev Med Clin Condes.* 2017;28(3):339-342. doi: 10.1016/j.rmclc.2017.05.002.
18. Llaguno-Munive M, Vazquez-Lopez MI, Jurado R, Garcia-Lopez P. Mifepristone Repurposing in Treatment of High-Grade Gliomas. *Front Oncol* [Internet]. 2021;11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2021.606907>
19. van den Bent MJ. Adjuvant treatment of high-grade gliomas. *Ann Oncol.* 2006;17(Supplement 10):x186–x190. doi:10.1093/annonc/mdl258.
20. Llaguno-Munive M, Medina LA, Jurado R, Romero-Piña M, Garcia-Lopez P. Mifepristone improves chemo-radiation response in glioblastoma xenografts. *Cancer Cell Int.* 2013;13(1). doi:10.1186/1475-2867-13-29
21. Lin F, de Gooijer MC, Moreno Roig E, Buil LCM, Christner SM, Beumer JH, Würdinger T, Beijnen JH, van Tellingen O. ABCB1, ABCG2, and PTEN Determine the response of glioblastoma to temozolomide and ABT-888 therapy. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(10):2703-13. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0084.
22. Feldheim J, Kessler AF, Monoranu CM, et al. Changes of O (6)-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in glioblastoma relapse-a meta-analysis type literature review. *Cancers (Basel)* 2019;11 doi: 10.3390/cancers11121837.
23. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2010; 12: 116–21. doi: 10.1093/neuonc/nop020.
24. Singh N, Miner A, Hennis L, Mittal S. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resist.* 2021; 4(1):17-43. doi: 10.20517/cdr.2020.79.

25. Segovia-Mendoza M, Jurado R, Mir R, Medina LA, Prado-Garcia H, Garcia-Lopez P. Antihormonal agents as a strategy to improve the effect of chemo-radiation in cervical cancer: in vitro and in vivo study. *BMC Cancer*; 2015;15(1). doi:10.1186/s12885-015-1016-4
26. Llaguno-Munive M, Romero-Piña M, Serrano-Bello J, Medina L, Uribe-Urbe N, Salazar A, et al. Mifepristone overcomes tumor resistance to temozolomide associated with DNA damage repair and apoptosis in an orthotopic model of glioblastoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2018 [citado el 27 de noviembre de 2023];11(1):16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30583528/>
27. García-López P, Rodríguez-Dorantes M, Pérez-Cárdenas E, Cerbón M, Mohar-Betancourt A. Synergistic effects of ICI 182,780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2004 [citado el 27 de noviembre de 2023];53(6):533–40. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15138713/>
28. Kim S. Comparison of 2D vs. 3D cell culture. [internet]. BioRender; 2022. [citado el 27 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/likes/t-6203e63f05f29500a3b3a8d0-comparison-of-2d-vs-3d-cell-culture>
29. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* [Internet]. 2015 [citado el 27 de noviembre de 2023];17(1):1–15. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25622895/>
30. Pampaloni F, Reynaud E, Stelzer E. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:839–845. doi.10.1038/nrm2236.
31. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci*. 2012; 125(Pt 13):3015-24. doi: 10.1242/jcs.079509.
32. Khanna S, Chauhan A, Bhatt AN, Dwarakanath BSR. Multicellular tumor spheroids as in vitro models for studying tumor responses to anticancer therapies. India Verma AS, Singh A, editores. *Animal Biotechnology (Second Edition)*. Academic Press; 2020. p. 251-268. ISBN 9780128117101. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00011-2>.
33. Keller F, Bruch R, Schneider R, Meier-Hubberten J, Hafner M, Rudolf R. A scaffold-free 3-D co-culture mimics the major features of the reverse Warburg effect in vitro. *Cells*. 2020;9(8):1900. doi: 10.3390/cells9081900.

34. Nederman T, Norling B, Glimelius B, Carlsson J, Brunk U. Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1984; 44(7):3090-7.
35. Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):3028. doi: 10.3390/ijms19103028.
36. Tsvirkun D, Revilloud J, Giannetti A, Verdier C. The intriguing role of collagen on the rheology of cancer cell spheroids. *J Biomech.* 2022; 141:111229. doi: 10.1016/j.jbiomech.2022.111229.
37. Singh SK, Abbas S, Saxena AK, Tiwari S, Sharma LK, Tiwari M. Critical role of three-dimensional tumorsphere size on experimental outcome. *Biotechniques.* 2020; 69(5):333-338. doi: 10.2144/btn-2020-0081.
38. Calori IR, Alves SR, Bi H, Tedesco AC. Type-I collagen/collagenase modulates the 3D structure and behavior of glioblastoma spheroid models. *ACS Appl Bio Mater.* 2022; 5(2):723-733. doi: 10.1021/acsabm.1c01138.
39. Wallace DI, Guo X. Properties of tumor spheroid growth exhibited by simple mathematical models. *Front Oncol.* 2013; 3:51. doi: 10.3389/fonc.2013.00051.
40. O'Connor JP, Rose CJ, Waterton JC, Carano RA, Parker GJ, et al. Imaging intratumor heterogeneity: role in therapy response, resistance, and clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2015; 21:249–57. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0990.
41. Zhang J, Si J, Gan L, Di C, Xie Y, Sun C, Li H, Guo M, Zhang H. Research progress on therapeutic targeting of quiescent cancer cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019; 47:2810–2820. doi: 10.1080/21691401.2019.1638793.
42. Hofer, M., Lutolf, M.P. Engineering organoids. *Nat Rev Mater* 6, 402–420 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00279-y>
43. Velasco, V., Shariati, S.A. & Esfandyarpour, R. Microtechnology-based methods for organoid models. *Microsyst Nanoeng* 6, 76 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41378-020-00185-3>
44. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(2):108-15. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.
45. Wang, T., Wang, L., Wang, G. et al. Leveraging and manufacturing in vitro multicellular spheroid-based tumor cell model as a preclinical tool for translating dysregulated tumor metabolism into clinical targets and biomarkers. *Bioresour. Bioprocess.* 7, 35 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00325-7>
46. Hamilton G, Rath B. Role of circulating tumor cell spheroids in drug resistance. *Cancer Drug Resist.* 2019; 2(3):762-772. doi: 10.20517/cdr.2019.47.

47. Mittler F, Obeid P, Rulina AV, Haguët V, Gidrol X, et al. High-content monitoring of drug effects in a 3D spheroid model. *Front Oncol.* 2017; 7:293. doi: 10.3389/fonc.2017.00293.
48. Jubelin C, Muñoz-García J, Griscom L, Cochonneau D, Ollivier E, Heymann MF, Vallette FM, Oliver L, Heymann D. Three-dimensional in vitro tumor spheroid models for evaluation of anticancer therapy: Recent updates. *Cell Biosci.* 2022; 12:155. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00887-3>
49. Olson B, Li Y, Lin Y, Liu ET, Patnaik A. Mouse models for cancer immunotherapy research. *Cancer Discov.* 2018; 8(11):1358-1365. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0044.
50. Hubrecht, Carter. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing change. *Animals (Basel)* [Internet]. 2019 [citado el 27 de noviembre de 2023];9(10):754. Doi: 10.3390/ani9100754
51. Carbone L. Estimating mouse and rat use in American laboratories by extrapolation from Animal Welfare Act-regulated species. *Sci Rep* [Internet]. 2021 [citado el 27 de noviembre de 2023];11(1):1–6. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-79961-0>
52. Naber HPH, Wiercinska E, ten Dijke P, van Laar T. Ensayo esférico para medir TGF- β inducida por invasión. *J Vis Exp.* 2011; (58): e3337. doi: 10.3791/3337.
53. Pinto B, Henriques AC, Silva PMA, Bousbaa H. Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research. *Pharmaceutics.* 2020;12(12):1186. doi: 10.3390/pharmaceutics12121186.
54. Tevis KM, Cecchi RJ, Colson YL, Grinstaff MW. Mimicking the tumor microenvironment to regulate macrophage phenotype and assessing chemotherapeutic efficacy in embedded cancer cell/macrophage spheroid models. *Acta Biomater.* 2017;51: 21-33. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.12.037.,
55. Muler ML, Antunes F, Guarache GC, Oliveira RB, Ureshino RP, Bincoletto C, et al. Effects of ICI 182,780, an ER α and ER β antagonist, and G-1, a GPER agonist, on autophagy in breast cancer cells. *Einstein (São Paulo).* 2020; 18:1-11.
56. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase regulates estrogen receptor- α signaling in breast cancer cells. *Oncogenesis.* 2017;6(2): e299. doi: 10.1038/oncsis.2017.4.