



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE
CULTIVOS RICOS EN GLIOMA STEM CELLS COMO MODELO PARA
ESTUDIOS PRECLÍNICOS”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
*QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO***

PRESENTA

JAEL ALEJANDRO CANALES CASAS

TUTORA DE TESIS

IRMA GABRIELA GONZÁLEZ HERRERA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2024





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARINA GAVILANES RUIZ

VOCAL: SOBEIDA SANCHEZ NIETO

SECRETARIO: IRMA GABRIELA GONZALEZ HERRERA

1er. SUPLENTE: MARIA ELENA IBARRA RUBIO

2° SUPLENTE: EUCLIDES AVILA CHAVEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL
VELASCO SUÁREZ**

ASESOR DEL TEMA:

IRMA GABRIELA GONZÁLEZ HERRERA

SUSTENTANTE (S):

JAEL ALEJANDRO CANALES CASAS

Agradecimientos

A mi tutora la Dra. Irma Gabriela González Herrera quien me brindo la oportunidad de trabajar un largo periodo y me oriento acertadamente en la realización de este trabajo.

A mi padre Víctor Canales quien siempre está ahí, quien trabaja por aquellos que más ama por su bienestar y una mano firme a la que aferrase en los tiempos más difíciles junto con mi hermano Erick, por ser mi confidente y compañero por tantos años.

A mis tías Socorro y Marta Casas, quienes con amor me brindaron su apoyo incondicionalmente en mi educación, salud y bienestar. A mis tíos Antonio Castillo y Manuel Granados, por sus consejos llenos de sabiduría en todo este trayecto. A mis tías Diana Casas y Cristina Casas, por su cariño y apoyo en este recorrido.

A mis primos, Alan, Mariana, Oscar Granados y Leslie García por siempre estar ahí y saber que cuento con ellos en todo momento.

A mis amigos, Fanny Ordoñez, Kenya García, Itzel Bonola, Natalia Ortiz, Eduardo Aguirre, Eduardo Cabrera, Alberto Hernández, Melissa Mendoza y Sofia Alonso, mi compañía durante toda la facultad.

A Ariana Ocampo, mi gran compañera de vida y apoyo incondicional, por haber estado presente durante todo este tiempo, por estar cuando más lo necesitaba y ser mi motivación para seguir adelante. Gracias por hacerme mejor persona cada día. Te amo

Y a Magdalena Casas, mi motivación más grande en mi vida, la mejor madre que pude haber tenido, mi compañera por las madrugadas de tareas y exámenes no hubo un día que no viera por mi salud, por mi educación y por mi bienestar, no ha habido un día en el que no estes presente, este trabajo también lleva tu nombre, así como yo te llevo en el corazón por siempre.

Con todo mi cariño,

Jael Canales

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	7
RESUMEN.	8
1 INTRODUCCIÓN	10
1.1 Neoplasias cerebrales	10
1.2 Glioblastoma	13
1.2.1 Incidencia y mortalidad.....	14
1.2.2 Glioblastoma y mecanismos de resistencia tumoral.....	14
1.2.2.1 Nicho hipóxico y angiogénesis	15
1.2.2.2 Metabolismo tumoral.	15
1.2.2.3 Células formadoras de tumor o células madre cancerosas.....	16
1.2.2.3.1 Marcadores de GSCs.	17
1.2.2.4 Microambiente tumoral (TME)	17
1.3 Modelos experimentales de glioblastoma.....	19
1.3.1.1 Cultivos celulares	19
1.3.1.2 Eficacia de cultivos 2D como modelo preclínico.....	21
1.3.2 Cultivos 3D	22
1.3.2.1 Esferoides	25
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
2 METODOLOGÍA.	30
2.1 Crecimiento de células en monocapa 2D	30
2.2 Cultivos 3D.	32
2.2.1 Gota colgante	32
2.2.2 Sembrado en cajas de ultra baja adherencia	33
2.2.3 Empaquetado celular por centrifugación	33
2.2.4 Cajas Petri recubiertas con agarosa al 1% (suero vs libre de suero) ..	33

2.2.5 Cajas Petri bacteriológicas (suero vs libre de suero).....	34
2.2.6 Cajas Petri recubiertas con poly-HEMA	34
2.3 Inmunofluorescencia.	36
2.3.5 Lavado y permeabilización	36
2.3.6 Bloqueo y tinción	37
2.3.7 Preparación del portaobjetos y captura de imágenes.....	38
2.4 Western blot	38
2.4.1 Extracción de proteínas.....	38
2.4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	39
2.4.3 Preparación del gel.....	40
2.4.4 Preparación de las proteínas.....	40
2.4.5 Electroforesis.....	40
2.4.6 Transferencia	41
2.4.7 Bloqueo, lavados y colocación de anticuerpos.....	42
2.4.8 Revelado	43
3 RESULTADOS.....	44
3.1 Estandarización de un protocolo de alto rendimiento para la obtención de esferoides ricos en GSCs a partir de líneas celulares de glioma	44
3.1.1 Comparación por microscopía de campo claro de los esferoides obtenidos por diversas técnicas	44
3.2 Pruebas de reproducibilidad con otras líneas celulares	55
4 DISCUSIÓN	59
5 CONCLUSIONES	67
7 PERSPECTIVAS.....	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÉNDICE 1.....	80
APÉNDICE 2.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células gliales del sistema nervioso central (Vidovic et al., 2018)	10
Figura 2. Localización del glioblastoma en las diferentes regiones del cerebro humano (Gould, 2018)	13
Figura 3. Condiciones físicas dentro del microambiente tumoral (Damgaci et al.,2018)	18
Figura 4. Diferentes métodos de obtención de esferoides (Hoarau-Véchet, et al.,2018)	24
Figura 5. Zonas que forman a un esferoide (Sant & Johnston, 2017).....	26
Figura 6. Comparación de las caractersticas de las células 2D vs las 3D. (UPM BIOMEDICALS, 2018).....	28
Figura 7. Ensamblado de membrana Semi-Dry Cleaver Scientific (Siniobiological et al., 2023)	42
Figura 8. Esferoides de células T98G obtenidos por la técnica de gota colgante (Gould, 2018)	45
Figura 9. Esferoides de células T98G otbtenidas por la técnica de sembrado en placas de ultra baja adherencia.....	46
Figura 10. Esferoides de células T98G obtenidas por la técnica de centrifugación de diferentes densidades	47
Figura 11. Esferoides de células T98G obtenidas por la técnica de sembrado en cajas recubiertas con agarosa.....	48
Figura 12. Esferoides de células T98G obtenidas por la técnica de sembrado en caja bacteriologica estéril	49
Figura 13. Análisis de la expresión de proteínas CD133, NESTIN,GFAP por Western Blot.....	52
Figura 14. Ensayo Dot Blot de células T98G y esferoides obtenidos por técnica de gota colgante y sembrado en placas de ultra baja adherencia.....	53
Figura 15. Imágenes representativas de esferoides inmunomarcados T98G ..	54
Figura 16. Esferoides de células C6 y LN18	56
Figura 17. Análisis de la presencia de células CD133+ en esferoides C6	57

Figura 18. Imágenes representativas de esferoides LN18 inmunomarcados

58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grado de gliomas y actual clasificación dada por OMS en 2016 (Sinning, 2017).....	12
Tabla 2. Comparación de las características de los cultivos 2D vs 3D.	27
Tabla 3. Medios utilizados durante las diferentes técnicas de obtención de esferoides.....	35
Tabla 4. Resultados obtenidos con las diferentes técnicas de obtención de esferoides.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

BHE	Barrera hematoencefálica
BM	Baño María
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
GBM	Glioblastoma multiforme
GBM2	Glioblastoma multiforme secundario
GLA	Gelatina metacrilada
GSCs	Células Madre de Glioma
HIF1	Factor Inducible de Hipoxia 1
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEV	Polietilenglicol
PLA	Ácido poliláctico
PLG	Poly lactide-co-glycolide
PM	Peso Molecular
Poly-HEMA	Polihidroxietilmetacrilato
PVA	Alcohol Polivinílico
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal de Bovino
TME	Microambiente Tumoral
RGD	Tripéptido formado por Arginina, Glicina y Ácido Aspártico

RESUMEN.

El glioblastoma multiforme (GBM) o glioma es el tumor cerebral más frecuente y mortal, debido a que los tratamientos antitumorales convencionales como la quimio- y la radio-terapia presentan una baja tasa de éxito. Esta gran resistencia del GBM a los tratamientos se debe en parte a la presencia de células madre de glioma, o GSCs (por sus siglas en inglés), las cuales cuentan con la capacidad de autorrenovarse, diferenciarse y reiniciar el tumor, lo que, sumado a su facilidad de migración y de infiltración en el parénquima cerebral hacen virtualmente imposible erradicar al GBM. Así, tanto el diseño como el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento del GBM deberán tomar en cuenta a las GSCs para ser verdaderamente eficaces.

El objetivo principal de este trabajo fue el establecimiento de un método de cultivo de esferoides con un alto rendimiento de GSCs, a partir de líneas celulares de glioma, que pueda ser útil como modelo preclínico en el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra este tumor cerebral.

Para lograr el objetivo, este trabajo se dividió en dos partes. En la primera de ellas se estandarizó un método para el cultivo de esferoides empleando la línea celular de glioma humano T98G. Las células se sembraron bajo diferentes condiciones en 3 dimensiones, mediante los métodos de: I) gota colgante seguido de cultivo con rotación, II) empaquetado celular por centrifugación III) sembrado en cajas de ultra baja adherencia o IV) en cajas Petri bacteriológicas o V) en cajas Petri recubiertas con Poly-Hema o VI) cajas Petri recubiertas con agarosa al 1%. Los medios empleados consistieron en combinaciones de medio DMEM o DMEM/F12 suplementado o no con alguno de los siguientes componentes: I) SFB (10%), III) SFB KO (especial para células madre) al 10%, o IV) suplemento B27 (2X) y factores de crecimiento EGF y FGF2. El crecimiento de los esferoides se monitoreó durante 1-7 días, y al término de este plazo, los esferoides se recuperaron para estudios de Inmunofluorescencia Indirecta y Western blot con el fin de detectar marcadores específicos de GSCs (CD133, NESTIN y GFAP), o alternativamente, se disgregaron y resembraron en condiciones 3D para verificar su capacidad de formar tumoroesferas de *novo* que expresen los mismos biomarcadores de troncalidad. En la segunda parte del trabajo, se buscó demostrar que el método establecido para producir GSC's

puede funcionar con cualquier línea celular de glioma, por lo que se reprodujo empleando las líneas celulares LN18 de glioma humano y C6 de glioma de rata.

Los resultados demuestran que se logró estandarizar un método sencillo y económico, que produce un gran número de esferoides ricos en GSC's en el mínimo tiempo, independientemente de la línea celular empleada. Este método puede ser de utilidad en medicina traslacional para realizar pruebas analíticas robustas empleando métodos convencionales (Western blot, PCR en tiempo real, Inmunofluorescencia y citometría de flujo), a diferencia de los métodos actuales, ya que en éstos se obtiene una cantidad muy limitada de esferoides, los cuales no están completamente formados por GSCs, por lo que solamente se pueden realizar pruebas a microescala que requieren de equipos sofisticados de análisis, los cuales no están disponibles en todos los laboratorios. Adicionalmente, nuestro método podría tener aplicaciones también en medicina personalizada, ya que la obtención de esferoides enriquecidos en GSC's a partir de tumores primarios obtenidos de pacientes, ayudaría a seleccionar el tratamiento más adecuado en cada caso particular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Neoplasias Cerebrales

Glioma es el término con el que se describe a la neoplasia cerebral maligna primaria más común originada de la proliferación anormal de células gliales (Okuma et al., 2017) las cuales brindan soporte y protección a las células nerviosas, es decir a las neuronas (Jäkel & Dimou, 2017). Las células gliales son de tres tipos: células endimarias, oligodendrocitos o astrocitos (Figura 1) y los tumores cerebrales derivados de éstas se clasifican con base en la célula que los origina (Hanif et al., 2017).

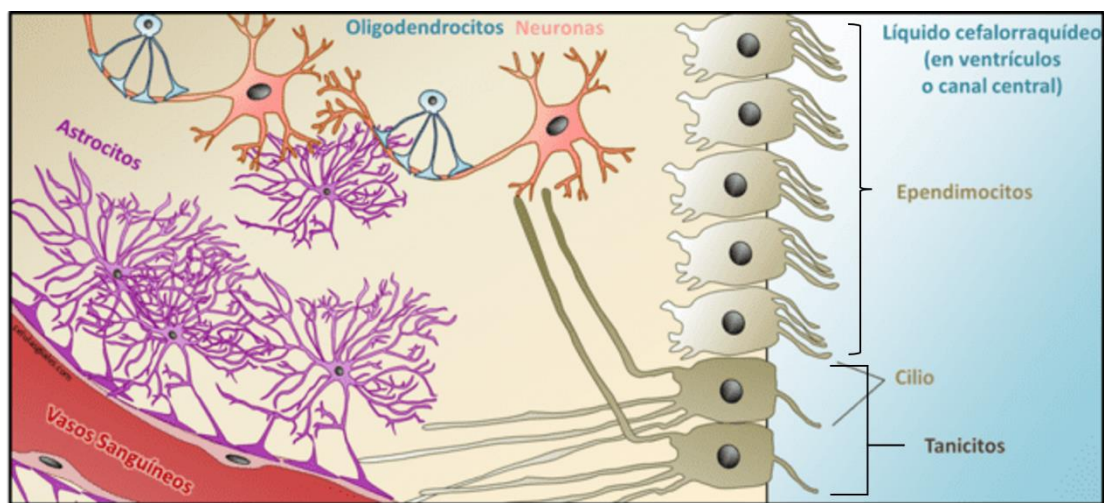


Figura 1. Células gliales del sistema nervioso central (Modificada de Vidovic et al., 2018)

Así, los endimomas son originados por células endimarias, las cuales son células multiciliadas que recubren por dentro el epitelio ventricular del cerebro, además de que se sugiere que son células en estado latente con la capacidad de adquirir función neurogénica (Jakacki, 2015). Los oligodendrogliomas son originados por los oligodendrocitos, que tienen la capacidad fundamental producir la mielina que envuelve a los axones para permitir una comunicación neuronal eficiente (Reyes-Haro et al., 2014). Finalmente, los tumores astrocíticos, también llamados astrocitomas, son originados por células astrocíticas, que son las células gliales más abundantes en el SNC y se encuentran íntimamente asociados con las neuronas. Tienen diferentes funciones dentro del cerebro, pues regulan su homeostasis, y lo proveen de energía y sustratos para la neurotransmisión. Además, están relacionados con

el paso de las sustancias del torrente sanguíneo al cerebro y viceversa; por lo cual se les atribuye el establecimiento de la barrera hematoencefálica (BHE) (Reyes-Haro et al., 2014).

Los astrocitomas pueden clasificarse por su velocidad de crecimiento (lento, moderado o rápido) o también por el nivel de anomalía que presentan (comprendido por una escala de I a IV), siendo esta última la más común. De acuerdo con esta clasificación, tenemos (Phuphanich, 2017):

- Grado I: Tumor considerado benigno por su buen pronóstico debido a que se considera curable con una resección quirúrgica. La mayoría de estos tumores son diagnosticados mayormente en niños.
- Grado II: A menudo designados como de “grado bajo”. El término “benigno” puede ser equivocado debido a que este grado de tumores refleja una tendencia a repetirse. Los pacientes requieren ser monitoreados por resonancias magnética o tomografías computarizadas por varios meses para asegurar que no reaparezca.
- Grado III: Tumores formados por células anaplásicas, por lo cual se consideran gliomas malignos debido a que son infiltrantes y tienen un índice de crecimiento celular mayor al visto en los grados I y II.
- Grado IV: Es el grado más alto de glioma que debido a su rápido crecimiento y mayor presencia de tumores malignos, es el más maligno de los astrocitomas. También recibe el nombre de glioblastoma, que suele distinguirse por la presencia de células necróticas y un crecimiento anormal de vasos sanguíneos alrededor del tumor.

El término “glioma maligno” y “glioma de alto grado” comprende a los gliomas de grado III y IV.

Sin embargo, en el año 2016, la OMS cambió la manera de clasificar a los tumores, haciendo principal énfasis en que en años anteriores se han clasificado de acuerdo con las similitudes observadas al microscopio (células de origen y nivel de diferenciación, dependiendo de la interacción de la luz del microscopio con las secciones marcadas con hematoxilina y eosina). La modificación se hizo considerando tanto las características histológicas (fenotipo) como el genotipo

que presentan, por lo que ahora la clasificación es como se muestra a continuación en la Tabla 1 (Louis, et al., 2016).

TABLA 1. Clasificación actual de los gliomas según la OMS (2016)

	Gliomas astrocíticos y oligodendrocíticos	Clasificación OMS 2016	Grado
Gliomas de bajo grado	Astrocitoma difuso	Astrocitoma difuso con IDH mutado	Grado II
		Astrocitoma difuso con IDH nativo	Grado II
		Astrocitoma difuso NOS	Grado II
	Oligodendroglioma	Oligodendroglioma con IDH mutado y 1p19q codeletado	Grado II
		Oligodendroglioma NOS	Grado II
	Oligoastrocitoma	Oligoastrocitoma NOS	Grado II
Gliomas de alto grado	Astrocitoma anaplásico	Astrocitoma anaplásico con IDH mutado	Grado III
		Astrocitoma anaplásico con IDH nativo	Grado III
		Astrocitoma anaplásico NOS	Grado III
	Oligodendroglioma anaplásico	Oligodendroglioma anaplásico con IDH mutado y 1p19q codeletado	Grado III
		Oligodendroglioma anaplásico NOS	Grado III
	Oligoastrocitoma anaplásico	Oligoastrocitoma anaplásico NOS	Grado III
	Glioblastoma	Glioblastoma con IDH mutado	Grado IV
		Glioblastoma con IDH nativo	Grado IV
		Glioblastoma NOS	Grado IV

IDH: Gen de la isocitrato deshidrogenasa; NOS: Tumores cuyo estudio molecular no se llevó a cabo (modificada de Sinning, 2017).

1.2 Glioblastoma

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor más común, representando al 60% de los tumores astrocíticos y está clasificado como tumor de grado IV de acuerdo con la OMS debido a su agresividad (Louis, Perry, et al., 2016). Histológicamente se reconoce por tener un gran índice de densidad celular, pleomorfismo, actividad mitótica prominente, además de contar con proliferación vascular y necrosis (González-Trujillo et al., 2014). Suele originarse en la sustancia blanca y la denominación multiforme está dada por la heterogeneidad que lo caracteriza bajo visión microscópica. Puede desarrollarse a partir de un astrocitoma de bajo grado que va sufriendo transformación anaplásica e ir evolucionando hasta un glioblastoma secundario (GBM2); o directamente presentarse como un glioblastoma primario o de *novo* (GBM1). (Franco-Hernández et al., 2007).

La localización del tumor varía según la región del cerebro: en el 31% de los casos se encuentra en el lóbulo temporal; en el 24%, en el lóbulo parietal; en el 23%, en el lóbulo frontal y en el 16%, en el lóbulo occipital (Figura 2). La presencia del glioblastoma en el área frontotemporal también es frecuente (Celis et al., 2015).

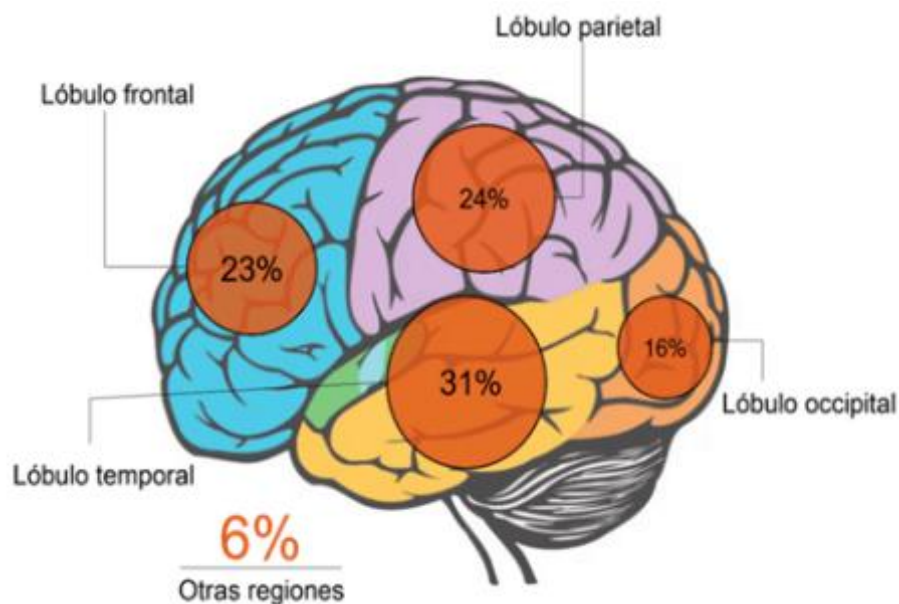


Figura 2: Localización del glioblastoma en las diferentes regiones del cerebro humano (modificada de Gould, 2018).

1.2.1 Incidencia y mortalidad

Los glioblastomas multiformes (GBMs) representan 12-15% de las neoplasias intracraneanas y el 60-75% de los tumores astrocíticos (Hermida-Pérez et al., 2013). La prevalencia de glioblastoma en EE.UU. y Europa es de 3-4 casos nuevos por cada 100.000 habitantes por año (Celis et al., 2015) Se informa también que el pico de incidencia de glioblastoma es a los 61 años y que 80% de los pacientes afectados eran mayores a 50 años además de que es más común en hombres que en mujeres (Celis et al., 2015). La agencia Globocan (Global Cancer Observatory) en 2012 reportó que la incidencia mundial de GBM es aproximadamente de 3,8 casos por cada 100 mil habitantes al año (Castañeda et al., 2015). En México la incidencia y prevalencia de estas neoplasias se estima que es de 3.5 por cada 100 mil habitantes y representa la segunda y quinta causa de mortalidad por cáncer en grupos de 0 a 18 años y de 18 a 29 años, respectivamente (Arenas, 2020).

A pesar de un tratamiento óptimo en el que se lleve a cabo la resección quirúrgica y constante quimioterapia, el glioblastoma maligno tiene un pronóstico de vida desfavorable donde los reportes indican que un 42.4% sobrevive por 6 meses, el 17.7% por un año y solo el 5% logra sobrevivir por 5 años (Ohgaki et al., 2004). Además, esta probabilidad va disminuyendo conforme aumenta la edad, reduciéndose a un tiempo de no más de 8.5 meses de supervivencia en promedio (Delgado-López & Corrales-García, 2016). Este mal pronóstico puede atribuirse a las limitaciones en los tratamientos, que se ven afectados por la naturaleza infiltrativa de las células del tumor, el fracaso de los fármacos al atravesar la barrera hematoencefálica, la heterogeneidad celular y la capacidad metastásica y angiogénica natural de las células formadoras de tumores que hacen que el tumor sea fuertemente resistente a quimioterapia (Ghosh et al., 2018).

1.2.2 Glioblastoma y mecanismos de resistencia tumoral

Las células de glioma tienen la habilidad de resistir a condiciones adversas, como lo son la hipoxia y el estrés metabólico, ya que estar constantemente bajo estas condiciones favorece el crecimiento del tumor e influencia fuertemente el comportamiento tumoral, caracterizado por una rápida proliferación, invasión de

tejidos cercanos al sistema nervioso central y una vascularización aberrante conocida como angiogénesis (Ichikawa et al., 2016). Esta naturaleza del GBM es un factor que interfiere con la respuesta a tratamientos convencionales y es el obstáculo principal en el desarrollo de tratamientos efectivos.

1.2.2.1 Nicho hipóxico y angiogénesis

A pesar de que el glioblastoma es uno de los tumores humanos más vascularizados, su sistema de circulación sanguínea es ineficiente, lo que conduce a áreas hipóxicas dentro del tumor asociadas a necrosis. La hipoxia resulta en un suministro inadecuado de oxígeno y nutrientes por lo que promueve cambios genéticos que serán fundamentales para la supervivencia y crecimiento del tumor. Es así como la agresividad del glioblastoma recae en la función de factores inducibles por hipoxia, como lo son HIF-1, el cual es el regulador maestro que orquesta la respuesta celular a la hipoxia (Domènech et al., 2021). Recientemente, se ha asociado a la hipoxia con la actividad invasiva de los tumores. Se ha observado que la hipoxia es la responsable de disminuir la regulación de cadherinas, resultando en la ruptura de la interacción célula-célula, promoviendo así el comportamiento invasivo y metastásico, además de disminuir la actividad proliferativa. Se ha concluido entonces que los niveles de oxígeno, asociados directamente con la hipoxia son como un interruptor que hace el cambio entre un fenotipo proliferativo o invasivo de los tumores (Ichikawa et al., 2016).

1.2.2.2 Metabolismo tumoral.

Las actividades metabólicas de las células cancerosas están alteradas en comparación con las células normales, y estas alteraciones son el soporte para la adquisición y mantenimiento de sus propiedades malignas (De Berardinis & Chandel, 2016).

Las células tumorales, al igual que otras células, dependen totalmente del suministro de energía para soportar los eventos celulares como proliferación, migración e invasión, tal y como ocurre con las células metastásicas. Únicamente la proliferación por sí sola engloba varias reacciones anabólicas, todas ellas costosas en términos de energía. Por lo que se determina que las células

tumorales no solo sobreviven, sino que progresan como resultado de la selección de las rutas metabólicas que generen el ATP y metabolitos suficientes incluso en condiciones de hipoxia (Amoêdo et al., 2013).

Las células normales, llevan a cabo el proceso de fosforilación oxidativa cuando hay presencia de oxígeno y el proceso de glucólisis en condiciones anaerobias con la finalidad de obtener la energía necesaria (Strickland & Stoll, 2017). Por otro lado, las células cancerosas metabolizan la glucosa de forma distinta pues aún en presencia de oxígeno, las células siguen la ruta de la glucólisis funcionando unas 10 veces más rápido, lo que sin embargo, parece no ser suficiente para satisfacer las necesidades energéticas de las células, lo cual no explica por qué seguir este camino sería ventajoso para las células tumorales (Strickland & Stoll, 2017). Se ha aceptado que el hecho de que las células cancerosas sigan esta ruta es debido a que la producción de NADH ayuda a la formación de la biomasa del tumor y el lactato ayuda a acidificar el microambiente, facilitando la invasión tumoral. (Heiden et al., 2009)

1.2.2.3 Células formadoras de tumor o células madre cancerosas

La primera evidencia de células madre cerebrales la llevó a cabo Ignatova en 2002, y posteriormente fue respaldada por otros grupos (Alves et al., 2021a). En el glioblastoma, las células madre cancerosas o GSCs (por sus siglas en inglés), fueron identificadas por Singh en 2004 como una población de células capaces de iniciar el crecimiento tumoral *in vivo* (Alves et al., 2021).

Las GSCs también conocidas como células iniciadoras de tumor son las responsables de la resistencia a fármacos y reincidencia del cáncer (Phi et al., 2018a), debido a que los agentes quimioterapéuticos suelen tener como objetivo conducir hacia la apoptosis a las células proliferativas. Si bien las terapias exitosas suprimen la mayor parte de estas células, un pequeño remanente de CSCs logran sobrevivir y promueven la reincidencia del cáncer, por su habilidad para establecer una mayor invasión y quimioresistencia (Phi et al., 2018).

Las GSCs residen en nichos vascularizados especiales, normalmente en la región más hipóxica del tumor, en contacto con las células del endotelio cerebral, modelando su renovación, determinando el destino en su ciclo celular, y protegiéndolas de la quimio y radio terapia. Además se ha propuesto que

pequeñas cantidades de GSCs permanecen en el tejido cerebral después de una cirugía de resección, causando un recrecimiento muy veloz y una resistencia a la radioterapia y/o tratamiento con temozolomida y contribuyendo a la recurrencia tumoral, agresividad y progresión de la enfermedad (Mattei et al., 2021).

1.2.2.3.1 Marcadores de GSCs.

El primer marcador de superficie definido para GSC fue CD133, el cual permitió la subdivisión de las células troncales en dos grupos, los CD133 positivos (CD133+) o células madre cancerosas y CD133 negativos (CD133-) o células madre no cancerosas. Este marcador además indicaba la capacidad de las células de autorrenovarse e inducir la formación de esferoides *in vitro* y modelos *in vivo* (Glumac & LeBeau, 2018). Otros marcadores como CD133 y CD15 se han determinado como los marcadores más útiles para la identificación de GSCs. Si se encuentran asociados a otros marcadores como Nestin (una proteína asociada con las células madre neurales) o a HOX (genes homeóticos agrupados) constituye un factor adverso en el pronóstico de la progresión del glioblastoma. El marcador CD184, el cual está asociado con la expresión del factor de hipoxia inducible (HIF-1), se encuentra expresado al igual que CD44, CD90, SOX2, ALDH1, L1CAM, KLF4, SALL4 y GFA, que son usados para identificar GSCs (Alves et al., 2021).

1.2.2.4 Microambiente tumoral (TME)

El proceso para la formación y progresión del tumor está influenciado por dos factores, los cambios genéticos/epigenéticos en las células tumorales y el reacomodo de los componentes en el microambiente tumoral (TME), mediante comunicación dinámica constante. El TME consiste en un conjunto de diferentes células, ya sea células tumorales, células tumorales estromales como fibroblastos, células endoteliales y células inmunes como la microglía, los macrófagos y los linfocitos, así como de componentes no celulares como la apocrina y la paracrina, moléculas de señalización y exosomas, además de componentes de la matriz extracelular como el colágeno, fibronectina, ácido hialurónico, laminina y algunos otros. Las células tumorales son consideradas el corazón del TME, pues controlan la función de los componentes celulares y no

celulares a través de señalizaciones complejas que hacen que las células no malignas trabajen para su propio beneficio (Baghban et al., 2020).

Tanto las células presentes en el microambiente tumoral, como los componentes no celulares, las moléculas de señalización, los componentes de la matriz extracelular, los factores de crecimiento, además de las condiciones específicas de hipoxia y acidosis, constituyen el microambiente tumoral y por tanto, este juega un importante papel en el establecimiento de la quimioresistencia del glioblastoma a los tratamientos, siendo además el responsable de proveer un escudo protector contra la vigilancia inmunológica (Da Ros et al., 2018).

Como se puede observar en la Figura 3, las condiciones que tienen las células dentro del tumor varían dependiendo si se ubican más cerca de la periferia o se encuentran más cercanas al núcleo tumoral.

Es así que las células más cercanas al núcleo se encuentran en condición de hipoxia, pues el oxígeno disponible es mucho más bajo que el disponible en la periferia, por otro lado, la concentración de protones hidrogeno es mayor al centro que en la periferia, lo que indica que el núcleo tumoral es más ácido, lo cual está relacionado con la baja capacidad de amortiguamiento que tiene el núcleo tumoral a diferencia de la alta capacidad que podemos observar en la periferia del tumor.

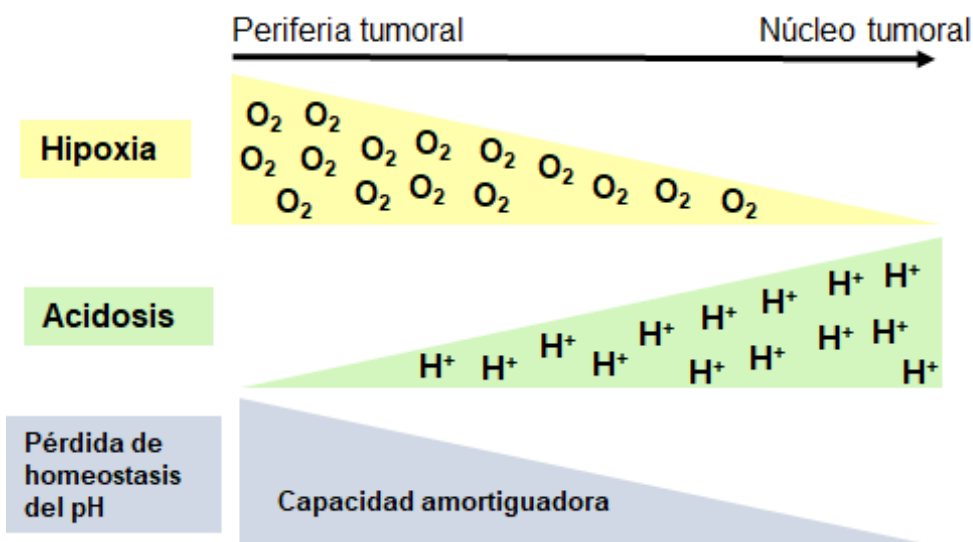


Figura 3. Condiciones físicas dentro del microambiente tumoral (Modificada de Damgaci et al., 2018).

1.3 Modelos experimentales de Glioblastoma

Las características del glioblastoma que se han revisado en los incisos anteriores así como su desarrollo en un órgano aislado, como lo es el cerebro, hacen que su estudio sea relativamente difícil. Esto ha llevado al desarrollo de diversas aproximaciones experimentales para tratar de comprender el comportamiento de las células que lo conforman, las interacciones entre ellas y el microambiente tumoral, por lo que actualmente existen múltiples opciones para el estudio del GBM, que van desde los cultivos celulares más básicos hasta los tridimensionales más sofisticados, pasando por diversos modelos animales.

En cualquier caso, un modelo preclínico ideal debe cumplir con ciertas características tales como (Lenting et al., 2017): I) La genética debe ser similar al de un subconjunto de gliomas; II) La genética, epigenética y fenotipo de la heterogeneidad intratumoral debe ser igual a la del glioma humano; III) Los modelos deben implicar un microambiente adecuado respecto a la inmunocompetencia, la presencia de barrera hematoencefálica (BHE) y las interacciones célula-célula y célula-microambiente; IV) El modelo debe ser reproducible y estable con el paso del tiempo.

Con estos requisitos, lo que se busca es simular las mismas lesiones, localización anatómica y características histopatológicas de los tumores humanos y así poder predecir de mejor manera la respuesta del paciente al tratamiento.

1.3.1.1 Cultivos celulares

Los cultivos celulares, así como los modelos animales son fundamentales para entender la formación, función y patología de tejidos y órganos, por lo cual han brindado importantes avances conceptuales (Yamada & Cukierman, 2007). Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas (Segeritz & Vallier, 2017).

Los cultivos celulares se pueden llevar a cabo utilizando células primarias aisladas directamente desde donadores (cultivos primarios) o cultivos ya establecidos y resguardados en bancos celulares (líneas celulares). Los cultivos

primarios son células aisladas quirúrgicamente de un organismo y colocadas en un ambiente adecuado donde puedan adherirse, dividirse y crecer. Una de las formas de obtener estos cultivos es por explantación, en donde pequeñas partes de un tejido se adhieren a cajas para cultivo de vidrio o plástico previamente tratado, añadiendo medio de cultivo. Tras unos días, las células individuales se moverán del tejido hacia la superficie de la placa de cultivo (Yamada & Cukierman, 2007). La segunda técnica más utilizada es conocida como disociación enzimática, la cual es más rápida, en ella se añaden enzimas digestivas, como tripsina o colagenasa para desgargar los fragmentos de tejido y mantener juntas a las células, las cuales posteriormente se pueden colocar en placas de cultivo, permitiendo su división y crecimiento (Ryan, 2008).

Los cultivos primarios son difíciles de aislar y tienen un periodo corto de vida, sin embargo, logran mimetizar las características genéticas de tumores *in vivo* y hacen que sea posible llevar a cabo experimentos funcionales, por lo que permiten entender la biología celular, la morfología de tejidos, los mecanismos de enfermedades y la forma de actuar de fármacos, haciendo que sean indispensables en estudios preclínicos de diferentes fármacos, en estudios de cáncer y estudios del funcionamiento de genes (Kapałczyńska et al., 2018a).

Por su parte, el diccionario de cáncer del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos define a las líneas celulares como células de un tipo único (humano, animal o vegetal) que son adaptadas para su crecimiento y expansión continuos en el laboratorio (Diccionario de Cáncer del NCI, s. f.).

Las líneas celulares tienen muchas aplicaciones tanto en investigación como en la industria, por ejemplo, en la producción de biomoléculas de interés, como proteínas y anticuerpos, así como para pruebas de nuevas moléculas con potencial terapéutico y estudios funcionales de genes. Debido a la facilidad de obtención y mantenimiento de las líneas celulares, su empleo como plataformas para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos se popularizó durante el siglo pasado. Sin embargo, se ha visto que de cada diez potenciales fármacos nuevos, sólo uno tiene éxito en las pruebas clínicas. Esta alta tasa de fracaso se ha atribuido al uso de cultivos celulares en monocapa o 2D, como plataforma de

prueba, ya que no mimetizan la compleja organización de las células *in vivo*, especialmente de los tumores, cómo se discute a continuación.

1.3.1.1 Cultivos 2D

En los cultivos 2D, las células crecen en monocapa adheridas a la superficie plástica de una caja de Petri o frasco de cultivo (Kapalczyńska et al., 2018) y son el modelo base en la investigación biológica debido al bajo costo que tienen, a su facilidad para ser llevados a cabo, el poder monitorear el crecimiento de las células y su repetibilidad (Wanigasekara et al., 2023). Sin embargo, gracias a su constante uso, se han observado numerosas desventajas. Los cultivos 2D no imitan la naturaleza de los tejidos o los tumores, por lo que tampoco logran representar las interacciones célula-célula y célula-ambiente extracelular como se vería en un tumor, las cuales son responsables de la diferenciación celular, el metabolismo de fármacos, proliferación y expresión de genes y proteínas (Kapalczyńska et al., 2018). Además, se ha visto que, en este modelo de cultivo, las células tienen un acceso ilimitado al oxígeno, nutrientes, metabolitos y moléculas de señalización lo cual es un contraste con las condiciones *in vivo* donde hay un acceso variable a estos componentes (Mohandas et al., 2023)

Finalmente, los cultivos adherentes suelen ser de monocultivos permitiendo únicamente el estudio de solo un tipo celular, resultando en un microambiente o nicho tumoral ausente, el cual es requerido por las células iniciadoras de cáncer también conocidas como cáncer stem cells (CSCs) (Razi et al., 2023).

1.3.1.2 Eficacia de cultivos 2D como modelo preclínico.

El primer paso en el desarrollo de fármacos inicia con el cultivo 2D, que prosigue con el estudio de modelos animales; solo un 5% de los estudios preclínicos en todas las áreas terapéuticas son exitosos al resultar efectivos en tratamiento humano (Brancato et al., 2020). La razón principal es que los datos obtenidos de pruebas realizadas en cultivos 2D no logran predecir de manera adecuada la respuesta celular y por tanto predecir la respuesta *in vivo* del compuesto, resultando en una pérdida de tiempo y de recursos, por lo que termina retrasando la identificación de tratamientos viables. Por ello, ha aumentado el interés en la

adopción del cultivo 3D como modelo en la obtención de nuevos compuestos (Belfiore et al., 2021).

Las desventajas previamente mencionadas y sumado a sus limitantes como modelo preclínico ha provocado que los investigadores emprendieran una búsqueda de un modelo que predijera de mejor manera el comportamiento de los compuestos

1.3.2 Cultivos 3D

Los cultivos tridimensionales o 3D han contribuido a zanzar la brecha entre los modelos tradicionales 2D y los modelos animales de glioblastoma, porque ellos presentan un microambiente muy similar al encontrado en condiciones *in vivo*. Los diferentes tipos de cultivos 3D pueden obtenerse ya sea a partir de la libre agregación celular, mediante cultivos rotatorios en biorreactor, produciendo agregados celulares, con microacarreadores empleando cultivos en hidrogeles o andamios. Este tipo de cultivos pueden mantenerse en plataformas adaptables y escalables, e incluyen los cultivos de esferas y las rebanadas organotípicas (Wanigasekara et al., 2023)

El gran interés suscitado por los cultivos de esferoides ha llevado al desarrollo de múltiples protocolos para su obtención, los cuales van desde técnicas muy simples hasta algunas que requieren instrumentos más complejos y sofisticados, pero a grandes rasgos se distinguen dos tipos de metodologías para la obtención de cultivos 3D: las que se basan en el uso de sistemas de apoyo o andamiaje y las que no los requieren.

Por un lado, los sistemas de andamiaje requieren de una matriz capaz de tener las características similares a la matriz extracelular (ECM), por lo que se ha recurrido a polímeros naturales, sintéticos, con proteínas recombinantes, cerámicas o incluso compuesta de metales; por su similitud con la ECM, los polímeros derivados de animales como colágeno son considerados como el estándar de oro. Lamentablemente, la dependencia de productos animales ha provocado un cierto rechazo debido a su variabilidad, a su impacto ambiental y temas éticos (Ahmad et al., 2021)

En la búsqueda de andamios libres de animales, ha surgido una fuente potencial de materiales consistentes, químicamente definidos y de bajo costo, como son los polímeros sintéticos o los naturales libres de animales tales como celulosa, Cultrex (marca registrada R&D Systems), Geltrex (marca registrada GIBCO), ácido hialurónico, colágeno, agarosa, alginato, polietilenglicol (PEG), Alcohol polivinílico (PVA), polylactide-co-glycolide (PLG), ácido poliláctico (PLA), gelatina metacrilada (gelMA) quitina/quitosano, alginatos y seda recombinante (revisado en Campuzano & Pelling, 2019).

Por otra parte, los sistemas libres de andamiaje se basan en la autoagregación de las células, impidiendo que estas se adhieran a una superficie, para lo cual se utilizan placas de cultivo especiales, ya sea elaboradas con materiales de ultra baja adherencia o tratadas con polímeros inertes como agarosa o Polihidroxietilmetacrilato (Poly-HEMA) (Langhans, 2018). De igual manera, se pueden obtener forzando su autoagregación mediante gravedad como en los métodos de gota colgante o centrifugación, y pueden ser obtenidas por agitación constante (Langhans, 2018). En la Figura 4, se muestran algunos de estos métodos.

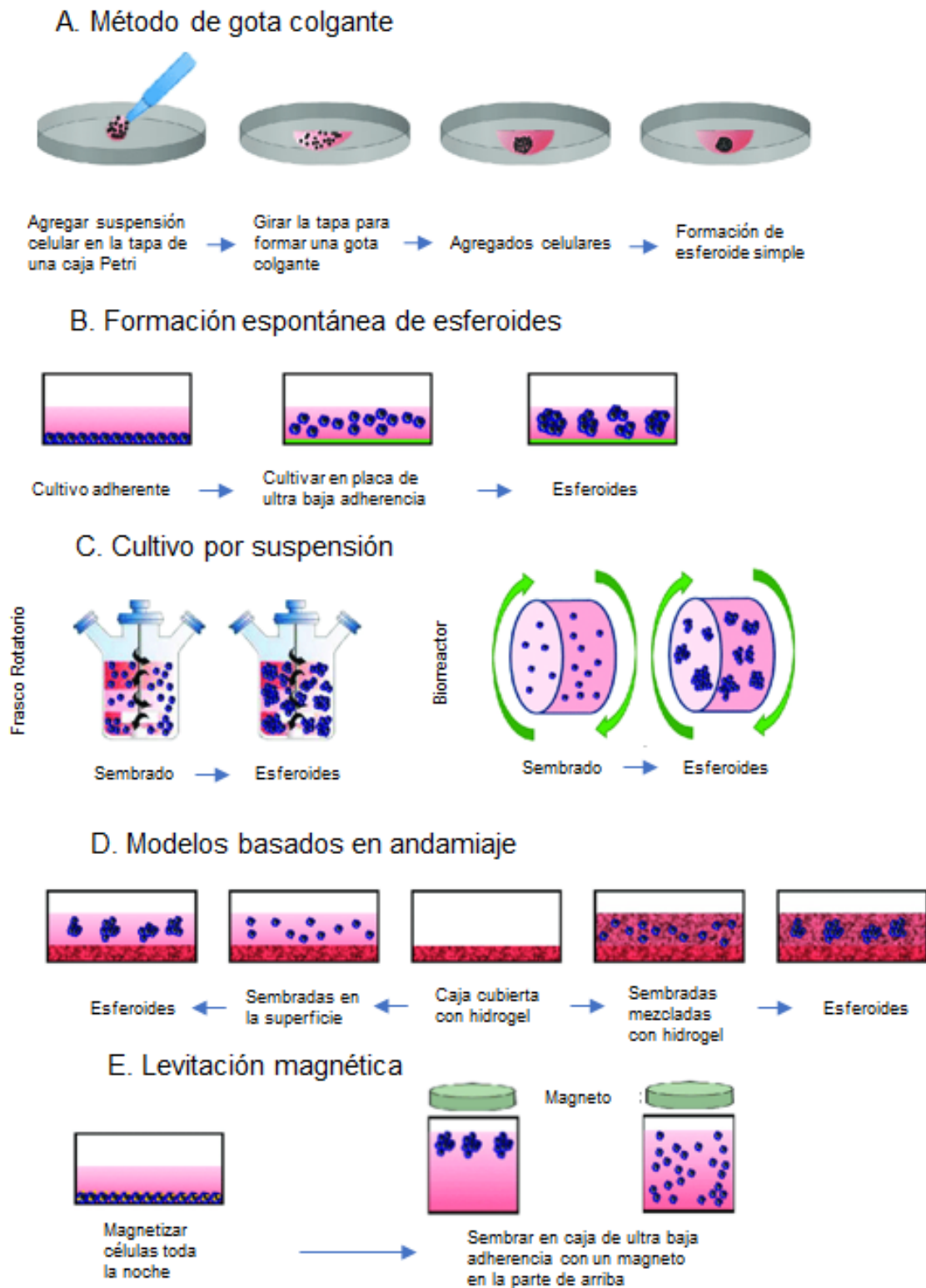


Figura 4. Diferentes métodos de obtención de esferoides (figura modificada de Hoarau-Véchet et al., 2018).

1.3.2.1 Esferoides

Los esferoides son agregados celulares formados por el cultivo de una gran densidad celular, crecidos en un ambiente que no permite que se adhieran a una superficie plana, ya sea de una placa Petri o caja de cultivo (Li et al., 2020). La formación de los esferoides es posible gracias a proteínas de membrana (integrinas) y proteínas de la matriz extracelular (Li et al., 2020). La formación de esferoides sucede en 3 pasos:

- 1) Las células dispersas en una solución forman agregados gracias a las fibras de cadena larga presentes en la matriz extracelular las cuales presentan RGD (péptido más común responsable de la adhesión celular a la matriz extracelular), permitiendo así la unión de las integrinas de la superficie celular, esto lleva a la sobreexpresión de cadherina.
- 2) La cadherina se acumula en la superficie de la membrana celular
- 3) La unión cadherina-cadherina entre células vecinas permite conexiones estrechas entre las células, formando finalmente los esferoides (Białkowska et al., 2020).

Los esferoides, a diferencia de lo visto en cultivos de monocapa, muestran existencia de gradientes de nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento, y fármacos, por lo que podemos encontrar diferentes capas formando el esferoide (Figura 5); lo que brinda heterogeneidad celular dependiendo de la capa celular, incluyendo células proliferativas, quiescentes, hipóxicas y necróticas, tal y como ocurre en los tumores *in vivo*.

Las células formadoras del esferoide que se encuentran en la periferia cuentan con una mayor concentración de nutrientes, oxígeno, factores de crecimiento y fármacos, mientras que a medida que las células se aproximan al núcleo del esferoide, estas concentraciones se ven reducidas, e incluso no siempre logran penetrar completamente al esferoide. En contraste, las condiciones hipóxicas, la acidez del medio y la necrosis, ocurren en el interior, algo muy similar a lo que sucede en el crecimiento de un tumor (Sant & Johnston, 2017).

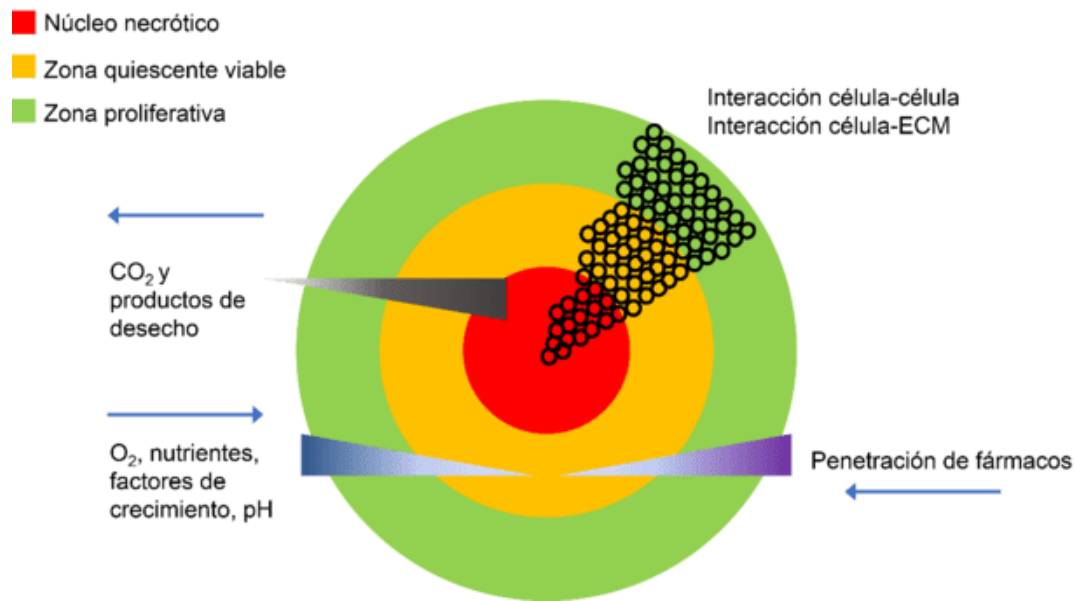


Figura 5. Diferentes zonas que forman un esferoide. Se puede observar la presencia de zona necrótica, quiescente y proliferativa, las cuales están conformadas por células que interactúan entre sí y con la matriz extracelular, donde además del gradiente de la llegada de nutrientes, O_2 y pH, se observa un gradiente con la interacción de fármacos y la salida de CO_2 y productos de desecho (modificado de Sant & Johnston, 2017).

Quereda y colaboradores (2018) identificaron por inmunofluorescencia que los esferoides formados por células de glioblastoma expresan marcadores de GSCs, entre ellos, Nestin, Sox2 y Sox9. Por su parte, Jensen (Jensen et al., 2016) identificó por análisis inmunohistoquímico a los marcadores Nestin, CD133 y CD56 en células T98. Adicionalmente, Tang y colaboradores (2021) identificaron por PCR los marcadores CD44, Nanog y OCT4 en células U-251. Todos estos marcadores no suelen identificarse en los cultivos 2D formados por astrocitos diferenciados (Yamamuro et al., 2015)

Una de las características de los cultivos 3D que más implicaciones tiene, es la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular más natural, en contraste con los cultivos en monocapa; estas interacciones permiten una proliferación *in vitro* en un microambiente que refleja lo ocurrido *in vivo* (Wanigasekara et al., 2023).

Así mismo, se ha demostrado que, en comparación con las células crecidas en monocapa, los esferoides sobreexpresan genes involucrados en autofagia, metabolismo de fármacos a través de citocromo p450 y a los transportadores tipo ABC unidos a ATP, los cuales están relacionados con la resistencia a los fármacos. Además, existe la sobre-regulación de genes, entre los cuales se encuentran los relacionados con el control del ciclo celular y la replicación de ADN (Chaicharoenaudomrung et al., 2020). En la Tabla 2 se resumen algunas características de los cultivos 2D vs. cultivos 3D.

Tabla 2. Comparación de las características de los cultivos 2D vs 3D.

Características celulares	Cultivos 2D	Cultivos 3D
Morfología (Huang et al., 2013)	Células con forma de hoja, estiradas y en monocapa	Forma más parecida a la encontrada <i>in vivo</i> , de esferoide y agregados celulares
Interacción celular (Z. Li & Cui, 2014)	No hay una interacción célula-célula ni célula-microambiente	Hay interacción célula-células y célula-microambiente, creando "nichos" ambientales
Proliferación (Joseph et al., 2018)	Pueden llegar a proliferar más rápido que <i>in vivo</i>	Diferentes tipos de células proliferan a diferentes ritmos
Exposición a medio/ fármacos (Bokhari et al., 2007)(Z. Li & Cui, 2014)	Exposición homogénea a metabolitos, nutrientes, oxígeno y señales moleculares	Los metabolitos, nutrientes, oxígeno y señales moleculares pueden no penetrar el esferoide por completo, el núcleo celular recibe menos de estos elementos.
Fase del ciclo celular (Kapałczyńska et al., 2018)	Las células suelen estar en un mismo ciclo celular pues reciben los mismos nutrientes	Los esferoides, al no recibir la misma cantidad de nutrientes pueden contener células quiescentes, proliferativas, hipóxicas y necróticas.
Tiempo de formación (Kapałczyńska et al., 2018)	Se forman de minutos a algunas horas	Se forman de algunas horas o algunos días
Sensibilidad a fármacos	Las células suelen ceder a los fármacos y	Son más resistentes a los fármacos y tratamientos

(Bokhari et al., 2007)	tratamientos, aparentando que son muy efectivos	comparados con los cultivos 2D, lo que simula de mejor manera un comportamiento <i>in vivo</i>
Costo de mantenimiento (Kapałczyńska et al., 2018)	Suele ser más barato, son más comerciales tanto las pruebas como el medio a utilizar en estos cultivos	Suelen ser más caros, debido a que las pruebas y el medio son menos comerciales, además de consumir un mayor tiempo que los cultivos 2D

Así la conformación espacial de las células parece jugar un papel de gran importancia para su biología (Figura 6). Todos estos datos han llevado a que actualmente nos encontremos con una tendencia por sustituir los cultivos 2D por cultivos 3D en cuanto a la investigación en cáncer, pues estos parecen comportarse de una manera más aproximada al crecimiento natural de un tumor y pueden predecir de una forma más exacta, el comportamiento que presentarán los tratamientos con fármacos.

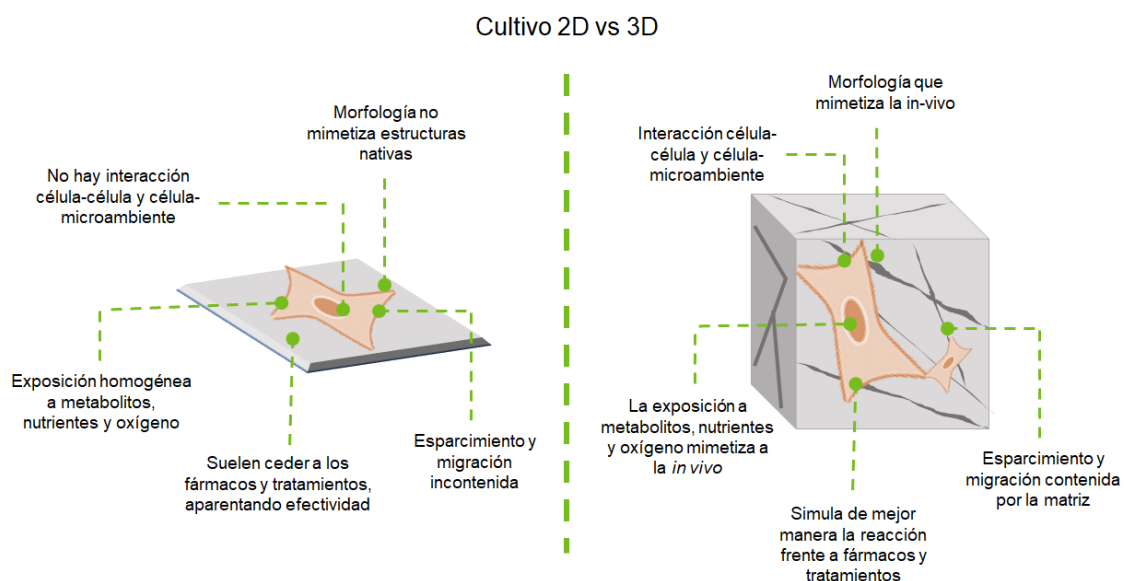


Figura 6. Comparación de las características de los cultivos celulares en 2D vs 3D (Modificado de UPM BIOMEDICALS, 2018).

Cómo hemos visto en el apartado 1.2.4, actualmente existen diversos protocolos para la obtención de esferoides a partir de líneas celulares, específicamente en el caso de células de glioma; sin embargo, éstos métodos no permiten la

obtención de una cantidad suficientemente vasta de esferoides para extraer proteínas o ácidos nucleicos para su posterior análisis por métodos convencionales tales como Western blot o PCR en tiempo real, lo que ha llevado al desarrollo de técnicas muy sofisticadas que permiten el análisis de prácticamente un esferoide a la vez. Por fascinante que esto pueda ser, los análisis robustos siguen siendo necesarios, particularmente cuando se trata de pruebas preclínicas de una nueva molécula candidata a ser un nuevo agente antitumoral. Esto hace imprescindible la estandarización de un método que permita obtener una cantidad abundante de esferoides, con particular énfasis en GSCs, y que sea accesible a cualquier laboratorio interesado en realizar estas pruebas.

Aunque actualmente existen múltiples protocolos para la obtención de GSCs, una comparación experimental entre algunos de ellos nos mostró que la cantidad de GSCs obtenidas con dichos protocolos no permite la realización de estudios moleculares y bioquímicos convencionales.

HIPOTESIS.

Es posible estandarizar un protocolo de obtención de esferoides enriquecidos en GSCs

OBJETIVO GENERAL.

- Establecer un método de cultivo de esferoides con alto rendimiento de GSCs y con una buena relación costo/eficiencia a partir de líneas celulares de glioma humano, que sea útil como modelo preclínico para el desarrollo de nuevos fármacos contra el glioblastoma.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Producir esferoides de entre 100 y 200 μm de diámetro
- Comparar mediante observaciones microscópicas el tiempo en que se forman esferoides empleando diferentes cantidades de células y diversas condiciones de cultivo 3D.
- Verificar la presencia de GSCs en los esferoides mediante la expresión de marcadores específicos
 - a) Detección por inmunofluorescencia

- b) Cuantificar mediante la técnica de Western blot la expresión de los marcadores de GSCs en los esferoides obtenidos mediante el protocolo estandarizado de cultivo 3D.
- Demostrar que el método estandarizado de producción de un máximo número de esferoides funciona para cualquier otra línea celular de glioma.

2 METODOLOGÍA.

La preparación de soluciones, medios de cultivo y otros reactivos se encuentra en el Apéndice 1

2.1 Crecimiento de células en monocapa 2D

Se emplearon las líneas celulares provenientes de glioma humano T98G y LN18 (CRL-1690 y CRL-2610 respectivamente) y C6 de glioma de rata (CCL-107) las cuales se adquirieron del catálogo de ATCC y se trataron de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Descongelamiento de células

Las alícuotas de cada una de las líneas celulares ($\sim 1 \times 10^6$) contenidas en crioviales de 2 ml y almacenados en un contenedor de nitrógeno, se descongelaron en un baño maría a 37°C. Previamente, se prepararon 3 tubos cónicos de 15 mL con 10 mL de medio DMEM. Una vez descongeladas las células, se depositaron en el respectivo tubo con medio, resuspendiéndolas con pipeteo suave (5 veces). Luego de esto, las células se centrifugaron a 2000 rpm en una centrífuga clínica (800 D, Biofield Medical). El sobrenadante se eliminó, y de nueva cuenta se resuspendieron suavemente en 5 mL de medio DMEM completo con suero fetal bovino (SFB) al 5 % para las células LN18 o al 10 % para los otros tipos celulares. El medio también se adicionó con antibióticos y antimicótico (penicilina G, sulfato de estreptomicina y anfotericina B, Santa Cruz Biotechnology ®); los medios así preparados se denominan medios DMEM completos. La suspensión de células se colocó en una botella de cultivo T25 (TPP ® Switzerland) y se introdujeron en una incubadora a 37°C, 5 % de CO₂ y 80 % de humedad. Se permitió que las células alcanzaran una confluencia del 70-80 % antes de realizar el pase.

2. Proceso de pasaje de células

La monocapa celular se lavó dos veces con PBS, y se añadieron, 0.7 mL (para botellas T25) o 2.0 mL (para cajas Petri de 100 mm) de Tripsina al 0.25 %-1 mM EDTA. Las células se regresaron a la incubadora durante 5-7 min. Al término de este tiempo, se les agregaron dos volúmenes de medio DMEM completo (37°C). Las células se recuperaron en un tubo cónico para centrífuga de 15 mL y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Se retiró el medio, posteriormente se agregaron 3-5 mL de PBS y se procedió a resuspender el botón de células y se repitió el proceso de centrifugación. Se retiró el PBS y se resuspendió de nuevo el botón formado en PBS (en esta parte se lleva a cabo un conteo celular por medio del método de azul tripano y haciendo uso del contador automático Invitrogen™ Countess™ 3. Este método se encuentra descrito en el Apéndice 2), para poder determinar la densidad celular y con ello calcular la o las diluciones para obtener los contenidos necesarios para cada experimento. Se eliminó el PBS por centrifugación y se agrega la cantidad de medio DMEM completo necesario para obtener la densidad celular deseada y se distribuyó en cajas Petri de 100 mm de diámetro (Corning Inc. ® USA).

3. Sembrado en caja Petri

Se prepararon las cajas Petri de 100 mm de diámetro para cultivo previamente con 8 mL de medio DMEM y se agregó la cantidad de la suspensión de células ya con la dilución de células adecuada, se homogenizaron las células en el medio realizando movimientos circulares en forma de “8” con la caja apoyada sobre la superficie de la campana de flujo, durante 30 s. Posteriormente se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad en una incubadora (Mettler ® INCO108med)

Se verificó el crecimiento celular todos los días y al cabo de 3 días se observó una confluencia de al menos 70-80 %. Después de 3 pases sucesivos posteriores a la descongelación, las células se pusieron en condiciones de cultivo 3D con las técnicas que a continuación se describen.

2.2 Cultivos 3D.

Para la obtención de cultivos celulares en 3D o esferoides, se siguieron diferentes protocolos; I) gota colgante seguido de cultivo con rotación, II) sembrado en cajas de ultra baja adherencia, III) empaquetado celular por centrifugación, IV) sembrado en cajas Petri bacteriológicas, V) sembrado en cajas Petri recubiertas con Poly-HEMA o VI) sembrado en cajas Petri recubiertas con agarosa al 1 %.

2.2.1 Gota colgante

Los esferoides de la línea celular T98G se crecieron utilizando la técnica modificada descrita (Foty, 2011). Cuando la monocapa de células alcanzó una confluencia del 80-90 %, se preparó la suspensión celular, para lo cual, primero se enjuagaron las células con PBS en dos ocasiones, después de retirar por completo el PBS se agregaron 2 mL (para una caja de 100 mm) de tripsina 0.25 %-1 mM EDTA y se incubaron a 37°C para favorecer el desprendimiento. La acción enzimática de la tripsina se detuvo agregando 2 mL de medio DMEM adicionado con SFB al 10 %, y disgregando suavemente las células con el uso de una pipeta de 5 mL hasta obtener una suspensión celular homogénea. Se centrifugó a 2000 RPM durante 5 min. Al botón celular obtenido se le realizaron 2 lavados con PBS, se contaron las células por medio del contador automático (Thermo Fisher Scientific ® Countess II) y se ajustó la concentración a 2.5×10^6 células/mL con medio DMEM completo.

Se removió la tapa de una caja de cultivo de 60 mm, en el fondo de la caja se agregaron 5 mL de PBS, el cual actúa como una cámara de hidratación. En la superficie de la tapa invertida se depositaron gotas de 10 μ l de la suspensión celular lo suficientemente alejadas para que no se tocaran unas con otras. En total se colocaron 16 gotas. Se invirtió la tapa y se colocó cuidadosamente sobre la cámara de hidratación con PBS. Las gotas se incubaron en una incubadora a 37°C/ 5 % CO₂/ 95 % de humedad. Mediante estereomicroscopio y microscopio invertido, se observó el crecimiento de los esferoides todos los días cuidando de no abrir la caja, hasta que los esferoides alcanzaron un diámetro de aproximadamente 100 μ m (aproximadamente en 48 h). Se añadieron 2 mL de medio DMEM/F12 sin suero en la tapa invertida, con el fin de recolectar los esferoides mediante una pipeta de transferencia. Los esferoides se depositaron

en un matraz de fondo redondo que contenía otros 5 mL del mismo medio, y se introdujeron en un incubador orbital (Thermoscientific® MaxQ 400) a 37 °C con agitación de 30 rpm, y se incubaron durante 24-48 h. Al término de este periodo los esferoides se recuperaron en un tubo Falcon de 50 mL introduciendo una pipeta de transferencia.

2.2.2 Sembrado en cajas de ultra baja adherencia

Se obtuvo una suspensión celular de 1×10^6 células/mL a partir de la monocapa de células, y se colocaron 100 μ l (10,000 células por pozo) en cada uno de los pocillos de una caja de ultra baja retención (Corning® Ref. 3474, USA) siguiendo el protocolo (Culley et al., 2023). Los esferoides se cultivaron tanto con medio DMEM suplementado con SFB (medio completo) como sin SFB, añadiendo a este último factores de crecimiento y antibióticos (medio de esferoides). Las cajas se llevaron a incubación a 37°C/ 5 % CO₂/ 95 % de humedad y se monitorearon durante 3 días hasta que alcanzaron un tamaño aproximado de 200 μ m.

2.2.3 Empaquetado celular por centrifugación

Para este método se siguió el protocolo descrito por (Zanoni et al., 2016) con algunas modificaciones. Después de obtener la suspensión de células crecidas en forma de cultivo 2D, esta se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. Una vez que se contaron las células se resuspendieron en medio DMEM completo, a una concentración de 1×10^6 células /mL, y después se ajustó la concentración a 1.25×10^4 , 2.5×10^4 , 5.0×10^4 , 1.0×10^5 y 2.0×10^5 células/0.5 mL. Cada una de estas suspensiones se colocó en microtubos de 1.5 mL y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. El botón celular así obtenido se incubó con la tapa abierta para permitir el intercambio de gases, en una incubadora con condiciones de 37°C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad durante 24 h en medio DMEM completo. Cada esferoide se separó de su tubo y se transfirió a placas de cultivo de 96 pozos con ultra baja adherencia (Corning® Ref. 3474, USA) añadiendo medio DMEM completo y antibióticos.

2.2.4 Cajas Petri recubiertas con agarosa al 1 % (suero vs libre de suero)

Los esferoides de la línea celular T98 se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por (Rivera, 2017) con algunas modificaciones. Como primer paso, se

recubrieron las cajas Petri con agarosa al 1 % (Anexo 1). Para mantener la agarosa en forma líquida se mantuvo en un baño María a 50°C. Para recubrir las cajas de 60 mm de diámetro se agregó 1 mL de la solución de agarosa y 3 mL para las cajas de 100 mm de diámetro. Una vez que se depositó la agarosa sobre el fondo de las cajas Petri, se cuidó de que quedara una superficie lo más uniforme posible mediante movimientos circulares en forma de “8” suaves y se permitió la gelificación a temperatura ambiente. Una vez que estuvieron completamente gelificadas, se sellaron con Parafilm y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Las células se sembraron en medio DMEM sin suero, adicionando factores de crecimiento FGF-2 (10 ng/mL) y EGF (20 ng/mL) así como antibióticos (penicilina G y sulfato de estreptomicina, Santa Cruz Biotechnology ®) y con una densidad de 1×10^5 células/mL. Se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad, y se observaron en un microscopio estereoscópico a las 24, 72 y 168 h posteriores.

2.2.5 Cajas Petri bacteriológicas (suero vs libre de suero)

Después del tercer pase de cultivo en monocapa después de la descongelación de las células y con una confluencia mayor al 80 %, se preparó la suspensión celular como previamente se ha descrito. Las células se contaron (ver Apéndice 2) y se resuspendieron en medio DMEM sin suero para obtener una concentración final de 2×10^5 células/mL. Las células se sembraron en cajas Petri bacteriológicas que contenían 5 mL del medio DMEM suplementado con suero KO respectivo o medio DMEM para esferoides, y se adicionaron las cantidades necesarias de la suspensión celular para obtener una cantidad final de 3×10^6 células por caja Petri de 100 mm de diámetro. Las células se introdujeron en una incubadora a 37°C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad y se observaron todos los días durante 1 a 7 días.

2.2.6 Cajas Petri recubiertas con poly-HEMA

Este método se basó en el protocolo descrito por Hong y colaboradores (Hong et al., 2012), para ello, primero se recubrieron las cajas Petri con poly-HEMA, cuya preparación se encuentra descrita en el Anexo 1. Dentro de la campana de flujo laminar, se agregó 1 mL de la solución de poly-HEMA en cajas de cultivo de 60 mm, con movimientos circulares y en forma de “8” se aseguró de cubrir toda

la superficie de las cajas. Se taparon y se dejaron secar durante 24 h dentro de la campana y una vez que estuvieron completamente secas se sellaron con Parafilm™ y se almacenaron a 4°C hasta su uso. El mismo procedimiento se siguió para las cajas de 100 mm, pero agregando 3 mL de la solución de poly-HEMA para asegurar la completa cobertura de estas.

Antes de utilizar las cajas, se enjuagaron tres veces con PBS, y se dejaron en la campana de flujo laminar hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se obtuvo una suspensión celular a una concentración de 5×10^5 células/mL en medio DMEM para esferoides. En las cajas previamente tratadas, se agregó la cantidad de medio y suspensión correspondiente para tener 1×10^5 células/mL (1×10^6 células totales por caja de 100 mm). Las células se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂ y con 95 % de humedad y se observaron a las 24, 72 y 168 h.

Técnica	Material utilizado	Medio utilizado	Denominación
Gota colgante (Foty, 2011)	Tapa de caja Petri	Medio DMEM + SFB	Medio completo
		Medio DMEM/F12 sin SFB	Medio DMEM/F12
Sembrado en cajas de ultra baja adherencia (Culley et al., 2023)	Cajas de ultra baja retención	Medio DMEM + SFB	Medio completo
		Medio DMEM + factores de crecimiento + B27 + antibiótico y antimicótico	Medio de esferoides
Empaquetado celular por centrifugación (Zanoni et al., 2016)	Microtubos cónicos de 1.5 ml	Medio DMEM + SFB	Medio completo
Cajas Petri recubiertas con agarosa (Rivera, 2017)	Caja Petri + agarosa	Medio DMEM + factores de crecimiento + B27 + antibiótico y antimicótico	Medio de esferoides
Cajas Petri bacteriológicas	Caja Petri bacteriológica	Medio DMEM + suero KO	Medio suplementado con suero KO
		Medio DMEM + factores de crecimiento +	Medio de esferoides

		B27 + antibiótico y antimicótico	
Cajas Petri recubiertas con poly-HEMA (Hong et al., 2012a)	Caja Petri	Medio DMEM + factores de crecimiento + B27 + antibiótico y antimicótico	Medio de esferoides

Tabla 3. Medios utilizados durante las diferentes técnicas de cultivo de esferoides

2.3 Conteo de esferoides

Para calcular el número de esferoides obtenidos se realizó la contabilidad de estos según se describe en el Anexo 2.

2.4 Pase de esferoides

Con el fin de determinar si después de disgregarse, las GSCs obtenidas son capaces de reiniciar la formación de esferoides conservando los marcadores de troncalidad, se realizaron hasta dos pases sucesivos de las mismas como se describe en el Anexo 2.

2.5 Congelación de esferoides

Con el fin de investigar si los esferoides pueden almacenarse en congelación sin que pierdan sus propiedades de GSCs, se implementó un protocolo para la congelación de estos antes del pase y después de disgregarse según se reporta en el anexo 2.

2.3 Inmunofluorescencia.

La tinción por inmunofluorescencia es un método ampliamente utilizado para identificar y cuantificar la expresión de biomarcadores específicos y su localización subcelular. En este trabajo se empleó esta técnica para analizar la expresión de marcadores específicos de GSCs (CD133, Nestina y GFAP) en aquellos esferoides obtenidos con los métodos con mejor rendimiento, cuando alcanzaron un diámetro de 100-200 μm para lo cual se siguió el protocolo que se encuentra a continuación:

2.3.5 Lavado y Permeabilización

- a) Recuperación de esferoides: Los esferoides formados se recolectaron en un tubo falcon haciendo uso de una pipeta de transferencia y evitando su disociación. Se permitió que los esferoides se depositaran en el fondo del tubo por gravedad, para lo cual se dejó en reposo el tubo. Cuando fue visible el botón en el fondo (aproximadamente 15 min después), se eliminó casi totalmente el medio, dejando aproximadamente dos mL de medio, el cual se transfirió junto con los esferoides a un microtubo de 2 mL de capacidad.
- b) Lavado: Una vez recuperados, los esferoides se centrifugaron a 2300 x g durante 5 min en la microcentrífuga. Se aspiró el sobrenadante cuidando de no deshacer el botón, al cual se le agregó 1mL de PBS. Se invirtió suavemente el tubo de 3 a 5 veces para no dañar los esferoides y se centrifugó nuevamente. Este lavado se repitió dos veces más.
- c) El botón se resuspendió en 1mL de TBST 0.5 % (ver preparación en el Anexo 1)
- d) Se dejaron permeabilizar por 30 min con agitación suave en un mezclador de tubos (Thermolyne Vari-mix™), a temperatura ambiente.
- e) Los esferoides se resuspendieron por agitación suave y se colocaron en partes iguales (200 µl) en cada uno de los pozos de un portaobjetos de una cámara de 4 pozos. Para no dañarlos, se cortó la punta de una punta para micropipeta de 1 mL.

2.3.6 Bloqueo y tinción

El bloqueo previene la tinción no específica de los anticuerpos añadidos.

- a) Los esferoides se lavaron nuevamente tres veces con PBS, pero en lugar de centrifugar, se permitió que los esferoides se depositaran en el fondo de la cámara (aproximadamente 5 min), antes de eliminar el PBS de cada lavado.
- b) A cada pozo con esferoides se le agregaron 200 µl de anticuerpo primario diluido 1:100; el primer pozo fue el control, por lo que solo se agregó PBS, en el segundo pozo se añadió el anticuerpo anti-CD133, en el tercer pozo se añadió anti-NESTIN y en el cuarto pozo se añadió el anticuerpo anti-GFAP.
- c) Se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda

d) Se realizaron 3 lavados con PBS (200-300 μ l)

El anticuerpo secundario se añadió en concentración 1:1000 y se incubó por 1 h y 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. En el pozo control se le añadió un anticuerpo anti-rabbit y en los siguientes pozos se agregó el anticuerpo secundario correspondiente.

2.3.7 Preparación del portaobjetos y captura de imágenes

El paso final es la recuperación del portaobjetos con los esferoides teñidos y una vez realizado, el portaobjetos puede almacenarse un tiempo indefinido a -80°C , pero en nuestra experiencia, la captura de las imágenes y el análisis es de mejor calidad si se realiza antes de que transcurran más de tres días posteriores a la tinción.

a) Se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 min

b) Se retiró con precaución la parte de la cámara (pozos) del portaobjetos

c) Se añadió una gota de medio de montaje (UltraCruz® Aqueous mounting medium with DAPI) y se colocó delicadamente un cubreobjetos, se esperó a que el medio se distribuyera homogéneamente y sin burbujas de aire a lo largo entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Se dejó secar durante 2-3 h en la oscuridad.

d) Los bordes entre el cubreobjetos y el portaobjetos se sellaron con barniz para uñas transparente.

Las laminillas se colocaron una por una en el dispositivo para laminillas del lector multimodal BioTek® Cytation 7 para realizar la captura de imágenes y la medición del tamaño del esferoide.

2.4 Western blot

Para analizar la expresión de marcadores de GSCs se utilizó el método de inmunotransferencia o Western blot, la cual es una técnica que permite reconocer anticuerpos por antígenos que se absorben en una membrana. Se realizó el siguiente protocolo:

2.4.1 Extracción de proteínas

- a) Los esferoides se recuperaron y lavaron como se ha descrito en el apartado anterior. En el tercer lavado los esferoides se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min a 4°C. Se les eliminó completamente el PBS y se resuspendieron en 250 µl de amortiguador de lisis RIPA con inhibidores de proteasas (Ultras Cruz™ Cocktail Tablet) y se incubaron en hielo por 15 min.
- b) Al término de la incubación se agitó vigorosamente con un vórtex durante 60 s y se dejó de nueva cuenta en hielo por 15 min más. Al término de la incubación el tubo se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C
- c) Se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio. Se tomó una alícuota para cuantificar la concentración de proteína total por el método de Lowry (Waterborg, 2009).

2.4.2 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Para la preparación de las soluciones ver el apéndice 1

- a) Antes de comenzar se encendió el espectrofotómetro (Beckman DU-530) a 750 nm para su autocalibración.
- b) Se preparó una curva de calibración con albúmina de rango 0-20 µg de proteína (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 µg/µl de acuerdo con la tabla 1 del apéndice 2)
- c) Se realizó una dilución 1:100 de cada extracto de proteína a cuantificar (2µl de muestra en 200 µl de agua pura)
- d) Se incluyó un tubo con una dilución 1:100 del amortiguador en que se encuentran las muestras (Blanco)
- e) Las soluciones A y B se prepararon de acuerdo con el apéndice 1
- f) La solución C se preparó en el momento y se agregó 1 mL a cada tubo, los cuales se agitaron y se dejaron reposar 10 min a temperatura ambiente (T.A)
- g) A todos los tubos se les agregaron 100 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 con agua pura y se agitaron con vórtex inmediatamente durante 15 s.
- h) Los tubos se incubaron 30 min a T.A

- i) Se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro tanto de los tubos con albúmina y los controles, así como de las muestras.
- j) Las concentraciones de las muestras se determinaron mediante la interpolación de las concentraciones de la curva de albúmina y ajustándolas con el factor de dilución.

2.4.3 Preparación del Gel

- a) Las placas de vidrio de la unidad de electroforesis se limpiaron cuidadosamente antes de comenzar a preparar los geles. Se montaron en el soporte provisto por el fabricante (BioRad), para la polimerización de los geles.
- b) Se seleccionó el porcentaje de acrilamida a utilizar (10 % de acuerdo con la Tabla 1 del Anexo 1.)
- c) En un frasco se colocaron los reactivos para hacer el gel de resolución, excepto TEMED, se agitó suavemente para homogenizar y se agregó este último. Inmediatamente se vertió la solución en las placas de vidrio y se dejó reposar 10-15 min para gelificación completa.
- d) Se preparó en otro frasco la solución para el gel concentrador (cuidando de agregar el TEMED al final). Se colocó el peine de 0.75 mm de espesor y se dejó reposar 5-10 min a T.A.

2.4.4 Preparación de las proteínas

- a) En un microtubo se colocó el volumen de muestra equivalente a 30 µg de proteína
- b) Se agregaron 5 µl de amortiguador Laemmli 5X a cada tubo con muestra
- c) Se llevó a un volumen final de 25 µl con agua pura
- d) Las muestras así preparadas se introdujeron en baño María a 95°C por 5 min.

2.4.5 Electroforesis

- a) Una vez polimerizados los geles, se retiraron los peines a cada uno, con mucho cuidado para mantener los carriles de los pozos intactos.

- b) Las placas de vidrio con los geles se colocaron en la cámara de electroforesis y se llenó con amortiguador de corrida el interior y exterior de los geles
- c) Se cargaron las muestras en los carriles del gel, utilizando una pipeta p200 y una punta por cada muestra.
- d) En el primer carril se cargó el marcador de pesos moleculares (CruzMarker™, SantaCruz Biotechnology) y en los carriles sin muestra, se agregó sólo amortiguador de muestra.
- e) Se colocó la tapa de la cámara de electroforesis y se migraron las proteínas a 200 volts durante 60 min.

2.4.6 Transferencia

- a) Se cortó la membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno BIO RAD®) a la medida del gel usando guantes y pinzas para no tocarla directamente con las manos.
- b) Una vez finalizado el tiempo de la electroforesis se desprendió cuidadosamente el gel de los cristales y se sumergió inmediatamente en aproximadamente 20 mL de amortiguador de transferencia semiseca (ver apéndice 1). Dos papeles filtro (BioRad) de la misma medida que la membrana se colocaron también en amortiguador de transferencia
- c) La membrana de PVDF se activó sumergiéndola en metanol por 30 s y posteriormente colocó en amortiguador de transferencia
- d) La unidad de transferencia (Semi-Dry blotters Cleaver Scientific) se ensambló de la siguiente manera:

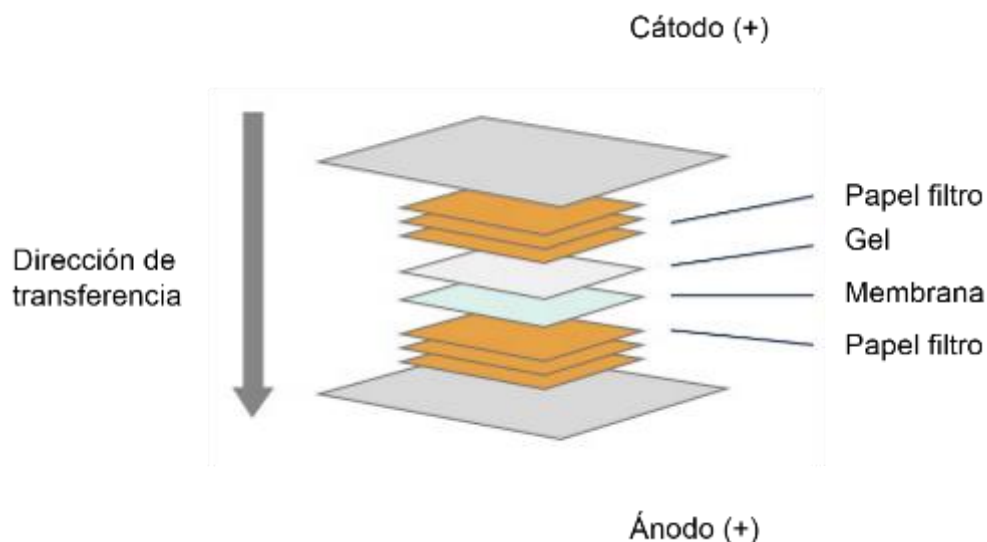


Figura 7. Ensamblado de membrana Semi-Dry Modificada de Sinobiological, 2023 <https://www.sinobiological.com/category/wb-semi-dry-transfer>

Antes de colocar la tapa se removieron las burbujas de aire con ayuda de un rodillo

e) La transferencia se llevó a cabo por 15 min a 320 mA

2.4.7 Bloqueo, lavados y colocación de anticuerpos

- a) Terminada la transferencia, la membrana se colocó en un recipiente pequeño (justo el tamaño de la membrana) con 10 mL de leche descremada (Svelty™, Nestlé) al 5 % en TBS-Tween 20, durante 15-60 min en agitación constante a T.A.
- b) Pasado ese tiempo, se retiró la leche y se añadió el anticuerpo primario monoclonal (Santa Cruz Biotechnology) respectivo (anti-CD133, Anti-Nestina, anti-GFAP o anti-GADPH) diluido 1:1000, en 10 mL de leche descremada al 3 % en TBS-Tween 20 1X (TBS-T 1X) durante 1 h a T.A.
- c) Terminado el tiempo de incubación con el anticuerpo, éste se eliminó y se realizaron 3 lavados con TBS-T de 5 min cada uno con agitación.

- d) Se colocó el anticuerpo secundario respectivo diluido 1:10,000 en la solución de leche al 3 % en TBS-T. Se dejó en incubación por 30 min a T.A.
- e) Al término de la incubación se lavó la membrana 3 veces con TBS-Tween 20, durante 5 min cada vez.

2.4.8 Revelado

- a) En la obscuridad, se sacudió la membrana en una sanita para eliminar el exceso de líquido y se colocó en un recipiente oscuro. Se agregó 1 mL de solución de peróxido y 1 mL de sustrato luminiscente (Clarity™ Western ECL Substrate Bio-Rad). Se tapó el recipiente y se agitó suavemente 30 s y se dejó reposar 1 min.
- b) La membrana se colocó en un fotodocumentador, durante 10 s. Las imágenes fueron capturadas con el software SmartView Pro
- c) Los análisis densitométrico se realizaron por medio del programa ImageJ de dominio público <https://imagej.net/ij/>

2.4.9 DOT BLOT

En el caso de los esferoides crecidos en cajas de 60 mm de diámetro, se realizó el análisis de la expresión de CD133 por la técnica de Dot-blot.

- a) Se obtuvieron los esferoides como ya se describió anteriormente
- b) Los esferoides se centrifugaron a 4°C durante 15 min a máxima velocidad (14000 rpm) en una centrífuga Eppendorf 5417R
- c) El sobrenadante se eliminó cuidadosamente y conservando el botón de células. Para eliminar la mayor cantidad posible de líquido se colocaron los tubos por inversión en una sanita.
- d) El botón se resuspendió en acetona fría (mantenida a -20°C) con vórtex, se dejó toda la noche a -20°C.
- e) Al día siguiente se centrifugó durante 30 min a máxima velocidad.
- f) Las muestras se secaron al aire para eliminar cualquier residuo de acetona durante 5 min.

- g) Las muestras fueron resuspendidas en 10 μ l de PBS. Se cuantificaron por el método de Lowry, y se depositó el equivalente a 5 μ g de proteína en una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad), con una pipeta p10.
- h) Se dejó secar la membrana durante 15 min. Se sumergió en etanol al 70 % durante 30 s y se dejó secar otros 10 min.
- i) Se introdujo en un recipiente pequeño con 15 mL de solución de Rojo de Ponceau (descripción en anexo I) y se puso en agitación suave durante 45 min a T.A
- j) Se eliminó la solución de Rojo de Ponceau y se realizaron varios lavados con agua destilada hasta que sólo aparecieron las marcas de las proteínas correspondientes a cada muestra.
- k) Se tomó una fotografía con un teléfono inteligente.
- l) Se continuaron los lavados hasta la completa descoloración de la membrana
- m) Se colocó la membrana en un recipiente pequeño con el anticuerpo anti-CD133 diluido en TBS-T/ 3 % leche. Se dejó en incubación durante 1 h
- n) Al cabo de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T
- o) Se colocó la membrana con el anticuerpo secundario. Se dejó en incubación por 30 min a T.A.
- p) Al término de la incubación se eliminó el anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS-T.

Se incubó con el reactivo de quimioluminiscencia y se fotodocumentó cómo se describió en el apartado anterior

3 RESULTADOS

3.1 Estandarización de un protocolo de alto rendimiento para la obtención de esferoides ricos en GSCs a partir de líneas celulares de glioma

3.1.1 Comparación por microscopía de campo claro de los esferoides obtenidos por diversas técnicas

En una primera etapa, se llevó a cabo la comparación de 6 métodos de cultivo de esferoides reportados en la literatura con la finalidad de encontrar la técnica

y condiciones que brindaran la mayor cantidad de esferoides, con mejor forma, mejor tamaño y que fueran obtenidos en el menor tiempo y por lo tanto que brinden un mejor costo/beneficio. Así, primero se obtuvieron esferoides mediante el método descrito por Foty (Foty, 2011)

En la Figura 7, los esferoides formados por gota colgante tienen un tamaño adecuado transcurridos 7 días ($>200\ \mu\text{m}$) (A), sin embargo, no su morfología no es la adecuada, ya que muy pocos de ellos presentan una forma esférica (B). Además, el número de esferoides que se obtienen por esta técnica depende de la cantidad de gotas colocadas en la tapa de la caja Petri, por lo que pueden obtenerse hasta 25 esferoides por caja de 60 mm los cuales son relativamente pocos. Adicionalmente, la manipulación de estos esferoides es difícil, porque cuando se transfirieron a un matraz para crecerlos en rotación se perdió la mayor parte de ellos debido a que quedaron adheridos a las paredes del matraz, por lo que su recuperación es difícil. Sin embargo, observamos que los esferoides se forman con mayor facilidad en gota colgante si se emplea el medio DMEM/F12 sin suero en lugar del medio DMEM completo.

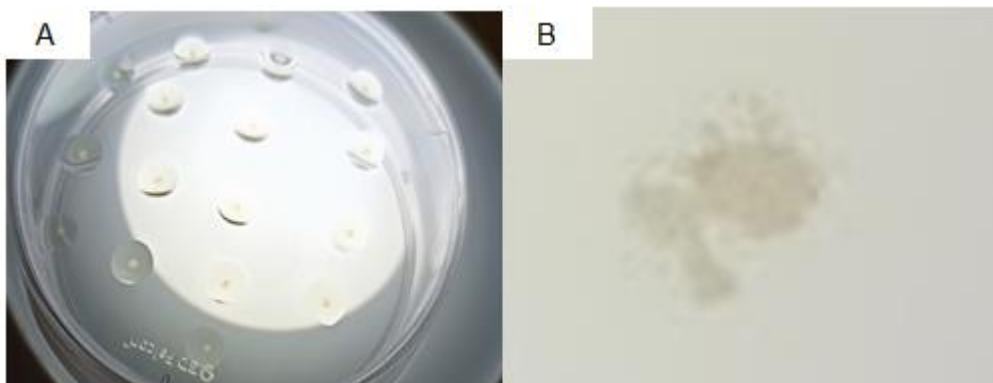


Figura 8. Esferoides a partir de células T98G formados por la técnica de gota colgante, observados a través del microscopio digital USB (A) 50x; observados con microscopio estereoscópico (B) la forma que presentan la mayoría de los esferoides no es regular 20x

Por su parte, la técnica de sembrado en placas de ultra baja adherencia (Figura 9) brinda esferoides con una forma más esférica desde los 3 días (Figura 9 A). A los 7 días pueden observarse al microscopio zonas necróticas y quiescentes (Figura 8 B), sin embargo, observamos que el tamaño de los esferoides depende de la cantidad de células iniciales, por lo que pudimos estandarizar el número de

células necesarias para obtener esferoides de tamaño óptimo (100-200 μm) desde los 4 días; y si bien se obtiene una gran cantidad de esferoides (más de 96 por cada placa de 96 pozos), su manipulación resulta difícil cuando se requiere recuperarlos para análisis de Western blot, inmunofluorescencia o PCR en tiempo real.

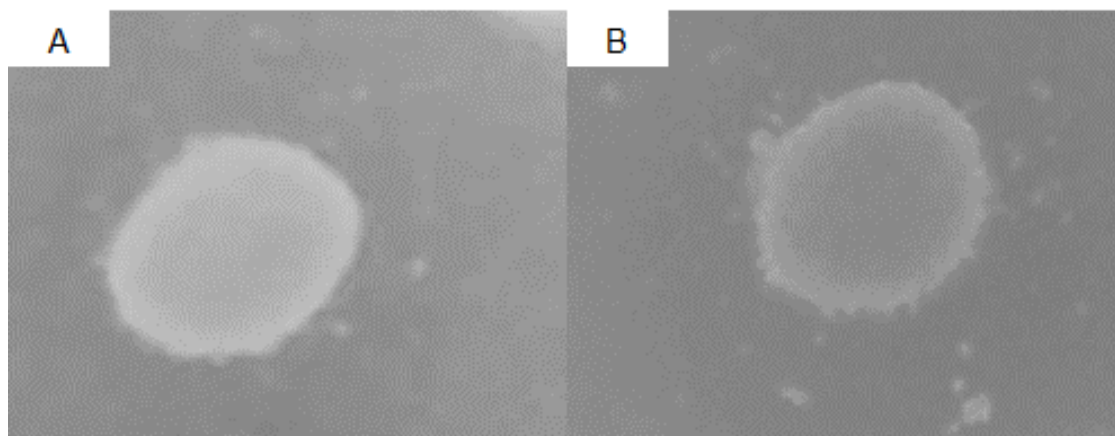


Figura 9. Esferoides obtenidos a partir de la línea celular de glioma T98G, mediante la técnica de sembrado en placas de ultra baja adherencia observados en microscopio invertido con el objetivo 40x. A) después de 3 días de cultivo en medio de esferoides; (B) después de 7 días en cultivo con medio de esferoides.

Por su parte, los esferoides formados por empaquetado celular por centrifugación (o *Botón*) (Figura 10) producen esferoides con una forma adecuada y también dependiendo de la densidad celular inicial se pueden obtener con un buen tamaño (entre 100 y 200 μm) desde el primer día. Si bien estos esferoides son fáciles de manipular, se obtiene una muy baja cantidad de ellos (solo 1 por tubo), por lo que su uso no es apropiado cuando se requiere la extracción de proteínas o ácidos nucleicos, por ejemplo. Sin embargo, esta técnica nos permitió determinar que la densidad celular óptima para obtener esferoides de tamaño y forma adecuados es de 1×10^5 células/mL que se empleó en las otras técnicas de producción de esferoides.

Otra desventaja de este método es el hecho de tener que incubar los esferoides en el tubo, con la tapa semicerrada, para permitir la entrada de los gases, lo que puede ocasionar la contaminación de los cultivos.

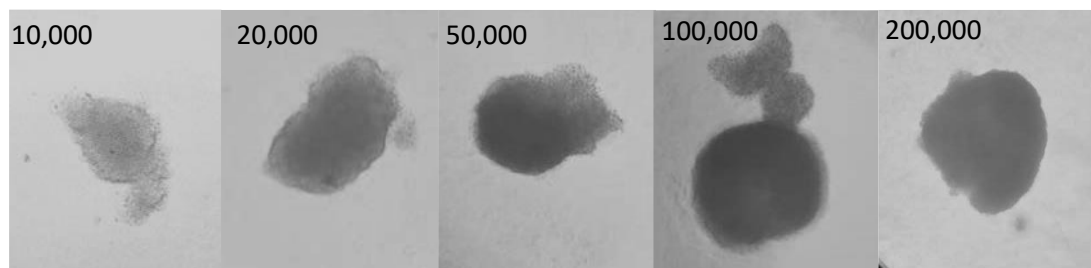


Figura 10. Esferoides obtenidos por empaquetado de células T98G mediante centrifugación de diferentes densidades celulares. Los esferoides se observaron en un microscopio óptico invertido, después de 24 h de haberse recuperado en una placa de 96 pozos con medio para esferoides. (Objetivo 40x).

Por su parte los esferoides obtenidos en cajas Petri recubiertas con agarosa al 1 % (Figura 11) muestran una forma no tan regular a los 3 días (Figura 11A) sin embargo a los 7 días (Figura 11B) estos ya presentan una forma más esférica y un tamaño más regular mayor a 200 μm , aunque ya se observa el núcleo necrótico en la mayoría de ellos. Con esta técnica se obtuvieron aproximadamente 30 esferoides por caja de 100 mm, los cuales son fáciles de manipular si se quisiera llevar a cabo estudios de caracterización, sin embargo, su observación al microscopio y la captura de imágenes se dificulta por la presencia de la capa de agarosa.

Una variación de esta técnica consistió en recubrir las cajas con poly-HEMA, con la cual los esferoides obtenidos tuvieron una forma esférica muy regular y un tamaño regular aproximado de 200 μm a los 7 días (B1) se obtuvo una gran cantidad de esferoides en una caja de 100 mm, y al ser sencilla su manipulación, se pudieron recuperar con facilidad para resembrar las células disgregadas de los esferoides en una segunda caja también tratada con poly-Hema (B2) Los esferoides crecieron rápidamente, conservando las características observadas con los esferoides previos al pase, y también pueden recuperarse fácilmente para su análisis.

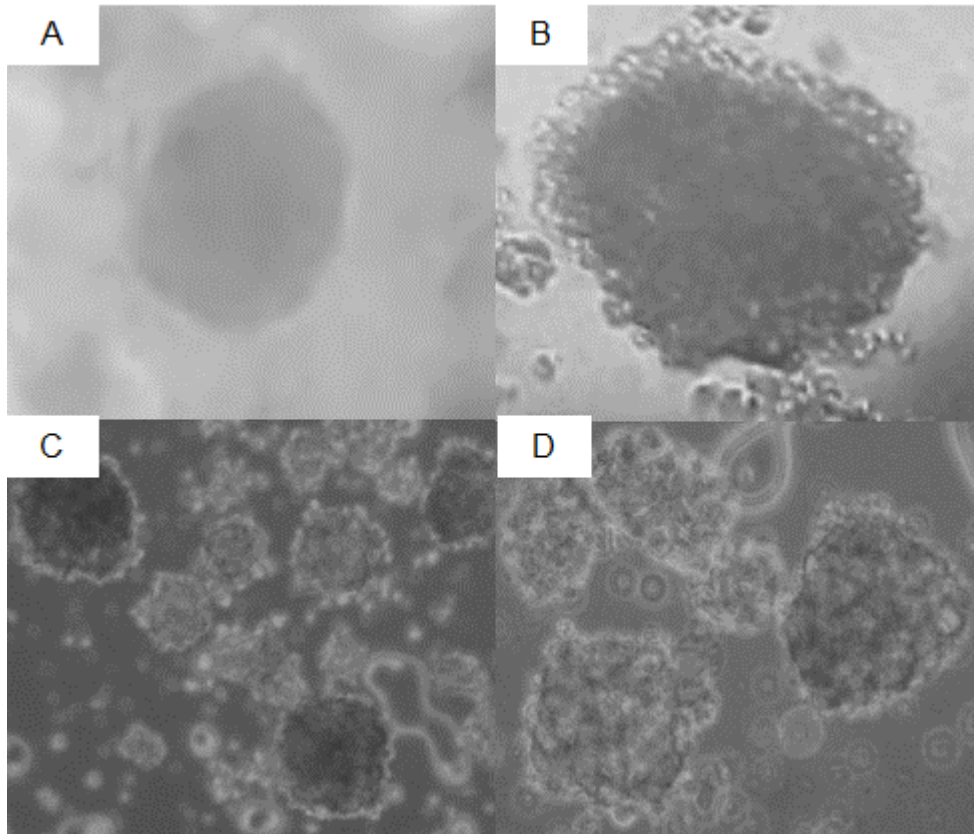


Figura 11. Esferoides obtenidos a partir de la línea celular T98G mediante la técnica de sembrado en caja recubierta con agarosa (A y B) o con poly-HEMA (C y D). Los esferoides se cultivaron en medio para esferoides durante 7 días y las imágenes se obtuvieron a los 3 días (A y C) o a los 7 días (B y D), en un microscopio óptico (aumento 40x).

Finalmente, con la técnica de sembrado en caja bacteriológica (Figura 12), se observó que las células rápidamente se agregan y los esferoides se observaron desde las primeras 24 h (Figura 12A). A los 3 días (Figura 12B) los esferoides muestran una forma completamente esférica y regular y aunque se observaron esferoides de diferentes tamaños, la gran mayoría se encontraban entre 100 y 200 μm , por lo que se les realizó un pase en este momento. Esta técnica brinda una buena cantidad de esferoides, ya que se pudo calcular que cuando se siembra una cantidad de 1×10^5 células/mL de medio, se obtienen más de 7,500 esferoides por caja. El pase se hizo mediante la disgregación de las células que forman los esferoides, las cuales se resembraron ya sea con medio libre de suero (Figura 12C) o con medio DMEM adicionado con suero fetal bovino (medio completo) (Figura 12D). En ambos casos, las células fueron capaces de formar

nuevamente esferoides, pero esta vez a una mayor velocidad y mostrando una forma esférica muy regular desde las primeras horas, rindiendo en promedio 7,500 esferoides por caja. Debido a la facilidad de obtención y manipulación, los esferoides obtenidos por este método fueron caracterizados por técnicas moleculares.

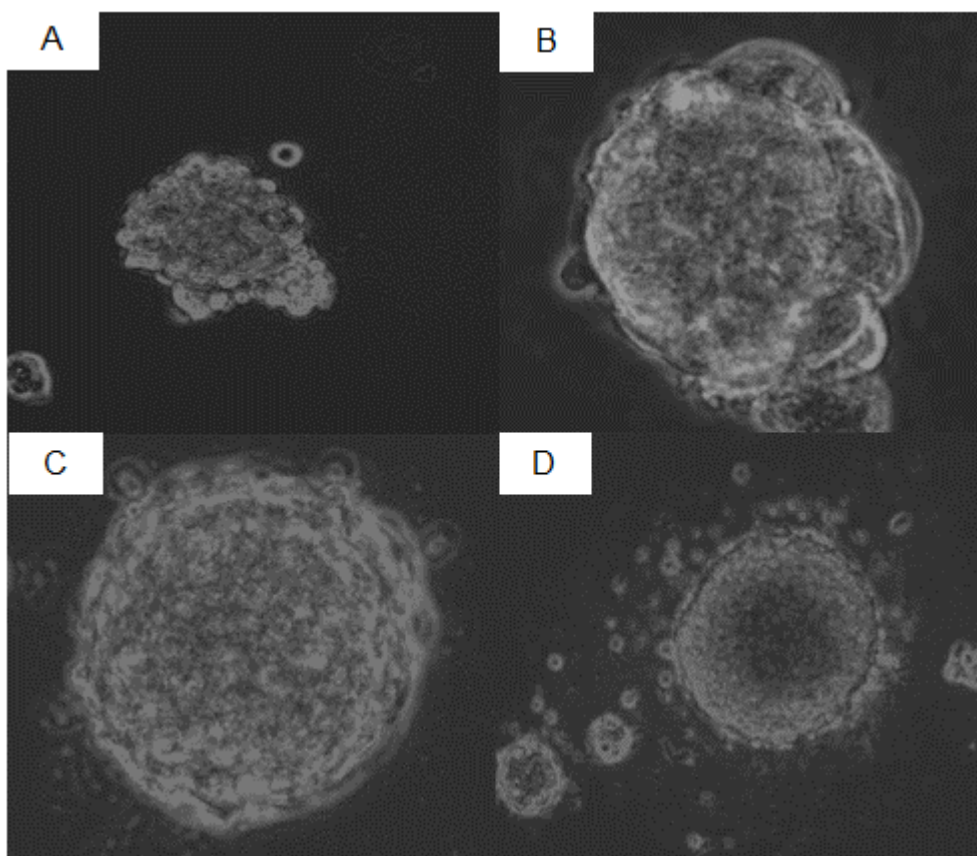


Figura 12. Esferoides obtenidos a partir de la línea celular T98G, empleando la técnica de sembrado en caja bacteriológica estéril. La suspensión de células se sembró en una caja Petri bacteriológica de 100 mm de diámetro y se observaron con un microscopio invertido 24 h (A) y 72 h (B) después. Los esferoides de 72 h se disgregaron manualmente y las células se sembraron ya sea en medio de esferoides (C) o en medio DMEM completo suplementado con suero KO (D). Imágenes representativas obtenidas en un microscopio invertido (Objetivo 40x).

Técnica	Medio utilizado	Características obtenidas
Gota colgante (Foty, 2011)	Medio completo	Esferoides de menor tamaño y forma, se obtienen pocos esferoides

	Medio DMEM/F12	Esferoides con morfología y tamaño más regular, formadas en menor tiempo
Sembrado en cajas de ultra baja adherencia (Culley et al., 2023)	Medio completo	Esferoides de buen tamaño (*), aunque no presentan una morfología regular
	Medio de esferoides	Esferoides pequeños, aunque con morfología regular y formados en menor tiempo
Empaquetado celular por centrifugación (Zanoni et al., 2016)	Medio completo	Esferoides de buen tamaño (*), forma no regular y se obtiene apenas 1 esferoide por microtubo
Cajas Petri recubiertas con agarosa (Rivera, 2017)	Medio de esferoides	Esferoides con morfología y tamaño regular, formados en menor tiempo, se obtiene gran cantidad de esferoides
Cajas Petri bacteriológicas	Medio suplementado con suero KO	Esferoides de buen tamaño (*), forma no regular, se obtienen muchos esferoides en poco tiempo
	Medio de esferoides	Esferoides con mejor tamaño (*), de morfología más regular y obtenidos en el menor tiempo, además de permitir pase de esferoides, por lo que se obtiene gran cantidad de esferoides
Cajas Petri recubiertas con poly-HEMA (Hong et al., 2012a)	Medio de esferoides	Esferoides con mejor tamaño, de morfología más regular y obtenidos en el menor tiempo, además de permitir pase de esferoides, permite obtener gran cantidad de esferoides

Tabla 4. Resultados obtenidos con diferentes técnicas de obtención de esferoides

(*) tamaño entre 100 y 200 micras.

3.1.2 Expresión de marcadores específicos de GSCs en los esferoides obtenidos por cultivo en cajas bacteriológicas

De los resultados anteriores se logró determinar que los mejores métodos para obtener los esferoides a partir de la línea celular T98G de glioma humano fueron el cultivo en cajas Petri bacteriológicas o en cajas Petri recubiertas con poly-HEMA. Sin embargo, debido a que el primer método utiliza cajas bacteriológicas más económicas que las de cultivo celular, y además no se emplea ningún otro

aditivo como el poly-HEMA o la agarosa, se ahorran varios pasos, además de reactivos, por lo que resulta mucho más económico, simple y rápido emplear cajas bacteriológicas. Adicionalmente, observamos que con las cajas bacteriológicas se acorta el tiempo en el que se obtienen esferoides, por lo que los esferoides obtenidos por este método se analizaron por dos métodos moleculares.

Para confirmar la presencia de GSCs en los esferoides obtenidos con el protocolo estandarizado antes descrito, se midieron los niveles de expresión de las proteínas, CD133, GFAP y NESTIN, las cuales son marcadores específicos de GSCs (Yamamuro et al., 2015). Los esferoides crecidos en una caja bacteriológica de 100 mm de diámetro se dividieron en dos partes cuando tuvieron 5 días en cultivo; una parte se empleó para realizar un pase de esferoides (P1) y la segunda para hacer una lisis celular para extraer proteínas. El mismo procedimiento se realizó en los esferoides P1. Los resultados se muestran en la Figura 13, en donde se observa que los controles GAPDH y GFAP se expresan tanto en cultivo en monocapa (2D) como en los esferoides, sin embargo, CD133 solo se expresa en las células crecidas como esferoides. Lo mismo ocurre con la expresión de NESTIN, que solo se observa en los esferoides, pero no en las células crecidas en monocapa (Figura 13 A).

En la Figura 13 B podemos observar los cambios en la expresión de las proteínas GFAP, CD133 y NESTIN en esferoides recuperados a los 5 días y esferoides recuperados 5 días después de un pase (P1) con respecto al cultivo de células en monocapa (Control 2D). Los resultados muestran que mientras que los niveles de GFAP se mantienen relativamente homogéneos en todos los casos, aunque disminuyen ligeramente en los esferoides P1, las proteínas CD133 y NESTIN se expresan solamente cuando las células se crecen como esferoides.

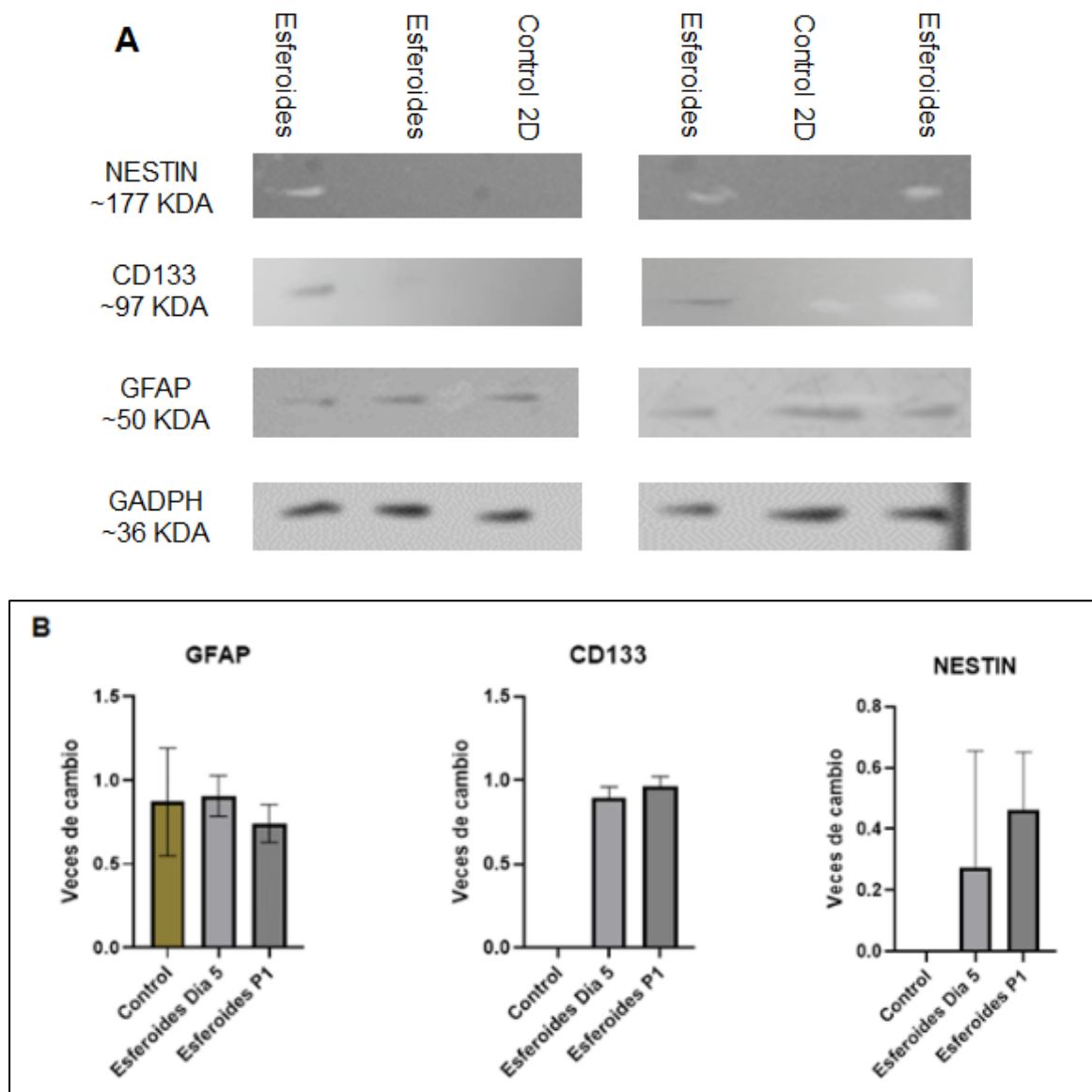


Figura 13. Análisis de la expresión de las proteínas CD133, NESTIN, GFAP por Western blot. (A) Se analizaron por duplicado 30 μ g de proteínas totales en geles de acrilamida al 10 %, que se transfirieron en membranas PVDF, y las imágenes se capturaron en fotodocumentador. Como control de carga se empleó la detección de la proteína GADPH, en células T98 crecidas en monocapa (control 2D) y en esferoides crecidos en medio DMEM completo (B) Análisis densitométrico comparando los niveles de expresión de las proteínas normalizadas con el control de carga (n=2).

Estos resultados demuestran que los esferoides obtenidos con nuestro protocolo contienen GCSC's, e interesantemente, parece que la población de éstas se enriquece con el pase, ya que los niveles de nestina se incrementan mientras que los de GFAP, un marcador de astrocitos diferenciados parece disminuir.

Para demostrar que con éste nuevo método de obtención de esferoides que estandarizamos pueden realizarse sin problemas este tipo de análisis convencionales, comparamos la factibilidad de analizar muestras de lisados proteicos a partir de los esferoides obtenidos por el método de la gota colgante y encajas de ultra baja adherencia. De inicio observamos que la cantidad de proteínas obtenidas no nos permite realizar un ensayo de Western blot, por lo que se optó por un análisis mediante Dot-blot con esferoides obtenidos por gota colgante y cultivo en placas de ultra baja adherencia (Figura 14). Los resultados demuestran que no es posible la detección de proteínas en estas muestras.

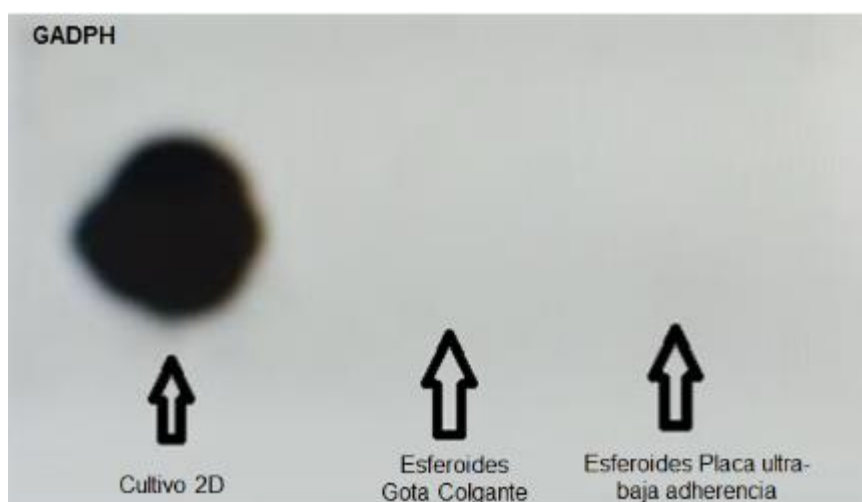


Figura 14. Ensayo dot blot realizado para las células T98 y esferoides obtenidos por la técnica de gota colgante y sembrado en placas de ultra baja adherencia.

Los resultados del Western blot se confirmaron empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta, tal y como puede observarse en la Figura 15, en donde los marcadores específicos de células madre de glioma, sólo se expresan en las células de los cultivos 3D, pero no en las células 2D. Por lo que respecta a GFAP, marcador del linaje de astrocitos y la proteína GADPH, se expresan en las células cultivadas tanto en monocapa (2D) como los esferoides obtenidos por sembrado en placa bacteriológica (3D)

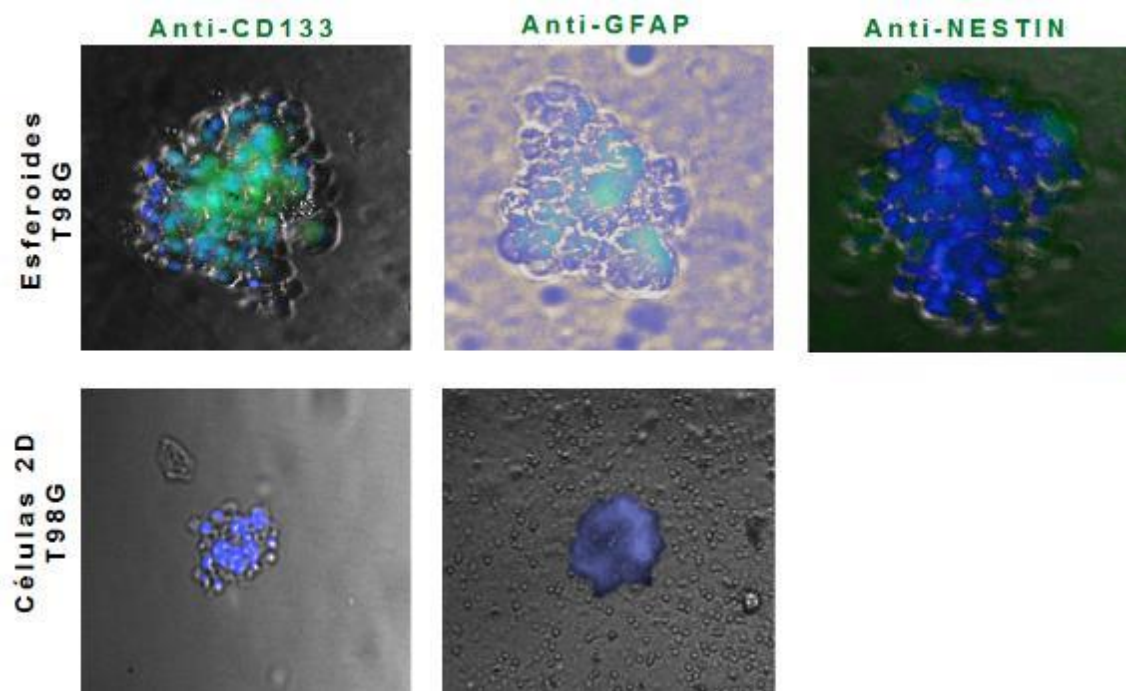


Figura 15. Imágenes representativas de esferoides inmunomarcados (verde) con anticuerpos contra (1) CD133, (2) GFAP y (3) NESTIN. Se utilizó DAPI (azul) para teñir los núcleos.

Así pudimos determinar que las condiciones adecuadas para obtener una gran cantidad de esferoides enriquecidos en GSCs son: 1) el cultivo en cajas bacteriológicas estériles de una suspensión celular de 5×10^5 células/mL, 2) Realmente no observamos diferencias importantes en el uso de medio especial para esferoides o medio DMEM completo, bajo estas condiciones, aunque con el medio de esferoides la morfología es más regular 3) a los 3-4 días del sembrado en las cajas bacteriológicas ya se alcanza un tamaño óptimo (mayor a $100 \mu\text{m}$ pero menor a $200 \mu\text{m}$), por lo que los esferoides pueden emplearse para su análisis, 4) los esferoides pueden disgregarse mecánicamente y las células disociadas que los componen pueden sembrarse en las mismas condiciones lo que parece enriquecer la población de GSCs.

3.2 Pruebas de reproducibilidad con otras líneas celulares

Con el fin de demostrar que el protocolo funciona con otras líneas celulares de glioma, se reprodujo el mismo, empleando esta vez las líneas celulares LN18 de glioma humano y C6 de glioma de rata.

En la Figura 16 se muestra una comparación del crecimiento de las células en monocapa que crecen adheridas a lo largo y ancho de la caja de cultivo (2D), con una forma alargada e irregular. Por el contrario, cuando las células se crecen siguiendo el protocolo que hemos estandarizado, las células rápidamente se aglomeran sin necesidad de centrifugar la suspensión celular en las cajas, formándose los esferoides desde el primer día de cultivo. Una observación importante, concierne al comportamiento de las células de glioma de rata C6 ya que a diferencia de las células en las líneas humanas T98G y LN18, las células de rata en un principio forman “colonias” de células adheridas a la caja bacteriológica, las cuales no son capaces de migrar, lo que hace que comiencen a crecer hacia el centro y después un aglomerado celular que al pasar los días (2 o 3) se desprende flotando en el medio, formándose así los esferoides, mientras que las células adheridas a la caja continúan ahí. Los esferoides flotantes fueron recuperados y sus células disgregadas, y puestas de nuevo en cultivo en condiciones 3D. Tanto las células disgregadas de los esferoides C6 como las de LN18 fueron capaces de volver a formar esferoides, por lo que es claro que los esferoides primarios contienen GSCs. Además, los esferoides formados a partir de las tres líneas celulares después del pase parecen ser más densos y compactos, es decir formados con un mayor número de células, además de que crecen con mayor rapidez y su morfología es más regular que los esferoides antes del pase, e incluso en los esferoides C6 ya no se observaron células adheridas a la caja, sino solamente esferoides flotantes, por lo que parece ser que nuestro método también es una manera de selección y enriquecimiento de GSCs.

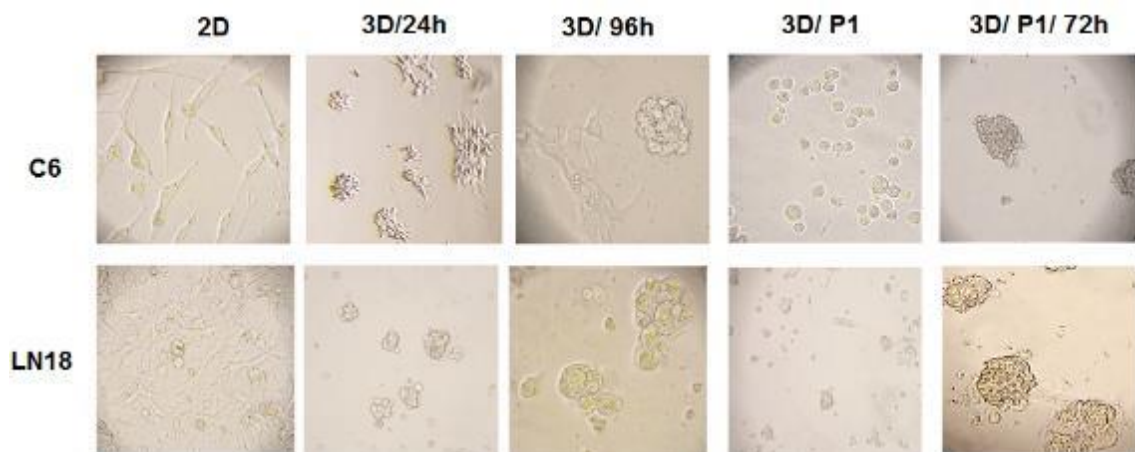


Figura 16. Formación de esferoides a partir de líneas celulares C6 (glioma de rata) y LN18 (glioma humano). Imágenes representativas obtenidas mediante un microscopio invertido (Objetivo 10X).

Adicionalmente, tres días después del pase de los esferoides C6 se recuperó una parte de estos para ser congelados y conservados en nitrógeno durante dos semanas. Posteriormente fueron descongelados y se pusieron de nuevo en cultivo en una caja bacteriológica y en medio DMEM sin suero adicionado con antibióticos y factores de crecimiento y suplemento B27. Como se observa en la Figura 17, los esferoides descongelados continuaron creciendo después de ponerse de nuevo en cultivo. Cinco días después se recuperaron (Figura 17C) y se lisaron para obtener extractos de proteínas totales, al igual que los de esferoides primarios cultivados durante 5 días (Figura 17A), esferoides secundarios obtenidos a partir de un primer pase (Figura 17B). El equivalente de 5 μ g de proteínas de cada uno de estos extractos se colocaron en una membrana de nitrocelulosa para incubarse en presencia del anticuerpo anti-CD133, para verificar la presencia de GSCs CD133+ (figura 17D).

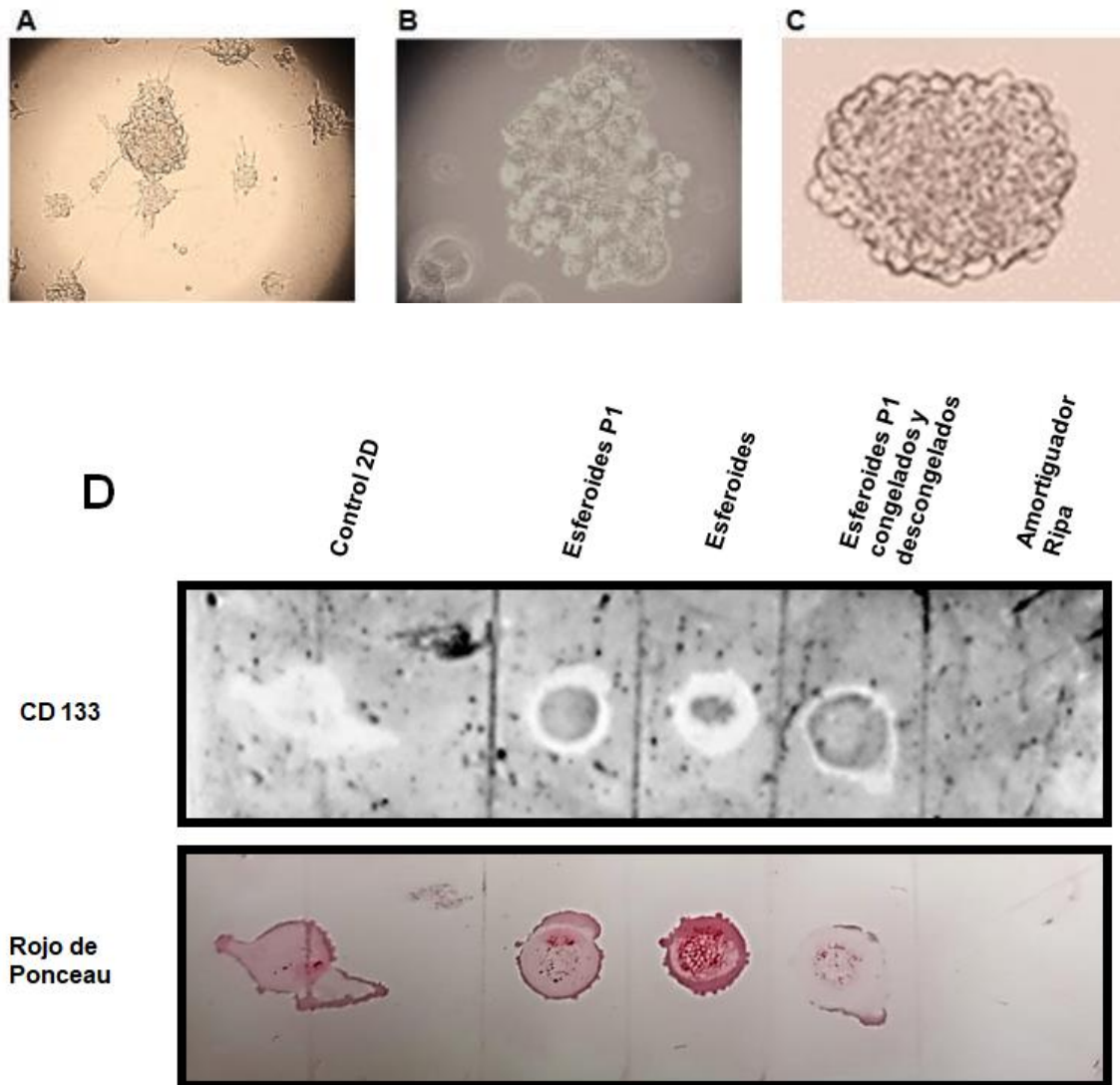


Figura 17. Análisis de la presencia de células CD133+ en los esferoides C6. (A) esferoides obtenidos a partir de un cultivo 2D. (B) Esferoides obtenidos a partir de esferoides C6 (pase 1), (C) esferoides C6 pase 1 después de almacenarse durante 2 semanas en nitrógeno y ponerse durante 5 días en cultivo después de su descongelación (3D/P1/C-DC). (D) Demostración por la técnica de Dot-blot que CD133 se expresa en todos los esferoides, pero no en las células C6 cultivadas en monocapa (2D).

Los resultados demuestran que CD133, se expresa fuertemente en los esferoides especialmente después del P1 y esto se acrecienta en los esferoides descongelados, indicando un enriquecimiento en GCSC's. Cabe destacar que

para este ensayo los esferoides se cultivaron en cajas bacteriológicas de 60mm, lo que dio un rendimiento de entre 0.2 y 1.64 mg/mL de proteínas totales, que fue suficiente para realizar el análisis por Dot-blot, confirmando que este método de producir GSCs puede emplearse como un método de alto rendimiento.

En cuanto a los esferoides LN18, éstos también expresaron marcadores de GSCs como se observa en la Figura 18. El análisis por la técnica de inmunofluorescencia mediante la cual se buscaron los marcadores específicos de GSCs, CD133, GFAP y NESTIN muestran que en comparación con los esferoides T98 (véase la Figura 15 también), mientras que CD133 se expresa fuertemente en ambos, GFAP y NESTIN se expresan poco en los esferoides T98, pero su expresión es muy fuerte en los esferoides derivados de la línea LN18, particularmente en la periferia en donde vemos que NESTIN es muy abundante.

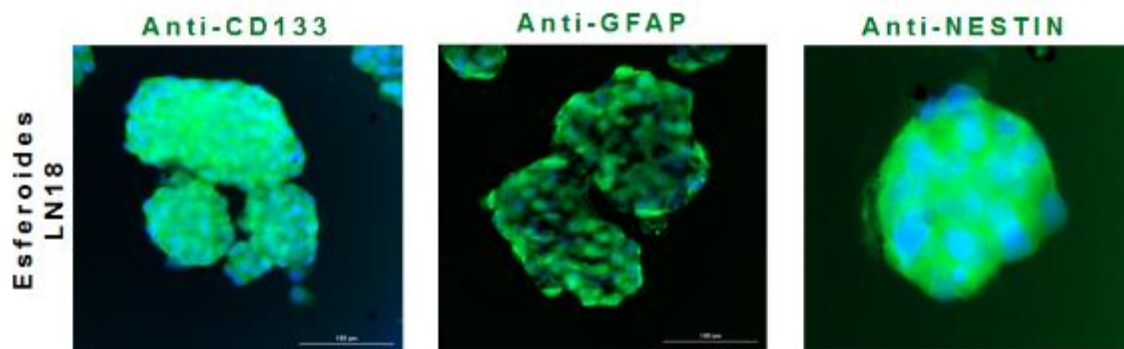


Figura 18. Imágenes representativas de esferoides inmunomarcados (verde) con anticuerpos contra (1) CD133, (2) GFAP y (3) NESTIN. Se utilizó DAPI (azul) para teñir los núcleos.

En su conjunto, todos estos resultados demuestran que se ha estandarizado un método sencillo, económico y de alto rendimiento, para la producción de esferoides ricos en GSCs a partir de líneas celulares de glioblastoma maligno.

4 DISCUSIÓN

En las últimas décadas se ha sugerido que una subpoblación de células cancerosas (CSCs) se comporta de manera similar a las células madre llevando a la heterogeneidad celular y crecimiento del tumor, contribuyendo a la resistencia al tratamiento con quimio- y radio- terapia, así como su recurrencia (Alcantara Llaguno & Parada, 2021).

A pesar de que terapias eficientes contra el cáncer logran eliminar la masa de células tumorales proliferativas, un conjunto remanente de CSCs logra sobrevivir promoviendo la reaparición del cáncer por su habilidad para establecerse con mayor invasividad y resistencia (Phi et al., 2018b). Por ello, las CSCs se han establecido como un nuevo objetivo en el tratamiento del cáncer. Los estudios encaminados a la búsqueda de nuevas terapias enfocadas en las CSCs ha determinado que el microambiente complejo 3D en el que se desarrollan juega un papel de suma importancia para su mantenimiento y proliferación; es por ello que los esferoides, es decir agregados celulares que recrean un tumor en una placa de cultivo, se han convertido en una herramienta biológica indispensable debido a su estructura 3D y su capacidad para replicar microambiente tumoral (Mehta et al., 2018).

Con la intención de estudiar más a fondo las CSCs y el impacto que pudieran tener potenciales fármacos, se han establecido múltiples protocolos para la generación de esferoides. Así, encontramos desde técnicas tan simples como la formación de gotas colgantes de una suspensión celular, el sembrado en placas tratadas con agarosa o poly-HEMA, el sembrado en cajas bacteriológicas, o cultivo en frascos rotatorios, hasta técnicas más complejas y costosas como formación por levitación magnética, uso de biorreactores, uso de hidrogeles para su cultivo o sistemas de micro fluido (Hoarau-Véchet et al., 2018).

Sin embargo, los esferoides siguen teniendo limitantes en cuanto la consecución resultados satisfactorios para el estudio de nuevas terapias; entre las más destacables se encuentra la dificultad para obtener esferoides con un

diámetro regular, además de que la forma de obtención es mediante protocolos de bajo rendimiento. (Białkowska et al., 2020). Varios estudios han determinado que la utilización de esferoides de diámetro entre 100 y 200 μm es importante pues se ha demostrado que bajo estas condiciones hay mejores gradientes de nutrientes y de oxígeno (permitiendo regiones hipóxicas y proliferativas) y evitándose así un centro necrótico muy grande, ya que la presencia de un mayor número de células necróticas influye en los mecanismos de evasión de la vigilancia inmune y promueve el desarrollo de tumores (Białkowska et al., 2020). El tamaño de los esferoides también muestra impacto en las variaciones físicas como las fuerzas celulares que juegan un rol importante en la formación y homeostasis del esferoide 3D (Lucio et al., 2017), además de los gradientes químicos.

Al realizar este trabajo, se llevó a cabo una revisión exhaustiva en la literatura lo que nos mostró que existe un gran número de protocolos reportados para la obtención de esferoides, particularmente de glioma. Con el objetivo de encontrar un método reproducible, de bajo costo y que pueda tener un alto rendimiento en la producción de esferoides para llevar a cabo análisis robustos, se compraron de estos diversos protocolos. En una primera instancia se observó que ciertos autores hacen uso del medio DMEM y otros del medio DMEM/F12.

La compañía Merck indica que el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium (MERCK), 2024) no es un medio completo por sí solo, ya que carece de nutrientes necesarios como proteínas, lípidos o factores de crecimiento. Por lo tanto, debe complementarse con otros componentes, como suero fetal bovino, aminoácidos y otros nutrientes para proporcionar un entorno de crecimiento completo y equilibrado a las células en cultivo. Por otro lado el medio DMEM/F12 es un medio mucho más complejo y completo por lo tanto puede utilizarse sin suero. Sin embargo, a pesar de no ser claro el porqué, se ha observado que esferoides crecidos con suero suelen mostrar un compartimiento más similar a células troncales, que el que se observa en los esferoides crecidos sin suero fetal bovino (Hong et al., 2012). En nuestra experiencia, los esferoides pudieron producirse con ambos tipos de medio, aunque muestran una mejor morfología (más regular) con el uso de medio

DMEM/F12 sin suero, con el cual también parecen formarse con mayor facilidad. Como sabemos, en comparación con los cultivos en monocapa, los esferoides cambian su interacción célula-célula, sobre todo porque las capas más internas del esferoide reciben una cantidad menor de nutrientes con respecto con las capas más externas. El suero en el medio puede brindar una mejor capacidad para que las células de las capas internas se transformen en células quiescentes o latentes, favoreciendo el comportamiento de células madre cancerosas (Hong et al., 2012). Aunque, en contraste, también se ha observado que el crecimiento de células en medio libre de suero impide el crecimiento de una mayor cantidad de células no neoplásicas y no diferenciadas, por lo que se favorece el crecimiento de células madre cancerosas cuando se cultivan esferoides o neuroesferas, que mimetizan con mayor acierto el comportamiento de las neuronales *in vivo*, presentando finalmente un mayor potencial de diferenciación y preservando el genotipo del tumor original (Hasselbach et al., 2014). Nosotros observamos que los esferoides crecidos tanto en presencia de suero, como sin éste expresan marcadores de GSCs (Figuras 12, 14, 16, 17), por lo que en el protocolo estandarizado en este trabajo se emplea medio DMEM sin suero, suplementado con B27, que es una mezcla de antioxidantes, vitaminas y otros compuestos que favorecen la proliferación de células neurales, y los factores de crecimiento FGF2 y EGF.

En esta tesis se reportan los resultados obtenidos con el cultivo de esferoides por diversas técnicas. Por ejemplo, Foty (Foty, 2011) reporta que con una combinación de la técnica de gota colgante, una técnica que se emplea con mucha frecuencia por su sencillez y practicidad es el cultivo rotatorio, se pueden obtener esferoides de manera simple y altamente costo/efectiva para ensayos bioquímicos y de pruebas de fármacos. Sin embargo, nosotros obtuvimos esferoides de un tamaño $<200 \mu\text{m}$ en un lapso de 7 días; y si bien por este método es fácil llevar la cuenta de los esferoides obtenidos ya que depende de la cantidad de gotas que se coloquen (aprox. 25 por tapa), cuando se les intentó poner en rotación en un matraz de fondo redondo para realizar tratamientos con fármacos, su manipulación no resultó sencilla, ya que se disgregan y no es posible agruparlos nuevamente, ni se puede aumentar la cantidad y tamaño de

los esferoides como lo describe Foty (Foty, 2011), por lo que su caracterización y análisis tampoco se pudo llevar cabo, dado que, como se muestra en la Figura 13, la obtención de proteínas totales fue tan pobre que no logró detectarse ni siquiera por el método de Dot blot que requiere menores concentraciones de proteínas que el Western blot. Sin embargo, interesantemente observamos que, si se cultivan los esferoides en placa y con medio libre de suero o suero KO (especial para cultivo de células madre), se obtienen esferoides de mejor calidad (de tamaño y forma más regular) que posteriormente pueden cultivarse en rotación en medio DMEM sin suero, a diferencia del artículo original que utiliza medio completo para el crecimiento de los esferoides.

Por su parte, con la técnica de obtención de esferoides por empaquetamiento celular por centrifugación se obtienen esferoides de buen tamaño (>200 μm) dependiendo de la cantidad de células iniciales, pero no el tamaño reportado por Zanoni de mayor a 500 μm (2016). Estos esferoides presentan una forma esférica desde los 3 días, pero se encontró que esta técnica muestra dos desventajas principales; la primera es que desde los primeros días se observó un gran núcleo muy necrosado que llegaba hasta la periferia, y la otra desventaja es la cantidad de esferoides obtenidos, pues queda restringido únicamente a un esferoide por tubo por lo que utilizar este método para análisis robustos es inviable. Sin embargo, tiene la ventaja de que al obtenerse un único esferoide por tubo, permite hacer un seguimiento puntual del esferoide mediante microscopía y a nosotros nos permitió utilizar esta técnica para establecer la densidad celular óptima para la obtención de esferoides en las otras técnicas, porque se observó que una densidad celular de 100,000 células/mL (aprox. 1×10^6 células por caja de 10 mL) brinda los esferoides con un mejor tamaño, una mejor forma esférica, en un menor tiempo y permitiendo la mejor heterogeneidad celular (respecto a otras densidades) por lo que esta densidad celular se estableció como ideal para los siguientes experimentos.

Otro de los métodos más frecuentemente empleados para la obtención de esferoides consiste en el crecimiento de éstos en fase líquida, lo que en inglés se conoce como *liquid overlay spheroids*. Como su nombre lo indica, este método se basa en la formación de esferoides mediante la inhibición del contacto con la superficie del contenedor del cultivo, para que éstos se

desarrollen en la fase líquida del cultivo (Jubelin et al., 2023). Para lograr esto, existen diversos métodos, entre los cuales los más populares son el empleo de cajas de cultivo recubiertas con materiales inertes, ya sea preparadas domésticamente o adquiridas comercialmente. En este último caso se encuentran las cajas conocidas como de ultra baja adherencia, como las que se emplearon en este trabajo. Siguiendo el protocolo de sembrado en placa de ultra baja retención, que se ha empleado ampliamente para obtener esferoides de glioma, obtuvimos esferoides de buena calidad en muy corto tiempo (3 días), sin embargo, encontramos que esta técnica requiere de equipo especializado, para los análisis de los resultados, como multilectores de placas o sistemas de adquisición y análisis de imágenes, que no siempre están disponibles en los laboratorios. Aunque Culley (Culley et al., 2023), describo que con este método se obtienen esferoides con mayores marcadores de troncalidad si se emplea el medio DMEM completo. Nosotros observamos que, al igual que con el método de la gota colgante, se obtienen esferoides de mejor calidad empleando el medio sin suero o suplementado con suero KO. Así, nuestros resultados muestran que, aunque es muy fácil obtener esferoides de características óptimas por este método, tiene los inconvenientes del alto costo de las cajas y el manejo difícil de los esferoides, por lo que frecuentemente se le emplea en cajas de formatos de 96 o 384 pozos, limitando su empleo para pruebas de viabilidad o de tinción de marcadores, lo que además requiere de equipos especiales como se mencionó.

Otras opciones para inhibir el contacto de las células con la superficie de las cajas o frascos de cultivo, son por ejemplo el recubrir las cajas de cultivo convencionales con materiales inertes con polímeros como agarosa o poly-HEMA. En este trabajo se compararon ambos métodos y encontramos que el método con agarosa es difícil de estandarizar, pues se requiere que la agarosa permanezca a una temperatura de 45-55 °C para evitar que solidifique antes de aplicarse a las cajas, lo que requiere introducir un baño María en la campana de flujo laminar. Además, si se lleva a cabo la preparación de varias cajas o varios pozos, se corre el riesgo de que la agarosa polimerice en la pipeta, o que se formen grumos, formando una superficie irregular, lo que podría explicar la forma tan irregular de los esferoides obtenidos por este método.

Adicionalmente, la capa de agarosa dificulta las observaciones al microscopio. Por su parte el recubrimiento con poly-HEMA es más homogéneo y transparente, por lo que los esferoides obtenidos mostraron mejores características morfológicas con respecto a los obtenidos en cajas recubiertas con agarosa. Ambos métodos tienen el inconveniente de requerir la preparación previa de agarosa o de poly-HEMA, además del tiempo que toma el recubrir las cajas y esperar a que puedan utilizarse (de 2 a 48 h, respectivamente). Además, se incrementa el costo y el tiempo para obtener los esferoides, al requerir los polímeros, así como pasos adicionales con respecto a las cajas de ultra baja adherencia.

Considerando que las placas de cultivo bacteriológicas están fabricadas con poliestireno que no se ha tratado para la adhesión de las células, en este trabajo, también se probaron como alternativa para la producción de esferoides. Aunque observamos que se requiere de un elevado número inicial de células (de 500 mil a 1 millón por mL de medio), para que puedan formarse los esferoides iniciales, éstos se forman rápidamente (en 24 h) tanto con el medio DMEM completo como con el medio DMEM/F12 suplementado con B27 y factores de crecimiento. El tamaño óptimo (100-200 μm) y forma adecuada (esférica o semiesférica en la mayoría de los casos) se alcanza en pocos días (3-4). Estos esferoides muestran heterogeneidad celular desde los 3 días que se mantiene hasta los 7 días, es decir que no muestran núcleos necróticos en este periodo, por lo que pueden ser fácilmente empleados en análisis preclínicos que requieran monitoreo con el paso de los días. Este tipo de cultivo resultó en numerosos esferoides de fácil manipulación lo que posibilitó la recuperación de la mayor parte de ellos. Una posible explicación para el comportamiento de las células en estas placas puede ser que a diferencia de las superficies inertes logradas con el recubrimiento con agarosa o poli-HEMA, la superficie hidrófoba de las cajas bacteriológicas fomenta la reagrupación de las células en suspensión en colonias sin necesidad de centrifugación, favoreciendo una forma más esférica y heterogénea.

Una de las propiedades de las GSCs, es la de poder reiniciar un tumor. Por ello, se realizó un pase de los primeros esferoides obtenidos con las cajas bacteriológicas, los cuales se disgregaron mecánicamente a fin de no dañarlos

con el uso de enzimas o influir en su biología. Una vez obtenidas las células que formaban los esferoides, se sembraron en las mismas condiciones, siendo capaces de volver a formar rápidamente esferoides, manteniendo sus características óptimas de buen tamaño y forma esférica, que incluso fue más regular en la mayoría de los esferoides formados, lo que implica que las células disgregadas de los primeros esferoides son en su mayoría GSC's, las cuales conservan sus propiedades de células iniciadoras de tumor (CIT) después del pase. Estos esferoides fueron capaces de continuar creciendo incluso aún después de haber sido criopreservados en nitrógeno líquido durante dos semanas, aunque sólo si el esferoide se conserva completo, ya que, si se disgregan las células y se cultivan en condiciones 3D después de congelación, no se forman de nuevo los esferoides, lo que parece indicar que, de esta manera, pierden sus características de CIT o su viabilidad, al menos en el caso de los esferoides C6.

En comparación, los esferoides obtenidos con la técnica de placas Petri recubiertas con agarosa que se reporta ampliamente en la literatura, si bien alcanzaron un tamaño adecuado (100-200 μm), no lograron tener una forma esférica regular, aunque al igual que los esferoides obtenidos con caja bacteriológica estos son de fácil manipulación, pero su recuperación es un poco difícil, ya que muchos de ellos quedan adheridos a la agarosa, especialmente cuando hay partes no uniformes, lo que disminuye la cantidad de proteína para llevar a cabo el análisis de Western blot, y para la tinción para análisis de inmunofluorescencia. Los esferoides obtenidos por esta técnica mostraron una heterogeneidad celular contrario a la que se observa en el trabajo presentado por Rivera (2017), aunque esto también puede deberse a las diferentes densidades celulares cultivadas, pues nuestra técnica emplea el doble de células utilizados por ese trabajo.

Así, de acuerdo a nuestros resultados, los cultivos en cajas bacteriológicas seguidos del cultivo en cajas de cultivo celular tratadas con poly-HEMA fueron los que funcionaron mejor para obtener un número suficiente de esferoides, ya sea para emplearse en un pase sucesivo, o para estudios convencionales de determinación de proteínas o para inmunofluorescencia, ya que los esferoides se forman rápidamente con forma y tamaño óptimo, se pueden recuperar

fácilmente, y subcultivarse en cajas de 100 mm, 60 mm, o en cajas de pozos o en microcámaras para inmunofluorescencia, lo que facilita tanto su manejo para pruebas con fármacos, así como para la recolección de datos y su análisis. Sin embargo, el cultivo en cajas bacteriológicas resultó tener la mejor relación costo/beneficio, además que a diferencia de los esferoides cultivados en cajas tratadas con poly-HEMA, que tardan hasta 3 días en formarse, los esferoides en cajas bacteriológicas se forman en sólo 1 día, lo que también reduce el tiempo y el medio que se requiere para obtenerlos. En este sentido, Alimperti, et al (2014) menciona que el costo asociado al uso constante de suero suele bloquear el avance cuando se requiere de realizar estudios terapéuticos en una escala comercial y por tanto es crítico obtener un medio libre de suero para el cultivo de esferoides a gran escala. Pero no solo el costo se ve beneficiado en el uso de un medio libre de suero, pues dichos autores (Alimperti et al., 2014) también refieren que el uso de suero puede traer consigo varios problemas, como la contaminación con agentes adventicios, la posible presencia de inhibidores de crecimiento o moléculas citotóxicas que interfieran con el uso preclínico de las células. Por tanto, nuestro protocolo también ayuda a reducir los recursos necesarios para llevar a cabo esta técnica, y evitar otras cuestiones inherentes al uso de suero en los cultivos.

En este trabajo, también quedó demostrado que es posible obtener numerosos esferoides ricos en GSCs, a partir de células C6 de rata y LN18 de glioma humano empleando el protocolo de crecimiento en placa bacteriológica y medio de cultivo DMEM sin suero que se estandarizó con células T98G. Interesantemente, se observó un comportamiento en las células C6 diferente al observado en las células T98 y LN18, pues en un inicio las células parecen insistir en formar una monocapa, manteniéndose adheridas a la superficie de la caja bacteriológica, sin embargo, ante la imposibilidad de migrar sobre la superficie de la caja, las células forman “colonias” que comienzan a crecer hacia arriba, formándose así esferoides que se mantienen unidos a la “colonia” adherida a la superficie. Al paso de los días, esta acumulación celular 3D se desprende, mientras que las células adheridas permanecen inmóviles en la superficie de la caja, lo que parece simular el proceso de metástasis. Cuando estos esferoides se disgregan y se resiembran en condiciones 3D, las células

pierden la capacidad de adherirse a la caja y forman solamente esferoides flotantes desde el primer día, lo que podría estar relacionado con una menor diferenciación y malignidad, que son las características de GSCs. También se ha reportado que las GSCs son las responsables de migrar a otros sitios del cerebro, formando nuevos focos cancerosos (Ortensi et al., 2013), por lo que es posible que el método que hemos estandarizado seleccione específicamente a las GSCs. Esto explicaría los resultados que muestran la tendencia que tienen los esferoides formados después del pase en aumentar los niveles de CD133 y NESTIN, los cuales son indicadores de estas dos características (Yamamuro et al., 2015). También parece que el pase de esferoides enriquece la población de GSCs en las líneas T98 y LN18, sin embargo, se requieren de mayores estudios para confirmarlo.

Debido a que el método de cultivo que se estandarizó en este trabajo resultó eficiente cuando se cultivaron tres líneas celulares diferentes, éste protocolo también podría ser de utilidad en medicina de precisión, la cual es una de las principales aplicaciones actuales de los esferoides que busca personalizar los tratamientos en los pacientes (Hofmann et al., 2022), si se emplea para la obtención de esferoides a partir tejido de gliomas humanos primarios.

5 CONCLUSIONES

Actualmente se reconoce que la resistencia del glioblastoma multiforme a los tratamientos convencionales como la radio- y quimio- terapia se debe en gran parte a la presencia de GSCs esto por ser críticas en la iniciación, mantenimiento y progresión del cáncer, lo cual ha llevado a la búsqueda de nuevos enfoques en el desarrollo de terapias para el tratamiento eficaz del GBM. Así, los nuevos tratamientos deben estar encaminados a la eliminación eficaz de las GSC's, por lo que actualmente existe la tendencia a privilegiar los cultivos 3D para la obtención de estas, los cuales presentan una serie de múltiples ventajas como, por ejemplo, tener una mejor capacidad para predecir el comportamiento de nuevos compuestos. Sin embargo, su actual popularidad ha provocado que contemos con una gran cantidad de protocolos para la obtención de esferoides, lo que puede ocasionar dificultad en la selección de

las mejores opciones y poco rigor en la interpretación de resultados, independientemente de que no todas las técnicas están disponibles para cualquier laboratorio.

En este trabajo se estandarizó un protocolo relativamente simple, económico, y factible para obtener cultivos enriquecidos en GSCs, con una muy buena relación costo/beneficio y que también requiere de un menor tiempo para la obtención de esferoides, que consiste en la obtención de esferoides por sembrado en caja bacteriológica estéril en medio para esferoides. Así, este nuevo protocolo parece ser adecuado como una plataforma para la realización de estudios preclínicos, en los que además de citotoxicidad, se requiera de la caracterización de los mecanismos moleculares de nuevas moléculas mediante métodos robustos como Western blot, PCR en tiempo real o citometría de flujo, entre otros.

7. PERSPECTIVAS

Es necesario recordar que las GSCs son actualmente los objetivos sobre los cuales se debe investigar si se quiere suplir o potenciar la actividad de terapias convencionales como quimio- y radio- terapia. Con el protocolo que aquí presentamos, parece ser posible llevar a cabo ensayos que permitan evaluar la actividad biológica de nuevos compuestos en la búsqueda de terapias eficaces en el tratamiento del GBM estableciendo a los GSCs como objetivo de estos compuestos. Sin embargo, sería conveniente caracterizar con mayor profundidad estos esferoides con otras técnicas como citometría de flujo, por ejemplo, para analizar un mayor número de marcadores de GSCs, además de conocer el porcentaje de estas células en los cultivos, y tener un análisis más preciso sobre las células vivas y muertas presentes, para así poder determinar el balance entre células quiescentes y necróticas. Pero, por el momento, aquí en este trabajo se han sentado las bases de un protocolo que parece tener una buena relación costo/beneficio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2D vs 3D cell culture | Learning Center | UPM Biomedicals. (2018).
<https://www.upmbiomedicals.com/resource-center/learning-center/what-is-3d-cell-culture/2d-versus-3d-cell-culture/>
- Ahmad, K., Lim, J. H., Lee, E. J., Chun, H. J., Ali, S., Ahmad, S. S., Shaikh, S. & Choi, I. (2021). Extracellular matrix and production of cultured meat. *Foods*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/FOODS10123116>
- Alcantara Llaguno, S. & Parada, L. F. (2021). Cancer stem cells in gliomas: Evolving concepts and therapeutic implications. *Current Opinion in Neurology*, 34(6), 868. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000994>
- Alimperti, S., Lei, P., Wen, Y., Tian, J., Campbell, A. M. & Andreadis, S. T. (2014). Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. *Biotechnology Progress*, 30(4), 974–983. <https://doi.org/10.1002/BTPR.1904>
- Alves, A. L. V., Gomes, I. N. F., Carloni, A. C., Rosa, M. N., da Silva, L. S., Evangelista, A. F., Reis, R. M. & Silva, V. A. O. (2021a). Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives. *Stem Cell Research & Therapy* 2021 12:1, 12(1), 1–22.
<https://doi.org/10.1186/S13287-021-02231-X>
- Amoêdo, N. D., Valencia, J. P., Rodrigues, M. F., Galina, A. & Rumjanek, F. D. (2013). How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells. *Bioscience Reports*, 33(6), 865–873.
<https://doi.org/10.1042/BSR20130066>
- Arenas, G. (2020). *Al año, diagnostican 300 mil nuevos casos de tumores cerebrales en el mundo*.
https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2020_580.html
- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T. & Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell*

Communication and Signaling 2020 18:1, 18(1), 1–19.

<https://doi.org/10.1186/S12964-020-0530-4>

Belfiore, L., Aghaei, B., Law, A. M. K., Dobrowolski, J. C., Raftery, L. J., Tjandra, A. D., Yee, C., Piloni, A., Volkerling, A., Ferris, C. J. & Engel, M. (2021). Generation and analysis of 3D cell culture models for drug discovery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 163.

<https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2021.105876>

Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M. & Miłowska, K. (2020a).

Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures-examples of methods of preparation and the most important application. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–17.

<https://doi.org/10.3390/IJMS21176225>

Bokhari, M., Carnachan, R. J., Cameron, N. R. & Przyborski, S. A. (2007).

Culture of HepG2 liver cells on three-dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *Journal of Anatomy*, 211(4), 567–576. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7580.2007.00778.X>

Brancato, V., Oliveira, J. M., Correlo, V. M., Reis, R. L. & Kundu, S. C. (2019).

Could 3D models of cancer enhance drug screening? *Biomaterials*, 232.

<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2019.119744>

Bruschini, S., Ciliberto, G. & Mancini, R. (2020). The emerging role of cancer

cell plasticity and cell-cycle quiescence in immune escape. *Cell Death & Disease* 2020 11:6, 11(6), 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2669-8>

Campuzano, S. & Pelling, A. E. (2019). Scaffolds for 3D cell culture and cellular agriculture applications derived from non-animal sources. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 436742.

<https://doi.org/10.3389/FSUFS.2019.00038/BIBTEX>

Castañeda, C. A., Casavilca, S., Orrego, E., García-Corrochano, P., Deza, P., Heinike, H., Castillo, M., Belmar-Lopez, C. & Ojeda, L. (2015).

Glioblastoma: molecular analysis and its clinical implications. *Revista*

Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 32(2), 316–325.

<https://doi.org/10.17843/RPMESP.2015.322.1627>

Celis, M. Á., Alegría-Loyola, M. A., González-Aguilar, A., Martínez-Tlahuel, J., Green-Renner, D., Reyes-Soto, G., Arellano-Reynoso, A., Flores-Castro, J. M., Moreno-Jiménez, S., Poitevin-Chacón, M. A., Cacho-Díaz, B., Olvera-Manzanilla, E., Díaz-Victoria, A. R., Aguilar-Castañeda, E., Granados-García, M., Rodríguez-Orozco, J., Herrera-Goepfert, R. & Álvarez-Avitia, M. Á. (2015a). Primer consenso mexicano sobre recomendaciones de la atención multidisciplinaria del paciente con glioblastoma multiforme (GBM). Grupo Interdisciplinario Mexicano de Investigación en Neurooncología (GIMINO). *Gaceta Médica de México*, 151(3), 403–415.
www.anmm.org.mx

Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., Promjantuek, W., Rujanapun, N., Heebkaew, N., Soraksa, N. & Noisa, P. (2020). Transcriptomic profiling of 3d glioblastoma tumoroids for the identification of mechanisms involved in anticancer drug resistance. *In Vivo (Athens, Greece)*, 34(1), 199–211.
<https://doi.org/10.21873/INVIVO.11762>

Culley, J., Nagle, P. W., Dawson, J. C. & Carragher, N. O. (2023). Patient derived glioma stem cell spheroid reporter assays for live cell high content analysis. *SLAS Discovery*, 28(2), 13–19.
<https://doi.org/10.1016/J.SLASD.2022.09.002>

Da Ros, M., De Gregorio, V., Iorio, A. L., Giunti, L., Guidi, M., de Martino, M., Genitori, L. & Sardi, I. (2018). Glioblastoma chemoresistance: the double play by microenvironment and blood-brain barrier. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS19102879>

Damgaci, S., Ibrahim-Hashim, A., Enriquez-Navas, P. M., Pilon-Thomas, S., Guvenis, A. & Gillies, R. J. (2018). Hypoxia and acidosis: immune suppressors and therapeutic targets. *Immunology*, 154(3), 354–362.
<https://doi.org/10.1111/IMM.12917>

- De Berardinis, R. J. & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5). Pag.1
<https://doi.org/10.1126/SCIADV.1600200>
- Definición de línea celular de cultivo - Diccionario de cáncer del NCI - NCI.* (n.d.). Retrieved January 23, 2024, from
<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/linea-celular-de-cultivo>
- Delgado-López, P. D. & Corrales-García, E. M. (2016). Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clinical and Translational Oncology*, 18(11), 1062–1071. <https://doi.org/10.1007/S12094-016-1497-X/METRICS>
- Domènech, M., Hernández, A., Plaja, A., Martínez-balibrea, E. & Balañà, C. (2021). Hypoxia: The cornerstone of glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/IJMS222212608>
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).* (n.d.). Retrieved January 23, 2024, from <https://www.sigmaaldrich.com/MX/en/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-media-and-buffers/classical-media-and-buffers/dulbeccos-modified-eagle-medium>
- Foty, R. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 51. <https://doi.org/10.3791/2720>
- Franco-Hernández, C., Martínez-Glez, V. & Rey, J. A. (2007). Biology molecular of glioblastomas. *Neurocirugía*, 18(5), 373–382. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-14732007000500001&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Ghosh, D., Nandi, S. & Bhattacharjee, S. (2018). Combination therapy to checkmate glioblastoma: clinical challenges and advances. *Clinical and Translational Medicine*, 7(1), e33. <https://doi.org/10.1186/S40169-018-0211-8>

- Glumac, P. M. & LeBeau, A. M. (2018). The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clinical and Translational Medicine*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/S40169-018-0198-1>
- González Trujillo, F., Castro Noriega, C., Castro Ramírez, O. J., Olaya, N., Penagos González, P. J., Zubieta Vega, C. & Melo Gómez, G. (2014). Glioblastoma multiforme: actualidad en marcadores biomoleculares como factores de pronóstico a propósito de una serie de casos con sobrevivencia mayor a 2 años en el Instituto Nacional de Cancerología. INC- Colombia. *Acta Neurológica Colombiana*, 30(4), 282–289.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87482014000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Gould, J. (2018). Breaking down the epidemiology of brain cancer. *Nature*, 561(7724), S40–S41. <https://doi.org/10.1038/D41586-018-06704-7>
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M. & Simjee, S. U. (2017). Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 18(1), 3. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
- Hasselbach, L. A., Irtenkauf, S. M., Lemke, N. W., Nelson, K. K., Berezovsky, A. D., Carlton, E. T., Transou, A. D., Mikkelsen, T. & deCarvalho, A. C. (2014). Optimization of high grade glioma cell culture from surgical specimens for use in clinically relevant animal models and 3d immunochemistry. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 83, 51088.
<https://doi.org/10.3791/51088>
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1160809>
- Hermida Pérez, J., Hernández Guerra, J., Bermejo Hernández, A., Sobenes Gutiérrez, R. J. & Jimenez Vila, B. (2013). Carcinoma infiltrante de mama y glioblastoma multiforme cerebral: dos tumores un mismo paciente. *Medicina General, ISSN-e 0214-8986, Vol. 2, Nº. 9, 2013, Págs. 268-271*, 2(9), 268–271. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6339971>

- Hoarau-Véchet, J., Rafii, A., Touboul, C. & Pasquier, J. (2018a). Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS19010181>
- Hofmann, S., Cohen-Harazi, R., Maizels, Y. & Koman, I. (2022). Patient-derived tumor spheroid cultures as a promising tool to assist personalized therapeutic decisions in breast cancer. *Translational Cancer Research*, 11(1), 134–147. <https://doi.org/10.21037/TCR-21-1577/COIF>
- Hong, X., Chedid, K. & Kalkanis, S. N. (2012a). Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. *International Journal of Oncology*, 41(5), 1693–1700. <https://doi.org/10.3892/IJO.2012.1592>
- Huang, H., Ding, Y., Sun, X. S. & Nguyen, T. A. (2013). Peptide hydrogelation and cell encapsulation for 3D culture of MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0059482>
- Ichikawa, T., Otani, Y., Kurozumi, K. & Date, I. (2016). Phenotypic transition as a survival strategy of glioma. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 56(7), 387–395. <https://doi.org/10.2176/NMC.RA.2016-0077>
- Jakacki, R. (2015). *Ependymoma*. www.abta.org.
- Jäkel, S. & Dimou, L. (2017). Glial cells and their function in the adult brain: a journey through the history of their ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2017.00024>
- Jensen, S. S., Meyer, M., Petterson, S. A., Halle, B., Rosager, A. M., Aaberg-Jessen, C., Thomassen, M., Burton, M., Kruse, T. A. & Kristensen, B. W. (2016). Establishment and characterization of a tumor stem cell-based glioblastoma invasion model. *PLoS One*, 11(7), e0159746. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0159746>
- Joseph, J. S., Malindisa, S. T., Ntwasa, M., Joseph, J. S., Malindisa, S. T. & Ntwasa, M. (2018). Two-dimensional (2d) and three-dimensional (3d) cell culturing in drug discovery. *Cell Culture*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.81552>

- Jubelin, C., Muñoz-García, J., Cochonneau, D., Ollivier, E., Vallette, F., Heymann, M. F., Oliver, L. & Heymann, D. (2023). Technical report: liquid overlay technique allows the generation of homogeneous osteosarcoma, glioblastoma, lung and prostate adenocarcinoma spheroids that can be used for drug cytotoxicity measurements. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1260049.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2023.1260049/BIBTEX>
- Kapalczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł. & Lamperska, K. (2018a). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science : AMS*, 14(4), 910–919.
<https://doi.org/10.5114/AOMS.2016.63743>
- Langhans, S. A. (2018). Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JAN), 334617. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00006/BIBTEX>
- Lenting, K., Verhaak, R., ter Laan, M., Wesseling, P. & Leenders, W. (2017). Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 263–282. <https://doi.org/10.1007/S00401-017-1671-4>
- Li, N. T., L. Co, I., Landon-Brace, N., Latour, S. & McGuigan, A. P. (2020). Tissue-engineered 3D cancer microenvironment for screening therapeutics. *Biomaterials for 3D Tumor Modeling*, 453–479.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818128-7.00019-8>
- Li, Z. & Cui, Z. (2014). Three-dimensional perfused cell culture. *Biotechnology Advances*, 32(2), 243–254.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2013.10.006>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P. & Ellison, D. W. (2016). The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/S00401-016-1545-1>

- Lucio, A. A., Mongera, A., Shelton, E., Chen, R., Doyle, A. M. & Campàs, O. (2017a). Spatiotemporal variation of endogenous cell-generated stresses within 3D multicellular spheroids. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12363-x>
- Mattei, V., Santilli, F., Martellucci, S., Monache, S. D., Fabrizi, J., Colapietro, A., Angelucci, A. & Festuccia, C. (2021). The importance of tumor stem cells in glioblastoma resistance to therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS22083863>
- Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)*. (n.d.). Retrieved October 30, 2023, from <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-media-and-buffers/classical-media-and-buffers/dulbeccos-modified-eagle-medium>
- Mehta, P., Novak, C., Raghavan, S., Ward, M. & Mehta, G. (2018). Self-renewal and cscs *in vitro* enrichment: growth as floating spheres. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1692, 61. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_6
- Mesfin, F. B. & Al-Dhahir, M. A. (2023). Gliomas. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441874/>
- Mohandas, S., Gayatri, V., Kumaran, K., Gopinath, V., Paulmurugan, R. & Ramkumar, K. M. (2023). New frontiers in three-dimensional culture platforms to improve diabetes research. *Pharmaceutics* 2023, Vol. 15, Page 725, 15(3), 725. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15030725>
- Nacional De Salud, I., Davelois, P., Escalante, K. ; & Jara, H. ; (2016). Rendimiento diagnóstico del Western blot para detectar simultaneamente anticuerpos en pacientes con cisticercosis, hidatidosis y fascioliasis humana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33(4), 616–624. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.334.2543>
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schüler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C., Baeza, N., Pisani, P., Yonekawa, Y., Yasargil, M. G., Lütolf, U. M. & Kleihues, P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study.

Cancer Research, 64(19), 6892–6899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1337>

- Okuma, C. and Fernández, R. (2017a) 'Evaluación de gliomas por técnicas avanzadas de Resonancia Magnética', *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(3), pp. 360–377. doi:10.1016/j.rmclc.2017.05.005.
- Ortensi, B., Setti, M., Osti, D. & Pelicci, G. (2013). Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/SCRT166/TABLES/1>
- Phi, L. T. H., Sari, I. N., Yang, Y. G., Lee, S. H., Jun, N., Kim, K. S., Lee, Y. K. & Kwon, H. Y. (2018a). Cancer Stem Cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. *Stem Cells International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5416923>
- Phuphanich, S. (2017). *Glioblastoma and Malignant Astrocytoma*. <https://www.abta.org/wp-content/uploads/2018/03/glioblastoma-brochure.pdf>
- Pinto-Almazán, R. (n.d.). *Western blot*. Retrieved December 18, 2023, from https://www.academia.edu/4353202/Western_blot
- Quereda, V., Hou, S., Madoux, F., Scampavia, L., Spicer, T. P. & Duckett, D. (2018). A Cytotoxic three-dimensional-spheroid, high-throughput assay using patient-derived glioma stem cells. *SLAS Discovery : Advancing Life Sciences R & D*, 23(8), 842–849. <https://doi.org/10.1177/2472555218775055>
- Razi, S., Haghparsat, A., Chodari Khameneh, S., Ebrahimi Sadrabadi, A., Aziziyan, F., Bakhtiyari, M., Nabi-Afjadi, M., Tarhriz, V., Jalili, A. & Zalpoor, H. (2023). The role of tumor microenvironment on cancer stem cell fate in solid tumors. *Cell Communication and Signaling 2023 21:1*, 21(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/S12964-023-01129-W>
- Reyes-Haro, D., Bulavina, L., Pivneva N T. & Glía, L. (2014). *I2 ciencia • abril-junio de 2014*. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/Red_Glia.pdf

- Rivera, C. (2017). Agarose floor technique: a simple scaffold-free method for 3D cell culture and multicellular tumor spheroids formation. *BioRxiv*, 130260. <https://doi.org/10.1101/130260>
- Ross, A. (2012). *Glioblastoma y astrocitoma maligno*. www.abta.org.
- Ryan, J. A. (2008). Introduction to Animal Cell Culture. *Corning Incorporated*. <https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-AN-042.pdf>
- Sant, S. & Johnston, P. A. (2017). The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies*, 23, 27–36. <https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2017.03.002>
- Segeritz, C. P. & Vallier, L. (2017). Cell culture: growing cells as model systems *in vitro*. *basic science methods for clinical researchers*, 151. 51-52 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
- Singh, S. K., Abbas, S., Saxena, A. K., Tiwari, S., Sharma, L. K. & Tiwari, M. (2020). Critical role of three-dimensional tumorsphere size on experimental outcome. *BioTechniques*, 69(5), 333–338. <https://doi.org/10.2144/BTN-2020-0081/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE3.JPEG>
- Sinning, M. (2017). Clasificación de los tumores cerebrales. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(3), 339–342. <https://doi.org/10.1016/J.RMCLC.2017.05.002>
- Strickland, M. & Stoll, E. A. (2017). Metabolic reprogramming in glioma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5,3-4 <https://doi.org/10.3389/FCELL.2017.00043>
- Tang, X., Zuo, C., Fang, P., Liu, G., Qiu, Y., Huang, Y. & Tang, R. (2021). Targeting glioblastoma stem cells: a review on biomarkers, signal pathways and targeted therapy. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FONC.2021.701291>
- Vidovic, D., Davila, R. A., Gronostajski, R. M., Harvey, T. J. & Piper, M. (2018). Transcriptional regulation of ependymal cell maturation within the postnatal

brain. *Neural Development*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13064-018-0099-4>

Wanigasekara, J., Carroll, L. J., Cullen, P. J., Tiwari, B. & Curtin, J. F. (2023a). Three-Dimensional (3D) *in vitro* cell culture protocols to enhance glioblastoma research. *PLOS ONE*, 18(2).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0276248>

Waterborg, J. H. (2009). The lowry method for protein quantitation. 7–10.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_2

Yamada, K. M. & Cukierman, E. (2007). Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*, 130(4), 601–610.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.08.006>

Yamamuro, S., Okamoto, Y., Sano, E., Ochiai, Y., Ogino, A., Ohta, T., Hara, H., Ueda, T., Nakayama, T., Yoshino, A. & Katayama, Y. (2015). Characterization of glioma stem-like cells from human glioblastomas. *International Journal of Oncology*, 47(1), 91.
<https://doi.org/10.3892/IJO.2015.2992>

Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A. & Tesei, A. (2016). 3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports*, 6.
<https://doi.org/10.1038/SREP19103>

APÉNDICE 1

Soluciones y materiales.

PBS 10x

- NaCl 80 g
- KCl 2 g
- Na₂HPO₄ 14.4 g
- KH₂PO₄ 2.4 g

1) Pesar cada uno de los reactivos y disolver completamente en 800 mL de agua destilada.

2) Medir pH y ajustar a 7.4 si fuese necesario, ya sea con HCl o NaOH.

3) Una vez ajustado el pH aforar a 1L con agua destilada.

4) Esterilizar en autoclave

Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)

- Medio en polvo 13.37 g
- NaHCO₃ 3.7 g
- Suero fetal bovino (SFB)
- (Glutamina, antibiótico y antimicótico)

1) Disolver NaHCO₃ y medio en 800 mL de agua.

2) Medir pH y ajustar a 7.4 si fuese necesario, ya sea con HCl o NaOH

3) Una vez ajustado, aforar a 1 L con agua destilada

4) En campana de flujo laminar y haciendo uso de filtro 0.22 µm se añade el SFB
o Al 5 % se deben agregar 50 mL de suero fetal bovino (SFB)
o Al 10 % se deben agregar 100 mL de suero fetal bovino (SFB)

5) Añadir 10 mL de glutamina, antibiótico y antimicótico, para una concentración final 1x

Amortiguador de corrida 1x

- Tris 3 g
- Glicina 14.4 g
- SDS 2 g

1) Disolver reactivos en 1L de agua destilada

TBS 10x

- Tris 24 g
- NaCl 88 g

1) Disolver reactivos en 800 mL de agua destilada

2) Medir pH y de ser necesario ajustar a 7.4 con HCl o NaOH

3) Aforar a 1 L con agua destilada

TBS-T 1x

- 100 mL stock TBS 10x
- 1 mL de Tween 20

1) Disolver los reactivos en 1 L de agua destilada

4x SDS Amortiguador de cargado de geles (Stock 4x para 7.5 mL)

- 1.5 mL Tris-HCl pH 6.5 1M
- 3 mL de DTT 1M
- 600 mg de SDS
- 30 mg de azul de bromofenol
- 2.4. g de glicerol

1) Se disuelven los reactivos en 2 mL de agua destilada (difícil de disolver)

2) Si la solución es naranja o amarilla se ajusta pH con NaOH 5M

3) Aforar a 7.5 mL

4) Se hacen alícuotas de 500 µl y se guardan a – 20°C

Amortiguador de transferencia

- 5.8 g de Tris-base
- 2.9 g glicina
- 0.37 g de SDS

1) Disolver reactivos en 800 mL de agua destilada

2) Una vez disuelto, se afora a 1 L con 200 mL de metanol

SDS al 10 %

- 10 g de SDS

1) Disolver y almacenar a temperatura ambiente

- 100 mL agua desionizada

Solución 1.5 M tris-HCl pH 8.8

- 18.5 g de Tris-base
- 100 mL de agua desionizada

- 1) Disolver Tris-base en agua desionizada
- 2) Ajustar a pH 8.8 con HCl
- 3) Almacenar a 4°C

Solución 0.5 M tris-HCl pH 6.8

- 6 g de Tris-base
- 100 mL de agua desionizada

- 1) Disolver Tris-base en agua desionizada
- 2) Ajustar a pH 6.8 con HCl
- 3) Almacenar a 4°C

Rojo de Ponceau

- 95 mL de agua
- 5 mL de ácido acético glacial
- 100 mg de rojo de Ponceau

- 1) Disolver rojo de Ponceau en ácido acético
- 2) Llevar al aforo con agua destilada hasta 100 mL

Poly-HEMA 1.2 %

- 1.2 g de poly-HEMA
- 100 mL alcohol 96 %

- 1) Disolver 1.2 g de poly-HEMA en 100 mL de alcohol al 96 % durante toda la noche
- 2) Centrifugar solución a 400 x g para eliminar partículas no disueltas
- 3) Filtrar utilizando filtro de 0.22 µm

Agarosa 1 %

- 1 g de agarosa purificada

- 1) Disolver 1 g de agarosa purificada en 100 mL de agua destilada

- 100 mL agua destilada
- 2) Antes de utilizar, calentar en microondas (revisando que no se derrame) para tener una consistencia líquida y disuelta

Reactivos Lowry

Solución A (1 L)

- Na₂CO₃ 2 % (20g)
 - NaOH 0.4 % (4g)
 - Tartrato de Na 0.02 %
- 1) Disolver en 1 L de agua destilada
2) Guardar en frasco ámbar a 4°C

Solución B

- Cu(SO₄)₃ (1.25g)
 - O
 - Cu(SO₄)₃ · 5 H₂O (0.5g)
- 1) Si se tiene Cu(SO₄)₃, disolver en 250mL de agua destilada
2) Si se tiene Cu(SO₄)₃ · 5 H₂O, disolver en 100 mL de agua destilada
3) En cualquier caso, almacenar en frasco ámbar a 4°C

Solución C (preparada en el momento)

- 50 mL de solución A
 - 1 mL de solución B
- 1) En el momento de llevar a cabo la cuantificación se mezclan los volúmenes de acuerdo con la proporción indicada

Tabla 1. Porcentaje de acrilamida necesario de acuerdo con el tamaño de las proteínas

Tamaño de las proteínas	Concentración de acrilamida
4-40 kDa	Hasta 20 %

12-45 kDa	15 %
10-70 kDa	12.5 %
15-100 kDa	10 %
50-200 kDa	8 %
+ 500 kDa	4-6 %

Obtenida de (Buenas Prácticas al Realizar Una SDS-PAGE – Labster de

https://theory.labster.com/es/best_practice_sds/

APÉNDICE 2

Contabilidad celular.

Para llevar a cabo el conteo celular se utilizó el contador automático Invitrogen™ Countess™ 3 y el método de azul de tripano que se describe a continuación:

- 1) Al momento de realizar el pase celular previo a la siembra de esferoides, y cuando se encuentran resuspendidos en el segundo lavado con PBS, se toman 10 µl de la suspensión celular, para mejores resultados se debe estimar una concentración entre 1×10^5 y 4×10^6 células/mL.
- 2) Los 10 µl de suspensión celular se mezclan con 10 µl de azul tripano al 0.4 % en un microtubo eppendorf, pipeteando un par de veces para lograr una correcta mezcla.
- 3) Mediante capilaridad y haciendo uso de una pipeta, se colocan 10 µl en la cámara para conteo celular (cada portaobjeto cuenta con dos cámaras para usar en el conteo).
- 4) Se lee el número de células en el contador automático, y se hacen los cálculos con las diluciones llevadas a cabo

Conteo de esferoides

- 1) Los esferoides se transfirieron a un tubo falcón de 15 mL.
 - 2) Se lavó la placa de cultivo con 2 mL del medio utilizado, se combinaron las suspensiones colectadas.
 - 3) Se centrifugo a baja velocidad, aproximadamente 100-200 x g por 5 min
 - 4) Se aspiró el sobrenadante cuidadosamente para no romper el boton de esferoides.
-
- 5) Se resuspende el boton cuidadosamente en un volumen de 500 µl del medio utilizado.

- 6) Con un marcador fino, se dividió un pozo de una placa de 96 pozos en cuadrantes, marcando una cruz por la parte de abajo del pozo.
 - 7) Se añadieron 50 μ l de la suspensión de esferoides en el pozo y se observaron bajo el microscopio.
 - 8) Se contaron los esferoides de cada cuadrante usando un contador de mano. Para asegurar que el conteo fue acertado, se deben contar al menos 50 esferoides por cada pozo, los cuales deben tener al menos un tamaño de 50 μ m.
 - 9) Se calculó la concentración de esferoides dividiendo el conteo de esferoides entre el volumen en el que se contaron, el total de esferoides se contó multiplicando la concentración de esferoides por el volumen total.
-

Pase de esferoides

- 1) El pase de esferoides se hace cuando se observa un tamaño uniforme de los esferoides o se considera que estos ya no tienen un crecimiento (aproximadamente entre los 3 y 7 días).
- 2) Se recolectan los esferoides en un tubo de 15 mL.
- 3) Centrifugar por 15 min a 267 x g y descartar el sobrenadante.
- 4) Se añaden aproximadamente 2 mL de PBS y se procede a disociar los esferoides recolectados (se puede hacer uso de un agente disociativo para facilitar la disociación de los esferoides).
- 5) Haciendo uso de una pipeta se disocian los esferoides pipeteando arriba y abajo en al menos 20 ocasiones
- 6) Se incuban esferoides a 37°C por 5-10 min, y se vuelve a pipetear en al menos 20 ocasiones hasta lograr la disociación.
- 7) Se añaden 3-4 mL de PBS y se centrifuga a 267 x g durante 15 min.
- 8) Se descarta el sobrenadante y se resuspende en el nuevo medio de cultivo de esferoides a utilizarse.

Cuantificación proteica por Lowry. Curva de Albúmina

Tabla 2. Stock de 2mg/mL de albúmina

H ₂ O (μl)	Volumen de Albúmina (μl)	Concentración de Albúmina (mg/mL)
200	0	0
198	1	2
195	5	10
190	10	20
180	20	40
170	30	60
160	40	80
150	50	100

Obtenida de (Waterborg, 2009)