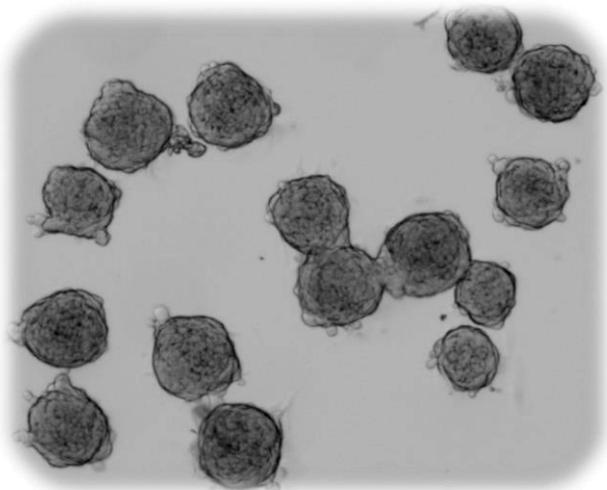

COMPARATIVA DE CULTIVOS EN 2D VERSUS 3D COMO MODELO DE ENSAYO PARA FASES PRECLÍNICAS DEL DESARROLLO DE FÁRMACOS ANTI-TUMORALES Y SU APLICACIÓN AL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO DE UNA LIBRERÍA DE COMPUESTOS COMERCIALES.

COMPARISON OF CULTURES IN 2D VERSUS 3D AS AN ESSAY MODEL FOR ANTI-TUMORAL DRUGS DEVELOPMENT DURING THE PRECLINICAL PHASE AND ITS APPLICATION TO A HIGH-THROUGHPUT SCREENING OF A COMMERCIAL COMPOUNDS LIBRARY.

COMPARATIVA DE CULTIVOS EN 2D VERSUS 3D COMO MODELO DE ENSAIO PARA FASES PRECLÍNICAS DO DESENVOLVEMENTO DE FÁRMACOS ANTI-TUMORAIS E A SÚA APLICACIÓN Ó CRIBADO DE ALTO RENDEMENTO DUNHA LIBRARÍA DE COMPOSTO COMERCIAL.



AMAYA GÓMEZ
DE VÍRGALA

4 DE FEBRERO
DE 2019

COMPARATIVA DE CULTIVOS EN 2D VERSUS 3D COMO MODELO DE ENSAYO PARA FASES PRECLÍNICAS DEL DESARROLLO DE FÁRMACOS ANTI-TUMORALES Y SU APLICACIÓN AL CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO DE UNA LIBRERÍA DE COMPUESTOS COMERCIALES.

COMPARISON OF CULTURES IN 2D VERSUS 3D AS AN ESSAY MODEL FOR ANTI-TUMORAL DRUGS DEVELOPMENT DURING THE PRECLINICAL PHASE AND ITS APPLICATION TO A HIGH-THROUGHPUT SCREENING OF A COMMERCIAL COMPOUNDS LIBRARY.

COMPARATIVA DE CULTIVOS EN 2D VERSUS 3D COMO MODELO DE ENSAIO PARA FASES PRECLÍNICAS DO DESENVOLVEMENTO DE FÁRMACOS ANTI-TUMORAIS E A SÚA APLICACIÓN Ó CRIBADO DE ALTO RENDEMENTO DUNHA LIBRARÍA DE COMPOSTO COMERCIAL.

FACULTADE DE CIENCIAS

REALIZADO EN STEMTEK THERAPEUTICS

AMAYA GÓMEZ DE VÍRGALA
A CORUÑA, FEBRERO DE 2019

D. Juan Gumuzio Barrie con DNI 16077944R y D. Manuel Becerra Fernández con DNI 32820909R autorizan la presentación de este trabajo ante el Tribunal Evaluador en calidad de tutor externo y tutor académico respectivamente.

Vº Bº Tutores Fdo.:

D. Juan Gumuzio Barrie

D. Manuel Becerra Fernández



Manuel
Becerra
Fernández

Firmado digitalmente por
Manuel Becerra Fernández
Nombre de reconocimiento
(DN): cn=Manuel Becerra
Fernández, o=Universidade da
Coruña, ou,
email=manu@udc.es, c=ES
Fecha: 2019.01.31 14:50:56
+01'00'

0. INDICE

1. RESUMEN	Pág. 3
2. INTRODUCCIÓN	Págs. 3-10
3. OBJETIVOS	Pág. 10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1. LÍNEAS CELULARES	Pág. 11
4.2. CULTIVO CELULAR EN 2D	Pág. 11
4.3. ANÁLISIS DE MICOPLASMA	Págs. 11-12
4.4. COMPUESTOS	Págs. 12-13
4.5. ENSAYO DE VIABILIDAD EN 2D POR MTT	Pág. 13
4.6. CULTIVO CELULAR EN 3D	
4.6.1. CULTIVO DE ESFERAS EN PLACAS DE POCILLOS DE FONDO REDONDO	Págs. 13-14
4.6.2. CULTIVO DE ESFERAS EN PLACAS DE POCILLOS DE FONDO PLANO	Págs. 14-15
4.7. CRIBADO Y VALIDACIÓN DE UNA LIBRERÍA DE FÁRMACOS	Pág. 15
4.8. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMAGEN	Págs. 16-17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1. ANÁLISIS DE MICOPLASMA	Pág. 18
5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DIFERENCIAL DE LOS COMPUESTOS QUIMIOTERÁPICOS EN CULTIVOS CELULARES 2D VS 3D	
5.2.1. MEDIDA DE LA VIABILIDAD EN 3D (RATIO VS CCK8)	Págs. 18-19
5.2.2. EFECTO DIFERENCIAL DE LOS COMPUESTOS SOBRE CULTIVOS 2D VS 3D	Págs. 19-28
5.2.3. EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE EL TAMAÑO DE LAS ESFERAS	Págs. 28-30
5.3. CRIBADO Y VALIDACIÓN DE UNA LIBRERÍA DE FÁRMACOS	
5.3.1. CRIBADO INICIAL	Págs. 30-31
5.3.2. VALIDACIÓN	Págs. 31-33
6. CONCLUSIONES	Pág. 34
7. BIBLIOGRAFÍA	Págs. 35-39
ANEXO I. GRÁFICAS RATIO VS CCK8	Págs. 40-42
ANEXO II. GRÁFICAS TAMAÑO	Págs. 43-45

1. RESUMEN

Actualmente el desarrollo de fármacos en oncología es un proceso poco eficiente. Una de las razones de estos bajos niveles de éxito radica en el uso rutinario de cultivos celulares en 2 dimensiones para los ensayos pre-clínicos. Este tipo de cultivos carecen de la organización celular que sí se da en el tejido natural en 3D, así como de los gradientes metabólicos o los procesos de señalización y secreción celular. Por estas razones, el efecto que pueda tener un compuesto sobre un cultivo celular en 2D tiene una baja capacidad de predicción del efecto real del compuesto in vivo. Por el contrario, los resultados obtenidos de ensayos realizados con cultivos en 3D han demostrado una mayor correlación con la respuesta clínica real, especialmente en el campo de la oncología, ya que es posible recrear de una manera más fiel la morfología y el microambiente natural del tumor.

En este trabajo se realizarán ensayos con 6 compuestos de uso clínico rutinario sobre líneas celulares de cáncer de colon, mama y pulmón con el fin de comprobar el efecto diferencial de las dos técnicas (2D y 3D). Asimismo, de manera complementaria se realizará un cribado de una colección de 1920 compuestos. Con el fin de valorar la idoneidad de los mismos como posibles agentes terapéuticos, se llevan a cabo ensayos de viabilidad en 2D y en 3D, además de ensayos para evaluar el impacto del fármaco sobre la capacidad formadora de esferas de las células presentes en el cultivo.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En el año 2012 se detectaron 14,1 millones de casos nuevos y 8,2 millones de muertes a causa de esta enfermedad. Los cánceres más comúnmente diagnosticados fueron de pulmón, de mama y colorrectal, siendo el primero además el de mayor mortalidad. (Ferlay et al., 2014) El último informe publicado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer sobre la situación actual mundial de esta enfermedad prevé una incidencia y mortalidad en 2018 de 18,1 millones de nuevos casos diagnosticados y de 9,6 millones de muertes. Este informe confirma que, independientemente del sexo del paciente, el cáncer de pulmón es el más frecuente y la causa principal de muerte por cáncer. Muy cerca en el porcentaje de incidencia estarían el cáncer de mama femenino, el cáncer colorrectal y el cáncer de

próstata. Sin embargo, el que mayor número de muertes causa, únicamente después del cáncer de pulmón, es el cáncer colorrectal (Figura 1) (Bray et al., 2018).

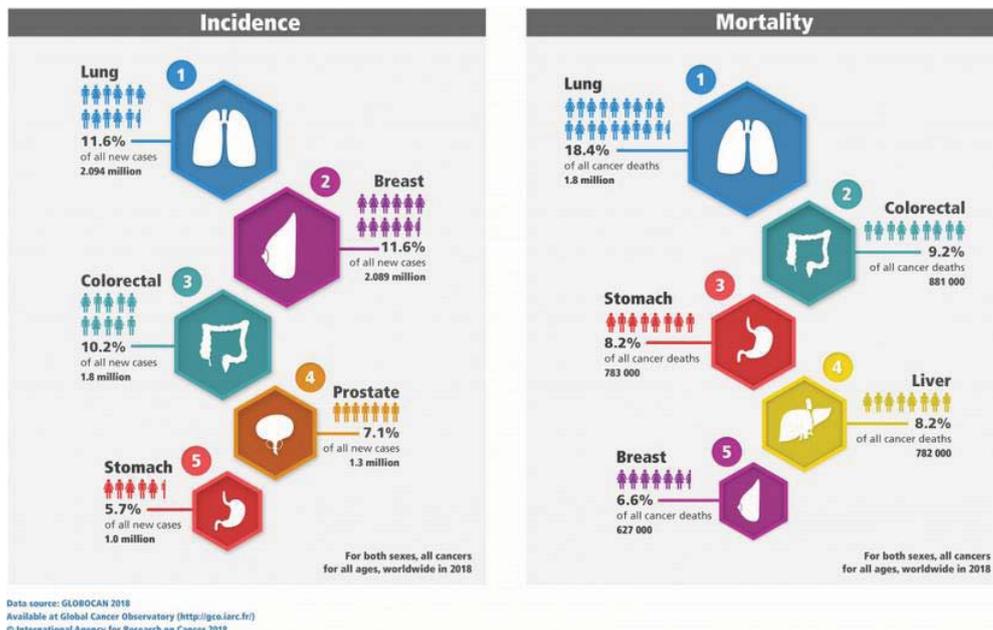


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los tipos predominantes de cáncer. (The Union for International Cancer Control, 2018)

En términos generales, actualmente no es posible conocer con exactitud el origen de la aparición del cáncer. Sin embargo, se han relacionado ciertos factores de riesgo que pueden aumentar la posibilidad de una persona de sufrir la enfermedad, siendo algunos de ellos incontrolables, como la edad o los antecedentes familiares. Con el fin de identificar estos factores de riesgo se realizan estudios epidemiológicos, en los cuales se examinan y comparan grandes números de pacientes y personas sanas. Cabe destacar que un estudio por sí solo no prueba que un comportamiento o una sustancia sean la causa de la enfermedad, pero sí cuando un elevado número de ellos asocian de manera semejante un posible factor de riesgo y una mayor incidencia de cáncer, y más cuando existe un posible mecanismo que lo explique. Algunos de los factores de riesgo que más se han estudiado son el alcohol, el tabaco o la exposición por encima de lo recomendado a luz solar u otros tipos de radiación (National Cancer Institute, 2015).

Más concretamente, se han realizado estudios epidemiológicos para encontrar factores directamente involucrados en la tumorigénesis. Entre otros, se ha demostrado un vínculo entre los hábitos de nutrición poco saludables, el tabaquismo y el consumo de alcohol y el aumento del riesgo de incidencia (Gallegos-Hernández, 2006). Además, hay factores genéticos que se han asociado a ciertos tipos de cáncer, como la mutación de los

genes *BRCA1* y *BRCA2* en el cáncer de mama (Modan et al., 2001) o como el virus del papiloma humano relacionado con el cáncer cervical (Galani et al., 2009).

En la actualidad, aunque existe un mayor control sobre los factores de riesgo ya mencionados y se han puesto medios para una detección más temprana y mejoras en el tratamiento, las tasas de mortalidad de esta enfermedad siguen siendo muy elevadas (Torre et al., 2016). Esto puede explicarse por dos motivos fundamentales, uno relacionado con la propia biología de la enfermedad y otro con la tecnología utilizada en el desarrollo de nuevos fármacos.

Desde el punto de vista del desarrollo tumoral, en las últimas dos décadas el modelo de desarrollo tumoral de las Células Madre Tumorales ha adquirido gran relevancia. Este modelo propone que los tumores, como ocurre en el desarrollo del tejido, se organizan jerárquicamente y que una pequeña porción de células no diferenciadas con capacidad de renovación automática, las células madre cancerosas (CSC, Cancer Stem Cells en sus siglas en inglés), mantienen el crecimiento del tumor a lo largo de su desarrollo (Eun et al., 2017). Además, estas células dotarían al tumor de una mayor resistencia a una gran variedad de tratamientos quimio y radioterápicos (Amaya et al., 2015; Batlle et al., 2017; Krause et al., 2017). Estas células se aprovechan de muchas de las propiedades innatas a cualquier tipo de célula madre, como su relativa inactividad, su alta capacidad de auto-renovación o su gran capacidad de reparación del ADN y resistencia a la apoptosis, para, además de con sus propios mecanismos como la expresión de varios transportadores ABC, eludir el efecto del tratamiento y sobrevivir (Dean et al., 2005). De esta manera, aunque un tratamiento muestre inicialmente un aparente éxito en la remisión de la enfermedad, estas células madre tumorales evaden el tratamiento y, en un periodo de tiempo variable, vuelven a desarrollar el tumor. Por tanto, a la hora de buscar fármacos eficaces deberían seleccionarse, además de aquellos que muestren un efecto sobre la totalidad de tumor, otros fármacos específicos que afecten a la sub-población de CSCs.

En segundo lugar, puede considerarse el uso de ensayos in vitro biológicamente poco relevantes en las fases iniciales del desarrollo de fármacos como uno de los principales motivos de fracaso en el desarrollo de nuevas terapias. Los ensayos in vitro basados en cultivos en monocapa celular (2D) han demostrado ser altamente artificiales en comparación con los sistemas fisiológicos (3D), dando lugar a un gran número de falsos

positivos (Imamura et al., 2015). Las diferencias observadas en la potencia y la eficacia de los fármacos contra el cáncer en los cultivos 3D sugieren que son modelos más relevantes para seleccionar los mejores candidatos de fármacos en los estudios preclínicos (Nirmalanandhan et al., 2010).

La existencia de estas CSCs se probó por primera vez en el contexto de la leucemia mieloide aguda (LMA)(Bonnet et al., 1997). Años después, este principio se extendió al cáncer de mama (Al-Hajj et al., 2003) y al glioblastoma (Singh et al., 2003), demostrando que una sola célula caracterizada como CSC era capaz de formar un nuevo tumor similar al tumor original al ser inyectadas en ratones. Estos y otros experimentos han revelado las dos propiedades fundamentales de las CSC, su capacidad pluripotente y de auto-renovarse. Así pues las CSCs poseen el potencial de auto-renovarse y dar lugar a células no solo de fenotipo similar sino también células cancerígenas fenotípicamente diversas (Pardal et al., 2003).

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con las células madre somáticas presentes en los órganos, las CSCs realizan estos procesos de una forma anormal y poco regulada. Es más, en algunos casos las células madre cancerosas surgen a partir de mutaciones de las células madre, manifestándose en forma de tumores gracias a dicha capacidad de auto renovación y diferenciación (Reya et al., 2001; Taipale et al., 2001). Algunas de estas rutas mutadas son por ejemplo, WNT en células madre hematopoyéticas, del epitelio intestinal o del sistema nervioso central (Korinek et al., 1998; Chenn et al., 2002; Willert et al., 2003; Reya et al., 2003), Sonic Hedgehog (SHH) también en células madre del sistema nervioso central así como en células granulares del cerebelo (Wechsler-Reya et al., 1999; Lai et al., 2003), Notch en células madre hematopoyéticas y del epitelio mamario (Varnum-Finney et al., 2000; Chepko et al., 2003), PTEN en células madre neurales (Groszer et al., 2001) y BMI1 en células madre hematopoyéticas (Park et al., 2003).

Por tanto, a la hora de buscar nuevos tratamientos contra el cáncer, sería necesario diseñar terapias dirigidas a las CMTs (Amaya et al., 2015). Como se muestra en la figura 2, las terapias que eliminan, inducen la diferenciación o previenen la metástasis de las células madre del cáncer (gris) lograrían una regresión del tumor primario (Siclari et al., 2010), sin embargo, no curarán al paciente a medio largo plazo debido a que una pequeña proporción de CMTs resistentes permanecerán vivas y eventualmente el tumor reaparecerá (Pardal et

al., 2003). Actualmente, hay algunos compuestos anti-CSC en fase de desarrollo como Dencizumab (Anti-DLL4) e Ipafricept (OMG-54F28) (Smith et al., 2014; Jimeno et al., 2017).

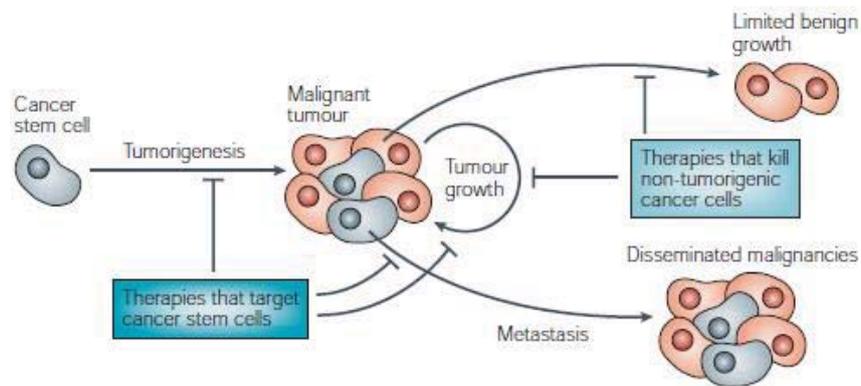


Figura 2. Implicaciones terapéuticas de las células madre del cáncer (Pardal et al., 2003)

Desde el punto de vista técnico, uno de los problemas a resolver en oncología sigue siendo el desarrollo de fármacos activos de manera más económica y eficaz. Este proceso es largo y costoso ya que se requieren varias etapas, desde la identificación del objetivo hasta el descubrimiento y la optimización del compuesto, la validación preclínica y los ensayos clínicos que culminan en la aprobación para su uso clínico (Imamura et al., 2015). De hecho, la probabilidad de aprobación desde el descubrimiento preclínico al ensayo clínico de fase I es más baja para los fármacos oncológicos (7%) que para los fármacos con otras indicaciones (Hay et al., 2014). Teniendo en cuenta el alto costo y el consumo de tiempo del desarrollo clínico de los medicamentos oncológicos, se requieren urgentemente mejores plataformas preclínicas para la selección de medicamentos.

Tradicionalmente, en la fase preclínica, la mayoría de los experimentos se llevan a cabo en células cultivadas en dos dimensiones (2D) en superficies de plástico optimizadas para el cultivo de tejidos. Sin embargo, existen evidencias convincentes que sugieren que las células cultivadas en estas condiciones no fisiológicas no son representativas de las células que residen en el complejo microambiente de un tejido tumoral original, que crecen en tres dimensiones (3D) (Breslin et al., 2013; Lovitt et al., 2014). Las principales ventajas de los sistemas de cultivo de células 2D son su bajo coste y sencillez, la disponibilidad de múltiples ensayos bien caracterizados para la medida de distintos parámetros o la posibilidad de comprar resultados con la basta bibliografía disponible. Sin embargo, también tienen grandes desventajas. Quizá la más importante, como ya se ha mencionado previamente, es que no son cultivos representativos de entornos celulares reales, ya que

en el cuerpo humano las células crecen en contacto con otras células en tres dimensiones. Además se pierden los componentes de la matriz extracelular, la interacción de célula a célula y de célula a matriz que son importantes para la diferenciación, proliferación y funciones celulares in vivo (Mazzoleni et al., 2009). Esto conlleva baja capacidad predictiva de los ensayos, siendo habitual el fracaso en las fases clínicas del desarrollo de fármacos de compuestos que se evaluaron previamente como "activos" utilizando modelos basados en líneas celulares cultivadas en 2D en ensayos pre-clínicos (Imamura et al., 2015).

Así pues, en los últimos años se ha producido un aumento en la investigación y el desarrollo de cultivos celulares en tres dimensiones, biológicamente más relevantes que los cultivos celulares en 2D. Los cultivos celulares en 3D pueden servir como una plataforma alternativa rentable para el desarrollo de medicamentos, ya que muestran características más cercanas a las complejas condiciones in vivo y por tanto han demostrado ser más realistas a la hora de trasladar los resultados de los estudios a las aplicaciones in vivo (Vinci et al., 2012).

La tecnología de cultivo celular en tres dimensiones ha alcanzado grandes niveles de complejidad y sofisticación, incluyendo cultivos con distintos tipos matrices extracelulares, co-cultivos con varios tipos celulares distintos (Kapałczyńska et al. 2018), cultivos utilizando micro-ingeniería y micro-fluídica (organ-on-a-chip) (Gupta et al, 2016), o cultivos ex-vivo utilizando xeno-injerto de células en ratones (Antoni et al, 2015). Sin embargo, estos métodos pueden resultar altamente sofisticados y costosos para ser utilizados en las fases iniciales de desarrollo de fármacos, donde se busca la capacidad de testar un gran número de compuestos candidatos en ensayos que ofrezcan resultados sencillos de procesar y que proporcionen información relevante. En este sentido, los esferoides por agregación de múltiples esferas en suspensión son un método sencillo y rápido para la evaluación de compuestos candidatos. Estos esferoides presentan 3 capas, la necrótica central, la inactiva interna y la proliferación externa que imita el microentorno de los tumores sólidos humanos. De este modo, existen una gran cantidad de similitudes en la capacidad de respuesta al fármaco entre estos esferoides tumorales y los modelos animales utilizados en las posteriores fases clínicas. Además, hay muchas características peculiares de las células cancerosas que crecen en condiciones de 3D y que son paralelas a los tumores in vivo, particularmente en las primeras etapas del crecimiento del tumor antes

de la aparición de la vascularización, como por ejemplo la baja tasa de proliferación, que facilita los estudios de toxicidad permitiendo el estudio de los efectos de los fármacos a largo plazo (Ravi et al., 2015).

Además, estas técnicas de cultivo en 3D permite realizar ensayos funcionales para medir el porcentaje de células madre tumorales dentro de una población celular. El ensayo de formación de esferas permite medir el porcentaje de células madre tumorales presentes en una población de células, ya sea una línea tumoral comercial, células provenientes de PDX (xenoinjertos derivados células del tumor de un paciente que han sido implantadas en un ratón inmunodeficiente o humanizado), o una muestra directa de un paciente. En este ensayo, una suspensión celular es cultivada en placas de baja adherencia en un medio de cultivo restrictivo. En este ambiente, solo las células madre tumorales son capaces de sobrevivir y formar esferas. Por tanto, cuantificando el número de esferas en el cultivo podemos estimar el porcentaje de células madre tumorales dentro del mismo (Gumuzio Barrie, 2014).

Por otra parte, también es esencial en el descubrimiento de fármacos el cribado de alto rendimiento (high-throughput screening, HTS sus siglas en inglés). Éste es llevado a cabo para determinar la posible actividad terapéutica de bibliotecas de un gran número de compuestos químicamente diversos en un único ensayo. Para ello se requiere un protocolo estandarizado que genere rápidamente esferoides de tamaño homogéneo con gradientes de difusión y fisiología celular similares en un formato de placa que sea fácilmente accesible para el posterior análisis bioquímico o celular (Ivascu y Kubbies, 2006). Además también es importante que estos modelos en 3D, descritos con anterioridad, sean escalables. Con este fin se sustituyen las placas habituales de 96 pocillos por otras de 384 pocillos que tienen una capacidad de volumen inicial mayor, lo que supondrá una reducción tanto en tiempos de desarrollo como en costes. Sin embargo, la aplicación del cultivo celular en 3D en HTS sigue siendo en algunos casos un desafío, sobre todo en cuanto a la reproducibilidad, la incorporación a una configuración de detección automática y la compatibilidad con los métodos de ensayo y detección disponibles (Montanez-Sauri et al., 2015; Ryan et al., 2016). Tanto es así que, actualmente, una gran parte de los HTS basados en células que se están llevando a cabo son realizados en 2D, factor que contribuye de nuevo a la alta tasa de fracaso en el descubrimiento de fármacos (Langhans, 2018). Por todo esto, en un futuro

donde predominará la terapia personalizada, sería idóneo desarrollar un ensayo in vitro 3D estandarizado y de alto rendimiento para evaluar la respuesta individual de los pacientes a los distintos tratamientos.

En este trabajo se ha tratado de valorar el posible efecto diferencial sobre la viabilidad celular que tienen 6 compuestos de uso clínico en oncología sobre una única esfera en 3D en comparación con cultivos en 2D. Para ello se utilizan 3 líneas celulares de cáncer bien conocidas, BT474 (mama), CALU1 (pulmón) y HCT116 (colon). Concretamente, se han empleado placas de baja adherencia de fondo redondo con recubrimiento hidrófobo (el polímero no adherente poli-HEMA). La morfología del fondo de los 96 pocillos genera una falta de superficies de adhesión que, junto al efecto del polímero que propicia la agregación celular, hace que se produzca la formación de esferoides (Ivascu y Kubbies, 2006).

Asimismo, se ha realizado un cribado de un elevado número de compuestos para su posible uso como terapéuticos antitumorales. Para ello se han utilizado placas de 384 pocillos para realizar ensayos de viabilidad en 2D y en 3D de 1920 compuestos. Se utilizaron placas de fondo plano, permitiendo valorar además del efecto tóxico sobre esferas multi-celulares, el efecto específico de los compuestos en la capacidad formadora de esferas. Los resultados del cribado se validaron realizando ensayos de viabilidad en placas de fondo plano de 96 pocillos para 12 compuestos seleccionados de la librería de 1920 compuestos. Por último, se realizó una segunda validación con 4 de esos 12 compuestos que mostraron un efecto en la capacidad de formación de esferas de los cultivos. Para ello se realizaron ensayos de formación de esferas en placas de 96 pocillos, cuantificando el número y tamaño de esferas.

3. OBJETIVOS

- ◆ Comparar los modelos de cultivo celular en 3D frente a los cultivos en 2D como herramienta predictiva para el efecto de compuestos quimioterápicos.
- ◆ Desarrollar un sistema de cribado de fármacos en cultivos celulares en 3D con el fin de identificar aquellos susceptibles de ser empleados con fines terapéuticos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LINEAS CELULARES

Para estos experimentos se emplearon 3 líneas celulares tumorales de uso común en investigación y en ensayos de detección de fármacos, la línea de cáncer colorrectal de morfología epitelial HCT-116, la línea de cáncer de mama BT-474 y la línea de cáncer de pulmón de células no pequeñas CALU-1.

4.2 CULTIVO CELULAR EN 2D

Como medio de cultivo se utilizó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Thermo Fisher Scientific) para las líneas HCT-116 y BT474, mientras que para las CALU1 se utilizó medio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific). En ambos casos el medio está suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de L-Glutamina y 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina). Las células crecen en frascos de cultivo T25 (Corning, Thermo Fisher Scientific) y se mantienen a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de O₂ y con un 5% de CO₂. Una vez se alcanza una confluencia del 60-80% se realiza un pase. Para ello se retira el sobrenadante y se aclara la superficie con tampón de fosfato salino (PBS, en sus siglas en inglés) (Gibco, Thermo Fisher Scientific). A continuación, las células se despegan de la superficie de cultivo mediante la acción peptidasa del enzima Tripsina (Gibco, Thermo Fisher Scientific), añadiendo tripsina suficiente para cubrir toda la superficie del frasco incubando las células con la tripsina a a 37°C durante 5 minutos. A continuación, se bloquea la acción enzimática de la tripsina añadiendo el mismo volumen de medio de cultivo con SFB y se centrifugan las células durante 5 minutos a 1500 rpm (Hettich Lab Technology, Thermo Fisher Scientific). Por último, se retira el sobrenadante y se resuspenden las células en 1 mL de medio de cultivo y se procede al conteo celular. Para ello se utiliza una cámara de Neubauer (BOECO, IMLAB) donde se introducen 10 µL de una dilución 1:10 de la suspensión celular con azul de tripano (Thermo Fisher Scientific), colorante de viabilidad que nos permitirá diferenciar células vivas de las muertas.

4.3 ANÁLISIS DE MICOPLASMAS (PCR)

Los micoplasmas son los organismos que pertenecen a la clase bacteriana Mollicutes, y por ello carecen de pared celular y presentan un genoma extremadamente

básico, por lo que deben funcionar como parásitos para satisfacer sus exigencias energéticas y de biosíntesis explotando las células huésped para sobrevivir. Además, dada su falta de pared celular, son resistentes a muchos antibióticos comúnmente empleados en cultivos celulares, como la penicilina y la estreptomina. La contaminación de un cultivo celular por micoplasmas no se puede visualizar a simple vista ni si quiera con microscopios electrónicos debido a su pequeño tamaño y a que no genera la turbidez típicamente asociada con la contaminación bacteriana o fúngica (Armstrong et al., 2010). Debido a esto su detección se realiza a través de una PCR realizada con el kit comercial VenorGem OneStep (Minerva Biolabs). Los efectos de una contaminación de este tipo sobre un cultivo celular pueden alterar la síntesis de ADN, ARN y proteínas, disminuir los niveles de aminoácidos y ATP, introducir alteraciones cromosómicas, además de afectar a la expresión de cientos de genes, incluidos algunos que codifican receptores, canales iónicos, factores de crecimiento y oncogenes, e incluso modificar los antígenos de la membrana plasmática de las células huésped (Miller et al., 2003). El programa introducido en el termociclador de PCR (Thermo Fisher Scientific) se muestra en la tabla 1. A continuación se prepara un gel de agarosa al 1.5%. Se introducen 5 µL del producto final de la PCR (de la muestra, del control negativo y del control positivo) mezclado con tampón de carga con azul de bromofenol (Sigma-Aldrich). Además se utiliza un marcador de pesos moleculares de 1 kb (Sigma-Aldrich).

Tabla 1. Programa PCR

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (seg)
1	94 °C	120 s
39	94 °C - 55 °C - 72 °C	30 s - 30 s - 30 s
Enfriamiento hasta 4 – 8 °C		

4.4 COMPUESTOS

Se testaron 6 compuestos quimioterapéuticos. Se analizaron los fármacos de uso clínico Doxorubicin, Cisplatin, Lapatinib, Gemcitabine, Paclitaxel y Vinorelbine a 5 concentraciones. Las concentraciones utilizadas para estos compuestos según la línea celular se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones utilizadas de los compuestos quimioterápicos según la línea celular.

COMPUESTO	HCT116	BT474	CALU1
PACLITAXEL	1μM, 300nM, 100nM, 30nM, 10nM, 3nM		
DOXORUBIXIN	3μM, 1μM, 300nM, 100nM, 30nM, 10nM	10μM, 3μM, 1μM, 300nM, 100nM, 30nM	3μM, 1μM, 300nM, 100nM, 30nM, 10nM
CISPLATIN	100μM, 30μM, 10μM, 3μM, 1μM, 300nM		
LAPATINIB	10μM, 3μM, 1μM, 300nM, 100nM, 30nM	3μM, 1μM, 300nM, 100nM, 30nM, 10nM	10μM, 3μM, 1μM, 300nM, 100nM, 30nM
GENCITABINE	300nM, 100nM, 30nM, 10nM, 3nM, 1nM	30μM, 10μM, 3μM, 1μM, 300nM, 100nM	30μM, 10μM, 3μM, 1μM, 300nM, 100nM
VINORELBINE	1μM, 300nM, 100nM, 30nM, 10nM, 3nM	100nM, 30nM, 10nM, 3nM, 1nM, 0,3nM	1μM, 300nM, 100nM, 30nM, 10nM, 3nM

4.5 ENSAYO DE VIABILIDAD EN 2D POR MTT

Se siembran las células en placas de 96 pocillos a distintas concentraciones (10.000 células por pocillo para las BT-474, 6000 células por pocillo para las CALU-1 y 4000 células por pocillo para las HCT-116) en un volumen de 160 μL por pocillo. Tras 16 horas en cultivo, se añaden 20μL de los distintos compuestos a las concentraciones definidas por triplicado. Las células se incuban con los tratamientos durante 72 horas. A continuación, se retira el medio y se reemplaza con una mezcla de 100μL de 40μL de medio fresco y 60μL de MTT (bromuro de 4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil-tetrazolio) a 0,5 mg/mL (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Tras 4 horas de incubación, el MTT es reducido por la acción de las oxidorreductasas celulares a Formazán, formando cristales que pueden disolverse en dimetilsulfóxido (DMSO), adquiriendo un color violeta. Utilizando un espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek) se mide la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. En aquellos pocillos donde la actividad metabólica celular se haya reducido por la acción de los compuestos, se formarán menos cristales de formazán.

4.6 CULTIVO CELULAR EN 3D

4.6.1 CULTIVO DE ESFERAS EN PLACAS DE POCILLOS DE FONDO REDONDO

En placas de 96 pocillos de fondo redondo (Corning, Thermo Fisher Scientific) se siembra una suspensión celular en 180 μL de medio de esferas a 1500 células/pocillo, en el caso de las HCT116 y las BT474, y 3000 células/pocillo para las CALU1. Tras un periodo de incubación de entre 3 y 5 días, se observa la formación de la esfera y se añade el compuesto, manteniendo el tratamiento 72 horas. El efecto de los fármacos sobre las esferas se medirá a través de dos ensayos:

- ◆ Ensayo de viabilidad con Cell Counting Kit-8 (CCK8) (Bimake): Esta solución es un indicador redox que utiliza una sal de tetrazolio hidrosoluble (WST-8) para formar un compuesto también hidrosoluble de formazán coloreado. Esta reacción se produce gracias a la reducción del NAD^+ o NADP^+ llevada a cabo por las deshidrogenasas celulares en presencia de un transportador de electrones (1-Methoxy PMS) en el medio de cultivo (figura 3). La cantidad de tinción proporcionada por el compuesto de formazán formado es directamente proporcional al número de células vivas. Esta coloración será medida por un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, BioTek) a 450 nm.

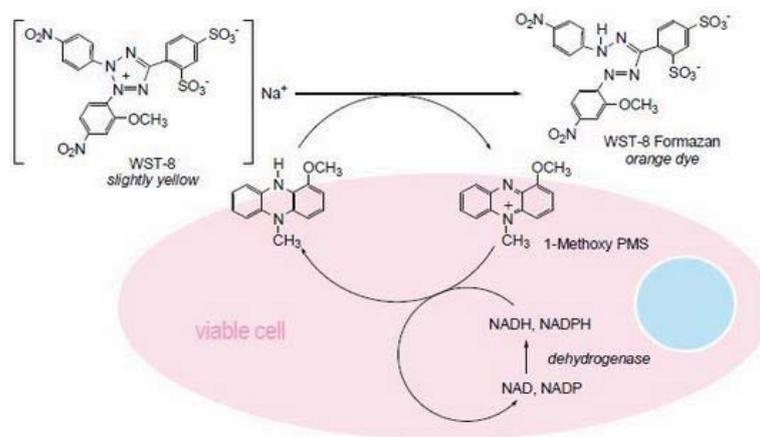


Figura 3. Mecanismo de detección de viabilidad celular con CCK-8 (Sigma-Aldrich, 2019)

- ◆ Ensayo de viabilidad por tinción doble de Naranja de acridina y Ioduro de propidio: Se añaden $20\mu\text{L}$ de cada uno de los dos colorantes. La naranja de acridina es un colorante catiónico fluorescente que se intercala con el ADN y el ARN y que nos permitirá ver en verde las células vivas. Sin embargo, con el ioduro de propidio podremos diferenciar las células muertas, ya que al no ser capaz de atravesar la membrana sana este agente fluorescente solo se intercala con el ADN si la célula está dañada o completamente muerta. Las esferas teñidas se analizan con el citómetro de imagen de microplacas Cytation 5 (BioTek). Con él podremos medir el tamaño de las esferas y la ratio entre células vivas entre células muertas.

4.6.2 CULTIVO DE ESFERAS EN PLACAS DE POCILLOS DE FONDO PLANO

Se siembran una suspensión celular de la línea HCT116 a una densidad de 7500 cls/ml en placas de fondo plano de baja adherencia (Corning, Thermo Fisher Scientific) para realizar los dos tipos de ensayos. Este ensayo se realiza tanto en placas de 96 como de 384

pocillos, a un volumen final de 200 y 100 μL respectivamente. El medio de esferas empleado consta de DMEM (que contenía 5 mg/ml de insulina) suplementado con F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific), B27 (Gibco, Thermo Fisher Scientific), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Gibco, Thermo Fisher Scientific).

- ◆ Ensayo de formación de esferas. Tras 4 horas de incubación a 37°C, se adicionan los fármacos en concentraciones crecientes con 3 réplicas por cada concentración. Después de 6 días de incubación, se utiliza el Cell Counting Kit-8 (CCK8) (Bimake) para medir la viabilidad resultante de las células tras el tratamiento a través de la medida de la coloración con un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, BioTek) a 450 nm.
- ◆ Ensayo de toxicidad sobre esferas preformadas. En este caso el periodo de incubación previo al tratamiento es de 72 horas. Después se añaden los fármacos en concentraciones crecientes con 3 réplicas por cada concentración y se dejan 3 días incubando. Por último, se medirá el efecto de los compuestos con CCK8.

4.7 CRIBADO Y VALIDACIÓN DE UNA LIBRERÍA DE FÁRMACOS

En el cribado de compuestos se utilizan 1920 compuestos de una librería comercial de más de 4000 compuesto (Bioscent, UK). Para el cribado de 1920 fármacos se realizan ensayos en 2D y 3D (tanto de formación como de toxicidad) como los descritos anteriormente utilizando placas de 384 pocillos de fondo plano (Corning, Thermo Fisher Scientific). En este cribado se mide el efecto en la viabilidad con CCK8 tanto en 2D como en 3D. De los resultados obtenidos se realiza una selección de 12 compuestos que muestran el efecto deseado para llevar a cabo una primera validación. La validación se realiza en placas de 96 pocillos de fondo plano (Corning, Thermo Fisher Scientific) a cuatro concentraciones (5 μM , 1 μM , 500nM y 100nM) por triplicado. De nuevo la viabilidad se mide empleando CCK8. Por último, con el fin de confirmar el efecto de 4 de los 12 compuestos en la capacidad formadora de esferas, se realiza un ensayo de formación de esferas en placas de 96 pocillos a cuatro concentraciones por triplicado. En esta ocasión, además de medir la viabilidad resultante con CCK8, se añade naranja de acridina para medir tamaño y cuantificar el número de esferas por pocillo con el citómetro de imagen de microplacas Cytation 5 (BioTek).

4.8 TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE IMAGEN

La obtención de imágenes se realizó con un citómetro de imagen, el Cytation 5 (BioTek). Tanto para la configuración de los distintos parámetros de lectura del instrumento como para realizar diferentes tipos de análisis se utilizó el programa Gen5 3.04 (figura 4).

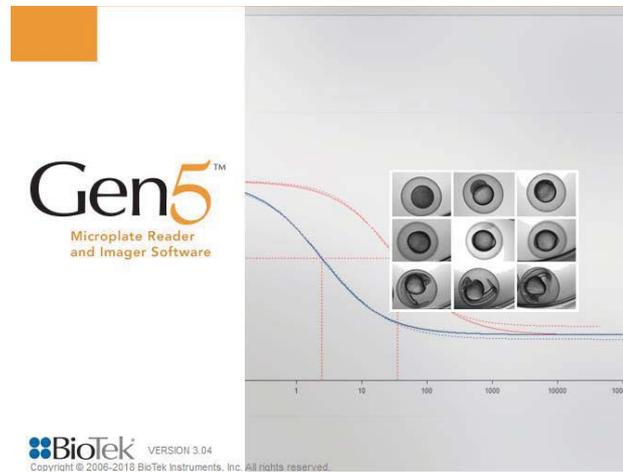


Figura 4. Programa utilizado para extracción y análisis de imagen

Este programa te permite enfocar el pocillo de modo que se vea correctamente la zona deseada y evitar que posibles restos que se encuentran flotando en el medio o pegados al fondo provoquen un error del autoenfoco del citómetro. Además, simultáneamente, puedes tomar diferentes imágenes dependiendo del agente fluorescente que quieras visualizar. Asimismo, también se pueden variar distintos parámetros, como la intensidad del LED o la exposición, para mejorar la calidad de la imagen final (figura 5)

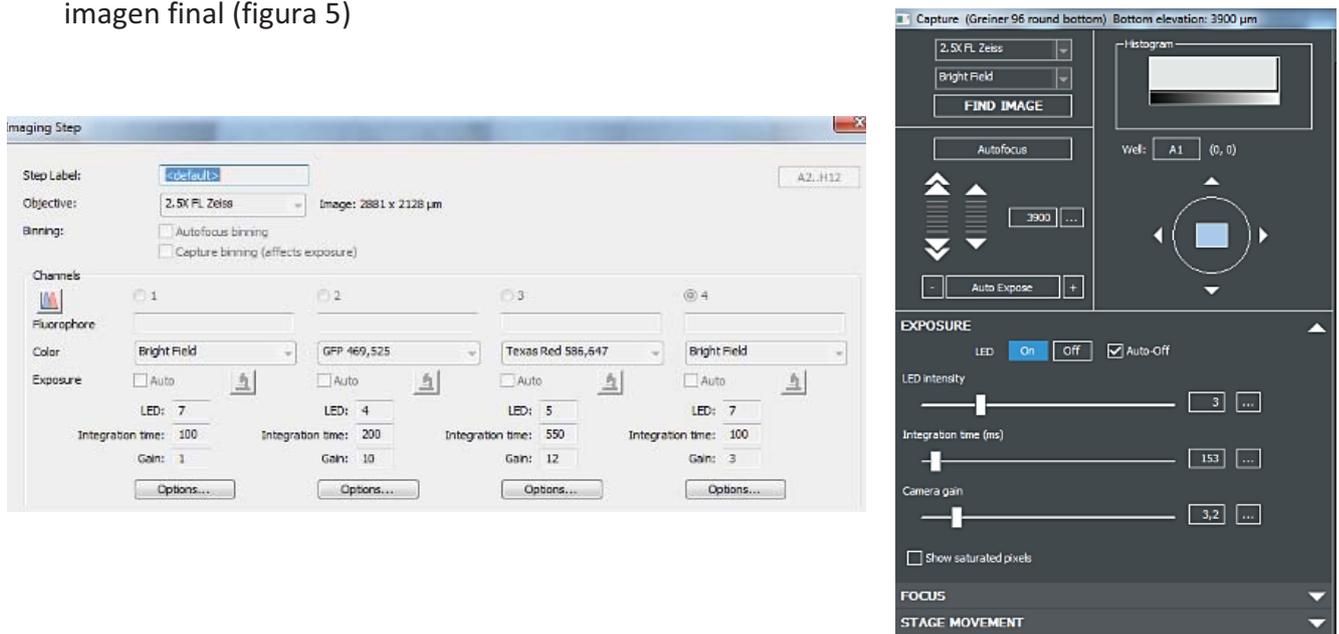


Figura 5. Configuración de los distintos parámetros para la captura de imágenes de la placa por el citómetro.

Para el estudio de la imagen se pueden tener en cuenta distintos factores, desde el número de esferas por pocillo, hasta el tamaño o la circularidad de las mismas (figura 6).

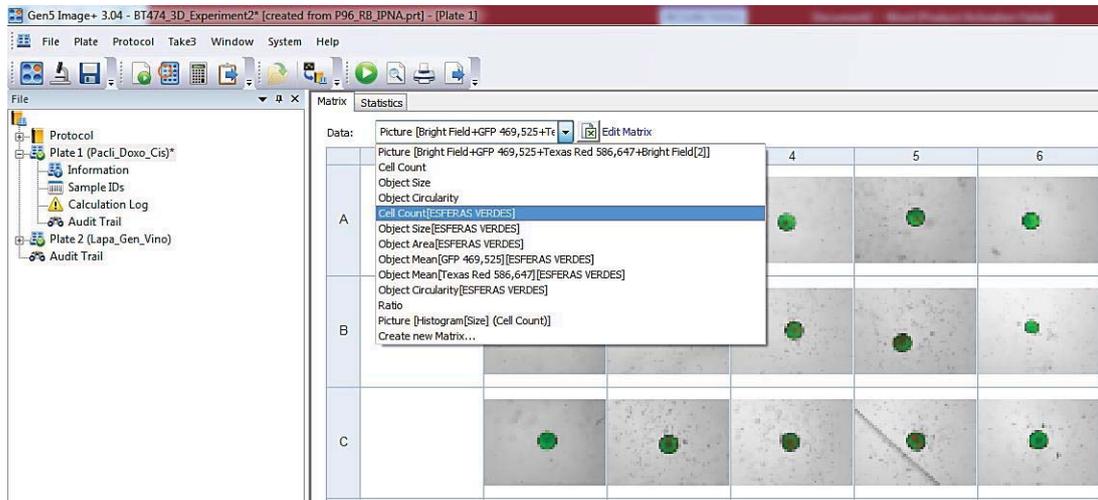


Figura 6. Diversidad de análisis posibles de la imagen

Dentro de cada análisis es además posible variar los parámetros de medida, como el tamaño máximo y mínimo o la circularidad mínima que se establecen para que el objeto detectado sea contabilizado como esfera (figura 7).



Figura 7. Ejemplo de modificación de parámetros de análisis

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ANÁLISIS DE MICOPLASMA

El análisis de PCR confirmó que todas las líneas celulares estaban libres de contaminación por micoplasma y, por lo tanto, adecuadas para su utilización en posteriores experimentos (figura 8).

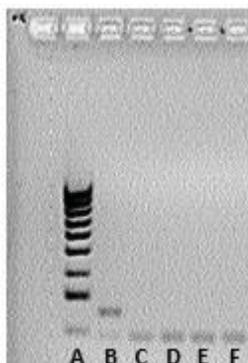


Figura 8. Gel de agarosa para análisis de micoplasma. A. Marcador de pesos moleculares B. Control positivo (267 pb) C. Control negativo (191 pb) D - F. Muestras de líneas HCT116, BT474 y CALU1 respectivamente (191 pb).

5.2 ESTUDIO DEL EFECTO DIFERENCIAL DE LOS COMPUESTOS QUIMIOTERÁPICOS EN CULTIVOS CELULARES 2D VS 3D

5.2.1 MEDIDA DE LA VIABILIDAD EN 3D (RATIO VS CCK8)

Con el fin de medir la viabilidad en 3D se utilizan dos procedimientos en paralelo. Por un lado, se realiza una tinción con naranja de acridina y yoduro de propidio, que nos permitirá calcular la ratio entre células vivas y muertas dentro de la esfera. Por otro lado, se utiliza el Cell Counting Kit-8 que produce una coloración proporcional a la cantidad de células vivas.

En las tres líneas celulares la viabilidad cuantificada por los dos métodos no coincide (figuras 23, 24 y 25, Anexo I). Una posible explicación a esta divergencia en los resultados podría ser debida a la propia acción de los compuestos utilizados. En el caso de que los compuestos terapéuticos tuviesen propiedades reductoras y reaccionarán con el WST-8 del CCK8, dando al medio una mayor coloración que hará que se sobreestime la cantidad de células viables. (Gold Biotechnology, 2014.). Otra posible causa de esta lectura errónea podría venir del hecho de que la presencia de sustancias tóxicas en bajas concentraciones a veces estimula la actividad celular. Dado que las células tienen mecanismos para

protegerse de la exposición a dichas sustancias, la actividad enzimática puede aumentar en la etapa inicial de tratamiento hasta llegar a una cierta concentración del fármaco en la que las células empiezan a morir. Por tanto, hasta ese punto se han sobre-producido algunos metabolitos que, sabiendo que el CCK8 da su resultado en base a la reacción con un metabolito producido por la célula como es el NAD⁺, no serán proporcionales a la cantidad de células viables al final del tratamiento cuando se realiza la medida. (Sigma-Aldrich, 2019). Por tanto, a la hora de comparar el efecto de los compuestos en 2D y 3D, decidimos utilizar los datos del ensayo de tinción doble NA/IP, ya que se trata de un método directo en el que se cuantifica el porcentaje de células muertas real.

5.2.2 EFECTO DIFERENCIAL DE LOS COMPUESTOS SOBRE CULTIVOS 3D VS 2D (RATIO VS MTT)

Con el fin de medir la viabilidad resultante tras el tratamiento de las líneas celulares con agentes quimioterápicos se utilizan dos tipos de ensayos. En el experimento realizado en 2D se utiliza el ensayo MTT, mientras que para los cultivos 3D se utiliza la medida de la ratio de células vivas entre células muertas dado por la tinción doble NA/IP.

PACLITAXEL

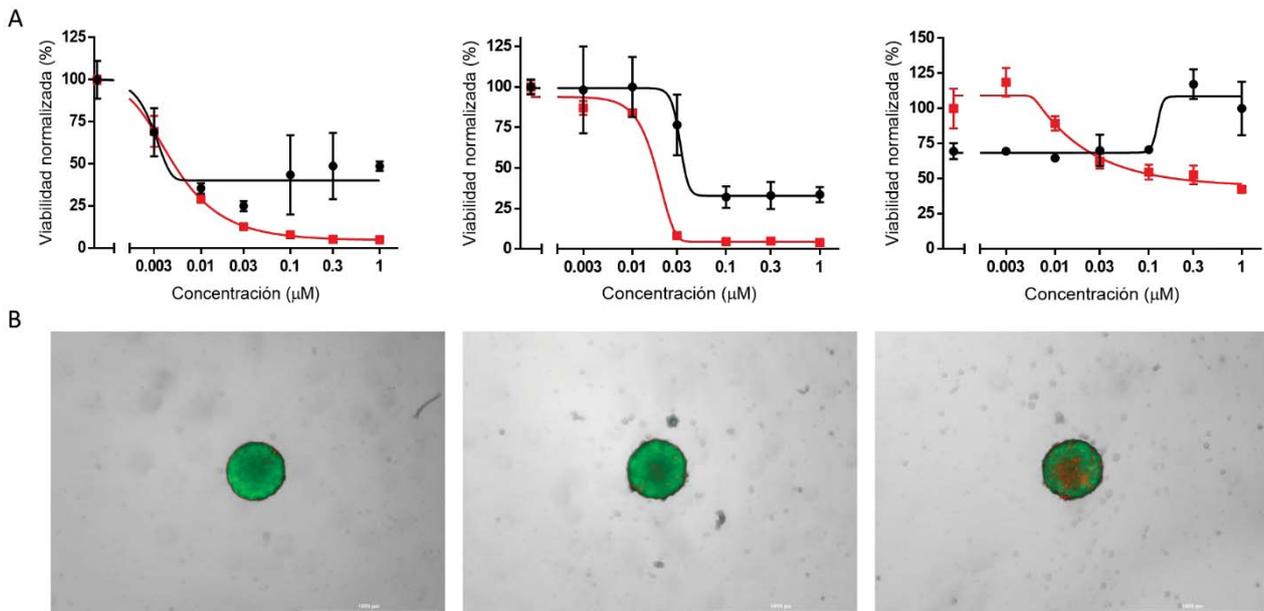


Figura 9. Efecto diferencial de Paclitaxel en 2D y 3D. A) Comparación de la viabilidad celular resultante del efecto del Paclitaxel sobre HCT116 (a la izquierda), BT474 (Centro) y CALU1 (Derecha) en 3D y 2D: Ratio (en negro) vs MTT (en rojo). Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento. B) Imágenes representativas de esferas de BT-474 tratadas con paclitaxel, En verde células vivas y en rojo células muertas. Control (izquierda), Paclitaxel 0.01 µM (centro) y 0,3 µM (derecha).

El Paclitaxel es un compuesto contra el cáncer que interfiere en la división celular y causa la destrucción de las células interfiriendo en la descomposición normal de los microtúbulos durante la división celular (Nirmalanandhan et al., 2010). Como se puede observar en la figura 9, se trata de un compuesto tóxico para las tres líneas celulares empleadas, ya que se puede apreciar un efecto notable en los dos tipos de ensayos, siendo éste siempre mayor en 2D que en 3D. Es en la línea HCT116, donde esto se distingue más claramente. A partir de $0,010 \mu\text{M}$ la viabilidad en 3D se mantiene estable mientras que en 2D sigue decreciendo prácticamente hasta llegar a un 0%. Cabe destacar también que a las concentraciones más altas, este compuesto produce un efecto de diseminación celular sobre la esfera en vez de producir la necrosis dentro de la esfera como es habitual (figura 10).

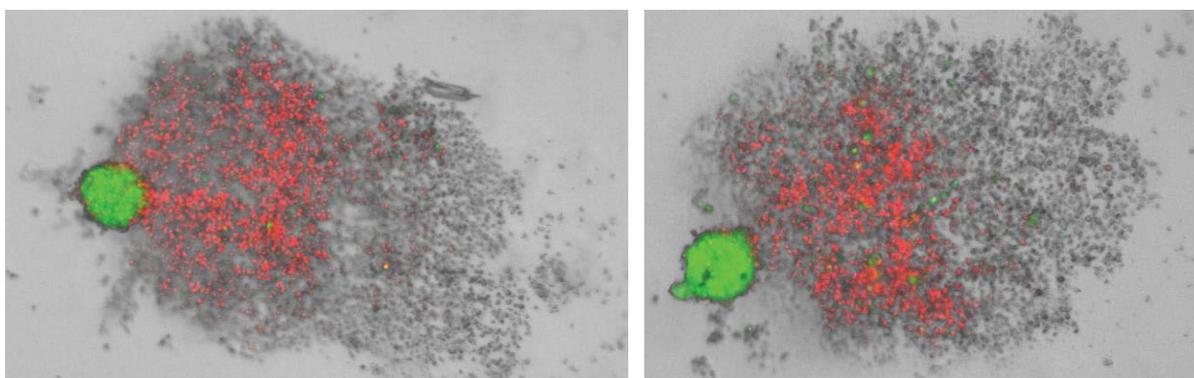


Figura 10. Imágenes obtenidas por el citómetro de imágenes Cytation. En verde células vivas y en rojo células muertas. A la izquierda: Esfera con tratamiento de Paclitaxel a $1\mu\text{M}$. A la derecha: Esfera con tratamiento de Paclitaxel a $0,3 \mu\text{M}$.

En el caso de la línea de cáncer de mama se puede observar que, comparando con HCT116 y CALU1, se requiere una concentración de compuesto mayor para que la viabilidad celular comience a decrecer notablemente. En modelos de cultivo en 3D se ha observado que la expresión del enzima relacionado con apoptosis PARP (poli-ADP-ribosa polimerasa) en su forma escindida es mayor en cultivos 2D respecto a cultivos 3D tras tratamiento con paclitaxel. Esto parece venir causado por la morfología densa de la esfera, que protegería a las células de la apoptosis inducida por el paclitaxel (Imamura et al., 2015). Modelos preclínicos han demostrado que la combinación de este compuesto con Sorafenib y radioterapia disminuyen de forma sinérgica la viabilidad de las células del cáncer de mama e inducen significativamente su apoptosis de forma más efectiva que cuando son tratadas únicamente con Paclitaxel. Esto se debe a que este tratamiento reduce los niveles de factor anti-apoptótico en las células (Choi et al., 2019).

En cuanto a la línea celular CALU1 en la figura 9 se observa un ratio mayor a concentraciones más altas, lo cual a priori sería ilógico ya que la proporción de células viables debería disminuir con el gradiente creciente del compuesto. Esto probablemente viene causado por problemas con la tinción, tanto en las esferas control sin tratamiento como en aquellas que han sido tratadas con concentraciones bajas del compuesto. Quizás por falta de tiempo de incubación o por una mezcla incorrecta con el medio, la naranja de acridina y el yoduro de propidio no penetraron correctamente en la esfera, por lo que los datos de la ratio no son totalmente fiables. Sin embargo, en las imágenes se aprecia un efecto notable como se puede observar en la figura 11.

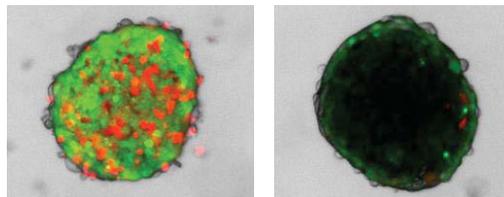


Figura 11. Imágenes obtenidas por el citómetro de imágenes Cytation. En verde células vivas y en rojo células muertas. A la izquierda: Esfera con tratamiento de Paclitaxel a 1 μ M. A la derecha: Esfera con tratamiento de Paclitaxel a 3 nM.

DOXORUBIXIN

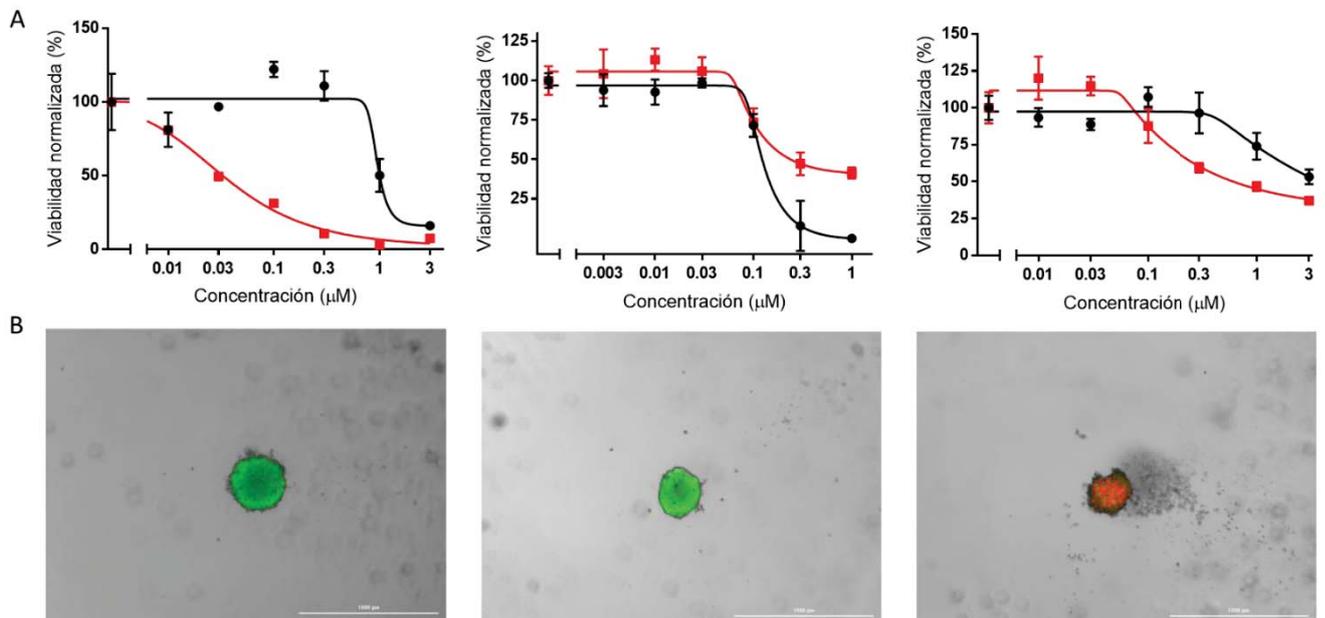


Figura 12. Efecto diferencial de doxorubicina en 2D y 3D. A) Comparación de la viabilidad celular resultante del efecto de doxorubicina sobre HCT116 (a la izquierda), BT474 (Centro) y CALU1 (Derecha) en 3D y 2D: Ratio (en negro) vs MTT (en rojo). Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento. B) Imágenes representativas de esferas de HCT116 tratadas con doxorubicina, En verde células vivas y en rojo células muertas. Control (izquierda), doxorubicina 0.1 μ M (centro) y 3 μ M (derecha).

Actualmente la doxorubicina se usa como tratamiento de diferentes tipos de cáncer, como el de mama, pulmón y hepático. Pertenece a la familia de las antraciclinas y actúa intercalándose con el ADN y por tanto inhibiendo la biosíntesis de ácidos nucleicos. Dificulta el avance de la enzima topoisomerasa II, que lleva a cabo la transcripción, estabilizando el complejo con esta enzima después de que se abra la cadena de ADN, evitando que se libere la doble hélice y deteniendo así el proceso de replicación. Esto hace que las células cancerosas mueran y, en consecuencia, el crecimiento del tumor sea más lento o se detenga. Además, este compuesto forma radicales libres de oxígeno que resultan en una citotoxicidad secundaria a la peroxidación de lípidos de la membrana celular (National Center for Biotechnology Information, 2019).

Así pues, observando la figura 12, se puede apreciar que este compuesto tiene un claro efecto sobre todas las líneas ensayadas. Tanto para las HCT116 como para las CALU1, la repercusión del tratamiento es mayor en 2D que en 3D. No obstante, a concentraciones elevadas (3 μM en HCT116 y 1 μM en CALU1) la viabilidad celular es tan baja que es similar para ambos tipos de experimentos. Sin embargo, en el caso de las BT474 a partir de una concentración de 0,1 μM la viabilidad celular en 3D cae drásticamente mientras que en el cultivo 2D baja más moderadamente hasta un 50%. La Doxorubicina se utiliza como quimioterapia de agente único de primera línea para el cáncer de mama metastásico (Paridaens et al., 2000). Es más, a posteriori se han realizado estudios con liposomas que contenían este compuesto (PLD, doxorubicina liposomal pegilada) que reducían significativamente la cardiotoxicidad que presentaba el fármaco suministrado por sí solo debido a su capacidad de generar radicales libres (O'Brien et al., 2004).

CISPLATINO

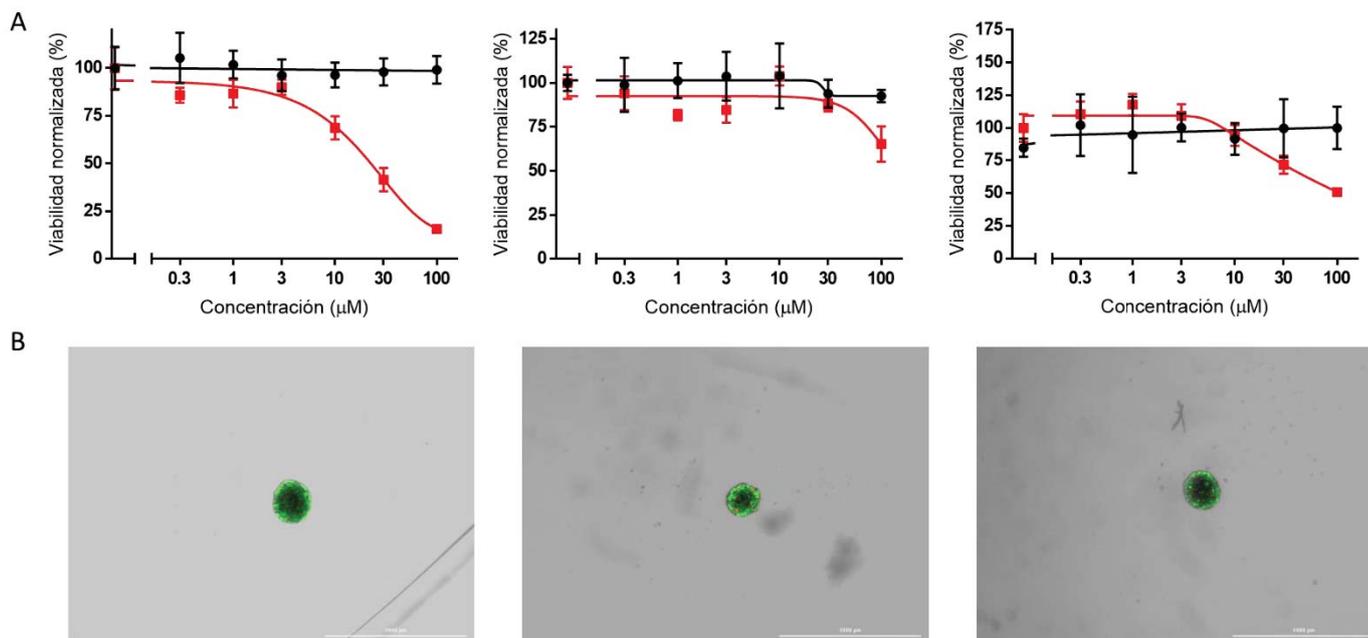


Figura 13. Efecto diferencial de cisplatino en 2D y 3D. A) Comparación de la viabilidad celular resultante del efecto del cisplatino sobre HCT116 (a la izquierda), BT474 (Centro) y CALU1 (Derecha) en 3D y 2D: Ratio (en negro) vs MTT (en rojo). Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento. B) Imágenes representativas de esferas de CALU-1 tratadas con cisplatino. En verde células vivas y en rojo células muertas. Control (izquierda), cisplatino 1 μM (centro) y 10 μM (derecha).

El cisplatino es un fármaco antineoplásico y citotóxico bien conocido utilizado para el tratamiento de numerosos cánceres humanos, entre otros el de pulmón, ovario, carcinomas, linfomas y sarcomas. Su modo de acción se ha relacionado con su capacidad para entrecruzarse con las bases de purina en el ADN, interferir con los mecanismos de reparación del ADN y causar un daño en el ADN para, posteriormente, inducir la apoptosis en las células cancerosas. Sin embargo, debido a la resistencia al fármaco y numerosos efectos secundarios indeseables, como problemas renales graves, reacciones alérgicas, disminución de la inmunidad a las infecciones, trastornos gastrointestinales, hemorragia y pérdida de la audición, se ha cambiado su uso por otros medicamentos anticancerosos que también contienen platino, como el carboplatino que es menos efectivo pero tiene menos contraindicaciones. Para superar la resistencia a los medicamentos y reducir los considerables efectos secundarios considerables, la terapia de combinación con otros medicamentos y con un adyuvante a base de cisplatino se ha aplicado como nuevas estrategias terapéuticas para muchos tipos de cáncer (Dasari y Tchounwou, 2014).

Los mecanismos de resistencia de este tipo de células frente al cisplatino no están aun plenamente esclarecidos. Se cree que la resistencia puede estar relacionada con la activación del aldehído deshidrogenasa y las vías de desarrollo, la respuesta mejorada al daño en el ADN y sobretodo con la salida de fármacos por parte de los transportadores ABC. La sobreexpresión en algunos tipos de tumores de las proteínas que conforman estos transportadores deriva en un flujo dependiente de ATP de estos compuestos citotóxicos con el fin de mantener la concentración del fármaco dentro de las células por debajo del nivel tóxico (Cojoc et al., 2015).

Así pues, en la figura 13 se puede apreciar que aunque en los cultivos 2D el cisplatino si causa un efecto notable por esa citotoxicidad del compuesto que se ha mencionado anteriormente, en el ensayo de 3D apenas tiene repercusión en la viabilidad celular, incluso a concentraciones tan altas como 100 μM . Esto sería un claro ejemplo de fármacos que demuestran ser muy efectivos en 2D pero que en fases preclínicas posteriores con modelos tumorales más similares a la realidad in vivo pierden tal efectividad.

LAPATINIB

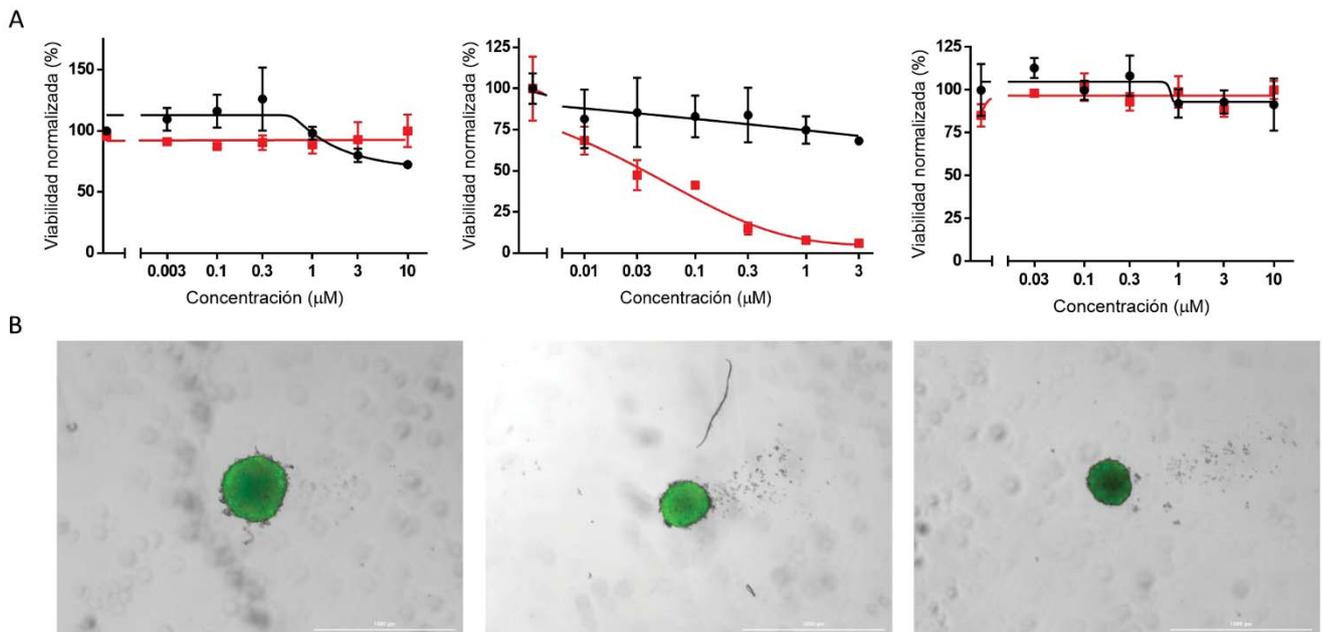


Figura 14. Efecto diferencial de Lapatinib en 2D y 3D. A) Comparación de la viabilidad celular resultante del efecto del Lapatinib sobre HCT116 (a la izquierda), BT474 (Centro) y CALU1 (Derecha) en 3D y 2D: Ratio (en negro) vs MTT (en rojo). Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento. B) Imágenes representativas de esferas de CALU-1 tratadas con Lapatinib, En verde células vivas y en rojo células muertas. Control (izquierda), Lapatinib 0.1 μM (centro) y 3 μM (derecha).

El Lapatinib es un fármaco que actúa como inhibidor de la transducción de ciertas señales, concretamente de la tirosina quinasa, de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) y del receptor 2 para el factor humano de crecimiento epidérmico (HER2). El bloqueo de estas señales dificulta el proceso de crecimiento y división de las células cancerígenas que terminan por morir. Este tratamiento es aplicado a pacientes con cáncer de mama avanzado o metastásico HER-2 positivo que ya hayan recibido previamente otro tipo de tratamientos, ya que este es más agresivo y genera más efectos secundarios (Mitri et al., 2012). Por esta razón se ve un efecto más notable sobre la línea BT474 (figura 14) en 3D e incluso aún mayor en el ensayo en 2D. Sin embargo sobre la línea CALU1 este compuesto no tiene efecto ninguno ni en 2D ni en 3D (figura 14). Así mismo cabe destacar que, aunque no se trata de una línea celular de cáncer de mama, también se puede apreciar un efecto moderado sobre HCT116 en los ensayos en 3D (figura 14). Esto se debe a que, como se ha comprobado en algunos estudios, este fármaco es capaz de inhibir el crecimiento de células de cáncer de colon que tienen una expresión detectable o incluso sobreexpresión de HER-2 (LaBonte et al., 2009).

GENCITABINE

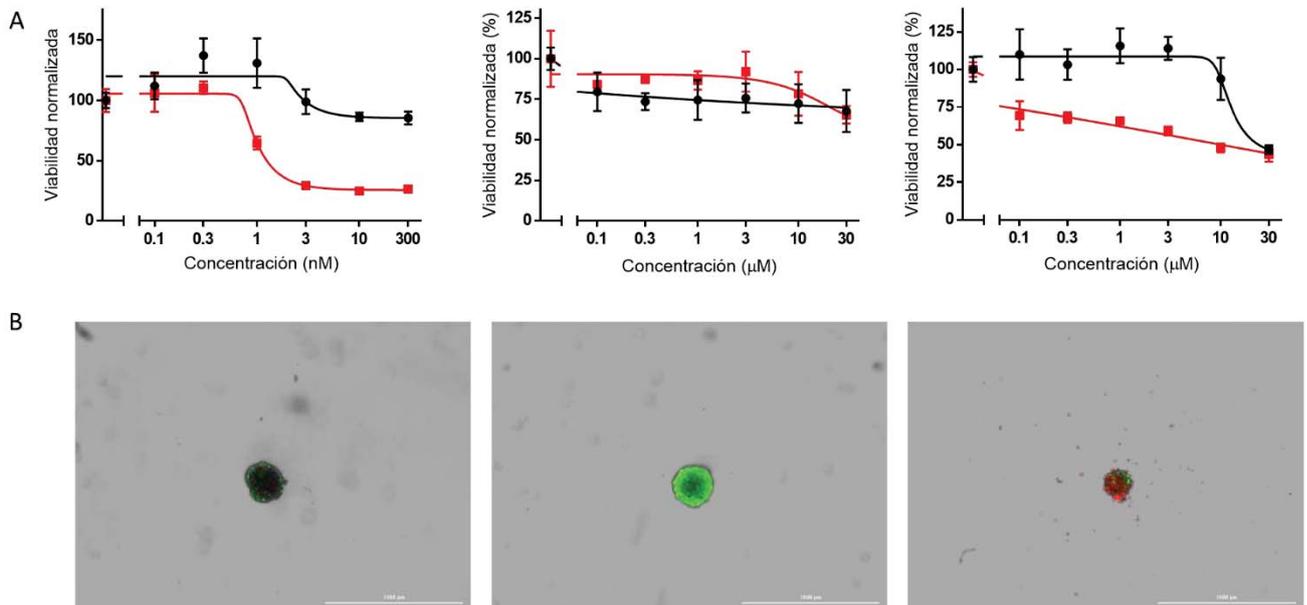


Figura 15. Efecto diferencial de Gencitabine en 2D y 3D. A) Comparación de la viabilidad celular resultante del efecto del Gencitabine sobre HCT116 (a la izquierda), BT474 (Centro) y CALU1 (Derecha) en 3D y 2D: Ratio (en negro) vs MTT (en rojo). Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento. B) Imágenes representativas de esferas de CALU-1 tratadas con Gencitabine, En verde células vivas y en rojo células muertas. Control (izquierda), Gencitabine 1 μ M (centro) y 30 μ M (derecha).

El Gencitabine es un quimioterápico utilizado para tratar diferentes tipos de cáncer, incluyendo el de páncreas, el ovárico, el de pulmón de células no pequeñas y el de mama. Este compuesto se define como un "antimetabolito", es decir, una sustancia muy similar a las encontradas en el interior celular pero que al ser incorporadas al metabolismo celular provocan una pérdida de la capacidad de división en la misma. En este caso el Gencitabine es un antagonista de la pirimidina, que cuando es transportado a la célula es fosforilado y se incorpora al ADN, imposibilitando así la elongación de la hebra por parte de las ADN polimerasas y evitando a su vez que las enzimas de corrección de síntesis de ADN retiren el gentabicine de su posición. Esta inhibición del crecimiento y la división celular será lo que cause finalmente la muerte celular. Este fármaco ataca a células en fases muy específicas del ciclo, por lo que, debido a que las células tumorales suelen dividirse más rápido y con menor corrección de errores que las células sanas, las células cancerosas son más sensibles a este daño (Plunkett et al., 1995). Así pues, el mayor impacto de este tratamiento se observa en las líneas CALU1 y BT474. En el primer caso, tanto en 2D como en 3D se ve tal efecto, sin embargo, en el cultivo 3D se requiere una concentración más elevada para que la viabilidad celular comience a decrecer, mientras que en 2D es un efecto más gradual. En cuanto a la línea BT474, analizando la gráfica podemos advertir que el efecto en 2D y 3D es prácticamente paralelo. Además, desde las concentraciones más bajas la viabilidad está en torno al 75 %, manteniéndose estable a pesar del incremento en la concentración del compuesto (figura 15).

VINOURELBINE

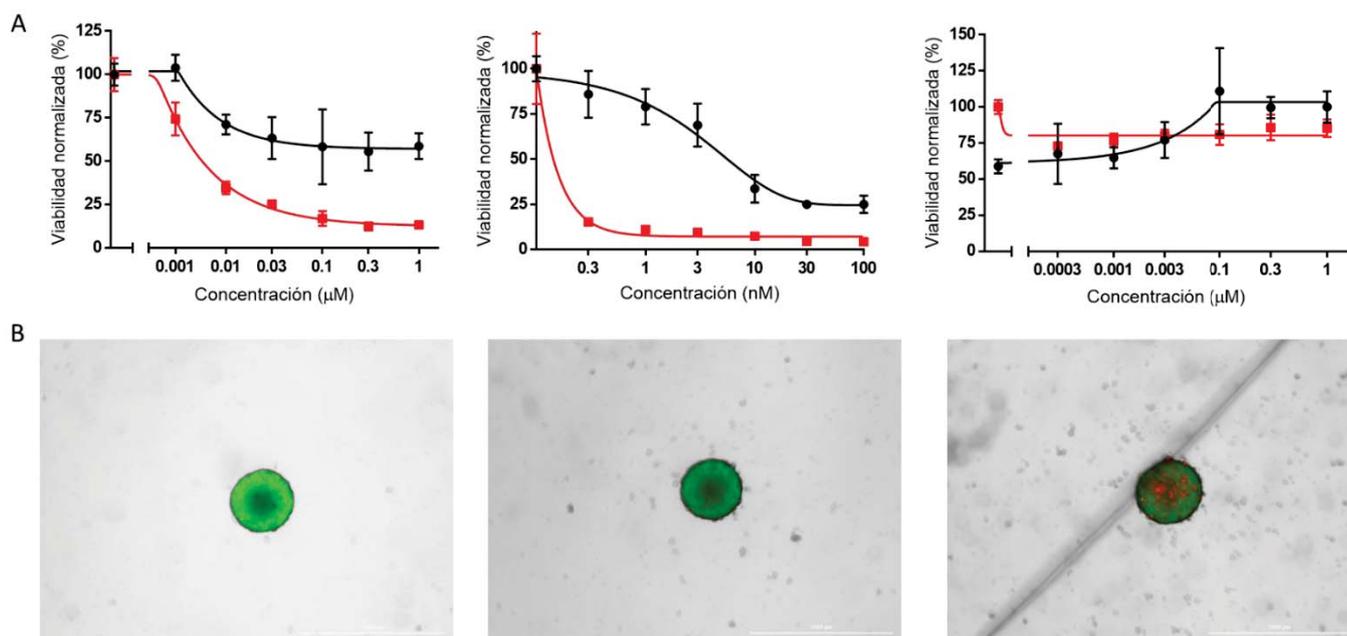


Figura 16. Efecto diferencial de Vinorelbine en 2D y 3D. A) Comparación de la viabilidad celular resultante del efecto del Vinorelbine sobre HCT116 (a la izquierda), BT474 (Centro) y CALU1 (Derecha) en 3D y 2D: Ratio (en negro) vs MTT (en rojo). Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento. B) Imágenes representativas de esferas de BT-474 tratadas con Vinorelbine, En verde células vivas y en rojo células muertas. Control (izquierda), Vinorelbine 3 μM (centro) y 10 μM (derecha).

El Vinorelbine es un compuesto recetado en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas o como agente único en pacientes con cáncer de mama metastásico en el que tratamientos anteriores con antraciclina y/o taxano hayan fallado. Se trata de un agente citostático que inhibe la polimerización de la tubulina y se une preferentemente a los microtúbulos mitóticos. De esta manera, bloquea la mitosis en la fase G2-M causando la muerte celular en la interfase o en la siguiente mitosis (Johnson et al., 1996). Llama la atención que a pesar de que este fármaco esté indicado para el cáncer de pulmón de células no pequeñas, en la línea CALU1 apenas se vea efecto en 3D y que sea nulo en 2D (figura 16). Esto puede deberse a que, con la intención de no crear una toxicidad demasiado alta que provocase la muerte celular de la totalidad de las células, se han empleado concentraciones demasiado bajas. Sin embargo, hay estudios que ya aplican este tratamiento con otros compuestos quimioterápicos como el cisplatino (Douillard et al., 2006) y/o cetuximab (Pirker et al., 2008).

En cuanto a su efecto sobre la línea de cáncer de mama BT474 se puede observar una clara diferencia entre la curva obtenida en un cultivo 2D frente a la observada en el ensayo 3D (figura 16). En el cultivo 2D se percibe un efecto drástico a una concentración

muy baja del compuesto (a 0,3 nM), a partir de la cual la viabilidad celular restante es tan baja que se mantiene prácticamente idéntica, aunque la concentración del fármaco vaya creciendo. Sin embargo en 3D, hasta que no se alcanza una concentración de 3 nM el efecto no es muy notable. No obstante, en ambos casos se aprecia una buena eficacia del fármaco. A pesar de su efectividad en algunos estudios se ha llegado a ensayar su administración a pacientes con cáncer de mama metastásico con adyuvantes como el Gencitabine (Martín et al., 2007) o el Trastuzumab (Joensuu et al., 2006). Por último, también se puede distinguir un amplio efecto diferencial del Vinorelbine sobre HCT116 (figura 16). Mientras para la concentración más baja (3 nM) el cultivo 2D ya baja su viabilidad celular a un 75%, en 3D se requiere más del triple (10 nM) para llegar a tal dato. Esta disparidad es aún más notable a concentraciones más altas (de 0,1 a 1 μ M), cuando en 2D la viabilidad celular está alrededor del 20 % y en 3D asciende hasta prácticamente un 70%.

5.2.3 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE EL TAMAÑO DE LAS ESFERAS

Con el objetivo de obtener la mayor información posible de los ensayos funcionales en cultivos celulares en 3D, se midió también el efecto de los compuestos quimioterápicos en el tamaño y la morfología de las esferas. Analizando las gráficas expuestas en el Anexo II (figuras 26, 27 y 28) se puede percibir, en general, que el cambio de tamaño de las esferas no es muy significativo en ninguna de las tres líneas. Esto se debe a que el tratamiento con estos compuestos es citotóxico, es decir, que las células dejan de crecer y dividirse. Además la muerte celular suele producirse en la zona central de la esfera por lo que estas no ven en ningún caso reducido su tamaño (figura 17).

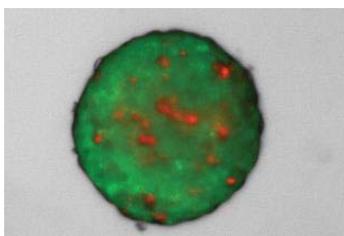


Figura 17. Ejemplo de esfera con necrosis celular. Línea celular BT474. Tratamiento con Paclitaxel a 1 μ M. Células vivas en verde. Células muertas en rojo.

No obstante, también se pueden observar algunas excepciones. Tanto en las esferas de la línea HCT116 tratadas con Paclitaxel, Doxorubicin o Vinorelbine, como en las de la línea BT474 tratadas también con Doxorubicin se observa cambio en el tamaño claro, derivado del efecto citotóxico que tienen estos compuestos sobre estas líneas en concreto (figuras 26 y 27, Anexo II). En estos casos el fármaco afecta a las células de las capas más

externas de la esfera, lo que produce un efecto de diseminación, de forma que la esfera se deshace (figuras 18 y 19). Este efecto podría indicar una baja capacidad de penetración de los fármacos en estructuras tridimensionales. Esta característica puede llevar, cuando el fármaco es testado clínicamente, a una respuesta inicial positiva, donde el tamaño del tumor disminuiría pero que, a la larga, daría lugar a una reaparición del mismo debido a que el crecimiento del tumor solo se habría detenido transitoriamente.

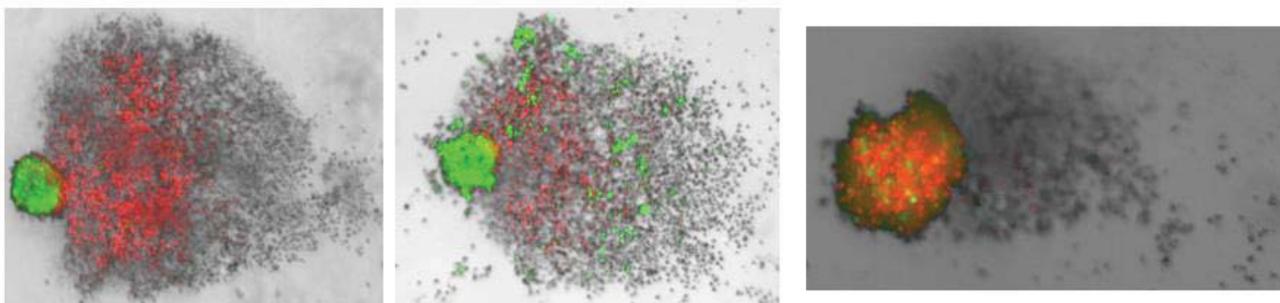


Figura 18. Ejemplos del efecto diseminatorio sobre la línea HCT116. Esferas tratadas con Paclitaxel (izquierda) y Vinorelbine (centro) a $1 \mu\text{M}$, con Doxorubicin a $3 \mu\text{M}$ (derecha). Células vivas en verde. Células muertas en rojo.

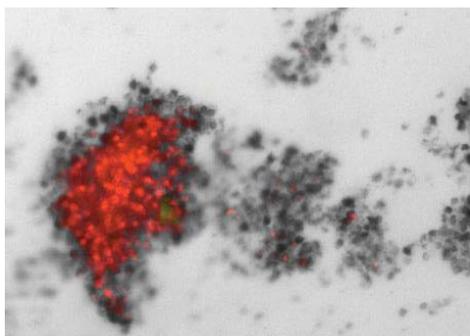


Figura 19. Ejemplo del efecto diseminatorio sobre la línea BT474. Esfera tratada con Doxorubicin a $10 \mu\text{M}$. Células vivas en verde. Células muertas en rojo.

Estos datos revelan un claro efecto diferencial de los quimioterápicos seleccionados en cultivo 2D y 3D. Este efecto diferencial se observa claramente en el caso de HCT116, línea sobre la cual 5 de los 6 compuestos quimioterápicos ensayados (Paclitaxel, Doxorubicin, Lapatinib, Cisplatino y Vinorelbine) muestran un mayor efecto en 2D frente a 3D. Lo mismo sucede con la línea BT474, 5 de los 6 compuestos empleados (Paclitaxel, Lapatinib, Cisplatino, Gencitabine y Vinorelbine) tienen mayor efecto en la viabilidad celular en cultivos 2D que en 3D. En la línea CALU-1, 3 compuestos muestran un efecto diferencial claro entre cultivos 2D y 3D (Paclitaxel, Cisplatino y Gencitabina), uno mostró un efecto ligeramente más claro en 2D que en 3D (Doxorubicin) y 2 no mostraron diferencias. De entre todos los compuestos probados destaca el cisplatino como un claro ejemplo de la importancia y validez de estos modelos en 3D, ya que, aunque sobre cultivos

2D demuestra ser altamente tóxico, sobre 3D apenas tiene repercusión en la viabilidad celular del cultivo.

5.3 CRIBADO Y VALIDACIÓN DE UNA LIBRERÍA DE FÁRMACOS

5.3.1 CRIBADO

Uno de los principales problemas de los compuestos usados en la terapia contra el cáncer es que en muchas ocasiones estos compuestos presentan un efecto citotóxico inespecífico cuya consecuencia son unos efectos secundarios altamente perjudiciales para los pacientes. Además, las CSC que sostienen el crecimiento del tumor serían más resistentes a estos tratamientos que el resto de las células tumorales e incluso que las células somáticas del paciente. Por lo tanto, a la hora de seleccionar un buen candidato para compuesto con efecto anti-CSC, será necesario buscar compuestos que no muestren un elevado efecto citotóxico sobre el cultivo en 2D pero que si afecte a las CSC. Para medir el efecto de compuestos frente a la sub-población celular de las CSC utilizamos el ensayo de formación de esferas, que nos permite determinar el efecto de los compuestos en las células formadoras de esferas, consideradas células con características de célula madre tumoral (Gumuzio Barrie, 2014).

Para ello se realiza un cribado de 1920 compuestos, pertenecientes a una librería de compuestos comerciales, en placas de 384 pocillos midiendo la viabilidad del cultivo en 2D a la vez que se ensaya en 3D el efecto del compuesto sobre la capacidad de formación de esferas del cultivo. Complementariamente, se mide el efecto tóxico de los compuestos sobre esferas ya formadas. Por tanto, los parámetros medidos son toxicidad de los compuestos en cultivo 2D, efecto en la capacidad formadora de esferas y toxicidad de los compuestos en cultivo 3D (figura 20). En el cribado seleccionaremos los compuestos que no presenten efecto tóxico en cultivos 2D (viabilidad >60%), que tengan efecto en la toxicidad en 3D (viabilidad < 50%) y que tengan efecto en la capacidad formadora de esferas (<50%).

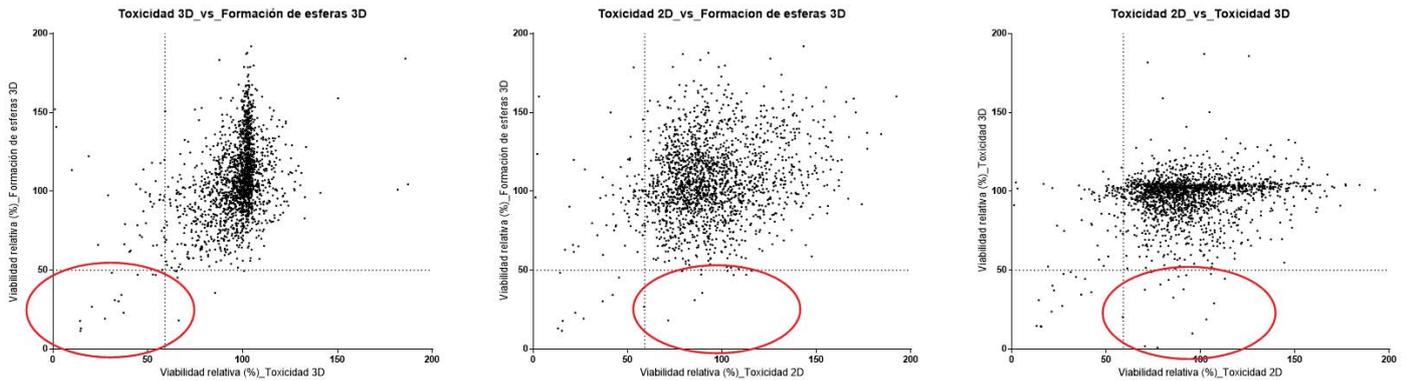


Figura 20. Representación gráfica del efecto de los 1920 compuestos sobre la línea HCT116. En las gráficas se compara el efecto en la capacidad formadora de esferas frente al efecto en la viabilidad de esferas ya formadas (izquierda), el efecto tóxico en cultivos en 2D frente a capacidad formadora de esferas (centro) y el efecto tóxico en cultivos en 2D frente al efecto tóxico en esferas ya formadas (derecha). Un círculo rojo señala en todas las gráficas los compuestos con el efecto deseado.

De todos los candidatos ensayados se realiza una selección de 12 compuestos que han demostrado el efecto deseado, es decir, un impacto tóxico muy bajo o nulo sobre un cultivo 2D pero un efecto destacable de toxicidad y/o sobre la capacidad de formación de esferas en 3D.

5.3.2 VALIDACIÓN

Para validar los resultados del cribado de compuestos, se realizan de nuevo los experimentos en placas de 96 pocillos a varias concentraciones por triplicado de los 12 compuestos en cuestión (0,1 - 0,5 - 1 - 5 μ M).

Como se puede observar en las gráficas expuestas en la figura 21 algunos compuestos (el 71-P24, el 64-C24, el 70-A23 y el 70-P24) que no muestran ningún efecto señalado ni sobre cultivos 2D, como cabía esperar ya que por eso fueron seleccionados, ni sobre la viabilidad o la capacidad formadora de esferas en 3D. Sin embargo, hay otros compuestos que exhiben efectos dispares. Mientras que algunos, como el 69-P18 o el 70-G11, aparentan tener un elevado efecto tanto en cultivos 2D como en cultivos 3D, otros como el 69-P24 o el 70-L12, aunque tienen un débil o prácticamente nulo efecto sobre la viabilidad y la capacidad formadora de esferas en 3D sí que muestran un alcance mayor en el efecto sobre cultivos 2D. En estos casos es por tanto imposible validar el efecto que se había observado en el primer cribado, ya que algunos han demostrado tener un efecto en 2D mayor de lo esperado y un efecto sobre la capacidad formadora de esferas mucho menor de la deseada.

Sin embargo, en las gráficas de la figura 21 correspondientes a los compuestos 70-A23, 70-P24, 71-P24 y 64-C24 sí que se puede confirmar el efecto demostrado en el cribado preliminar. Existe para estos compuestos una clara diferencia entre el alcance del compuesto sobre cultivos 2D en comparación con el observado en 3D, sobretodo sobre la capacidad formadora de esferas. Por ello se seleccionan estos cuatro compuestos para ratificar el efecto observado.

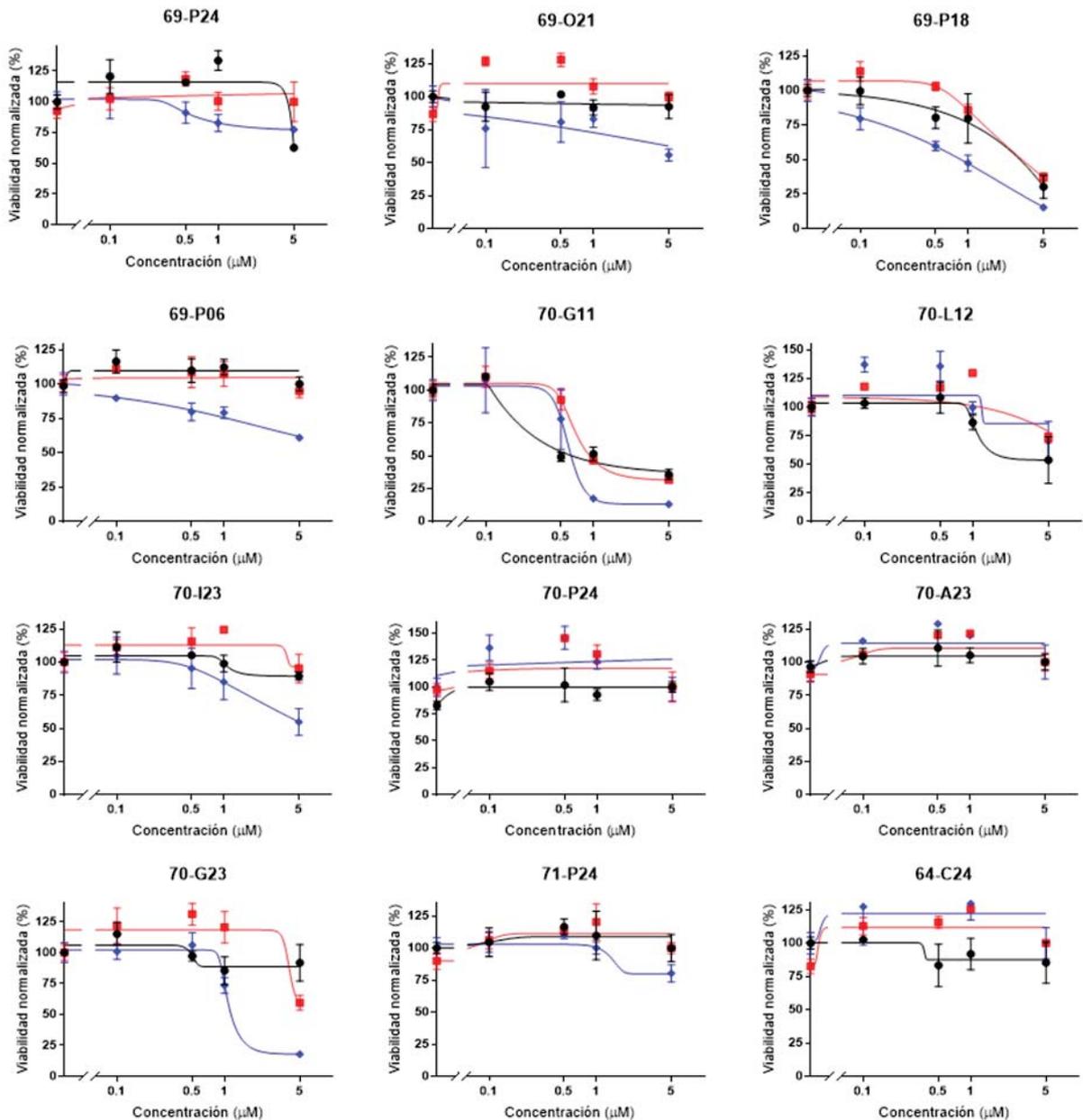


Figura 21. Efecto de los 12 compuestos seleccionados del cribado para la validación sobre la línea HCT116. En negro el efecto en 2D, medido por el ensayo de viabilidad MTT. En rojo el efecto de toxicidad sobre la esfera en 3D, medido por CCK8. En azul el efecto sobre la capacidad formadora de esferas del cultivo en 3D, medido por CCK8. Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento.

Por último, se realiza un ensayo de formación de esferas en placas de 96 pocillos donde se mide el número y tamaño de esferas que se han generado, mediante la tinción del cultivo 3D con naranja de acridina y su posterior medición con el citómetro de imagen. Complementariamente se mide la viabilidad celular por CCK8.

De los cuatro compuestos analizados únicamente el compuesto 70-G23 un efecto claro en la capacidad formadora de esferas del cultivo 3D. Además, este dato correlación con el efecto observado en la viabilidad celular por el ensayo de CCK8, lo cual es esperable ya que en principio, a un menor número de esferas, una menor actividad metabólica observable por pocillo. Así pues, de los 1920 examinados en primera instancia éste sería el único buen candidato para posteriores fases clínicas.

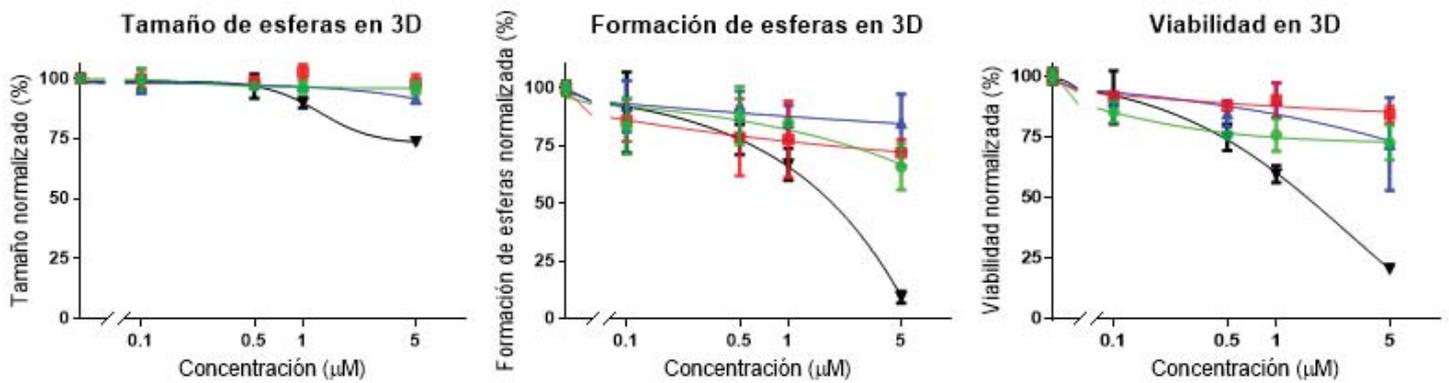


Figura 22. Efecto de los 4 compuestos seleccionados sobre la línea HCT116. En negro el efecto de 70-G23, en rojo el de 69-P06, en verde el de 69-O21 y en azul el de 70-I23. La viabilidad en 3D (derecha) ha sido medida mediante un ensayo con CCK8. Tanto el tamaño de las esferas (izquierda) como la capacidad formadora de las mismas (centro) se han medido a través de una tinción con naranja de acridina y un posterior análisis con el citómetro de imagen.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo de fin de máster indican que las células de las líneas continuas de cáncer HCT-116, BT-474 y CALU-1 presentan, por lo general, una mayor resistencia al tratamiento con los compuestos quimioterápicos seleccionados cuando crecen en cultivo celular en 3D que cuando crecen en cultivo celular en 2D.

Los ensayos de compuestos sobre esferas 3D de células tumorales permiten obtener, en un solo ensayo, información relevante sobre el efecto del compuesto en la viabilidad celular, crecimiento, aspecto y tamaño de la esfera, lo que permite una mejor caracterización del compuesto.

Los ensayos celulares en 3D pueden escalarse para realizar cribados de alto rendimiento de fármacos anti-tumorales. Estos ensayos representan una posible alternativa sencilla, rápida, económica y biológicamente más relevante a los ensayos tradicionales en cultivos celulares en 2D.

7. BIBLIOGRAFÍA

Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(7), 3983-3988.

Amaya, C. N., & Bryan, B. A. (2015). Enrichment of the embryonic stem cell reprogramming factors Oct4, Nanog, Myc, and Sox2 in benign and malignant vascular tumors. *BMC clinical pathology*, *15*(1), 18.

Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):5517-27. Published 2015 Mar 11. doi:10.3390/ijms16035517

Armstrong, S. E., Mariano, J. A., & Lundin, D. J. (2010). The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*, *38*(2), 211-213.

Battle, E., & Clevers, H. (2017). *Cancer stem cells revisited*. *Nature Medicine*, *23*(10), 1124–1134.

Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*, *3*(7), 730.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *68*(6), 394-424.

Breslin, S., & O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today*, *18*(5-6), 240-249.

Chenn, A., & Walsh, C. A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*, *297*(5580), 365-369.

Chepko, G., & Dickson, R. B. (2003). Ultrastructure of the putative stem cell niche in rat mammary epithelium. *Tissue and Cell*, *35*(2), 83-93.

Choi, K. H., Jeon, J. Y., Lee, Y. E., Kim, S. W., Kim, S. Y., Yun, Y. J., & Park, K. C. (2019). Synergistic Activity of Paclitaxel, Sorafenib, and Radiation Therapy in advanced Renal Cell Carcinoma and Breast Cancer. *Translational oncology*, *12*(2), 381-388.

Cojoc, M., Mäbert, K., Muders, M. H., & Dubrovskaja, A. (2015). A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 31, pp. 16-27). Academic Press.

Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, *740*, 364-378.

Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*, *5*(4), 275.

Douillard, J. Y., Rosell, R., De Lena, M., Carpagnano, F., Ramlau, R., González-Larriba, J. L., ... & Clary, C. (2006). Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *The lancet oncology*, *7*(9), 719-727.

Eun, K., Ham, S. W., & Kim, H. (2017). Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB reports*, *50*(3), 117.

- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., & Bray, F. (2014). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359-E386.
- Galani, E., & Christodoulou, C. (2009). Human papilloma viruses and cancer in the post-vaccine era. *Clinical microbiology and infection*, 15(11), 977-981.
- Gallegos-Hernández, J. F. (2006). El cáncer de cabeza y cuello. Factores de riesgo y prevención. *Cirugía y Cirujanos*, 74(4), 287-293.
- Gold Biotechnology. [Sede web]*. St Louis, USA: C. Menne [actualizado 17 de Diciembre de 2014; acceso 9 de Enero de 2019] Disponible en: <https://www.goldbio.com/uploads/documents/429b0ad1486d8e41a337c3f3c2d3f44d.pdf>
- Groszer, M., Erickson, R., Scripture-Adams, D. D., Lesche, R., Trumpp, A., Zack, J. A., & Wu, H. (2001). Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science*, 294(5549), 2186-2189.
- Gumuzio Barrie, J. (2014). *Caracterización de células madre tumorales de cáncer de mama. Desarrollo de nuevos fármacos*. Doctorado. Universidad del País Vasco.
- Gupta N, Liu JR, Patel B, Solomon DE, Vaidya B, Gupta V. Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research. *Bioeng Transl Med*. 2016;1(1):63-81
- Hay, M., Thomas, D. W., Craighead, J. L., Economides, C., & Rosenthal, J. (2014). Clinical development success rates for investigational drugs. *Nature biotechnology*, 32(1), 40.
- Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., & Minami, H. (2015). Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology reports*, 33(4), 1837-1843.
- Ivascu, A., & Kubbies, M. (2006). Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of biomolecular screening*, 11(8), 922-932.
- Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., & Felsher, D. W. (2002). Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science*, 297(5578), 102-104.
- Jimeno, A., Gordon, M., Chugh, R., Messersmith, W., Mendelson, D., Dupont, J., ... & Brachmann, R. K. (2017). A first-in-human phase I study of the anticancer stem cell agent ipafricept (omp-54f28), a decoy receptor for wnt ligands, in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research*.
- Joensuu, H., Kellokumpu-Lehtinen, P. L., Bono, P., Alanko, T., Kataja, V., Asola, R., ... & Turpeenniemi-Hujanen, T. (2006). Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 354(8), 809-820.
- Johnson, S. A., Harper, P., Hortobagyi, G. N., & Pouillart, P. (1996). Vinorelbine: an overview. *Cancer treatment reviews*, 22(2), 127-142.
- Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. 2018;14(4):910-919
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J., & Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature genetics*, 19(4), 379.

- Krause, M., Dubrovskaja, A., Linge, A., & Baumann, M. (2017). Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 109, 63-73.
- LaBonte, M. J., Manegold, P. C., Wilson, P. M., Fazzino, W., Louie, S. G., Lenz, H. J., & Ladner, R. D. (2009). The dual EGFR/HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib sensitizes colon and gastric cancer cells to the irinotecan active metabolite SN-38. *International journal of cancer*, 125(12), 2957-2969.
- Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H., & Schaffer, D. V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature neuroscience*, 6(1), 21.
- Langhans, S. A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 6.
- Lovitt, C. J., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2014). Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. *Biology*, 3(2), 345-367.
- Martín, M., Ruiz, A., Muñoz, M., Balil, A., García-Mata, J., Calvo, L., ... & Escudero, M. J. (2007). Gemcitabine plus vinorelbine versus vinorelbine monotherapy in patients with metastatic breast cancer previously treated with anthracyclines and taxanes: final results of the phase III Spanish Breast Cancer Research Group (GEICAM) trial. *The lancet oncology*, 8(3), 219-225.
- Mazzoleni, G., Di Lorenzo, D., & Steimberg, N. (2009). Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research?. *Genes & nutrition*, 4(1), 13.
- Miller, C. J., Kassem, H. S., Pepper, S. D., Hey, Y., Ward, T. H., & Margison, G. P. (2003). Mycoplasma infection significantly alters microarray gene expression profiles. *BioTechniques*, 35(4), 812-815.
- Mitri, Z., Constantine, T., & O'Regan, R. (2012). The HER2 receptor in breast cancer: pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy. *Chemotherapy research and practice*, 2012.
- Modan, B., Hartge, P., Hirsh-Yechezkel, G., Chetrit, A., Lubin, F., Beller, U., & Tucker, M. A. (2001). Parity, oral contraceptives, and the risk of ovarian cancer among carriers and noncarriers of a BRCA1 or BRCA2 mutation. *New England Journal of Medicine*, 345(4), 235-240.
- Montanez-Sauri, S. I., Beebe, D. J., & Sung, K. E. (2015). Microscale screening systems for 3D cellular microenvironments: platforms, advances, and challenges. *Cellular and molecular life sciences*, 72(2), 237-249.
- National Cancer Institute. [Sede web]*USA [actualizado 23 de Diciembre de 2015; acceso 9 de Enero de 2019] Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>
- National Center for Biotechnology Information [Sede web] Bethesda, USA: [actualizado 27 de Enero de 201; acceso 15 de Enero de 2019] Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/doxorubicin#section=Top>
- Nirmalanandhan, V. S., Duren, A., Hendricks, P., Vielhauer, G., & Sittampalam, G. S. (2010). Activity of anticancer agents in a three-dimensional cell culture model. *Assay and drug development technologies*, 8(5), 581-590.
- O'Brien, M. E., Wigler, N., Inbar, M. C. B. C. S. G., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., ... & Orlandi, F. (2004). Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of oncology*, 15(3), 440-449.
- Pardal, R., Clarke, M. F., & Morrison, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 895.

- Paridaens, R., Biganzoli, L., Bruning, P., Klijn, J. G. M., Gamucci, T., Houston, S., ... & Awada, A. (2000). Paclitaxel versus doxorubicin as first-line single-agent chemotherapy for metastatic breast cancer: a European Organization for Research and Treatment of Cancer Randomized Study with cross-over. *Journal of clinical oncology*, 18(4), 724-724.
- Park, I. K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., & Clarke, M. F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, 423(6937), 302.
- Pierce, G. B., & Speers, W. C. (1988). Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer research*, 48(8), 1996-2004.
- Pirker, R., Szczesna, A., Von Pawel, J., Krzakowski, M., Ramlau, R., Park, K., ... & Pereira, J. R. (2008). FLEX: A randomized, multicenter, phase III study of cetuximab in combination with cisplatin/vinorelbine (CV) versus CV alone in the first-line treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*, 26(15_suppl), 3-3.
- Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y. Z., Heinemann, V., Grunewald, R., & Gandhi, V. (1995, August). Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. In *Seminars in oncology* (Vol. 22, No. 4 Suppl 11, pp. 3-10).
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., & Solomon, F. P. (2015). 3D cell culture systems: advantages and applications. *Journal of cellular physiology*, 230(1), 16-26.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., & Weissman, I. L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423(6938), 409.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105.
- Ryan, S. L., Baird, A. M., Vaz, G., Urquhart, A. J., Senge, H., Richard, D. J., ... & Davies, A. M. (2016). Drug discovery approaches utilizing three-dimensional cell culture. *Assay and drug development technologies*, 14(1), 19-28.
- Siclari, V. A., & Qin, L. (2010). Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 5(1), 78.
- Sigma-Aldrich. [Sede web]*. St Louis, USA [acceso 9 de Enero de 2019] Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/96992-product-information.pdf
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*, 63(18), 5821-5828.
- Smith, D. C., Eisenberg, P. D., Manikhas, G., Chugh, R., Gubens, M. A., Stagg, R. J., ... & Sikic, B. (2014). A phase I dose escalation and expansion study of the anticancer stem cell agent demcizumab (anti-DLL4) in patients with previously treated solid tumors. *Clinical Cancer Research*.
- Taipale, J., & Beachy, P. A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 411(6835), 349.
- The Union for International Cancer Control [Sede web]*. Ginebra, Suiza [actualizado 18 de Septiembre de 2018; acceso 4 de Enero de 2019] Disponible en: <https://www.uicc.org/new-global-cancer-data-globocan-2018>
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 25(1), 16-27.

Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., & Bernstein, I. D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature medicine*, 6(11), 1278.

Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Lomas, C., ... & Eccles, S. A. (2012). Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC biology*, 10(1), 29.

Wechsler-Reya, R. J., & Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*, 22(1), 103-114.

Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., & Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938), 448.

ANEXO I: GRÁFICAS RATIO VS. CCK8

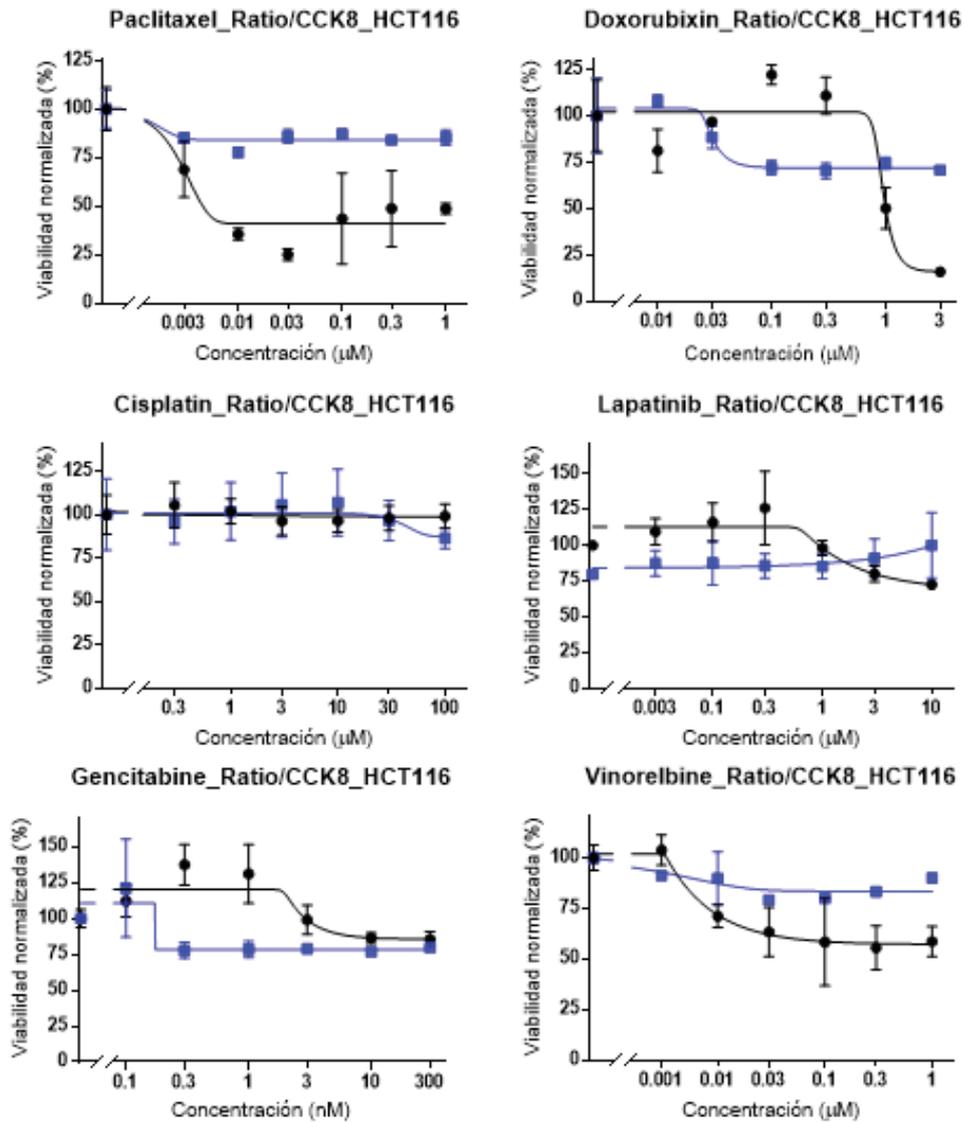


Figura 23. Efecto de compuestos quimioterápicos sobre la línea HCT116. Comparación de la medida de la viabilidad celular en 3D: Ratio (en negro) vs CCK8 (en azul). Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento.

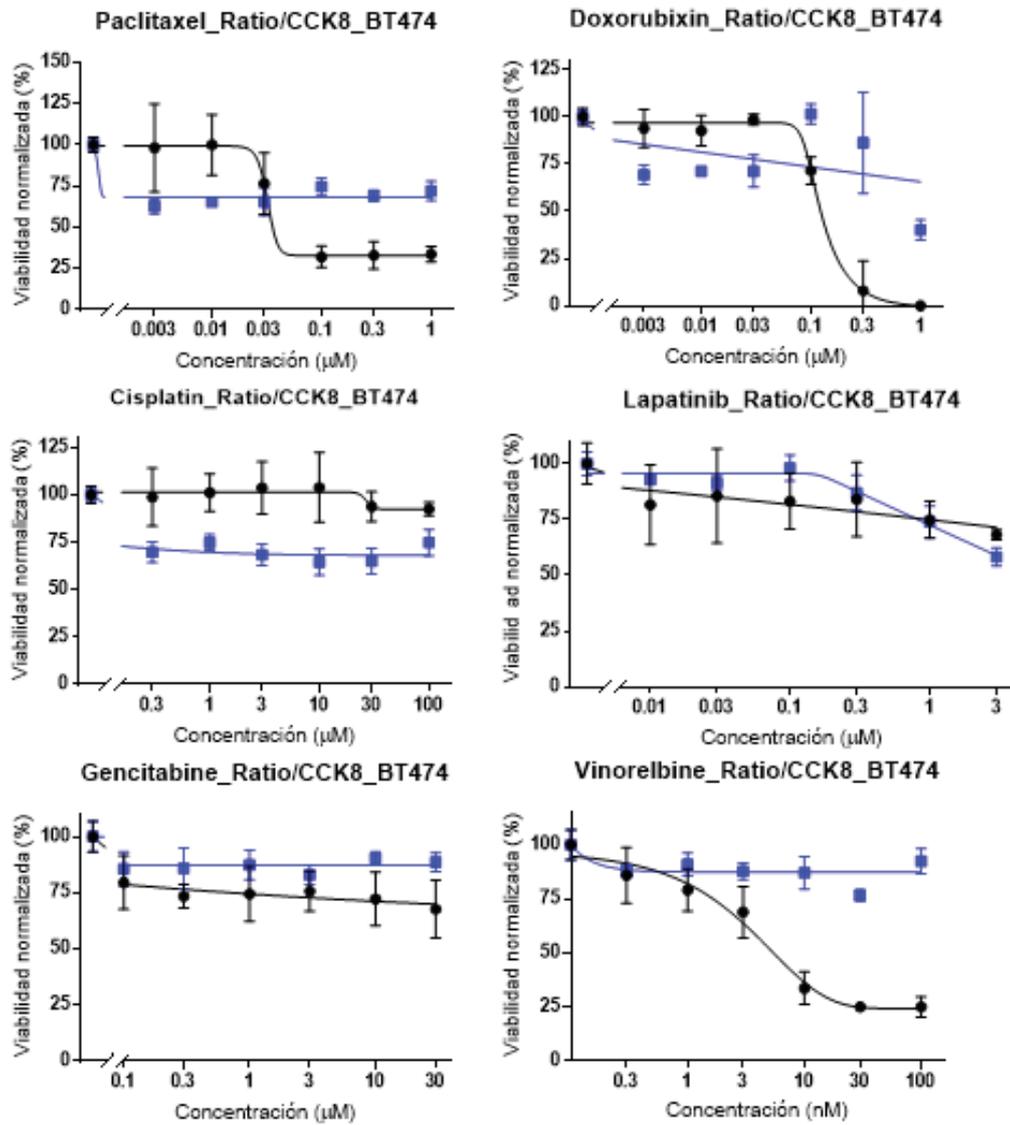


Figura 24. Efecto de compuestos quimioterápicos sobre la línea BT474. Comparación de la medida de la viabilidad celular en 3D: Ratio (en negro) vs CCK8 (en azul). Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento.

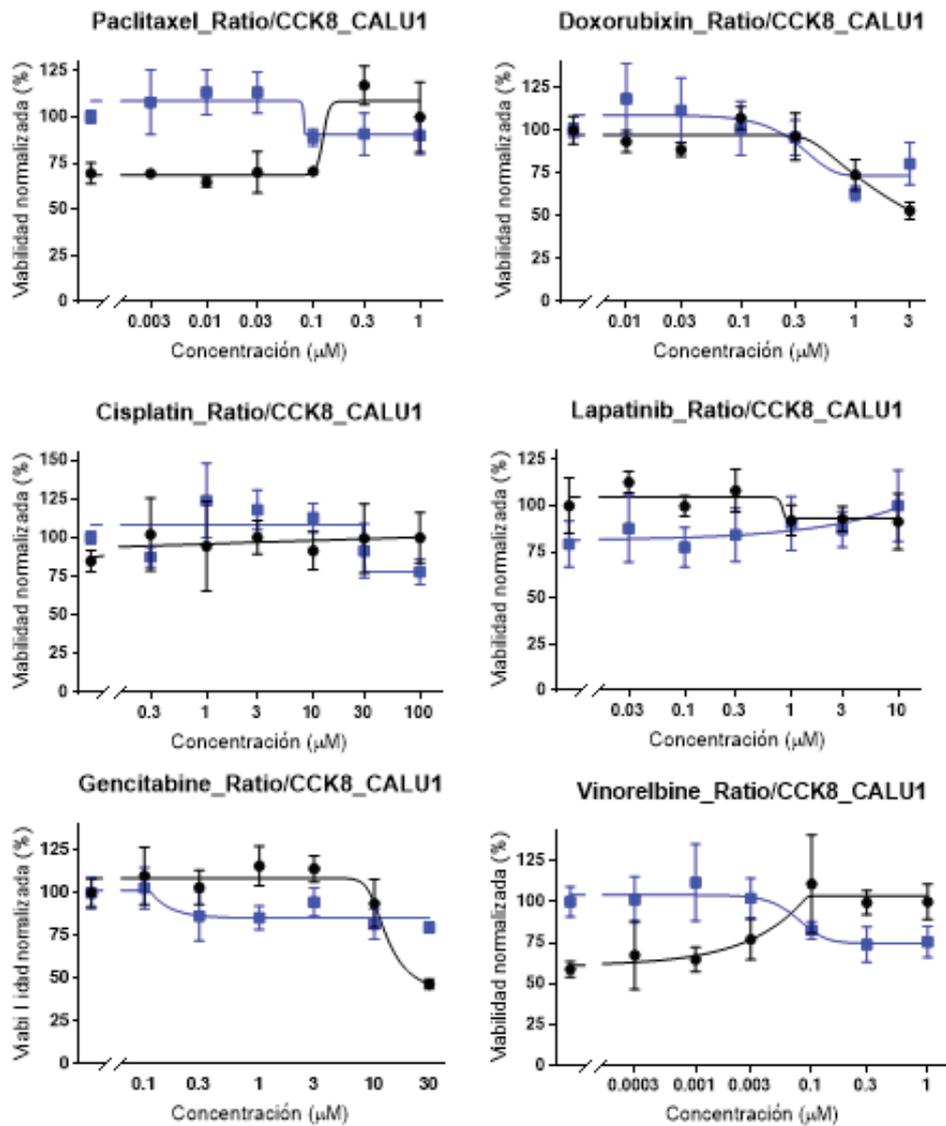


Figura 25. Efecto de compuestos quimioterápicos sobre la línea CALU1. Comparación de la medida de la viabilidad celular en 3D: Ratio (en negro) vs CCK8 (en azul). Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento.

ANEXO II: GRÁFICAS TAMAÑO

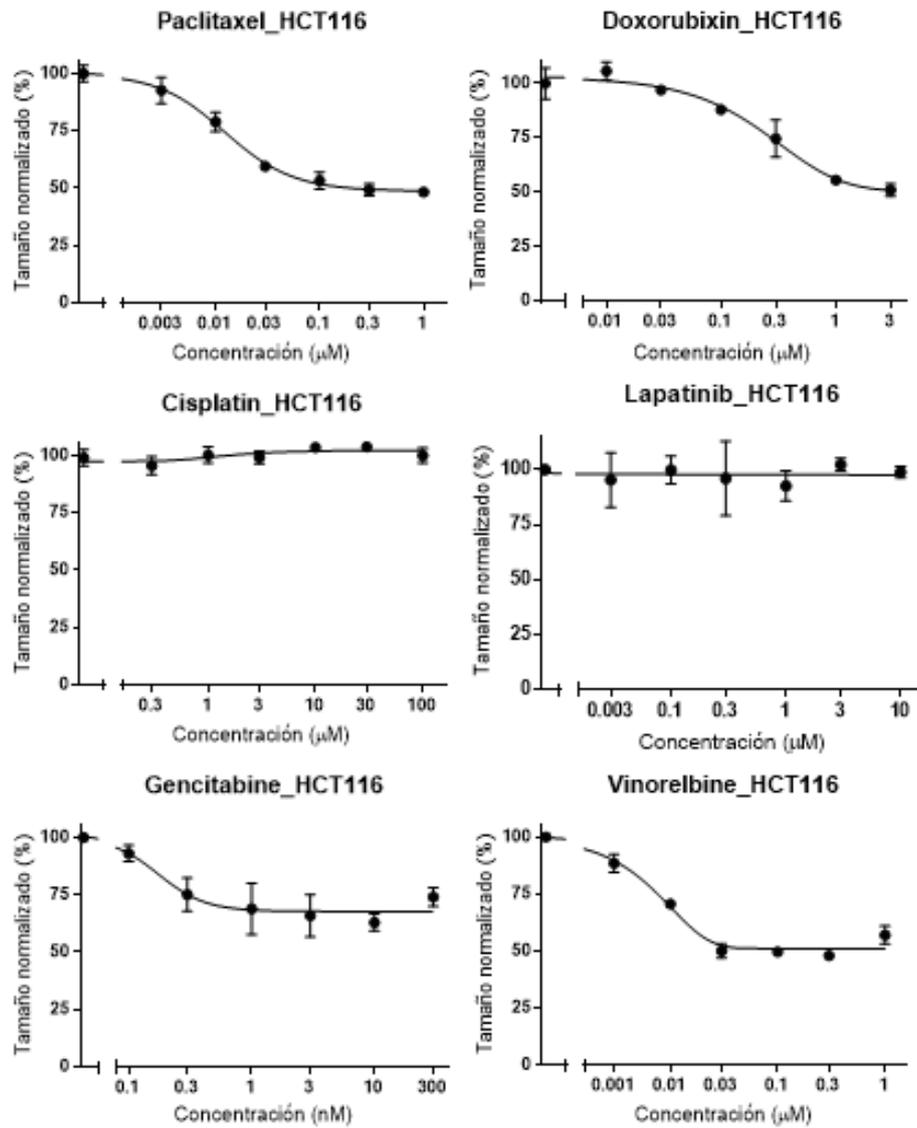


Figura 26. Efecto de compuestos quimioterápicos sobre el tamaño de la oncoesfera en la línea HCT116. Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento.

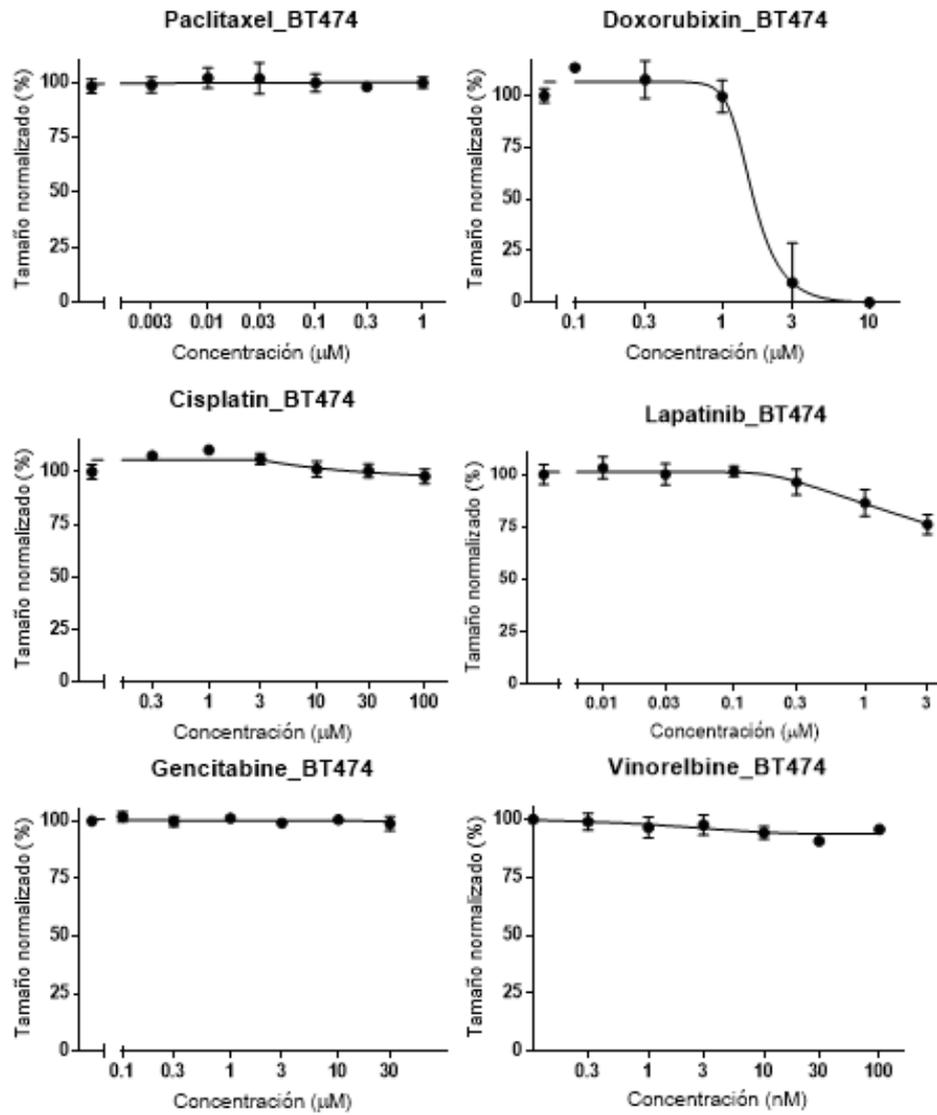


Figura 27. Efecto de compuestos quimioterápicos sobre el tamaño de la oncoesfera en la línea BT474. Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento.

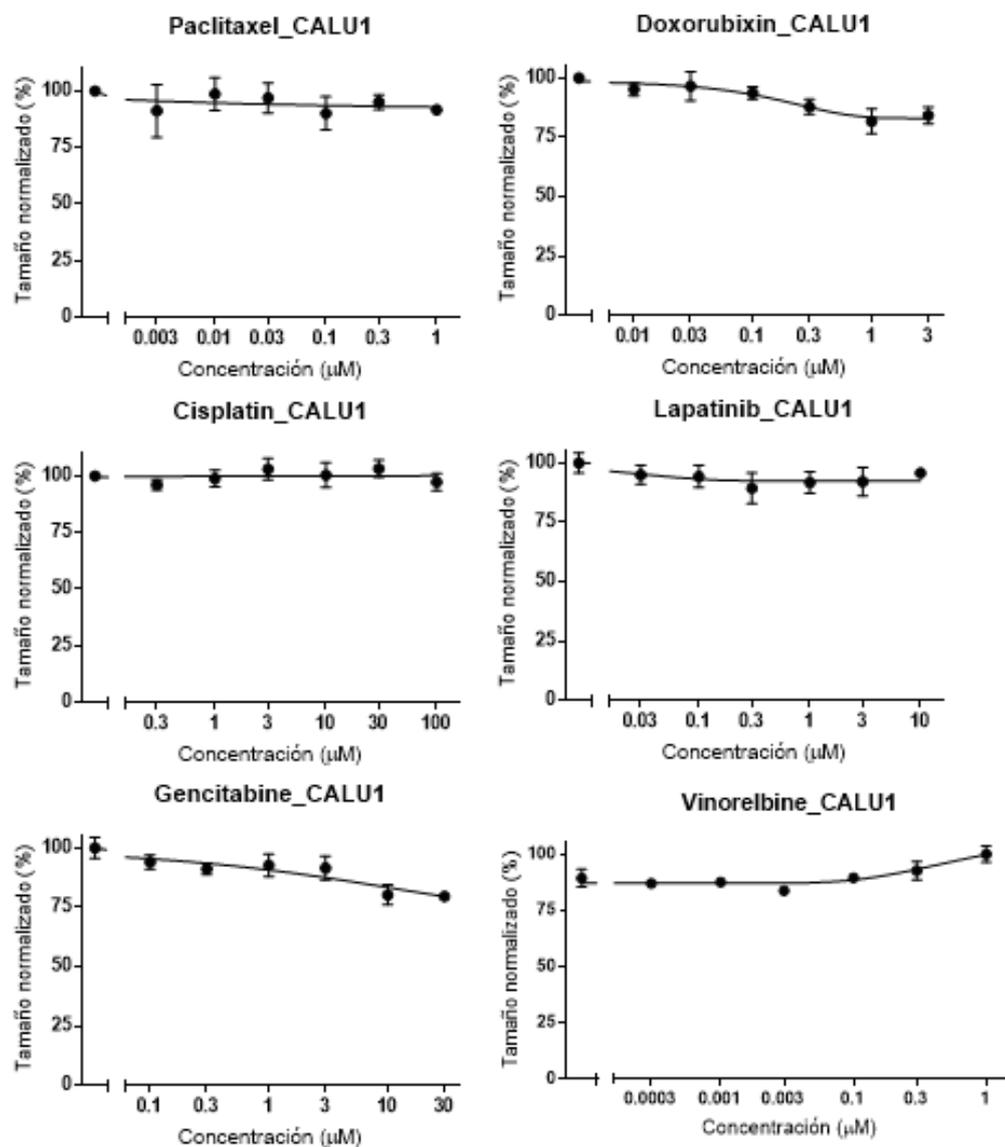


Figura 28. Efecto de compuestos quimioterápicos sobre el tamaño de la oncoesfera en la línea CALU1. Los datos están normalizados respecto al control sin tratamiento.