



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

**EFFECTO DEL CULTIVO 3D SOBRE LA RESISTENCIA
FARMACOLOGICA Y EL METABOLISMO EN LINEAS
CELULARES SENSIBLES Y RESISTENTES DE CANCER
DE OVARIO**

POR MILOVAN PAOLO ACEVEDO CATRIL

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de concepción para
optar al grado de Magister en Bioquímica clínica e Inmunología

Profesor Guía y Patrocinante

Felipe Andrés Zúñiga Arbalti
Departamento de Bioquímica clínica e inmunología.
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción.

Octubre, 2025
Concepción, Chile

Índice

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Contexto del cáncer de ovario	7
1.2. Diagnóstico del cáncer de ovario	11
1.3. Terapia en cáncer de ovario.....	14
1.6. Relación del metabolismo y el cáncer.....	21
1.7. Esferoides celulares como modelo de estudio en Cáncer de ovario	25
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	28
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	28
4. HIPOTESIS	29
5. OBJETIVO GENERAL	29
6. OBJETIVOS ESPECIFICOS	30
7. METODOLOGIA	31
7.1. Cultivo de líneas celulares tumorales.....	31
7.2. Generación de esferoides celulares de las líneas SKOV-3 y OVCAR-3.....	32
7.3. Efecto de agentes antineoplásicos sobre esferoides celulares de Cáncer de ovario SKOV-3 y OVCAR-3.	33
7.4. Medición de genes asociados a la vía glicolítica y lipídica por RT-qPCR en esferoides celulares generados de las líneas celulares OVCAR-3 y SKOV-3.	34
7.5. Depleción de Glutación	35
7.6. Análisis Estadístico	36
8. RESULTADOS	37
8.1. Generación de Esferoides de líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3.....	37
8.2. Efecto de Doxorrubicina en esferoides de líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3.....	43
8.3. Eficacia de Doxorrubicina para esferoides celulares y cultivos en monocapa.	48
8.4. Efecto de Cisplatino en esferoides de líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3.....	51
8.5. Eficacia de Cisplatino para esferoides celulares.....	56
8.6. Efecto de Carboplatino en esferoides de líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3.....	59
8.7. Eficacia de Carboplatino en esferoides.	64
8.8. Expresión génica de genes clave del metabolismo glucídico y lipídico en esferoides SKOV-3 y OVCAR-3.....	68

8.9.	Efecto de la depleción de glutatión sobre el crecimiento de esferoides celulares.	71
9.	DISCUSIÓN	83
10.	CONCLUSIÓN	75
11.	BIBLIOGRAFÍA	86
12.	ANEXO	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 8.1. <i>IC₅₀ Doxorrubicina esferoides OVCAR-3 y SKOV-3</i>	52
Tabla 8.2. <i>IC₅₀ Cisplatino esferoides OVCAR-3 y SKOV-3</i>	62
Tabla 8.3. <i>IC₅₀ Carboplatino esferoides SKOV-3 y OVCAR-3</i>	73

Índice de ilustraciones

Figura 1-1. Estadificación del cáncer de ovario	8
Figura 1-2. Mecanismos de quimiorresistencia intrínsecos y adquiridos en cancer de ovario.....	18
Figura 1-3. Sellos del cáncer actualizados	22
Figura 8.1-1. Esferoides línea celular SKOV-3.....	39
Figura 8.1-2. Time plot del crecimiento de esferoides SKOV-3	40
Figura 8.1-3. Esferoides línea celular OVCAR-3	41
Figura 8.1-4. Time plot del crecimiento de esferoides OVCAR-3	42
Figura 8.2-1. Esferoides línea celular SKOV-3 incubados con Doxorubicina	44
Figura 8.2-2. Esferoides línea celular OVCAR-3 incubados con Doxorubicina.....	46
Figura 8.2-3. Time plot del crecimiento de esferoides SKOV-3 y OVCAR-3 incubados con Doxorubicina.....	49
Figura 8.3-1. Curvas IC₅₀ para Docorrubicina en esferoides SKOV-3 y OVCAR-3.....	51
Figura 8.4-3. Esferoides línea Celular SKOV-3 incubados con Cisplatino.....	54
Figura 8.4-2. Esferoides línea Celular OVCAR-3 incubados con Cisplatino	56
Figura 8.4-3. Time plot del crecimiento de esferoides SKOV-3 y OVCAR-3 incubados con Cisplatino	59
Figura 8.5-1. Curvas IC₅₀ para Cisplatino en esferoides SKOV-3 y OVCAR-3.....	61
Figura 8.6-1. Esferoides línea celular SKOV-3 incubados con Carboplatino.....	64
Figura 8.6-2. Esferoides línea Celular OVCAR-3 incubados con Carboplatino	66
Figura 8.6-3. Time plot del crecimiento de esferoides SKOV-3 y OVCAR-3 incubados con Carboplatino.....	69
Figura 8.6-4. Curvas IC₅₀ para Carboplatino en esferoides SKOV-3 y OVCAR-3	72
Figura 8.8-1. Expresión de ARNm de GLUT-1, HK2, PKM, LDHA, FASN, CD36, CPT1A y CPT1B en esferoides de líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3.....	76
Figura 8.9-1. Esferoides de línea celular SKOV-3 depletados de glutatión	78
Figura 8.9-2. Esferoides de línea celular OVCAR-3 depletados de glutatión.....	79
Figura 8.6-3. Time plot del crecimiento de esferoides SKOV-3 y OVCAR-3 en condiciones de depleción de glutatión	80

RESUMEN

El cáncer de ovario es una de las neoplasias ginecológicas más letales debido a su diagnóstico tardío y alta resistencia a la quimioterapia. Frente a ello, los modelos tridimensionales (3D) han surgido como una alternativa más representativa del microambiente tumoral en comparación con los cultivos bidimensionales tradicionales.

Este estudio evaluó el efecto del cultivo 3D, mediante la formación de esferoides celulares, sobre la resistencia farmacológica y el metabolismo en líneas de cáncer de ovario sensibles (OVCAR-3) y resistentes (SKOV-3). Los esferoides obtenidos mostraron una menor sensibilidad frente a los agentes antineoplásicos cisplatino, carboplatino y doxorubicina, evidenciando un aumento de la resistencia en el modelo tridimensional.

A nivel molecular, se observó una sobreexpresión de genes asociados al metabolismo glucolítico en OVCAR-3 y del metabolismo lipídico en SKOV-3, sugiriendo una reprogramación metabólica asociada a la resistencia.

En conjunto, estos resultados confirman que los modelos tridimensionales reproducen de mejor manera las condiciones fisiológicas del tumor y representan una herramienta más adecuada para el estudio de la quimiorresistencia y del metabolismo tumoral en cáncer de ovario.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contexto del cancer de ovario

Hoy en día, el cáncer se posiciona como uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial, siendo esta enfermedad una de las principales causas de muerte, donde, según reportes de la Organización Mundial de la Salud, puede llegar a tomar la primera o segunda posición como causa de muerte antes de los 70 años (WHO 2020). Es más, se estima que para el año 2040 se observe un aumento del 47% de casos respecto a lo registrado en el año 2020, donde los países más afectados son aquellos en vías de desarrollo (Sung H, et al. 2021), no quedando Chile exento de esto. Según una proyección realizada por el Ministerio de Salud, el cáncer tomará la primera posición como causa de muerte en un periodo no mayor a 10 años (MINSAL 2018).

El cáncer corresponde a una patología oncológica caracterizada por un crecimiento descontrolado y anormal de las células en cualquier zona del organismo, un reconocimiento aberrante por parte del sistema inmunológico y, en etapas más avanzadas de la enfermedad, la capacidad de invasión y metástasis, entre otras características (Yin, Wang et al. 2021).

Con relación al cáncer de ovario, esta patología se categoriza como la neoplasia maligna más agresiva y letal dentro de los cánceres gineco-obstétricos (Stewart et

al.,Cáncer de ovario, esta patología se categoriza como la neoplasia maligna más agresiva y letal dentro de los canceres gineco obstétricos (Stewart, et al. 2019). Aunque comúnmente se da una mayor cobertura al cáncer de mama, el cáncer de ovario es 3 veces más letal, teniendo el peor pronóstico y la tasa de mortalidad más alta de los canceres femeninos del aparato reproductor (Bray, et al. 2018).

Si bien en un inicio esta patología afecta como su nombre lo indica a los ovarios, este no se limita a dichos órganos y según sea su estadificación este puede comprometer estructuras adyacentes como las trompas de Falopio, útero, colon y en etapas más avanzadas afectar a ganglios linfáticos, de los cuales se vale para diseminarse a órganos distantes como hígado o pulmón. (Olsen, et al. 2018). Las características para cada estadio del cáncer pueden ser observadas en la Figura 1-

1.



Figura 1-1. Estadificación del cancer de ovario: (American Society of Clinical Oncology, 2017).

Según sea el tejido en el cual se origina este cáncer, puede ser descrito de 3 formas: como un carcinoma de origen epitelial, carcinoma estromal o un carcinoma de células germinales. Aquí se destaca particularmente el carcinoma epitelial que se caracteriza por tener dos presentaciones, una de lento crecimiento y desarrollo que se limita principalmente a los ovarios y otra que presenta un crecimiento exacerbado e invasivo. Este cáncer de tipo epitelial corresponde al 90% de todos los casos diagnosticados de cáncer de ovario. (Kroeger & Drapkin, 2017).

Respecto a su prevalencia, existe una diversidad poblacional mostrando una mayor tasa en mujeres blancas no hispanas e hispanas seguido de mujeres de raza negra y asiáticas con una incidencia de entre 9.2 a 12.0 por 100.000 personas (Torre, et al. 2018).

En el contexto nacional, existe un alza gradual tanto para la incidencia como también para la mortalidad. Según datos de GLOBOCAN, al año 2020, (Sung, et al. 2021) se diagnosticaron anualmente más de 800 casos nuevos y son alrededor de 500 personas que pierden la vida por esta enfermedad. Por otro lado, analizando la situación por región, la mayor tasa de casos se concentra principalmente en 5 regiones del país, posicionándose en primer lugar Magallanes con 12,2 por cada 100.000 mujeres, en segundo lugar, la región del Biobío con 8.1 por cada 100.000 mujeres, luego la región de Tarapacá con 7,4 por cada 100.000 mujeres, seguido por la región de Los Lagos con 7,3 por cada 100.000 mujeres y finalmente por la región de Los Ríos con 7.2 por cada 100.000 mujeres. (MINSAL, 2019)

Dentro de las características de esta patología se encuentra su sintomatología silente, lo que ocasiona que la mayoría de los diagnósticos sean realizados en etapas avanzadas de la enfermedad. (Lheureux, 2019). Presenta una tasa de supervivencia a 5 años del 26 al 42% dependiendo de lo temprano que se logre hacer el diagnóstico. Sin embargo, el 40% de las pacientes diagnosticadas en etapas III o IV mueren al año y un 25% dentro de los primeros 90 días post diagnóstico. (Bray, et al. 2018).

1.2. Diagnóstico del cáncer de ovario

Debido al carácter silente de esta enfermedad, el abordaje diagnóstico suele ser altamente complejo y cuyas posibilidades de supervivencia dependen directamente de que pueda realizarse un diagnóstico temprano, el cual muchas veces se ve imposibilitado debido a la falta de biomarcadores de detección temprana. (Bonifácio V. 2020).

Según se puede encontrar en la literatura, la mayoría de los casos de cáncer de ovario son diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad, correspondiendo a los estadios III y IV, siendo un 34% de los diagnósticos en la etapa III y un 26% en la etapa IV (Paik et al. , 2015).

Clásicamente se ha utilizado el antígeno CA125 como un marcador tumoral en cáncer de ovario el cual corresponde a una glicoproteína secretada al torrente sanguíneo que se encuentra sobreexpresada en cáncer. Se considera que cuando los niveles séricos son mayores a 35 U/mL existe un alto riesgo de cursar con la patología (Zhang, et al. 2022). Sin embargo, actualmente este marcador no se recomienda para la detección temprana de cáncer de ovario debido a las altas probabilidades tanto de falsos positivos como negativos. (Slatnik, et al. 2015).

Actualmente se investigan nuevas estrategias y biomarcadores para realizar una pesquisa temprana, como es el caso de la proteína 4 de epidídimo humano (HE4) que en conjunto con el CA-125, alimenta un algoritmo de riesgo de malignidad

ovárica (ROMA) en combinación con otros antecedentes clínicos para predecir un alto o bajo riesgo de malignidad. (Dochez, et al. 2019)

Estudios preliminares muestran que este abordaje enfocado en el biomarcador (HE4) presenta mayor sensibilidad que el CA-125 y además se encuentra presente en todos los subtipos de cáncer ovárico. Además, al igual que CA-125 es secretada a la sangre por lo que puede ser detectada en suero (Anastasi, et al. 2023).

Existen, por otro lado, marcadores moleculares que tienen una directa relación con una predisposición genética para la patología, por ejemplo, se encuentran las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. Si bien comúnmente las mutaciones asociadas a estos genes se relacionan principalmente con el cáncer de mama, aumentan significativamente el riesgo de desarrollar cáncer de ovario. Mujeres con mutaciones en BRCA1 tienen un riesgo del 40% de desarrollar cáncer de ovario, mientras que para BRCA2 un 18% (Llort, et al. 2015). Entre el 13 y 21% de las pacientes presentan mutaciones en línea germinal y otro 6% con mutaciones somáticas, es así como la sociedad estadounidense de oncología clínica recomienda que todas las pacientes con diagnóstico confirmado de cáncer de ovario deben realizarse estudios moleculares para detectar mutaciones en BRCA1 y BRCA2 (Vergote, et al. 2022).

Para realizar un estudio confiable se opta por estudios imagenológicos como lo son la radiografía de tórax frontal y lateral, tomografía computarizada de tórax completo o de pelvis y también la ecografía abdominal y pélvicas, destacando particularmente la ecografía transvaginal que entrega información sobre el tamaño del tumor, su ubicación, y la complejidad tumoral. (MINSAL 2019)

Es justamente la ecografía transvaginal, la técnica predilecta para realizar un correcto y completo diagnóstico de cáncer de ovario. Dentro de las características que se investigan mediante esta técnica imagenológica, está la evaluación de la presencia de ascitis, proyecciones papilares, evaluación de ganglios linfáticos retroperitoneales o la irrigación de la zona. Por otro lado, esta herramienta se utiliza más allá que solo para el diagnóstico de las pacientes, sino que también es de vital importancia a la hora de monitorear y realizar un correcto seguimiento de la enfermedad.

La limitante de este estudio es el hecho de que no puede realizarse una correcta distinción entre masas cancerígenas de otras más ováricas como las que se presentan en el síndrome de ovario poliquístico o quistes premenopáusicos por lo que un correcto diagnóstico requiere de un abordaje multidisciplinario donde se considere por ejemplo biomarcadores en sangre o pruebas genéticas (Kaijser, et al 2018).

1.3. Terapia en cáncer de ovario

En primera instancia, el abordaje estándar en el tratamiento del cáncer de ovario es la intervención quirúrgica; esta cirugía busca realizar una citorreducción de tal manera que pueda ser removido lo máximo posible de la masa tumoral. A continuación de esto se procede a administrar a las pacientes quimioterapia adjuvante basada en un esquema principalmente a base de fármacos agentes del platino. (de Jong, et al. 2023)

Dentro de los fármacos a base de platino más conocidos se encuentra el cisplatino, este agente quimioterapéutico actúa uniéndose al DNA interfiriendo con la replicación e inhibiendo así la división celular y por tanto induciendo muerte celular. (Damia & Broggini, 2019) .

Específicamente el cisplatino ingresa a la célula tumoral mediante difusión pasiva, aunque también puede hacerlo mediante el empleo de los transportadores de cobre 1 o 2 (CTR1 o CTR2). Cuando el cisplatino reacciona uniéndose covalentemente a las hebras de DNA, interfiere con la separación y el desenrollamiento de las cadenas, lo que genera un arresto en el ciclo celular y, como consecuencia, la muerte de la célula. Por otro lado, el cisplatino está involucrado en el estrés oxidativo de las células, por tanto, también contribuye de esta manera a la inducción de la apoptosis (Fuertes et al., 2003).

Si bien una alta cantidad de pacientes presenta una buena respuesta a los esquemas basados fármacos de platino, es común que un número no menor, específicamente un 62% de las pacientes presente una recaída de la enfermedad. Por su parte un 25% de quienes son diagnosticadas con cáncer de ovario, presenta una resistencia primaria lo que significa que no hay una respuesta inicial a los fármacos del platino. Para determinar si un paciente es sensible o resistente al tratamiento, se considera la respuesta inicial a la quimioterapia, considerándose que un paciente es resistente si sufre una recaída dentro de los 6 meses de administrado el tratamiento y que es sensible si su recaída ocurre dentro de 6 o más meses desde la quimioterapia (Le Saux, 2021).

En aquellos casos en que el equipo clínico se encuentra con pacientes resistentes al tratamiento, se debe recurrir al uso de una terapia de segunda línea que tiene un objetivo paliativo más que curativo. Aquí, se encuentran fármacos como la Doxorrubicina la cual es un agente antineoplásico ampliamente utilizado en diversos tipos de cáncer. La doxorrubicina corresponde a un antibiótico antraciclina con actividad antitumoral y citotóxica que actúa intercalando el ADN, inhibiendo la topoisomerasa e induciendo la producción de ROS (Thorn et al. 2011). Además, frente a la exposición a la doxorrubicina, se ha observado que aumentan también los niveles intracelulares de glutatión como una respuesta de protección celular (Kim et al. 2019).

En el caso de Chile, los lineamientos que entrega el ministerio de salud siguen la misma dinámica que se encuentra en la literatura. De acuerdo con las guías clínicas del ministerio de salud, el tratamiento del cáncer de ovario en estadios iniciales es

preferentemente la cirugía cito reductora teniendo en cuenta la edad de la paciente para abordar de manera conservadora si se encuentra en edad fértil. En estadios avanzados se debe considerar un enfoque más radical pudiendo alcanzar hasta una histerectomía completa con remoción de tejido linfático y estructuras anexas como el omento, peritoneo o resecciones intestinales (MINSAL 2019).

Con respecto a la quimioterapia, esta debe ser determinada por el médico oncólogo en base a análisis de laboratorio y estudios de anatomía patológica. Esta puede ser administrada en cualquiera de las estadificaciones, salvo en etapas I y II que posean estadificación quirúrgica. En general, se recomienda terapia combinada tanto por vía intravenosa como por vía intraperitoneal, según determine el equipo clínico. Por otro lado, también se reporta que la administración conjunta de carboplatino más paclitaxel presenta una mejor respuesta que administrando carboplatino como monoterapia, esto dado que el paclitaxel junto al carboplatino actúan de manera complementaria, el primero a nivel de los microtúbulos en la mitosis y el segundo a nivel de ADN. Para estadios avanzados de la enfermedad, el esquema de tratamiento puede tener tanto un enfoque adjuvante como un neo-adjuvante utilizando una combinación de paclitaxel con carboplatino, carboplatino con gemcitabina o carboplatino con doxorubicina. En caso de que las pacientes sean consideradas resistentes al tratamiento, se debe evaluar por parte del comité oncológico la utilización de terapias paliativas o la utilización de monoterapia de topotecan, gemcitabina, doxorubicina liposomal, paclitaxel semanal, teniendo en consideración siempre la toxicidad del tratamiento, la respuesta a este y la calidad de sobrevivida. (MINSAL 2019)

1.4. Quimiorresistencia en Cáncer de Ovario

Una característica muy importante del cáncer de ovario es su elevada quimiorresistencia, aun cuando un elevado porcentaje de pacientes logra alcanzar la remisión. En la literatura, podemos encontrar que en 80% de las pacientes que alcanzan la remisión en estadios avanzados de la enfermedad experimentan una recaída que es explicada por el fenómeno de la quimiorresistencia.

La resistencia viene dada por una variedad de situaciones multifactoriales como lo son alteraciones genéticas, tanto desde una perspectiva de mutaciones como también a través de una regulación epigenética, así como también alteraciones por parte del sistema inmune.

Uno de los mecanismos más estudiados sobre la resistencia a la quimioterapia a base de platino son las alteraciones en el transporte del fármaco, de esta forma lo que falla aquí es la vía por la cual la célula tumoral capta y expulsa el fármaco. Así una posible opción es una baja en la expresión de transportadores que capten el compuesto lo que se traduce en una baja o nula concentración intracelular de la droga.

Por otro lado, hay una sobreexpresión de transportadores de multirresistencia a drogas, de modo que el fármaco está siendo sacado constantemente al medio extracelular. Muchas de las células resistentes a la quimioterapia también muestran mayores capacidades de reparación de ADN; esto ha sido evidenciado en estudios que muestran un aumento en la expresión de genes asociados a la reparación de

ADN, como, por ejemplo, MSH1 y MSH2. También las células cancerígenas activan mecanismos de regulación epigenéticas de tal manera que aumentan la expresión de DNA metiltransferasas generándose una hipermetilación en zonas del DNA relacionadas a muerte celular y represión de la proliferación o también una hipermetilación en zonas promitóticas (Havasi, 2023). En la Figura 1-2 se presentan algunos de los mecanismos de resistencia a drogas en cáncer de ovario que han sido descritos.

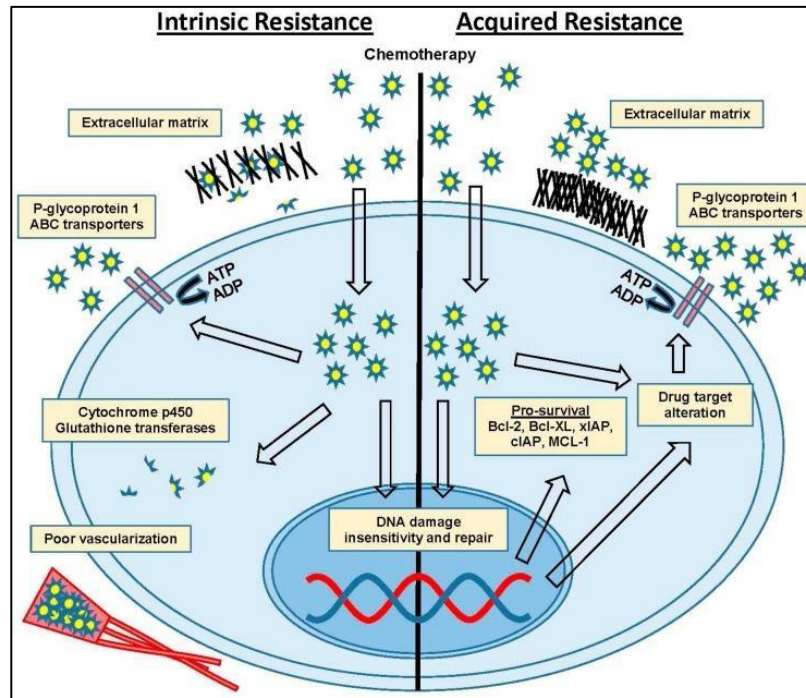


Figura 1-2. Mecanismos de quimiorresistencia intrínsecos y adquiridos en cáncer de ovario: Fuente: (Cornelison et al. 2017) Emerging Therapeutics to Overcome Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer: A Mini-Review.

Por su parte en el caso de la doxorubicina, un estudio metabolómico recientemente realizado en nuestro laboratorio, utilizando líneas celulares de cáncer de ovario, investigo el papel del glutatión y del metabolismo lipídico como factores clave en la resistencia a este fármaco. En células resistentes a dicho fármaco encontraron una regulación al alza de glutatión y metabolitos lipídicos. Cuando se realizó la depleción de glutatión se indujo un cambio en la sensibilidad a los fármacos mostrando un cambio de respuesta citostática a citotóxica. De esta forma los autores plantean al glutatión como uno de los mecanismos que adquiere la célula cancerígena para la resistencia a Doxorubicina, además de sugerirlo como un posible blanco farmacológico (Alarcón-zapata et al. 2023).

1.5. Cáncer de ovario y líquido ascítico

El líquido ascítico es un líquido seroso, de color claro semi transparente, que se acumula en la cavidad abdominal, entre las capas del peritoneo, es decir el espacio que reviste al abdomen y los órganos internos (Rakina, et al 2022).

En el caso del cáncer de ovario, la acumulación de líquido ascítico ocurre en etapas avanzadas de la enfermedad y es denominado como ascitis maligna y además de componerse por sustancias como agua, glucosa, electrolitos o proteínas contiene células cancerosas, lípidos y moléculas de señalización que crean un microambiente que favorece la supervivencia, proliferación, e invasión y metástasis de las células tumorales (Ford, et al.2020). Esto ocurre debido a la obstrucción de los vasos linfáticos por células tumorales y a alteraciones en la permeabilidad capilar que conllevan a alteraciones del equilibrio de la presión hidrostática y oncótica lo que se traduce en una mayor filtración de líquido hacia la cavidad abdominal (Du, et al. 2023).

Dado que el líquido ascítico actúa como un microambiente propicio para la supervivencia y proliferación de células tumorales, las cuales pueden agregarse para formar esferoides tridimensionales que actúan como precursores clave de las metástasis (Uno et al., 2022). Estos esferoides derivados de la ascitis maligna facilitan la diseminación, adhiriéndose al mesotelio peritoneal, lo que conlleva la metástasis intraperitoneal y pélvica, lo cual corresponde a la principal causa de mortalidad en cáncer de ovario y, por tanto, a la resistencia al tratamiento (Tadić et al., 2024).

1.6. Relación del metabolismo y el cáncer.

En el caso particular del cáncer de ovario, recientemente nuestro laboratorio ha observado, mediante análisis metabolómicos en líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3, modelos representativos de células resistentes y sensibles a agentes antineoplásicos respectivamente, que las células sensibles presentan un enriquecimiento de metabolitos de origen glucídico, mientras que las resistentes muestran una predominancia de metabolitos lipídicos. Además, se identificó al glutatión como un actor clave en los mecanismos de resistencia, ya que su depleción permitió cambiar un fenotipo resistente por uno sensible. Estos hallazgos demuestran que la resistencia terapéutica está directamente relacionada con adaptaciones metabólicas hacia un metabolismo lipídico (Alarcón-Zapata, 2023).

El metabolismo y sus alteraciones en el cáncer han sido reconocidos desde hace muchos años. Las células cancerígenas, en su afán por sobrevivir y proliferar, reprograman sus procesos metabólicos normales para adquirir características que potencien su malignidad, incluyendo una mayor capacidad invasiva. Este fenómeno, conocido como reprogramación metabólica, es considerado uno de los "hallmarks" del cáncer, tal como se muestra en la Figura 1-3 (Hanahan & Weinberg, 2011).



Figura 1-3. Sellos del cáncer actualizados. Modificado de: Hanahan, D., & Weinberg, R., *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*.

Uno de los ejemplos más conocidos de esta reprogramación es el efecto Warburg, descrito por Otto Warburg, quien observó que las células tumorales utilizan preferentemente la glucólisis para obtener energía, produciendo lactato incluso en presencia de oxígeno (Liberti & Locasale, 2016). Aunque la glucólisis es menos eficiente energéticamente que la fosforilación oxidativa, las células cancerígenas la prefieren porque les permite obtener intermediarios metabólicos fundamentales para la proliferación celular, como ribosa, aminoácidos y nucleótidos (Icard et al., 2018).

Para favorecer la glucólisis, las células tumorales pueden sobre expresar transportadores como GLUT-1, y aumentar la expresión de enzimas clave como la hexoquinasa 2 (HK2), lactato deshidrogenasa (LDHA) y piruvato quinasa tipo M (PKM). Esta situación ha sido particularmente observada en el cáncer de ovario, donde la literatura reporta un aumento en la expresión de GLUT-1, HK2, LDHA y PKM (Xintaropoulou et al., 2018).

Otro factor importante en la desregulación metabólica es la disponibilidad de nutrientes. Los tumores presentan gradientes de oxígeno, pH y nutrientes que disminuyen desde la periferia hacia el interior. Esto, sumado a la alta tasa de proliferación celular, obliga a las células cancerosas a activar vías metabólicas alternativas, como las asociadas al metabolismo de lípidos. Los lípidos no solo aportan energía, sino que también participan en la formación de membranas celulares y en procesos de señalización celular (Kroemer & Pouyssegur, 2008).

En este contexto, las células tumorales pueden aumentar procesos como la síntesis de novo de ácidos grasos, su captación o su oxidación (Broadfield et al., 2021). Esta desregulación no solo impacta la proliferación, sino también la interacción con el microambiente tumoral. Algunas moléculas lipídicas, como la prostaglandina E2 y el ácido lisofosfatídico (LPA), están involucradas en la progresión tumoral y la resistencia a fármacos (Chiurchiù et al., 2018). Además, estas alteraciones afectan la angiogénesis, la actividad de fibroblastos, células inmunes, y pueden inducir lipólisis en adipocitos cercanos (Broadfield et al., 2021). Así, diversas proteínas y enzimas han sido identificadas con un rol alterado en este contexto: CD36 en la

captación de ácidos grasos (Guillaumond et al., 2015), CPT1A y CPT1B en la oxidación (Liu et al., 2016), y FASN en la síntesis de novo (Du et al., 2022).

A pesar de los numerosos hallazgos que destacan al metabolismo como un eje clave en la investigación del cáncer, una de las principales limitaciones es que la mayoría de los estudios han sido realizados en cultivos celulares en monocapa, los cuales no representan de manera fiel las condiciones *in vivo* y por tanto, es necesario escalar hacia modelos más complejos que permitan obtener resultados más representativos de lo que realmente ocurre en pacientes.

1.7. Esferoides celulares como modelo de estudio en cáncer de ovario.

Históricamente, la mayoría de las investigaciones en cáncer se han basado en el uso de cultivos celulares bidimensionales (2D). A pesar de su amplia utilización, estos modelos presentan limitaciones importantes al no reproducir adecuadamente la complejidad del tumor *in vivo*. Su popularidad se debe principalmente a su facilidad de estandarización, reproducibilidad y rápida tasa de crecimiento. Sin embargo, tienden a perder parte de la heterogeneidad celular, ya que suelen derivarse de la expansión clonal de un único tipo celular, lo que reduce su capacidad para reproducir con fidelidad el comportamiento del tumor *in vivo* (Gillet et al., 2013). En contraposición, los modelos tridimensionales (3D), como los esferoides tumorales, han emergido como herramientas más representativas para el estudio de la biología del cáncer, ya que ofrecen una mejor simulación del microambiente tumoral y preservan interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular propias del tejido tumoral (Ro et al., 2022; Fantacuzzi et al., 2023).

Una de sus principales ventajas es la capacidad de generar gradientes de nutrientes, oxígeno y productos de desecho en su interior, formando zonas proliferativas externas, capas de células quiescentes y núcleos necróticos en el centro. Estos gradientes crean un microambiente protector para las células internas, resguardándolas parcialmente de la acción de fármacos, lo que refleja con mayor realismo la fisiología de los tumores sólidos (Fantacuzzi et al., 2023). Además, los esferoides de cáncer de ovario pueden obtenerse mediante técnicas *scaffold-free*,

como placas de baja adherencia (ultra-low attachment), gotas colgantes o levitación magnética, así como mediante métodos *scaffold-based* que emplean hidrogeles de matriz extracelular (Świerczewska et al., 2023). En líneas celulares de cáncer de ovario como SKOV-3 y OVCAR-3, la optimización de condiciones permite generar esferoides de carácter esférico con tamaños uniformes y, además, con formación de prolongaciones irregulares en sus superficies, con propiedades estructurales comparables a tumores primarios (Costa et al., 2016; Tofani et al., 2020).

Estos modelos 3D también han demostrado preservar múltiples características funcionales de los tumores sólidos. Se ha comprobado que mantienen patrones de expresión génica, señalización y secreción de mediadores solubles similares a los tejidos originales, reproduciendo de manera más fiel la arquitectura espacial y las respuestas fisiológicas del tumor (Costa et al., 2016). Asimismo, se ha observado que los esferoides conservan propiedades de células madre cancerosas, como alta autorrenovación y resistencia a antineoplásicos (Liao et al., 2014). En este sentido, Świerczewska et al. (2023) reportaron que tanto líneas celulares sensibles como resistentes al tratamiento mostraban menor sensibilidad a múltiples quimioterapéuticos en esferoides que en cultivos 2D, requiriendo concentraciones más altas. Estos hallazgos refuerzan su utilidad como modelos experimentales más realistas, capaces de reproducir mecanismos de resistencia tumoral como la barrera física, la heterogeneidad en el ciclo celular y los gradientes de penetración de fármacos (Świerczewska et al., 2023).

Este enfoque cobra especial relevancia en el contexto del cáncer de ovario avanzado, ya que como se ha mencionado anteriormente se ha documentado la formación natural de esferoides en el líquido ascítico de pacientes en estadios

tardíos de la enfermedad. Dichas estructuras participan en la diseminación tumoral intraperitoneal y pueden incluir células estromales e inmunes, lo que aumenta su capacidad de invasión y resistencia frente a modelos 2D más simples (Rakina et al., 2022; Fantacuzzi et al., 2023). Por lo tanto, el estudio de esferoides no solo representa una herramienta experimental *in vitro*, sino también un reflejo directo de procesos biológicos que ocurren *in vivo*, lo que potencia su valor como modelo fisiopatológico y de investigación preclínica.

En resumen, los esferoides celulares se han posicionado como una herramienta clave en la investigación oncológica, superando las limitaciones de los cultivos tradicionales y emergiendo como una alternativa viable para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas. Su capacidad para replicar el microambiente tumoral, incluyendo gradientes fisiológicos, expresión génica conservada y heterogeneidad celular, junto con su sensibilidad para detectar cambios morfológicos y funcionales, los convierte en una excelente metodología para estudiar procesos biológicos complejos como lo es la biología del cáncer. Además, el uso de esferoides permite reducir la dependencia del uso de animales en la investigación biomédica, alineándose con principios éticos de reemplazo en la experimentación científica (Costa et al., 2016; Świerczewska et al., 2023).

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La mayoría de los estudios sobre resistencia a quimioterapia en cáncer de ovario se han basado en cultivos bidimensionales (2D), los cuales no reproducen fielmente la complejidad del microambiente tumoral in vivo. Esta limitación ha impedido una comprensión completa de cómo el cambio a cultivos tridimensionales (3D), como los esferoides celulares, modula los mecanismos de resistencia farmacológica. En particular, en las líneas celulares OVCAR-3 y SKOV-3 se han reportado alteraciones metabólicas vinculadas a la resistencia, pero aún no se ha evaluado cómo estas adaptaciones varían bajo condiciones 3D. Esto restringe el entendimiento de los procesos moleculares involucrados en la quimiorresistencia.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo influye el cultivo tridimensional en esferoides sobre la expresión de genes clave del metabolismo glucídico y lipídico, como mecanismo de resistencia a la quimioterapia, en líneas celulares sensibles y resistentes de cáncer de ovario?

4. HIPOTESIS

La transición de cultivos en monocapa bidimensional a esferoides tridimensionales en las líneas celulares OVCAR-3 y SKOV-3 potencia las alteraciones cambiando la expresión de genes clave en el metabolismo glucídico y lipídico, respectivamente, asociándose con un aumento en la resistencia a agentes antineoplásicos.

5. OBJETIVO GENERAL

Analizar el impacto del cultivo tridimensional sobre genes clave del metabolismo glucídico y lipídico, y su relación con la resistencia a quimioterapia en esferoides de líneas celulares sensibles y resistentes de cáncer de ovario.

6. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Establecer un protocolo estandarizado para la generación de esferoides de líneas celulares de cáncer de ovario.
- 2) Evaluar la eficacia de doxorubicina, cisplatino y carboplatino en esferoides de cáncer de ovario en comparación con modelos 2D.
- 3) Analizar la expresión de genes clave implicados en el metabolismo glucídico y lipídico en cultivos 2D y 3D.
- 4) Explorar el efecto de la depleción de glutatión sobre la formación y el crecimiento de esferoides de líneas celulares OVCAR-3 y SKOV-3, como posible mecanismo de adaptación metabólica asociada a resistencia farmacológica.

7. METODOLOGIA

7.1. Cultivo de líneas celulares tumorales.

Se utilizaron las líneas celulares OVCAR-3 (células sensibles a quimioterapia HTB-161) y SKOV-3 (Células resistentes a quimioterapia HTB-77), ambas derivadas de adenocarcinoma de ovario humano. Las líneas celulares fueron cultivadas y mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con un 95% O₂ y 5% CO₂ y en medio RPMI (Corning) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 100 U/mL de la mezcla penicilina/estreptomicina.

La disposición de los residuos peligrosos se llevó a cabo de acuerdo con lo establecido por el plan de manejo de sustancias y residuos peligrosos (MATPEL) de la universidad de Concepción, como se ve descrito en el ANEXO: "Manejo de residuos".

7.2. Generación de esferoides celulares de las líneas SKOV-3 y OVCAR-3.

Para la generación de esferoides celulares, se utilizó el protocolo propuesto por Friedrich basado en el uso de placas de cultivo de ultra baja adhesión (Friedrich, et al. 2009). Se sembraron 2.000 células por pocillo en 100 μ L de medio por quintuplicado en una placa para esferoides de 96 pocillos de fondo redondo de ultrabaja adhesión de la empresa Corning, número de producto 4515. Para favorecer la formación del esferoide, la placa se centrifugo a 2000 rpm por 10 minutos en una centrifuga para placa Centurion Scientific K241 y se dejaron crecer por 4 días a 37°C con atmósfera húmeda con 95% O₂ y 5% CO₂.

Para el seguimiento y estudio de la cinética de crecimiento, se empleó un microscopio óptico NIKON modelo Eclipse E400 con una cámara NIKON DS FI3, acompañado del software de imagen Nis Elements que se configuró para detectar de forma semiautomatizada el área en μ m² del esferoide y obtener así registro por medio de fotografías. Los datos fueron recolectados tomando las fotografías a las 24, 48, 72 horas y 7 días después de la formación del esferoide (Friedrich et al., 2009).

7.3. Efecto de agentes antineoplásicos sobre esferoides celulares de Cáncer de ovario SKOV-3 y OVCAR-3.

Las células se sembraron en 100 μ L de medio por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo de ultrabaja adhesión que luego se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos. Los esferoides se dejaron crecer por 4 días a 37 °C con atmósfera húmeda con 95% O₂ y 5% CO₂.

A los cuatro días de formación del esferoide se agregaron las distintas concentraciones a investigar de doxorrubicina, cisplatino y carboplatino, realizando el experimento en quintuplicado. La Placa se mantuvo en cultivo por 7 días y la lectura del área se llevó a cabo en intervalos regulares, tomando registro fotográfico luego de incubar con los fármacos por 24 horas, 48 horas, 72 horas y 7 días. (Lazzari, et al. 2018).

7.4. Medición de genes asociados a la vía glicolítica y lipídica por RT-qPCR en esferoides celulares generados de las líneas celulares OVCAR-3 y SKOV-3.

Los esferoides generados a partir de las líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3 se cultivaron cuatro días luego de sembrar las células y luego se recuperaron en Trizol para la extracción de su ARN total.

El ARN total se extrajo a partir de 5 esferoides recolectados en 500 µL del reactivo TRIzol (Invitrogen) y el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de RT-qPCR se realizó en un solo paso, utilizando el reactivo TaqPart, CG de un paso (ThermoFisher) para sondas TaqMan y el equipo Applied Biosystem 7500 FAST Real Time PCR System con el protocolo de amplificación: 50°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos y alineamiento/extensión a 60°C por 30 segundos. Las sondas TaqMan prediseñadas para GLUT1 (Hs00892681_m1), HK2 (Hs00606086_m1), LDHA (Hs01378790_g1), PKM (Hs00987255_m1), (Hs00987255_m1) y vía ácidos grasos: FASN (Hs01005622_m1), CD36 (Hs00169627_m1), CPT1A (Hs00912671_m1), CPT1B (Hs00189258_m1) y RNaseP se adquirieron desde Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Inc.). La cuantificación relativa se normalizó a la expresión de RNase P utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Cada muestra se analizó por triplicado.

7.5. Depleción de Glutación

La depleción de glutación se realizó mediante el protocolo descrito por Mardones con algunas modificaciones (Mardones, et al. 2012). Para realizar la depleción, se cultivaron las células de las líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3 en monocapa y se incubaron con Butionina Sulfoximina (BSO), el cual inhibe a la enzima γ -glutamylcisteina sintasa, enzima limitante en la síntesis de glutación a una concentración de 1 mM por 24 horas. Luego de esto, se realizó una segunda incubación, esta vez con Maleato de Dietilo (DEM) el cual se une covalentemente al glutación consumiéndolo por 1 hora. Luego las células se lavaron dos veces con PBS 1X antes de tripsinizarlas para generar esferoides celulares. Una vez completado el protocolo de depleción, las células se utilizaron para la generación de esferoides celulares. Por otro lado, se generaron esferoides con células sin depletar como controles, haciéndoles seguimiento a las 24, 48, 72 horas y 7 días.

7.6. Análisis Estadístico

Los datos fueron procesados utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0 para Windows 11. Los resultados se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Los datos se reportaron como error estándar medio de a lo menos 3 determinaciones con su respectiva desviación estándar.

8. RESULTADOS

8.1. Generación de Esferoides de líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3.

En primera instancia, lo primero que se realizó fue determinar el número óptimo de células requeridas para generar esferoides de líneas celulares de cáncer de ovario, con el objetivo de realizar un seguimiento a su crecimiento mediante la medición de su área a lo largo del tiempo.

Para llevar a cabo esto, se sembraron distintos números de células pertenecientes a las 2 líneas celulares utilizadas en el laboratorio, SKOV-3 y OVCAR-3, y se generaron esferoides que fueron estudiados por un periodo de 7 días.

Se pudo observar que, independientemente de la línea celular utilizada, se evidenció crecimiento del tamaño del esferoide cuando se utilizaban densidades celulares de entre 1.000 y 5.000 células por pocillo. Durante los 7 días de estudio, se registraron aumentos en el tamaño del esferoide, determinados en base a su área, que en algunos casos dependiendo de la línea celular utilizada, logró aumentar más del doble de su tamaño inicial, sin embargo, cuando se utilizaron densidades celulares mayores a 5.000 células por pocillo no se logró observar crecimiento de los esferoides.

Los resultados de la generación de los esferoides se pueden ver de manera representativa en las figuras 8.1-1 y 8.1-3.

Para la observación gráfica de los registros representados en las figuras 8.1-1 y 8.1-3; se tomaron los datos de las distintas mediciones que se realizaron en quintuplicado y se confeccionaron los distintos gráficos del tipo “*Time plot*” donde se puede observar el crecimiento de los esferoides de las distintas líneas celulares a través de los días de cultivo. Esto se observa en las figuras 8.1-2 y 8.1-4.

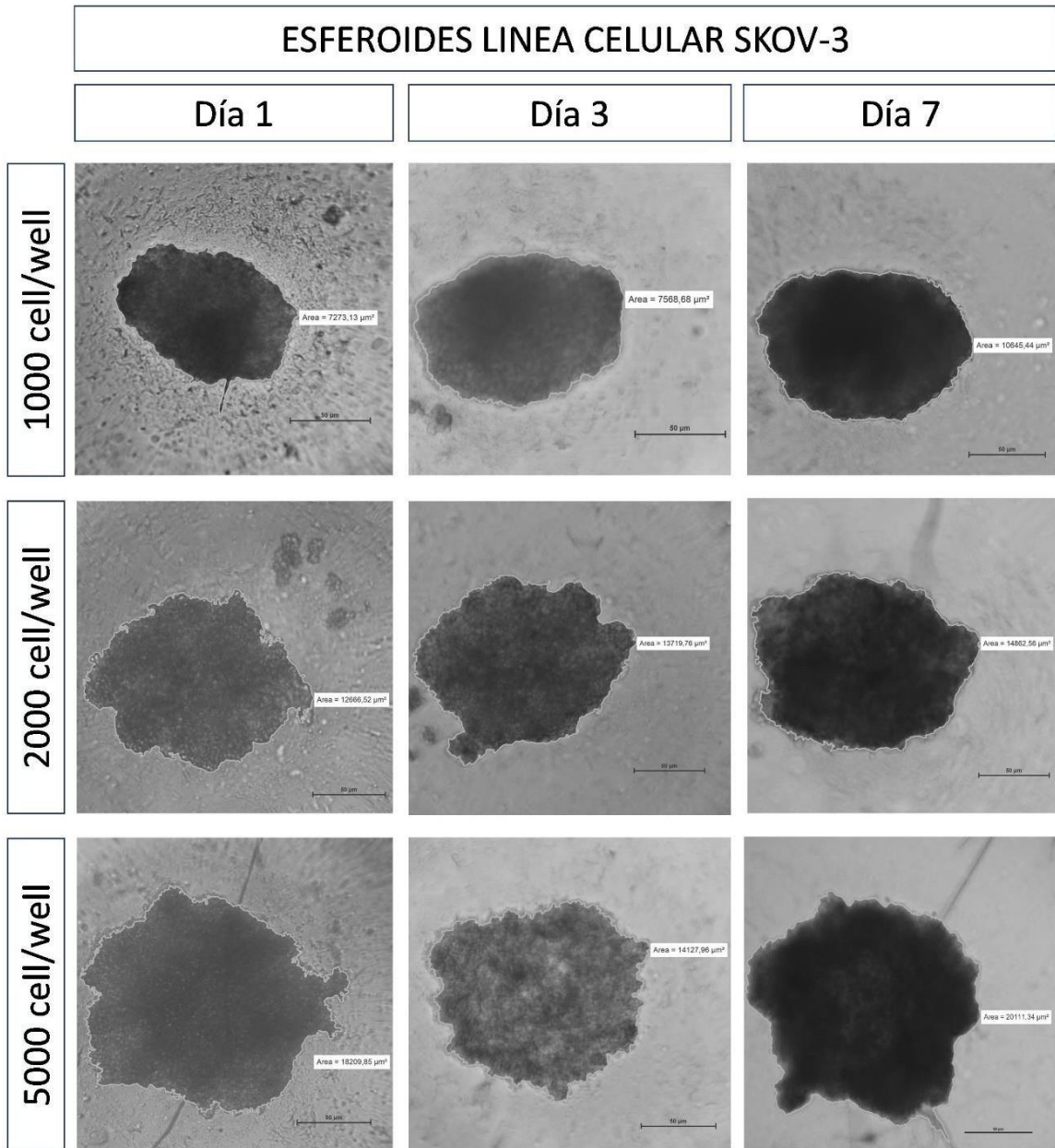


Figura 8.1-1. Esferoides de línea celular SKOV-3. Imágenes representativas por microscopía de contraste de fases usando el sistema de detección semiautomatizada de NIS-Elements© para determinar el crecimiento de esferoides de la línea celular SKOV-3. Fuente: elaboración propia.

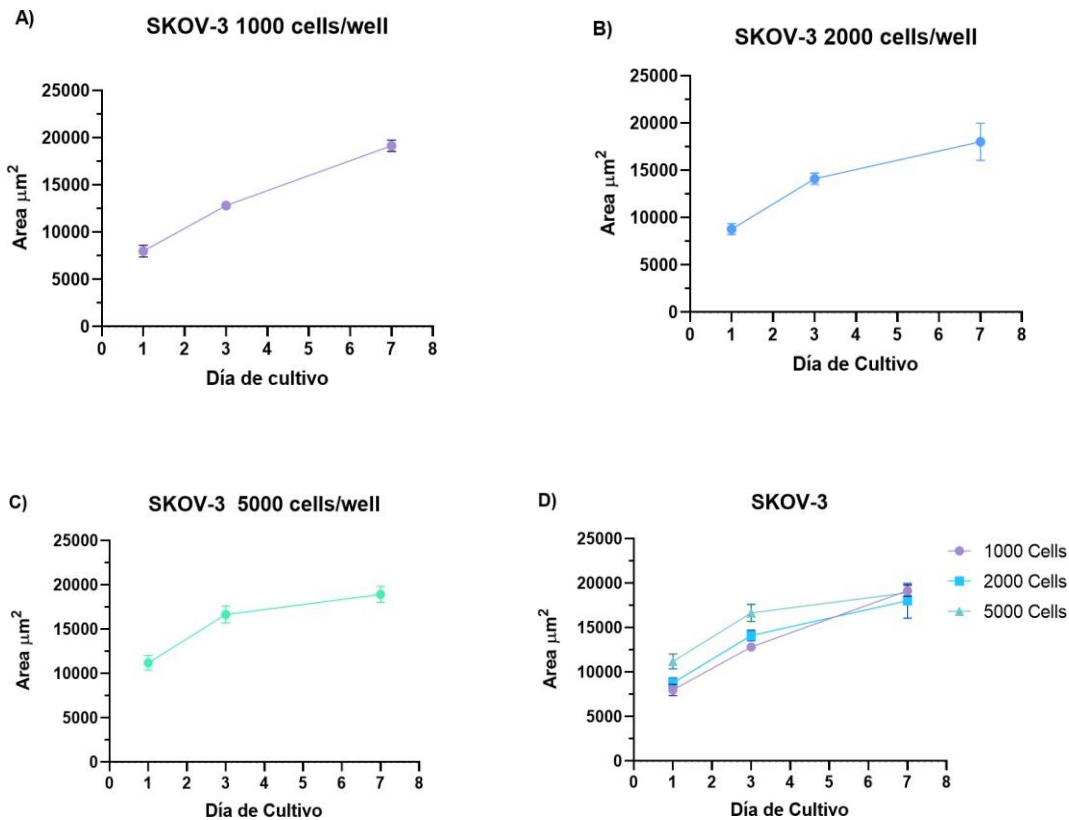


Figura 8.1-2. “Time plot” del crecimiento de esferoides de la línea celular SKOV-3 a distintas densidades celulares. Se determinó el crecimiento de esferoides generados de la línea celular SKOV-3 a distinto número de células por un periodo de 7 días. (A) 1000 células por pocillo. (B) 2000 células por pocillo. (C) 5000 células por pocillo. (D) Comparación del distinto número de células. Las determinaciones del área del esferoide fueron realizadas en quintuplicado. Las barras de error indican SEM. Fuente: elaboración propia.

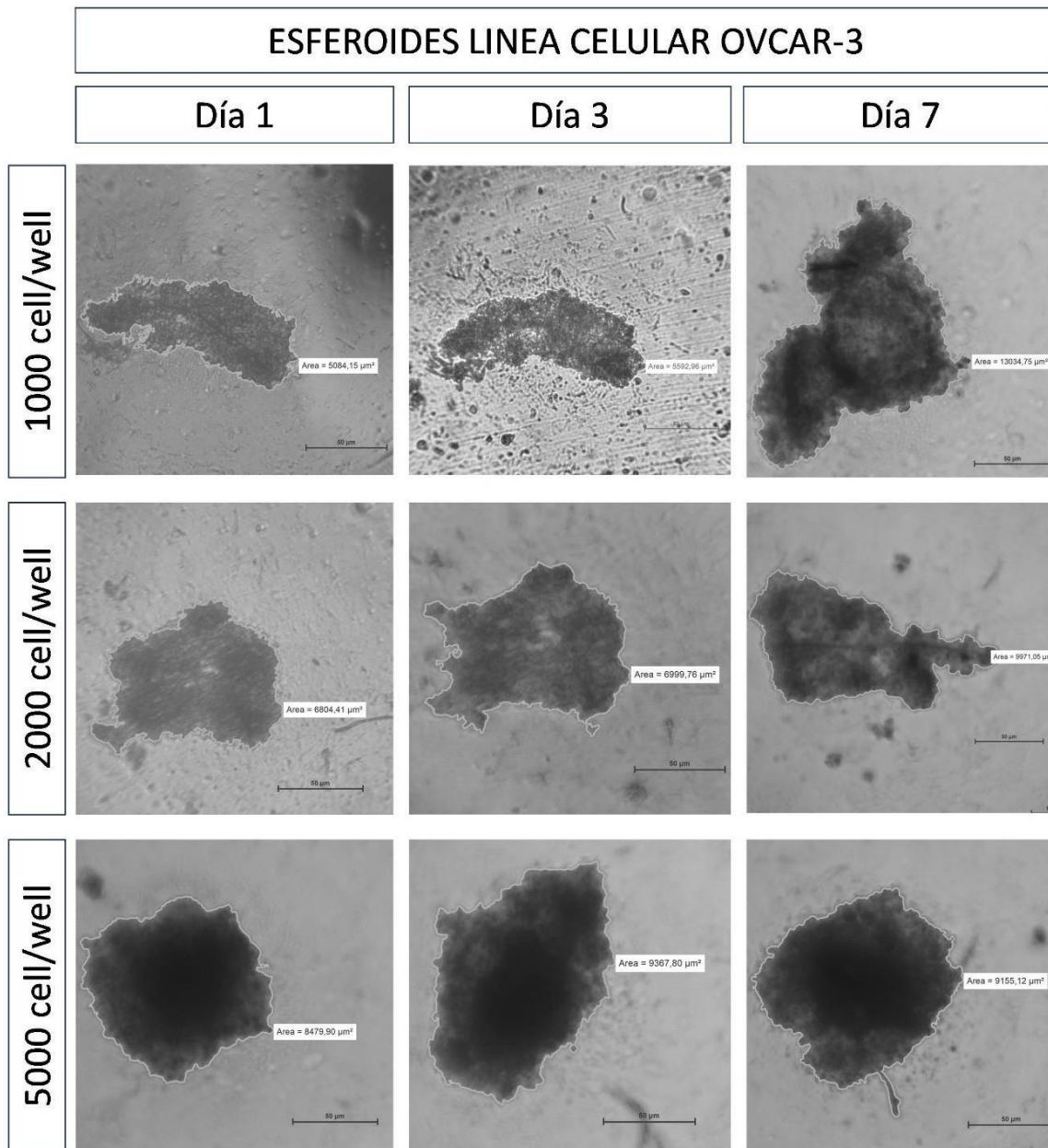


Figura 8.1-3. Esferoides de línea celular OVCAR-3. Imágenes representativas por microscopía de contraste de fases usando el sistema de detección semiautomatizada de NIS-Elements© para determinar el crecimiento de esferoides de la línea celular OVCAR-3. Fuente: elaboración propia.

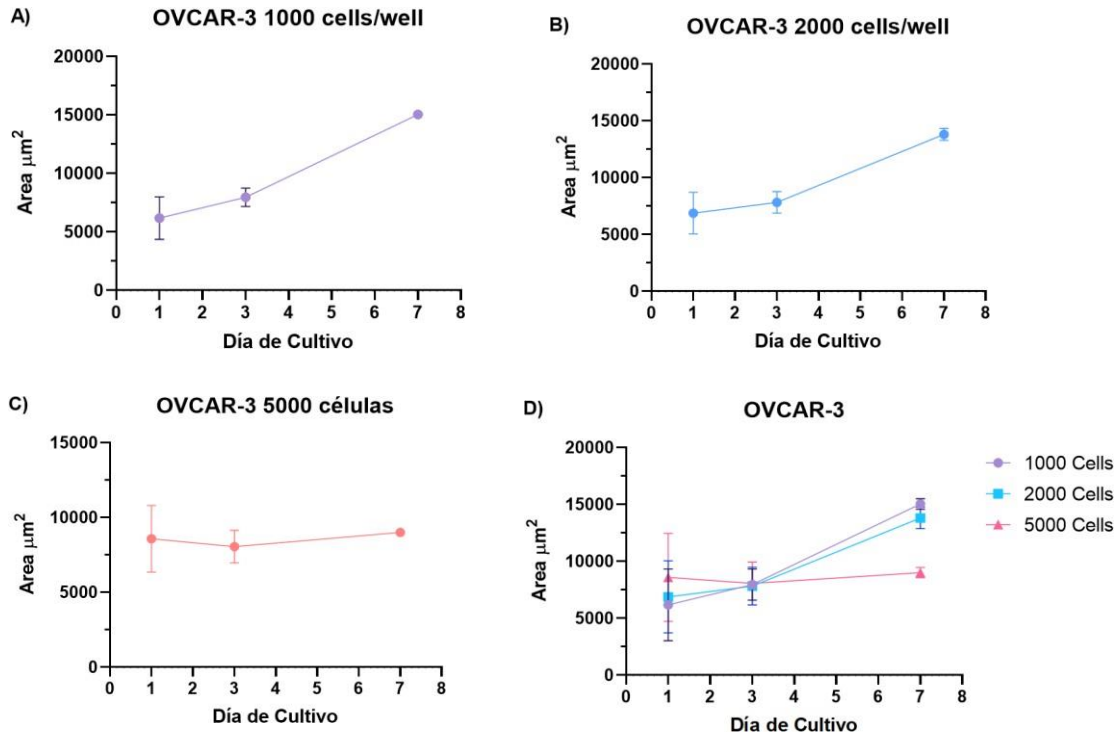


Figura 8.1-4. “Time plot” del crecimiento de esferoides de la línea celular OVCAR-3 a distintas densidades celulares. Se determinó el crecimiento de esferoides generados de la línea celular OVCAR-3 a distinto número de células por un periodo de 7 días. (A) 1000 células por pocillo. (B) 2000 células por pocillo. (C) 5000 células por pocillo. (D) Comparación del distinto número de células. Las determinaciones del área del esferoide fueron realizadas en quintuplicado. Las barras de error indican SEM. Fuente: elaboración propia.

8.2. Efecto de Doxorubicina en esferoides de líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3

Con el propósito de evaluar el impacto de la doxorubicina en los esferoides celulares, se llevaron a cabo estudios utilizando diversas concentraciones de este agente antineoplásico en esferoides generados a partir de las líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3. La evaluación del efecto de agentes antineoplásicos en la literatura mediante ensayos de citotoxicidad destaca la evaluación de los efectos de la incubación con drogas a las 72 horas (Świerczewska, et al. 2023). Sin embargo, en este estudio se decidió realizar mediciones a intervalos de 24, 48 y 72 horas, así como a los 7 días para recabar más información de cómo es el progreso del crecimiento del esferoide frente a una determinada condición, como se representa en la figura 8.2-1 y figura 8.2-2.

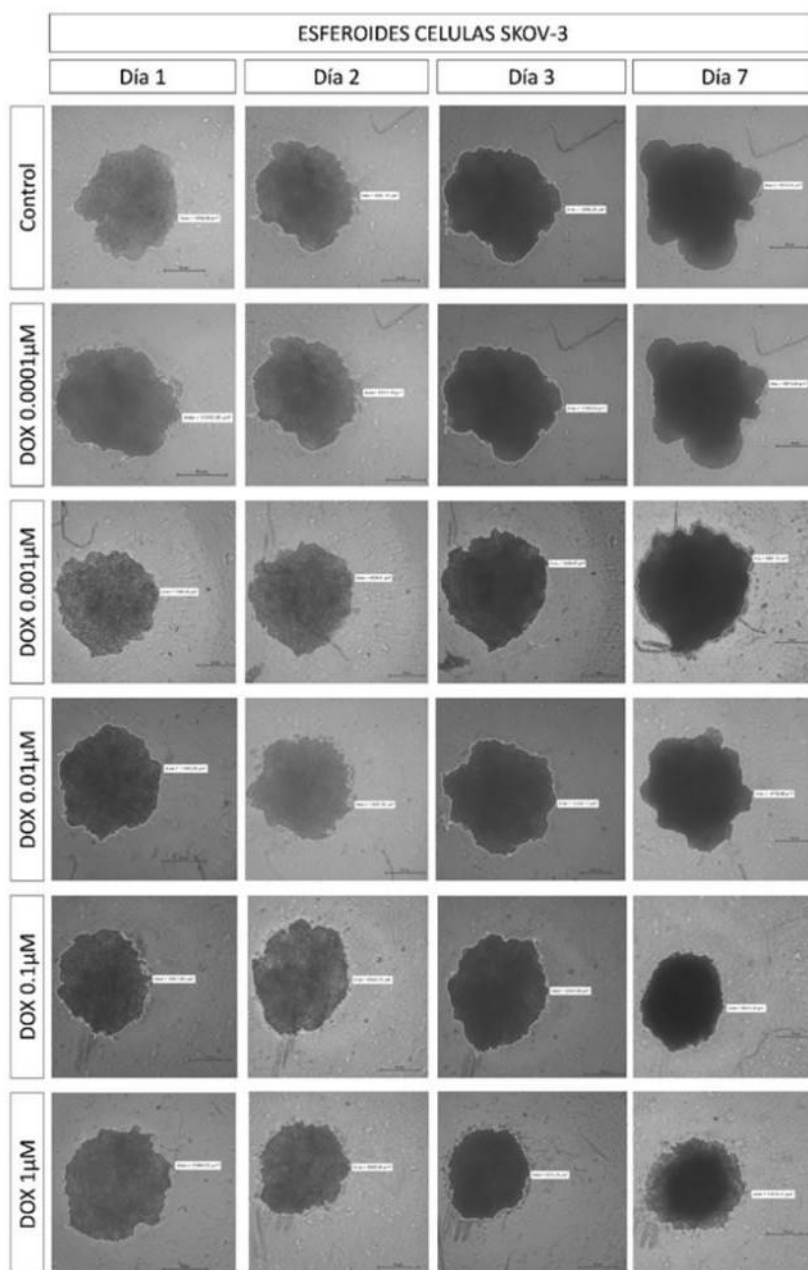


Figura 8.2-1. Esferoides de la línea celular SKOV-3 incubados con doxorubicina a distintas concentraciones. Imágenes representativas por microscopía de contraste de fases usando el sistema de detección semiautomatizada de NIS-Elements© para determinar el crecimiento de esferoides de la línea celular SKOV-3 tratados con distintas concentraciones de doxorubicina (DOX) por periodos de 24, 48, 72 horas y 7 días. Fuente: elaboración propia.

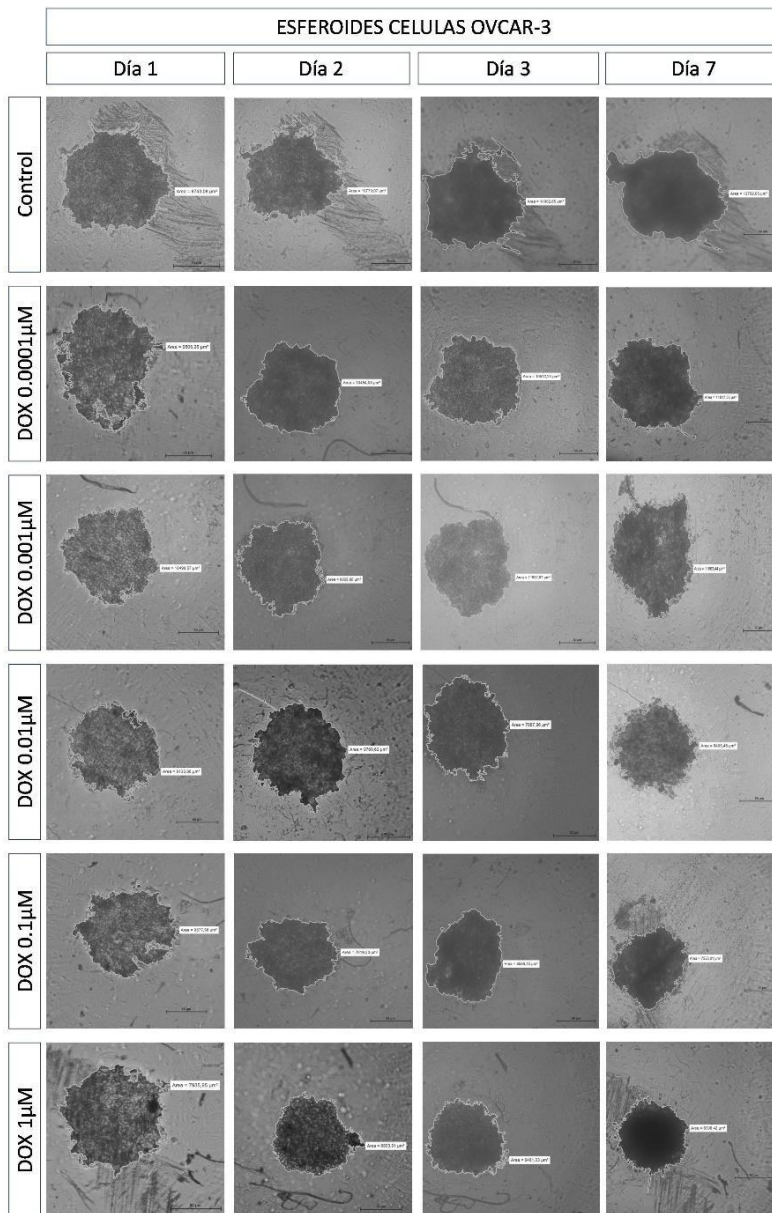


Figura 8.2-2. Esferoides de línea celular OVCAR-3 incubados con doxorubicina a distintas concentraciones. Imágenes representativas por microscopía de contraste de fases usando el sistema de detección semiautomatizada de NIS-Elements© para determinar el crecimiento de esferoides de la línea celular OVCAR-3 tratados con distintas concentraciones de doxorubicina (DOX) por periodos de 24, 48, 72 horas y 7 días. Fuente: elaboración propia.

Los datos fueron recopilados realizando microscopía de contraste de fases, mediante la captura de fotografías de los esferoides. Para el análisis de los resultados, se aplicó una normalización de los datos, tomando las determinaciones de las áreas de los esferoides obtenidas a partir de las distintas concentraciones de doxorubicina en relación con el tamaño de los esferoides cultivados sin tratamiento, sirviendo como control. Esto permitió observar un cambio neto en el tamaño del esferoide bajo diversas condiciones, en comparación con el tamaño obtenido en los esferoides no tratados.

De esta forma, lo que se representa en la figura 8.2-3 es un “*Time plot*” del crecimiento celular donde todos los esferoides parten de un tamaño promedio similar. Según el efecto que tenga la doxorubicina sobre el cultivo, estas curvas se van separando, mostrando cada una su propia cinética de crecimiento en función de una dosis-respuesta. Finalmente, se observa que los esferoides pueden aumentar su tamaño, disminuir su tamaño o ~~lo~~ mantenerlo de manera similar al control.

Para el caso de las células OVCAR-3, el efecto citotóxico de la Doxorubicina se comienza a observar tanto al para las concentraciones de 0.1 μM y 1 μM a partir del día 2 de incubación extendiéndose hasta el día 7 con una disminución parcial del tamaño de aproximadamente un 40%. En contraste, para las células SKOV-3, la concentración de 1 μM no muestra un efecto significativo en el tamaño del esferoide hasta el día 7 de incubación.

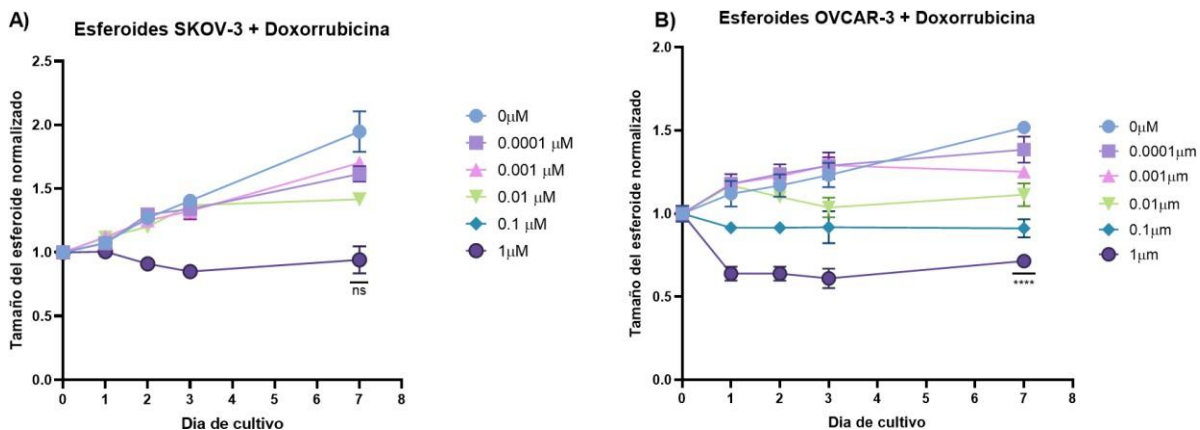


Figura 8.2-3. “Time plot” del crecimiento de esferoides SKOV-3 y OVCAR-3 frente a la incubación con doxorubicina. Tanto los esferoides generados de células SKOV-3 (A) como OVCAR-3 (B) fueron expuestos a concentraciones crecientes de doxorubicina. En color violeta claro se observan los controles de crecimiento que no fueron incubados con doxorubicina; el resto de los colores indica las distintas concentraciones a las cuales fueron sometidos los esferoides celulares. Las determinaciones fueron realizadas en quintuplicado y los datos fueron utilizando a lo menos 3 réplicas. $p < 0.0001$ (****) Las barras de error indican SEM. Fuente: elaboración propia.

8.3. Eficacia de Doxorrubicina para esferoides celulares y cultivos en monocapa.

En la figura 8.2-3 se observó que, para el caso de los esferoides generados a partir de las células OVCAR-3, la incubación con doxorrubicina a concentraciones de 0.1 μM y 1 μM afectó el crecimiento del esferoide, manteniendo un tamaño similar al inicial y generando una disminución del tamaño al séptimo día de trabajo para cada concentración, respectivamente. En contraste, para los esferoides obtenidos a partir de células SKOV-3, la concentración de 1 μM resultó en una mantención del tamaño similar a la inicial, sin mostrar una disminución de la masa celular. Es por esta razón que se generaron las curvas de IC_{50} para cuantificar la sensibilidad a doxorrubicina en los esferoides de ambas líneas celulares, como se observa en la figura 8.3-1. En dicha figura, se puede apreciar que la concentración de IC_{50} para los esferoides generados a partir de la línea celular SKOV-3 es mayor que en el caso de OVCAR-3. Esta diferencia en la concentración IC_{50} está en concordancia con lo descrito en la literatura y con resultados previos de nuestro laboratorio, que indican que SKOV-3 muestra resistencia a agentes antineoplásicos, mientras que OVCAR-3 es sensible a estos tratamientos. Por otro lado, en la figura 8.3-4 se observa una línea punteada roja que denota el tamaño inicial de los controles de crecimiento. En estas curvas, se pueden observar dos tipos de efectos. Primero, en (A), los esferoides SKOV-3 frente a distintas concentraciones de doxorrubicina no lograron reducir su tamaño por debajo del umbral del control. Esto indica que el efecto del fármaco es de tipo citostático. Por su parte, en el caso de los esferoides OVCAR-3 (B), al analizar este umbral indicado por la línea roja punteada, se

observa que la incubación con doxorubicina a concentraciones de 0.1 μM y 1 μM provoca una disminución del tamaño respecto al umbral de crecimiento. Por lo tanto, la figura revela dos tipos de efecto, el primero a concentraciones inferiores a 0.01 μM donde la acción de doxorubicina estaría inhibiendo el crecimiento del esferoide y por tanto ejerce una acción del tipo citostática, mientras a concentraciones por sobre 0.01 μM se estaría observando muerte celular indicada por una disminución del tamaño lo que indica que a concentraciones mayores el efecto es del tipo citotóxico.

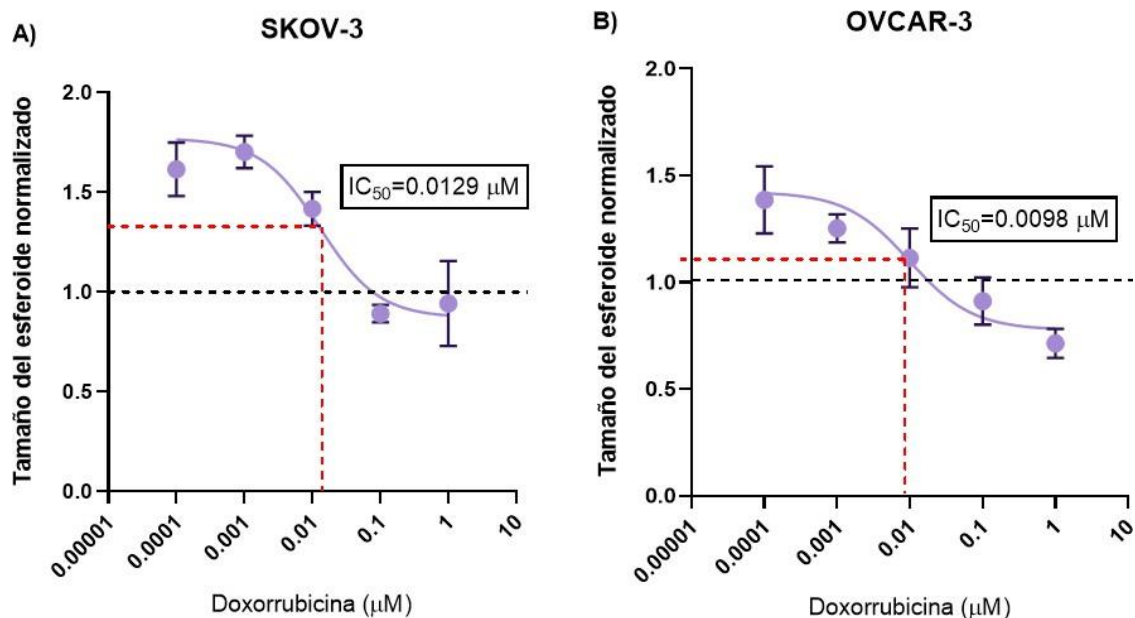


Figura 8.3-1. Curvas IC₅₀ para doxorubicina en esferoides de células SKOV-3 y OVCAR-3. Se realizó la curva de dosis-respuesta tanto para los esferoides generados de la línea celular SKOV-3 (A) como para OVCAR-3 (B) al séptimo de incubación con doxorubicina. La línea roja punteada representa el tamaño inicial de los controles de crecimiento, donde se denota que a partir de dicho punto los

esferoides sufren un aumento o disminución del tamaño. Las determinaciones fueron realizadas en quintuplicado y los datos graficados utilizando a lo menos 3 réplicas. Las barras de error indican SEM. Fuente: elaboración propia.

Tabla 8.1. IC₅₀ Doxorrubicina en esferoides OVCAR-3 y SKOV-3

Droga	IC₅₀ Esferoides OVCAR-3	IC₅₀ Esferoides SKOV-3
Doxorrubicina	0.0098 μ M	0.0129 μ M

Fuente: elaboración propia.

8.4. Efecto de Cisplatino en esferoides de líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3

Por otro lado, para el agente antineoplásico de primera línea cisplatino se realizó el mismo procedimiento utilizado con doxorubicina en esferoides SKOV-3 y OVCAR-3. La evaluación del efecto de cisplatino se evaluó según la literatura a las 24, 48 y 72 horas (Świerczewska et al., 2023). Sin embargo, según se ha descrito en este trabajo, también se realizó la medición a los 7 días de iniciado el trabajo, como se representa en la figura 8.4-1 y la figura 8.4-2.

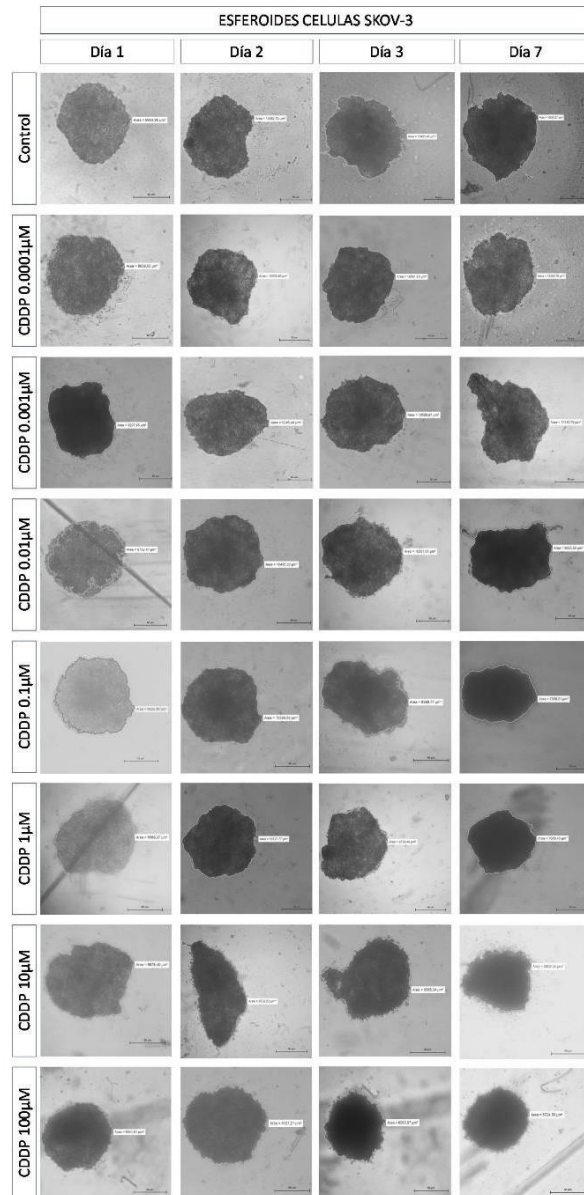


Figura 8.4-1. Esferoides de la línea celular SKOV-3 incubados con cisplatino a distintas concentraciones. Imágenes representativas por microscopia de contraste de fases usando el sistema de detección semiautomatizada de NIS-Elements© para determinar el crecimiento de esferoides de la línea celular SKOV-3 tratados con distintas concentraciones de Cisplatino (CDDP) por periodos de 24, 48, 72 horas y 7 días. Fuente: elaboración propia.

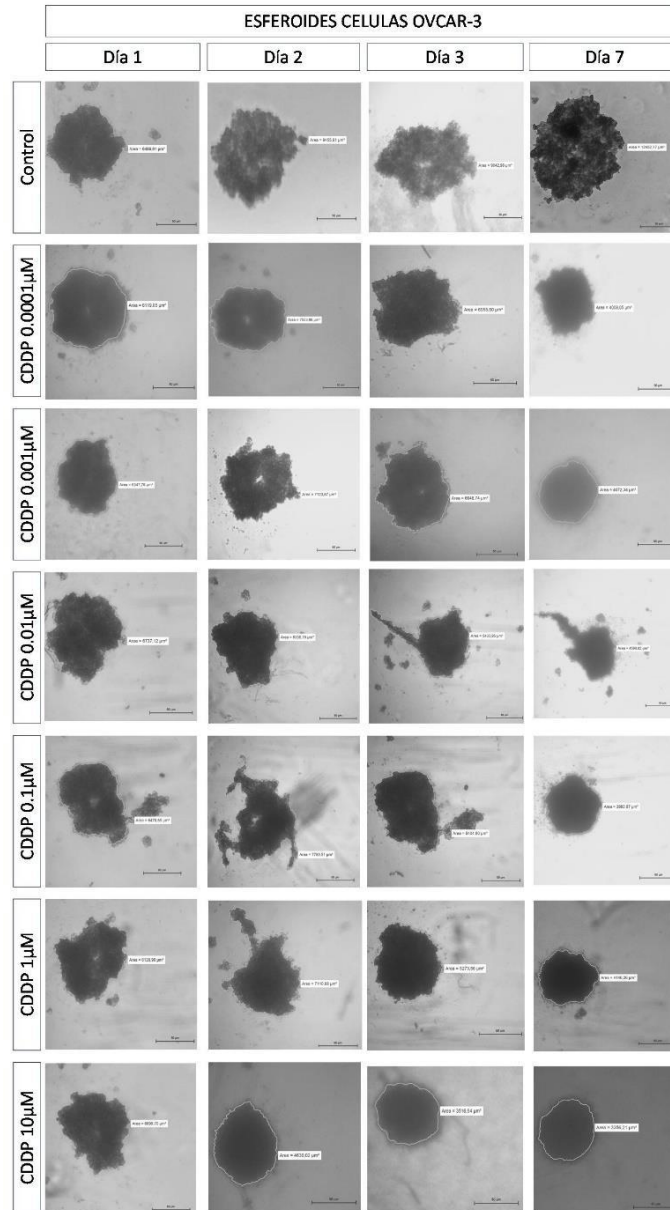


Figura 8.4-2. Esferoides de línea celular OVCAR-3 incubados con cisplatino a distintas concentraciones. Imágenes representativas por microscopía de contraste de fases usando el sistema de detección semiautomatizada de NIS-Elements© para determinar el crecimiento de esferoides de la línea celular OVCAR-3 tratados con distintas concentraciones de cisplatino (CDDP) por periodos de 24, 48, 72 horas y 7 días. Fuente: elaboración propia.

Al igual que en el caso de Doxorrubicina, los datos fueron recopilados realizando microscopia de contraste de fases, mediante la captura de fotografías de los esferoides. Para el análisis de los resultados, también se recurrió a la normalización de los datos, tomando las determinaciones de las áreas de los esferoides obtenidas a partir de las distintas concentraciones de cisplatino en relación con el tamaño de los esferoides cultivados sin tratamiento.

Así, en el caso de cisplatino también se observó, según se evidencia en la figura 8.4-3 , su "*Time plot*" de crecimiento celular, donde todos los esferoides parten de un tamaño promedio similar. Sin embargo, según la concentración de cisplatino a la que se expongan los esferoides en cultivo, responden a una dosis-respuesta según sea la concentración del fármaco.

Para el caso de los esferoides de la línea celular SKOV-3, se presenta a la concentración de 0.0001 μM una inhibición parcial del crecimiento del esferoide respecto al control de crecimiento, efecto que se ve aumentado entre las concentraciones de 0.001 μM y 10 μM , donde se observa una respuesta citostática completa, y a la concentración de 100 μM , un efecto citotóxico parcial. Por otro lado, para el caso de OVCAR-3 existe una marcada disminución del volumen desde el segundo día de incubación con concentraciones desde 0.0001 μM .

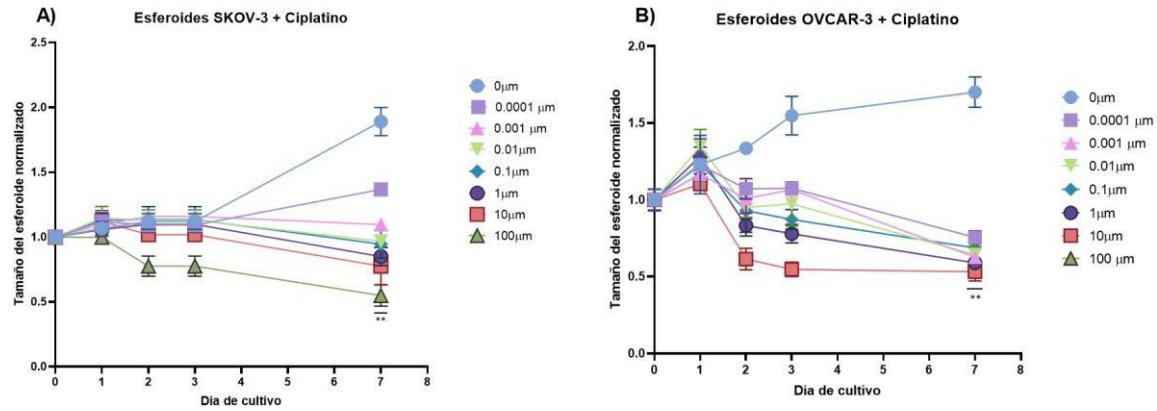


Figura 8.4-3. “Time plot” del crecimiento de esferoides SKOV-3 y OVCAR-3 frente a la incubación con cisplatino. Tanto los esferoides generados de células SKOV-3 (A) como OVCAR-3 (B) fueron expuestos a concentraciones crecientes de cisplatino. En color celeste claro se observan los controles de crecimiento que no fueron incubados con cisplatino; el resto de los colores indica las distintas concentraciones a las cuales fueron sometidos los esferoides celulares. Las determinaciones fueron realizadas en quintuplicado y los datos fueron recopilados utilizando a lo menos 3 réplicas. $p < 0.01$ (**). Las barras de error indican SEM. Fuente: elaboración propia.

8.5. Eficacia de Cisplatino para esferoides celulares.

En la figura 8.4-3 se evidencia que la exposición de esferoides OVCAR-3 a Cisplatino en concentraciones de 0.1 μM y 100 μM se genera una reducción progresiva de su tamaño con el paso de los días. En contraste, los esferoides derivados de SKOV-3 muestran un patrón de resistencia caracterizado por una inhibición parcial del crecimiento a 0.0001 μM y una respuesta citostática entre 0.001 μM y 10 μM , alcanzando únicamente un efecto citotóxico parcial a la concentración más alta evaluada (100 μM).

Estos resultados se correlacionan con los valores de IC_{50} obtenidos, vistos en la figura 8.5-1, la cual muestra la dosis-respuesta al séptimo día de incubación con cisplatino. Aquí se observa que los esferoides SKOV-3 presentan una concentración inhibitoria mayor en comparación con OVCAR-3, confirmando la menor sensibilidad de esta línea a cisplatino. Asimismo, en la misma figura se aprecia la línea punteada roja que corresponde al control de crecimiento, lo cual permite distinguir claramente el carácter de la respuesta: en SKOV-3, la acción del fármaco se limita principalmente a un efecto citostático, mientras que en OVCAR-3 la disminución por debajo del umbral de control a concentraciones menores confirma un efecto citotóxico de carácter parcial ya que se reduce aproximadamente a la mitad el tamaño de los esferoides incubados.

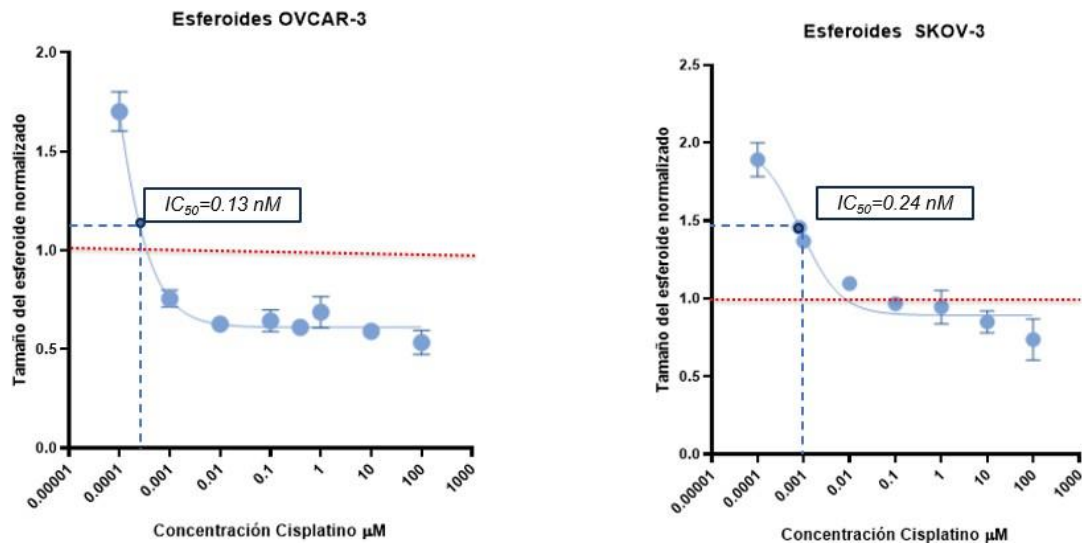


Figura 8.5-1. Curvas IC_{50} para Cisplatino en esferoides de células SKOV-3 y OVCAR-3. Se realizó la curva de dosis-respuesta tanto para los esferoides generados de la línea celular SKOV-3 (A) como para OVCAR-3 (B) al séptimo de incubación con cisplatino. Para el caso de SKOV-3 se observa que presenta una concentración de IC_{50} mayor al caso de OVCAR-3, siendo 0.24 nM y 0.13 nM, respectivamente. La línea roja punteada representa el tamaño inicial de los controles de crecimiento, donde se denota que a partir de dicho punto los esferoides sufren un aumento o disminución del tamaño. Las determinaciones fueron realizadas en quintuplicado y los datos graficados utilizando a lo menos 3 réplicas. Las barras de error indican SEM. Fuente: elaboración propia.

Tabla 8.2. IC₅₀ de cisplatino en esferoides de OVCAR-3 y SKOV-3.

Droga	IC₅₀ Esferoides OVCAR-3	IC₅₀ Esferoides SKOV-3
Cisplatino	0.13 nM	0.24 nM

Fuente: elaboración propia.

8.6. Efecto de Carboplatino carboplatino en esferoides de líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3.

Finalmente, se evaluó el efecto del Carboplatino en los esferoides generados a partir de las líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3. Buscando, al igual que con Doxorubicina doxorubicina y Cisplatino cisplatino, ver la respuesta en términos de sensibilidad y resistencia. Para ello, se realizó un seguimiento temporal a las 24, 48 y 72 horas (Świerczewska et al., 2023), además de una evaluación a 7 días, con el propósito de registrar tanto los efectos iniciales como la evolución del crecimiento o reducción de los esferoides en el tiempo. De esta forma se tiene una vista completa entre los dos compuestos utilizados como primera línea en terapia antineoplásica en cancer cáncer de ovario, además de la doxorubicina como agente terapéutico de segunda línea.

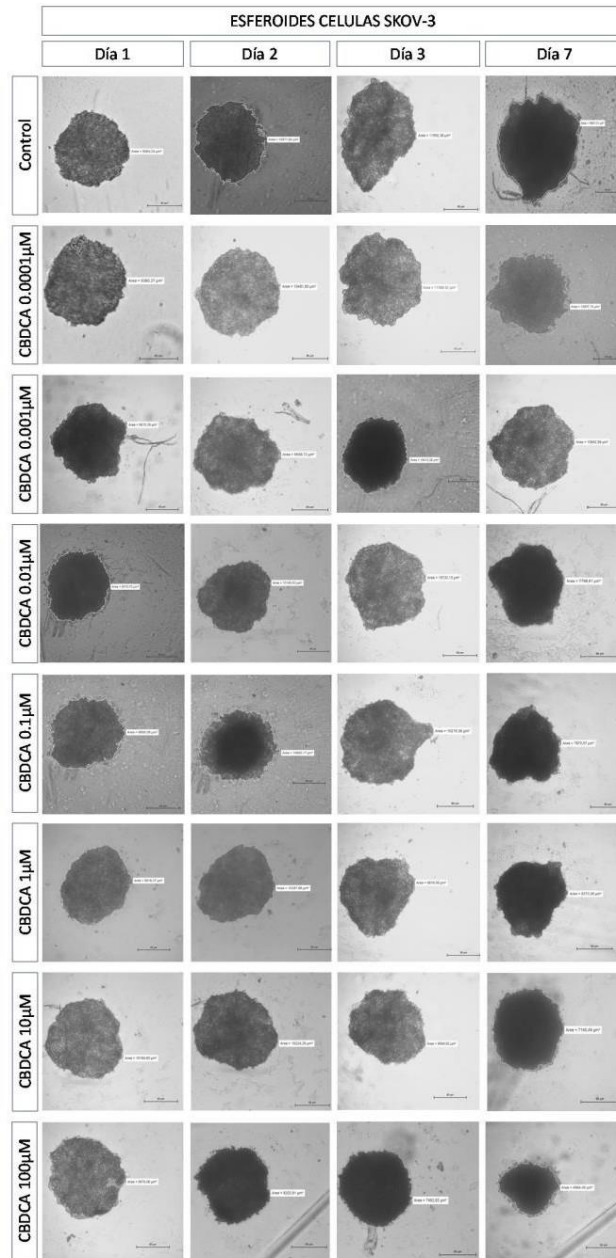


Figura 8.6-1. Esferoides de la línea celular SKOV-3 incubados con Carboplatino carboplatino a distintas concentraciones. Imágenes representativas por microscopia microscopía de contraste de fases usando el sistema de detección semiautomatizada de NIS-Elements© para determinar el crecimiento de esferoides de la línea celular SKOV-3 tratados con distintas concentraciones de carboplatino (CBDCA) por periodos de 24, 48, 72 horas y 7 días. Fuente: elaboración propia.

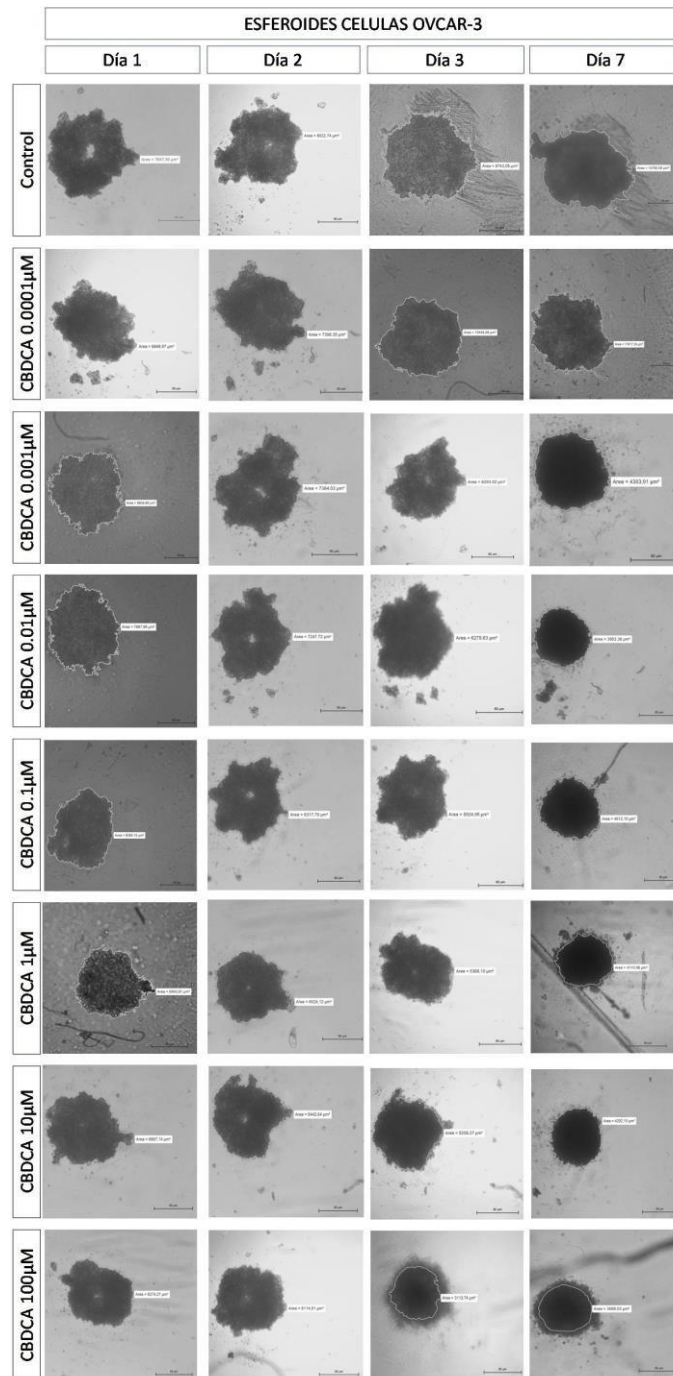


Figura 8.6-2. Esferoides de línea celular OVCAR-3 incubados con a distintas concentraciones. Imágenes representativas por microscopía de contraste de fases usando el sistema de detección semiautomatizada de NIS-Elements© para determinar el crecimiento de esferoides de la línea celular SKOV-3 tratados con distintas concentraciones de carboplatino (CBDCA) por periodos de 24, 48, 72 horas y 7 días. Fuente: Elaboración propia.

microscopía de contraste de fases, mediante la captura de fotografías de los esferoides. Para el análisis de los resultados, se aplicó una normalización de los datos, tomando las determinaciones de las áreas de los esferoides obtenidas a partir de las distintas concentraciones de carboplatino en relación con el tamaño de los esferoides cultivados sin tratamiento, sirviendo como control; esto para observar un cambio neto en el tamaño del esferoide.

Así, para esta tercera droga en estudio, también se puede observar en la figura 8.6-3 el “time plot” confeccionado con los datos de las fotografías obtenidas por microscopía. Observándose nuevamente en un inicio los esferoides con un tamaño similar promedio, cuyo crecimiento se ve afectado y por tanto el tamaño de estos según se aumentan las concentraciones de carboplatino separándose de lo observado con el control de crecimiento.

En el caso de la figura 8.6-3 se observa que en los esferoides de la línea celular SKOV-3 a medida que se aumenta la concentración de carboplatino se produce una disminución gradual del tamaño del esferoide respecto al control mientras que en el caso de los esferoides generados con células OVCAR-3 experimentan una disminución del tamaño aun a bajas concentraciones de este agente antineoplásico, sosteniendo el efecto a lo largo del experimento.

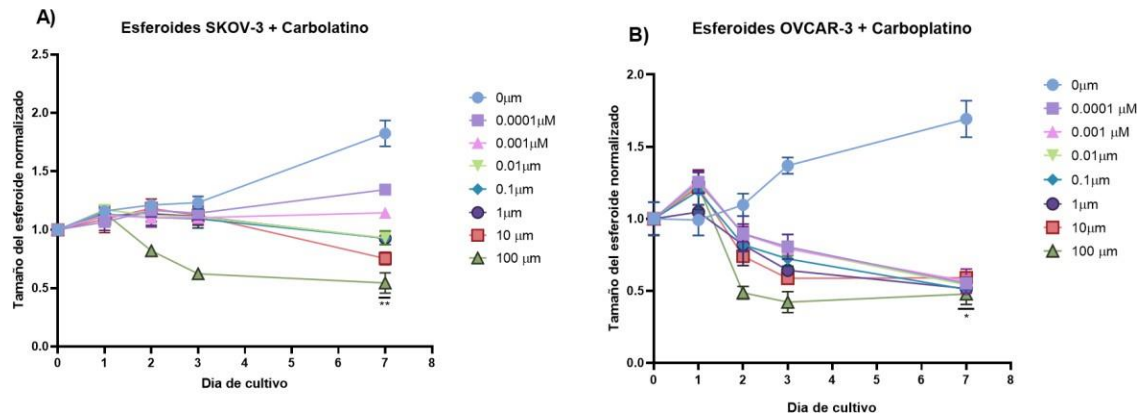


Figura 8.6-3. “Time plot” del crecimiento de esferoides SKOV-3 y OVCAR-3 frente a la incubación con carboplatino. Tanto los esferoides generados de células SKOV-3 (A) como OVCAR-3 (B) fueron expuestos a concentraciones crecientes de carboplatino. En color celeste claro se observan los controles de crecimiento que no fueron incubados con carboplatino; el resto de los colores indica las distintas concentraciones a las cuales fueron sometidos los esferoides celulares. Las determinaciones fueron realizadas en quintuplicado y los datos fueron recopilados utilizando a lo menos 3 réplicas. $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*). Las barras de error indican SEM. Fuente: elaboración propia.

8.7. Eficacia de Carboplatino en esferoides.

En el Time plot presentado en la figura 8.6-3 se observa el comportamiento que presentaron los esferoides celulares de las líneas OVCAR-3 y SKOV-3 frente a la incubación con Carboplatino.

En primer lugar, cuando se observó lo que ocurre con los esferoides formados a partir de la línea celular SKOV-3, podemos ver que a medida que aumentamos la concentración de carboplatino desde 0.0001 μM hasta 100 μM existe una disminución gradual del tamaño del esferoide. Entre las 0.0001 μM y las concentración 0.01 μM esta disminución responden a una inhibición de la proliferación celular denotado por tamaños que no pasan bajo los controles al día 0 de trabajo, sin embargo, a concentraciones desde 0.1 μM en adelante hasta alcanzar los 100 μM observamos que existe una disminución de los tamaños de los esferoides respecto a sus controles situación que se ve mas pronunciada al tercer día de incubación con carboplatino a la concentración 100 μM . Por otro lado, en el caso de los esferoides generados a partir de la línea celular OVCAR-3 estos comienzan a experimentar una disminución de su tamaño desde el primer día de incubación con el fármaco desde las concentraciones más bajas como lo es a 0.0001 μM , este efecto es de carácter sostenido en el tiempo extendiéndose hasta el día 7 de la incubación con un tamaño menor del cual se inició el trabajo experimental. Con estos datos se procedió a generar la curva de dosis respuesta para los datos obtenidos de los esferoides de ambas líneas celulares al séptimo día de trabajo como se observa en la figura 8.6-4. En la figura mencionada se puede ver que, en

concordancia con lo obtenido previamente, los esferoides generados con la línea celular SKOV-3 presentan un mayor IC_{50} que los que provienen de la línea celular OVCAR-3 lo que indica que el fármaco tiene una menor potencia farmacológica en SKOV-3 lo que se traduce en que se necesitan concentraciones más altas para lograr el efecto citotóxico. Ahora si se mira con más detenimiento al ver el comportamiento de los esferoides a las distintas concentraciones respecto a la línea puntada roja que es el tamaño de inicio del control. En primer lugar, se observa el caso de la figura 8.6-4 (A), donde se observa que a concentraciones desde 0.0001 μM hasta 100 μM genera una disminución del tamaño respecto al umbral de crecimiento indicando un efecto del tipo citotóxico, mientras que en el caso de la figura 8.6-4 (B) incluso a concentraciones de 100 μM no logra disminuir el tamaño por debajo del umbral y por tanto indica un efecto del tipo citostático.- donde la acción de carboplatino estaría inhibiendo el crecimiento del esferoide y, por tanto, ejerce una acción del tipo citostático, como se describió anteriormente.

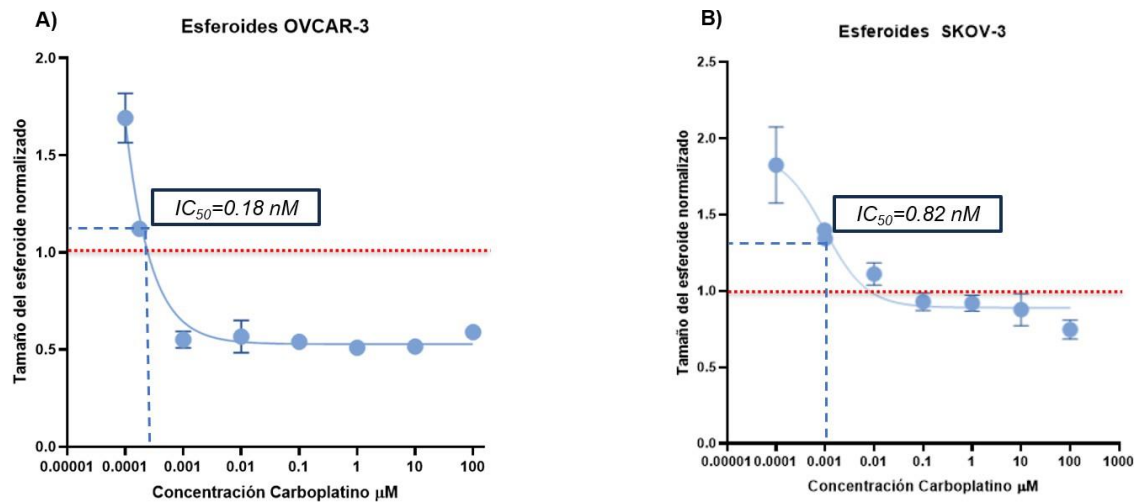


Figura 8.6-4. Curvas IC_{50} para Carboplatino en esferoides de células SKOV-3 y OVCAR-3. Se realizó la curva de dosis-respuesta tanto para los esferoides generados de la línea celular SKOV-3 (A) como para OVCAR-3 (B) al séptimo de incubación con carboplatino. Para el caso de SKOV-3 se observa que presenta una concentración de IC_{50} mayor al caso de OVCAR-3, siendo 0.82 nM y 0.18nM, respectivamente. La línea roja punteada representa el tamaño inicial de los controles de crecimiento, donde se denota que a partir de dicho punto los esferoides sufren un aumento o disminución del tamaño. Las determinaciones fueron realizadas en quintuplicado y los datos graficados utilizando a lo menos 3 réplicas. Las barras de error indican SEM. Fuente: elaboración propia.

Tabla 8.3. IC₅₀ de carboplatino en esferoides OVCAR-3 y SKOV-3.

Droga	IC₅₀ Esferoides OVCAR-3	IC₅₀ Esferoides SKOV-3
Carboplatino	0.18 nM	0.82 nM

Fuente: elaboración propia.

8.8 Expresión génica de genes clave del metabolismo glucídico y lipídico en esferoides SKOV-3 y OVCAR-3.

Para poder comprender de mejor manera el fenómeno de la quimiorresistencia en cáncer de ovario, se estudiaron 8 genes que tienen un rol importante tanto para el metabolismo glucídico como para el metabolismo lipídico. Estos genes fueron seleccionados con base en resultados previos obtenidos por el laboratorio en el clásico modelo de monocapa. Es así como, en el caso del metabolismo glucídico, las 4 enzimas glucolíticas en estudio fueron GLUT1, HK2, PKM y LDHA.

Al observar la figura 8.8-1 (A) y observar lo que sucede con el transportador GLUT-1, este se encuentra sobreexpresado en aproximadamente 1.5 veces en el modelo de esferoides para la línea celular OVCAR-3 respecto a su expresión en monocapa, mientras que en el caso de los esferoides de SKOV-3 estos presentan una disminución de la expresión respecto al modelo clásico. Por otro lado, en (B) con la hexoquinasa 2 podemos observar que tanto los esferoides generados con la línea celular SKOV-3 como los de la OVCAR-3 presentan una ligera sobreexpresión. En tercer lugar, en (C) para la Piruvato quinasa M ocurre algo similar que en (B) mostrando una ligera sobreexpresión. Por último, en el caso de (D) para los esferoides generados con ambas líneas celulares presentan una sobreexpresión considerable de la enzima Lactato deshidrogenasa A con ambos teniendo un aumento de la expresión de aproximadamente 7 veces de lo que se observa en monocapa.

En contraste, para los actores clave del metabolismo lipídico los genes estudiados fueron FASN, CD36, CPT1A y CPT1B.

Revisando nuevamente la figura 8.8-1 (E) se puede observar que en el caso de la sintasa de ácidos grasos N, esta presenta una sobreexpresión cercana a 3 veces en los esferoides de la línea celular SKOV-3, mientras que en su contraparte los esferoides OVCAR-3 estos presentan una disminución en la expresión de 2 veces respecto a la misma línea celular cultivada en monocapa. En segundo lugar, en (F) EL receptor CD36 muestra esta vez que la sobreexpresión de 2 veces fue observada en los esferoides de la línea celular OVCAR-3 en contraste con los de SKOV-3 que presentaron una disminución en la expresión. Por su parte la enzima CPT1A presente en (G) muestra para los esferoides de ambas líneas celulares una disminución de la expresión siendo esta más pronunciada aquellos esferoides de la línea celular OVCAR-3. Finalmente, la enzima CPT1B en (H) presenta una expresión similar a lo visto en su isoforma CPT1A con una menor expresión en esferoides OVCAR-3 respecto a los esferoides SKOV-3

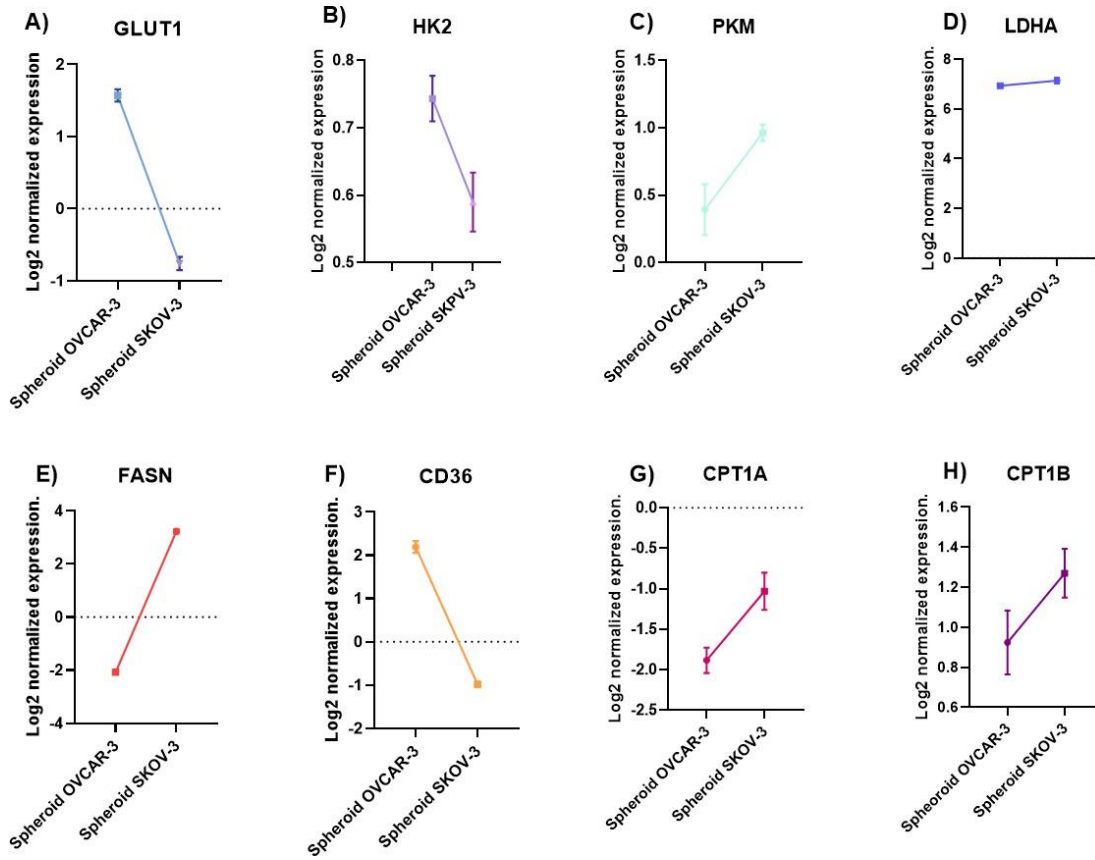


Figura 8.8-1. Expresión de ARNm de GLUT1, HK2, PKM, LDHA, FASN, CD36 CPT1A y CPT1B en esferoides celulares de líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3. Expresión de genes clave del metabolismo lipídico y glucídico en esferoides celulares de líneas celulares de cáncer de ovario respecto a su expresión en monocapa. (A)GLUT1. (B) HK2. (C) PKM. (D) LDHA. (E) FASN. (F) CD36 (G) CPT1A (H) CPT1B. Fuente: elaboración propia

8.9. Efecto de la depleción de glutatión sobre el crecimiento de esferoides celulares.

Con el fin de evaluar el rol del glutatión (GSH) en el crecimiento del esferoide, se cultivaron las líneas celulares SKOV-3 y OVCAR-3 en monocapa en presencia de presencia de Butionina sulfoximina (BSO) durante 24 horas y con dietil maleato por 1 hora posteriormente para luego generar los esferoides celulares. Estos fueron comparados con esferoides generados con células cultivadas en monocapa bajo condiciones normales. El seguimiento se realizó mediante microscopía de contraste de fases, cuantificando de manera semiautomatizada el área del esferoide. Como se observa en la figura 8.9-1 y la figura 8.9-2. Posteriormente, estos datos se recogieron y normalizaron, tal como se observa en la figura 8.9-3.

En condiciones de control, los esferoides de SKOV-3 mostraron un crecimiento progresivo durante los siete días de cultivo, alcanzando un aumento aproximado de 2 veces su tamaño inicial, en concordancia con resultados previos descritos en este trabajo. De manera similar, los esferoides de control de OVCAR-3 presentaron un incremento de alrededor de 1,5 veces al día 7.

~~En contraste,~~ los esferoides generados a partir de células SKOV-3 previamente depletadas de glutatión mostraron un crecimiento limitado; su tamaño mostró una reducción de tamaño de aproximadamente 0.3 veces en comparación con los controles, manteniéndose prácticamente constante entre el día 1 y el día 7, con solo pequeñas variaciones. Finalmente, en el caso de las células OVCAR-3 sometidas a depleción, no se observó la formación de esferoides celulares. En lugar de ello, las células permanecieron dispersas en la placa.

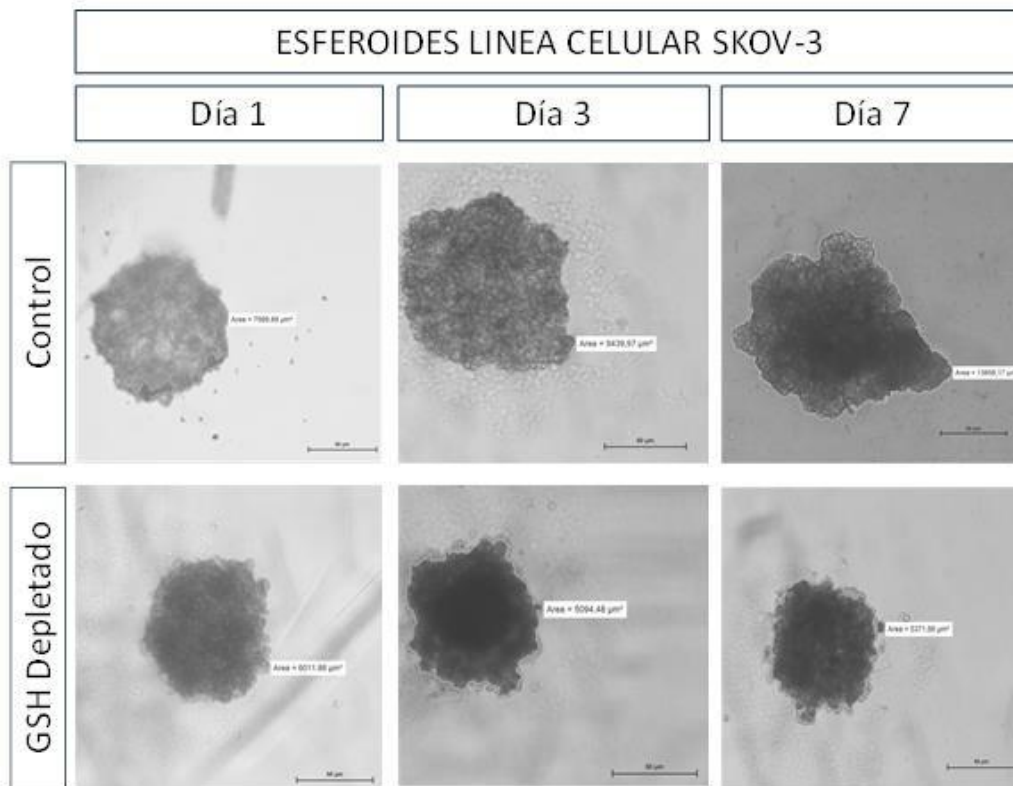


Figura 8.9-1. Esferoides de línea celular SKOV-3 depletados de glutatión.

Esferoides celulares de la línea celular SKOV-3 generados con células cultivadas en monocapa depletadas de glutatión. Imágenes representativas por microscopía de contraste de fases usando el sistema de detección semiautomatizada de NIS-Elements© para determinar el crecimiento de esferoides de la línea celular SKOV-

3. Fuente: elaboración propia.

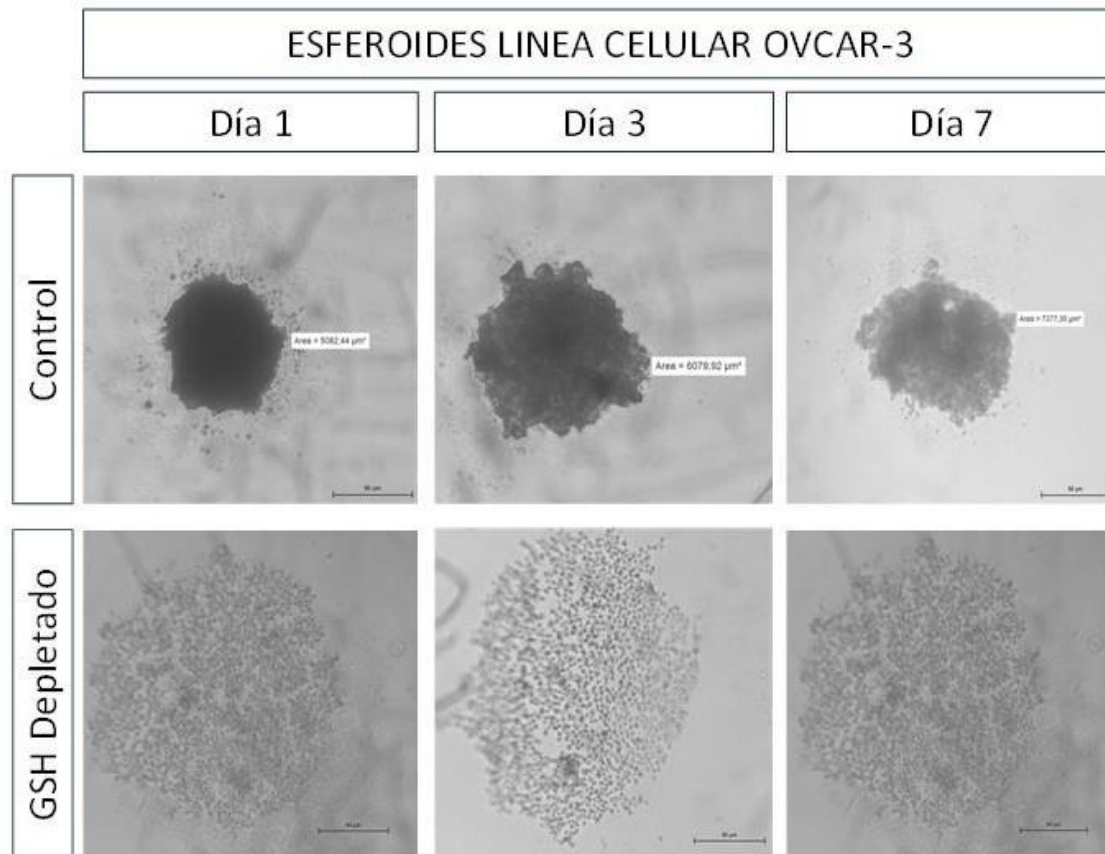


Figura 8.9-2. Esferoides de línea celular OVCAR-3 depletados de glutatión. Esferoides celulares de la línea celular OVCAR-3 generados con células cultivadas en monocapa depletadas de glutatión. Imágenes representativas por microscopía de contraste de fases usando el sistema de detección semiautomatizada de NIS-Elements© para determinar el crecimiento de esferoides de la línea celular OVCAR-3. Fuente: elaboración propia.

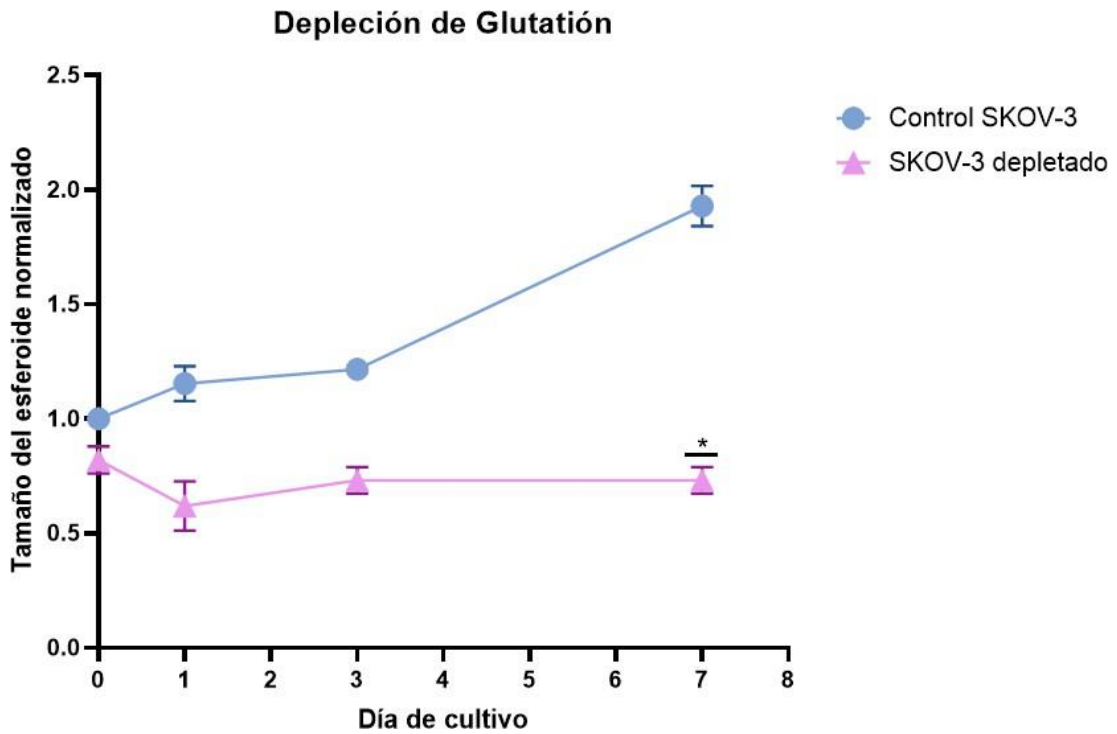


Figura 8.9-3. “Time plot” del crecimiento de esferoides SKOV-3 en condiciones de depleción de glutación. Los esferoides depletadas de glutación fueron generados a partir de células cultivadas en monocapa. En color celeste claro se observa el control de crecimiento para los esferoides SKOV-3 mientras que en color rosa corresponde a esferoides generados con células SKOV-3 depletadas de glutación. Las determinaciones fueron realizadas en quintuplicado y los datos fueron utilizando a lo menos 3 réplicas. $p < 0.05$ (*). Las barras de error indican SEM. Fuente: elaboración propia.

9. DISCUSIÓN

La evolución en los modelos preclínicos para el estudio del cáncer de ovario ha puesto en evidencia que los cultivos celulares bidimensionales no capturan la complejidad del microambiente tumoral ni la heterogeneidad celular. (Costa et al., 2016; Ro et al., 2022; Fantacuzzi et al., 2023) En un cancer tan complejo como el cáncer de ovario epitelial, que suele diagnosticarse un 70% de las pacientes en estadios avanzados y que además presenta una alta recurrencia temprana y la resistencia a los fármacos constituyen la principal causa de mortalidad, convirtiéndolo en el cancer gineco obstétrico más grave. (Torre et al., 2018; Lheureux et al., 2019; Ledermann et al., 2021; WHO, 2020) Por ello, en la presente tesis se buscó evaluar la eficacia de los agentes antineoplásicos clásicos usados en quimioterapia de primera y segunda línea frente a esta patología oncológica, además de caracterizar su perfil metabólico mediante esferoides celulares tridimensionales en comparación con los clásicos modelos de cultivo en monocapa 2D. (Friedrich et al., 2009; Costa et al., 2016)

Los resultados obtenidos en esta investigación confirman que el uso de esferoides celulares derivados de las líneas OVCAR-3 y SKOV-3 ofrece una plataforma más representativa para evaluar la eficacia de agentes antineoplásicos en cáncer de ovario que los cultivos monocapa convencionales. (Selby et al., 2017; Świerczewska et al., 2023; Costa et al., 2016) En el caso de la morfología, los esferoides formados mostraron compacidad variable, bordes irregulares y arquitectura de tipo agregada, hallazgos que concuerdan con los descritos por Selby et al. (2017) y con la alta variabilidad morfológica mencionada por Świerczewska et al. (2023) como una

propiedad distintiva de los modelos tridimensionales pero que a su vez es constante y característica para cada línea celular. (Selby et al., 2017; Świerczewska et al., 2023) Este grado de heterogeneidad estructural es importante porque permite reproducir gradientes de nutrientes, oxígeno y metabolitos que se observan en tumores reales, representando microambientes internos con distintas tasas proliferativas y estados celulares que se generan en directa respuesta al gradiente de nutrientes y por tanto a la disponibilidad de estos. (Hanahan & Weinberg, 2011; Liao et al., 2014; Guillaumond et al., 2015)

Al analizar la eficacia de doxorubicina, cisplatino y carboplatino en 2D frente a 3D, emergen diferencias notables: en monocapa la OVCAR-3 exhibió un efecto citotóxico casi total con doxorubicina, mientras que en esferoides solo ocurre una disminución parcial del tamaño de este, sugiriendo que la penetración del fármaco o la capacidad de muerte celular se ve parcialmente limitada en 3D dada la disposición y arquitectura de matriz extracelular que dificulta el contacto de los fármacos de manera uniforme con las células como ocurre en el cultivo monocapa. (Friedrich et al., 2009; Ro et al., 2022; Thorn et al., 2011) En SKOV-3, la respuesta pasó de un efecto parcialmente citotóxico en 2D a un efecto predominantemente citostático en 3D, sin reducción de volumen observable. Para cisplatino y carboplatino, los esferoides OVCAR-3 respondieron con una reducción sostenida del tamaño desde concentraciones bajas, mientras que los esferoides SKOV-3 requirieron concentraciones más elevadas para manifestar efecto y, en rangos intermedios, exhibieron directamente una inhibición del crecimiento. (Damia & Brogini, 2019; Tadić et al., 2024) Este patrón produjo IC50 superiores en SKOV-3

frente a OVCAR-3 para los tres fármacos, confirmando la resistencia intrínseca incrementada en el entorno tridimensional. Comparados con estudios clínicos, estos resultados reflejan los desafíos terapéuticos del cáncer de ovario: las pacientes con tumores resistentes a platinos suelen presentar recaídas tempranas, y la eficacia clínica de cisplatino y carboplatino a menudo se ve limitada por la heterogeneidad tumoral y la inducción de mecanismos de resistencia. (Ledermann et al., 2021; Havasi et al., 2023; Damia & Brogini, 2019)

Por tanto, los resultados in vitro aquí observados acercan el modelo experimental a las realidades clínicas donde además no es difícil el plantear que mediante las mismas biopsias provenientes de pacientes diagnosticadas con cancer de ovario puedan usarse para generar esferoides celulares y mediante estos realizar un testeo de fármacos para evaluar el mejor tratamiento posible acercando así una medicina mas personalizada. (Ford et al., 2020; Fantacuzzi et al., 2023; Ro et al., 2022)

En cuanto a como se ve afectado el metabolismo al cambiar de un modelo tradicional en monocapa a esferoides 3D, los resultados muestran varios puntos interesantes. Dentro de los datos obtenidos, se observó una marcada sobreexpresión de LDHA, una ligera elevación de HK2 y PKM, mientras que GLUT1 aumentó su expresión en aproximadamente 1,5 veces en los esferoides OVCAR-3 pero disminuyó en los SKOV-3. (Xintaropoulou et al., 2018; Liberti & Locasale, 2016; Icard et al., 2018) En el metabolismo lipídico, FASN se elevó alrededor de 3 veces en SKOV-3 mientras que en OVCAR-3 disminuyó en aproximadamente 2 veces; por su parte, CD36 aumentó al doble en los esferoides OVCAR-3 y disminuyó fuertemente en SKOV-3. (Menendez & Lupu, 2007; Pascual et al., 2017; Broadfield

et al., 2021) Estos hallazgos van en directa relación con los resultados reportados previamente por nuestro laboratorio donde se observó mediante análisis metabolómico que las líneas de cáncer de ovario con resistencia mostraron un perfil de mayor dependencia lipídica y alteraciones en rutas de glicólisis y lípidos, fortaleciendo la hipótesis de que los modelos tridimensionales realzan estas adaptaciones metabólicas. (Alarcon-Zapata et al., 2023; Broadfield et al., 2021) Es más, si se analiza en mayor detalle los resultados además sugieren que en células resistentes a antineoplásicos no solo hay una reprogramación metabólica que favorece el metabolismo lipídico sino que además cuando estamos a células que son resistentes estas prefieren la síntesis de novo de compuestos lipídicos más que la captación, situación que se ve con el aumento de FASN y disminución de CD36 en los esferoides SKOV-3, mientras que cuando las células están en un etapa sensible como el caso de los esferoides OVCAR-3 prefieren un metabolismo principalmente glucídico denotado por el aumento de GLUT-1 y su metabolismo lipídico esta más relacionado a la captación que a la síntesis dada su sobreexpresión de CD36. (Menendez & Lupu, 2007; Pascual et al., 2017; Xintaropoulou et al., 2018) Esta reprogramación sugiere que en el contexto 3D estas alteraciones se ven exacerbadas dado las diferencias en la accesibilidad a nutrientes, gases y variaciones en el pH en las distintas subpoblaciones que conforman el modelo de esferoides. (Guillaumond et al., 2015; Hanahan & Weinberg, 2011) Estas adaptaciones metabólicas podrían reducir la eficacia de fármacos al limitar la generación de estrés oxidativo o favorecer mecanismos de reparación celular. (Kroemer & Pouyssegur, 2008; Icard et al., 2018)

El microambiente del esferoide juega un rol fundamental en estas diferencias: la presencia de hipoxia, acidosis relativa, menor difusión de nutrientes y la organización celular compacta establecen barreras físicas y químicas al fármaco, creando zonas menos accesibles y células en estado de baja proliferación que evaden el efecto citotóxico. Además, los gradientes de pH y metabolitos pueden alterar la carga iónica y la permeabilidad celular, modulando la efectividad de los agentes. (Liao et al., 2014; Friedrich et al., 2009; Hanahan & Weinberg, 2011) En este estudio, además se apuntó a ver como la depleción de glutatión un metabolito clave en la detoxificación de fármacos y en la regulación del estrés oxidativo afectaba a los esferoides celulares. De la generación de esferoides con células depletadas de glutatión se observó que en el caso de SKOV-3 generaron esferoides de menor tamaño que los obtenidos en condiciones normales y mantuvieron su volumen casi constante con el paso del tiempo indicando que la ausencia o en su defecto la mínima actividad proliferativa de las células del esferoide mientras que en el caso de las células OVCAR-3 depletadas de glutatión no fueron capaces de formar esferoides, quedando células dispersas sin agregarse. (Traverso et al., 2013; Mardones et al., 2012) Esto evidencia que la capacidad antioxidante es esencial para la supervivencia celular y para mantener la integridad estructural del esferoide en presencia de estrés farmacológico situación donde con el solo hecho de depletar glutatión se obtuvieron esferoides con tamaños cercanos a la mitad de lo que normalmente se tienen en condiciones normales situación que además es importante al considerar que la disminución de tamaño de esas dimensiones fue alcanzada con los agentes antineoplásicos evaluados en esta investigación a concentraciones elevadas sugiriendo que el glutatión y la modulación de los perfiles

metabólicos podrían ser estudiados como posibles blancos terapéuticos para abordar la resistencia farmacológica y diseñar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cancer. (Traverso et al., 2013; Zhang et al., 2023; Alarcon-Zapata et al., 2023) A su vez, en concordancia con lo reportado en otras líneas celulares tumorales (Traverso et al., 2013; Ortega et al., 2021), la incapacidad de neutralizar especies reactivas puede comprometer las rutas de reparación del daño y sensibilizar células a la muerte inducida por quimioterapia. (Traverso et al., 2013; Ortega et al., 2021)

Con estos antecedentes, no está de más recalcar la importancia y el gran aporte que presentarían desde el punto de vista preclínico, dado que los resultados apuntan a que debe discutirse que los esferoides deben incorporarse como plataforma un modelo importante en etapas tempranas del desarrollo de fármacos oncológicos, dado que es posible observar una mayor resistencia que los modelos 2D no revelan donde muchas veces se sobreestiman los resultados ante la falta de representatividad de sistemas biológicos traduciéndose en que finalmente al ver en perspectiva el total de los nuevos compuestos que se desarrollan para tratar el cancer, tan solo un 10% lleguen finalmente a los pacientes. (Costa et al., 2016; Friedrich et al., 2009; Gillet et al., 2013; Ro et al., 2022)

Por otro lado el hecho de considerar combinaciones terapéuticas que incluyan agentes antineoplásicos junto con moduladores metabólicos o reguladores del estado redox podrían mejorar la eficacia y el éxito terapéutico en los tratamientos. Además no sería la primera vez que se plantean nuevos enfoques y abordajes combinados por ejemplo algunos estudios enfocados en inmunoterapia han

planteado el uso de antiinflamatorios en combinación con terapia citotóxica, específicamente con inhibidores de COX-2 en esta línea un estudio publicado en Nature communications mostro que la inducción de COX-2/PGE₂ por células tumorales que mueren puede limitar la inmunidad antitumoral, y cuyos resultados sugieren que justamente al inhibir COX-2 se puede mejorar respuestas a terapias citotóxicas. (Le Saux et al., 2021; Chiurchiù et al., 2018)

Por otro lado, desde una perspectiva más clínica, si los perfiles de resistencia responden a adaptaciones en el metabolismo teniendo células resistentes con un preferencia hacia una vía más lipídica y sensibles hacia una vía más glucolítica, es que puede plantearse la posibilidad de explorar ajustes nutricionales como complemento terapéutico de tal manera que por ejemplo se limite la disponibilidad de sustratos como carbohidratos simples u otros precursores lipídicos en combinación con compuestos inhibidores de la lipogénesis, mientras que se mantiene un aporte balanceado de glucosa y macronutrientes en general podría favorecer al abordaje terapéutico. (Menendez & Lupu, 2007; Pascual et al., 2017; Xintaropoulou et al., 2018) Esto se ve respaldado por estudios donde se realizaron intervenciones que modulan la lipogénesis o la captación de glucosa observándose alteraciones en la proliferación y supervivencia de células tumorales (Menendez & Lupu, 2007; Pascual et al., 2017), lo que respalda la opción de que un enfoque nutricional personalizado, dirigido a influir en la preferencia metabólica del tumor donde por ejemplo en el contexto del cancer de ovario se suplemente la vía glucolítica para mantener las células tumorales en un estado sensible y evitar a toda cosa una reprogramación metabólica a un metabolismo lipídico que se ha

demostrado que se relaciona con un fenotipo resistente siendo esto una posible forma de potenciar la respuesta a la quimioterapia. (Menendez & Lupu, 2007; Pascual et al., 2017; Broadfield et al., 2021)

Finalmente, la utilización de esferoides como modelo intermedio entre los cultivos 2D y los sistemas más complejos, como los modelos animales, no solo permite reducir significativamente el uso de organismos vivos en la investigación, sino que también incrementa la precisión en la predicción de la eficacia terapéutica y promueve un avance más ágil y rápido en el desarrollo de nuevos fármacos. (Costa et al., 2016; Fantacuzzi et al., 2023; Ro et al., 2022; Ford et al., 2020) Asimismo, este enfoque facilita la traslación de hallazgos metabólicos a estrategias terapéuticas más efectivas, ofreciendo un marco más representativo del microambiente tumoral en cáncer de ovario y potenciando el desarrollo de tratamientos personalizados basados en la biología tumoral y avanza así cada vez más en medicina de precisión. (Ro et al., 2022; Fantacuzzi et al., 2023)

10. CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos durante esta investigación muestran que, en primer lugar, los esferoides generados a partir de las líneas celulares OVCAR-3 y SKOV-3 de cáncer de ovario presentan una morfología característica compartida para ambas líneas celulares. Estas características coinciden con lo descrito en la literatura, correspondiendo a esferoides del tipo agregado, los cuales se caracterizan por presentar una forma redondeada con una disposición celular de compactación variable y bordes irregulares pero definidos. Por otro lado, al evaluar la respuesta de los esferoides celulares frente a agentes antineoplásicos para determinar su eficacia, se observó que en el modelo tridimensional existe una menor efectividad de los agentes en comparación con el cultivo en monocapa, siendo en este trabajo evaluados los fármacos cisplatino y carboplatino como agentes de primera línea en el tratamiento del cáncer de ovario, y doxorubicina como fármaco de segunda línea. En detalle, en monocapa la línea OVCAR-3 presentó una respuesta mayoritariamente citotóxica frente a doxorubicina, mientras que en esferoides la misma línea manifestó únicamente una disminución parcial del tamaño, indicando un efecto parcialmente citotóxico en 3D. En el caso de SKOV-3, conocida por su perfil resistente, en monocapa se observó una población minoritaria de células afectadas frente a este fármaco, mientras que en esferoides no se registró una disminución significativa de su volumen, evidenciando un efecto predominantemente citostático en 3D, distinto al parcialmente citotóxico descrito en monocapa.

Para carboplatino y cisplatino, en los esferoides de la línea OVCAR-3 se observó una reducción del tamaño desde el primer día de incubación, alcanzando aproximadamente la mitad de su condición inicial, lo que corresponde a un efecto parcialmente citotóxico diferente al observado en monocapa. Por otro lado, los esferoides SKOV-3, a menores concentraciones (0.0001 μM a 1 μM), mostraron una respuesta citostática parcial reflejada en la inhibición del crecimiento respecto a sus controles, mientras que a concentraciones más altas (10 a 100 μM para carboplatino y 100 μM para cisplatino) se observó una respuesta citotóxica parcial entre los días 3 y 7 de incubación con los respectivos agentes antineoplásicos. Estos resultados evidencian que los esferoides reproducen de mejor manera las características fisiológicas del microambiente tumoral y constituyen un modelo experimental más representativo que los cultivos convencionales en monocapa para estudios preclínicos de sensibilidad farmacológica en cáncer de ovario.

Asimismo, se realizó una comparación de la expresión de genes clave del metabolismo glucídico y lipídico, observándose en los esferoides OVCAR-3 una mayor sobreexpresión de las enzimas glucolíticas en relación con el modelo en monocapa, destacando un aumento de 1.5 veces en GLUT-1 y de aproximadamente 7 veces en LDHA. En contraste, los esferoides SKOV-3 mostraron una mayor expresión de genes asociados al metabolismo lipídico, destacando FASN con un incremento de tres veces respecto al cultivo en 2D. Además, se observó que en los esferoides OVCAR-3 la expresión de FASN disminuyó dos veces respecto al cultivo tradicional y que CD36 aumentó dos veces, mientras que en SKOV-3 la expresión de CD36 disminuyó cerca de tres veces en comparación con el modelo 2D.

Finalmente, respecto a la generación de esferoides bajo la condición de depleción de glutatión, se observó que los esferoides generados a partir de la línea celular SKOV-3 presentaron un crecimiento limitado, partiendo desde tamaños menores que los observados en condiciones normales y sin variaciones significativas a lo largo del tiempo, manteniendo su tamaño constante durante los días de incubación. En el caso de la línea OVCAR-3, no fue posible la formación de esferoides bajo depleción de glutatión, ya que las células permanecieron dispersas sin generar agregados. Estos resultados indican que el glutatión es un componente esencial para la formación y estabilidad estructural de los esferoides celulares, así como para mantener la viabilidad de las células en condiciones tridimensionales.

11. BIBLIOGRAFÍA

Alarcon-Zapata, P., Perez, A. J., Toledo-Oñate, K., Contreras, H., Ormazabal, V., Nova-Lamperti, E., Aguayo, C. A., Salomon, C., & Zuniga, F. A. (2023). Metabolomics profiling and chemoresistance mechanisms in ovarian cancer cell lines: Implications for targeting glutathione pathway. *Life sciences*, 333, 122166.

Anastasi, E., Farina, A., Granato, T., Colaiacovo, F., Pucci, B., Tartaglione, S., & Angeloni, A. (2023). Recent Insight about HE4 Role in Ovarian Cancer Oncogenesis. *Int J Mol Sci*, 24(13).

Bonifácio V. D. B. (2020). Ovarian Cancer Biomarkers: Moving Forward in Early Detection. *Advances in experimental medicine and biology*, 1219, 355–363.

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

Broadfield, L. A., Pane, A. A., Talebi, A., Swinnen, J. V., & Fendt, S. M. (2021). Lipid metabolism in cancer: New perspectives and emerging mechanisms. *Developmental cell*, 56(10), 1363–1393.

Chiurchiù, V., Leuti, A., & Maccarrone, M. (2018). Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. *Frontiers in immunology*, 9, 38.

Cornelison, R., Llaneza, D. C., & Landen, C. N. (2017). Emerging Therapeutics to Overcome Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer: A Mini-Review. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2171.

Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2016). 3D tumor spheroids: An overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1427–1441.

Damia, G., & Brogгинi, M. (2019). Platinum Resistance in Ovarian Cancer: Role of DNA Repair. *Cancers*, 11(1), 119.

De Jong D, Thangavelu A, Broadhead T, Chen I, Burke D, Hutson R, et al. Prerequisites to improve surgical cytoreduction in FIGO stage III/IV epithelial ovarian cancer and subsequent clinical ramifications. *J Ovarian Res.* 2023;16:214.

Dish, C. C. (2020). A new dimension of cell culture: the rise of spheroid culture systems. *Cell Culture Dish*. <https://cellculturedish.com/cell-culture-spheroid-culture-systems/>

Dochez, V., Caillon, H., Vaucel, E., Dimet, J., Winer, N., & Ducarme, G. (2019). Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *Journal of ovarian research*, 12(1), 28.

Du, Q., Liu, P., Zhang, C., Liu, T., Wang, W., Shang, C., Wu, J., Liao, Y., Chen, Y., Huang, J., Tan, H., Zhao, Y., Xia, M., Liu, J., & Yao, S. (2022). FASN promotes lymph node metastasis in cervical cancer via cholesterol reprogramming and lymphangiogenesis. *Cell death & disease*, 13(5), 488.

Du, L., Wei, N., Maiwall, R., & Song, Y. (2023). Differential diagnosis of ascites: etiologies, ascitic fluid analysis, diagnostic algorithm. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 62(7), 1266–1276.

Fantacuzzi, M., Amoroso, R., & Cesa, S. (2023). 3D ovarian cancer models: From spheroids to organoids. *Cancers*, 15(2), 334.

Ford, C. E., Werner, B., Hacker, N. F., & Warton, K. (2020). The untapped potential of ascites in ovarian cancer research and treatment. *British journal of cancer*, 123(1), 9–16.

Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*, 4(3), 309-324.

Fuertes, M. A., Alonso, C., & Pérez, J. M. (2003). Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chemical reviews*, 103(3), 645–662.

Gillet, J. P., Varma, S., & Gottesman, M. M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst*, 105(7), 452-458.

Guillaumond, F., Bidaut, G., Ouaiissi, M., Servais, S., Gouirand, V., Olivares, O., Lac, S., Borge, L., Roques, J., Gayet, O., Pinault, M., Guimaraes, C., Nigri, J., Loncle, C., Lavaut, M. N., Garcia, S., Tailleux, A., Staels, B., Calvo, E., Tomasini, R., ... Vasseur, S. (2015). Cholesterol uptake disruption, in association with chemotherapy, is a promising combined metabolic therapy for pancreatic adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(8), 2473–2478.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

Havasi, A., Cainap, S. S., Havasi, A. T., & Cainap, C. (2023). Ovarian Cancer-Insights into Platinum Resistance and Overcoming It. *Medicina (Kaunas)*, 59(3).

Icard, P., Shulman, S., Farhat, D., Steyaert, J. M., Alifano, M., & Lincet, H. (2018). How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells?. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 38, 1–11.

Kaijser J, Bourne T, Valentin L, Sayasneh A, Van Holsbeke C, Vergote I, et al. Improving strategies for diagnosing ovarian cancer: a summary of the International Ovarian Tumor Analysis (IOTA) studies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013;41:9-20.

Kim, S. J., Kim, H. S., & Seo, Y. R. (2019). Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 5381692.

Kroemer, G., & Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell*, 13(6), 472–482.

Kroeger, P. T., Jr., & Drapkin, R. (2017). Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 29(1), 26-34.

Lazzari, G., Nicolas, V., Matsusaki, M., Akashi, M., Couvreur, P., & Mura, S. (2018). Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. *Acta Biomater*, 78, 296-307.

Le Saux, O., Ray-Coquard, I., & Labidi-Galy, S. I. (2021). Challenges for immunotherapy for the treatment of platinum resistant ovarian cancer. *Semin Cancer Biol*, 77, 127-143.

Ledermann, J. A., Raja, F. A., Fotopoulou, C., Gonzalez-Martin, A., Colombo, N., & Sessa, C. (2021). Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 32(10), 1300–1323.

Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer. *Lancet*, 393(10177), 1240-1253.

Liao, J., Qian, F., Tchabo, N., Mhaweche-Fauceglia, P., Beck, A., Qian, Z., Wang, X., Huss, W. J., Lele, S. B., Morrison, C. D., & Odunsi, K. (2014). Ovarian cancer spheroid cells with stem cell-like properties contribute to tumor generation, metastasis and chemotherapy resistance through hypoxia-resistant metabolism. *PLoS one*, 9(1), e84941.

Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211–218.

Liu, P. P., Liu, J., Jiang, W. Q., Carew, J. S., Ogasawara, M. A., Pelicano, H., Croce, C. M., Estrov, Z., Xu, R. H., Keating, M. J., & Huang, P. (2016). Elimination of chronic lymphocytic leukemia cells in stromal microenvironment by targeting CPT with an antiangiogenic drug perhexiline. *Oncogene*, 35(43), 5663–5673.

Mardones, L., Zúñiga, F. A., Villagrán, M., Sotomayor, K., Mendoza, P., Escobar, D., González, M., Ormazabal, V., Maldonado, M., Oñate, G., Angulo, C., Concha, I. I., Reyes, A. M., Cárcamo, J. G., Barra, V., Vera, J. C., & Rivas, C. I. (2012). Essential role of intracellular glutathione in controlling ascorbic acid transporter expression and function in rat hepatocytes and hepatoma cells. *Free radical biology & medicine*, 52(9),

- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 763–777.
- Minsal. (2019). Resumen ejecutivo de práctica clínica de cancer de ovario epitelial. Santiago: Minsal.
- Olsen, Kathryn & Oliphant, Michael. Spread of Ovarian Cancer. *Contemporary Diagnostic Radiology* 31(20):p 1-5, September 30, 2008.
- Ortega, M. A., Fraile-Martínez, O., Asúnsolo, Á., Buján, J., & García-Honduvilla, N. (2021). Reactive oxygen species in tumor microenvironment: The dual role of oxidative stress in cancer evolution. *Frontiers in Physiology*, 12, 705575.
- Paik, E. S., Lee, Y. Y., Lee, E. J., Choi, C. H., Kim, T. J., Lee, J. W., Bae, D. S., & Kim, B. G. (2015). Survival analysis of revised 2013 FIGO staging classification of epithelial ovarian cancer and comparison with previous FIGO staging classification. *Obstetrics & gynecology science*, 58(2), 124–134.
- Pascual, G., Avgustinova, A., Mejetta, S., Martín, M., Castellanos, A., Attolini, C. S. & Benitah, S. A. (2017). Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. *Nature*, 541(7635), 41–45.
- Rakina, M., Kazakova, A., Villert, A., Kolomiets, L., & Larionova, I. (2022). Spheroid Formation and Peritoneal Metastasis in Ovarian Cancer: The Role of Stromal and Immune Components. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 6215.
- Rakina, M., Tiourina, A., & Sokolov, I. (2022). Tumor spheroids in ascitic fluid: The role in peritoneal dissemination of ovarian carcinoma. *Cancers*, 14(9), 2156
- Ro, J. Y., Lee, K. H., Kim, Y. K., & Park, J. H. (2022). Advances in ovarian cancer 3D culture systems and their application to drug response evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9054.
- Selby, M., Patel, S., & Liu, Y. (2017). Morphological and molecular characterization of ovarian cancer spheroids for therapeutic screening. *Cancer Cell International*, 17(1), 120.
- Slatnik, C. L., & Duff, E. (2015). Ovarian cancer: Ensuring early diagnosis. *Nurse Pract*, 40(9), 47-54.
- Stewart, C., Ralyea, C., & Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs*, 35(2), 151-156.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71(3), 209-249.

- Świerczewska, M., Kiełbik, A., Płaczkiewicz, K., & Mazurek, M. (2023). 3D ovarian cancer spheroids as in vitro models for drug screening: Morphology, viability and drug resistance. *Cells*, *12*(5), 814.
- Tadić, V., Zhang, W., & Brozovic, A. (2024). The high-grade serous ovarian cancer metastasis and chemoresistance in 3D models. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, *1879*(1), 189052.
- Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, *21*(7), 440–446.
- Tofani, L. B., Abriata, J. P., Luiz, M. T., Marchetti, J. M., & Swiech, K. (2020). Establishment and characterization of an in vitro 3D ovarian cancer model for drug screening assays. *Biotechnology progress*, *36*(6), e3034.
- Torre, L. A., Trabert, B., DeSantis, C. E., Miller, K. D., Samimi, G., Runowicz, C. D., Gaudet, M. M., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2018). Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, *68*(4), 284-296.
- Traverso, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato, M. A., Marinari, U. M., & Domenicotti, C. (2013). Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2013*, 972913.
- Vergote, I., Gonzalez-Martin, A., Ray-Coquard, I., Harter, P., Colombo, N., Pujol, P., Lorusso, D., Mirza, M. R., Brasiuniene, B., Madry, R., Brenton, J. D., Ausems, M., Buttner, R., Lambrechts, D., & European experts' consensus, g. (2022). European experts consensus: BRCA/homologous recombination deficiency testing in first-line ovarian cancer. *Ann Oncol*, *33*(3), 276-287.
- World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. WHO; 2020. Accessed December 11, 2020. who.int/data/gho/data/theme-s/mortality-and-global-health-estimates/gh-leading-cause-of-death
- Xintaropoulou, C., Ward, C., Wise, A., Queckborner, S., Turnbull, A., Michie, C. O., Williams, A. R. W., Rye, T., Gourley, C., & Langdon, S. P. (2018). Expression of glycolytic enzymes in ovarian cancers and evaluation of the glycolytic pathway as a strategy for ovarian cancer treatment. *BMC cancer*, *18*(1), 636.
- Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, *246*(16), 1791-1801.
- Zhang, R., Siu, M. K. Y., Ngan, H. Y. S., & Chan, K. K. L. (2022). Molecular Biomarkers for the Early Detection of Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*, *23*(19).
- Zhang, L. H., Tang, M., Tao, X., Shao, Q., Thomas, V., Shimizu, S., Kasano, M., Ishikawa, Y., Inukai, T., & Nomura, D. K. (2023). Covalent Targeting of Glutamate Cysteine Ligase to Inhibit Glutathione Synthesis. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, *24*(23), e2023003

12. ANEXO

CLASIFICACION Y MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS

TRATAMIENTO DE DESECHOS BIOLÓGICOS

Se seguirá la normativa vigente según:

Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos

Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos Universidad de Concepción

www.udec.cl/matpel



Anexo: 7352/3330/1591, email: matpel@udec.cl

Segregación y almacenamiento de residuos biológicos






- Los residuos biológicos deben segregarse en residuo biológico (tipo 1), residuo biológico cortopunzante (tipo 2), residuo bio-inerte (tipo 3), residuo cortopunzante inerte (tipo 4) o residuo microbiológico (tipo 5) (ANEXO8.5).
- Se deben utilizar los envases proporcionados por la Unidad RESPEL según se indica a continuación.
- Los residuos de tipo 1 deben ser almacenados en bolsas amarillas, y los de tipo 2 en cajas amarillas, ambos a temperaturas inferiores a 4°C. El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa y la Unidad RESPEL, de acuerdo con el

decreto N°6/2009, “Reglamento sobre Manejo de Residuos de Establecimientos de Atención de Salud (REAS)”. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la Unidad RESPEL.

- Los residuos de tipo 3 deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retiradas por la Unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico.
- Los residuos de tipo 4 serán almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como “Cortopunzante inerte”, hasta ser retirados por la Unidad RESPEL para su disposición final.
- Los residuos de tipo 5 deben ser entregados a la Unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La Unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación.

 Universidad de Concepción	INSTRUCTIVO Clasificación y manejo de residuos peligrosos		Código: I-01 v02
			Página 19 de 23

ANEXO 8.5 Clasificación y manejo de residuos biológicos

Tipo de Residuo	Definición	Almacenamiento y Retiro	Contenedor o bolsa
Residuos biológicos (tipo 1)	Corresponden SOLO a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Bolsa de autoclave amarilla 
Residuos cortopunzantes biológicos (tipo 2)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Caja cortopunzante amarilla 
Residuos bio-inertes (tipo 3)	Corresponden a animales o restos de animales de experimentación que <u>NO</u> están contaminados con bacterias o virus patógenos u otras sustancias peligrosas.	Deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retiradas por la unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico.	Bolsa para residuos inertes color negro 
Residuos cortopunzantes inertes (tipo 4)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que <u>NO</u> han estado en contacto con tejidos humanos, restos de tejidos humanos, fluidos humanos (sangre, orina), ni restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como "Cortopunzante inerte", hasta ser retirados por la unidad RESPEL para su disposición final	Contenedor plástico 4 u 8 kg 
Residuos microbiológicos (tipo 5)	Corresponden a materiales de cultivo que han estado en contacto con bacterias no patógenas y que han sido inactivados por esterilización con autoclave o por desinfección en un baño con solución de hipoclorito de sodio.	Deben ser entregados a la unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación.	Bolsa de autoclave transparente o blanca (solo para autoclave) 

(*) El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa Stericycle y la unidad RESPEL. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la unidad RESPEL.

Instructivo elaborado en colaboración con la Facultad de Ciencias Biológicas.