

**EVALUACIÓN DEL METABOLISMO DE LA RESAZURINA EN FUNCIÓN DE LA  
FORMA Y TAMAÑO DE ESFEROIDES TUMORALES ORALES.**

**Brayan Alfonso Saenz Muñoz**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
BOGOTÁ DC.- JUNIO 2021.**

## HOJA DE IDENTIFICACIÓN

<b>Universidad</b>	El Bosque
<b>Facultad</b>	Odontología
<b>Programa</b>	Odontología
<b>Título:</b>	Evaluación del metabolismo de la resazurina en función de la forma y tamaño de los esferoides tumorales orales.
<b>Grupo de Investigación:</b>	Unidad de Investigación Básica Oral-UIBO Grupo de Inmunología Celular y Molecular Universidad el Bosque - INMUBO
<b>Línea de investigación:</b>	Línea de Biotecnología Línea de Cáncer Oral
<b>Tipo de investigación:</b>	Pregrado /Grupo
<b>Estudiante:</b>	Brayan Alfonso Sáenz Muñoz
<b>Director:</b>	Dra. Johanna Morantes.
<b>Codirector</b>	Dr. Andrés Cardona.
<b>Asesor metodológico:</b>	Dra. Gloria Inés Lafaurie.

## **DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

<b>OTTO BAUTISTA GAMBOA</b>	Presidente del Claustro
<b>JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO</b>	Presidente Consejo Directivo
<b>MARIA CLARA RANGEL G.</b>	Rector(a)
<b>RITA CECILIA PLATA DE SILVA</b>	Vicerrector(a) Académico
<b>FRANCISCO JOSÉ FALLA CARRASCO</b>	Vicerrector Administrativo
<b>MIGUEL OTERO CADENA</b>	Vicerrectoría de Investigaciones.
<b>CRISTINA MATIZ MEJIA</b>	Secretaria General
<b>JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS</b>	División Postgrados
<b>MARIA ROSA BUENAHORA</b>	Decana Facultad de Odontología
<b>MARTHA LILIANA GOMEZ RANGEL</b>	Secretaria Académica
<b>DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ</b>	Directora Área Bioclinica
<b>ALEJANDRO PERDOMO RUBIO</b>	Director Área comunitaria
<b>JUAN GUILLERMO AVILA ALCALÁ</b>	Coordinador Área Psicosocial
<b>INGRID ISABEL MORA DIAZ</b>	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
<b>IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES</b>	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

**“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético de este en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.**

## GUÍA DE CONTENIDO

	Págs.
<b>Resumen</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>3</b>
<b>3. Planteamiento del problema</b>	<b>12</b>
<b>4. Justificación</b>	<b>14</b>
<b>5. Situación Actual</b>	<b>14</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>17</b>
<b>7. Metodología del Proyecto</b>	<b>18</b>
<b>7.1. Tipo de estudio</b>	
<b>7.2. Población y muestra (Criterios de selección y exclusión)</b>	
<b>7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información</b>	
<b>7.4 Plan de tabulación y análisis.</b>	<b>19</b>
<b>a. Estadística descriptiva</b>	
<b>8. Consideraciones éticas.</b>	<b>20</b>
<b>9.. Resultados</b>	
<b>10. Discusión</b>	<b>28</b>
<b>11. Conclusiones</b>	<b>30</b>
<b>12. Referencias bibliográficas</b>	<b>31</b>

## LISTADO DE TABLAS

		<b>Págs.</b>
<b>Tabla 1</b>	Diferencias clave entre los cultivos bidimensionales y los cultivos tridimensionales. Tomada y adaptada de Edmondson et al., 2014.	<b>5</b>

## LISTADO DE FIGURAS

		<b>Págs.</b>
<b>Figura 1</b>	Células tumorales y su microambiente. Las células de la capa proliferativa (rojo), Las células de la capa quiescente (rosa), Las células de la capa necrótica (morado), se encuentran rodeadas por un microambiente complejo que consta de proteínas y glicoproteínas de la matriz extracelular (MEC) (verde), células de apoyo que median las interacciones célula-célula (azul), células inmunes (amarillo) y factores solubles (esferas blancas). Tomado y adaptado de Langhans, 2018.	7
<b>Figura 2</b>	Reducción de resazurina a resorufina. El compuesto activo del alamarBlue® es la resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido), esta se usa como un indicador del metabolismo celular, ya que en su forma oxidada la resazurina es de color azul y no es fluorescente, mientras que, en su forma reducida, que es de color rosa y fluorescente y se le llama resorufina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona). Tomado y adaptado de Walzl et al., 2014.	9
<b>Figura 3</b>	Software de código abierto AnaSp y ReViSP. se distribuyen libremente como una herramienta de software de código abierto. En particular, las versiones ejecutables independientes de 32 bits y 64 bits de ReViSP y AnaSp, están dotados de una plataforma GUI simple que lo hace particularmente fácil de usar. Tomado y adaptado de Piccinini et al., 2014.	11
<b>Figura 4</b>	Actividad metabólica de la resazurina en células CAL27 creciendo en monocapa. (A) Cultivo 2D observado a diferentes densidades celulares, (B) curva de intensidad media de fluorescencia (IMF) en cultivos bidimensionales. Elaborado por Brayan Saenz.	22
<b>Figura 5</b>	Actividad metabólica de la resazurina en células CAL27 creciendo esferoides 3D.(A) Cultivo 3D observado a diferentes densidades celulares y presencia de las diferentes capas del esferoide, (B) curva de intensidad media de fluorescencia (IMF) en los esferoides a diferentes densidades. Elaborado por Brayan Saenz.	23
<b>Figura 6</b>	Actividad metabólica de la resazurina en esferoides con mayor área y tamaño. (A) Software de procesamiento de imágenes de código abierto imageJ, (B) curva de intensidad media de fluorescencia (IMF) discriminado por área y (C) curva de intensidad media de fluorescencia (IMF) discriminado por tamaño de los esferoides. Elaborado por Brayan Saenz.	24
<b>Figura 7</b>	Procesamiento y reconstrucción de esferoides de células CAL27. (A) Software de procesamiento de imágenes de código abierto imageJ, parámetros descriptivos de circularidad (B) procesamiento, mapeo y visualización de la superficie de los esferoides (C) representación tridimensional de los esferoides clasificados en esféricos y no esféricos. Elaborado por Brayan Saenz.	26
<b>Figura 8</b>	Actividad metabólica de la resazurina en los grupos de esferoides. (A) diferencia en la IMF en los grupos esféricos y no esféricos (n=9), (B) curva de intensidad media de fluorescencia (IMF) total expresada en cultivos 2D vs cultivos 3D a diferentes densidades celulares. Elaborado por Brayan Saenz.	28

## RESUMEN

### EVALUACIÓN DEL METABOLISMO DE LA RESAZURINA EN FUNCIÓN DE LA FORMA Y TAMAÑO DE ESFEROIDES TUMORALES ORALES.

**Antecedentes:** El cáncer oral es el crecimiento celular maligno localizado en la cavidad oral. El manejo terapéutico y/o quirúrgico de la enfermedad es muy agresivo y se basa en el estadio, localización y tamaño del carcinoma al momento del diagnóstico. Estudios recientes se han enfocado en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento menos invasivas, menos costosas y con menores efectos adversos. Los ensayos basados en células han sido un pilar importante en estos estudios debido a que son modelos de fácil acceso y de menor costo si se compara con los modelos *in vivo*. Los cultivos 3D representan una organización espacial y un comportamiento celular muy similar al tumor, aunque se han evidenciado algunas limitaciones para usarlos de rutina en el laboratorio. El ensayo de reducción de resazurina (RR) o alamarBlue® se emplea como una medida indirecta para evaluar el número de células viables en un esferoide, sin embargo, debido a la variabilidad en tamaño, forma y actividad metabólica se han observado modificaciones en el metabolismo de la resazurina, que pueden dar lugar a una mala interpretación de los resultados del ensayo. **Objetivo:** Evaluar el metabolismo de la resazurina en función de la forma y tamaño de los esferoides de células CAL27. **Materiales y Métodos:** Se propagaron células CAL27 en frascos de cultivo T75 hasta llegar a una confluencia del 90%, las células se separaron del soporte, se centrifugaron a 1500 rpm y el pellet obtenido se utilizó para la conformación de los esferoides en doce diferentes densidades celulares, después de 72h de incubación se realizó el ensayo RR reemplazando 100 µl de medio por 100µl de una solución de resazurina (80 µM). Para garantizar la transformación de la resazurina a resofurina, los esferoides fueron incubados por 12 h. Los experimentos se realizaron en duplicado usando seis réplicas por cada densidad. **Resultados:** IMF emitida por los esferoides aumenta a medida que hay un aumento en el tamaño y área de los esferoides, así mismo se evidenció que en tamaños superiores a 300 µm algunos esferoides presentaban una forma irregular. Una agrupación descriptiva de cultivos esféricos y no esféricos dejó ver un aumento poco significativo en la IMF emitida por el grupo esférico. Como se esperaba, en los cultivos 2D se evidenció una mayor tasa del metabolismo de la resazurina con respecto a los cultivos 3D. **Conclusiones:** Con este trabajo se establecieron valores de referencia de IMF para esferoides de diferentes tamaños. Se demostró que el metabolismo de la resazurina en los esferoides de CAL27 exhibe una relación directamente proporcional al tamaño y densidad celular, sugiriendo que si un tratamiento afecta el tamaño de un esferoide se debería observar una disminución en la reducción de la resazurina.

**Palabras claves:** Cáncer oral, Ensayo de reducción de resazurina, carcinoma escamo celular, cultivo celular esferoide, viabilidad celular.



## ABSTRACT

### RESAZURIN METABOLISM ASSESSMENT AS A FUNCTION OF THE SHAPE AND SIZE OF ORAL TUMORAL SPHEROIDS.

**Background information:** Oral cancer is the malignant cell growth type of cancer found in the oral cavity. The disease's therapeutic and/or surgical management is aggressive, and is determined by the stage, location, and size of the carcinoma at the time of diagnosis. Recent research has focused on finding new treatment options that are less intrusive, less expensive, and have less side effects. Cell-based assays have been a hallmark in this research since they are more accessible and cheaper than in vivo models. Although several limitations have been demonstrated for their normal usage in the laboratory, 3D cultures show a spatial structure and cellular behavior that is remarkably comparable to that of a tumor. The resazurin reduction test (RR) or alamarBlue® is used as an indirect measure to determine the amount of viable cells in a spheroid; nevertheless, alterations in metabolism have been reported due to the fluctuation in size, shape, and resazurin, metabolic activity which can cause test findings to be misinterpreted. **Objective:** Based on the shape and size of CAL27 cell spheroids, assess resazurin metabolism. **Materials and Methods:** After 72 hours of incubation, the RR test was performed by replacing 100 l of medium with 100 l of a resazurin solution (80 M) in T75 culture flasks until the cells reached 90% confluence, the cells were separated from the support, centrifuged at 1500 rpm, and the pellet obtained was used for the conformation of the spheroids in twelve different cell densities. The spheroids were incubated for 12 hours to ensure that resazurin was converted to resofurin. The studies were done in pairs, with six replicates for each density. **Outcomes:** The amount of IMF released by spheroids grows as their size and area grow larger; it was also discovered that some spheroids with diameters more than 300 m had an uneven shape. The MFI radiated by the spherical group was slightly higher than that of the non-spherical group, according to a descriptive grouping of spherical and non-spherical cultures. When compared to 3D cultures, 2D cultures demonstrated a greater rate of resazurin metabolism. **Conclusions:** MFI reference values for spheroids of various sizes were established with this work. Resazurin metabolism was found to be directly proportional to cell size and density in CAL27 spheroids, implying that if a treatment impacts the size of a spheroid, a drop in resazurin reduction should be detected.

**Keywords:** Oral Cancer, Resazurin Reduction Assay, Squamous Cell Carcinoma, Spheroid Cell Culture, Cell Viability.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer oral es el término general utilizado para cualquier crecimiento maligno localizado en la cavidad oral que afecta a todos los tejidos, incluyendo labios, paladar, lengua, piso de boca, encías, carrillos y garganta. El manejo terapéutico y/o quirúrgico de la enfermedad se basa en el estadio, localización y tamaño del carcinoma al momento del diagnóstico. Por lo general, el tratamiento de elección es la resección quirúrgica, seguido de un régimen de radioterapia dirigida y modulada por ciclos de quimioterapia y en ocasiones acompañado con ciclos de inmunoterapia (1, 2, 3, 4). Los efectos secundarios de la radioterapia incluyen la mucositis dolorosa y esofagitis. El tiempo de recuperación del tejido depende de la dosis de radiación, generalmente ocurre durante las tres primeras semanas posteriores al tratamiento, lo que genera un deterioro continuo en la calidad de vida del paciente. Es por esta razón que la ciencia se ha enfocado en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento menos invasivas y costosas que causen menos efectos adversos a los tratamientos convencionales. Los cultivos de las líneas celulares derivadas de OSCC, se han convertido en una importante herramienta para comprender la patogenia de esta enfermedad y uno de los modelos preclínicos más empleados en la búsqueda de alternativas terapéuticas más seguras y eficaces para el tratamiento de esta enfermedad (5). Los ensayos basados en células han sido un pilar importante en los estudios preclínicos, debido a que son modelos de fácil acceso, constituyen una herramienta simple, rápida y menos costosa si se compara con los modelos *in vivo*. Los cultivos celulares bidimensionales (2D), son células cultivadas en sustratos de plástico planos y rígidos, que aunque han demostrado ser una herramienta invaluable para los estudios basados en células, sus limitaciones se han reconocido cada vez más ya que estudios recientes sobre comunicación, microambiente y comportamiento espacial de las células tumorales, han puesto al descubierto la gran necesidad de realizar nuevos procedimientos, que permitan cultivar células en un entorno lo más similar al tumoral (6). En ese sentido, la principal diferencia entre ambos tipos de cultivos, es que en los cultivos 2D las células crecen adheridas a un sustrato plano o en suspensión, mientras que en los modelos de cultivos en 3D, las células se encuentran dispuestas sobre un andamiaje sólido (natural o artificial), formando grupos

celulares generalmente de forma esferoidal (esferoides) o en pequeñas formaciones a modo de cápsulas esféricas (esferas líquidas)(7), lo que permite una mayor interacción célula-célula y facilita la secreción de matriz extracelular, estos sistemas tridimensionales al representar características propias del entorno natural del tumor hacen que este modelo sea más robusto y confiable para la evaluación de nuevas alternativas terapéuticas.

El empleo del ensayo de reducción de resazurina (RR), comercialmente conocido como el ensayo de alamarBlue® o CellTiter-Blue® es más recientemente usado para medir la proliferación y viabilidad en células eucariotas. En este ensayo, las células que son metabólicamente activas transforman la forma oxidada de la resazurina (de color azul y no fluorescente) a su forma reducida resorufina, (de color rosa y fluorescente). Los cambios de color pueden ser cuantificados por un espectrofluorómetro y analizados en función de la actividad metabólica, y de manera indirecta la viabilidad celular (8). Debido a que los cultivos celulares basados en esferas representan una organización espacial y un comportamiento celular muy similar al tumor, el modelo de esferoides muestra unas limitaciones de difusión que causan diferencias en el metabolismo energético lo que afecta la fisiología en general y el crecimiento exponencial de los esferoides (9). Es por ello que a través de este trabajo se busca establecer cómo influyen la forma y el tamaño de los esferoides frente al metabolismo de la resazurina.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Cáncer oral**

El carcinoma Escamo celular Oral (OSCC), se desarrolla en la mucosa de los labios, carrillos, paladar, piso de boca y lengua (10), es muy agresivo con altas tasas de morbilidad y mortalidad, siendo considerado el décimo quinto cáncer más común en el mundo según Globocan; 2020 con cifras que van en aumento cada año. Afecta tanto a hombres como mujeres de igual forma, sin embargo, tiene una mayor prevalencia en hombres, en edades de 50 años (11, 12), con tasas de incidencia de 5.7% con 19.837 casos reportados en América latina, y el caribe, según cifras de la agencia internacional para la investigación en cáncer de la OMS (Globocan), lo que ha convertido a esta enfermedad en un problema de salud pública. Los factores de riesgo asociados al desarrollo de esta enfermedad son el consumo de alcohol, tabaquismo e infecciones con virus del papiloma humano (13, 14), e incluso por alteraciones en la microbiota oral (15). El manejo terapéutico de la enfermedad en la actualidad se basa en el estadio, localización y tamaño del carcinoma al momento del diagnóstico (2). Por lo general, el tratamiento de elección es la resección quirúrgica, seguido de un régimen de radioterapia dirigida y modulada por ciclos de quimioterapia y en algunos casos combinado con ciclos de inmunoterapia (1, 2, 3, 4). No obstante, los tratamientos mencionados deterioran la calidad de vida, generando complicaciones que incluyen la mucositis dolorosa y esofagitis. La mucositis puede ser reducida mediante la reducción de las dosis de radioterapia o de fármacos citotóxicos, manteniendo una buena higiene y evitando irritantes como lo son el tabaco y comidas picantes (16).

### **2.2. Modelos *in vitro* de investigación en cáncer**

Las líneas celulares derivadas de OSCC, se han convertido en una importante herramienta para comprender la patogenia de esta enfermedad y la búsqueda de alternativas terapéuticas más seguras y eficaces. Los cultivos celulares han demostrado ser modelos útiles en los estudios asociados al descubrimiento de nuevos fármacos, siendo este un modelo simple, rápido y menos costoso (5).

### **2.2.1. Cultivo bidimensionales o en 2D**

Los cultivos en monocapa son células que crecen adheridas sobre un soporte sólido que hace que las células se vean obligadas a asentarse en una superficie plana, esta hace que cerca del 50% de su área de superficie sea dedicada únicamente a la adhesión, dejando una parte limitada a la interacción celular (17). Aunque ha demostrado ser un modelo importante en los estudios de actividad anti proliferativa, se han evidenciado diferentes limitaciones, ya que las células dentro de su entorno natural *in vivo* se encuentran rodeadas de una matriz extracelular de forma tridimensional mientras que en los cultivos bidimensionales no existe interacción lo que limita la respuesta celular reflejada en un modelo *in vivo*. El cultivo 2D al no representar el entorno natural de las células tumorales, conduce a que los resultados de las pruebas realizadas arrojan datos no predictivos o que difieran de los obtenidos en modelos *in vivo* (6).

### **2.2.2. Cultivos tridimensionales tipo esferoides**

Estudios recientes sobre comunicación, microambiente y comportamiento espacial de las células tumorales, han puesto al descubierto la gran necesidad de incorporar nuevos modelos preclínicos, que permitan cultivar células en un entorno lo más semejante posible al tejido del cual forman parte (7). En ese sentido, los sistemas de cultivo tridimensional aprovechan la tendencia natural de las células a agregarse a sí mismas formando masas multicelulares en forma esferoidal lo que ha despertado un interés paulatino, ya que los esferoides cultivados en sistemas 3D pueden imitar con precisión algunas características de los tumores sólidos, como lo son su arquitectura espacial, respuestas fisiológicas, secreción de mediadores solubles, patrones de expresión genética y mecanismos de resistencia a fármacos (18). Puesto que se ha encontrado que las células tumorales cultivadas en sistemas 3D difieren morfológica y fisiológicamente a las células cultivadas en un sistema 2D. Las características adicionales dadas por la dimensionalidad resultan ser esenciales en la respuesta celular a fármacos, porque influyen en la organización espacial de los receptores de superficie involucrados en la interacción célula a célula, además otorgan restricciones físicas, afectando la señal de transducción desde el exterior hacia el interior de la célula, modificando la expresión de genes y en el comportamiento celular (6). En la **tabla 1** se muestran algunas de las diferencias más representativas en estos modelos de cultivo.

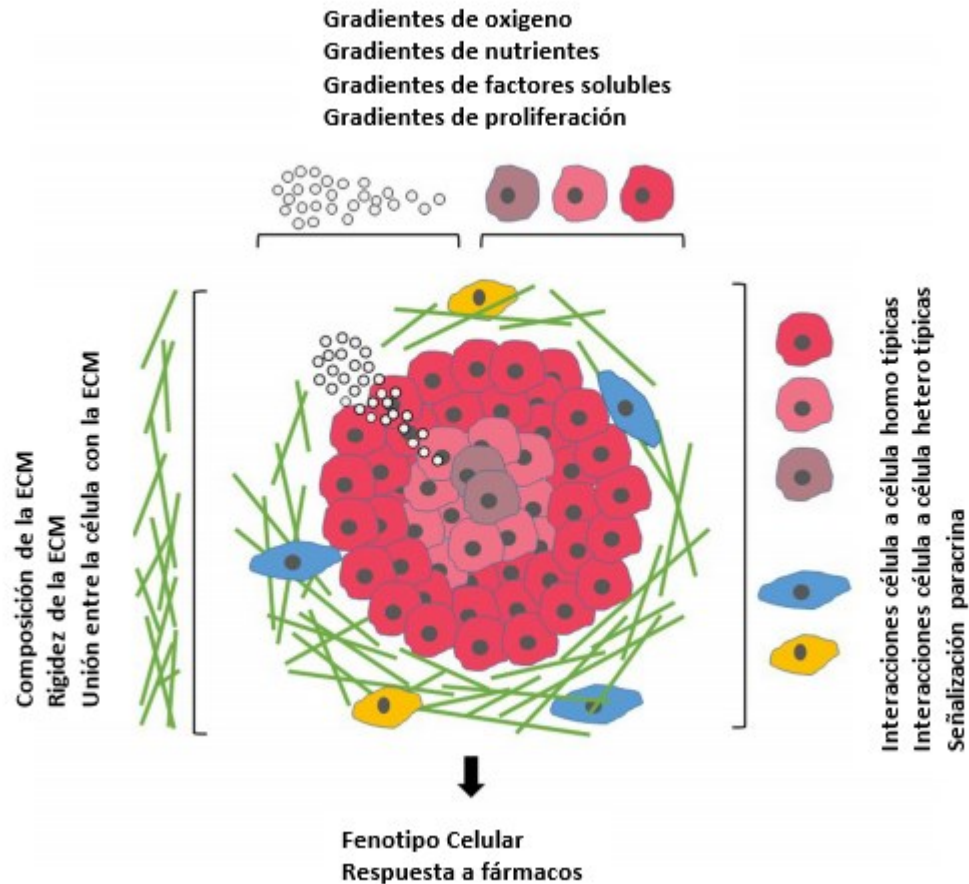
**Tabla 1.** Diferencias clave entre los cultivos bidimensionales y los cultivos tridimensionales

Características celulares	2D	3D
<b>Morfología</b>	Células creciendo en forma de lámina plana	Células creciendo en agregados celulares en forma esférica
<b>Proliferación</b>	A menudo su tasa de proliferación es más rápida que <i>in vivo</i> .	Puede proliferar de forma rápida, en una tasa más lenta comparada con cultivos celulares en 2D, dependiendo del tipo de célula y del sistema o modelo en 3D.
<b>Exposición al medio/ fármaco</b>	Las células en monocapa están igualmente expuestas a nutrientes, factores de crecimiento y fármacos que son distribuidos en un medio de crecimiento.	Los nutrientes y factores de crecimiento o fármacos no pueden permear al interior del esferoide en su totalidad.
<b>Etapas del ciclo celular</b>	La mayor parte de las células se encuentran en la misma etapa del ciclo celular porque todas tienen el mismo acceso a nutrientes y oxígeno.	Su capa más externa está compuesta por células que muestran una alta tasa de proliferación debido a su fácil acceso al oxígeno y nutrientes mientras que su capa media presenta células en quiescencia, y su capa más interna está compuesta por células necróticas.

<b>Expresión de genes / proteínas</b>	A menudo muestran niveles diferenciales de expresión de genes y proteínas en comparación con modelos <i>in vivo</i> .	Las células a menudo exhiben una expresión de genes y proteínas más similar a modelos <i>in vivo</i> y al tejido original.
<b>Sensibilidad a fármacos</b>	Las células a menudo responden al tratamiento con fármacos y parecen ser más efectivos.	Las células a menudo son más resistentes al tratamiento y tienen una mejor predicción a respuestas farmacológicas <i>in vivo</i> .

Adaptado de (6).

Como ocurre en los tumores sólidos, la estructura interna de los esferoides está constituida por un complejo microambiente que afecta directamente el comportamiento celular dentro del del tumor, el esferoide está compuesto por diferentes capas celulares (**Figura 1**), donde la capa más externa está compuesta por células que muestran una mayor tasa de proliferación debido al fácil acceso a oxígeno y nutrientes de la periferia, mientras que en la capa media predominan células quiescentes y la capa más interna o nuclear, está constituido por células necróticas debido a su ausencia de oxígeno y nutrientes (18). Los cambios dinámicos ocurridos dentro del esferoide pueden regular la proliferación, adhesión y organización celular por lo que podría influir en la respuesta de una célula en el esferoide a diferentes estímulos (19).



**Figura 1. Células tumorales y su microambiente.** Las células de la capa proliferativa (rojo), Las células de la capa quiescente (rosa), Las células de la capa necrótica (morado), se encuentran rodeadas por un microambiente complejo que consta de proteínas y glicoproteínas de la matriz extracelular (MEC) (verde), células de apoyo que median las interacciones célula-célula (azul), células inmunes (amarillo) y factores solubles (esferas blancas). Adaptado de (19).

Las células tumorales creciendo en esferoides o aquellas que forman parte del tejido afectado, al igual que las células sanas en un tejido normal, se organizan formando complejas redes 3D que favorecen el contacto célula-célula e interacciones célula-matriz extracelular. Esta compleja disposición alcanzada en cultivos 3D les confiere varias características únicas, como la baja difusión de gradientes químicos (oxígeno, nutrientes o metabolitos) en diámetros a partir de 200  $\mu\text{m}$  y el desarrollo de un área necrótica secundaria central desde un diámetro de 500  $\mu\text{m}$  en adelante (9), lo que genera un fenómeno de resistencia multicelular (MCR), llevando a la reducción de la permeabilidad de fármacos y la modulación de la expresión de proteínas (20). Las células ubicadas en la periferia reflejan la situación *in*



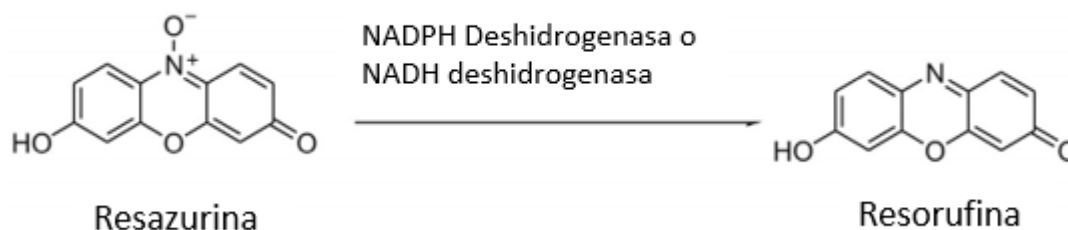
vivo de células tumorales en ciclo activo, mientras que las células más internas se vuelven inactivas y eventualmente mueren por apoptosis o necrosis (9). La producción de esferoides heterogéneos en términos de parámetros morfológicos como lo son el diámetro, el volumen, perímetro, área y esfericidad puede llegar a afectar la reproducibilidad de los datos obtenidos ya que la forma irregular de los esferoides puede influir en el número de células expuestas al medio con xenobióticos (9). de ahí la importancia de caracterizar el tamaño y la forma en los cultivos 3D en función del metabolismo de la resazurina.

### **2.3. ACTIVIDAD METABÓLICA EN LOS ESFEROIDES**

Existen varias técnicas utilizadas para evaluar la viabilidad celular bajo condiciones de cultivo *in vitro*, en las que se destacan los ensayos funcionales donde se evalúan intermediarios metabólicos necesarios para el crecimiento celular como lo es el ATP y otros productos del metabolismo celular como el lactato, la glucosa, el amoniaco, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Por otro lado, ensayos de reducción del MTT, XTT, ácido fosfatasa y la resazurina han sido ampliamente usados como una medida indirecta de la viabilidad celular. Bajo esta idea el daño celular puede ser asociado con la pérdida de la capacidad metabólica o una reducción en la de producción y de almacenamiento del ATP y otros metabolitos (21). 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 múltiples nutrientes (glucosa, oxígeno y lactato), alterando el metabolismo energético de la glucólisis junto a la producción y consumo de lactato, lo que afecta la fisiología general y el crecimiento exponencial de los esferoides (9). Se sabe que el crecimiento celular y las tasas de muerte en el esferoide se pueden describir en términos de la tasa de producción de ATP obtenida del metabolismo del esferoide (22). Sin embargo estos métodos utilizados para evaluar el ATP son costosos, requieren de equipos especializados y demanda una mayor experticia técnica, es por eso, que en este trabajo se busca implementar el ensayo de reducción de resazurina con el fin de tener una herramienta más fácil y menos costoso para evaluar un viabilidad celular del esferoide y generar un control de viabilidad favoreciendo la reducción de los posibles errores en estudios *in vitro*, obteniendo resultados confiables y promisorios.

## 2.4. ENSAYO DE REDUCCIÓN DE RESAZURINA

El ensayo de reducción de resazurina (RR), comercialmente conocido como el ensayo de alamarBlue® o CellTiter-Blue® es usado frecuentemente para determinar la capacidad de proliferación de células eucariotas (8). Es un colorante conocido por actuar como un intermediario que acepta electrones en la cadena de transporte de electrones entre la reducción final de oxígeno y la oxidasa del citocromo mediante la sustitución del oxígeno molecular como aceptor de electrones (23).



**Figura 2 Reducción de resazurina a resorufina.** El compuesto activo del alamarBlue® es la resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido), esta se usa como un indicador del metabolismo celular, ya que en su forma oxidada la resazurina es de color azul y no es fluorescente, mientras que, en su forma reducida, que es de color rosa y fluorescente y se le llama resorufina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona). Adaptado de (8).

En general, su uso se ha aplicado a varios aspectos de la vigilancia de la salud celular, como la apoptosis, la función y el control del ciclo celular, para la determinación de la citotoxicidad y la medición de la viabilidad celular en varias líneas celulares (**Figura 2**). También ha tenido un amplio uso en el estudio de la toxicología, en el screening de compuestos con actividad citotóxica (24). En el 2014 Walzl et al., determinaron mediante la utilización del ensayo CellTiter-Blue® la presencia de células metabólicamente activas en esferoides desde unas 300µm de diámetro, estimando el número de células viables midiendo la reducción de la resazurina a resorufina en un modelo de cultivo celular 3D de líneas celulares de cáncer de colon humano DLD-1. Todo lo anterior soporta la idea de implementar el uso del ensayo de reducción de resazurina en la evaluación de la viabilidad de esferoides de CAL27.

## 2.5. METODOS DE ANALISIS DE CULTIVOS ESFEROIDES

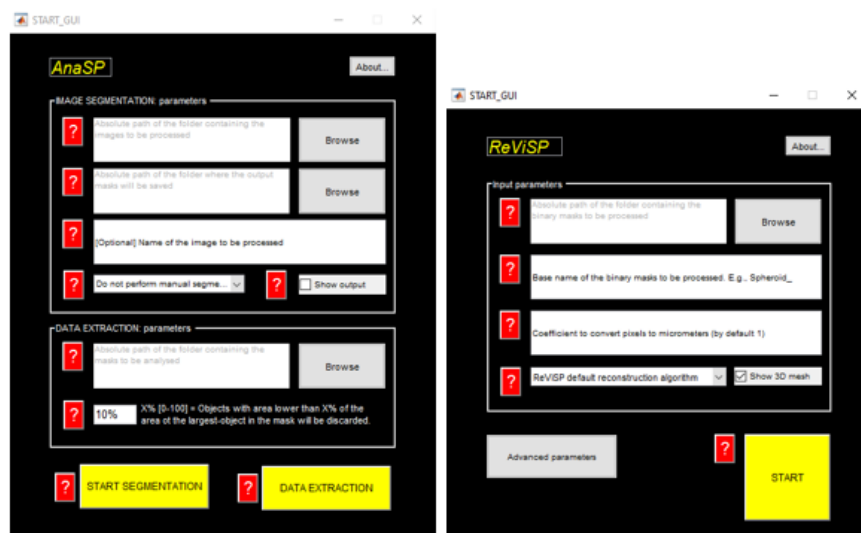
### ImageJ

ImageJ es un programa de procesamiento de imágenes diseñado para imágenes científicas, desarrollado por Wayne Rasband en el U.S. National Institutes of Health (NIH) y está en continuo desarrollo desde 1997. Es un software donde su código fuente es de dominio público, significando que no está sujeto a derechos de autor, con lo que se promueve su distribución y modificación, sólo citando la fuente. Al estar construido con Java, (de allí la “J”) funciona en cualquier sistema operativo: Linux, Mac OS X y Windows, ya sea de 32-bit o 64-bit (25). Se ingresan los parámetros básicos en el menú de diálogo, comenzando con el nombre de la carpeta con imágenes para analizar, el nombre del archivo de resultado de salida (formato .xls), la macro permite la evaluación de múltiples esferoides por imagen única, incluidas imágenes compuestas de múltiples campos de visión, como circularidad mínima y el tamaño de un esferoide, el valor de contraste es mejorado dependiendo del número de imágenes a evaluar y la escala de la imagen digital que será dada en  $\mu\text{m} / \text{px}$  (26).

### 2.6. AnaSp y ReviSP

Cada vez más laboratorios utilizan sistemas de cultivo tridimensional como un modelo *in vitro* de tumores. En los cuales se ha establecido ampliamente durante varias décadas que los cultivos tipo esferoides representan un modelo eficiente para validar los efectos de medicamentos o tratamientos con potencial antitumoral. Sin embargo, la falta de métodos para el análisis cuantitativo limita el uso de esferoides como experimentos de rutina (27). Se han propuesto varios métodos en la literatura para realizar experimentos de alto rendimiento empleando esferoides mediante el cálculo automático de diferentes parámetros morfológicos, como el diámetro, el volumen y la esfericidad (9). Estos sistemas se basan normalmente en costosas tecnologías automatizadas, que hacen que las herramientas sugeridas sean asequibles sólo a limitados grupos de investigación. Recientemente Filippo piccinini en el 2015 propuso el empleo del software AnaSP (**Figura 3**), que es un software de código abierto que permite evaluar y realizar una estimación de varios parámetros morfológicos de los cultivos, ya que AnaSP calcula automáticamente la máscara binaria del esferoide (es decir, la máscara en blanco y negro con el valor 1 asignado a los píxeles que

pertenecen al esferoide) (27). Mientras que ReViSP (**Figura 3**), es un software de código abierto desarrollado específicamente para analizar el volumen 3D de los esferoides y poder visualizar su superficie 3D a partir de una imagen de campo claro ubicándolo en un eje espacial X, un eje Y, y un eje Z. Estudios recientes han demostrado que el volumen es una de las características más relevantes que definen el tratamiento de un tumor *in vivo* cuando se utilizan modelos *in vitro* 3D de cáncer en estudios preclínicos, es por esto que ReviSP es una herramienta de software fácil de usar diseñada específicamente para estimar el volumen de organoides y agregados multicelulares de forma irregular lo que permite ampliar la descripción general de las herramientas de código abierto disponibles hoy en día para la evaluación *in vitro* de cultivos tridimensionales.



**Figura 3 Software de código abierto AnaSp y ReviSP.** se distribuyen libremente como una herramienta de software de código abierto. En particular, las versiones ejecutables independientes de 32 bits y 64 bits de ReViSP y AnaSp, están dotados de una plataforma GUI simple que lo hace particularmente fácil de usar. Adaptado de (25).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tradicionalmente los ensayos basados en cultivos celulares han resultado ser esenciales en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, sin embargo, los cultivos 2D convencionales no son capaces de imitar la complejidad y heterogeneidad de los tumores, ya que los tumores *in vivo* crecen en una conformación tridimensional, con una organización y arquitectura específicas, que un cultivo celular en 2D no puede reproducir (9). En particular los esferoides grandes (a partir de unos 500  $\mu\text{m}$  de diámetro), se caracterizan por presentar una zona de proliferación externa, una zona inactiva interna causada por una distribución limitada de oxígeno, nutrientes y metabolitos, y un núcleo necrótico. Por otro lado, la producción de esferoides heterogéneos en términos de parámetros morfológicos puede llegar a afectar la reproducibilidad de los datos obtenidos, ya que la forma irregular de los esferoides puede influir en el número de células expuestas al medio. Las diferencias en la actividad metabólica de las capas de los esferoides es otra variable que sin duda condiciona la respuesta de los esferoides frente a un tratamiento. Es por ello que la evaluación del metabolismo de la resazurina resulta crucial al momento de establecer el efecto de un tratamiento sobre la viabilidad de los esferoides. Aunque ya existen varios métodos usados para evaluar la viabilidad celular en un cultivo bidimensional, la estructura y forma de los cultivos 3D limita el uso de estos métodos, lo que ha estimulado el desarrollo de nuevos ensayos diseñados específicamente para modelos 3D. Aunque se ha propuesto el ensayo de RR como un método ideal para determinar la viabilidad de esferoides gran tamaño (9), existen opiniones encontradas respecto a su uso de rutina en el laboratorio. La mayoría de los estudios lo emplean debido a su bajo costo, fácil acceso y baja toxicidad. Sin embargo, otros refieren que la variabilidad en tamaño, forma, junto con la formación de un núcleo necrótico limitada la difusión de los compuestos químicos dentro de estos modelos puede llevar a un metabolismo diferencial de la resazurina, dando lugar a una mala interpretación de los datos del ensayo (28). Es por ello que a través de este trabajo se busca determinar si la forma y el tamaño de los esferoides tumorales orales influye en el metabolismo de la resazurina en células CAL27, una línea celular derivada de un carcinoma escamo celular de lengua que se usa de rutina para el tamizaje de sustancias con potencial antitumoral.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se han venido realizando ensayos basados en células cultivadas en superficies planas (2D) para investigar la biología celular, la eficacia de los fármacos, el metabolismo celular y la toxicidad de diferentes moléculas. Sin embargo, la biología de las células está muy influenciada por el microambiente que lo rodea, por los contactos célula-célula, las interacciones con la matriz celular, la polaridad celular o los perfiles de oxígeno (29). En ese sentido, los sistemas de cultivo tridimensional aprovechan la tendencia natural de las células a agregarse a sí mismas formando masas multicelulares en forma esférica lo que permite imitar con precisión algunas características de los tumores sólidos, como lo son su arquitectura espacial, respuestas fisiológicas y mecanismos de resistencia a fármacos (18). Adicionalmente los resultados obtenidos a partir de estos modelos se correlacionan muy bien con las observaciones clínicas o los estudios *in vivo*, permitiendo crear modelos *in vitro* más robustos y fiables que ayuden a dar respuesta a la necesidad de disminuir el tiempo que toma llevar el tratamiento desde el laboratorio al paciente y que a su vez este sea menos costoso (6). Esta compleja disposición alcanzada en cultivos 3D les confiere varias características únicas, como la baja difusión de gradientes químicos como oxígeno, nutrientes o metabolitos en diámetros a partir de 200  $\mu\text{m}$  y el desarrollo de un área necrótica central desde un diámetro de 500  $\mu\text{m}$  en adelante (9). Es por esta razón que la producción de esferoides heterogéneos en términos de parámetros morfológicos puede llegar a afectar la reproducibilidad de los datos obtenidos ya que la forma irregular de los esferoides puede influir en el número de células expuestas al tratamiento. En este sentido, la implementación de un método de evaluación reproducible y confiable para evaluar la viabilidad celular en los cultivos esferoides favorece su poder predictivo e interpretación en modelos *in vivo*. En los últimos años se ha despertado un interés paulatino en el uso del ensayo de reducción de resazurina o alamarBlue® como una medida indirecta del número de células viables en el esferoide (8, 26). Sin embargo, debido a la variabilidad en tamaño y forma de los esferoides se pueden presentar modificaciones en el metabolismo de la resazurina, que pueden dar lugar a una mala interpretación de los datos del ensayo. De allí la importancia de caracterizar el tamaño y la forma en los cultivos 3D en función del metabolismo de la resazurina.

## 5. SITUACIÓN ACTUAL

El ensayo de reducción de resazurina es un ensayo de fluorescencia que mide la actividad metabólica celular, es con frecuencia usado para estimar el número de células viables en cultivos 2D y también es usado de manera indirecta para evaluar la respuesta celular en pruebas de tamizaje de productos con potencial antitumoral. Uno de los primeros estudios en utilizar ensayos de reducción de resazurina para evaluar viabilidad celular fue publicado por O'Brien y colaboradores en el 2000. Empleando cultivos bidimensionales de células de hepatocitos primarios de rata y las líneas celulares de HepG2 y HeLa, demostraron que la alamarBlue® es la misma resazurina. Adicionalmente describieron que el colorante era reducido principalmente en el citoplasma y en el núcleo de células vivas ya que observaron que la fluorescencia citoplasmática era constante (30). En este trabajo también se demostró que el producto de la reacción enzimática (resorufina) se acumulaba en el medio, llevando a una sobreestimación de la población celular y que una reducción excesiva de la resazurina daba como resultado un producto no fluorescente e incoloro (Hidro Resorufina), que podía conducir a una subestimación de la viabilidad celular, además de que puede ser tóxico para las células. Basados en los resultados de este trabajo, otros autores implementaron el uso de la resazurina como método para evaluar la viabilidad celular tanto en cultivos 2D como 3D. Uno de los primeros trabajos en cultivos 3D tipo esferoides fue publicado por Lin y colaboradores en el 2008, aquí se estudió el efecto de micropartículas magnéticas sobre la fisiología, proliferación y cambios dinámicos de esferoides derivados de HepG2, SK-Hep1 Hep3B, todas estas de origen hepático y con diferentes tasas de crecimiento (31). Usando alamarBlue® se demostró que las micropartículas no generan efectos aparentes en la tasa de crecimiento, el diámetro y la actividad metabólica de los esferoides de SK-Hep1 (altas tasas de replicación) y tampoco de Hep3B (bajas tasas de replicación).

Yip & Cho, en el 2013, evaluaron el efecto de la doxorubicina sobre la viabilidad celular de células HepG2 creciendo en esferoides 3D y en monocapa 2D. Utilizando el ensayo de Alamar blue®, para ello examinaron la proliferación y citotoxicidad de hetero esferoides obtenidos a partir de co-cultivos de células de carcinoma de hígado y fibroblastos de células estromales, también homo esferoides obtenidos de células de HepG2 y cultivos bidimensionales con y sin tratamiento con un fármaco anticáncer (32). Los resultados de este estudio demuestran que

las condiciones de hetero esferoides con fibroblastos estromales exhiben una mayor resistencia al fármaco en comparación con los cultivos de homo esferoides y monocapa 2D. Posteriormente, Walzl et al., en el 2014, observaron que esferoides células de cáncer de colon (DLD-1) compactos y con tamaños entre 300 $\mu$ m y 500 $\mu$ m, aumentaban la producción de resofurina respecto a esferoides con tamaños superiores a 500 $\mu$ m indicando así, que las interacciones célula-célula en los esferoides podrían causar una obstaculización en la difusión de resazurina y su posterior reducción a resorufina, lo que lleva a una disminución de la actividad metabólica de las células ubicadas en el núcleo del esferoide, sugiriendo que la resazurina no puede difundir libremente hacia la parte más interna de esferoides grandes y que sólo puede ser reducida por la capa superficial de células, mostrando así la influencia del tamaño del esferoide sobre la reducción de la resazurina (8).

En ese mismo año Ivanov et al., usando esferoides de neuroblastomas (UW228-3) con diámetros entre 400 $\mu$ m y 500 $\mu$ m obtenidos a partir de 1.000 y 200.000 células por pozo, demostraron que las células de la periferia después de 4 h de incubación con alamarBlue®, metabolizan más rápido la resazurina al tener un mejor acceso al oxígeno y los nutrientes, mientras que las células del núcleo que se encuentran inactivas e hipóxicas no lo metabolizan. En este trabajo indicaron que en los esferoides de mayor tamaño la difusión y reducción de la resazurina era menos significativa respecto a los esferoides de menor tamaño, sugiriendo una disminución en la permeabilidad del colorante que luego fue también asociada con una baja permeabilidad de fármacos en estudios con actividad antitumoral. Deduciendo así que los esferoides más pequeños son más activos metabólicamente que los esferoides más grandes, ya que en los esferoides de gran tamaño su población inactiva es más significativa, mientras que en los esferoides pequeños la capa de células metabólicamente activas es mayor. Concluyendo que la reducción de resazurina fue proporcional al tamaño y al número de células dentro de los esferoides.

Recientemente Eilenberger y colaboradores en el 2018, evaluaron la viabilidad celular en esferoides de carcinoma hepatocelular (HepG2), relacionando la uniformidad del esferoide con la actividad metabólica empleando el ensayo de alamarBlue®. Demostrando así que los esferoides obtuvieron una disminución del 24% en la actividad metabólica después de 4 horas de incubación respecto a cultivos 2D. Se realizaron pruebas alternas con el ensayo de



resazurina a las 6 y 24 horas de incubación, poniendo en evidencia la influencia del tiempo de incubación con la intensidad de la fluorescencia dada por el metabolismo de la resazurina en los esferoides, demostrando así la importancia de la optimización de un protocolo para realizar ensayos de RR en cultivos de esferoides 3D y un tiempo adecuado a la exposición del xenobiótico, lo que pueden dar como resultado un impacto significativo en la confiabilidad y precisión del ensayo en el análisis de citotoxicidad y viabilidad celular. Sin embargo, aunque hay evidencia del uso del ensayo de alamarBlue® como un método para evaluar la viabilidad celular en otros cultivos tipo esferoides con diferentes células tumorales como HepG2, UW228-3, HeLa y DLD-1, los estudios con CAL27 son más limitados es allí donde se evidencia la importancia de realizar este trabajo sobre cultivos 3D de células de CAL27.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general:**

Evaluar el metabolismo de la resazurina en función de la forma y tamaño de esferoides tumorales orales.

### **6.2 Objetivos específicos:**

- Correlacionar el metabolismo de la resazurina con el tamaño de esferoides de CAL27
- Comparar el metabolismo de la resazurina con la forma de los esferoides de CAL27

## **7. METODOLOGÍA DEL PROYECTO**

### **7.1. Tipo de estudio**

Estudio de tipo experimental *in vitro*

### **7.2. Población y muestra (Criterios de selección y exclusión)**

Las células CAL27 fueron amablemente suministradas por el profesor Javier Rosas del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, y están actualmente disponibles en el laboratorio. Teniendo en cuenta que es una línea celular que crece bajo condiciones estándar de cultivo puede ser propagada de manera ilimitada, lo que garantiza la disponibilidad de la población o muestra durante todo el desarrollo del proyecto.

### **7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información**

#### **7.3.1 Condiciones de cultivo bidimensional de células CAL27**

Se utilizaron líneas celulares de carcinoma escamo celular de lengua (CAL27) que fueron propagadas en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C, creciendo en DMEM suplementado con suero fetal bovino y antibiótico, en una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa. Una vez la monocapa alcanzó el 90% de confluencia, las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, luego el pellet fue utilizado para la obtención de esferoides y cuando fue necesario crio preservar fueron resuspendidas en una solución con 900 µl SFB y 100µl de DMSO para luego congelar a -80°C.

#### **7.3.2 Obtención de esferoides de células CAL27**

Las células en monocapa fueron tripsinizadas y centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, luego el pellet fue resuspendido en medio DMEM suplementado, una vez realizado el conteo celular las células fueron sembradas en placas 96 pozos de baja adhesión en 12 densidades (500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 12000, 14000, 16000 18000 y 20000 células / pozo). Las placas fueron luego centrifugadas a 1400 rpm x 3 minutos y luego cuidadosamente dispuestas en la incubadora. La formación de los esferoides se verificó después de 72h de

cultivo. Cada densidad se sembró en 200  $\mu$ L de medio DMEM suplementado al 10% de SFB en seis réplicas. El mismo experimento se repitió en dos semanas independientes (33).

### **7.3.3 Ensayo de reducción de resazurina**

Una vez formados los esferoides de células de CAL27, 100  $\mu$ l de medio de cultivo se reemplazó por 100  $\mu$ l de una solución de resazurina (80  $\mu$ M) Para garantizar la transformación de la resazurina a resofurina, las placas con los esferoides fueron luego incubados por 12 h (33). Transcurrido el tiempo de incubación se evaluó la transformación de la resazurina a resofurina usando un lector de placa TECAN Genius 2000 a una longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 590 nm, expresando los resultados en intensidad media de fluorescencia (IMF).

### **7.3.4 Métodos de Análisis Morfológicos**

El tamaño de los esferoides fue analizado usando el software imageJ, mientras que la forma de los esferoides fue analizada usando los software AnaSP y ReviSP. Como control de la actividad metabólica se evaluó la transformación resazurina en células CAL27 cultivadas en monocapa a las mismas densidades celulares empleadas para la formación de esferoides.

## **7.4. Plan de tabulación y análisis estadístico**

Todos los datos fueron analizados de manera descriptiva.

## **8. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

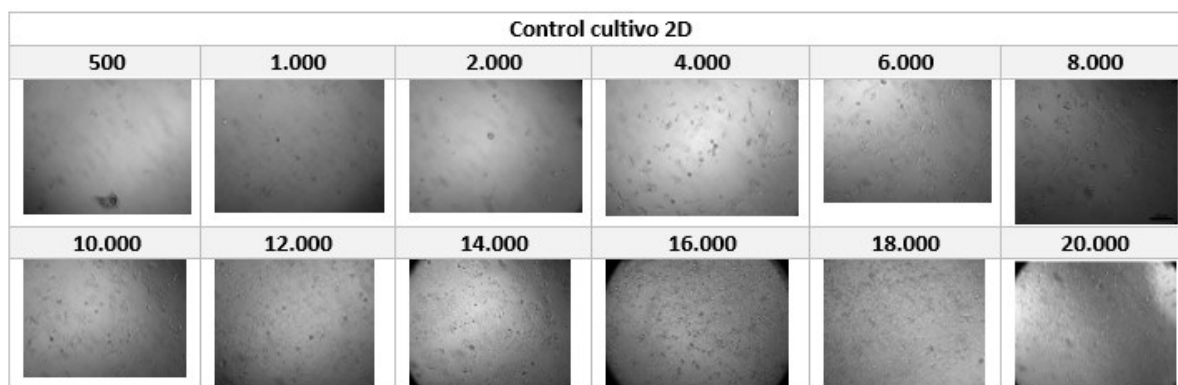
Este proyecto es un trabajo de tipo experimental *in vitro*, en donde se utilizarán líneas celulares de carcinoma escamo celular de lengua (CAL27) comercialmente disponibles creciendo en cultivos tipo esferoide y no habrá participación de individuos humanos ni de modelos animales, por tanto, no es necesario el aval ético ya que el desarrollo del proyecto es acorde a la ley 8430 de 1993, que es la que establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

## 9. RESULTADOS

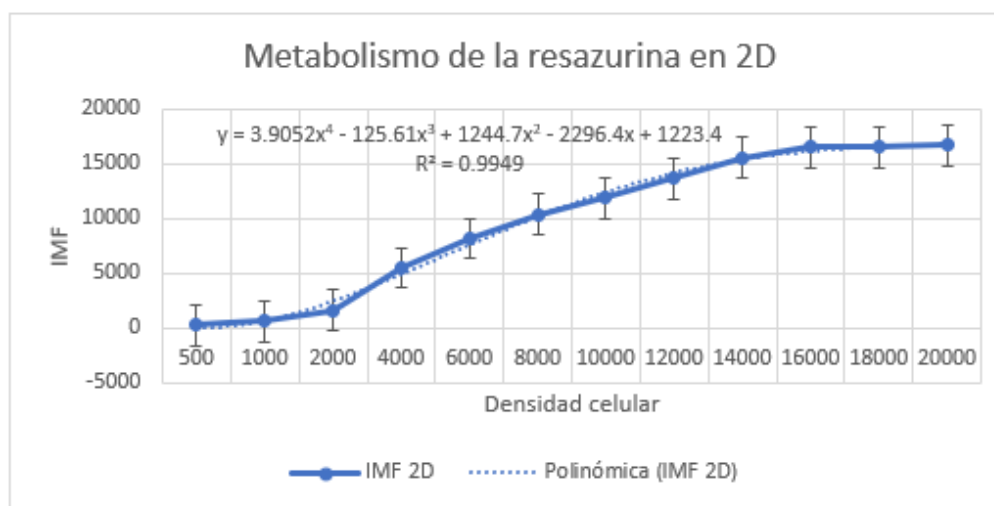
### 9.1. Correlación entre el metabolismo de la resazurina con el tamaño de esferoides de CAL27

Las condiciones de densidad celular y tamaño fueron evaluadas usando el software imageJ, una vez obtenidos los datos de diámetro y área de los esferoides se pudo evidenciar el metabolismo de la resazurina medido como intensidad media de fluorescencia (IMF) en función de densidad celular y tamaño del esferoide en ambos modelos, el 2D y el 3D. Inicialmente fueron sembradas y propagadas líneas celulares de carcinoma escamo celular de lengua (CAL27) en cultivos bidimensionales hasta llegar a una confluencia del 90%, usando una suspensión celular el metabolismo de la resazurina fue evaluado en diferentes densidades celulares como control inicial de viabilidad celular (**Figura 4a**) donde se pudo evidenciar que en el modelo 2D el metabolismo de la resazurina aumentó con respecto a la densidad celular de manera lineal entre las 4.000 y 16.000 células por pozo, al mismo tiempo se puede observar en densidades superiores a las 16.000 células un fase de platea donde el metabolismo de la resazurina se mantiene estable, esto acorde con la confluencia observada de las cajas de cultivo 2D (**Figura 4b**), lo que sugiere una mayor metabolización de la resazurina a medida que aumentaba la densidad celular en el cultivo, lo que pudo demostrar un comportamiento esperado en el cultivo 2D que indica que las células están en óptimas condiciones.

A



B

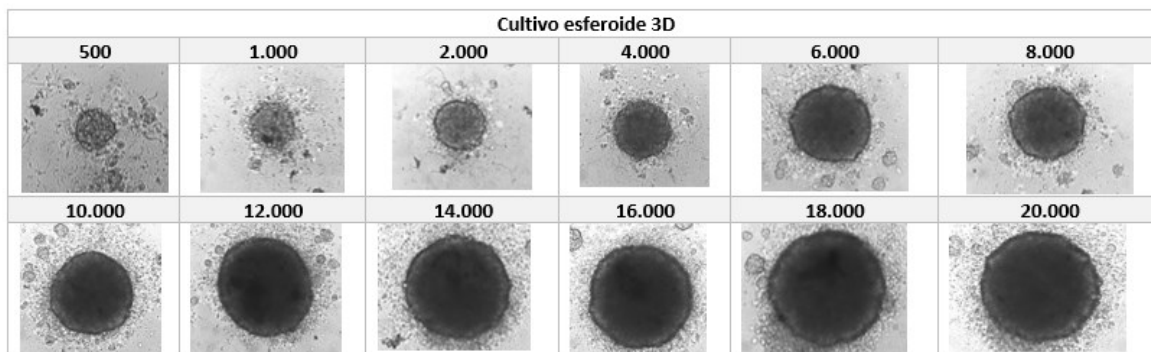


**Figura 4 Actividad metabólica de la resazurina en células CAL27 creciendo en monocapa.** (A) Cultivo 2D observado a diferentes densidades celulares, (B) curva de intensidad media de fluorescencia (IMF) en cultivos bidimensionales.

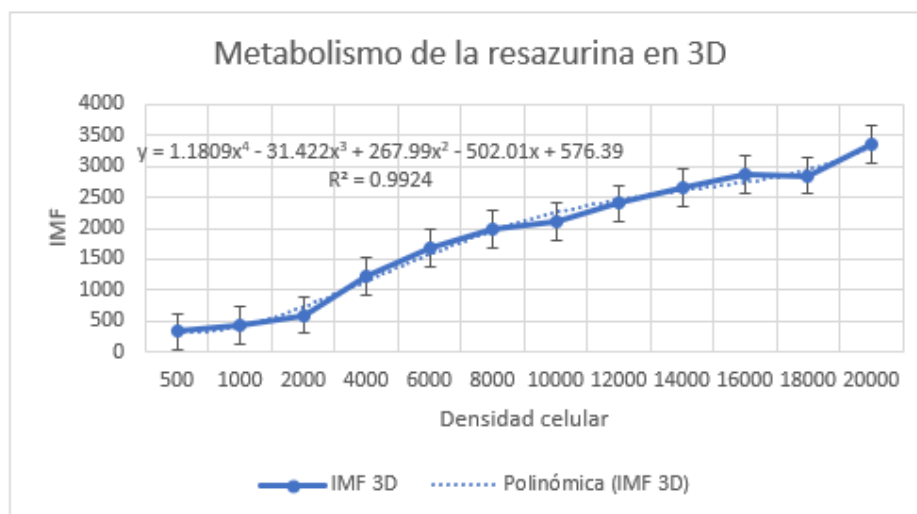
De igual forma, para los cultivos 3D una vez transcurridas las 72 h de incubación, se evaluó la conformación de los esferoides a diferentes densidades donde se pudo observar la formación de esferoides más homogéneos desde unas 4.000 células por pozo y a medida que aumentaba la densidad celular se pudo mostrar que los esferoides empezaban a presentar ciertas capas características de los tejidos tumorales y a medida que aumentaban las densidades celulares era más notoria la composición interna de sus diferentes capas: la necrótica, quiescente y proliferativa (**Figura 5a**). Al mismo tiempo se observó que el

metabolismo de la resazurina aumentó directamente proporcional a la densidad celular del esferoide entre las 2.000 y 16.000 células por pozo (**Figura 5b**)

**A**



**B**



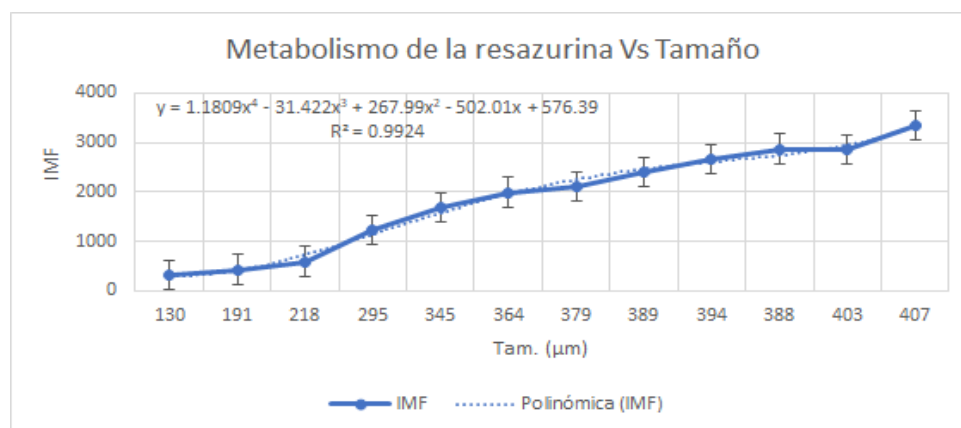
**Figura 5 Actividad metabólica de la resazurina en células CAL27 creciendo esferoides 3D.**(A) Cultivo 3D observado a diferentes densidades celulares y presencia de las diferentes capas del esferoide, (B) curva de intensidad media de fluorescencia (IMF) en los esferoides a diferentes densidades.

Posteriormente, se realizó el análisis del tamaño de los esferoides utilizando el software de procesamiento de imágenes de código abierto imageJ, se pudo demostrar que los esferoides de menor tamaño se encontraron en las densidades de 500 células con 130  $\mu\text{m}$  de diámetro +/- 33.398 de desviación estándar , 1000 células con 191  $\mu\text{m}$  +/- 25.913 de desviación estándar y los tamaños más grandes estuvieron en la densidad de 18.000 células con 403  $\mu\text{m}$

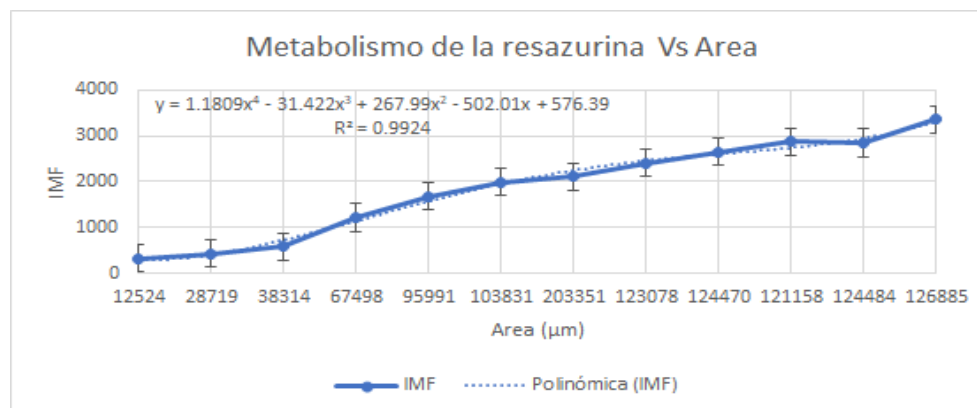


+/- 62.617 de desviación estándar y 20.000 células con 406  $\mu\text{m}$  +/- 53.844 de desviación estándar en promedio (**Figura 6a**), al igual que ocurre con la densidad celular, el metabolismo de la resazurina aumentó linealmente con respecto a los esferoides en diferentes tamaños, donde la IMF aumentó de manera lineal en esferoides con 295  $\mu\text{m}$  con 328 de emisión de IMF hasta esferoides con 388  $\mu\text{m}$  de diámetro respectivamente con 2868 de emisión de IMF, lo que sugiere unos tamaños estándar de trabajo para la conformación de esferoides homogéneos.

**A**



**B**



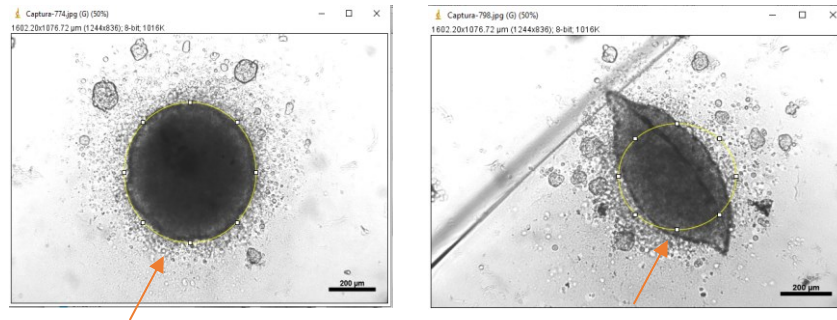
**Figura 6 Actividad metabólica de la resazurina en esferoides con mayor área y tamaño.** (A) curva de intensidad media de fluorescencia (IMF) discriminado por tamaño de los esferoides y (B) curva de intensidad media de fluorescencia (IMF) discriminado por área. La barra de error de los doce tamaños y áreas (+/- SD).

También se observó, como era de esperarse, que la densidad celular es directamente proporcional al diámetro y área, y estas tres variables fueron directamente proporcionales con el metabolismo de la resazurina (**Figuras 6b**). Por otra parte, los esferoides a partir de 400  $\mu\text{m}$  empezaron a mostrar las capas características de los cultivos 3D de células tumorales. (**Figura 5a**)

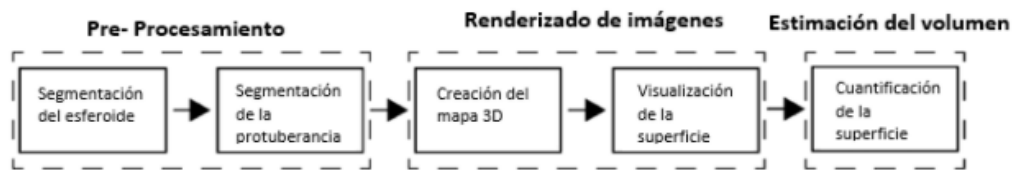
## 9.2. Comparación entre el metabolismo de la resazurina con la forma de los esferoides de CAL27

Los parámetros de esfericidad se obtuvieron de manera descriptiva utilizando el software de código abierto imageJ el cual permite evaluar el área del esferoide mediante su función de circularidad usando el Análisis Digital de Imágenes (ADI), donde todos los esferoides que se encontraban fuera de los parámetros de circularidad fueron clasificados como no esféricos y los que estaban dentro de los parámetros se clasificaron como esféricos (**Figura 7a**), seguidamente las imágenes fueron procesadas en los softwares de código abierto AnaSP y ReviSP, los cuales permiten generar una máscara binaria en escala de blanco y negro favoreciendo la reconstrucción tridimensional y su posterior visualización de la superficie 3D de los esferoides a diferentes densidades (**Figuras 7b y 7c**), una vez obtenida la reconstrucción tridimensional dada por el software, se reclasificaron los esferoides y se agruparon en esféricos y no esféricos dado que el software permite su visualización en un eje x, eje y, eje z brindando de esta manera una profundidad al esferoide facilitando así su posterior clasificación.

A

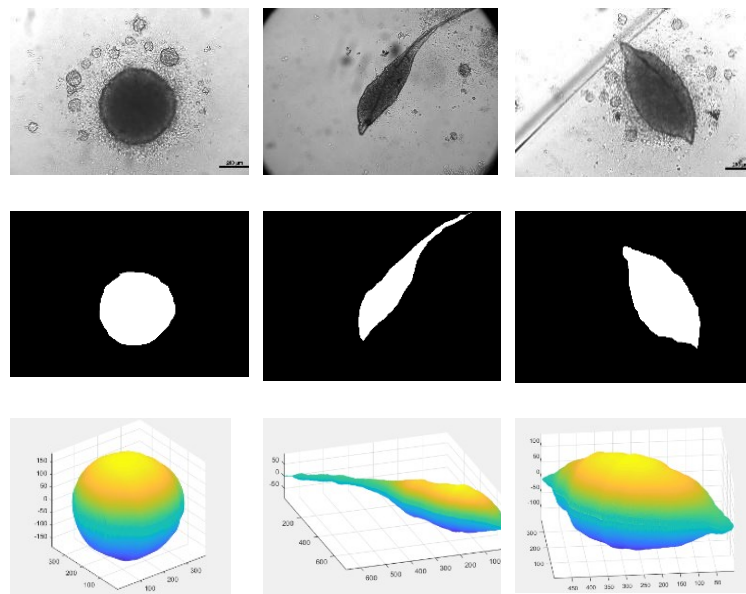


B



Adaptado de (Zanoni et al., 2016)

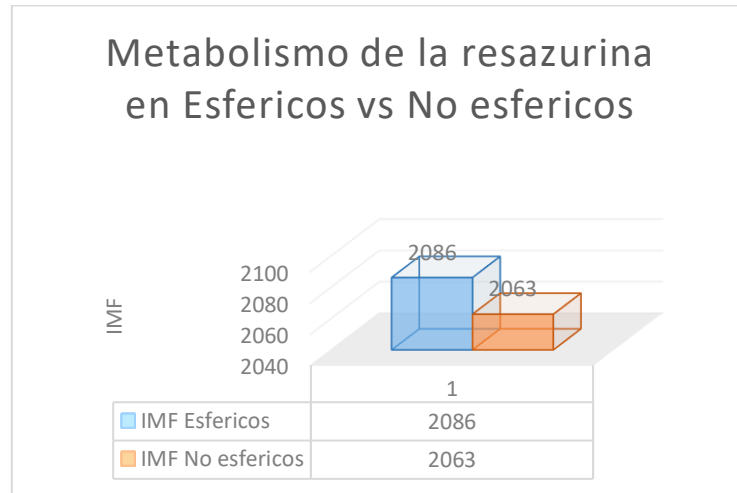
C



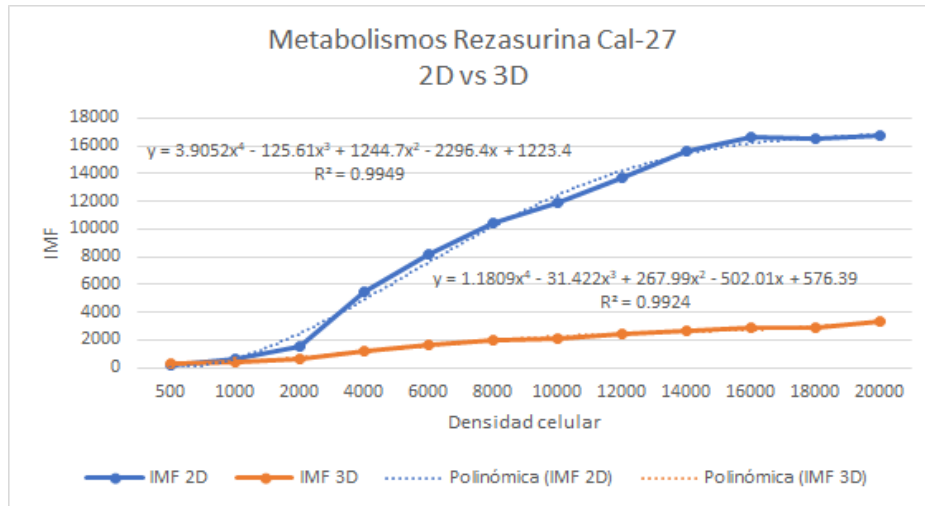
**Figura 7 Procesamiento y reconstrucción de esferoides de células CAL27.** (A) Software de procesamiento de imágenes de código abierto imageJ, parámetros descriptivos de circularidad (B) procesamiento, mapeo y visualización de la superficie de los esferoides (C) representación tridimensional de los esferoides clasificados en esféricos y no esféricos.

Para la estimación del metabolismo de la resazurina en función de la forma de los esferoides, previamente se realizó una clasificación de manera descriptiva donde se tomaron 9 esferoides en cada grupo (esféricos vs no esféricos) para hacer un análisis comparativo del metabolismo de la resazurina según la forma de estos. Se observó que los dos grupos metabolizan la resazurina de manera similar, aunque dichos niveles fueron levemente mayores en el grupo de esféricos. Lo que permite concluir que la forma del esferoide no influye fuertemente en el metabolismo del esferoide (**Figura 8a**). Para finalizar se evaluó el metabolismo de la resazurina total en todos los esferoides versus el metabolismo de la resazurina total en monocapa con todas las densidades celulares, donde se pudo observar que el metabolismo de la resazurina aumentó de manera exponencial en el cultivo en monocapa con respecto a los cultivos esferoides (**Figura 8b**).

**A**



**B**



**Figura 8 Actividad metabólica de la resazurina en los grupos de esferoides.** (A) diferencia en la IMF en los grupos esféricos y no esféricos (n=9), (B) curva de intensidad media de fluorescencia (IMF) total expresada en cultivos 2D vs cultivos 3D a diferentes densidades celulares.

## 10. DISCUSIÓN

En los últimos años los estudios *in vitro* han dirigido su interés hacia el desarrollo de nuevas técnicas de cultivo celular 3D que permitan proporcionar características propias del tumor sólido, que faciliten la comprensión de la interacción celular en el tumor, el soporte tridimensional otorgado por el microambiente y favorezcan a que el mantenimiento de las células en los esferoides sean lo más similares a aquellas condiciones en las que se encuentran en el organismo vivo (7). La compleja disposición espacial de los cultivos 3D les confiere ciertas características únicas, como la baja difusión de nutrientes, oxígeno y metabolitos, debido a esto es que en el objetivo principal de este trabajo resulta importante caracterizar el tamaño y la forma de los esferoides y cómo estos influyen en la difusión y posterior metabolización de la resazurina.

Los resultados obtenidos sugieren que a mayores densidades celulares a partir de unas 2.000 células por pozo en adelante se pueden generar esferoides con mayor tamaño de entre 200 $\mu\text{m}$  a 500 $\mu\text{m}$  de diámetro con una mayor homogeneidad, como se evidencia en la figura 5a, al mismo tiempo se pudo observar que a medida que aumentaba el tamaño de los esferoides la intensidad media de fluorescencia (IMF) aumentaba lo que indica que el metabolismo de la resazurina aumenta de manera significativa y directamente proporcional a la densidad celular y al tamaño del esferoide, lo cual es acorde a lo expuesto por Zannoni y colaboradores en el 2016 que utilizando esferoides subdivididos en 5 categorías volumétricas: 0.025, 0.050, 0.100, 0.150 y 0.300 mm<sup>3</sup>, correspondientes a un diámetro equivalente de aproximadamente 350, 450, 600, 650 y 850  $\mu\text{m}$ . Utilizando 9 esferoides de forma homogénea para cada categoría, realizaron un ensayo de viabilidad celular de CellTiter-Glo® donde observaron que la bioluminiscencia aumentó de forma lineal hasta esferoides de 650  $\mu\text{m}$  de diámetro. Al mismo tiempo se pudo observar en los resultados que en un grupo de esferoides cuya forma era irregular y cuyo diámetro oscila entre 450 y 550 $\mu\text{m}$  la tasa de IMF obtenida aumentaba muy poco con respecto a los esferoides homogéneos con la misma densidad celular lo que sugiere que no existen cambios significativos en el metabolismo de la resazurina entre los esferoides totalmente esféricos y los esferoides con forma irregular contrario a lo expuesto por Zannoni y colaboradores en el 2016 en el que sugieren que la producción de esferoides heterogéneos en parámetros de morfología como

diámetro, área y esfericidad de los cultivos 3D podría afectar la reproducibilidad de los datos obtenidos ya que la forma irregular de los esferoides puede influir directamente en la exposición a los metabolitos y xenobióticos en el medio. En ese sentido este enfoque de detección celular basados en esferoides representa una configuración experimental altamente fisiológica para identificar nuevos medicamentos contra el cáncer y un modelo preclínico innovador para reducir la alta tasa de fracaso de los compuestos contra el cáncer en los ensayos clínicos, debido a que el ensayo de reducción de resazurina (RR), es usado con frecuencia para determinar la viabilidad y la capacidad de proliferación celular (8). Este ensayo permite tener un control de respuestas citotóxicas y / o citostáticas en esferoides de células tumorales ya que se espera que a medida que haya un daño celular en el esferoide, habrá una disminución en el tamaño y por consiguiente una reducción en la metabolización de la resazurina.

## **11. CONCLUSIONES**

En este trabajo se pudo establecer que los tamaños promedio ideales para la obtención de esferoides homogéneos están entre 295  $\mu\text{m}$  y 400  $\mu\text{m}$  de diámetro a partir de densidades celulares establecidas entre 4.000 y 18.000 células por pozo, donde se producen datos entorno al diámetro y el área del esferoide de una manera lineal que se encuentran directamente relacionados a la intensidad media de fluorescencia (IMF), lo que facilita la posterior cuantificación de la reducción del metabolismo de la resazurina en esferoides tratados con xenobióticos o fármacos anticáncer en estos tamaños y densidades establecidos.

Con los datos obtenidos se pudo observar que la conformación de esferoides irregulares no influye directamente en el metabolismo de la resazurina con respecto a los cultivos esféricos lo que nos lleva a concluir que el metabolismo de la resazurina en los cultivos esferoides se encuentra directamente relacionado con la densidad celular y el tamaño del esferoide y no con la forma de los cultivos 3D.



## 12. REFERENCIAS:

1. Shanti RM, O'Malley BW. Surgical Management of Oral Cancer. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2017;62(1):77–86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.005>
2. Li CC, Shen Z, Bavarian R, Yang F, Bhattacharya A. Oral Cancer: Genetics and the Role of Precision Medicine. *Dent Clin North Am*. 2018;62(1):29–46.
3. Lee MR, Lin C, Lu CC, Kuo SC, Tsao JW, Juan YN, et al. YC-1 induces G0/G1 phase arrest and mitochondria-dependent apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells. *Biomed*. 2017;7(2):31–42.
4. Hartner L. Chemotherapy for Oral Cancer. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2017;62(1):87–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.006>
5. Jiang L, Ji N, Zhou Y, Li J, Liu X, Wang Z, et al. CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral Oncol* [Internet]. 2009;45(11):e204–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.06.001>
6. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207–18.
7. Meseguer J, Esteban MÁ, Mulero V, Cuesta A, Sepulcre P. Esferoides y esferas líquidas . Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. *Rev Eubacteria*. 2015;34(1944):15–20.
8. Walzl A, Unger C, Kramer N, Unterleuthner D, Scherzer M, Hengstschläger M, et al. The Resazurin Reduction Assay Can Distinguish Cytotoxic from Cytostatic Compounds in Spheroid Screening Assays. 2014;
9. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R, et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Nat Publ Gr*. 2016;(January):1–11.

10. Ángel emilio Bernal-Baláez. Estudio epidemiológico del cáncer bucal en Colombia 1989-2008. 2016;64(1):75-8.
11. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer : a review of global. 2000;65-74.
12. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol [Internet]. 2009;45(4-5):309-16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>
13. Huber MA. Oral and O ropharyngeal Cancer Squamous cell carcinoma Oropharynx Oral cavity Biopsy Tobacco Alcohol. Med Clin NA [Internet]. 2014;98(6):1299-321. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.005>
14. Cohen N, Fedewa S, Chen AY. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population [Internet]. Vol. 30, Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America. Elsevier Inc; 2018. p. 381-95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.06.001>
15. Gholizadeh P, Eslami H, Youse M, Asgharzadeh M. ScienceDirect Role of oral microbiome on oral cancers , a review. 2016;84:552-8.
16. Scully C, Porter S. Toolbox Oral cancer. 2000;174(May):348-51. Available from: [www.ewjm.com](http://www.ewjm.com)
17. Levinger I, Ventura Y, Vago R. Life is three dimensional-as in vitro cancer cultures should be. In: Kenneth D, Fisher P, editors. Advances in Cancer Research [Internet]. 1st ed. San Diego, Ca. USA: Elsevier Inc.; 2014. p. 383-414. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800249-0.00009-3>
18. Costa EC, Moreira AF, Melo-diogo D De, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 3D tumor spheroids : an overview on the tools and techniques used for their analysis. Biotechnol Adv [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>
19. Langhans SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and

- drug repositioning. *Front Pharmacol.* 2018;9(JAN):1–14.
20. 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;83(2):173–80.
  21. Russell Leek, David Robert Grimes, Adrian L. Harris and AM, Abstract. Tumor Microenvironment - Using Three-Dimensional Culture (Spheroids) as an In Vitro Model of Tumour Hypoxia. Vol. 80, *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics.* 2011. 1601 p.
  22. Venkatasubramanian R, Henson MA, Forbes NS. Incorporating energy metabolism into a growth model of multicellular tumor spheroids. *J Theor Biol.* 2006;242(2):440–53.
  23. Xiao J, Zhang Y, Wang J, Yu W, Wang W, Ma X. Monitoring of cell viability and proliferation in hydrogel-encapsulated system by resazurin assay. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010;162(7):1996–2007.
  24. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland).* 2012;12(9):12347–60.
  25. Gonzalez A, Botánica I De. Imagej : una herramienta indispensable para medir el mundo biológico septiembre de N ú m e r o 6 Imagej : una herramienta indispensable para medir el mundo sobreviviente vegetal : *Lactoris fernandeziana ( Lactoridaceae ).* 24 *Vida en las rocas.* 2018;(October).
  26. Amrita B, Aneta D, E TJ, Luděk B, Pavel B. Ready to go 3D? A semi-automated protocol for microwell spheroid arrays to increase scalability and throughput of 3D cell culture testing. *Toxicol Mech Methods [Internet].* 2020;0(0):000. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15376516.2020.1800880031>
  27. Piccinini F. AnaSP: A software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. *Comput Methods Programs Biomed [Internet].* 2015;119(1):43–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmpb.2015.02.006>

28. Eilenberger C, Kratz SRA, Rothbauer M, Ehmoser EK, Ertl P, Küpcü S. Optimized alamarBlue assay protocol for drug dose-response determination of 3D tumor spheroids. *MethodsX* [Internet]. 2018;5:781–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.07.011>
29. Kijanska M, Kelm J. In vitro 3D Spheroids and Microtissues: ATP-based Cell Viability and Toxicity Assays. *Assay Guid Man* [Internet]. 2004;(Md):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26844332>
30. Brien JO, Wilson I, Orton T, Pognan Ę. Investigation of the Alamar Blue ( resazurin ) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. 2000;5426:5421–6.
31. Lin RZ, Chu WC, Chiang CC, Lai CH, Chang HY. Magnetic reconstruction of three-dimensional tissues from multicellular spheroids. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2008;14(3):197–205.
32. Yip D, Cho CH. A multicellular 3D heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;433(3):327–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.008>
33. Fonseca A, Perdomo S, Johanna M. potencial antiproliferativo de un extracto de curuba(*Passiflora mollissima* (KUNTH) L.H. BAILEY) sobre un modelo de cultivo 3D tipo esferoide de células de cáncer oral. 2020. (Tesis concluida sin artículo de publicación).