



Universidad de Concepción  
Facultad Farmacia

Tesis

**Uso de cultivos 2D, esferoides u  
organoides como modelo de análisis  
de sensibilidad a drogas  
anticancerígenas en cáncer de ovario**

FRANCISCO JAVIER URRUTIA AYALA

Trabajo de tesis presentado a la Facultad de Farmacia de la  
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor patrocinante y guía: Dr. Felipe Zúñiga Arbalti.  
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología.  
Facultad de Farmacia.  
Universidad de Concepción

Mayo, 2021

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



© 2021, Francisco Javier Urrutia Ayala

# UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

## Facultad de Farmacia

### Examen de Titulo

El día ..... de mayo del 2021, El sr. Francisco Javier Urrutia Ayala, rindió su Examen de Titulo, para optar al Título de Bioquímico, presentando su Tesis titulada “*Uso de cultivos 2D, esferoideos u organoides como modelo de análisis de sensibilidad a drogas anticancerígenas en cáncer de ovario*”.

La comisión de Examen de Titulo acordó ..... este examen con una calificación de .....

---

Dr. Felipe Zúñiga Arbalti  
Profesor Tutor



---

Dra. Estefanía Nova Lamperti  
Miembro de la Comisión

---

Dra. Valeska Ormazabal Valladares  
Miembro de la Comisión

Concepción, 2021

## Tabla de contenido

Índice de Figuras.....	6
Índice de Tablas.....	7
1. Abstract.....	8
2. Resumen.....	10
3. Graphical Abstract.....	12
4. Introducción.....	13
4.1. Justificación del estudio.....	16
4.2. Hipótesis.....	18
4.3. Objetivo General.....	18
4.4. Objetivos específicos.....	18
5. Método.....	19
6. Resultados.....	21
6.1. Búsqueda bibliográfica.....	21
6.1.1. Búsqueda Bibliográfica de “Spheroids”.....	23
6.1.2. Búsqueda Bibliográfica de “Organoids”.....	25
6.1.3. Búsqueda Bibliográfica de “Animal Model”.....	28
Objetivo I: Caracterización de los modelos celulares.....	31
6.2. Características de los cultivos celulares - 2D.....	31
6.2.1. Cultivo Primario – líneas celulares inmortalizadas.....	32
6.3. Características de los cultivos celulares – 3D.....	34
6.3.1. Modelo de Esferoides.....	35
6.3.1.1. Esferoides en la metástasis peritoneal.....	37
6.3.2. Método de cultivo independiente de matriz.....	39
6.3.3. Métodos de cultivos dependientes de matriz.....	41
6.4. Modelos de Organoides.....	44
6.4.1. Organoides derivados de Pacientes (PDO).....	45
6.5. Característica de los Modelos Animales.....	48
6.5.1. Ratones Modificados Genéticamente (GEM).....	50
6.5.2. Xenoinjertos Derivados del Paciente (PDX).....	52
Objetivo II: Potencial para predecir una respuesta a drogas.....	54
6.6. Potencial y utilización de los Cultivo 2D.....	54

6.7.	Potencial de los Modelos celulares 3D.....	55
6.8.	Potencial de los esferoides .....	56
6.8.1.	Penetración de fármacos .....	59
6.8.2.	Proteómica y expresión.....	60
6.8.3.	Estudios de los Mecanismos de Metástasis en Cáncer de ovario.....	61
6.9.	Avances de los organoides .....	63
6.9.1.	Oportunidades de los Organoides derivados de pacientes.....	64
6.10.	Modelo Animal .....	65
6.10.1.	Estudios en la Vías de administración .....	65
6.10.2.	Características de los Xenoinjerto .....	66
Objetivo III: Análisis de ventajas y desventajas de los modelos.....		68
6.11.	Diferencias Económicas entre modelos 2D y 3D.....	68
6.12.	Discusiones Éticas .....	69
6.13.	Ventajas y desventaja de los Esferoides .....	70
6.13.1.	Tamaño y forma .....	71
6.13.2.	Efectos físicos .....	73
6.13.3.	Desventajas del Efecto de la matriz.....	74
6.14.	Ventajas de los Organoides .....	75
6.15.	Modelo Animal .....	76
6.15.1.	Modificación genética ventajas y desventajas.....	76
6.15.2.	Xenoinjerto .....	76
6.15.2.1.	Heterotópica u ortotópica .....	76
6.15.2.2.	Consideración en la Tasa de Injerto .....	77
6.15.2.3.	Miradas a una Medicina Personalizada .....	78
7.	Discusión.....	80
8.	Conclusiones.....	82
9.	Bibliografía .....	84

## Índice de Figuras

Figura 1. Registro histórico publicaciones de "Spheroids" .....	22
Figura 2 Registro histórico publicaciones "Organoides" .....	23
Figura 3 Resultado búsqueda "Spheroids" en base de datos Pubmed .....	24
Figura 4: Resultado búsqueda "Spheroids" en base de datos Web of Science.	24
Figura 5 Número final de publicaciones utilizadas para el tema "Spheroids" .....	25
Figura 6 Resultado búsqueda "Organoides" en base de datos Pubmed .....	26
Figura 7 Resultado búsqueda "Organoides" en base de datos Web of Science .	27
Figura 8 Numero final de publicaciones utilizadas para el tema "organoids" .....	28
Figura 9 Resultado búsqueda "Animal Model" en base de datos Pubmed.....	29
Figura 10 Resultado búsqueda "Animal Model" en base Web of Science.....	29
Figura 11 publicaciones utilizado para el tema "Animal Model" .....	30
Figura 12. Estructura de los modelos 3D.....	36
Figura 13 Efectos y oportunidad de los esferoides en las ascitis maligna .....	38
Figura 14 Métodos independiente de matriz .....	41
Figura 15 métodos dependiente de matriz.....	42
Figura 16 Cambios entre modelos 2D y 3D .....	56
Figura 17 Los esferoides mantienen la histología de los tumores .....	58
Figura 18 organoides en la medicina personalizada .....	64
Figura 19 Parecido entre Esferoides y Tumores .....	71
Figura 20 Forma y agregación de esferoides.....	72
Figura 21 Efecto de la matriz .....	74
Figura 22 Modelo de organoides .....	75

## Índice de Tablas

Tabla 1 métodos independiente de matriz desarrollados en los últimos 5 años	40
Tabla 2 métodos dependiente de matriz desarrollados en los últimos 5 años ..	43
Tabla 3 métodos de formación de organoides desarrollados en los últimos 5 años	45
Tabla 4 método de ensayos PDO desarrollados en los últimos 5 años.....	48
Tabla 5 modelos animales innovadores en los últimos 5 años.....	50
Tabla 6 métodos de optimización de ensayos con GEM en los últimos 5 años	52
Tabla 7 métodos desarrollados de PDX desarrollados en los últimos 5 años	53
Tabla 8 Uso de Organoides derivados de pacientes en ensayos preclínicos	65



## 1. Abstract

The technological advances in cell culture has allowed 3D cell models to improve the traditional monolayer culture method. These new 3D culture models simulate better physiological and pathological tumoral ambient than 2D models.

The aim of this review is to analyze the characteristics, use and implementation of different 3D cell culture models. In addition, we analyzed the main advantages and disadvantages, their techniques, and their potential use to predict sensitivity to drugs against ovarian cancer.

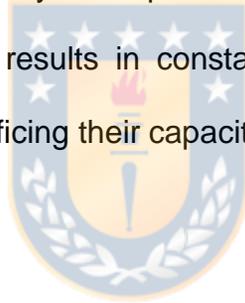
We hypothesize that the 3D spheroid or organoid models correspond to a cellular model that can better predict the response to drugs in ovarian cancer. The general aim was to analyze the use and implementation of different 3D culture models for massive analysis of susceptibility to anticancer drugs in ovarian cancer and its cost-efficiency relationship. We used Pubmed and Web of Science databases, and the keywords: "Spheroids"; "Organoids"; "Animal model"; and "Ovarian cancer".

In general, it was evident that the different 3D cell culture models open a big opportunity to investigate new topics in cancer biology and the development

of anticancer drugs. Besides, 3D culture has been used in multiple areas that were previously difficult or impossible to model in traditional systems.

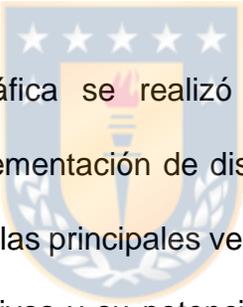
By characterizing the potential use of each model regarding its abilities to predict drug response in ovarian cancer, both organoids and spheroids can be used for study drug resistance, opening a way to personalized medicine with short culture times.

The analysis of advantages and disadvantages in using the different cell culture models shows that they can replace traditional models, especially with the increase in research that results in constant optimizations reducing costs or complications without sacrificing their capacity to model cell to cell interactions.



## 2. Resumen

El avance tecnológico en cultivo celular ha permitido la aparición de nuevos modelos celulares con el potencial de suplir las deficiencias del método tradicional de cultivo en monocapa. Estos nuevos modelos de cultivo 3D prometen tener el potencial de imitar mejor las características fisiológicas y patológicas de los tumores, emulando características difíciles o imposibles de simular.



Esta revisión bibliográfica se realizó con el objetivo de analizar las características, uso e implementación de distintos modelos de cultivo celulares 3D. Además, se analizaron las principales ventajas y desventajas de los distintos modelos y técnicas de cultivos y su potencial uso para predecir sensibilidad a drogas contra el cáncer de ovario.

Nuestra hipótesis es que los modelos 3D esféricos u organoides corresponden a un modelo celular que puede predecir de mejor forma la respuesta a drogas en cáncer de ovario. El objetivo general es: Analizar el uso e implementación de distintos modelos de cultivo 3D, para análisis masivo de susceptibilidad a drogas anticancerígenas en cáncer de ovario y su relación costo-eficiencia.

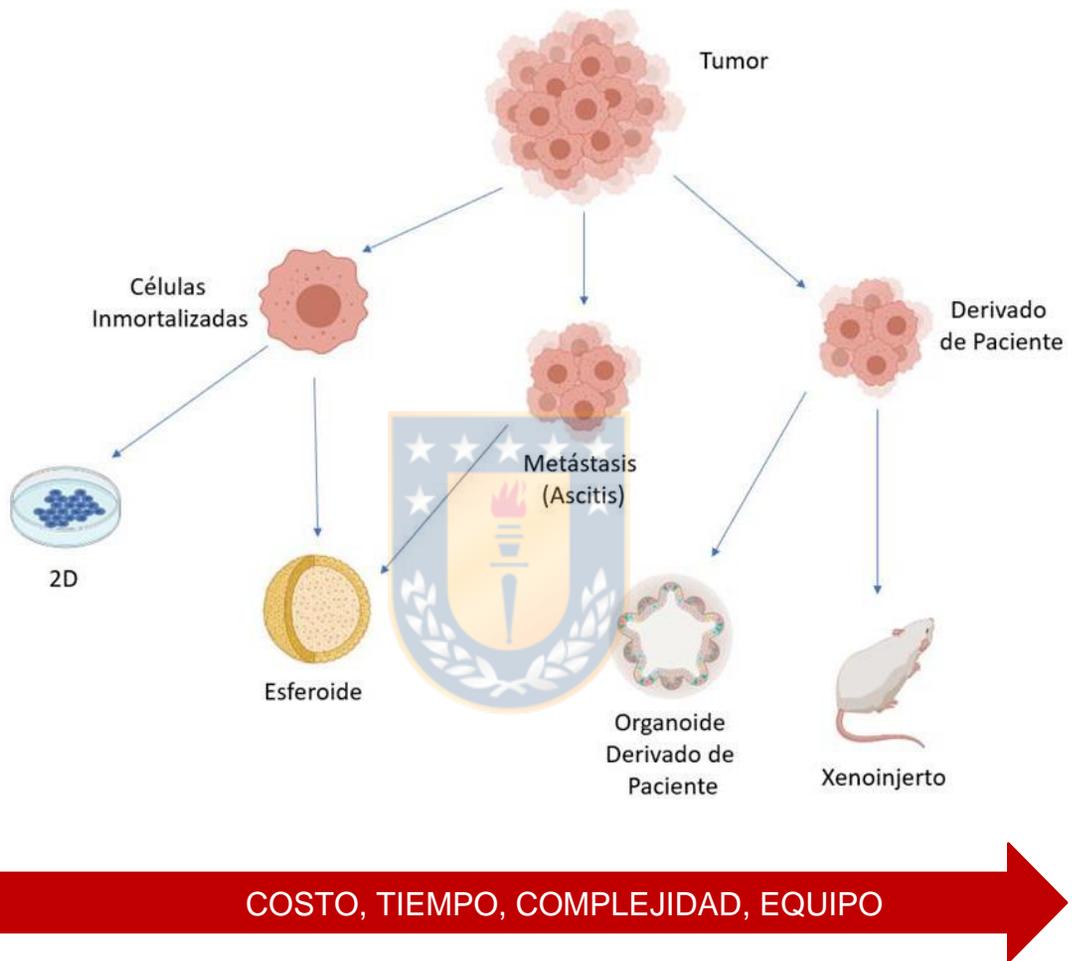
Para la revisión se usó como metodología los motores de búsqueda de las principales bases de datos científicas Pubmed y Web of Science, utilizando las siguientes palabras claves: “Spheroids” “Organoids” “Animal Model” “Ovarian Cancer”.

En general, durante la revisión bibliográfica se evidenció que los distintos modelos de cultivos celulares 3D abren una oportunidad a investigar nuevos temas para el avance de la ciencia, en múltiples áreas antes difíciles o imposibles de modelar en los sistemas tradicionales otorgándoles así un gran potencial para el desarrollo de fármacos anticancerígenos.

Al caracterizar el uso potencial de cada modelo respecto a sus capacidades de predecir respuesta a drogas en cáncer de ovario, tanto los organoides y esferoides tienen el potencial de predecir y estudiar la resistencia a fármacos dando paso a la medicina personalizada, con tiempos de cultivo cortos y necesidades de equipo y espacio menores a los modelos animales.

El análisis de ventajas y desventajas en el uso de los distintos modelos de cultivos celulares demuestra que tienen el potencial de reemplazar los modelos tradicionales, en especial con el aumento de la investigación que resulta en optimizaciones constantes reduciendo costos o complicaciones sin sacrificar su capacidad como modelo.

### 3. Graphical Abstract



## 4. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte. Actualmente, produce aproximadamente 9,5 millones de muertes al año a nivel mundial de las cuales en Chile son cerca de 54 mil muertes según cifras de “Global Cáncer Observatory”, lo que genera altos costos económicos y sociales que se distribuyen principalmente en los costos del tratamiento, efectos psicológicos, problemas laborales de las personas directamente afectadas y de su entorno familiar y/o cuidadores. Un desafío para su tratamiento es la falta de modelos eficaces para reproducir la compleja biología particular de esta enfermedad.

En el caso del cáncer de ovario (OC) solo en Chile representa un estimado de 841 casos nuevos y 470 muertes al año según cifras de “Global Cáncer Observatory”, donde el carcinoma epitelial predomina en frecuencia y agresividad. El tratamiento quirúrgico suele ser la primera opción para su eliminación en los casos bien diferenciados, relativamente pequeños o confinados al ovario. Sin embargo, alrededor del 75% de los casos se diagnostican como enfermedad avanzada (Etapas III y IV) [1], ya que sus síntomas se parecen mucho a las condiciones posmenopáusicas generalizadas o simplemente la enfermedad cursa de manera asintomática. Además, las pruebas de diagnóstico actuales se limitan a exámenes pélvicos físicos, ecografía

transvaginal y pruebas de suero del biomarcador CA125, todas las cuales tienen una baja sensibilidad para la detección temprana de la enfermedad.

Una de las características del cáncer de ovario es la quimio resistencia que ocurre en 25% de pacientes con enfermedad en estadio temprano y más del 80% de pacientes con enfermedad avanzada [1]. La mayoría de las pacientes con cáncer de ovario avanzado experimentan una recaída de la enfermedad. Durante la progresión de la enfermedad, las células de cáncer de ovario se desprenden de la masa tumoral liberando células individuales o esferoides en el líquido ascítico que se acumulan dentro de la cavidad peritoneal. Tanto las células individuales como los esferoides que se desprenden de los tumores pueden generar metástasis en sitios dentro de la cavidad peritoneal a través del líquido ascítico [2]. En consecuencia, la mayoría de las pacientes con cáncer de ovario mueren de metástasis debido al trasplante peritoneal o diseminación del torrente sanguíneo.

Así, uno de los principales problemas que se generan en el momento de tratar un paciente con cáncer de ovario es el grado de avance de la enfermedad, dado principalmente por un diagnóstico tardío y la capacidad de desarrollar resistencia a las drogas antineoplásicas. A nivel de laboratorio de investigación clínico, la generación de modelos celulares que orienten sobre la biología del cáncer y sean más confiables a la hora de generar tratamiento personalizados parece ser claves para un tratamiento rápido y efectivo. Aunque la implementación de modelos

celulares más complejos puede ser una importante herramienta para simular mejor el ambiente tumoral, estos modelos son más costosos, laboriosos y requieren de un personal altamente capacitado. Frente a esto, se hace necesario realizar una revisión de la literatura científica de manera de analizar si la implementación de modelos celulares más complejos tendrá un impacto importante en la predicción de la respuesta a drogas en cáncer de ovario.

La generación de cultivos celulares de monocapa primario e inmortalizados (2D) para estudiar la biología del cáncer reflejó un enorme progreso, casi revolucionario, para experimentar las condiciones propias del cáncer y establecer nuevas y mejoradas terapias. Este avance se debió, en parte, a sus bajos costos, fácil manipulación y experimentación, en comparación con otros modelos existentes.

Sin embargo, el modelo 2D ya sea cultivo primario o línea celular presenta una serie de defectos como la incapacidad de imitar Tales como, nivel de organización tridimensional, formación de vasos sanguíneos, gradientes de nutrientes en tres las distintas capas celulares, entre otras propiedades con efecto significativos a nivel fisiológicos importantes tanto para la comprensión de las patologías y su tratamiento.

En la búsqueda de modelos celulares más avanzados han surgido una serie de técnicas más complejas y específicas, entre ellas los cultivos en 3D; como los

esferoides; cultivos con características funcionales como los organoides y xenoinjertos en animales con un gran potencial para la investigación en cáncer. Se ha visto que los cultivos 3D imitan más estrechamente a los tumores sólidos con respecto a las interacciones célula-célula, la hipoxia, la penetración de fármacos y los gradientes de nutrición como se expresara más adelante de forma detallada, los que son irreproducibles en cultivos celulares en monocapa convencionales como se explicara más adelante.

En este contexto es importante preguntarse cuáles son las ventajas y desventajas de los distintos modelos y técnicas de cultivos 3D y su potencial uso como modelo para predecir sensibilidad a drogas contra el cáncer de ovario.

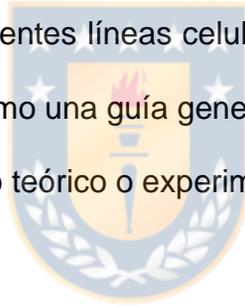
#### 4.1. Justificación del estudio

El Propósito de esta revisión, es presentar una descripción general y comparación de los modelos actuales y analizar el uso e implementación de distintos modelos de cultivo 3D, para análisis masivo de susceptibilidad a drogas anticancerígenas en cáncer de ovario y su relación costo-eficiencia.

Teniendo en cuenta que para que un modelo de investigación se considere creíble, debe ser biológicamente relevante, reflejando las características genéticas y fenotípicas, los receptores, las vías de transducción de señalización

y los patrones de expresión génica del tejido precursor, idealmente con aberraciones mínimas o nulas en el tiempo. Nuestra hipótesis es que los modelos 3D esferoides u organoides corresponden a un modelo celular que puede predecir de mejor forma la respuesta a drogas en cáncer de ovario.

Aunque durante esta revisión se analizarán principalmente trabajos científicos relacionados con líneas celulares derivadas de cáncer de ovario como OVCAR3 (ATCC® HTB-161 adenocarcinoma de células epiteliales) y SKOV3 (ATCC® HTB-77 adenocarcinoma de ascitis de ovario), se contempló además revisar referencias de diferentes líneas celulares y métodos recientes de cultivo 3D de manera de servir como una guía general para la búsqueda de información relevante para el desarrollo teórico o experimental de cultivos 3D.



## 4.2. Hipótesis

Los modelos 3D esféricos corresponden a un modelo celular que puede predecir de mejor forma la respuesta a drogas en cáncer de ovario que los modelos tradicionales en 2D.

## 4.3. Objetivo General

Analizar el uso e implementación de distintos modelos de cultivo 3D, para análisis masivo de susceptibilidad a drogas anticancerígenas en cáncer de ovario y su relación costo-eficiencia.

## 4.4. Objetivos específicos

- Clasificar los distintos modelos de cultivos celulares 2D y 3D (monocapa, esféricos, organoides y modelos animales).
- Identificar el uso potencial de cada modelo respecto a sus capacidades de predecir respuesta a drogas en cáncer de ovario.
- Analizar ventajas y desventajas en el uso de los distintos modelos de cultivos celulares.

## 5. Método

En esta revisión bibliográfica se realizará una búsqueda detallada, descriptiva, de carácter retrospectivo y sin intervenciones para obtener una valoración crítica del tema.

Para cumplir los objetivos específicos se procederá con el estudio selectivo de artículos científicos, revisiones y publicaciones de acceso libre o restringido utilizando la red de la universidad, consultando distintas bases de datos, tales como web of science (WOS), Pubmed, Google Académico, entre otras, además de otras fuentes bibliográficas como revistas de investigación científicas y repositorios de diversas entidades universitarias; todo esto con restricciones de fecha desde los últimos 5 años, en los idiomas inglés y español.

En cuanto a los criterios usados para limitar la búsqueda se usarán palabras claves: “organoid” “spheroid” “ovarian cancer” “3D culture” “animal model” entre otras. Además, para añadir o eliminar términos de búsqueda en el formulario se usarán los operadores lógicos booleanos como AND para combinar, OR para sumar y NOT para excluir, de este modo se permitirán relacionar de forma lógica los conceptos.

**Criterios de Inclusión:** 1) Literatura relacionada sobre la introducción de Cultivos 2D y 3D 2) Literatura relevante sobre aplicaciones y cultivo de células en 2D y 3D, 3) Literatura relacionada sobre ensayos de resistencia a drogas en cultivos 2D y 3D.

**Criterios de Exclusión:** 1) Artículos no relevantes para el propósito de la revisión, 2) Artículos de investigación repetitivos, 3) Artículos cuyos datos no se pueden extraer.

Estrategia de Recolección de datos: Cada estudio seleccionado será leído con el objeto de extraer datos para el trabajo, constando de dos etapas:

1) Lectura del resumen o abstract, introducción, conclusión y referencias con lo que se podrá obtener la información referente a las principales contribuciones del trabajo, sujeto o tema de estudio

2) Lectura del cuerpo del artículo lo que permitirá extraer en forma detallada la información necesaria para la revisión y comprender el experimento o fundamentos para identificar la relevancia de la publicación.

Posteriormente, se procederá a la organización, análisis y discusión de la información obtenida acorde a los objetivos propuestos.

## 6. Resultados

### 6.1. Búsqueda bibliográfica

Realizar una búsqueda sobre los modelos 2D tradicionales resulta imposible de filtrar, debido a que es un método tan ampliamente utilizado, que es considerado como el método tradicional lo que provoca que no se suele usar como tag bibliográfico y en su búsqueda suelen aparecer recursos comparativos con los modelos 3D. Un caso similar es el modelo animal tan ampliamente usado en el tiempo que se puede notar en el número de publicaciones en la búsqueda inicial.

La gran diferencia entre estos dos modelos es la fuerza propulsora de la aparición de los modelos 3D para mejorar las deficiencias del modelo 2D y buscar alternativas para sortear las dificultades técnicas y éticas del modelo animal. El modelo que podría considerarse una mejora del modelo tradicional sería el esferoide, un modelo que logra múltiples cualidades importante para el estudio de tumores sólidos principalmente con la facilidad de ser técnicamente muy similar al modelo anterior, tanto que puede usarse tal modelo como base.

Los esferoides abren la capacidad de estudiar el comportamiento de las células en un ambiente más real, donde conviven células en distintos estados celulares, en condiciones similares donde la estructura y ordenamiento causa diferentes gradientes que cambian en gran medida su comportamiento. La facilidad de pasar del modelo tradicional al modelo de esferoides parece ser una oportunidad que ha sido tomada en cuenta para la experimentación. 16230 estudios en 5 años es un número bajo si lo comparamos a los estudios en 2D o modelo animal, pero mirando las gráficas (**Figura 1**) es un número en rápido aumento.



**FIGURA 1. REGISTRO HISTÓRICO PUBLICACIONES DE “SPHEROIDS”**

Registro histórico de publicaciones indexadas utilizando la palabra clave “spheroids” (26 de febrero 2021) Información extraída directamente de la página: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.

Los organoides tuvieron su aparición años atrás aunque las dificultades técnicas y éticas de algunos organoides (neuronales) estancaron su uso, en la actualidad con las nuevas tecnologías disponibles este modelo empieza a ser cada vez más usado (**Figura 2**), en especial los PDO (Organoides derivados de paciente) y los PDX (xenoinjerto derivados de pacientes) debido a que al ser una muestra clínica poseen muchas características perdidas de las líneas celulares e

imposibles de replicar de forma eficiente en los modelos anteriores. Junto con los esferoides los organoides prometen ser un modelo interesante con miras a la medicina personalizada.

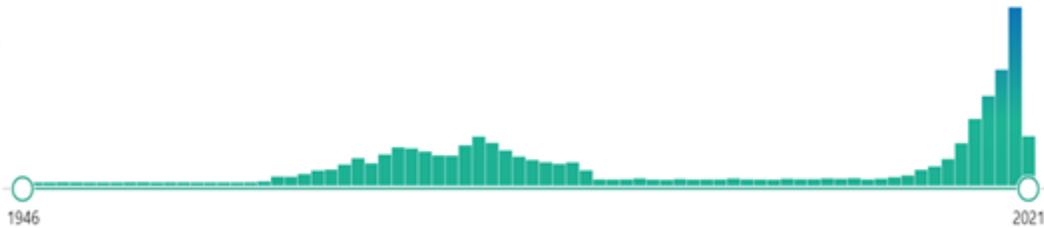
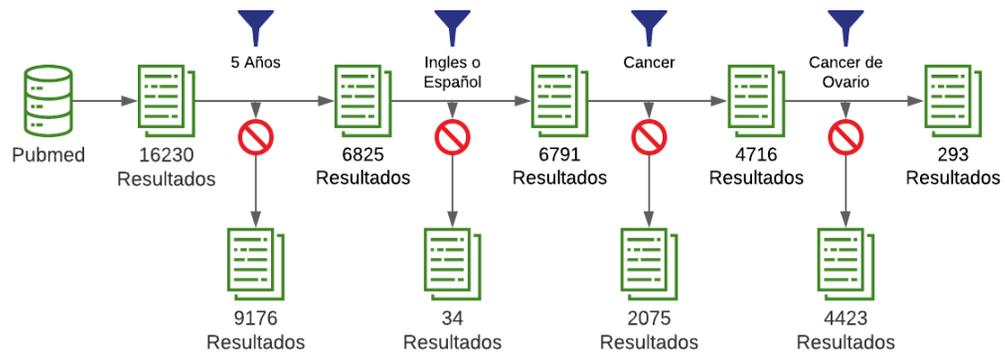


FIGURA 2 REGISTRO HISTÓRICO PUBLICACIONES "ORGANOIDES"

Registro histórico de publicaciones indexadas utilizando la palabra clave "organoids" (26 de febrero 2021) Información extraída directamente de la página: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.

### 6.1.1. Búsqueda Bibliográfica de "Spheroids"

De los 16230 resultados en **Pubmed (Figura 3)** obtenidos en la base de datos se descartaron 15937 elementos debido a filtros preliminares (antigüedad no mayor a 5 años, Idioma, y Especificidad del tema) dando un número total de 293 resultados que analizar. Al realizar la búsqueda en la base de datos de **Web of Science (Figura 4)** se obtuvieron 20535 resultados, los cuales al aplicar los filtros de selección, finalizamos con 347 resultados.



**FIGURA 3 RESULTADO BÚSQUEDA “SPHEROIDS” EN BASE DE DATOS PUBMED**

Esquema del protocolo de filtrado en la búsqueda de publicaciones, la búsqueda se realizó agregando de forma secuencial cada filtro búsqueda realizada octubre del año 2020. – Elaboración Propia



**FIGURA 4: RESULTADO BÚSQUEDA “SPHEROIDS” EN BASE DE DATOS WEB OF SCIENCE**

Esquema del protocolo de filtrado en la búsqueda de publicaciones, la búsqueda se realizó agregando de forma secuencial cada filtro búsqueda realizada octubre del año 2020. – Elaboración Propia

En los resultados de esferoides destaca que las referencias más nuevas año 2020 no hablan del método sino en gran medida de comparación e investigación de expresión de distintas líneas celulares en este nuevo ambiente su expresión y metástasis del cáncer. Cabe destacar también que sin lugar a

duda un gran aporte de los esferoides al estudio del cáncer es la nueva disposición y estructura de las células abriendo paso a muchos estudios de transportadores de fármacos y su capacidad de penetración y distribución en las células, de la búsqueda se incluyeron 34 publicaciones (**figura 5**)

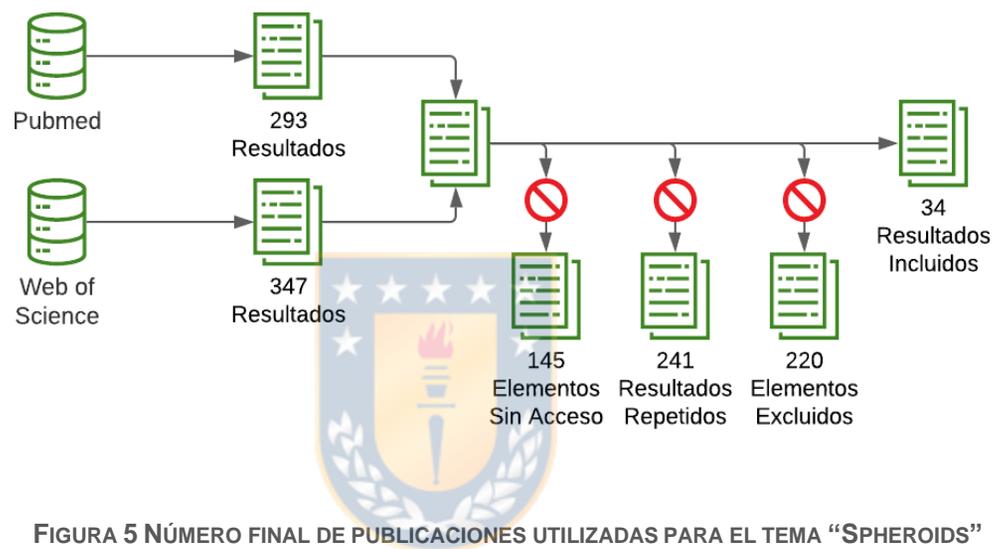


FIGURA 5 NÚMERO FINAL DE PUBLICACIONES UTILIZADAS PARA EL TEMA “SPHEROIDS”

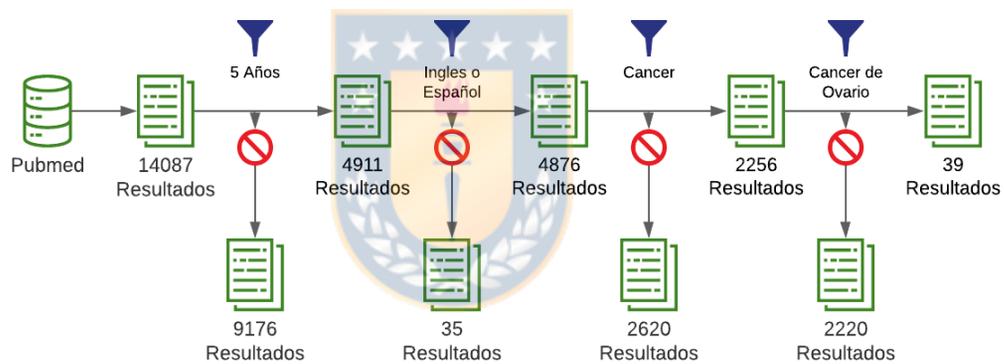
Esquema del protocolo de unión y filtrado manual realizado para los resultados de la búsqueda de información sobre esferoides en ambas bases de datos. – Elaboración Propia

### 6.1.2. Búsqueda Bibliográfica de “Organoids”

Debido a que la búsqueda daba un número reducido de referencias en cada base de datos, para la elaboración de este trabajo de investigación se procedió a seleccionar este como el primer tema a trabajar y como método de

inclusión/exclusión el análisis completo del texto para aprobar o rechazar priorizando la actualidad de la información.

De los 39 resultados en **Pubmed (Figura 6)** obtenidos en las bases de datos solo 2 elementos fueron descartados por falta de acceso a la publicación dando un número total de 37 resultados que analizar. Al realizar la búsqueda en la base de datos de **Web of Science (Figura 7)** obtuvieron 37 resultados de los cuales 6 elementos fueron descartados por falta de acceso a la publicación.



**FIGURA 6 RESULTADO BUSQUEDA “ORGANOIDS” EN BASE DE DATOS PUBMED**

Esquema del protocolo de filtrado en la búsqueda de publicaciones, la búsqueda se realizó agregando de forma secuencial cada filtro búsqueda realizada en diciembre 2020. – Elaboración Propia



FIGURA 7 RESULTADO BUSQUEDA “ORGANOIDS” EN BASE DE DATOS WEB OF SCIENCE

Esquema del protocolo de filtrado en la búsqueda de publicaciones, la búsqueda se realizó agregando de forma secuencial cada filtro búsqueda realizada en diciembre 2020. – Elaboración Propia

El total de Resultados correspondería a 76 y se aplicaron los criterios de exclusión (**Figura 8**) Para reducir la cantidad de elementos a incluir a 21 Algunos resultados aportaban información relevante en otros temas como esferoides y xenoinjertos. Pero **NO** información adicional a lo ya encontrado sobre organoides.

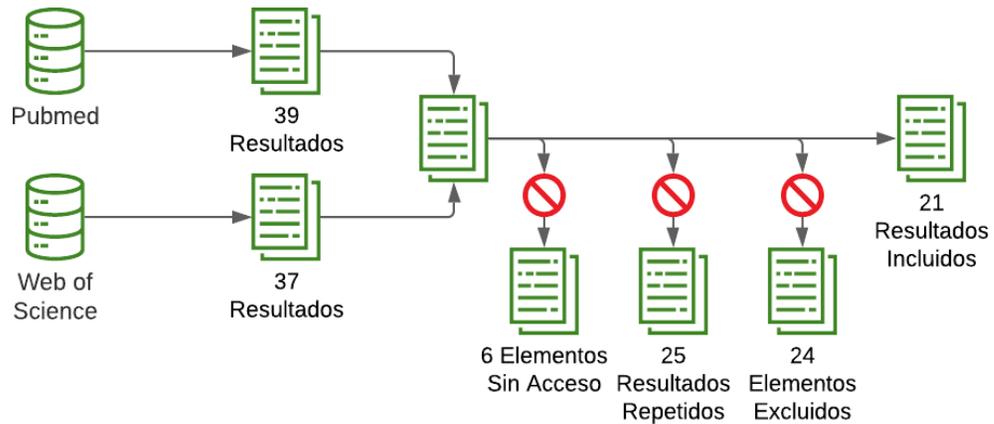


FIGURA 8 NUMERO FINAL DE PUBLICACIONES UTILIZADAS PARA EL TEMA “ORGANOIDS”

Esquema del protocolo de unión y filtrado manual realizado para los resultados de la búsqueda de información sobre esferoides en ambas bases de datos. – Elaboración Propia

### 6.1.3. Búsqueda Bibliográfica de “Animal Model”

De los 736385 resultados en **Pubmed (Figura 9)** obtenidos en la base de datos se descartaron 735720 elementos debido a filtros preliminares (antigüedad no mayor a 5 años, Idioma, y Especificidad del tema) dando un número total de 665 resultados que analizar. Al realizar la búsqueda en la base de datos de **Web of Science (Figura 10)** obtuvieron 418511 se descartaron 418163 y quedaron para analizar después de los filtros de la base de datos 348 elementos.

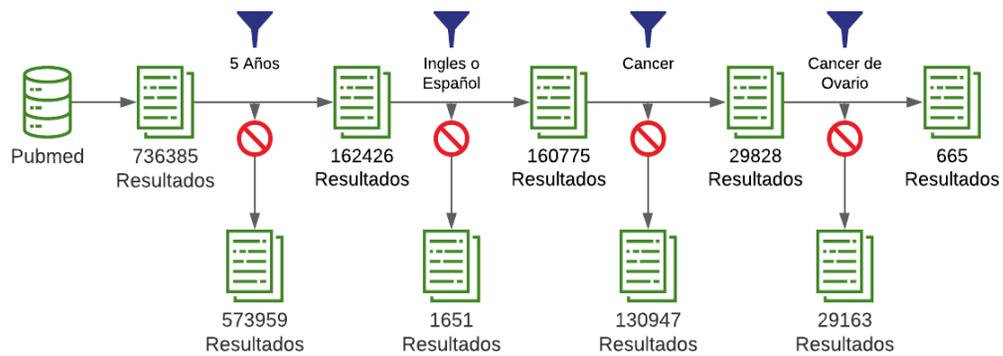


FIGURA 9 RESULTADO BÚSQUEDA "ANIMAL MODEL" EN BASE DE DATOS PUBMED

Esquema del protocolo de filtrado en la búsqueda de publicaciones, la búsqueda se realizó agregando de forma secuencial cada filtro búsqueda realizada en enero 2020. – Elaboración Propia

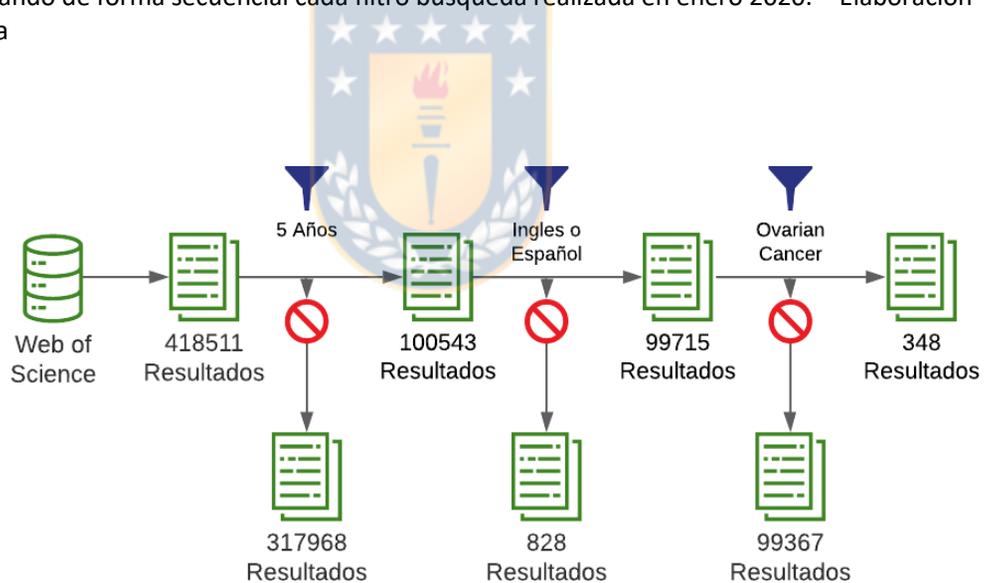


FIGURA 10 RESULTADO BÚSQUEDA "ANIMAL MODEL" EN BASE WEB OF SCIENCE

Esquema del protocolo de filtrado en la búsqueda de publicaciones, la búsqueda se realizó agregando de forma secuencial cada filtro búsqueda realizada en enero 2020. – Elaboración Propia

El total de Resultados correspondería a 76 y se aplicaron los criterios de exclusión (**Figura 11**) Para reducir la cantidad de elementos a incluir a 21. En esta búsqueda se encontró mucha información complementaria para temas anteriores que fue revisada para temas anteriores.

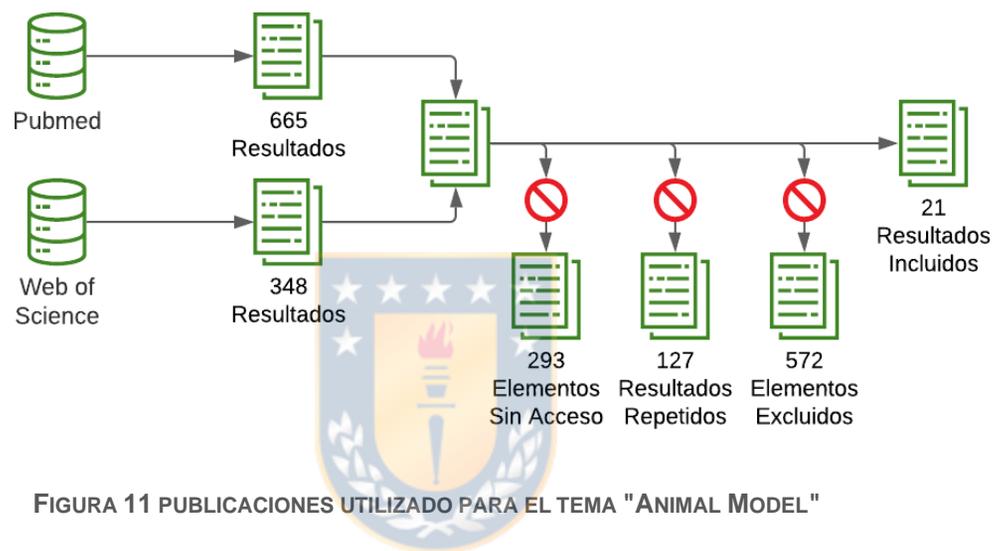


FIGURA 11 PUBLICACIONES UTILIZADO PARA EL TEMA "ANIMAL MODEL "

Esquema del protocolo de unión y filtrado manual realizado para los resultados de la búsqueda de información sobre esferoides en ambas bases de datos. – Elaboración Propia

Al Final de entre todas las búsquedas por separado se utilizaron 72 publicaciones de forma directa y 8 para conectar entre los temas dando un total de 80 referencias.

# Objetivo I: Caracterización de los modelos celulares

## 6.2. Características de los cultivos celulares - 2D

El cultivo celular inició su desarrollo a principios del siglo XX uno de los primeros fueron Harrison, 1907; Carrel, 1912 como un método para el estudio del comportamiento de las células animales, una técnica que permitía el estudio tanto *in vitro* como *in vivo*. Aunque el inicio con un cultivo de células animal, exactamente anfibios. A partir de esto ya en 1952 Gry y col, establecen la primera línea celular continua HeLa, aunque el medio usado fue complejo y poco definido abría grandes oportunidades para el estudio de la fisiología, patología humana.

Las células que se cultivan directamente desde un sujeto se conocen como células primarias. A excepción de algunos derivados de tumores, la mayoría de los cultivos celulares primarios tienen un periodo de vida limitado. Después de un cierto número de divisiones las células entran en el proceso de senescencia y dejan de dividirse, generalmente manteniendo la viabilidad. Las células se cultivan y mantienen habitualmente a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> en un incubador celular. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo

celular, y la variación de las condiciones para un tipo celular concreto, puede dar lugar a la expresión de diferentes fenotipos.

El factor más variado en los sistemas de cultivo es el medio de cultivo celular, que dependen de la clase de célula a cultivar y de los factores de crecimiento usados para suplementar los medios. Las células pueden crecer en suspensión (células sanguíneas) o de manera adherente; las que necesitan una superficie que normalmente es plástico como son las placas Petri, o frascos de cultivo, que pueden o no estar recubiertas con componentes de matriz extracelular para aumentar sus propiedades de adhesión y proporcionar otras señales necesarias para el crecimiento y diferenciación.

Las células terminan formando una capa adherida a la superficie de la placa de cultivo donde todas las células están homogéneamente sometidas a todos los factores antes descritos.

### 6.2.1. Cultivo Primario – líneas celulares inmortalizadas

Los cultivos primarios derivados de cánceres ofrecen un modelo *in vitro* para la investigación del cáncer a un bajo costo y han sido herramientas invaluable para la ciencia traslacional durante muchos años, Además han permitido la manipulación genómica, estudios de biología celular y exámenes de

alto rendimiento más allá de lo que sería factible en ensayos clínicos o modelos animales.

Las líneas celulares se generan a partir de tejido derivado de pacientes mediante algún método de inmortalización celular, un proceso con poca tasa de éxito y las pocas que logran generarse son un producto de selección clonal a largo plazo, que pierde la heterogeneidad celular original. Una solución económica pero que pierde cualidades como un modelo eficiente para el estudio del cáncer.

En relación con el cáncer de ovario estudios apuntan a que muchas de las líneas celulares de ovario epitelial que se usan actualmente se establecieron con importantes limitantes tecnológicas para su validación. Análisis genéticos realizados por Silvia Domcke *et al* (2003) reveló que dos de las líneas celulares más utilizadas SKOV-3 y A2780 (ECACC 93112517 carcinoma cáncer de ovario) carecen de las principales características del cáncer de ovario seroso de alto grado (HG-SOC) del subtipo del que se creía originalmente se derivaban, incluidas las mutaciones de TP53 y la inestabilidad genómica extensa, lo que obliga a reevaluar adecuadamente muchos estudios anteriores [3]. La mayoría de las líneas disponibles comercialmente son TP53-mutantes y su fenotipo es comparable al del adenocarcinoma, cubriendo solo una minoría de subtipos de cáncer de ovario, dejando la mayoría de los casos clínicos infrarrepresentados [4].

### 6.3. Características de los cultivos celulares – 3D

Actualmente, las investigaciones del cáncer se realizan utilizando diferentes modelos en gran medida debido su complejidad y la cantidad de factores que afectan las distintas etapas de esta enfermedad. Desde 1987 se han ideado distintos métodos de cultivo 3D para mejorar las capacidades de los modelos para la investigación, de este impulso han surgido los esferoides y organoides que han mostrado propiedades y organización celular cercanas a un tumor nativo, pero la investigación continua en especial con el aumento de la ciencia de la ingeniería de tejidos que plantean a futuro la implementación de organoides en chips sintéticos que imitan muchos aspectos fisiológicos de la célula.

De los cultivos 3D actuales, destacan principalmente los esferoides, los organoides y los modelos animales por sobre otros como los micro fluidos, o chips. Cada uno de estos modelos presentan ventajas y desventajas, que son claves de considerar para lograr los objetivos de cada investigación.

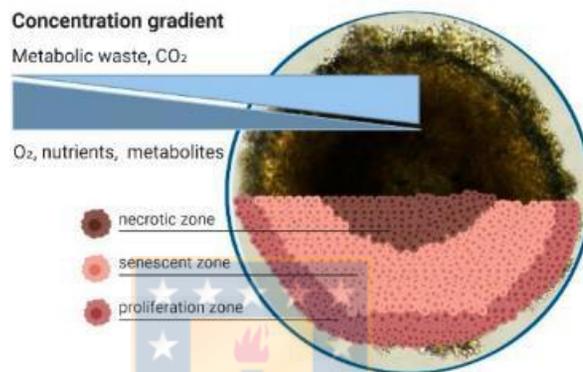
### 6.3.1. Modelo de Esferoides

Los esferoides son un agregado de células de pacientes o líneas celulares que permanece como una estructura 3D flotante. En comparación con las líneas celulares, los esferoides pueden simular en gran medida el microambiente de los tumores y mantener la similitud con los tumores originales (**Figura 12**).

Los cultivos de esferoides han permitido reevaluar con más detalles el comportamiento de líneas celulares de cáncer de ovario tales como OVCAR – 3 [5], 105C (cáncer de ovario epitelial) [6], permitiendo estudiar características tales como expresión proteica y resistencia a drogas que no se expresaban en los modelos monocapa (2D), ayudando al estudio de la fisiología, patología y bioinformática [7].

Los esferoides se pueden obtener desde fragmentos de tumores (esferas tumorales derivadas de tejidos y esferoides multicelulares organotípicos), de cultivos de células madre cancerosas (tumorosferas) o de cultivos en suspensión de células cancerosas individuales (MCTS). Todos los modelos tienen fortalezas y debilidades. Por ejemplo, los fragmentos de tumor son adecuados para estudiar tanto la heterogeneidad del tumor como la interacción entre el tumor y el estroma, mientras que las tumorosferas son más apropiadas para estudiar la raíz del cáncer y la tumorigenicidad *in vivo*. El modelo MCTS es probablemente el más

conveniente para evaluar el crecimiento tumoral y la supervivencia celular después del tratamiento y, por lo tanto, está bien adaptado para la detección de fármacos en ensayos robóticos o masivos [8].



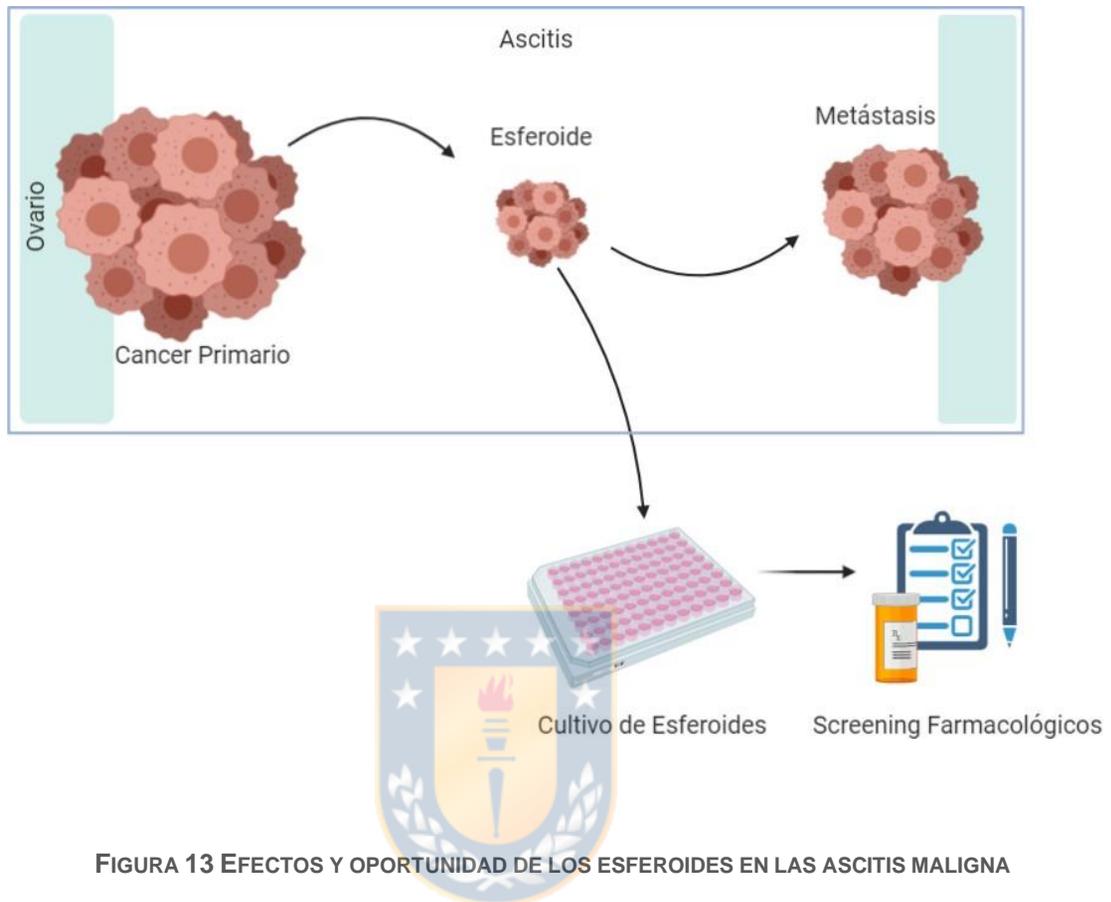
**FIGURA 12. ESTRUCTURA DE LOS MODELOS 3D**

Esquema de las partes que componen un esferoide representado por sus distintas zonas; necrótica, senescente y de proliferación esta es una de las ventajas de los modelos 3D es el gradiente de metabolitos y nutrientes que se genera lo cual induce que coexistan células en diversos estados metabólicos distintos, esto asemeja mucho a lo que sucede en un tumor *in vivo*. Modificado de Gilazieva, Z., *et al.* (2020) [9]

El término hetero esferoide y esferoides multicelulares se usa de forma similar para referirse a esferoides que contienen más de una clase celular y generalmente se forman a partir de una línea celular cancerígena y otras células tales como mesenquimales [10], macrófagos [11, 12] o fibroblastos [13]. Esto permite el estudio de la interacción entre células sanas y el cáncer con diversos propósitos.

### 6.3.1.1. Esferoides en la metástasis peritoneal

Una de las razones principales del mal pronóstico del cáncer de ovario es la metástasis intraperitoneal y pélvica, que se produce cuando las células del cáncer se diseminan más allá del confinamiento de los ovarios (**Figura 13**). Las células de cáncer generalmente se diseminan dentro del abdomen, donde la acumulación de ascitis ayuda en su tránsito. La ascitis metastásica contiene esferoides multicelulares, que promueven la quimio resistencia y la recurrencia [14]. Estas unidades metastásicas, que pueden adherirse al mesotelio e invadir la matriz extracelular para facilitar la diseminación peritoneal, podrían considerarse la fuerza impulsora en la metástasis tumoral en el cáncer de ovario. Estos esferoides naturales del cáncer comparten una gran cantidad de características con los cultivados desde líneas celulares, por lo que protocolos para estos cultivos pueden aplicarse para su estudio, estos crecen hasta aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  de diámetro, y tienen una zona exterior proliferativa y una zona hipóxica – necrótica en común [15].



**FIGURA 13 EFECTOS Y OPORTUNIDAD DE LOS ESFEROIDES EN LAS ASCITIS MALIGNA**

Los esferoides autogenerados son los precursores de la Metástasis Peritoneal, evento que suele suceder en etapas tardías y suele considerarse como el evento principal causante de la mortalidad del cáncer de ovarios. Estudios sugieren que se pueden aprovechar estos esferoides para el estudio de tratamientos personalizados y así mejorar el pronóstico de la enfermedad. Elaboración propia.

Para la generación de esferoides existen principalmente dos métodos: los independientes de matriz extracelular y los dependientes de matriz.

### 6.3.2. Método de cultivo independiente de matriz

Los métodos de generación de esferoides independientes de matriz son muy comunes por su fácil implementación y van desde el uso de placas de ultra baja adhesión el cual es tratado para evitar de forma física y/o química la unión de las células a los pocillos, algunas técnicas usan agitación para mejorar la unión celular y evitar su adhesión a los pocillos., generación de gotas colgantes método que se basa en la generación de pequeñas gotas en suspensión donde el asentamiento celular la gravedad y la adhesión célula-célula propician la generación de aglutinaciones celulares. [3] o superficies tratadas para evitar la adhesión celular [16] (**Tabla 1**) y (**Figura 14**). Otorgan un mejor modelo sin alejarse demasiado de lo convencional. También se pueden utilizar herramientas mecánicas como motores de rotación e incluso usar propiedades físicas como el magnetismo para lograr un cultivo, aunque estas últimas requieren un equipamiento especial.

En los cultivos independientes de matriz se puede apreciar de mejor manera que el cambio espacial y estructural de los modelos 3D presenta diferencias con respecto al modelo convencional monocapa como plantea Singha, B *et al.* en sus resultados donde existen diferencias significativas en expresión de muchas proteínas como LC3 – I, LC3 – II, ULK1 [16]. Siendo el

modelo más parecido al modelo 2D o de monocapa la disposición y ordenamiento genera cambios que permite nuevos estudios (Tabla 1), se pueden formar esferoides de casi cualquier línea celular relevante para estudio.

TABLA 1 MÉTODOS INDEPENDIENTE DE MATRIZ DESARROLLADOS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS

Nombre del estudio	Resumen	Referencia
<b>Método de gota colgante a partir de células primarias derivadas de ascitis (AsPC)</b>	Ensayo funcional para evaluar la sensibilidad a drogas en cultivos de células primarias derivadas de ascitis (AsPC) de pacientes	[3]
<b>Cultivo de esferoides frescos en ácido hialurónico</b>	Generar datos predictivos de la sensibilidad <i>in vivo</i> al platino, con mira a terapias personalizadas	[16]
<b>Modelo de pasajes en serie</b>	Examinar la aparición y el desarrollo de la quimio resistencia en el cáncer de ovario en un formato controlable y reproducible.	[17]
<b>Método de cultivo dinámico, bajo esfuerzo cortante fisiológicamente relevante</b>	Los esferoides generados mediante esta técnica fueron totalmente susceptibles de ensayos funcionales.	[18]

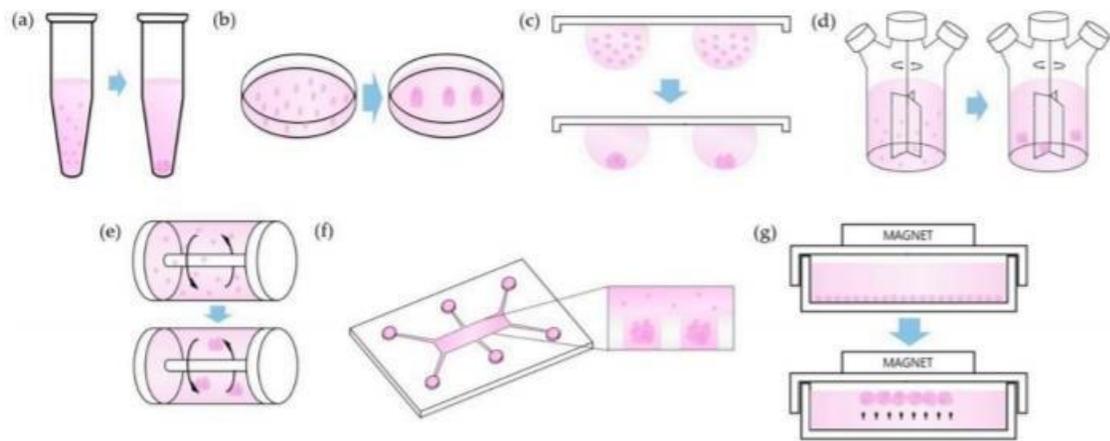


FIGURA 14 MÉTODOS INDEPENDIENTE DE MATRIZ

A y b) Método de superficies de baja adhesión, c) Métodos de gotas colgantes d y e) Método de cultivo rotativo f) método de Microfluidos g) Método de levitación magnética. Modificación de Imagen de "Na-Eun Ryu, et. al" [19]

### 6.3.3. Métodos de cultivos dependientes de matriz

El uso de matriz ayuda a emular un microambiente tumoral dado que juega un papel importante en el del desarrollo del cáncer [20]. El microambiente tumoral es una mezcla de células malignas y no malignas, como fibroblastos, células endoteliales y células inmunes que afecta el crecimiento del tumor y sufre cambios en respuesta a la progresión del cáncer, normalmente para imitar el microambiente se utiliza un matrigel, films o partículas disueltas (**Figura 15**).

Los biopolímeros naturales incluyen los obtenidos de la naturaleza seda, gelatina y alginato o componentes ECM, como el colágeno fibrina y ácido hialurónico pueden ser utilizados para formar la matriz [21]. Actualmente, el

método más usado es matrigel que se trata de una membrana basal solubilizada extraída de sarcoma de ratón que consiste en una mezcla indefinida de proteínas de la matriz extracelular (como laminina y colágeno) que permite interacciones célula-matriz, que promueven el crecimiento de células malignas y no malignas, así como la formación de esferoides. Lamentablemente entre sus desventajas es que es difícil su estandarización debido a su alta variabilidad de lotes [21], composición indefinida y origen murino.

Aunque como modelo experimental para el estudio de la fisiología o patología del cáncer pueden presentar ventajas, para la utilización en la prueba de drogas el problema de la estandarización es complejo, razón por la cual se sigue en búsqueda de una matriz más eficiente cada año (**Tabla 2**).

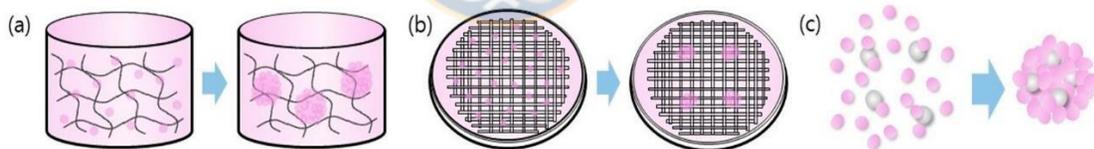


FIGURA 15 MÉTODOS DEPENDIENTE DE MATRIZ

Esquema de las diferentes técnicas de cultivo dependiente de matriz más utilizados en la investigación. a) Matrigel b) Film c) micropartículas - Imagen de "Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells" [20]

Para abordar estos inconvenientes, se están explorando materiales naturales y sintéticos como alternativas para generar modelos de cáncer en 3D. Los materiales naturales recapitulan los aspectos estructurales del medio

extracelular, pero son limitados en las propiedades mecánicas. Mientras que los materiales sintéticos pueden superar las limitaciones del control mecánico, son menos bioactivos [22].

**TABLA 2 MÉTODOS DEPENDIENTE DE MATRIZ DESARROLLADOS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS**

<b>Nombre del estudio</b>	<b>Resumen</b>	<b>Referencia</b>
<b>Hidrogel biomimético a base de colágeno</b>	Recapitula el nicho de las células madre, mejora la progresión y la quimio resistencia.	[23, 24]
<b>Matrices de ensamblaje de péptido-proteína como modelo biomimético</b>	Los bio-enlaces de ensamblaje de PA / proteína pueden modelar la TME del cáncer de ovario a un nivel similar, pero más controlado, que el proporcionado por Matrigel.	[22]
<b>Plataforma de micro fluidos</b>	La viabilidad y la expresión del marcador epitelial en los cultivos de micro fluidos fue superior a la de Matrigel o cultivos 3D de gran volumen.	[25]
<b>Poly (ethylene glycol)-Cross-Linked Poly (methyl vinyl ether-alt-maleic acid) and Alginate Double-Network Hydrogels</b>	Generación de matrices con diferentes propiedades para pruebas farmacológicas.	[26]
<b>Un hidrogel 3D PEG inspirado en omento</b>	Plataforma mejorada de prueba de fármacos in vitro para estudiar la respuesta a fármacos, para células derivadas de pacientes.	[27]
<b>Generación de hetero esferoides en placas con matrigel</b>	Produce esferoides de tamaño uniforme para múltiples ensayos simultáneos.	[28]

## 6.4. Modelos de Organoides

Los organoides son una versión miniaturizada y simplificada de un órgano producido *in vitro* que se derivan de células de un tejido, células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas mediante un cuidadoso ajuste y control de su medio extracelular, las que pueden autoorganizarse en cultivo tridimensional debido a su capacidad de autorrenovación y diferenciación.

En general, el proceso de fabricación de un organoide empieza con la capacidad intrínseca que exhiben las células madre para ensamblarse en estructuras complejas; cuando estas se colocan dentro de un hidrogel (a menudo matrigel) y en presencia de factores exógenos adecuados las células madre tienden a formar estructuras que contengan grupos organizados de células

Estas réplicas de órganos o tumores no requieren transformación para sobrevivir y permiten una expansión a largo plazo, al tiempo que mantienen el panorama genómico de las células del donante. Dado que estos sistemas apoyan el crecimiento de células epiteliales sanas, les da a los modelos organoides una ventaja considerable que ningún otro sistema de modelo derivado de humanos ha tenido antes: idoneidad para estudiar las primeras etapas del desarrollo tumoral en entornos relevantes para humanos [4].

Los organoides representan un enfoque emergente para la creación de modelos de cáncer *in vitro* ya sea derivado de células madre (**Tabla 3**) o de pacientes ya que son capaces de imitar las características fisiopatológicas de la tumorigénesis y metástasis [1, 4, 29]. el tiempo de formación suele ser de 1 o 2 meses [29].

TABLA 3 MÉTODOS DE FORMACIÓN DE ORGANOIDES DESARROLLADOS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS

Método	Resumen	Referencia
<b>Organoides Endometriales libres de matriz.</b>	Características funcionales del endometrio nativo en respuesta a la fase folicular E2 y testosterona	[30]
<b>Cultivo a partir de esferoides multicelulares (MCS) presentes en los líquidos de efusiones malignas.</b>	El modelo recapitula las características histológicas del líquido ascítico maligno y pueden expandirse durante al menos 6 días.	[31]
<b>Formación de organoides desde tejido de epitelio de las trompas de Falopio reconstruido.</b>	Se demostró, abundante presencia de células madre en tejido de epitelio de las trompas de Falopio, eficientes en la formación de organoides	[32]
<b>Formación de organoides de HGSC mediante señalización</b>	Modelo derivado de células pluripotentes de epitelio de las trompas de Falopio humano.	[33]

#### 6.4.1. Organoides derivados de Pacientes (PDO)

Los organoides tumorales derivados de pacientes se han convertido en importantes sistemas de modelos preclínicos. Esto principalmente a que se pueden cultivar a partir del material celular extraído del propio del paciente, se pueden expandir con alta eficiencia y en parte también a que son más económicos y rápidos existiendo técnicas para lograrlo en aproximadamente 20

días [34]. El tratamiento de estos organoides es muy parecido a los de esferoides anteriormente tratados.

Brevemente, el cultivo de PDO comienza picando el tejido del paciente y colocando las células en Matrigel. Luego, se agregan medios llenos de nutrientes alrededor de las gotas para permitir el crecimiento continuo de las PDO y para que las células crezcan en formas de esferoides que se denominan "organoides". Si se cultivan bien, las formas conservan el paisaje genético y las propiedades histológicas del tumor original [35].

Los organoides derivados de pacientes no pierden la capacidad de imitar las características de expresión genética [34] y fisiológicas del tumor de los mismos pacientes [36, 37]. Incluyendo la capacidad de emular de cerca la respuesta fisiológica a fármacos para medir la eficacia y toxicidad [29], convirtiendo este método una alternativa más conveniente que los Xenoinjertos (revisión más adelante) [38].

Se han generado organoides tumorales derivados del paciente a partir de tejidos tumorales extraídos: de colon, páncreas, próstata, mama, gástrico, pulmón, esófago, vejiga, ovario, riñón e hígado [36, 39].

En el caso particular del cáncer de ovario existen estudios que sugieren el uso de organoides derivados de pacientes para el estudio de todas las etapas del cáncer desde determinar el riesgo de recurrencia en etapas tempranas, al

monitorear las características de estos organoides ya que conservan fielmente las propiedades del paciente del que se generó. [40] y otros que demuestra correlación entre la resistencia a drogas y la respuesta del paciente como demostró Chris Jenke de Witte et al. [1, 34] al estudiar y caracterizar 36 organoides derivados de paciente de 23 pacientes, también es importante mencionar que incluso se pueden estudiar etapas tan tardías como la metástasis y el efecto de esta en otros órganos como los pulmones y tejido circundante. [41]; abriendo la puerta a ser usados para el avance de una medicina personalizada para todas las etapas de la enfermedad.

En los últimos años se han generado distintos métodos para la recapitulación de organoides a partir de pacientes, para superar distintos desafíos propios de cada cáncer o tejido como la resistencia a la digestión o tejido, o con miradas a optimizar el rendimiento para lograr pruebas de alto rendimiento.

**TABLA 4 MÉTODO DE ENSAYOS PDO DESARROLLADOS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS**

Los ensayos de organoides derivados de pacientes carecen de las complicaciones de la transición del modelo de organoide lo que permite que su investigación en los últimos 5 años se centre en mejorar las cualidades del modelo – Elaboración Propia

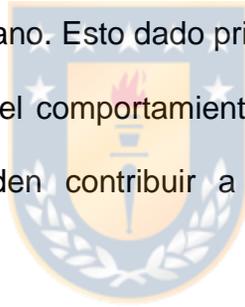
Nombre del estudio	Resumen	Referencia
<b>Método optimizado contra la resistencia a la digestión</b>	Método para la reducción de la pérdida de muestra por los procesos de digestión en los métodos tradicionales de cultivo de organoides derivados de pacientes logrando un éxito del 45 al 90%, para una propagación robusta de organoides	[42]
<b>Cultivo derivado de pacientes en Matrigel</b>	Estandarización de metodología para el cultivo de esferoides derivados de pacientes con miras a mantener las características histológicas y la positividad de p53 de los tumores primarios.	[39]
<b>Método de alto rendimiento en forma de mini anillo</b>	Mediante una adaptación al medio de cultivo se pueden generar organoides de pequeño tamaño de forma eficiente para ser usado dentro de una  semana después de la cirugía, para evaluar sensibilidad a drogas	[43]

## 6.5. Característica de los Modelos Animales

En la actualidad además de las líneas celulares se suele usar el modelo animal. Estos modelos sirven como puentes entre las pruebas *in vitro* y la composición heterogénea de un organismo vivo, en las que distintos tipos celulares se relacionan dentro de un microambiente. Los modelos animales, en especial el de ratón se utilizan ampliamente en la investigación del cáncer debido a disponibilidad y diversidad de cepas inmunocompetentes e inmunodeficientes y esto motiva a la modificación de métodos para mejorar su eficiencia (**Tabla 5**).

Dado la capacidad de mantener un microambiente fisiológicamente controlado, los modelos de animales, permite estudiar posibles efectos secundarios producidos por fármacos en tejido u órganos [44], Además, es una estrategia para predecir y evitar tales efectos [45] También es una técnicas de detección en etapas tempranas del cáncer o de una posible metástasis [46] cualidades imposibles de reproducir en los modelos *in vitro*; como el efecto en folículos primordiales [47] o los efectos de mARNs [48].

Sin embargo, es importante entender que un modelo animal no siempre es extrapolable al ser humano. Esto dado principalmente por razones propias de la fisiología animal, como el comportamiento de los animales y las diferencias entre especies que pueden contribuir a interpretaciones erróneas de los resultados.



**TABLA 5 MODELOS ANIMALES INNOVADORES EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS**

En los últimos 5 años una de las áreas de investigación del modelo animal es mejorar la capacidad exploratoria del modelo, para lograr estudiar sin intervenir demasiado el modelo. – Elaboración Propia

Nombre del estudio	Resumen	Referencia
<b>Modelo de ratón de cáncer de ovario para metástasis peritoneal para el estudio de quimioterapia intraperitoneal.</b>	Modelo de ratón para el estudio de quimioterapia intraperitoneal.	[49]
<b>Puerto endoscópico de acceso repetido y de bajo costo</b>	Este método se puede utilizar para producir dispositivos con fines ligeramente diferentes a los del acceso endoscópico repetido, como la producción de un puerto de entrada para herramientas quirúrgicas.	[50]

### 6.5.1. Ratones Modificados Genéticamente (GEM)

El ratón de laboratorio es el modelo animal más utilizado en la investigación del cáncer debido a su alta adaptación a diferentes ambientes, variabilidad genética y similitudes fisiológicas con humanos. Comenzando con mutaciones espontáneas que surgen en colonias de ratones que permiten perseguir estudios de condiciones patológicas específicas, esta área de investigación in vivo ha evolucionado significativamente, Tal como su nombre lo indica este modelo nace con las técnicas de edición genética.

Este modelo sigue evolucionando en especial con la técnica de secuestro CRISPR / Cas9, que ofrece herramientas poderosas en el diseño y desarrollo

varias cepas de ratón con capacidades como de generar modelos de ratones humanizados que abarcan el sistema inmunológico humano o emular cualidades antes difíciles o imposibles [51].

En la actualidad existen tres estrategias principales para la generación de GEM Microinyección de constructo de ADN, infección retroviral y transgén dirigido, todas las cuales implican la introducción de secuencias de ADN en el genoma en el modelo de ratón.

La mayoría de los estudios preclínicos en cáncer de ovario se realizan utilizando modelos de roedores inmunodeficientes o xenoinjertos para el estudio de etapas más avanzadas o ya formadas de cáncer. Y se pueden usar métodos de inducción química para generar un cáncer de ovario que puedan ser un buen modelo para etapas tempranas ya que poseen una histopatología y vías de diseminación a otros órganos similar al cáncer de ovario humano. lamentablemente la formación del cáncer toma de 6 a 12 meses [52].

**TABLA 6 MÉTODOS DE OPTIMIZACIÓN DE ENSAYOS CON GEM EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS**

El modelo de ratón modificado genéticamente es un modelo hecho a medida para el estudio de cada cáncer. En los últimos 5 años se estudia como generar ratones específicos para cada cáncer más que en mejorar el modelo como técnica – Elaboración Propia.

<b>Método</b>	<b>Resumen</b>	<b>Referencia</b>
<b>Terapia génica monitoreada por imágenes moleculares para el cáncer de ovario ortotópico de rata</b>	Línea celular de cáncer de ovario humano con expresión estable de luciferasa mediante la transfección de las células con el gen lentiviral mCherry / luciferasa	[49]

### 6.5.2. Xenoinjertos Derivados del Paciente (PDX)

Actualmente los modelos de xenoinjertos derivados del paciente (PDX) o xenoinjertos tumorales derivados de pacientes (PDTX) se han desarrollado ampliamente debido a que pueden representar de mejor forma la heterogeneidad del tumor y además el microambiente tumoral con retención de la complejidad celular, citogenética y arquitectura estromal [53]. Además, al poner el tumor en un ambiente más realista ha permitido su uso como una forma eficiente de ensayos farmacológicos preclínicos [42, 54].

Generalmente, el xenoinjerto se genera desde una biopsia derivada del paciente o tejidos tumorales disecados quirúrgicamente y se utilizan para el crecimiento tumoral ratones inmunodeficientes. Dependiendo el lugar del trasplante se denomina implantación heterotópica (cuando se inyectan muestras de cáncer en un sitio de ratón independiente de la ubicación del cáncer primario)

u ortotópica (Los modelos ortotópicos implican la siembra de líneas de células tumorales en el tejido correspondiente en modelos animales).

Los modelos PDX de trasplante ortotópico pueden generar metástasis e imitan con precisión el entorno natural del tumor primario, generalmente se utilizan para el estudio de metástasis tumoral. Para la mayoría de los cánceres de ovario, la investigación se realiza con frecuencia utilizando heterotópicamente debido a que es más fácil técnicamente de implementar, como también para realizar el seguimiento y monitoreo del tumor.

Las limitaciones de los xenoinjertos derivados de pacientes incluyen, además del uso de animales de experimentación, una baja eficiencia del injerto para algunos subconjuntos de tumores de pacientes. Además, el enfoque es costoso, requiere mucho tiempo y recursos asociados y los PDX pueden sufrir una evolución tumoral específica hacia la fisiología del ratón [29].

**TABLA 7 MÉTODOS DESARROLLADOS DE PDX DESARROLLADOS EN LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS**

<b>Método</b>	<b>Resumen</b>	<b>Referencia</b>
<b>Xenoinjertos derivados de pacientes en ratón parcialmente humanizado para pruebas preclínicas de inmunoterapias</b>	Reducción de la disparidad entre los modelos convencionales y los bloqueadores de puntos de control inmunitarios usando xenoinjertos	[55]
<b>Generación de líneas celulares derivadas de PDX estables usando reprogramación condicional</b>	Capacidad de expandir células PDX in vitro para ensayos de cribado 2D posteriores, así como para su uso in vivo para reducir la variabilidad, el uso de animales y los costos de estudio.	[56]

## Objetivo II: Potencial para predecir una respuesta a drogas

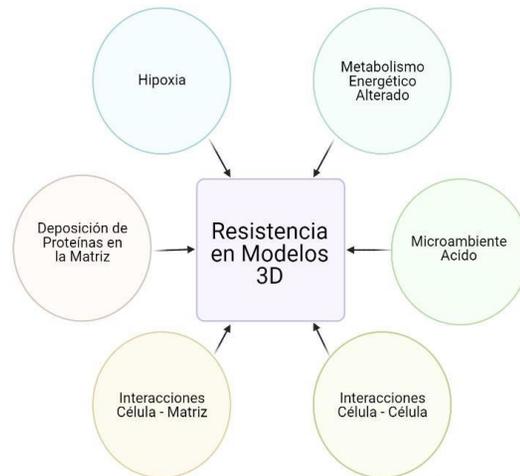
### 6.6. Potencial y utilización de los Cultivo 2D

El modelo de cultivo celular en monocapa o 2D ha sido el modelo tradicional utilizado para el estudio de muchas patologías, incluyendo cáncer y su tratamiento farmacológico, es normal que todos los estudios siempre sean probados en este modelo, aunque su capacidad de predicción es conocida como muy baja. Pero es evidente que este modelo presenta una serie de limitaciones siendo poco representativo de la realidad del microambiente celular. Esta es la principal razón por la cual los ensayos experimentales con nuevas terapias siempre incluyen modelos más complejos como el animal, especialmente si es necesario predecir la respuesta a fármacos.

## 6.7. Potencial de los Modelos celulares 3D

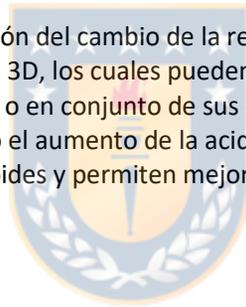
Existen diferencias significativas al cambiar de modelos monocapa a los modelos 3D, el cambio espacial genera que no todas las células están expuestas en las mismas condiciones, generando una heterogeneidad en los estados celulares en un mismo cultivo. Al crecer el número de células en los esferoides se generan gradientes donde las células precursoras quedan en el centro incapaces de obtener nutrientes y oxígeno entrando en un estado de hipoxia y cambiando su expresión y comunicación con otras células (**Figura 16**), mientras que las células más exteriores se encuentran expuestas al medio nutritivo y al oxígeno en una fase de proliferación. Diversos estudios apuntan a que la hipoxia juega un papel importante en la aparición de la resistencia a fármacos [57], todo esto combinado crea un cambio importante en el modelo celular





**FIGURA 16 CAMBIOS ENTRE MODELOS 2D Y 3D**

Múltiples propiedades son la razón del cambio de la resistencia a drogas entre el modelo monocapa y los nuevos modelos 3D, los cuales pueden potenciarse en los modelos para el estudio de forma independiente o en conjunto de sus efectos. La hipoxia es un factor reconocido por generar otros cambios como el aumento de las acides y el cambio metabólico, estos cambios se ven potenciados en los esferoides y permiten mejor su estudio – Imagen de Nunes *et al.* – Modificada [57].



## 6.8. Potencial de los esferoides

Los esferoides tienen la ventaja de ser un punto de partida mucho mejor que los modelos monocapa ya que pueden manejarse con precisión y facilidad para emular características específicas de un tumor [8], es posible generar cocultivos además las propiedades fisicoquímicas y biológicas son personalizables; se establece un gran número de interacciones célula-ECM artificiales, están presentes gradientes de gases, nutrientes y pH; los esferoides se pueden formar sin equipos y herramientas específicos; la mayoría de las

técnicas son económicas; compatible con ensayos masivos [21], usando este modelo se pueden hacer ensayos predictivos con una alta tasa de confiabilidad sobre el futuro resultado de los tratamientos de ciertos pacientes [58]. En gran medida por dar un salto importante en la representación de la fisiología del cáncer en comparación al modelo monocapa. (**Figura 17**).



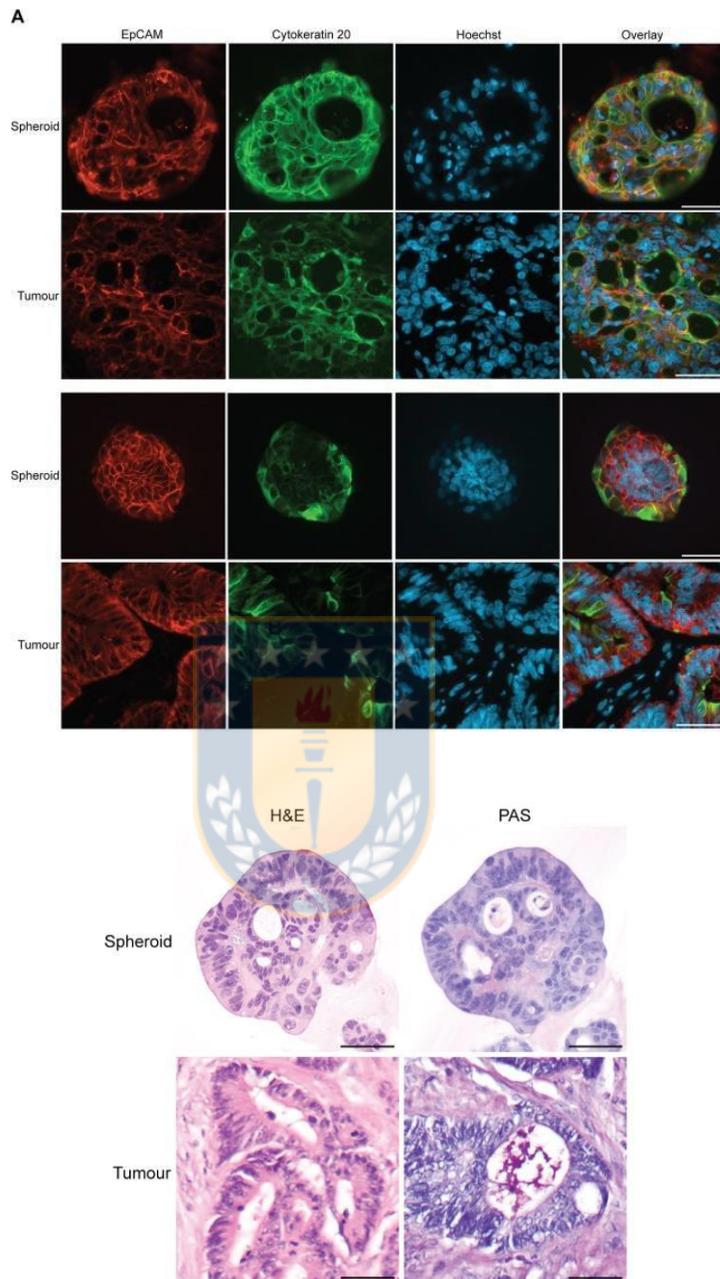


Figura 17 Los esferoides mantienen la histología de los tumores

En los modelos de esferoides se puede apreciar de mejor manera las similitudes estructurales Imagen superior y los parecidos histológicos Imagen inferior que tienen los esferoides a un tumor real, esto debido a que su ordenamiento permite la interacción de células en distintos estados celulares, mejorando el modelo de forma significativa. - Imagen de Maria Jeppesen *et al.* [59]

### 6.8.1. Penetración de fármacos

En los cultivos tradicionales monocapa es difícil de evaluar la capacidad de los fármacos y de los sistemas de administración de fármacos para llegar selectivamente al lugar de acción, la capacidad de penetrar y distribuirse por los tumores sólidos, factores limitantes del éxito del tratamiento del cáncer.

El surgimiento de los modelos 3D ha sido un gran impulso para el estudio de nanopartículas transportadoras y el estudio de farmacología de forma más precisa en especial la capacidad de evaluar la penetración de moléculas en el tejido tumoral, Marie Millard *et al.* [8] sugiere que estos modelos pueden integrarse al estudio de nanopartículas dado que los esferoides multicelulares mostraron una fuerte evidencia de barreras de transporte que impiden la difusión de macromoléculas (fármacos, transportadores, proteínas). Además, los modelos 3D han permitido estudiar los mecanismos que influyen en la difusión de moléculas a través del espacio intersticial como son la estructura y composición del compartimento intersticial, el tamaño de los espacios intersticiales, la densidad celular, etc.

En este sentido los cultivos 3D ofrecen evaluar la penetración de fármacos y transportadores de una forma más económica y rápida que el modelo animal, ya

existen estudios que lo evalúan tomando en cuenta las propiedades tanto de superficie como internas del tumor [60]. Además, se han usado estos modelos para estudiar el efecto de estas propiedades en los medios de distribución y la incorporación de moléculas transportadoras. [8, 61, 62].

### 6.8.2. Proteómica y expresión.

El uso de modelos 3D en especial de esferoides ha permitido estudiar las interacciones que se generan entre distintas poblaciones celulares ya sea de la misma línea u otras poblaciones celulares como en los esferoides multicelulares u organoides. Esto ha generado cambios de expresión de proteínas, en especial integrinas, entre otras lo que se asemeja a un ambiente más representativo a un tumor sólido real [63]. En cuanto a proteómica existen estudios muy extensos como Thomas Worzfeld *et al.* [64] que han demostrado diferencias significativas en múltiples vías de señalización intercelular impulsadas por mediadores de proteínas o lípidos que están asociadas con el resultado clínico en esferoides. Las proteínas más destacadas del grupo de "adhesión celular" son integrinas (ITG) y receptores con funciones de señalización fundamentales en la biología del cáncer, incluidos los receptores de efrina (rEPH), EGFR, NOTCH3, la molécula de adhesión L1CAM, las fosfatasa de proteína de tirosina de tipo

receptor (PTPR) y los receptores de semaforina de las familias de neuropilina (NRP) y plexina (PLXN) entre otros.

Estas expresiones se ven potenciadas en los modelos 3D debido a que su estructura potencia la interacción intracelular. Existen una gran cantidad de estudios que hablan de la expresión específica de proteínas o vías de señalización para esferoides. Con un especial enfoque los esferoides multicelulares los cuales han demostrado como otras células logran enriquecer el modelo para el estudio de la generación de la quimio protección [10], uno de los factores más importantes del mal pronóstico en el cáncer de ovario.



### 6.8.3. Estudios de los Mecanismos de Metástasis en Cáncer de ovario

Una de las características en cáncer de ovario es la generación de metástasis en el líquido intraperitoneal. Estas células metastásicas generan esferoides de forma natural lo que puede ser aprovechado usando las técnicas de cultivo de esferoides y se ha visto que por medio de este fenómeno se generan múltiples mecanismos de resistencia a fármacos.

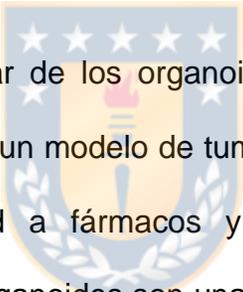
El cáncer de ovario seroso de alto grado (HGSOC) es la forma más agresiva de cáncer de ovario (OC) y se caracteriza por el inicio temprano de la diseminación peritoneal, fenómeno que lo distingue del cáncer de ovario seroso

de bajo grado (LGSOC). La metástasis en cáncer de ovario se produce por diseminación intraperitoneal de las células cancerosas, tanto la metástasis hematológica como la intraperitoneal implican cambios en las interacciones célula-célula o célula-matriz debido a la expresión de proteínas de adhesión mejor representada en los modelos 3D. Esta es una de las razones más influyentes en el mal pronóstico de esta patología. Estas características se reflejan en los esferoides extraídos de la ascitis peritoneal. Con esto en mente se han usado esferoides para estudiar el pronóstico de distintas pacientes, demostrando su potencial aplicación debido que los cánceres más agresivos son propensos a formar esferoides heterotípicos con fibroblastos, y asocian la expresión de ciertas proteínas como ITGA5 como indicadores de un mal pronóstico. [13, 65].

Estudios genéticos comparativos entre los esferoides formados de células de ascitis maligna con las células del tumor primario del paciente pueden ayudar a conocer tanto la progresión del tumor como los posibles resultados terapéuticos en el cáncer de ovario [66]. Con esto en mente existen ensayos que demuestran que el uso de estos esferoides son un buen modelo para el análisis de susceptibilidad a drogas, esto a sus capacidades como modelo y su adaptabilidad al ensayo masivo [67].

## 6.9. Avances de los organoides

Los organoides tradicionales a partir de células madre. Han demostrado tener mucha capacidad para el estudio de las primeras etapas del cáncer y las interacciones en las primeras etapas. Pero su aplicación está muy limitada por el tiempo que demoran en diferenciarse. Actualmente se plantea y se están generando bancos de esferoides de muchas líneas celulares que pueden ayudar a estudiar y reclasificar líneas celulares muy utilizadas.



En el caso particular de los organoides de cáncer de ovario diversos estudios apuntan a que es un modelo de tumor útil para el análisis de genes, la predicción de sensibilidad a fármacos y la búsqueda de biomarcadores específicos [68, 69]. Los organoides son una herramienta útil en el estudio de la terapia de orientación genética y proporciona un buen entorno para el estudio de la inmunoterapia [70]. Esta herramienta se presenta como una opción para estudiar la evolución desde tejidos normales, lesiones precancerosas, hasta la malignidad. Este modelo se plantea con miras a lograr una detección, prevención y tratamiento tempranos.

Aún queda mucho por estudiar de estos modelos y se sigue generando investigación centrada en mejorar el rendimiento de los organoides, donde más

avance se ha logrado es agregando la Ingeniería de tejidos lo que permite generar organoides en chips impresos [71].

### 6.9.1. Oportunidades de los Organoides derivados de pacientes

Estos modelos ya son parte de ensayos para medir y comprar efectividad de drogas en tratamientos de cáncer con distintos fármacos (**Figura 18**), estos avances concuerdan que son un modelo viable con un gran potencial uso en la medicina personalizada, de forma predictiva [58].

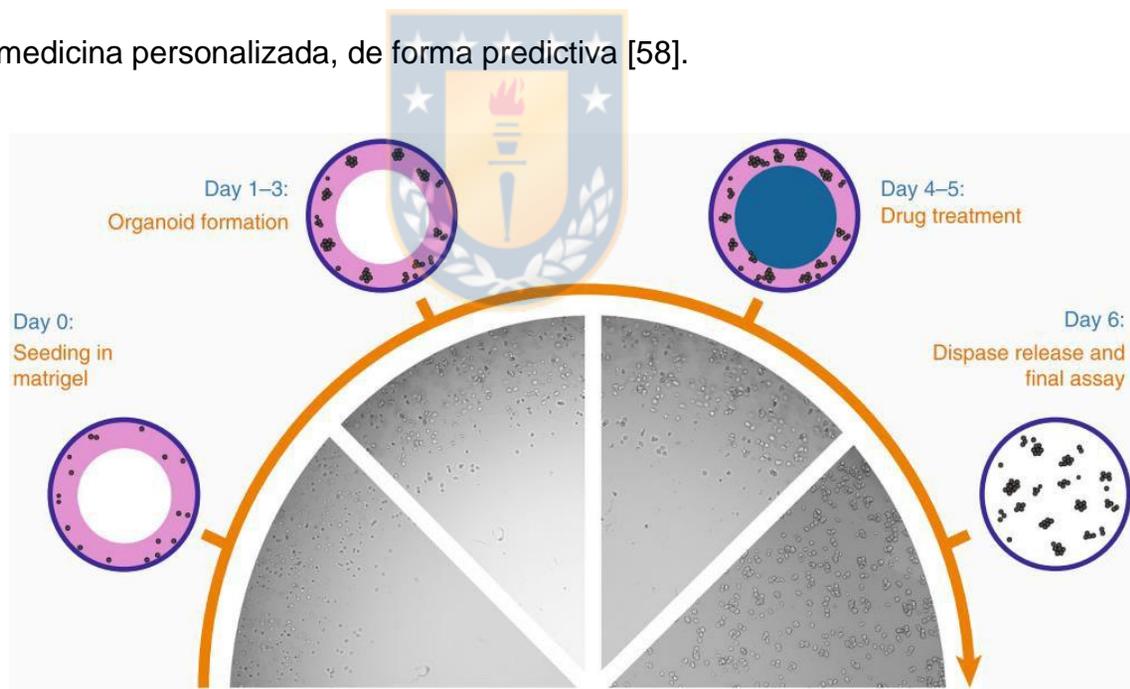


Figura 18 organoides en la medicina personalizada

Los organoides derivados de pacientes poseen las propiedades específicas del cáncer individual del paciente convirtiéndolos en una poderosa herramienta potencial para el desarrollo de medicina personalizada y una guía para el tratamiento farmacológico del cáncer. – Imagen de Nhan Phan *et al.* [43]

TABLA 8 USO DE ORGANOIDES DERIVADOS DE PACIENTES EN ENSAYOS PRECLÍNICOS

Fármaco	Tipo de cáncer	Conclusión	Referencia
Derivados de benzoilpiperidina de segunda generación	Cáncer de ovario seroso de alto grado	Efectividad comparable al carboplatino	[29]
Complejos de Paladio (II) con N-trifluorometilo Carbenos N-heterocíclicos:	Cáncer de ovario seroso de alto grado	Se pueden realizar pruebas farmacológicas para seleccionar posibles antineoplásicos de un gran pool de opciones, una elección con menos tasa de error que los modelos tradicionales.	[72]

## 6.10. Modelo Animal

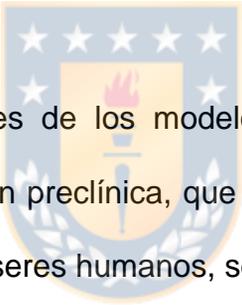
### 6.10.1. Estudios en la Vías de administración

Existen múltiples métodos de administración que son imposibles de estudiar en modelos *in vitro* y que pueden ser estudiados gracias a las características modelo animal. Incluso métodos parecidos pueden tener diferencias significativas en los resultados de supervivencia según la quimioterapia intraperitoneal con catéter (CIPC), la quimio perfusión normotérmica e hipertérmica (NIPEC e HIPEC) según la droga que con la cual se esté experimentando [73].

Gracias a los modelos estudios como el de Vladimir G. Beshpalov *et al.* Puede plantear cambios en los tratamientos actuales y sugerir nuevos

tratamientos con potencial y da como ejemplos experimentales con el fármaco dioxadet el cual tiene potenciales ventajas en la quimioterapia intraperitoneal frente al cisplatino más utilizado en la actualidad, lo que indica las perspectivas del dioxadet para su futura introducción en la práctica clínica como fármaco primario para HIPEC y CIPC en pacientes con cáncer de ovario avanzado y recidivante [73].

#### 6.10.2. Características de los Xenoinjerto



Dada las limitaciones de los modelos de líneas celulares y modelos animales en la investigación preclínica, que no reflejan de manera suficiente la situación fisiológica de los seres humanos, se han desarrollado ampliamente los modelos de xenoinjertos derivados del paciente (PDX). Los PDX logran una representación de la heterogeneidad y microambiente tumorales con retención de la complejidad celular, citogenética y arquitectura estromal.

Un desafío en las pruebas de nuevos fármacos es determinar la participación de las características fisiológicas como las hormonas y la eficacia antitumoral. El xenoinjerto es una mezcla entre los modelos de esferoides/organoides y el modelo animal que permite precisamente estudiar estos efectos, que pueden ser muy importante en el desarrollo de algunos

carcinomas serosos de alto grado [74], o el desarrollo de nuevas técnicas de detección de cáncer menos invasivas o más precisas [75].

Existen estudios que detectaron una gran concordancia de sensibilidad al cisplatino y al carboplatino entre los modelos PDX y los pacientes donantes tales como Cybulska P *et al.* (2018) [76], que realizó secuenciación genética comparativa entre los xenoinjertos y los tumores de pacientes.



## Objetivo III: Análisis de ventajas y desventajas de los modelos.

### 6.11. Diferencias Económicas entre modelos 2D y 3D

El modelo más económico siempre será el modelo 2D ya sea cultivo primario o línea celular, su amplia utilización y optimizaciones por años a permitido minimizar sus costos, disminuir sus requerimientos en equipos y técnica, los esferoides y organoides usan en gran mayoría el mismo soporte y otros agregados como matrigel, o placas especiales menos estandarizadas y altamente comerciales, esto debido a que es la base de la mayoría de los métodos de cultivo y todo cultivo en 3D o modelo animal suele tener asociado en algún grado un cultivo en 2D.

En cuanto a los modelos 3D los modelos independientes de matriz como gotas colgantes o placas de ultra baja adhesión son los más económicos al no ser muy diferentes a los cultivos 2D en cuanto a requerimientos o equipos especiales, ya que otros pueden ser adaptados.

## 6.12. Discusiones Éticas

En general se cree que el uso de material de líneas celulares carece de implicancias éticas debido a su amplio uso y fácil acceso, pero no es el caso. Como se explica en: “*A Troubled Past? Reassessing Ethics in the History of Tissue Culture*” Existe un trasfondo muy ignorado en la utilización de muchas líneas celulares, un tema aún sin resolver que puede afectar la conciencia de cada investigador de manera diferente. Donde ya judicialmente se dio un veredicto por lo que legalmente no habría implicancias.

Aquellos que tienen implicancias éticas más directa y sencillas de ver siempre son aquellos donde un ser vivo es afectado, ya sea un animal como en los modelos animales. Donde se debe tener siempre en cuenta el tratar de afectar al menor número posible, cosa que se opone a la estadística que busca un gran número de muestras para ganar robustez, evitar el sufrimiento del animal es difícilmente posible sin poner en riesgo las condiciones de estudio en una patología crónica y que con conocidos efectos en la calidad de vida.

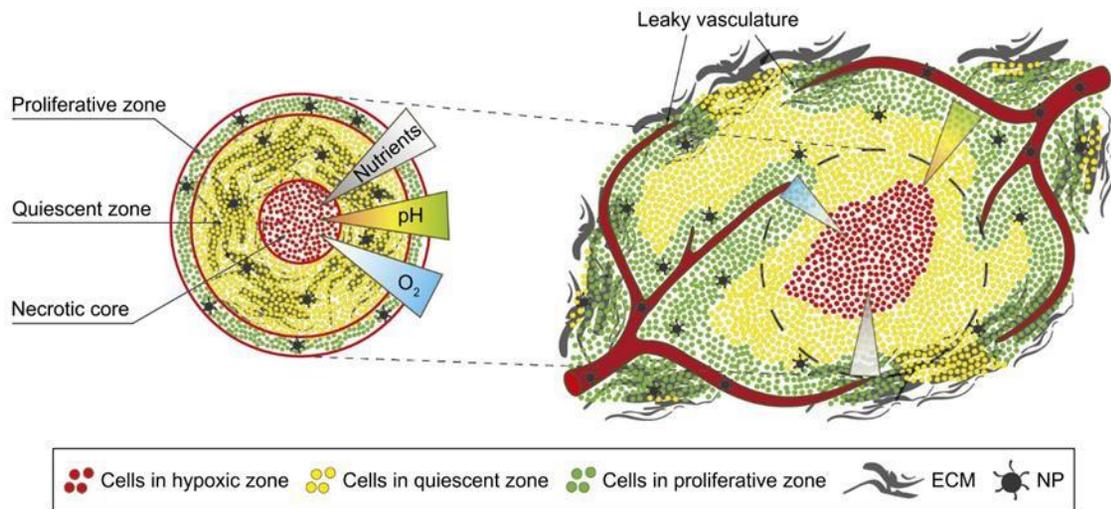
En el caso de los organoides, en el caso de generarse de células madre o sean parte de una biopsia u operación son parte de un paciente el cual podría entregar voluntariamente o como parte de desecho de operación, con

información genética, clínica y personal que se debe tratar con extremo cuidado y respeto.

### 6.13. Ventajas y desventaja de los Esferoides

El uso de esferoides ha demostrado tener propiedades que los modelos monocapa no poseen, estas propiedades se deben tener en cuenta en muchos casos para el desarrollo experimental complicando el modelo a favor de una mejor representación de la realidad fisiológica **(Figura 19)**.





**FIGURA 19 PARECIDO ENTRE ESFEROIDES Y TUMORES**

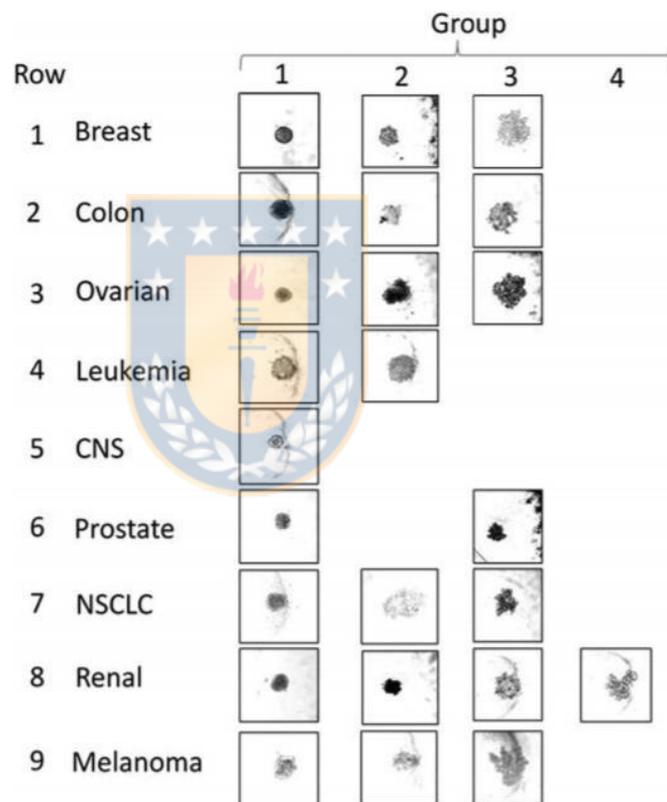
Los esferoides, en especial los esferoides multicelulares tienen un gran parecido a los tumores reales, esto es lo que les da una gran ventaja para el estudio contra el cáncer. – imagen de Marie Millard *et al.* [8]

### 6.13.1. Tamaño y forma

Uno de los grandes inconvenientes sobre el estudio en esferoides en algunos métodos de cultivo como por ejemplo los de placas de ultra baja adhesión es la falta de capacidad de formar esferoides de forma uniforme ya sea en tamaño, forma y por consecuencia de densidad para hacer los análisis estadísticos de forma precisa como se demuestra en Ludivine Guillaume *et al.* los esferoides acumulan estrés inducido por el crecimiento afectando la forma

una característica importante de evaluar al momento de desarrollar un método experimental de cultivo de esferoides.

El tamaño de los esferoides también afecta los gradientes y la penetración de fármacos. Además, aunque todos tienen el nombre de esferoides no todos los esferoides poseen la misma forma (**Figura 20**).



**FIGURA 20 FORMA Y AGREGACIÓN DE ESFEROIDES**

Los esferoides pueden presentar formas distintas según el tipo de línea celular que lo origine como son ejemplos: Grupo 1= Esferoides Condensados, Grupo 2 = Esferoide no condensado, Grupo 3 = Agregados, and Grupo 4 = agregados sueltos. -Imagen de Selby, M *et al.*

### 6.13.2. Efectos físicos

Todas las células existen en un entorno fisiológico que está determinado por factores biológicos, químicos y físicos. Los efectos físicos a veces son olvidados por la dificultad de tener modelos para su correcta evaluación, pero igual que los químicos y biológicos, estos factores dirigen el crecimiento, la organización y la función de los tejidos, pero también pueden causar o contribuir a enfermedades como el cáncer.

Estos fenómenos cobran especial relevancia en el cáncer de ovario debido al su particular mecanismo de metástasis en la ascitis como explica Alexandra R. Hyler *et al.* Se ha demostrado que la adición de pequeñas cantidades de esfuerzo cortante de fluidos (FSS) altera las propiedades de los esferoides [77], como el aumento de la expresión de marcadores de células madre cancerosas y la quimioresistencia [78]. Y esta también cambia la viabilidad y forma de los esferoides, donde el efecto depende del tipo de línea celular. [18].

Aunque exponer a los esferoides en situaciones estresantes durante su formación los que pueden su tamaño y densidad parece ser relevante. Como señalan algunos estudios el tamaño manera de formación de los esferoides no tienen efectos significativos, respecto a la resistencia a drogas. El efecto solo se presentó en los esferoides grandes (5000) (estudio en cisplatino). Que suele ser

difícil de evaluar debido a la deformaciones en el esferoide por efectos de las drogas [79].

### 6.13.3. Desventajas del Efecto de la matriz.

Es importante tener en cuenta que la matriz puede afectar las pruebas debido principalmente a que puede afectar la expresión de proteínas o ser un impedimento al transporte o llegada del fármaco, como ejemplo en las demostraciones de Song, H., *et al.* En las que, las proteínas de adhesión tales como Integrina 1, N-Cadherina, E-Cadherina [80] cambian su expresión de acuerdo con la matriz (**Figura 21**).

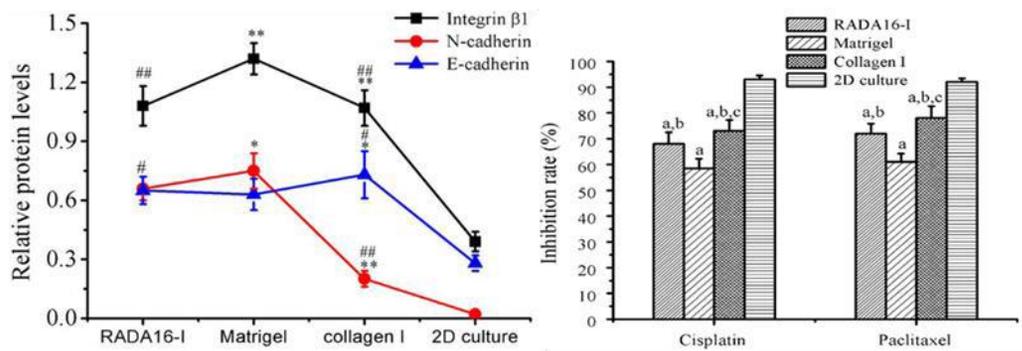


FIGURA 21 EFECTO DE LA MATRIZ

La matriz extracelular juega un papel importante en la expresión de proteínas, lo que puede afectar el resultado de algunos experimentos se **presenta un ejemplo del efecto de la matriz en la expresión de proteínas de adhesión en cultivos de HO-8910PM de 7 días [77]**

## 6.14. Ventajas de los Organoides

La principal ventaja de organoides cancerosos es ligeramente más económica en comparación a los modelos animales, requiere menos espacio y una técnica más fácil de usar y se puede lograr en 1 o 2 meses, y dejando la oportunidad de subcultivos. [29].

Estos modelos tienen la ventaja de mantener el genotipo y fenotipo originales de los tumores (**Figura 22**) y representan una herramienta importante para las pruebas experimentales de agentes anticancerosos, Por tanto, se podrían utilizar para aconsejar directamente decisiones individualizadas en futuros ensayos clínicos [29].

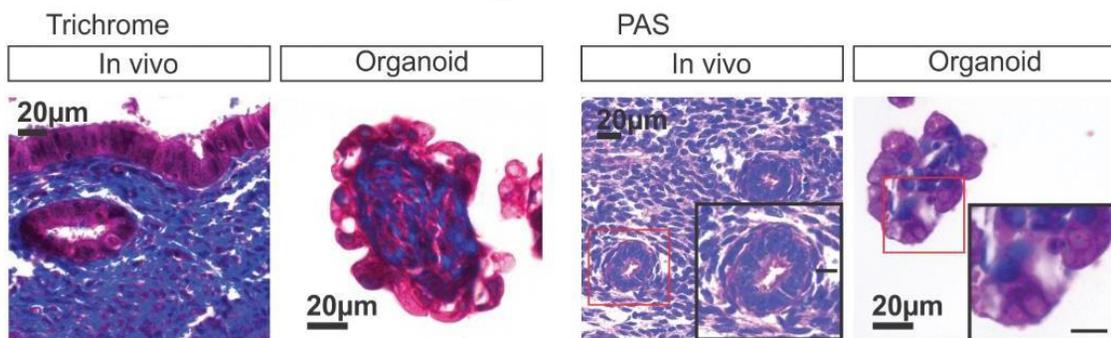


Figura 22 Modelo de organoides

Los organoides, aunque parecidos a los esferoides poseen la ventaja de tener una estructura más heterogénea y funcional de sus células, donde distintos tipos celulares pueden convivir para imitar incluso el funcionamiento de un órgano. – imagen de Wiwatpanit, T. *et al.* [30]

## 6.15. Modelo Animal

### 6.15.1. Modificación genética ventajas y desventajas

En la actualidad la técnica CRISPR / Cas9, ofrece herramientas poderosas para diseñar y desarrollar diversas cepas de ratón. Comenzando con mutaciones espontáneas que surgen en colonias de ratones que permiten realizar estudios de condiciones patológicas específicas, y los recientes avances permiten “humanizar” el modelo en las áreas específicas que se desee estudiar, de forma menos costosa y más eficiente, existen una gran variedad de formas de realizar estas con ventajas y desventajas específicas como se explica en *“Spontaneous and Induced Animal Models for Cancer Research”* [51].

### 6.15.2. Xenoinjerto

#### 6.15.2.1. Heterotópica u ortotópica

Es importante considerar la ubicación del injerto para los experimentos, Para la mayoría de los cánceres de ovario, la investigación se realiza con frecuencia utilizando modelos PDX trasplantados heterotópicamente, aun cuando

poseen menos cualidades fisiológicas que los ortotopicos debido principalmente a que su técnica es más fácil y se puede monitorear el tamaño del cáncer con precisión. En cambio, los modelos ortotopicos generar metástasis e imitar con precisión el entorno natural del tumor primario, que normalmente se utilizan para el estudio de la metástasis tumoral, pero poseen menor la tasa de éxito del injerto tumoral y disminuyen la reserva de heterogeneidad del cáncer humano [53].

#### 6.15.2.2. Consideración en la Tasa de Injerto

No solo la ubicación es importante sino también se debe tener en cuenta la tasa de injerto puede ser muy variable desde el 29% al 100% esto porque se ve influenciada por múltiples factores como el subtipos de cáncer, huésped, el sitio de implantación, los tumores primarios o metastásicos, el estado del tratamiento del paciente y la conservación de las muestras tumorales [53]. Además de poder sufrir una evolución tumoral específica del ratón [29].

Una de las desventajas más grandes del modelo animal, es que es difícil de humanizarlo debido a la fisiología y comportamientos propios de los animales, disponer de una gran cantidad es un gasto constante y tener una cantidad reducida aumenta los tiempos de experimentación en un proceso en que el tiempo de establecimiento que puede variar desde 2 a 11 semanas, incluso en algunos canceres 30+ semanas [53].

### 6.15.2.3. Miradas a una Medicina Personalizada

El desarrollo de nuevos modelos en especial los derivados de paciente directamente son un paso importante para la medicina personalizada. Esto debido que cada tumor y cada paciente pueden tener diferencias significativas en la respuesta a fármacos.

En el caso del cáncer de ovario los esferoides provenientes de la ascitis son una oportunidad aprovechable, de bajo costo y relativamente baja necesidad de equipo especializado. En otro cáncer es necesario usar modelos de organoides derivados de paciente para lograr las mismas características.

El uso de los Xenoinjertos derivados de pacientes permite el análisis de la farmacología de forma más precisa y personalizada, esto debido a que, al ser el modelo más complejo, capaz de emular la distribución de los fármacos en cuerpo y órganos en general. Esto a pesar de lo complicado de su puesta en marcha debido a su alto costo y requisitos técnicos puede ser un enfoque distinto para las pruebas preclínicas existentes actualmente, esto debido a que al tener el componente derivado de paciente pueden ser pruebas humanizadas sin poner en riesgo a ningún paciente. Esto ya está siendo explorado, ya existen estudios de farmacológicos tomando esta línea de investigación como es el caso de *“Anti-*

*Cancer Activity of As4O6 and its Efficacy in a Series of Patient-Derived Xenografts for Human Cervical Cancer”*

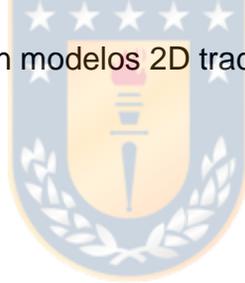


## 7. Discusión

En los 5 últimos años ha aumentado rápidamente el interés en el desarrollo de modelos 3D generando a su vez una gran cantidad de información en especial cuando se habla de esferoides. Por otro lado, la cantidad de información disponible para los organoides, contrario a lo esperado, es más modesta, esto dado principalmente a la necesidad de contar con instrumentos específicos y protocolos para generar este modelo más complejo si se usan células madre o de adquirir en el caso derivados de pacientes. Es importante recalcar que ningún modelo está por encima del otro, y no responden a un desarrollo lineal, esto debido principalmente que sus diferencias pueden ser ventajas y desventajas que pueden ser aprovechadas de acuerdo con las necesidades experimentales de cada laboratorio.

Como ocurre habitualmente en los avances tecnológicos, en general aún existe una falta de estandarización en la terminología empleada y protocolos utilizados, existiendo una gran cantidad de protocolos y métodos. Esto aumenta la variabilidad y reproducibilidad entre modelos de cultivos 3D. Finalmente, este problema es una oportunidad dirigida a los distintos grupos de investigación de generar protocolos y modelos innovadores estandarizados con miras a responder a distintas necesidades, en distintas condiciones.

Para el estudio de la respuesta a drogas los modelos mas complejos como el modelo animal pueden estudiar la respuesta de forma eficiente y además se puede observar las características farmacológicas de estas drogas. Lamentablemente este modelo es complejo en técnica, tiempo y equipo. Los organoides son un modelo potencial en especial en los derivados de pacientes tienen potencial en la medicina personalizada. Pero en el caso particular del cáncer de ovario los esferoides pueden ser el modelo con la mejor relación costo eficiencia debido a la particularidad de su metástasis que ofrece esferoides naturales. E incluso los derivados de líneas celulares son mejores modelos de pruebas que las pruebas en modelos 2D tradicionales.



## 8. Conclusiones

Los nuevos modelos en 3D abren una oportunidad a investigar nuevos temas para el avance de la ciencia, cada uno con sus características, ventajas y desventajas pueden ser usados con miras a investigar temas antes difíciles o imposibles. Y esto se ve claramente en el rápido aumento en el número de publicaciones que aparecen cada año usando alguno de estos modelos, así como también en las propuestas e inicio de bancos de esferoides y organoides, pensando en un futuro donde el cultivo 2D sea solo una etapa más que un fin. En vista de esto es recomendable para todos los laboratorios de investigación poner esfuerzo en informarse y encontrar el modelo que pueda mejorar las condiciones de su investigación para entregar datos relevantes en sus publicaciones, estas tecnologías pueden adaptarse a cualquier laboratorio cualesquiera sean las condiciones. Por ejemplo, el modelo de gotas colgantes para generar esferoides requiere de una mínima inversión ya que no difiere en gran medida con el modelo tradicional y aun con este cambio permite generar cambios importantes que ofrecen la oportunidad de mejorar el modelo más cercano a la realidad.

En el cáncer de ovario los esferoides y organoides tienen mucho que aportar en el caso particular del cáncer de ovario el esferoide tienen ventajas

como modelo que pueden ser aprovechadas para el entendimiento de esta patología.

Los modelos 3D tienen el potencial de reemplazar completamente los modelos tradicionales, el aumento de la tecnología que disminuye costos, tiempos y equipos. Puede ser la puerta a que estos modelos lleguen a la clínica para determinar el mejor tratamiento a una paciente de forma personalizada, los esferoides y organoides ya han demostrado ser capaces de esto, lo que es un importante avance en una patología con tan mal pronóstico donde cada minuto cuenta en particular debido a su capacidad de adquirir resistencia a el tratamiento con anticancerígenos.



## 9. Bibliografía

1. Maenhoudt, N., et al., *Developing Organoids from Ovarian Cancer as Experimental and Preclinical Models*. Stem Cell Reports, 2020. **14**(4): p. 717-729.
2. Boylan, K.L.M., et al., *Inhibition of Ovarian Cancer Cell Spheroid Formation by Synthetic Peptides Derived from Nectin-4*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(13).
3. Sheta, R., et al., *Development of a 3D functional assay and identification of biomarkers, predictive for response of high-grade serous ovarian cancer (HGSO) patients to poly-ADP ribose polymerase inhibitors (PARPis): targeted therapy*. J Transl Med, 2020. **18**(1): p. 439.
4. Lohmussaar, K., M. Boretto, and H. Clevers, *Human-Derived Model Systems in Gynecological Cancer Research*. Trends Cancer, 2020.
5. Wang, F.C., et al., *Highly expressed STAT1 contributes to the suppression of stemness properties in human paclitaxel-resistant ovarian cancer cells*. Aging-U.S, 2020. **12**(11): p. 11042-11060.
6. Kolendowski, B., et al., *Characterization of Mutational Status, Spheroid Formation, and Drug Response of a New Genomically-Stable Human Ovarian Clear Cell Carcinoma Cell Line, 105C*. Cells, 2020. **9**(11).
7. Behera, A., et al., *Bioinformatics analysis and verification of molecular targets in ovarian cancer stem-like cells*. Heliyon, 2020. **6**(9): p. e04820.
8. Millard, M., et al., *Drug delivery to solid tumors: the predictive value of the multicellular tumor spheroid model for nanomedicine screening*. International Journal of Nanomedicine, 2017. **12**: p. 7993-8007.
9. Gilazieva, Z., et al., *Promising Applications of Tumor Spheroids and Organoids for Personalized Medicine*. Cancers, 2020. **12**(10): p. 19.
10. Raghavan, S., et al., *Carcinoma-Associated Mesenchymal Stem Cells Promote Chemoresistance in Ovarian Cancer Stem Cells via PDGF Signaling*. Cancers (Basel), 2020. **12**(8).
11. Raghavan, S., et al., *Ovarian cancer stem cells and macrophages reciprocally interact through the WNT pathway to promote pro-tumoral and malignant phenotypes in 3D engineered microenvironments*. J Immunother Cancer, 2019. **7**(1): p. 190.
12. Long, L.L., M.Z. Yin, and W. Min, *3D Co-culture System of Tumor-associated Macrophages and Ovarian Cancer Cells*. Bio-Protocol, 2018. **8**(8): p. 10.
13. Gao, Q., et al., *Heterotypic CAF-tumor spheroids promote early peritoneal metastasis of ovarian cancer*. J Exp Med, 2019. **216**(3): p. 688-703.
14. Al Habyan, S., et al., *Multicellular detachment generates metastatic spheroids during intra-abdominal dissemination in epithelial ovarian cancer*. Oncogene, 2018. **37**(37): p. 5127-5135.
15. Emmings, E., et al., *Targeting Mitochondria for Treatment of Chemoresistant Ovarian Cancer*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(1).
16. Balduit, A., et al., *The Extracellular Matrix Influences Ovarian Carcinoma Cells' Sensitivity to Cisplatin: A First Step towards Personalized Medicine*. Cancers (Basel), 2020. **12**(5).
17. Ward Rashidi, M.R., et al., *Engineered 3D Model of Cancer Stem Cell Enrichment and Chemoresistance*. Neoplasia, 2019. **21**(8): p. 822-836.
18. Masiello, T., et al., *A Dynamic Culture Method to Produce Ovarian Cancer Spheroids under Physiologically-Relevant Shear Stress*. Cells, 2018. **7**(12).
19. Ryu, N.E., S.H. Lee, and H. Park, *Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells*. Cells, 2019. **8**(12).

20. Paradiso, F., et al., *Marine Collagen Substrates for 2D and 3D Ovarian Cancer Cell Systems*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019. **7**.
21. Nunes, A.S., et al., *3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs*. *Biotechnol Bioeng*, 2019. **116**(1): p. 206-226.
22. Hedegaard, C.L., et al., *Peptide-protein coassembling matrices as a biomimetic 3D model of ovarian cancer*. *Sci Adv*, 2020. **6**(40).
23. Moon, S., et al., *A Marine Collagen-Based Biomimetic Hydrogel Recapitulates Cancer Stem Cell Niche and Enhances Progression and Chemoresistance in Human Ovarian Cancer*. *Mar Drugs*, 2020. **18**(10).
24. Liu, M., et al., *Collagen-based three-dimensional culture microenvironment promotes epithelial to mesenchymal transition and drug resistance of human ovarian cancer in vitro*. *Rsc Advances*, 2018. **8**(16): p. 8910-8919.
25. Dadgar, N., et al., *A microfluidic platform for cultivating ovarian cancer spheroids and testing their responses to chemotherapies*. *Microsystems & Nanoengineering*, 2020. **6**(1): p. 12.
26. Zhou, N.Z., et al., *Expansion of Ovarian Cancer Stem-like Cells in Poly(ethylene glycol)-Cross-Linked Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid) and Alginate Double-Network Hydrogels*. *Acs Biomaterials Science & Engineering*, 2020. **6**(6): p. 3310-3326.
27. Brooks, E.A., et al., *An omentum-inspired 3D PEG hydrogel for identifying ECM-drivers of drug resistant ovarian cancer*. *APL Bioeng*, 2019. **3**(2): p. 026106.
28. Lee, J.M., et al., *Generation of uniform-sized multicellular tumor spheroids using hydrogel microwells for advanced drug screening*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 17145.
29. Granchi, C., et al., *Design, synthesis and biological evaluation of second-generation benzoylpiperidine derivatives as reversible monoacylglycerol lipase (MAGL) inhibitors*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021. **209**.
30. Wiwatpanit, T., et al., *Scaffold-Free Endometrial Organoids Respond to Excess Androgens Associated With Polycystic Ovarian Syndrome*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020. **105**(3).
31. Chen, H., et al., *Short-term organoid culture for drug sensitivity testing of high-grade serous carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2020. **157**(3): p. 783-792.
32. Chang, Y.H., T.Y. Chu, and D.C. Ding, *Human fallopian tube epithelial cells exhibit stemness features, self-renewal capacity, and Wnt-related organoid formation*. *J Biomed Sci*, 2020. **27**(1): p. 32.
33. Yucer, N., et al., *Directed Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Fallopian Tube Epithelium*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 10741.
34. de Witte, C.J., et al., *Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids Mimic Clinical Response and Exhibit Heterogeneous Inter- and Intrapatient Drug Responses*. *Cell Rep*, 2020. **31**(11): p. 107762.
35. Liu, L., et al., *Patient-derived organoid (PDO) platforms to facilitate clinical decision making*. *J Transl Med*, 2021. **19**(1): p. 40.
36. Löhmußaar, K., et al., *Assessing the origin of high-grade serous ovarian cancer using CRISPR-modification of mouse organoids*. *Nature Communications*, 2020. **11**(1).
37. Hoffmann, K., et al., *Stable expansion of high-grade serous ovarian cancer organoids requires a low-Wnt environment*. *EMBO J*, 2020. **39**(6): p. e104013.
38. Tamura, H., et al., *Evaluation of anticancer agents using patient-derived tumor organoids characteristically similar to source tissues*. *Oncology Reports*, 2018.
39. Nanki, Y., et al., *Patient-derived ovarian cancer organoids capture the genomic profiles of primary tumours applicable for drug sensitivity and resistance testing*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 12581.
40. Cochrane, D.R., et al., *Single cell transcriptomes of normal endometrial derived organoids uncover novel cell type markers and cryptic differentiation of primary tumours*. *J Pathol*, 2020. **252**(2): p. 201-214.

41. Ramamoorthy, P., et al., *Metastatic Tumor-in-a-Dish, a Novel Multicellular Organoid to Study Lung Colonization and Predict Therapeutic Response*. *Cancer Res*, 2019. **79**(7): p. 1681-1695.
42. Maru, Y., et al., *Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors*. *Gynecol Oncol*, 2019. **154**(1): p. 189-198.
43. Phan, N., et al., *A simple high-throughput approach identifies actionable drug sensitivities in patient-derived tumor organoids*. *Commun Biol*, 2019. **2**: p. 78.
44. Ueda, T., et al., *Non-clinical efficacy, safety and stable clinical cell processing of induced pluripotent stem cell-derived anti-glypican-3 chimeric antigen receptor-expressing natural killer/innate lymphoid cells*. *Cancer Sci*, 2020. **111**(5): p. 1478-1490.
45. Levy, K., et al., *Abdominal FLASH irradiation reduces radiation-induced gastrointestinal toxicity for the treatment of ovarian cancer in mice*. *Scientific Reports*, 2020. **10**(1).
46. Alvero, A.B., et al., *Novel approach for the detection of intraperitoneal micrometastasis using an ovarian cancer mouse model*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 40989.
47. Winship, A.L., et al., *The PARP inhibitor, olaparib, depletes the ovarian reserve in mice: implications for fertility preservation*. *Hum Reprod*, 2020. **35**(8): p. 1864-1874.
48. Staicu, C.E., et al., *Role of microRNAs as Clinical Cancer Biomarkers for Ovarian Cancer: A Short Overview*. *Cells*, 2020. **9**(1).
49. Rezniczek, G.A., et al., *Establishment of a Mouse Ovarian Cancer and Peritoneal Metastasis Model to Study Intraperitoneal Chemotherapy*. *Cancers*, 2020. **12**(12).
50. Ingram, S.N., et al., *A low-cost, novel endoscopic repeated-access port for small animal research*. *MethodsX*, 2020. **7**: p. 101049.
51. Onaciu, A., et al., *Spontaneous and Induced Animal Models for Cancer Research*. *Diagnostics*, 2020. **10**(9).
52. Li, Y., et al., *Molecular imaging-monitored radiofrequency hyperthermia-enhanced intratumoral herpes simplex virus-thymidine kinase gene therapy for rat orthotopic ovarian cancer*. *Int J Hyperthermia*, 2020. **37**(1): p. 101-109.
53. Jiang, W.X., et al., *The Application of Patient-Derived Xenograft Models in Gynecologic Cancers*. *Journal of Cancer*, 2020. **11**(18): p. 5478-5489.
54. Noh, J.J., et al., *Anti-Cancer Activity of As4O6 and its Efficacy in a Series of Patient-Derived Xenografts for Human Cervical Cancer*. *Pharmaceutics*, 2020. **12**(10).
55. Odunsi, A., et al., *Fidelity of human ovarian cancer patient-derived xenografts in a partially humanized mouse model for preclinical testing of immunotherapies*. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2020. **8**(2).
56. Borodovsky, A., et al., *Generation of stable PDX derived cell lines using conditional reprogramming*. *Mol Cancer*, 2017. **16**(1): p. 177.
57. He, M., et al., *Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  directly promotes BCRP expression and mediates the resistance of ovarian cancer stem cells to adriamycin*. *Mol Oncol*, 2019. **13**(2): p. 403-421.
58. Shuford, S., et al., *Prospective Validation of an Ex Vivo, Patient-Derived 3D Spheroid Model for Response Predictions in Newly Diagnosed Ovarian Cancer*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 11153.
59. Jeppesen, M., et al., *Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine*. *PLoS One*, 2017. **12**(9): p. e0183074.
60. Rios De La Rosa, J.M., et al., *Microfluidic-assisted preparation of RGD-decorated nanoparticles: exploring integrin-facilitated uptake in cancer cell lines*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 14505.
61. Mai, N.X.D., et al., *Biodegradable Periodic Mesoporous Organosilica (BPMO) Loaded with Daunorubicin: A Promising Nanoparticle-Based Anticancer Drug*. *ChemMedChem*, 2020. **15**(7): p. 593-599.

62. Li, Y., et al., *Synthesis, Physicochemical Characterization, and Cytotoxicity Assessment of Rh Nanoparticles with Different Morphologies-as Potential XFCT Nanoprobos*. *Nanomaterials* (Basel), 2020. **10**(11).
63. Yue, X.S., et al., *Quantitative Proteomic and Phosphoproteomic Comparison of 2D and 3D Colon Cancer Cell Culture Models*. *Journal of Proteome Research*, 2016. **15**(12): p. 4265-4276.
64. Worzfeld, T., et al., *Proteotranscriptomics Reveal Signaling Networks in the Ovarian Cancer Microenvironment*. *Mol Cell Proteomics*, 2018. **17**(2): p. 270-289.
65. Hamester, F., et al., *Prognostic relevance of the Golgi mannosidase MAN1A1 in ovarian cancer: impact of N-glycosylation on tumour cell aggregation*. *Br J Cancer*, 2019. **121**(11): p. 944-953.
66. Kim, S., et al., *Evaluating Tumor Evolution via Genomic Profiling of Individual Tumor Spheroids in a Malignant Ascites*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 12724.
67. Gencoglu, M.F., et al., *Comparative Study of Multicellular Tumor Spheroid Formation Methods and Implications for Drug Screening*. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018. **4**(2): p. 410-420.
68. Kopper, O., et al., *An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity*. *Nature Medicine*, 2019. **25**(5): p. 838-849.
69. Heidari-Khoei, H., et al., *Organoid technology in female reproductive biomedicine*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2020. **18**(1): p. 19.
70. Liu, H.D., et al., *Organoid of ovarian cancer: genomic analysis and drug screening*. *Clin Transl Oncol*, 2020. **22**(8): p. 1240-1251.
71. Semertzidou, A., et al., *Organoid models in gynaecological oncology research*. *Cancer Treat Rev*, 2020. **90**: p. 102103.
72. Scattolin, T., et al., *Palladium(II)-eta(3)-Allyl Complexes Bearing N-Trifluoromethyl N-Heterocyclic Carbenes: A New Generation of Anticancer Agents that Restrain the Growth of High-Grade Serous Ovarian Cancer Tumoroids*. *Chemistry*, 2020. **26**(51): p. 11868-11876.
73. Bepalov, V.G., et al., *Comparative efficacy evaluation of catheter intraperitoneal chemotherapy, normothermic and hyperthermic chemoperfusion in a rat model of ascitic ovarian cancer*. *Int J Hyperthermia*, 2018. **34**(5): p. 545-550.
74. De Haven Brandon, A., et al., *Identification of ovarian high-grade serous carcinoma cell lines that show estrogen-sensitive growth as xenografts in immunocompromised mice*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 10799.
75. Chambers, L.M., et al., *Use of Transabdominal Ultrasound for the detection of intra-peritoneal tumor engraftment and growth in mouse xenografts of epithelial ovarian cancer*. *PLoS One*, 2020. **15**(4): p. e0228511.
76. Cybulska, P., et al., *A Genomically Characterized Collection of High-Grade Serous Ovarian Cancer Xenografts for Preclinical Testing*. *Am J Pathol*, 2018. **188**(5): p. 1120-1131.
77. Hyler, A.R., et al., *Fluid shear stress impacts ovarian cancer cell viability, subcellular organization, and promotes genomic instability*. *PLoS One*, 2018. **13**(3): p. e0194170.
78. Ip, C.K., et al., *Stemness and chemoresistance in epithelial ovarian carcinoma cells under shear stress*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 26788.
79. Gunay, G., et al., *The effects of size and shape of the ovarian cancer spheroids on the drug resistance and migration*. *Gynecol Oncol*, 2020. **159**(2): p. 563-572.
80. Song, H., et al., *Three-dimensional culture and clinical drug responses of a highly metastatic human ovarian cancer HO-8910PM cells in nanofibrous microenvironments of three hydrogel biomaterials*. *J Nanobiotechnology*, 2020. **18**(1): p. 90.