

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**COMPARACIÓN DE 2 MODELOS DE CULTIVO
3D TIPO ESFEROIDE DE CÉLULAS DERIVADAS DE CÁNCER DE CABEZA Y
CUELLO PARA VALORACIÓN DE POTENCIAL ACTIVIDAD
ANTINEOPLÁSICA**

GITHZA DANIELA RUANO BASTIDAS

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C, Colombia
2023

COMPARACIÓN DE 2 MODELOS DE CULTIVO 3D TIPO ESFEROIDE DE CÉLULAS
DERIVADAS DE CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO PARA VALORACIÓN DE
POTENCIAL ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA

GITHZA DANIELA RUANO BASTIDAS

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias - Farmacología

DIRECTOR:

Dr: Fabio Ancizar Aristizábal Gutiérrez, QF. Doctor en Ciencias Biológicas Profesor
Titular D.E. Investigador Instituto de Biotecnología.

Línea de investigación:

Cáncer

Grupo de investigación:

Farmacogenética del cáncer

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C, Colombia
2023

DEDICATORIA

Un viaje de mil millas comienza con el primer paso

Lao -Tsé

A mis padres Omaira, Niria y Fidel

Por ser el motor de mi vida

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre Githza Daniela Ruano Bastidas

Fecha 01/08/2023

Agradecimientos

Mi mayor agradecimiento a mi madre, a mis abuelos y a mi familia por su apoyo incondicional, por siempre estar presentes para mí y brindarme tanto amor.

A mi alma mater, la Universidad Nacional de Colombia, especialmente al departamento de farmacia, a mis docentes y compañeras de maestría, Karla, Nata y Mafe, quienes me brindaron su amistad y un apoyo invaluable, tanto académico como personal.

A mi director de tesis el profesor Fabio Aristizábal, por bríndame su valiosa asesoría y compartir sus amplios conocimientos.

A la Universidad de el Bosque, especialmente al laboratorio de investigación del grupo de inmunología celular y molecular, por permitirme recibir el entrenamiento adecuado para la realización de mi trabajo, el cual fue indispensable para la culminación del mismo.

A mi invaluable círculo de amigos, quienes siempre estuvieron prestos a ayudarme y escucharme cuando más lo necesité, a mi jefe y amiga Mafe por su bondad y comprensión, a mi novio por ser una luz en mi camino y una inspiración académica.

Resumen

Título: Comparación de 2 modelos de cultivo 3d tipo esferoide de células derivadas de cáncer de cabeza y cuello para valoración de potencial actividad antineoplásica

Pese a los recientes avances en las terapias contra cáncer, su tratamiento sigue siendo un desafío importante debido a la complejidad y heterogeneidad que presentan los tumores, por ello surge la necesidad de emplear modelos de cultivos celulares tridimensionales, concretamente esferoides tumorales, que a diferencia de los cultivos bidimensionales comúnmente utilizados, permiten investigar las características complejas de las células cancerosas y así mejorar las opciones de tratamiento clínico, por lo anterior el objetivo de este trabajo fue comparar modelos de cultivo 3D tipo esferoide generados a partir de dos líneas celulares derivadas de cáncer de cabeza y cuello y evaluar el comportamiento del potencial citotóxico del cisplatino en los mismos. Se generaron 2 cultivos tipo esferoide a partir de las líneas celulares CAL 27 y SCCO90, se trataron con diferentes concentraciones de cisplatino (5,10,20,30,40 y 50 μM). Después de 72 horas de incubación, se determinaron los parámetros morfológicos antes y después del tratamiento, y el efecto citotóxico del medicamento mediante un ensayo de resazurina. Tras establecer los cultivos tridimensionales a las condiciones seleccionadas, se encontró que los esferoides generados presentaron variaciones tanto en el comportamiento citotóxico de cisplatino, así como en los diferentes parámetros morfológicos analizados para las 2 líneas celulares. Los parámetros morfológicos calculados no se correlacionaron de manera directa con los datos de viabilidad celular. En este estudio se observó que estas líneas tumorales derivadas de cáncer de cabeza y cuello producen esferoides con distintas morfologías, tamaños y estados de compactación celular, los cuales exhiben gradientes de penetración y distribución de sustancias, por ello las diferencias encontradas.

Palabras clave: Cultivo celular 3D, esferoides, cáncer de cabeza y cuello, citotoxicidad.

Abstract

Title: Comparison of 2 3d spheroid-like culture models of head and neck cancer-derived cells for assessment of potential antineoplastic activity.

Despite recent advances in cancer therapies, cancer treatment remains a major challenge due to the complexity and heterogeneity of tumors, thus the need to use three-dimensional cell culture models, specifically tumor spheroids, which unlike the two-dimensional cultures commonly used, allow to investigate the complex characteristics of cancer cells and thus improve clinical treatment options. Therefore, the objective of this work was to compare 3D spheroid-type culture models generated from two cell lines derived from head and neck cancer and to evaluate the behavior of the cytotoxic potential of cisplatin in them. 2 spheroid-like cultures were generated from CAL 27 and SCCO90 cell lines, treated with different concentrations of cisplatin (5,10,20,30,40 and 50 μM). After 72 hours of incubation, morphological parameters before and after treatment, and the cytotoxic effect of the drug were determined using a resazurin assay. After establishing the three-dimensional cultures at the selected conditions, it was found that the generated spheroids presented variations both in the cytotoxic behavior of cisplatin, as well as in the different morphological parameters analyzed for the 2 cell lines. The calculated morphological parameters did not correlate directly with the cell viability data. In this study it was observed that these tumor lines derived from head and neck cancer produce spheroids with different morphologies, sizes and states of cellular compactness, which exhibit gradients of penetration and distribution of substances, hence the differences found.

Key words: 3D cell culture, spheroids, head and neck cancer, cytotoxicity.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas.....	XV
Introducción.....	1
1 Marco Teórico.....	5
1.1 Cáncer de cabeza y cuello.....	5
1.2 Terapia actual contra CCC.....	6
1.3 Recreando el microambiente tumoral: esferoides tumorales	7
1.4 Métodos de obtención de esferoides tumorales	8
1.4.1 Método de la gota colgante	8
1.4.2 Método de superficie no adherente	8
1.4.3 Método de cultivo en suspensión.....	9
1.4.4 Herramientas para la caracterización de esferoides tumorales	10
2 . Objetivos.....	12
2.1 Objetivo general	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 . Metodología	13
3.1 Obtención y caracterización del cultivo tridimensional tipo Esferoide	13
3.1.1 Cultivo de células en monocapa (2D)	13
3.1.2 Cultivo de células en esferoides (3D)	13
3.1.3 Caracterización de esferoides tumorales.....	14
3.1.4 Estimación de los parámetros morfológicos.....	14
3.2 Evaluación de citotoxicidad del fármaco de prueba.....	15
3.2.1 Evaluación de citotoxicidad en cultivo monocapa (2D).....	15
3.2.2 Evaluación de citotoxicidad en cultivo (3D) tipo esferoide.....	16
3.3 ANÁLISIS DE DATOS	17
3.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS	17
4 . Resultados y discusión.....	18
4.1 Obtención y caracterización de cultivos tridimensionales tipo esferoides	18
4.1.1 Caracterización de los esferoides 3D orales.....	18
4.1.2 Estimación de los parámetros morfológicos pretratamiento	21
4.2 Evaluación de citotoxicidad del fármaco de prueba.....	25
4.2.1 Evaluación de citotoxicidad en cultivo monocapa (2D).....	25

4.2.2	Evaluación de citotoxicidad en cultivo (3D) tipo esferoide	27
4.3	Estimación de los cambios en los parámetros morfológicos postratamiento	28
4.4	Evaluación de los cambios postratamiento por parámetro morfológico.	30
4.4.1	Cambios en el diámetro en esferoides SCC090	30
4.4.2	Cambios en la solidez en esferoides SCC090.....	31
4.4.3	Cambios en el volumen en esferoides SCC090	32
4.4.4	Cambios en la esfericidad en esferoides SCC090	33
4.4.5	Cambios en el diámetro en esferoides CAL27	34
4.4.6	Cambios en la solidez en esferoides CAL 27	35
4.4.7	Cambios en el volumen en esferoides SCC090	36
4.4.8	Cambios en la esfericidad en esferoides CAL27	37
4.5	Correlación entre los cambios morfológicos del esferoide y el porcentaje de viabilidad celular.	38
5	. CONCLUSIONES	49
6	. RECOMENDACIONES	50
7	. REFERENCIAS	51

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Regiones anatómicas donde se desarrolla el cáncer de cabeza y cuello.....	5
Figura 2: Organización estructural de un esferoide tumoral.....	7
Figura 3: Secuencia de generación de esferoides tumorales, por la técnica de gota colgante.....	8
Figura 4: Microplacas de 24 pozos redondos Corning de adhesión ultrabaja	9
Figura 5: A. Matrices giratorias, B. biorreactor	10
Figura 6: Esferoides tridimensionales de (A) SCC090 y (B) CAL 27 y sus respectivas segmentaciones.....	19
Figura 7: Parámetros morfológicos de los esferoides de CAL 27 no tratados.....	23
Figura 8: Parámetros morfológicos de los esferoides de SCC090 no tratados.	24
Figura 9: Curvas concentración respuesta de los efectos sobre la viabilidad celular en 2D tratados con cisplatino.	26
Figura 10: Curva dosis-respuesta de los efectos sobre la viabilidad celular de esferoides CAL 27 y SCC090 tratados con cisplatino.	27
Figura 11: Esferoides tridimensionales de SCC090 (A) CAL 27 (B) y su respectiva reconstrucción 3D pre y postratamiento.	29
Figura 12: Diagrama de diámetro por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con el diámetro en los grupos pre y postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M a 72 horas.	31
Figura 13: Diagrama de solidez por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con la solidez de los esferoides SCC090 en los grupos pre y postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M a 72 horas.....	32
Figura 14: Diagrama de volumen por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con el volumen de la línea celular SCC090 en los grupos pre y postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M a 72 horas.....	33
Figura 15: Diagrama de esfericidad por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con la esfericidad en los grupos pre y postratamiento de los esferoides de SCC090 tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M a 72 horas.	34
Figura 16: Diagrama de diámetro por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con el diámetro de la línea celular CAL27 en los grupos pre y	

postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M a 72 horas.....	35
Figura 17: Diagrama de solidez por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con la solidez de la línea celular CAL27 en los grupos pre y postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M a 72 horas.....	36
Figura 18: Diagrama de volumen por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con el volumen la línea celular CAL27 en los grupos pre y postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M a 72 horas.....	37
Figura 19: Diagrama de esfericidad por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con la esfericidad la línea celular CAL27 en los grupos pre y postratamiento de los esferoides CAL27 tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M a 72 horas.....	38
Figura 20: Gráficos de correlación entre Esfericidad y solidez/Diámetro y volumen y diámetro. Se muestran las correlaciones más fuertes positivas entre el Volumen y el Diámetro (A) y esfericidad y diámetro (B) para los esferoides SCC090 y las correlaciones más fuertes y positivas entre solidez y esfericidad (C) y volumen y diámetro (D) para los esferoides CAL27	46

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Escala de correlación Spearman utilizada.....	39
Tabla 2: Correlaciones entre los parámetros morfológicos y la viabilidad celular en los esferoides SCC090 no tratados.....	39
Tabla 3: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 5 μM de cisplatino.....	40
Tabla 4: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 10 μM de cisplatino.....	40
Tabla 5: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 20 μM de cisplatino.....	41
Tabla 6: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 30 μM de cisplatino.....	41
Tabla 7: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 40 μM de cisplatino.....	41
Tabla 8: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 50 μM de cisplatino.....	42
Tabla 9: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 no tratados.....	42
Tabla 10: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 5 μM de cisplatino.....	43
Tabla 11: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 10 μM de cisplatino.....	43
Tabla 12: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 20 μM de cisplatino.....	43
Tabla 13: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 30 μM de cisplatino.....	44
Tabla 14: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 40 μM de cisplatino.....	44
Tabla 15: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 50 μM de cisplatino.....	45

Introducción

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) representa un conjunto de neoplasias malignas heterogéneas localizadas a nivel de los senos paranasales, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, laringe, cavidad oral, lengua y glándulas salivares, su etiología está asociada a factores de riesgo genéticos, ambientales o infecciosos (1). La resección quirúrgica y la quimio radioterapia son los tratamientos de primera elección para el cáncer de cabeza y cuello localizado y el cisplatino en dosis altas, es el régimen de quimioterapia estándar para este tipo de cáncer cuando se encuentra en estado metastásico avanzado (2,3); aunque las tasas de supervivencia a 5 años han mejorado de un 55 % a un 66 % en los últimos 30 años, las tasas de curación continúan siendo alrededor del 50% y los pacientes con CCC avanzado, recurrente o metastásico tienen una mediana de supervivencia de solo 6 a 12 meses, constituyendo así a este grupo de enfermedades como un problema de salud pública (3,4), y los tratamientos actuales presentan resultados poco favorables, llevando así al fracaso del tratamiento en la mayoría de los casos (5,6).

La búsqueda de nuevas moléculas con potencial actividad antineoplásica se asocia a las limitaciones que presentan los ensayos *in vitro* realizados en cultivos convencionales bidimensionales, los cuales parecen resultar poco realistas al no reflejar de manera adecuada la fisiología y comunicación intercelular de un tejido real, ya que tanto las interacciones celulares y moleculares y el depósito de matriz extracelular no tienen gran similitud a lo que ocurre en un tejido *in vitro* (7,8).

Pese a los avances en las terapias contra cáncer durante los últimos años, el tratamiento sigue siendo un desafío importante debido a la complejidad y heterogeneidad que presentan los tumores, esto debido en gran medida a la interacción entre el tumor y su microambiente, el estudio de estas interacciones implica el desarrollo de nuevos métodos que permitan recrear un microambiente tumoral adecuado, por ello surge la necesidad de emplear modelos de tamizaje como los cultivos celulares tridimensionales, concretamente

esferoides tumorales en los que se puedan investigar parte de las características complejas de las células cancerosas y sus interacciones (9,10).

En un contexto tridimensional (3D), las células se encuentran comunicadas entre sí a través de uniones que asemejan tejidos, adicionalmente muestran gradientes metabólicos y proliferativos que se acercan en gran medida al intrincado entorno fisiológico tumoral, dada la arquitectura y las características mencionadas que caracterizan a los esferoides tumorales, el tamizaje de nuevas moléculas o fármacos con actividad antineoplásica utilizando este tipo de modelo, se ha hecho más sólido y confiable (7).

La mayoría de los estudios *in vitro* necesarios para la aprobación de medicamentos con actividad antitumoral se realizan en cultivos celulares bidimensionales (2D), los cuales no representan con precisión la fisiología de tejidos *in vivo* de manera general, ni la fisiología de tejidos tumorales, de forma particular, ya que las células no se disponen de la misma forma mostrando polaridad forzada o forma celular aplanada y una señalización celular y molecular muy diferente a la de un ambiente tumoral real (11,12); cuando se requieren extrapolar estos datos obtenidos *in vitro*, comúnmente se utilizan modelos animales, sin embargo se encuentran por medio problemas éticos y la variabilidad entre especies que dificulta su reproducibilidad en modelos *in vivo*; un modelo *in vitro* de cultivos tridimensionales puede ser una herramienta alternativa para eliminar estos problemas, específicamente los esferoides tumorales, que recrean de una manera más aproximada un microambiente tumoral, permitiendo analizar la comunicación intercelular, los gradientes de pH, oxígeno, nutrientes, sustancias o medicamentos, reflejando de forma más aproximada la fisiología y arquitectura de un tejido real, adicionalmente un modelo 3D permite realizar un cribado rápido de diversas moléculas, ya que se pueden generar esferoides a partir de diferentes líneas celulares o células primarias, lo que lo convierte en un modelo bastante eficiente (7).

Debido a la complejidad y heterogeneidad que presentan los tumores sólidos y la necesidad de tener una herramienta alternativa que tenga mejor aproximación a un ambiente real, se pretende generar esferoides tumorales a partir de 2 líneas celulares derivadas de cáncer de cabeza y cuello no trabajadas previamente en el laboratorio del grupo de investigación de fármaco genética del cáncer, para poder establecer una comparación de como las características estructurales o arquitectónicas de 2 cultivos

diferentes afectan la difusión de las sustancias con actividad antitumoral y así lograr evaluar las condiciones más apropiadas para obtener un modelo de esferoides en el laboratorio del grupo que permita realizar evaluación constante nuevas moléculas con potencial para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello.

1 . Marco Teórico

1.1 Cáncer de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) conforma un grupo de neoplasias malignas que involucran al tracto aéreo digestivo superior y de acuerdo a la región anatómica comprometida, se clasifican en cáncer de: cavidad oral (dos tercios de la lengua, carrillos y labios, base de la boca, paladar duro), faringe (nasofaringe, oro faringe e hipo faringe), laringe (glótica, supra glótica e infra glótica), glándulas salivales, fosas nasales y senos paranasales (Figura1) (13). Más del 90% de los CCC son de histología escamosa, es decir se derivan del epitelio que reviste la mucosa en la cavidad oral, la laringe y la faringe y son conocidos como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) el otro porcentaje, 2% son sarcoma y el 7% corresponden a adenoescamoso, melanoma y no especificados (14).

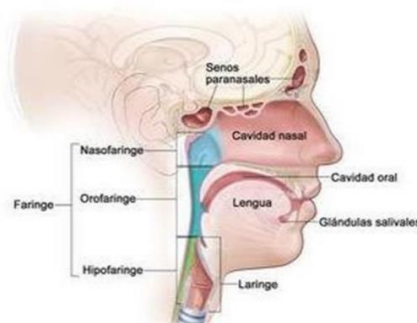


Figura 1: Regiones anatómicas donde se desarrolla el cáncer de cabeza y cuello (13).

Los tipos de CCC constituyen el sexto cáncer más común en todo el mundo, con 890 000 casos nuevos y 450 000 muertes por año, la incidencia +de carcinoma de células

escamosas que es el tipo de CCC que más se presentan, sigue en ascenso y se pronostica para el año 2030 aumentara en un 30%, es decir, 1,08 millones de casos nuevos al año (3, 14).

De acuerdo con las cifras reportadas por la agencia internacional para la investigación en cáncer de la OMS (Globocan) la tasa de incidencia reportada para América Latina y el caribe corresponde al 4,8% con 35.514 casos nuevos y una mortalidad de 4,4% con 16018 muertes reportadas para 2020, constituyendo un problema de salud pública, para el caso de Colombia la tasa de incidencia corresponde a un 7,7% con 2148 casos nuevos y su índice de mortalidad corresponde a un 6,2% (15).

Los principales factores asociados al desarrollo de este tipo de neoplasias son la exposición a carcinogénicos derivados del cigarrillo, consumo excesivo de alcohol y la presencia del virus papiloma humano (VPH), los tumores que surgen a nivel de orofaringe se relacionan en gran medida con una infección previa con cepas oncogénicas del VPH especialmente el genotipo 16 y en menor medida el 18 (16). El consumo de nuez de areca o una alteración en la microbiota bucal, se han relacionado con el desarrollo de cáncer oral y el virus de Epstein Barr también se encuentra reportado como un factor de riesgo para desarrollar cáncer nasofaríngeo (11).

1.2 Terapia actual contra CCC

Dada la complejidad de la región anatómica de cabeza y el cuello, el tratamiento consiste en combinar diversos métodos los cuales abarcan recesión quirúrgica, quimio o radioterapia o una combinación, actualmente se encuentran aprobados siete medicamentos para la terapia contra CCC: metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), bleomicina, cisplatino, docetaxel, cetuximab y pembrolizumab, aunque se han presentado avances terapéuticos significativos en los últimos años se continúan presentando varias complicaciones o efectos secundarios como mucositis, xerostomía, disfunción gustativa, disfagia, osteonecrosis entre otros (17,18); adicionalmente la recidiva de las lesiones, la resistencia a medicamentos o la recesión quirúrgica conllevan a deterioros funcionales y estéticos que disminuyen considerablemente la calidad de vida de los pacientes diagnosticados (19).

1.3 Recreando el microambiente tumoral: esferoides tumorales

Los esferoides tumorales constituyen un cultivo celular tridimensional que logra simular con mayor precisión un ambiente *in vivo*, ya que permite simular y estudiar la comunicación intercelular y la adherencia entre células-matriz extracelular, interacciones que modulan procesos propios de un microambiente tumoral (20).

Debido a la estructura jerárquica de los esferoides tumorales los cuales incluyen una región externa de células tumorales en proliferación, una capa de células intermedia inactivas o quiescentes y un núcleo necrótico, estos conservan los gradientes de pH, oxígeno, metabolitos o nutrientes de las regiones poco vascularizadas y avasculares, recreando un crecimiento tumoral exponencial similar al de los tumores sólidos (Figura 2) (21).

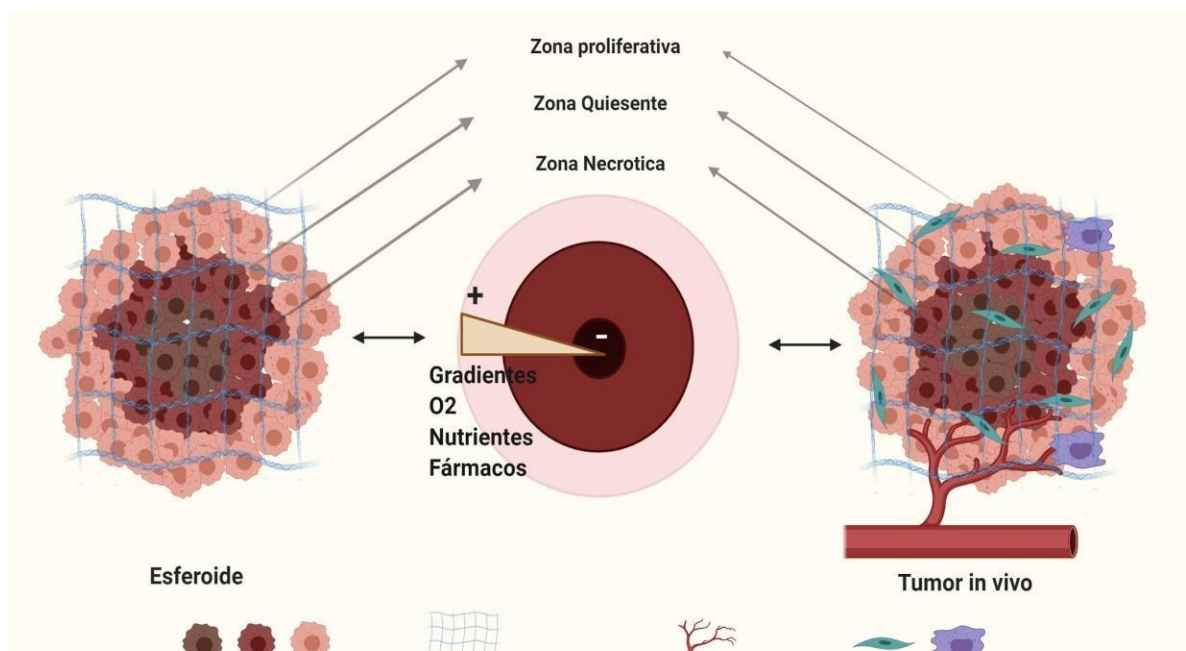


Figura 2: Organización estructural de un esferoide tumoral: se dispone en 3 capas, un núcleo necrótico una capa intermedia o zona quiescente y un borde de células proliferativas, también se representan los gradientes de oxígeno, pH, nutrientes, lo que ocasiona una difusión no uniforme de lo sustancias o medicamentos (22).

Dichos gradientes fisiológicos otorgados por la disposición celular de los esferoides tumorales pueden conferir resistencia a los fármacos, debido a la variabilidad de las concentraciones a las cuales se encuentran expuestas las células dentro del esferoide, proporcionando de esta manera un modelo más preciso en el que se pueda estudiar la eficacia terapéutica y los resultados puedan ser más reproducibles en un modelo *in vivo* (23).

1.4 Métodos de obtención de esferoides tumorales

Existen al menos 3 técnicas reportadas en la literatura para la obtención de esferoides tumorales

1.4.1 Método de la gota colgante

En esta técnica, se colocan gotas de suspensiones celulares en la parte inferior de la tapa de una placa de Petri (Figura 3). La tapa, donde cuelgan las células debido a la tensión superficial, se coloca en una placa de Petri, que contiene PBS (solución salina tamponada con fosfato) para evitar la deshidratación de las gotas. Las células se acumulan en la punta de la gota en la interfase aire-líquido, se agregan espontáneamente y finalmente forman esferoides, estos pueden mantenerse en cultivos durante varias semanas al interior de la matriz de la gota (24,25).



Figura 3: Secuencia de generación de esferoides tumorales, por la técnica de gota colgante (8).

1.4.2 Método de superficie no adherente

Esta es una técnica de formación espontánea de esferoides tumorales, aquí se utilizan placas de fijación ultra baja recubriéndolas con un sustrato inerte (agar o metacrilato de poli-2-hidroxietilo (poli-HEMA)), que evita que las células se adhieran

a la superficie de los pozos, lo que obliga a las células a agregarse y forman esferoides. También es posible utilizar placas pre revestidas comercialmente en las que la superficie inferior es hidrófila (Figura 4). La superficie inferior está cargada de forma neutra y unida covalentemente a la superficie de un recipiente de poliestireno, este recubrimiento evita la adherencia de las células a la superficie, obligándolas a estar en suspensión y, en consecuencia, a formar esferoides 3D. El recubrimiento es estable, no citotóxico y no degradable (24).



Figura 4: Microplacas de 24 pozos redondos Corning de adhesión ultrabaja (26)

1.4.3 Método de cultivo en suspensión

En esta técnica se coloca una suspensión celular dentro de un recipiente y se mantienen las células en suspensión ya sea por agitación o aumentando la viscosidad del medio. En el enfoque basado en la agitación, el recipiente puede agitarse suavemente o girarse, la agitación continua de las células evitará que se adhieran a las paredes del recipiente y promoverá las interacciones célula-célula, existen dos dispositivos principales que se utilizan en el método de cultivo en suspensión, están los matraces giratorios y biorreactores (Figura 5) (27).

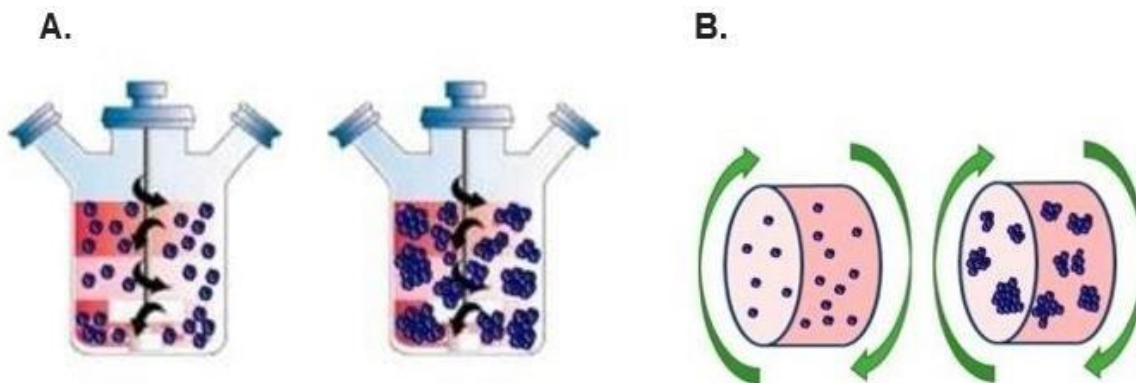


Figura 5: A. Matraces giratorios, B. biorreactor (8). Herramientas para la caracterización de esferoides tumorales

Ensayos bioquímicos de viabilidad celular, microscopía confocal o de fluorescencia y citometría de flujo son algunos métodos bastante útiles y ampliamente utilizados para el análisis fenotípico y morfológico de los esferoides tumorales, algunas de estas técnicas evalúan la viabilidad celular bajo condiciones de cultivo *in vitro*, ya sea en monocapa o en cultivo tridimensional, entre las que se destacan están los ensayos que monitorean el metabolismo celular como metiltetrazolio (MTT), 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), lactato deshidrogenasa y resazurina los cuales han sido usados como una medida indirecta de la viabilidad celular, de acuerdo a esto, el daño celular puede ser evaluado, monitoreando la pérdida de las capacidades metabólicas de la célula; adicionalmente al realizar estos ensayos en cultivos monocapa versus cultivos tridimensionales (3D) es común que se presente una mayor resistencia al tratamiento en células cultivadas en 3D en comparación con cultivos bidimensionales, esto, debido a que las células en una estructura agregada son mucho más resistentes que las células que crecen en monocapa por la difusión limitada de sustancias a través del esferoide y la hipoxia celular (28).

Aunque los sistemas de cultivos celulares basados en esferoides representan una organización espacial y un comportamiento celular muy similar al estado fisiológico del tumor, el modelo de esferoides tiene unas limitaciones de difusión que crean gradientes de sustancias, esto ocasionado porque los esferoides pueden poseer morfologías y tamaños variables que pueden afectar la reproducibilidad de los datos, de esta manera, para garantizar la obtención de poblaciones más homogéneas y complementar los ensayos anteriormente mencionados, se han creado nuevas herramientas

computacionales que permiten el cálculo y evaluación de parámetros relacionados con el tamaño como son el volumen y el diámetro, y para el análisis de aspectos de forma se evalúa los parámetros de solidez y esfericidad (27,29), estos parámetros se puede obtener a partir de imágenes que pueden ser analizadas con programas como AnaSP, y ReViSP, herramientas de software libres escritas en MATLAB (©, The MathWorks, Inc., Natick, MA, EE. UU.) creadas específicamente para analizar el volumen y otros parámetros morfológicos de los esferoides tumorales, estos softwares se basan en el procesamiento de píxeles, la segmentación de las imágenes y finalmente, la adquisición de un código binario que permite generar las mediciones de los parámetros morfológicos y la reconstrucción tridimensional de los mismos a partir de imágenes 2D obtenidas mediante microscopia óptica (30).

2 . Objetivos

2.1 Objetivo general

Comparar modelos de cultivo 3D tipo esferoide generados a partir de dos líneas celulares derivadas de cáncer de cabeza y cuello.

2.2 Objetivos específicos

- Generar y caracterizar modelos tridimensionales tipo esferoides para 2 líneas celulares derivadas de cáncer de cabeza y cuello.
- Evaluar el comportamiento del potencial citotóxico de cisplatino en los modelos de cultivos 3D tipo esferoide.

3 . Metodología

3.1 Obtención y caracterización del cultivo tridimensional tipo Esferoide

3.1.1 Cultivo de células en monocapa (2D)

Se cultivó la línea celular epitelial CAL 27 (ATCC® CRL-2095™) proveniente de carcinoma escamo celular de lengua y la línea celular epitelial SCC090 (ATCC® CRL-3240™) proveniente de carcinoma escamo celular de base de lengua. Las células fueron propagadas en cajas de cultivo de 75cm² y medio de cultivo DMEM (Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Lonza), las cuales se mantuvieron en incubadora al 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa hasta que alcanzaron una confluencia entre el 80 – 90%.

3.1.2 Cultivo de células en esferoides (3D)

Para la obtención del cultivo tridimensional tipo esferoide se utilizarán placas de cultivo celular no adhesivas de 96 pozos (Corning® Costar®). De acuerdo al protocolo propuesto por Fonseca et al, 2022 (31), las células CAL 27 y SCC090 se sembraron a una densidad de 2.000 células/pozo utilizando medio de cultivo DMEM (Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Lonza). Las células se mantuvieron en incubadora al 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Después de 72 horas de cultivo, la formación de los esferoides se determinó con microscopio óptico invertido, se tomaron

fotomicrografías para evaluar los parámetros morfológicos de los esferoides con los programas de imágenes (sección 3.1.3).

3.1.3 Caracterización de esferoides tumorales

Pasadas 72 horas de la siembra, la formación de los esferoides tumorales se evaluó mediante parámetros morfológicos (convexidad, esfericidad, circularidad, solidez y diámetro), para ello se obtuvieron imágenes del cultivo con el microscopio invertido Zeiss Imager. M2BX y una cámara CCD monocromática AxioCam HRm. Se calculó circularidad, la esfericidad, la solidez y el diámetro de los esferoides con el software de análisis de imágenes para esferoides AnaSP (<http://sourceforge.net/p/anasp/>) (30,32), adicionalmente la reconstrucción y visualización tridimensional y la estimación del volumen se realizó utilizando la herramienta de análisis ReViSP (<http://sourceforge.net/p/revisp/>) (33).

3.1.4 Estimación de los parámetros morfológicos

Después de adquirir las imágenes y de acuerdo con el protocolo reportado para utilizar el software Ana SP, que establece que cada imagen debe contener un solo esferoide, el software las convierte a niveles de grises para hacer la segmentación de los esferoides y así lograr una máscara binaria que permite calcular los parámetros morfológicos descritos a continuación:

- **Convexidad o circularidad:** permite determinar la integridad del esferoide antes del tratamiento, valores cercanos a 1.0 indican círculos perfectos
- **Diámetro:** Es calculado con el diámetro del círculo que tiene la misma área que el área de la sección transversal del esferoide analizado
- **Solidez:** Está relacionado con la cohesión de las células que hacen parte del esferoide en relación a la densidad del mismo
- **Esfericidad:** Este dado como un índice calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$S = \frac{\pi\sqrt{4A/\pi}}{P} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde A representa el área, P el perímetro y $\pi= 3,1416$

Por último, usando el software ReViSP se realizó la reconstrucción morfológica 3D del esferoide basada en el volumen del mismo y obtenida a partir de la sección transversal 2D. Se calcula con la siguiente ecuación 2:

$$V_{SPHERE} = \frac{\pi}{6}D^3 \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde D es diámetro y $\pi=3.1416$

El software realiza la reconstrucción tridimensional en diagramas, los cuales expresan la ubicación del vóxel dentro de la figura tridimensional reconstruida y ubicada espacialmente en un cubo (32,33).

3.2 Evaluación de citotoxicidad del fármaco de prueba

3.2.1 Evaluación de citotoxicidad en cultivo monocapa (2D)

Las líneas celulares CAL 27 (ATCC® CRL-2095™) y SCC090 (ATCC® CRL-3240™) se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 15.000 células por pozo, se trataron con cisplatino (Alpharma) a 5 concentraciones diferentes reportadas en la literatura 200, 20, 10, 5 y 0,5 μM durante 48 y 72h (18).

Después de la aplicación del cisplatino se evaluó el efecto citotóxico del medicamento a través del ensayo de reducción de resazurina, utilizando como control negativo células con medio de cultivo suplementado. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se adicionó a cada pozo la solución de resazurina, la cual se incubó por 4 h a una atmósfera humidificada y 5% de CO_2 a 37°C. Una vez cumplidos los tiempos de incubación, se determinó el cambio de fluorescencia de resazurina a resorufina utilizando el fluorómetro Tecan a una longitud de onda de excitación de 530 nm exc /590 nm em. Las células viables con actividad metabólica adecuada a nivel mitocondrial metabolizan la resazurina produciendo un cambio de color de azul a rosado fluorescente (34). La viabilidad celular se expresó como

porcentaje de células vivas en relación con los controles no tratados. Se construyeron curvas dosis-respuesta del porcentaje de viabilidad celular tratadas con las concentraciones de cisplatino. El IC50 se calculó basándose en la ecuación de regresión no lineal entre la viabilidad de las células y la concentración de las muestras (35), y se determinó utilizando el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPAD Corp., San Diego, CA, EE.UU.). Cada experimento se realizó por triplicado con un coeficiente de variación inferior al 20%.

3.2.2 Evaluación de citotoxicidad en cultivo (3D) tipo esferoide

A partir de los resultados obtenidos en monocapa y basados en la literatura donde se describe que el cultivo tridimensional aporta cierta resistencia a las células a los tratamientos, se determinó evaluar el efecto del medicamento cisplatino a las 72 horas postratamiento. Así mismo, teniendo en cuenta lo anterior, las concentraciones de cisplatino empleadas fueron 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μM . Los experimentos se realizaron en tiempos y semanas independientes; en cada ensayo se incluyeron como control negativo de muerte células sin tratamiento.

Los efectos del medicamento sobre la actividad metabólica celular para los cultivos 3D también fueron evaluados a través del ensayo de reducción de resazurina, Alamar blue (BioSource, Camarillo, CA, EE. UU.) Una disminución en la actividad metabólica de las células que conforman el esferoide fue un indicativo del potencial antiproliferativo y citotóxico del medicamento. Para este ensayo 100 μl del medio con los tratamientos fue reemplazado por 100 μl de una solución de resazurina a 44 μM . Las placas con los esferoides fueron incubadas toda la noche a 37°C. La fluorescencia emitida por las células metabólicamente activas fue cuantificada en lector de placas de micro titulación (530-590 nm, Tecan, Infinite® 200 PRO, Suiza una longitud de onda de excitación de 530 nm y una de emisión de 590 nm. Los resultados se reportaron como un porcentaje de supervivencia respecto al control no tratado.

3.3 ANALISIS DE DATOS

Los datos se presentan como las medianas y los rangos Inter cuartiles de los experimentos independientes de los tiempos evaluados (48-72 horas en el cultivo 2D y 72 horas en el cultivo 3D). La tabulación y la representación gráfica de los resultados se realizó utilizando el software Graphpad Prism 8. Se utilizó la prueba Shapiro Wilk y Kruskall Wallis, acompañada de la prueba de Dunn, para determinar el comportamiento de los datos y la significancia estadística con el software Graphpad Prism 8. Adicionalmente se utilizó una prueba de U de Mann-Whitney para la comparación entre grupos pre y postratamiento y determinar sus diferencias. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

3.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

De acuerdo a los lineamientos determinados por la RESOLUCIÓN Número 8430 DE 1993 (octubre 4) del Ministerio de Salud, República de Colombia: Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, este estudio se cataloga como de riesgo mínimo ya que se empleó un modelo de cultivo tridimensional a partir de líneas de células tumorales, obtenidas comercialmente, por lo tanto, no requiere aval ético por parte de la Facultad de Ciencias.

4 . Resultados y discusión

4.1 Obtención y caracterización de cultivos tridimensionales tipo esferoides

4.1.1 Caracterización de los esferoides 3D orales

La formación de los esferoides tridimensionales de células CAL 27 y SCC090 se evaluó a las 72 horas posteriores a la generación del cultivo en condiciones de baja adherencia. Los esferoides se cultivaron durante 72 h antes del primer cambio de medio para permitir la formación de la matriz extracelular y la compactación. En la figura 6 se muestran las imágenes más representativas de cada grupo de esferoides antes del tratamiento y para los diferentes tratamientos, las respectivas segmentaciones realizadas por el software de análisis AnaSP. Estos esferoides fueron generados partiendo de 2000 células por pozo cultivadas en medio DMEM suplementado al 10 % de SFB, condición que fue reportada en el protocolo realizado por Fonseca et al., (31), para las células CAL 27.

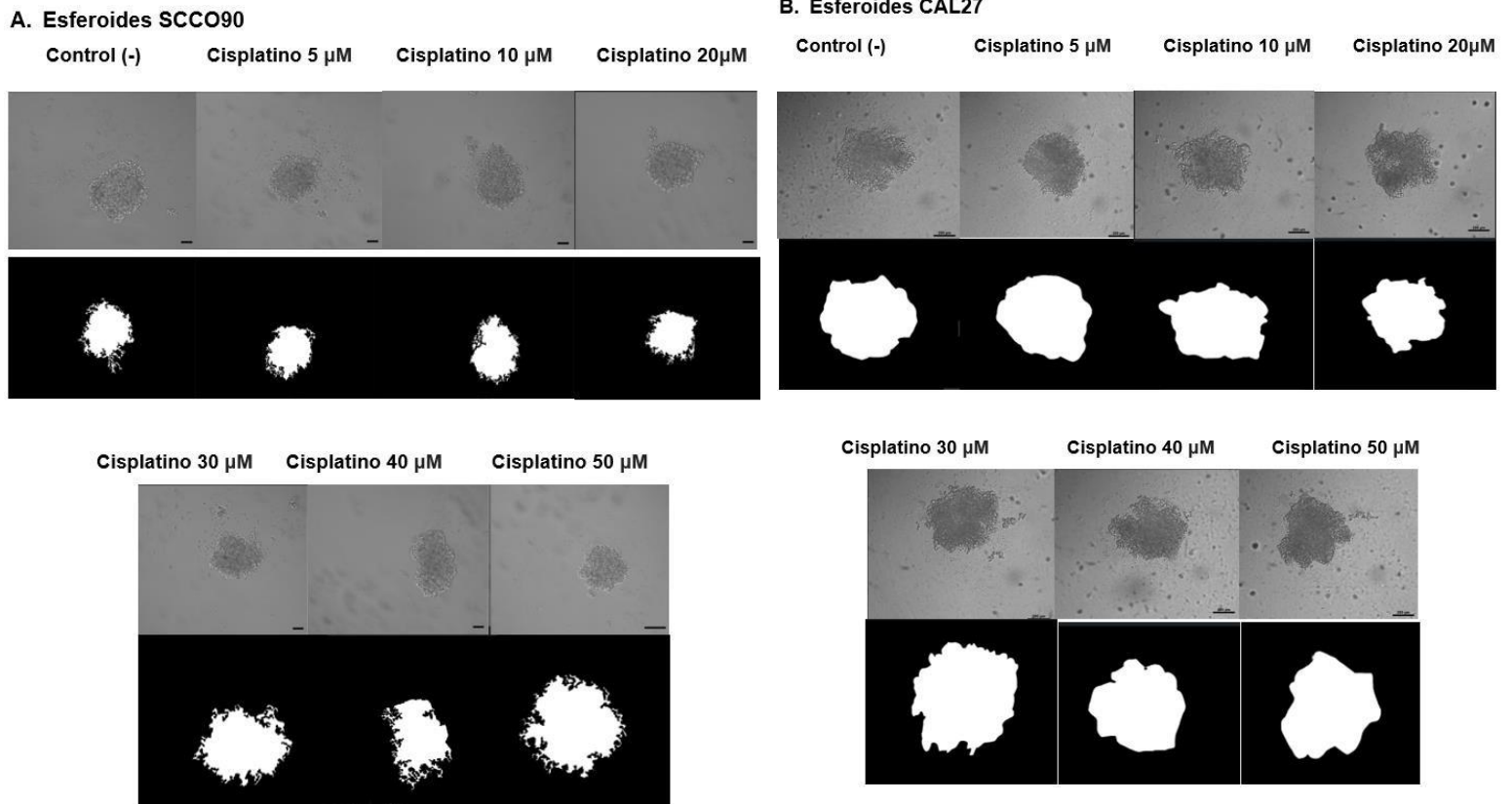


Figura 6: Esferoides tridimensionales de (A) SCCO90 y (B) CAL 27 y sus respectivas segmentaciones. Imágenes obtenidas a las 72 horas de generación del cultivo tridimensional tipo esferoide utilizando el microscopio óptico Zeiss Imager.M2BX y una cámara CCD monocromática AxioCam HRm. Barra de escala 200 μ M y sus respectivas segmentaciones generadas con el software AnaSP. Se muestra una imagen representativa de cada grupo antes del tratamiento.

4.1.2 Estimación de los parámetros morfológicos pretratamiento

Se tomó como base un protocolo reproducible reportado por Fonseca et al., (31) para la línea celular CAL27, se generaron esferoides a partir de una densidad celular de 2.000 células por pozo; con el fin de caracterizar y comparar los 2 tipos de esferoides obtenidos de CAL 27 y SCC090, los parámetros morfológicos evaluados fueron: circularidad, esfericidad y solidez; en donde los valores cercanos a 1, indican círculos casi perfectos y gran compactación, adicionalmente se midió volumen y diámetro; de acuerdo al método de obtención del cultivo empleado, se pueden generar esferoides de cualquier dimensión, en diámetros que van a partir de 200 μm y en los esferoides más grandes se desarrollan de manera más definida las diferentes capas, con una zona necrótica interna con diámetros que van de 500 μm en adelante (30).

Se midieron un total de 168 esferoides repartidos en los 7 grupos de tratamiento para realizar el análisis de los parámetros morfológicos, el índice de circularidad para esferoides SCC090 no tratados osciló entre 0,23 y 0,92, presentando una gran variabilidad, en cuanto al índice de esfericidad de los grupos no tratados, este varió entre 0,11 y 0,34, los datos de solidez se ubicaron entre 0,28 y 0,95, por último las mediciones de diámetro variaron entre 116,8 y 829,6 μm .

Para los esferoides CAL 27 los datos de circularidad oscilaron entre 0,59 y 0,94, presentando mayor circularidad y menor variabilidad que la línea SCC090, el índice de esfericidad para CAL 27 osciló entre 0,22 a 0,95 y el de solidez se ubicó entre 0,73 y 0,97, presentado menor variabilidad que la línea células SCC090, con respecto al diámetro, estos valores se ubicaron entre 750 y 1108 μm , a diferencia de los diámetros para CAL 27 reportados por el trabajo realizado por Fonseca et al, 2022 (31) los cuales se mantuvieron entre 219 a 248 μm , esto puede deberse a la variabilidad fenotípica del pase celular usado para esta medición, a factores ambientales que operan sobre la población celular o a la misma inherente capacidad que tienen las células tumorales de impulsar diferentes maneras de crecimiento tumoral (36). En cuanto a los demás parámetros analizados, encontramos similitudes al estudio previamente realizado para CAL27 (31), ya que se logró generar un cultivo celular de esferoides de CAL 27 con índices de solidez, esfericidad y circularidad, cercanos a 1, indicando una composición celular densamente empaquetada y círculos casi perfectos, así mismo no se encontró diferencias estadísticamente

significativas de los parámetros entre grupos para los esferoides de CAL 27 antes del tratamiento con cisplatino, condición que es importante para garantizar homogeneidad de la población.

Los esferoides de SCC090, presentaron mayor variabilidad pretratamiento en términos de diámetro, ya que oscilaron de 116 a 829 μm , así como su bajo índice de esfericidad por su composición celular no tan densamente empaquetada, es decir se presentaron algunas diferencias estadísticamente significativas entre los grupos pretratamiento para los diferentes parámetros morfológicos en SCC090; en este estudio se partió del supuesto que a la densidad celular escogida reportada por diferentes estudios para otras líneas celulares derivadas de cáncer de cabeza y cuello (31,13), se lograría generar esferoides de SCC090 homogéneos, en cuanto a tamaño y forma, pero no se consiguió de manera tan óptima, esto indica que es necesario realizar procesos de estandarización del protocolo para generar cultivos celulares tipo esferoide derivado de esta línea celular SCC090.

En resumen, del análisis que se realizó 72 horas después de la obtención del cultivo 3D, para la línea celular CAL 27 no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Figura 7), mientras que para la línea celular SCC090 se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, en los diferentes parámetros evaluados (Figura 8).

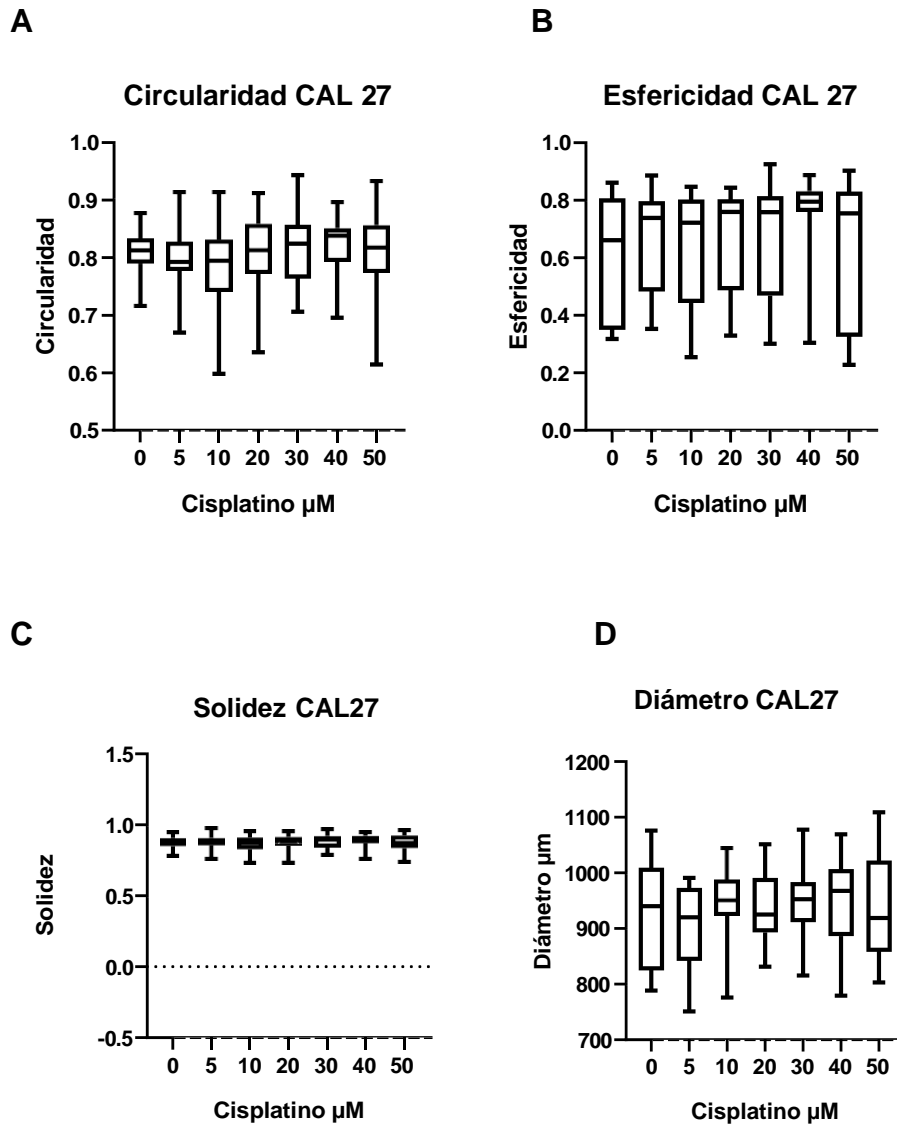


Figura 7: Parámetros morfológicos de los esferoides de CAL 27 no tratados. Los parámetros morfológicos de (A) Circularidad/Convexidad, (B) Esfericidad, (C) Solidez y (D) Diámetro se midieron a las 72 horas pretratamiento. Los diagramas de cajas y bigotes muestran los datos por grupo de tratamiento, (n=24). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos para ninguno de los parámetros establecidos $p > 0.05$.

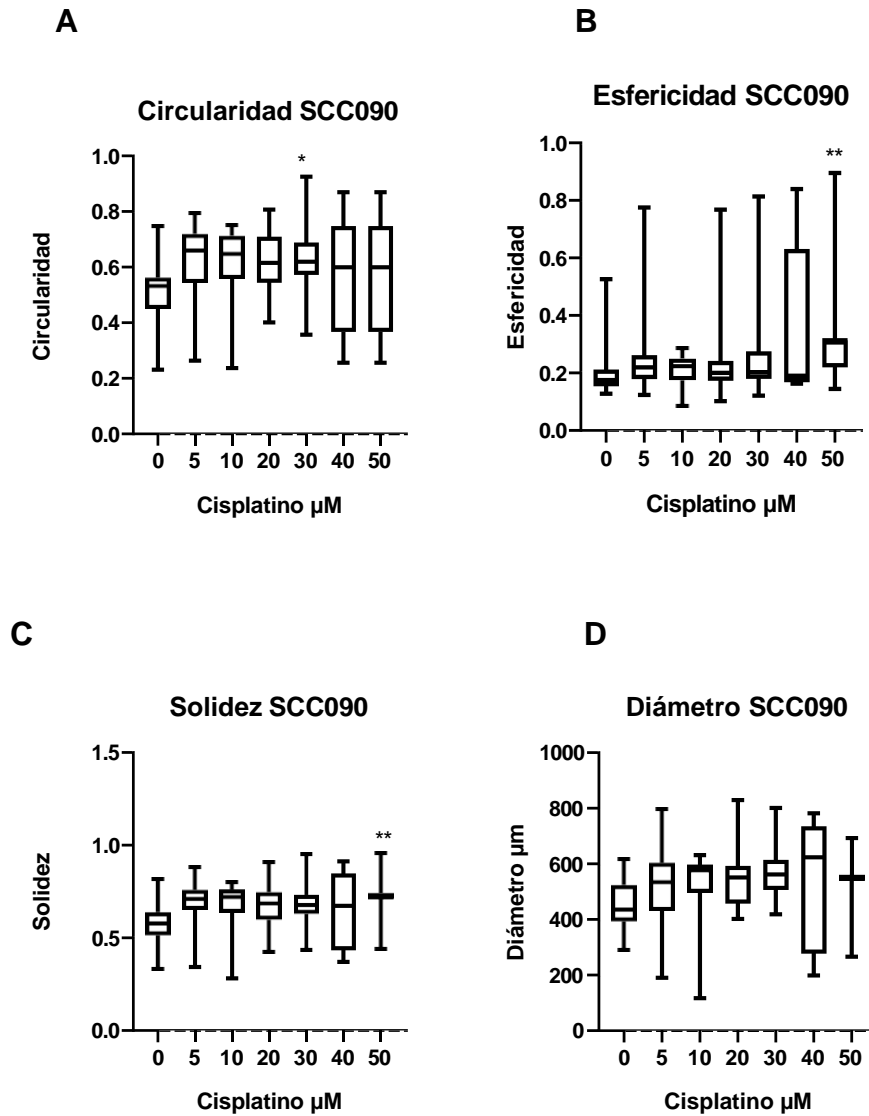


Figura 8: Parámetros morfológicos de los esferoides de SCC090 no tratados. Los parámetros morfológicos de (A) Circularidad/Convexidad, (B) Esfericidad, (C) Solidez y (D) Diámetro se midieron a las 72 horas pretratamiento. Los diagramas de cajas y bigotes muestran los datos por grupo de tratamiento, (n=24). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los grupos tratados con 50 μM para el parámetro de esfericidad y solidez y en el grupo de 30 μM para el parámetro de circularidad.(**) (*) $p < 0.05$.

4.2 Evaluación de citotoxicidad del fármaco de prueba

4.2.1 Evaluación de citotoxicidad en cultivo monocapa (2D)

Para evaluar el comportamiento celular de los esferoides en términos de viabilidad celular, se realizó la prueba de resazurina inicialmente en los cultivos en monocapa para las 2 líneas celulares, con el fin determinar las concentraciones a las cuales se trabajaría en los cultivos 3D. (Figura 9) indica las curvas dosis respuesta para cisplatino en las 2 líneas celulares a las 48 y 72 horas, en donde se encontró que la CI50 para SCCO90 a las 72h fue de 16 a 19 μM y para CAL27 a las 72h fue de 5 a 7 μM , La inhibición de la viabilidad celular en cultivos monocapa expuestos a varias concentraciones de cisplatino fue mayor que en esferoides (Figura 10) indicando que los esferoides CAL 27 Y SCC090 se vuelven más resistentes a los tratamientos, como ya ha sido descrito, debido a su morfología y a la manera no uniforme en la cual ingresan las sustancias al mismo.

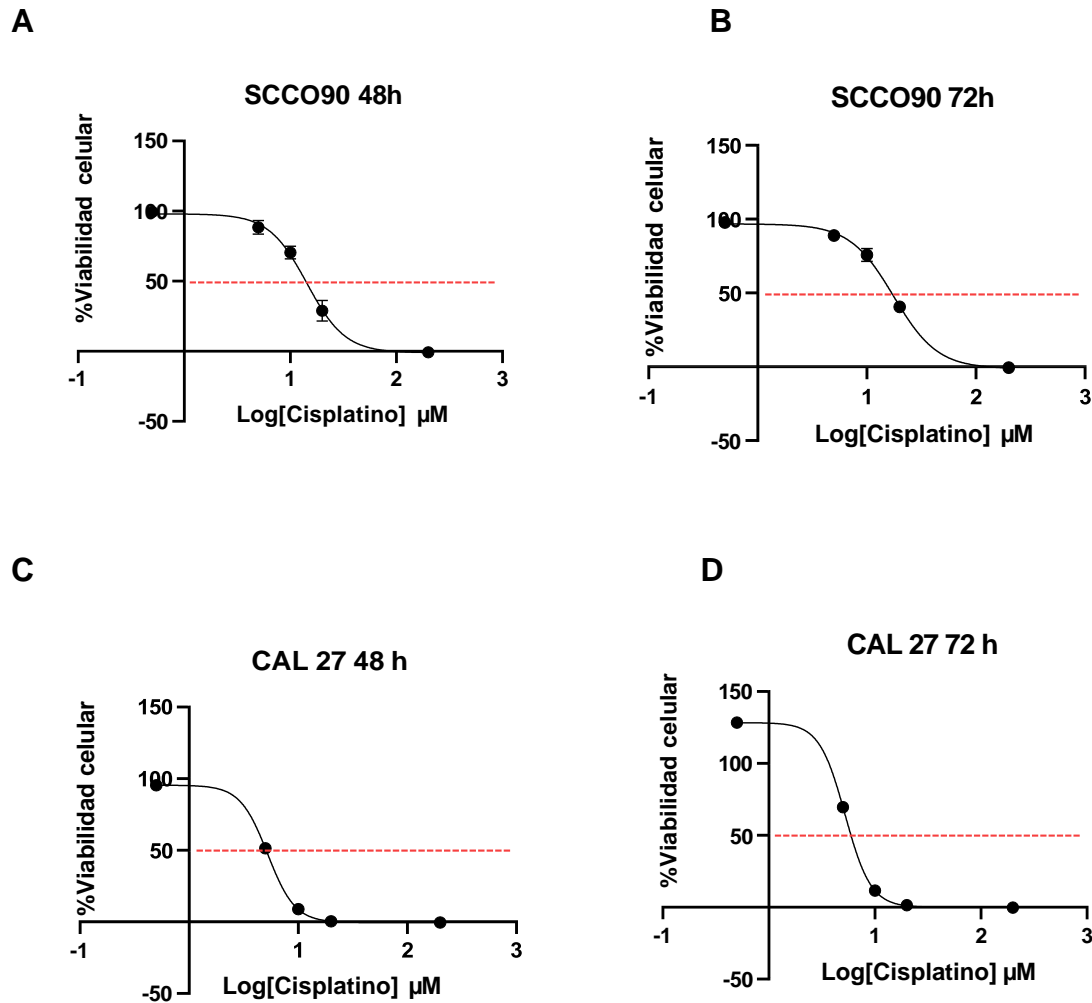


Figura 9: Curvas concentración respuesta de los efectos sobre la viabilidad celular en 2D tratados con cisplatino. Se trataron las células con cisplatino a 200, 20, 10, 5 y 0,5 μM durante 48 y 72h para SCC090 A y B, y para CAL 27 C y D, los datos se ajustaron a una concentración de inhibidor logarítmico sigmoideal no lineal frente al modelo de pendiente variable de respuesta normalizada usando el software GraphPad Prism 8. Se presentan los datos de CI50 normalizada \pm DE (n = 3) de pozos por triplicado para cada concentración de compuesto.

4.2.2 Evaluación de citotoxicidad en cultivo (3D) tipo esferoide.

Una vez realizadas las curvas de concentración respuesta para los cultivos en monocapa, y basados en la literatura, donde se reporta que el cultivo 3D aporta mayor resistencia a los tratamientos debido a la morfología y disposición celular, se determinó escoger 6 concentraciones del medicamento para SCC090 y CAL 27, se trataron con cisplatino 5,10,20,30,40 y 50 μM , durante 72 horas, en la figura 10, se observa que para los esferoides SCC090 la concentración, en la que hubo mayor pérdida de porcentaje de viabilidad celular con respecto al control no tratado fue a 50 μM a diferencia de las células CAL27, las cuales presentaron mayor disminución del porcentaje de viabilidad celular a 30 μM con respecto al control no tratado.

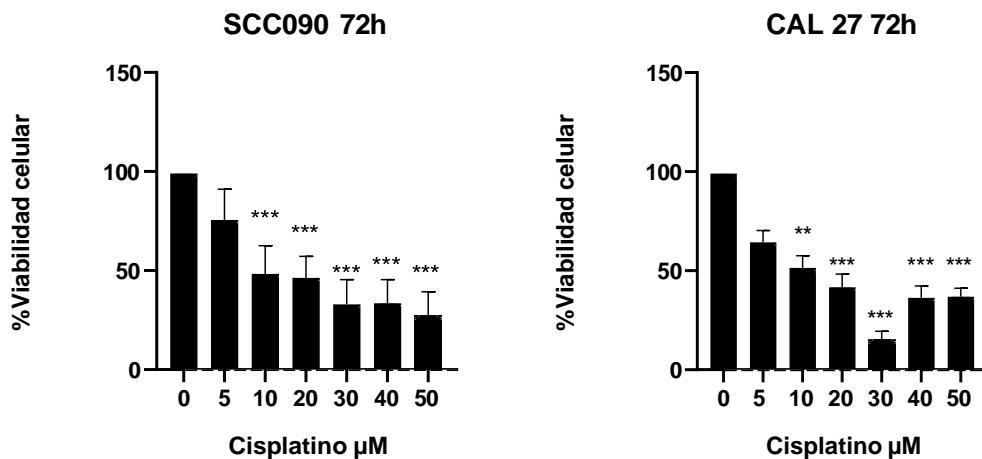


Figura 10: Curva concentración - respuesta de los efectos sobre la viabilidad celular de esferoides CAL 27 y SCC090 tratados con cisplatino. Los esferoides se trataron con 6 concentraciones de cisplatino 5,10,20,30,40 y 50 μM . Cada barra representa la mediana y el rango intercuartílico de 2 experimentos independientes con 12 réplicas para tiempos de evaluación de 72 h. (** $p < 0,05$). (***) $p < 0,01$).

El comportamiento citotóxico del medicamento cisplatino para cada línea celular, mostró una mayor resistencia a la citotoxicidad en células cultivadas en 3D en comparación con

cultivos en monocapa, lo que indica que las células en una estructura agregada son mucho más resistentes que las células que crecen en monocapa. La resistencia al tratamiento en cultivo 3D se puede atribuir a la difusión limitada a través del esferoide y la privación de oxígeno en zonas más profundas del mismo. De igual forma, las concentraciones de cisplatino a las cuales se produjo una mayor disminución de la viabilidad celular fueron diferentes para los 2 cultivos de esferoides generados, para SCC0090 fue de 50 μM y para CAL 27 fue de 30 μM , adicionalmente se observó que los esferoides CAL 27 presentan tendencia a generar resistencia al cisplatino, lo que se evidencia en el ensayo de citotoxicidad celular realizado, en donde se detecta cambio de tendencia de muerte celular ya que se presenta una recuperación de la capacidad de proliferación celular al evaluar concentraciones de 40 y 50 μM , al menos bajo las condiciones evaluadas, lo que podría estar indicando aparición de tolerancia o resistencia que deber ser estudiada.

4.3 Estimación de los cambios en los parámetros morfológicos postratamiento

El análisis de imágenes realizadas con microscopía invertida y la reconstrucción tridimensional que se obtuvo con el software ReVISP para los grupos pre y postratamiento, mostraron modificaciones relacionadas principalmente con el tamaño y morfología del esferoide (Figura 11 A y B). Dichas observaciones se compararon con los datos obtenidos en las mediciones de cada parámetro, los resultados se muestran más adelante en la sección 5.4.

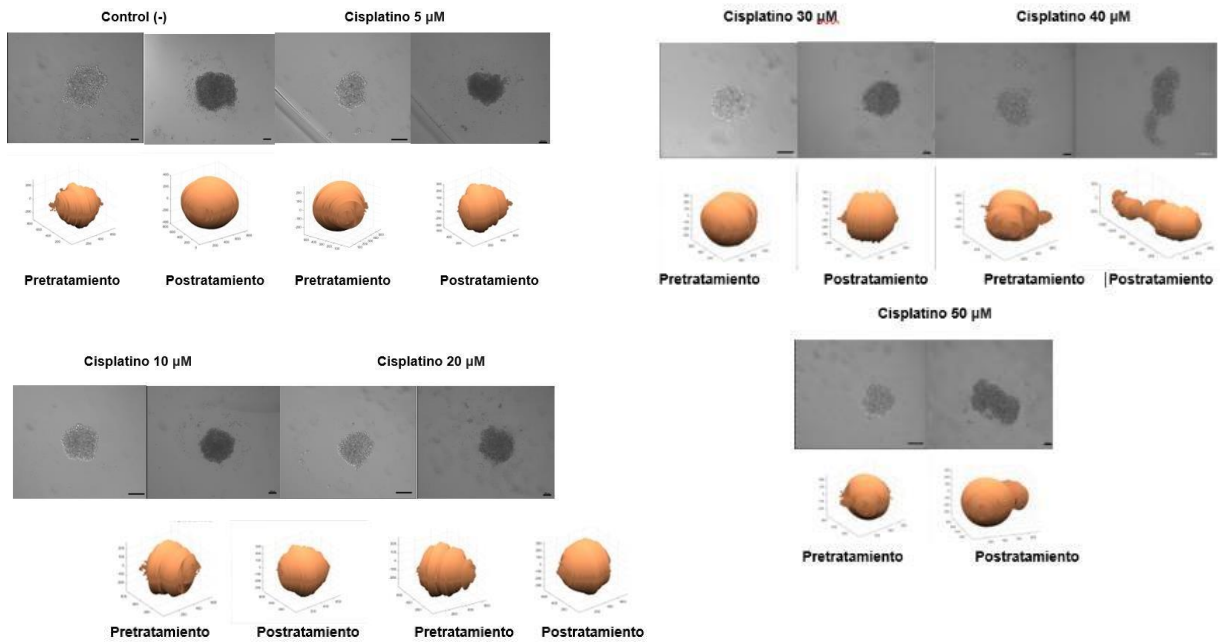
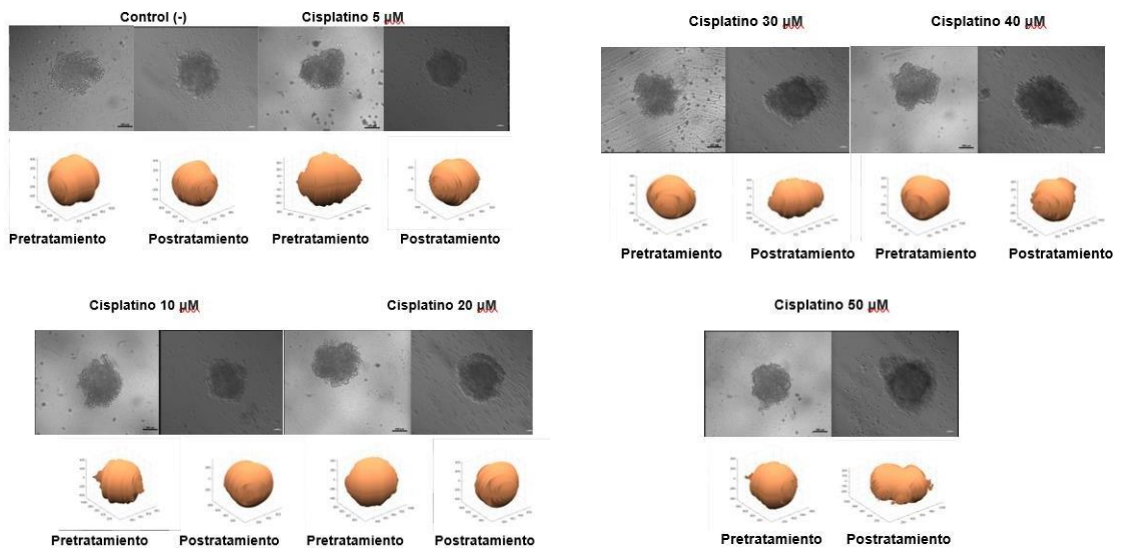
A. Esferoides línea celular SCC090**B. Esferoides línea celular CAL27**

Figura 11: Esferoides tridimensionales de SCC090 (A) CAL 27 (B) y su respectiva reconstrucción 3D pre y postratamiento. Se muestran algunas de las imágenes más representativas de los esferoides antes y después de los tratamientos con cisplatino

5,10,20,30,40 y 50 μ M a 72horas. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio óptico Zeiss Imager.M2BX y una cámara CCD monocromática AxioCam HRm. Barra de escala 200 μ M. Adicionalmente se observa la reconstrucción tridimensional realizada con el software ReViSP.

4.4 Evaluación de los cambios postratamiento por parámetro morfológico.

Para el análisis de los parámetros morfológicos de diámetro, solidez, volumen y esfericidad se obtuvieron los datos de un total de 168 esferoides repartidos en 7 grupos de tratamiento, para cada línea celular antes y después del tratamiento con cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M a 72 h.

4.4.1 Cambios en el diámetro en esferoides SCC090

Los esferoides de la línea SCC090 iniciaron con diámetros que oscilan entre 116,8 y 829,6 μ m pretratamiento. Se observó un aumento significativo del diámetro en los esferoides tratados con 5, 10, 20, 30 y 50 μ M de cisplatino, respecto a su correspondiente control $p < 0.001$, a excepción del grupo tratado con 40 μ M. De igual manera el diámetro en los controles no tratados presentó un aumento significativo (Figura 12).

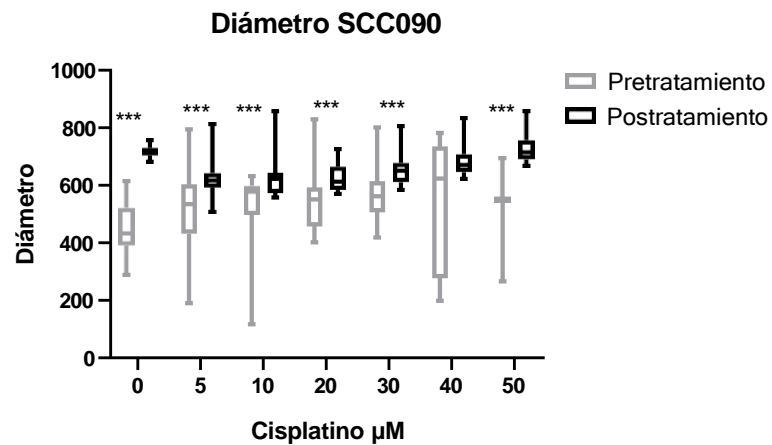


Figura 12: Diagrama de diámetro por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con el diámetro en los grupos pre y postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50µM a 72 horas. Se muestran los datos de las mediciones de 24 esferoides por grupo. Los asteriscos (***) $p < 0.001$ representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al control no tratado.

4.4.2 Cambios en la solidez en esferoides SCC090

Los cambios relacionados con la solidez de los esferoides SCC090, presentaron un aumento significativo con respecto al control para todos los grupos tratados, incluidos los controles no tratados (Figura13).

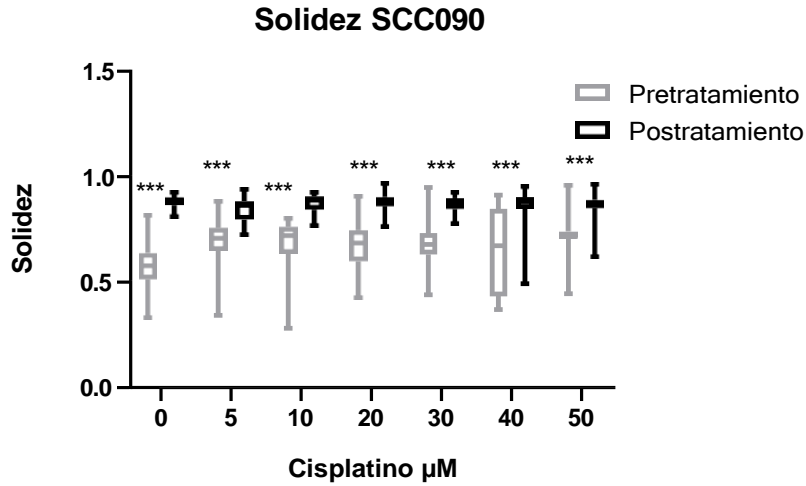


Figura 13: Diagrama de solidez por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con la solidez de los esferoideos SCC090 en los grupos pre y postratamiento de los esferoideos tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50µM a 72 horas. Se muestran los datos de las mediciones de 24 esferoideos por grupo. Los asteriscos (***) $p < 0.001$ representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al control no tratado.

4.4.3 Cambios en el volumen en esferoideos SCC090

En cuanto al volumen de los esferoideos SCC090, al igual que con la solidez, se observó que el cisplatino a las 6 concentraciones probadas induce un incremento significativo con respecto al esferoide no tratado, incluyendo los controles no tratados, siendo más evidente para el grupo de cisplatino a 50 µM, pero con resultados estadísticamente significativos para todos los grupos ($p < 0,001$).

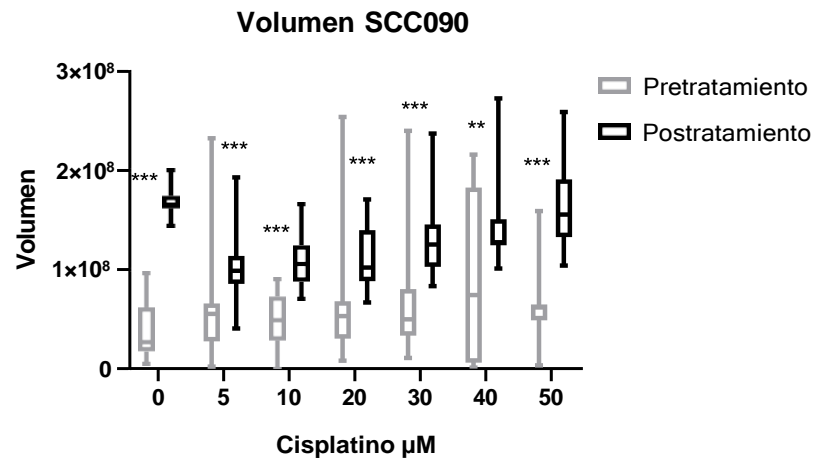


Figura 14: Diagrama de volumen por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con el volumen de la línea celular SCC090 en los grupos pre y postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μM a 72 horas. Se muestran los datos de las mediciones de 24 esferoides por grupo. Los asteriscos (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0,002$ representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al control no tratado.

4.4.4 Cambios en la esfericidad en esferoides SCC090

A diferencia de los anteriores parámetros, el índice de esfericidad para los esferoides SCC090 mostro un aumento en todos grupos de tratamiento, incluido el control sin tratamiento, a excepción del grupo tratado con 40 μM a las 72 horas, en donde se observa una disminución estadísticamente significativa con respecto al control no tratado, ($p < 0,002$) (Figura 15).

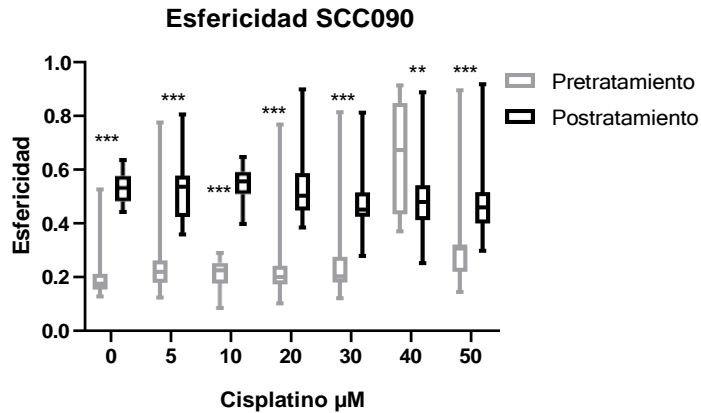


Figura 15: Diagrama de esfericidad por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con la esfericidad en los grupos pre y postratamiento de los esferoides de SCC090 tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50µM a 72 horas. Se muestran los datos de las mediciones de 24 esferoides por grupo. Los asteriscos (***) $p < 0.001$ (**) $p < 0.002$ representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al control no tratado.

Para todos los parámetros anteriormente evaluados, se observó un aumento significativo en los grupos control, de manera que no se garantizó la uniformidad de los cultivos previo al tratamiento, es posible que estas diferencias o variaciones pudieran deberse a que con el transcurso del tiempo del ensayo, que fueron 148 horas (72 horas para generar los esferoides, 72 horas de incubación con el medicamento, 4 horas de incubación, con resazurina para detección de viabilidad celular), el esferoide se fuera consolidando cada vez más, aumentando así su tamaño y volumen, y también obteniendo mayor densidad de empaquetamiento celular para el caso del aumento de solidez, esto, debido a que no se pre visualizó con suficiente precisión, cuanto tiempo tardaba el cultivo bidimensional en adquirir la conformación de esferoide más estable y cuánto tiempo permanecía el esferoide conformado sin sufrir alteración de manera espontánea, antes de realizar los tratamientos con el medicamento.

4.4.5 Cambios en el diámetro en esferoides CAL27

Los esferoides de la línea celular CAL27 iniciaron con diámetros que variaron entre 750 y 1108 µm previos al tratamiento. Se observó un aumento significativo del diámetro en los esferoides tratados con 5 y 10 µM de cisplatino, respecto a su correspondiente control $p < 0.001$, contrario a lo que se observó para los grupos con cisplatino a 40 y 50µM donde

se presentó una disminución significativa con respecto al control (Figura 16).

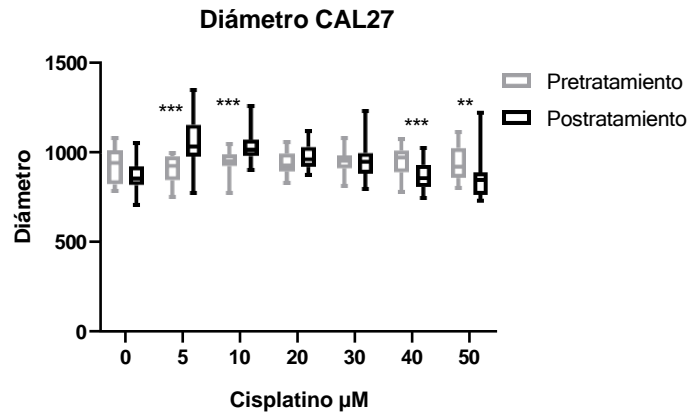


Figura 16: Diagrama de diámetro por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con el diámetro de la línea celular CAL27 en los grupos pre y postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50µM a 72 horas. Se muestran los datos de las mediciones de 24 esferoides por grupo. Los asteriscos (***) $p < 0.001$ (**) $p < 0,002$ representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al control no tratado.

4.4.6 Cambios en la solidez en esferoides CAL 27

Los cambios relacionados con la solidez de los esferoides CAL 27, presentaron una disminución significativa con respecto al control para todos los grupos tratados, a excepción de grupo tratado con 10 µM de cisplatino, donde la disminución no fue estadísticamente significativa. Se presentó una disminución significativa incluso en el grupo control (Figura17).

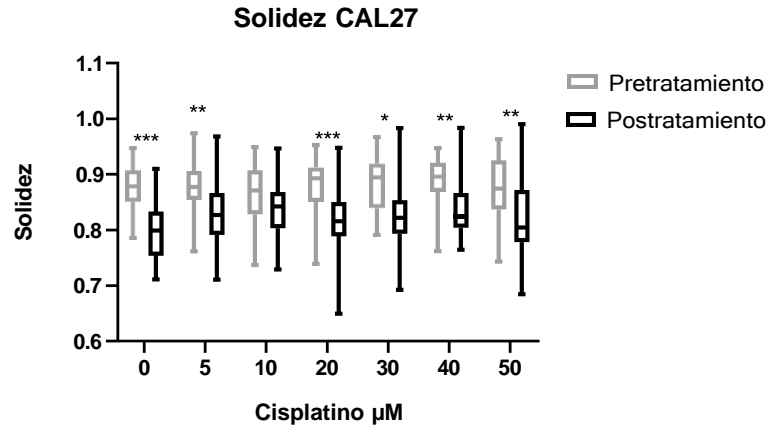


Figura 17: Diagrama de solidez por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con la solidez de la línea celular CAL27 en los grupos pre y postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50µM a 72 horas. Se muestran los datos de las mediciones de 24 esferoides por grupo. Los asteriscos (***) $p < 0.001$ representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al control no tratado.

4.4.7 Cambios en el volumen en esferoides CAL27

En cuanto al volumen de la línea celular CAL27, al igual que con el diámetro, se observó un aumento significativo del volumen en los esferoides tratados con 5 y 10 µM de cisplatino, respecto a su correspondiente control $p < 0.001$, contrario a lo que se observó para los grupos con cisplatino a 40 y 50µM donde se presentó una disminución significativa con respecto al control, también se observa una disminución significativa en el grupo control (Figura 18).

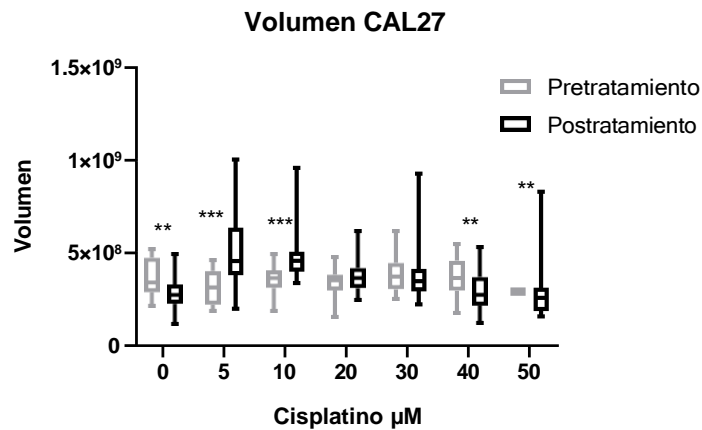


Figura 18: Diagrama de volumen por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con el volumen la línea celular CAL27 en los grupos pre y postratamiento de los esferoides tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µM a 72 horas. Se muestran los datos de las mediciones de 24 esferoides por grupo. Los asteriscos (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0,002$ representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al control no tratado.

4.4.8 Cambios en la esfericidad en esferoides CAL27

Los cambios relacionados con la esfericidad de los esferoides CAL 27, presentaron una disminución significativa con respecto al control para todos los grupos tratados, similar al comportamiento analizado en el parámetro de solidez, presentando de igual manera diferencias significativas en el grupo control (Figura19).

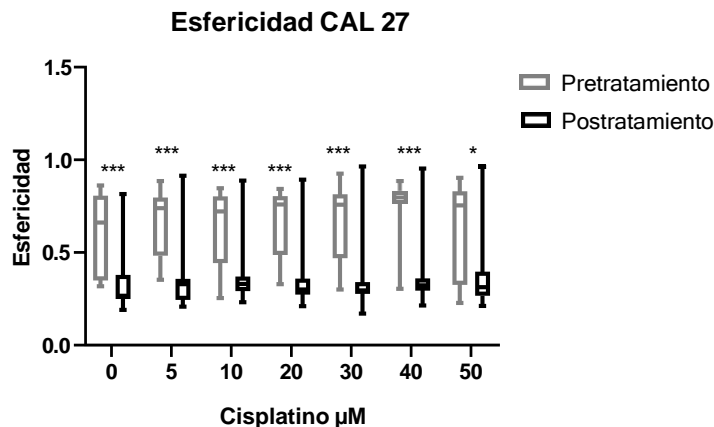


Figura 19: Diagrama de esfericidad por grupo de tratamiento. Se muestran los cambios relacionados con la esfericidad la línea celular CAL27 en los grupos pre y postratamiento de los esferoides CAL27 tratados con 6 concentraciones diferentes de cisplatino 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µM a 72 horas. Se muestran los datos de las mediciones de 24 esferoides por grupo. Los asteriscos (***) $p < 0.001$ (*) $p < 0,05$ representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con respecto al control no tratado.

Similar a lo observado con la línea SCC090, para los parámetros de solidez volumen y esfericidad, se presentaron diferencias estadísticamente significativas en los grupos control, pero esta vez a la inversa, es decir se presentó una disminución significativa en el valor de estos parámetros para el grupo control; es posible que estas diferencias pudieran deberse a que con el paso del tiempo que duró el ensayo, el esferoide fue perdiendo su integridad, hasta prácticamente desintegrarse sin haber aplicado ningún tratamiento; si bien se encontraba estandarizado el protocolo y publicado en la literatura el tiempo de trabajo con esta línea celular, el cual reportaba que a las 72 de cultivo, se conformaba los esferoides más estables y duraban en esa conformación hasta 1 semana, pudimos observar que incluso cambiando de laboratorio y operador, pueden presentarse estas variaciones.

4.5 Correlación entre los cambios morfológicos del esferoide y el porcentaje de viabilidad celular.

Con el propósito de conocer si existe relación lineal entre los cambios de los parámetros morfológicos evaluados de los esferoides y los resultados de viabilidad celular, se realizó una prueba de coeficiente de correlación Spearman (Rho de Spearman) mediante el software de análisis estadístico Graph Pad Prism 8, para cada parámetro por cada

tratamiento y para cada línea celular.

La interpretación de los resultados se realizó empleando la escala 2 del coeficiente de correlación que se muestra en la tabla a continuación: (ver Tabla 1).

Tabla 1: Escala de correlación Spearman utilizada (35)

Correlación	Rho
Negativa perfecta	-1,0
Negativa moderada débil	-0,5
Ninguna correlación	0
Correlación positiva moderada	+0,5
Correlación positiva perfecta	+1,1

Las hipótesis formuladas para realizar este análisis fueron: Hipótesis Alterna-Existe alguna correlación entre los cambios en los parámetros morfológicos de los esferoides y el porcentaje de viabilidad celular. Hipótesis Nula- No existe correlación entre los cambios en los parámetros morfológicos de los esferoides y el porcentaje de viabilidad celular. Los resultados de la correlación entre las variables y la viabilidad por grupo de tratamiento arrojaron que no existe correlación entre ninguno de los parámetros y el porcentaje de viabilidad celular, pero si se encontraron algunas correlaciones positivas con significancia estadística, entre ciertos parámetros para las 2 líneas celulares, como se muestran en las tablas a continuación:

Tabla 2: Correlaciones entre los parámetros morfológicos y la viabilidad celular en los esferoides SCC090 no tratados.

CONTROL (-)	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	-0,445	-0,273	0,670	0,316
SOLIDEZ	-0,445	1,000	0,877	-0,315	-0,226
ESFERICIDAD	-0,273	0,877	1,000	-0,276	-0,136
VOLUMEN	0,670	-0,315	-0,276	1,000	0,286
VIABILIDAD	0,316	-0,226	-0,136	0,286	1,000

Para los resultados de correlación de los esferoides no tratados, no se observaron correlaciones positivas ni negativas con significancia estadística, entre los parámetros analizados y la viabilidad celular (Tabla 2).

Tabla 3: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 5 μM de cisplatino.

CISPLATINO 5 μM	DIÁMETRO	ESFERICIDAD	SOLIDEZ	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	-0,126	0,177	0,272	-0,168
ESFERICIDAD	-0,126	1,000	-0,079	0,310	0,021
SOLIDEZ	0,177	-0,079	1,000	-0,150	0,139
VOLUMEN	0,272	0,310	-0,150	1,000	0,324
VIABILIDAD	-0,168	0,021	0,139	0,324	1,000

Para los resultados de correlación de los esferoides tratados con 5 μM de cisplatino, no se observaron correlaciones positivas ni negativas con significancia estadística, entre los parámetros analizados y la viabilidad celular (Tabla 3).

Tabla 4: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 10 μM de cisplatino.

CISPLATINO 10 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	-0,071	-0,338	0,652	-0,241
SOLIDEZ	-0,071	1,000	-0,383	0,107	-0,451
ESFERICIDAD	-0,338	-0,383	1,000	0,035	0,095
VOLUMEN	0,652	0,107	0,035	1,000	-0,564
VIABILIDAD	-0,241	-0,451	0,095	-0,564	1,000

Para los resultados de correlación de los esferoides tratados con 10 μM de cisplatino, no se observaron correlaciones positivas ni negativas con significancia estadística, entre los parámetros analizados y la viabilidad celular (Tabla 4).

Tabla 5: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 20 μM de cisplatino.

CISPLATINO 20 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	-0,222	0,057	0,8791***	-0,251
SOLIDEZ	-0,222	1,000	0,473	-0,164	0,307
ESFERICIDAD	0,057	0,473	1,000	0,240	0,320
VOLUMEN	0,8791***	-0,164	0,240	1,000	-0,179
VIABILIDAD	-0,251	0,307	0,320	-0,179	1,000

Los (***) significan $p < 0,001$

Con respecto a los esferoides tratados con cisplatino 20 μM , se encontraron correlaciones fuertes y positivas entre el volumen y el diámetro de los esferoides ($p < 0,05$), lo que permite inferir que hay una correlación lineal entre estos 2 parámetros, es decir a mayor volumen se observará un aumento en el diámetro, a esta concentración (Tabla 5).

Tabla 6: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 30 μM de cisplatino.

CISPLATINO 30 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	-0,036	0,206	0,819	-0,183
SOLIDEZ	-0,036	1,000	0,146	0,078	0,265
ESFERICIDAD	0,206	0,146	1,000	0,516	-0,210
VOLUMEN	0,819	0,078	0,516	1,000	-0,274
VIABILIDAD	-0,183	0,265	-0,210	-0,274	1,000

Para los resultados de correlación de los esferoides tratados con 30 μM de cisplatino, no se observaron correlaciones positivas ni negativas con significancia estadística, entre los parámetros analizados y la viabilidad celular (Tabla 6).

Tabla 7: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 40 μM de cisplatino.

CISPLATINO 40 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	-0,173	-0,489	0,579	-0,371
SOLIDEZ	-0,173	1,000	-0,213	-0,124	-0,003
ESFERICIDAD	-0,489	-0,213	1,000	0,020	0,383
VOLUMEN	0,579	-0,124	0,020	1,000	0,157
VIABILIDAD	-0,371	-0,003	0,383	0,157	1,000

Para los resultados de correlación de los esferoides tratados con 40 μM de cisplatino, no se observaron correlaciones positivas ni negativas con significancia estadística, entre los parámetros analizados y la viabilidad celular (Tabla 7).

Tabla 8: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides SCC090 tratados con 50 μM de cisplatino.

CISPLATINO 50 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	0,019	0,404	0,657	0,545
SOLIDEZ	0,019	1,000	0,122	0,118	-0,140
ESFERICIDAD	0,404	0,122	1,000	0,6484***	0,537
VOLUMEN	0,657	0,118	0,6484***	1,000	0,433
VIABILIDAD	0,545	-0,140	0,537	0,433	1,000

Los (***) significan $p < 0,001$

Con respecto a los esferoides tratados con cisplatino 50 μM , se encontraron correlaciones fuertes y positivas entre el volumen y la esfericidad de los esferoides ($p < 0,05$), lo que permite inferir que hay una correlación lineal entre estos 2 parámetros, es decir a mayor volumen se observará un aumento en la esfericidad, para esta concentración (Tabla 8).

Tabla 9: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 no tratados.

CONTROL (-)	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	0,470	0,607	0,942	0,071
SOLIDEZ	0,470	1,000	0,874	0,680	0,162
ESFERICIDAD	0,607	0,874	1,000	0,733	0,029
VOLUMEN	0,942	0,680	0,733	1,000	0,038
VIABILIDAD	0,071	0,162	0,029	0,038	1,000

Para los resultados de correlación de los esferoides de CAL 27 no tratados, no se observaron correlaciones positivas ni negativas con significancia estadística, entre los parámetros analizados y la viabilidad celular (Tabla 9).

Tabla 10: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 5 μM de cisplatino.

CISPLATINO 5 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	0,488	0,305	0,863	-0,105
SOLIDEZ	0,488	1,000	0,682	0,604	0,144
ESFERICIDAD	0,305	0,682	1,000	0,528	0,103
VOLUMEN	0,863	0,604	0,528	1,000	-0,133
VIABILIDAD	-0,105	0,144	0,103	-0,133	1,000

Para los resultados de correlación de los esferoides de CAL 27 tratados con 5 μM , no se observaron correlaciones positivas ni negativas con significancia estadística, entre los parámetros analizados y la viabilidad celular (Tabla 10).

Tabla 11: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 10 μM de cisplatino.

CISPLATINO 10 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	0,158	0,056	0,789	-0,340
SOLIDEZ	0,158	1,000	0,865	0,417	-0,075
ESFERICIDAD	0,056	0,865	1,000	0,331	0,031
VOLUMEN	0,789	0,417	0,331	1,000	-0,154
VIABILIDAD	-0,340	-0,075	0,031	-0,154	1,000

Para los resultados de correlación de los esferoides de CAL 27 tratados con 10 μM , no se observaron correlaciones positivas ni negativas con significancia estadística, entre los parámetros analizados y la viabilidad celular (Tabla 11).

Tabla 12: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 20 μM de cisplatino.

CISPLATINO 20 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	-0,002	0,015	0,845	-0,286
SOLIDEZ	-0,002	1,000	0,844	0,253	-0,018
ESFERICIDAD	0,015	0,844	1,000	0,271	0,055

VOLUMEN	0,845	0,253	0,271	1,000	-0,178
VIABILIDAD	-0,286	-0,018	0,055	-0,178	1,000

Para los resultados de correlación de los esferoides de CAL 27 tratados con 20 μM , no se observaron correlaciones positivas ni negativas con significancia estadística, entre los parámetros analizados y la viabilidad celular (Tabla 12).

Tabla 13: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 30 μM de cisplatino.

CISPLATINO 30 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	0,203	0,238	0,831	-0,378
SOLIDEZ	0,203	1,000	0,883	0,446	-0,322
ESFERICIDAD	0,238	0,883	1,000	0,506	-0,257
VOLUMEN	0,831	0,446	0,506	1,000	-0,384
VIABILIDAD	-0,378	-0,322	-0,257	-0,384	1,000

Para los resultados de correlación de los esferoides de CAL 27 tratados con 30 μM , no se observaron correlaciones positivas ni negativas con significancia estadística, entre los parámetros analizados y la viabilidad celular (Tabla 13).

Tabla 14: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 40 μM de cisplatino.

CISPLATINO 40 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	0,630	0,503	0,969	0,011
SOLIDEZ	0,630	1,000	0,918***	0,728	0,029
ESFERICIDAD	0,503	0,918***	1,000	0,636	-0,130
VOLUMEN	0,969	0,728	0,636	1,000	-0,008
VIABILIDAD	0,011	0,029	-0,130	-0,008	1,000

Los (***) significan $p < 0,001$

Con respecto a los esferoides tratados con cisplatino 40 μM , se encontraron correlaciones fuertes y positivas entre la esfericidad y la solidez de los esferoides ($p < 0,05$), lo que permite inferir que hay una correlación lineal entre estos 2 parámetros, es decir a mayor solidez se observará un aumento en la esfericidad, para esta concentración (Tabla 14).

Tabla 15: Correlación entre parámetros morfológicos y viabilidad celular de los esferoides CAL 27 tratados con 50 μM de cisplatino.

CISPLATINO 50 μM	DIÁMETRO	SOLIDEZ	ESFERICIDAD	VOLUMEN	VIABILIDAD
DIÁMETRO	1,000	0,438	0,337	0,948***	0,032
SOLIDEZ	0,438	1,000	0,863	0,622	0,040
ESFERICIDAD	0,337	0,863	1,000	0,534	-0,113
VOLUMEN	0,948***	0,622	0,534	1,000	0,018
VIABILIDAD	0,032	0,040	-0,113	0,018	1,000

Los (***) significan $p < 0,001$

Con respecto a los esferoides tratados con cisplatino 50 μM , se encontraron correlaciones fuertes y positivas entre el volumen y el diámetro de los esferoides ($p < 0,05$), lo que permite inferir que hay una correlación lineal entre estos 2 parámetros, es decir a mayor volumen se observará un aumento en el diámetro, para esta concentración (Tabla 15).

Con el objetivo de hacer una representación más clara del comportamiento de los datos se realizaron las gráficas de correlación con los parámetros que mostraron correlaciones positivas fuertes con significancia estadística $p < 0,05$, en donde se observa una correlación lineal para los parámetros de volumen y diámetro y entre volumen y esfericidad a los 20 μM y 50 μM de cisplatino para la línea SCC090, al igual que para los parámetros de esfericidad y solidez y volumen y diámetro a los 40 y 50 μM de cisplatino respectivamente (Figura 20).

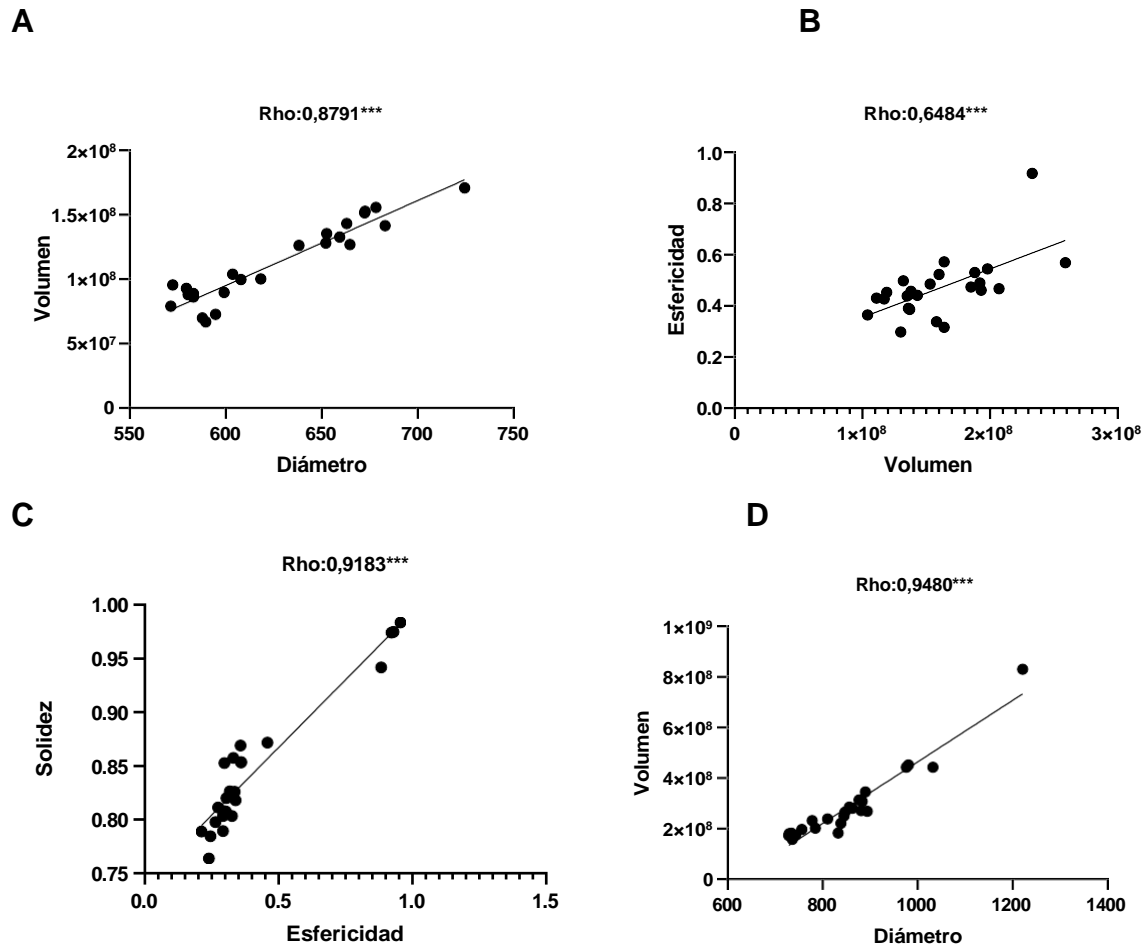


Figura 20: Gráficos de correlación entre Esfericidad y solidez/Diámetro y volumen y diámetro. Se muestran las correlaciones más fuertes positivas entre el Volumen y el Diámetro (A) y esfericidad y diámetro (B) para los esferoides SCC090 y las correlaciones más fuertes y positivas entre solidez y esfericidad (C) y volumen y diámetro (D) para los esferoides CAL27

Los datos que arrojó el análisis de correlación de spearman, para los 2 cultivos tipo esferoide coinciden con lo reportado previamente para esferoides de CAL 27 (31), es decir que no se observaron fuertes correlaciones entre los parámetro y el porcentaje de viabilidad celular, pero en cambio sí se observaron fuertes correlaciones entre parámetros, para el caso de los esferoides SCC090, hubo una correlación significativa entre el volumen con el diámetro y la esfericidad con el volumen, y para los esferoides CAL27, entre volumen con diámetro y solidez con esfericidad, lo que se ajusta a lo presentado en el análisis de parámetros morfológicos pre y pos tratamiento realizados con la ayuda del software Ana SP y ReVISP.

Estudios previamente desarrollados (37, 38, 39) reportan que confiar únicamente en mediciones de viabilidad basados en ensayos de metabolismo celular, no es tan diciente, debido a la arquitectura característica del esferoide, al medir únicamente el metabolismo, estamos recibiendo solo información de lo que le ocurre a la capa más externa del esferoide, la proliferativa, la cual es metabólicamente activa y es quien realizaría la reducción del colorante, y nos llevaría a subestimar el efecto de la sustancia que se esté probando, esto porque las células que se encuentran en capas subyacentes, como quiescente y necrótica, mantienen disminuido o nulo su metabolismo de manera fisiológica (40, 41, 42). La incorporación de otros métodos para evaluación de viabilidad celular como fluorescencia que no tienen relación con metabolismo celular, pero si con daño a la membrana (43) o el análisis de parámetros morfológicos reportados previamente en la literatura y utilizado por nosotros (30), nos sirven para realizar un análisis más detallado y encontrar un verdadero impacto de lo que sucede con el comportamiento celular dentro de los diferentes esferoides.

5 . CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó que estas líneas tumorales derivadas de cáncer de cabeza y cuello producen esferoides con distintas morfologías, tamaños y estados de compactación celular, los cuales desarrollan microambientes y exhiben gradientes de penetración y distribución de sustancias, que pueden variar mucho incluso entre una misma línea celular, si bien estas variaciones no pueden deberse completamente al efecto del tratamiento con cisplatino, ya que se observaron diferencias morfológicas previas al tratamiento, para el caso de la línea CAL27 se observó una disminución significativa en el diámetro con las concentraciones más altas del cisplatino, y este fue el único parámetro que garantizó uniformidad previa al tratamiento, este aumento puede estar relacionado con el tipo de muerte celular (apoptosis) que hace que el esferoide se contraiga disminuyendo así su tamaño y por ende su diámetro.

6 . RECOMENDACIONES

Si bien se encuentra reportado un protocolo para la obtención de cultivos tridimensionales tipo esferoides a partir de la línea CAL 27, debido a las variaciones encontradas en este estudio, se hace necesario estandarizar y caracterizar la obtención de esferoides para las 2 líneas celulares CAL 27 y SCC090, es decir probar nuevamente en el laboratorio de farmacogenética del cáncer, diferentes densidades celulares, tiempos de conformación y duración del cultivo en esferoide, entre otros, que permitan garantizar un cultivo más homogéneo, para que el tamizaje de nuevas sustancias pueda ser evaluado de una manera más óptima y robusta.

7 . REFERENCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods, and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
2. Park SJ, Ye W, Xiao R, Silvin C, Padget M, Hodge JW, Van Waes C, Schmitt NC. Cisplatin and oxaliplatin induce similar immunogenic changes in preclinical models of head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2019 Aug;95:127-135.3.
3. Close DA, Johnston PA. Detection and impact of hypoxic regions in multicellular tumor spheroid cultures formed by head and neck squamous cell carcinoma cells lines. *SLAS Discov*. 2022;27(1):39-54.
4. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck *J Clin Pathol*. 2006;59(5):445-53.
5. Brockstein BE. Management of recurrent head and neck cancer: recent progress and future directions. *Drugs*. 2011;71(12):1551-9.
6. Goerner M, Seiwert TY, Sudhoff H. Molecular targeted therapies in head and neck cancer--an update of recent developments-. *Head Neck Oncol* 2010; 14:2-8.
7. Zanoni M, Pignatta S, Arienti C, Bonafè M, Tesei A. Anticancer drug discovery using multicellular tumor spheroid models. *Expert opinion on drug discovery*. 2019;14(3):289-301.
8. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and animal models: are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions?. *International journal of molecular sciences*. 2018 Jan;19(1):18
9. McMillin D.W, Negri J, Mitsiades C.S. The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: Challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2013;12:217-228.

10. Pietras K., Ostman A. Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.* 2010;316:1324-1331.
11. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther.* 2016 Jul; 163:94-108.
12. Świerczewska M, Sterzyńska K, Ruciński M, Andrzejewska M, Nowicki M, Januchowski R, The response and resistance to drugs in ovarian cancer cell lines in 2D monolayers and 3D spheroids, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2023;(165):115152
13. Cárcamo, M. Epidemiología y generalidades del tumor de cabeza y cuello. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2018; 29(4), 388-396.
14. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2020 Nov 26;6(1):92.
15. IARC Publications Website- GLOBOCAN 2020 {citado 21 de junio de 2022} disponible en <https://gco.iarc.fr/today/home>.
16. Michaud DS, Langevin SM, Eliot M, Nelson HH, Pawlita M, McClean MD, Kelsey KT. High-risk HPV types and head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2014 Oct;135(7):1653-61.
17. Strojjan P, Hutcheson KA, Eisbruch A, Beitler JJ, Langendijk JA, Lee AWM, Corry J, Mendenhall WM, Smee R, Rinaldo A, Ferlito A. Treatment of late sequelae after radiotherapy for head and neck cancer. *Cancer Treat Rev.* 2017 Sep;59:79-92
18. Kochanek SJ, Close DA, Camarco DP, Johnston PA. Maximizing the Value of Cancer Drug Screening in Multicellular Tumor Spheroid Cultures: A Case Study in Five Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *SLAS Discov.* 2020 Apr;25(4):329-349.
19. Elrefaey S, Massaro MA, Chiocca S, Chiesa F, Ansarin M. HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice. *Acta Otorhinolaryngologica Italica.* 2014 Oct;34(5):299.
20. Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2013 Jul;13(7):511-8.
21. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng.* 2003 Jul 20;83(2):173-80.
22. Fonseca, A. Potencial antiproliferativo de un extracto de curuba *Passiflora mollissima* (Kunth) LH Bailey sobre un modelo de cultivo 3D tipo esferoide de células de cáncer oral. [Internet]. 2020. [citado: 2023, Julio] Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12495/8471>.

23. Ruppen J, Cortes-Dericks L, Marconi E, Karoubi G, Schmid RA, Peng R, Marti TM, Guenat OT. A microfluidic platform for chemoresistive testing of multicellular pleural cancer spheroids. *Lab Chip*. 2014 Mar;14(6):1198-205.
24. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer- Microenvironment Interactions? *Int J Mol Sci*. 2018 Jan;19(1):181
25. Hsiao AY, Tung YC, Kuo CH, Mosadegh B, Bedenis R, Pienta KJ, Takayama S. Micro-ring structures stabilize microdroplets to enable long term spheroid culture in 384 hanging drop array plates. *Biomed Microdevices*. 2012 Apr;14(2):313-23
26. Corning™ Elplasia™ Microcavity Plates {citado 21 junio 2022} Disponible en <https://www.fishersci.es/shop/products/elplasiamicrocavity%20plates/16445299?searchHijack=true&searchTerm=004441&searchType=RPID&matchedCatNo=004441>.
27. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high- throughput cell function and toxicity analysis. *J. Biomol. Screen*. 2006;11:922- 932.
28. Trédan O, Galmarini C. M, Patel K, Tannock I. F. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute* .2007;99:1441-1454.
29. Matsuda Y, Ishiwata T, Kawamoto Y, Kawahara K, Peng WX, Yamamoto T, Naito Z. Morphological and cytoskeletal changes of pancreatic cancer cells in three-dimensional spheroidal culture. *Med Mol Morphol*. 2010 Dec;43(4):211-7.
30. Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C, Zamagni A, Santi S, Polico R, Bevilacqua A, Tesei A . 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep*.2016; 6:19103.
31. Fonseca-Benitez A, Morantes Medina SJ, Ballesteros-Vivas D, Parada-Alfonso F, Sandra J Perdomo. Passiflora mollissima Seed Extract Induced Antiproliferative and Cytotoxic Effects on CAL 27 Spheroids. *Adv Pharmacol Pharm Sci*. 2022 May 31;2022:4602413.
32. Piccinini F. AnaSP: a software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. *Comput Methods Programs Biomed*. 2015 Apr;119(1):43-52.
33. Piccinini F, Tesei A, Arienti C, Bevilacqua A. Cancer multicellular spheroids: volume assessment from a single 2D projection. *Comput Methods Programs Biomed*. 2015 Feb;118(2):95-106.

34. Escobar, M, Rivera A, Aristizabal, F. estudio comparativo de los métodos de resazurina y mtt en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae* 2010 ; 17(1): 67-74.
35. Hazekawa M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, & Nakashima M. Evaluation of IC50 levels immediately after treatment with anticancer reagents using a real-time cell monitoring device. *Experimental and therapeutic medicine*. 2019;18(4), 3197-3205.
36. Martínez Ortega RM, Tuya Pendás LC, Martínez Ortega M, Pérez Abreu A, Cánovas AM. El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2009 Jun;8(2):0-.
37. Denaro N, Russi E, Adamo V, Colantonio I, Merlano M, C: Postoperative Therapy in Head and Neck Cancer: State of the Art, Risk Subset, Prognosis and Unsolved Questions. *Oncology*. 2011;81:21-29.38.
38. Li H, Wawrose JS, Gooding WE, Garraway LA, Lui VW, Peyser ND, Grandis JR. Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection. *Mol Cancer Res*. 2014 Apr;12(4):571-82.
39. Perez-Ordóñez B; Beauchemin M; Jordan RCK *Molecular Biology of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck*. *J. Clin. Pathol* 2006; 59, 445-453.
40. Ivanov DP, Parker TL, Walker DA, Alexander C, Ashford MB, Gellert PR, Garnett MC. Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres. *PLoS One*. 2014 Aug 13;9(8):e103817.
41. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive Genomic Characterization of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Nature* 2015; 517(7536):576-82.
42. Grantab R; Tannock IF. Penetration of Anticancer Drugs through Tumour Tissue as a Function of Cellular Packing Density and Interstitial Fluid Pressure and Its Modification by Bortezomib. *BMC Cancer* 2012; 12:214.
43. Grantab R; Sivananthan S; Tannock IF. The Penetration of Anticancer Drugs through Tumor Tissue as a Function of Cellular Adhesion and Packing Density of Tumor Cells. *Cancer Res*. 2006; 66(2):1033-1039.