



# Comparación del crecimiento y morfología de esferoides tumorales obtenidos por agitación mecánica



L. Alemán Miranda<sup>1</sup>, M. Valenzuela Reyes<sup>1</sup>, C. Chapa González<sup>1</sup>, L. Valencia Gómez<sup>1</sup> y P. García Casillas<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Instituto de Ingeniería y Tecnología de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

## Resumen

Los esferoides tumorales (ET) son tejidos de forma esferoidal que replican las funciones del fenotipo canceroso de origen. En los últimos años se ha puesto de manifiesto la necesidad de disponer de nuevos métodos que permitan cultivar células en 3D. Esto con el fin de permitir un importante avances en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer en el grupo de investigación de nanomedicina en la UACJ. Actualmente, los métodos para la obtención de cultivos tridimensionales no buscan conocer el efecto que estos tienen sobre las características de dichos cultivos. Por ello es importante la obtención de ET utilizando distintos tiempos de agitación mecánica, así como de diferentes aditivos para su síntesis. Con este trabajo se aporta un CPK que determinó un tiempo de agitación de 6 min, así como también, utilizar el RPMi-1640 como aditivo, siendo estas las condiciones idóneas para desarrollar eficazmente ET.

## Introducción

Los ET representan un modelo novedoso para analizar la efectividad de nuevos fármacos y sistemas de nanomedicina. Sin embargo, los ET no poseen las mismas funciones que un tumor *in vivo* debido a la falta de vascularización. Además, éstos presentan un metabolismo inverso relacionado con las tres zonas específicas que forman su estructura (de proliferación, de senescencia y necrótica) (Figura 1). Actualmente el estudio de ET se realiza principalmente de manera cualitativa. Lo anterior, debido a que los métodos para obtener cultivos celulares se encuentran estandarizados para cultivos en dos dimensiones (monocapas celulares); tampoco se cuentan con suficientes estudios estadístico del desarrollo *in vitro* de los ET [1]. Por ello, se propuso evaluar estadísticamente el crecimiento y la morfología de los ET para conocer la relación de estas propiedades con cuatro métodos de obtención que combinaron la agitación mecánica con dos aditivos agarosa (metodología de W. Wang *et al.* 2015) [2] y RPMi1640 (metodología de M. Blunden *et al.* 2016)[3].

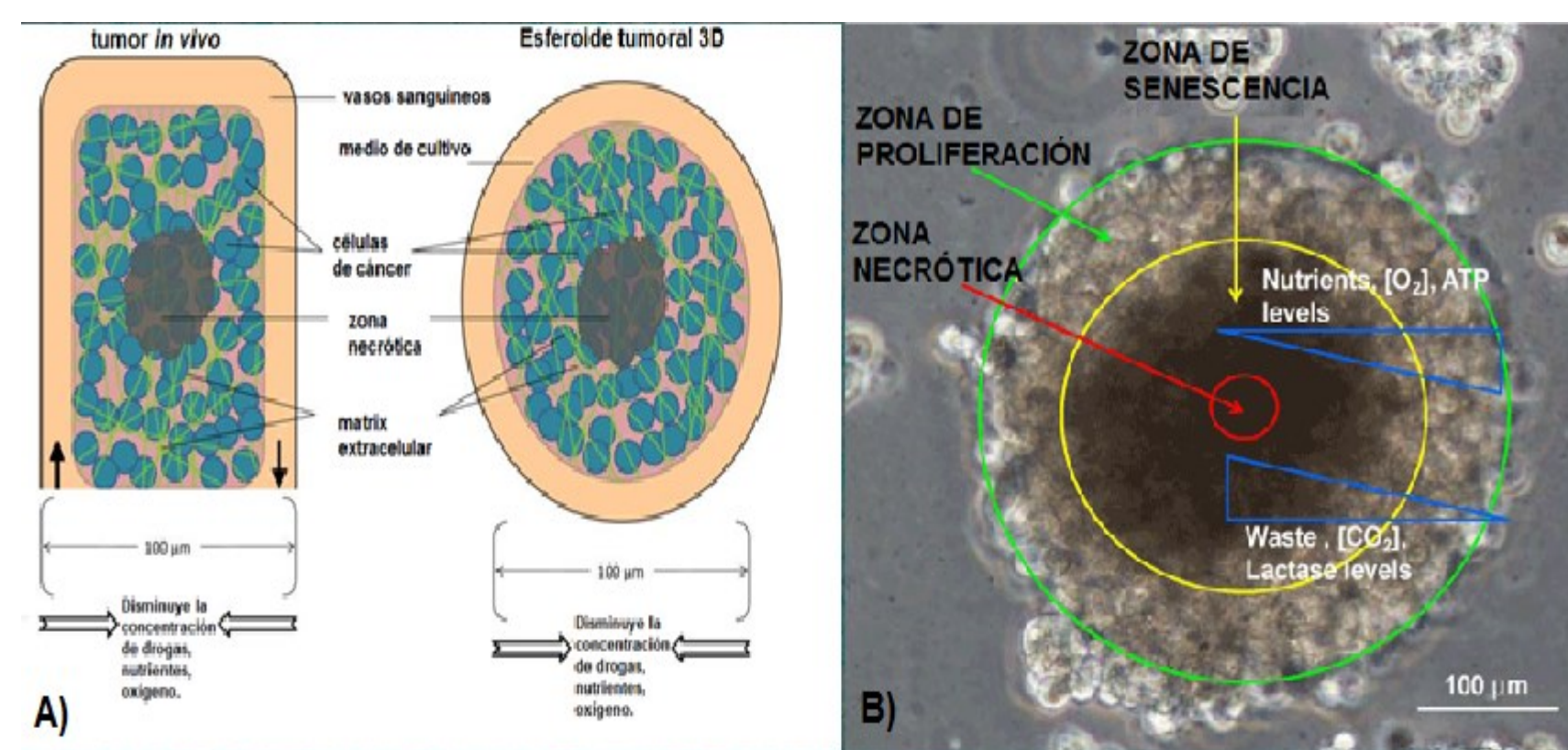


Figura 1. A) Comparativo del metabolismo y catabolismo de un tumor *in vivo* y un ET. B) Zonas específicas de los ET y como se relacionan

## Objetivos

### Objetivo General

- Evaluar las combinaciones del método de agitación con agarosa y RPMi-1640 sobre la obtención y las características estructurales de los ET.

### Objetivos Específicos

- Combinar agarosa y RPMi-1640 con cada método a utilizar para la obtención de ET.
- Comparar las características de los ET obtenidos con cada método.
- Evaluar la morfología, crecimiento, población celular, viabilidad y resistencia mecánica de los ET obtenidos con cada método.
- Analizar los ET obtenidos con cada método mediante un análisis estadístico.

| Método               | Día | Muestras | Medio (µm) | Desviación estándar (µm) | Varianza |
|----------------------|-----|----------|------------|--------------------------|----------|
| Método A - agarosa   | 1   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
|                      | 2   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
|                      | 3   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
| Método A - RPMi-1640 | 1   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
|                      | 2   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
|                      | 3   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
| Método B - agarosa   | 1   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
|                      | 2   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
|                      | 3   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
| Método B - RPMi-1640 | 1   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
|                      | 2   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |
|                      | 3   | 10       | 100.0      | 14.14                    | 200.0    |

Figura 2. Análisis estadístico de varianza propuesto para conocer la relación entre la proliferación celular y la varianza.

## Metodología

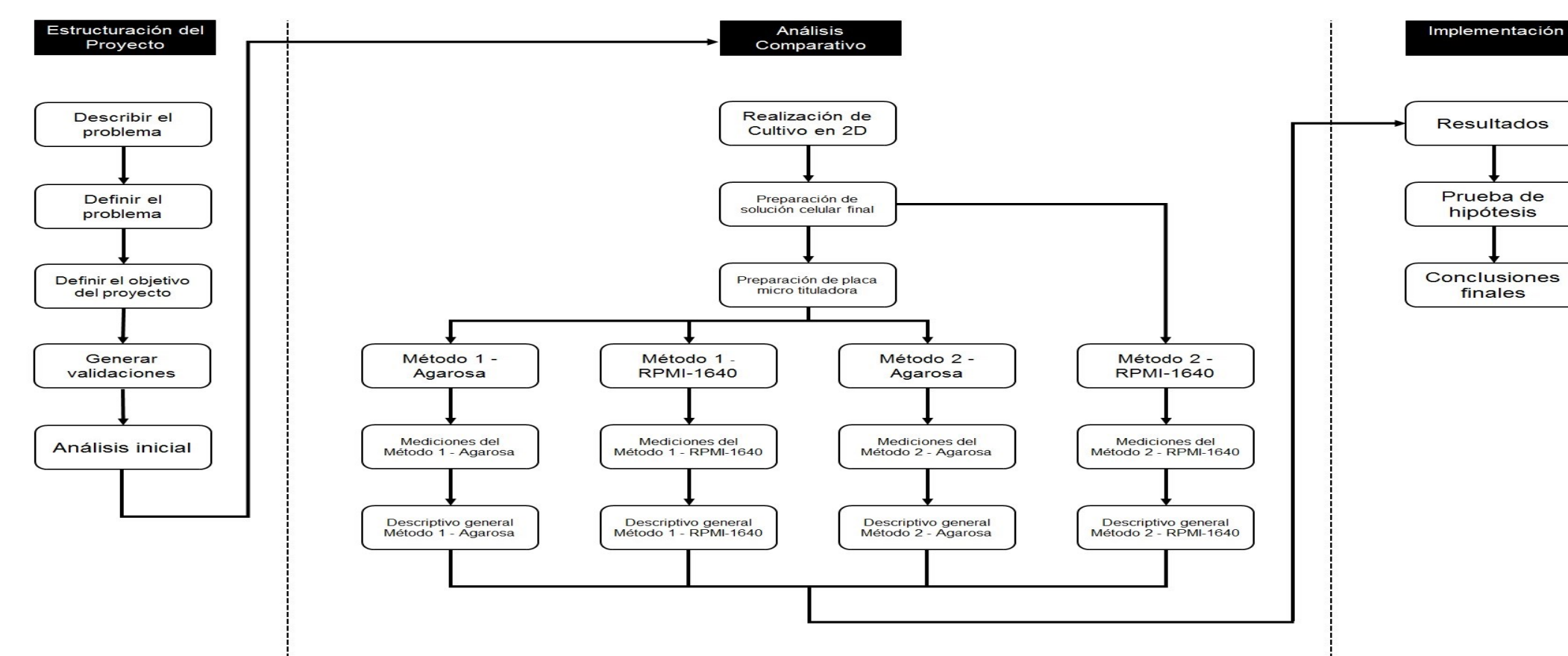


Figura 3. Metodología propuesta para el proyecto.

La morfología de los ET se analizó en el microscopio compuesto; la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de dibromuro-tetrazolol (MTT) y la resistencia a la compresión mecánica a través de análisis mecánico dinámico (DMA). Enseguida, los cuatro métodos se compararon estadísticamente para contrastar las propiedades de los ET (Figura 4).

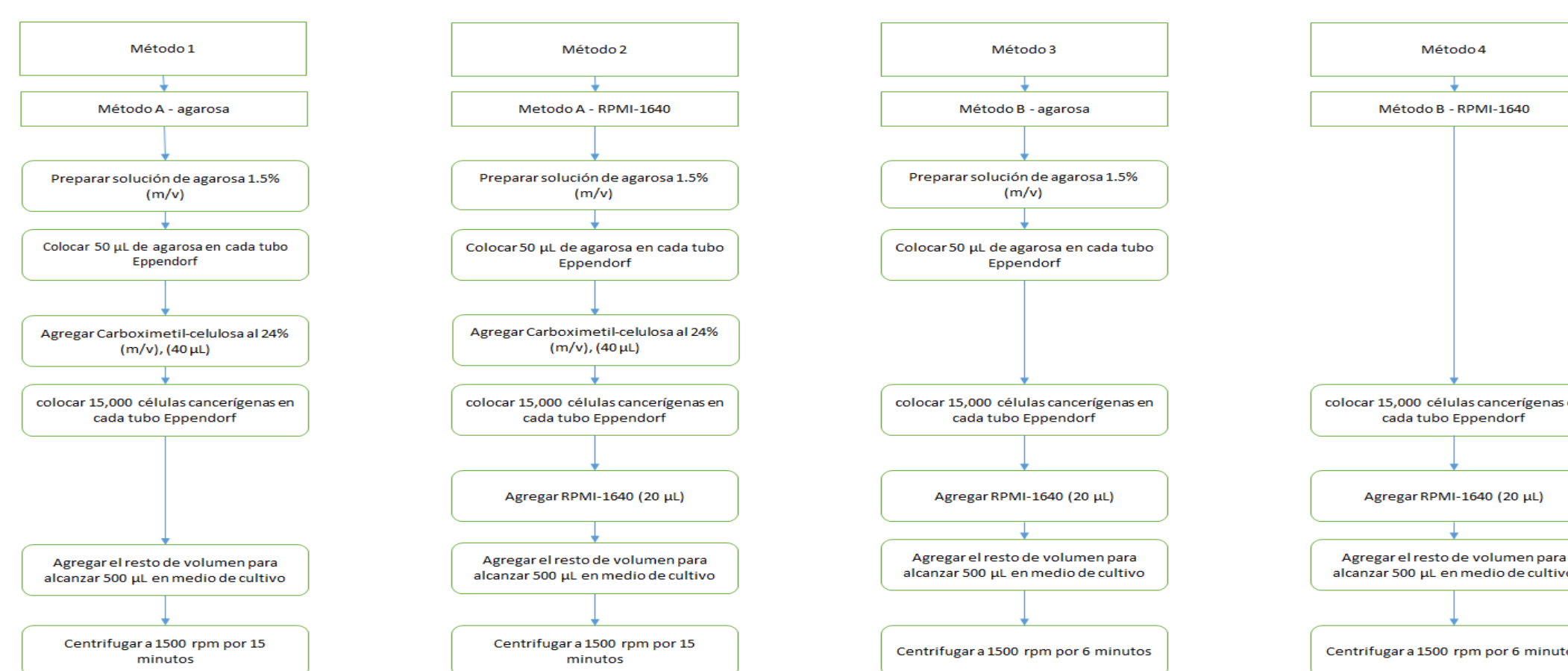


Figura 4. Cuatro métodos de obtención de ET a comparar.

## Resultados

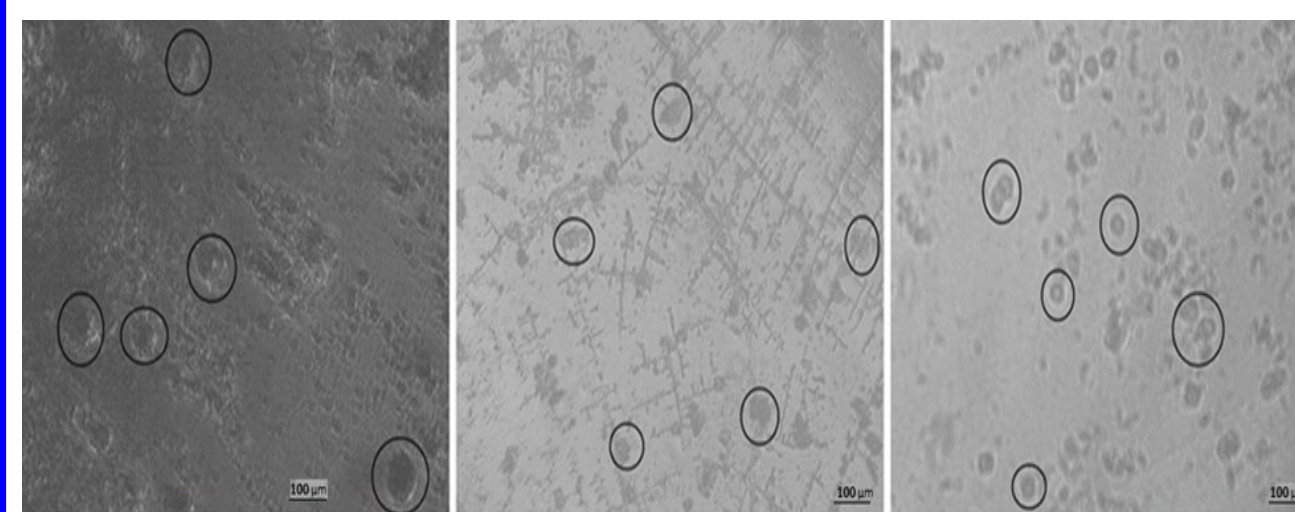


Figura 5. Efecto de encapsulación generado por la agarosa en los primeros tres métodos de obtención.

La agarosa encapsuló los ET en los métodos 1, 2 y 3; lo cual evitó que alcanzaran el diámetro mínimo esperado (300 µm). Además, modificó su morfología formando ET no uniformes.

La clasificación de la morfología de los ET se agrupó en uniformes y no uniformes. El método 4 fue el único que presentó morfología uniforme en función del tiempo (Figura 6).

## Resultados

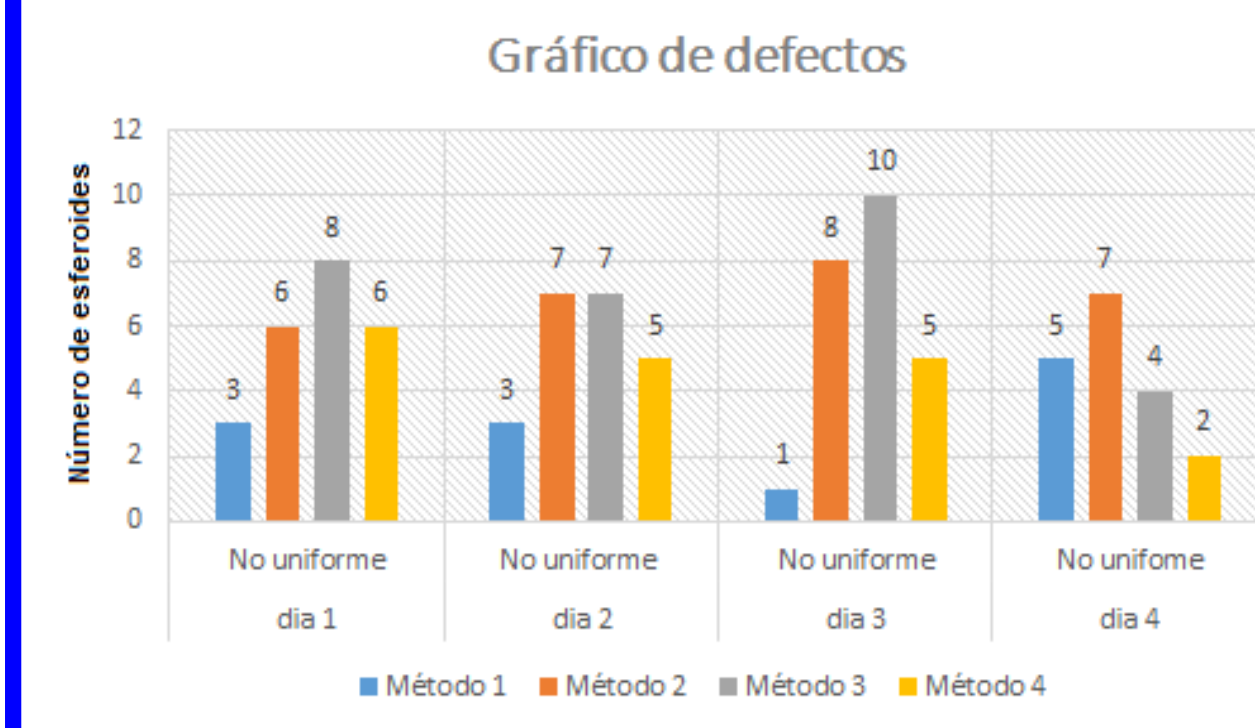


Figura 6. En el análisis de atributos de la morfología se observó una tendencia de decrecimiento en la formación de ET no uniformes con el método 4.

El análisis de intervalos e índice de capacidad de proceso para el diámetro y crecimiento de los ET fue el siguiente:

- Método 1: día 1: 159.1 µm, día 4: 7 µm
- Método 2: día 1: 145.5 µm, día 4: 89.7 µm
- Método 3: día 1: 140.7 µm, día 4: 92.3 µm
- Método 4: día 1: 686.6 µm, día 4: 1550 µm

Por lo tanto, al considerar el crecimiento y la morfología obtenidos el método mas eficiente es el método 4 (Figura 7).

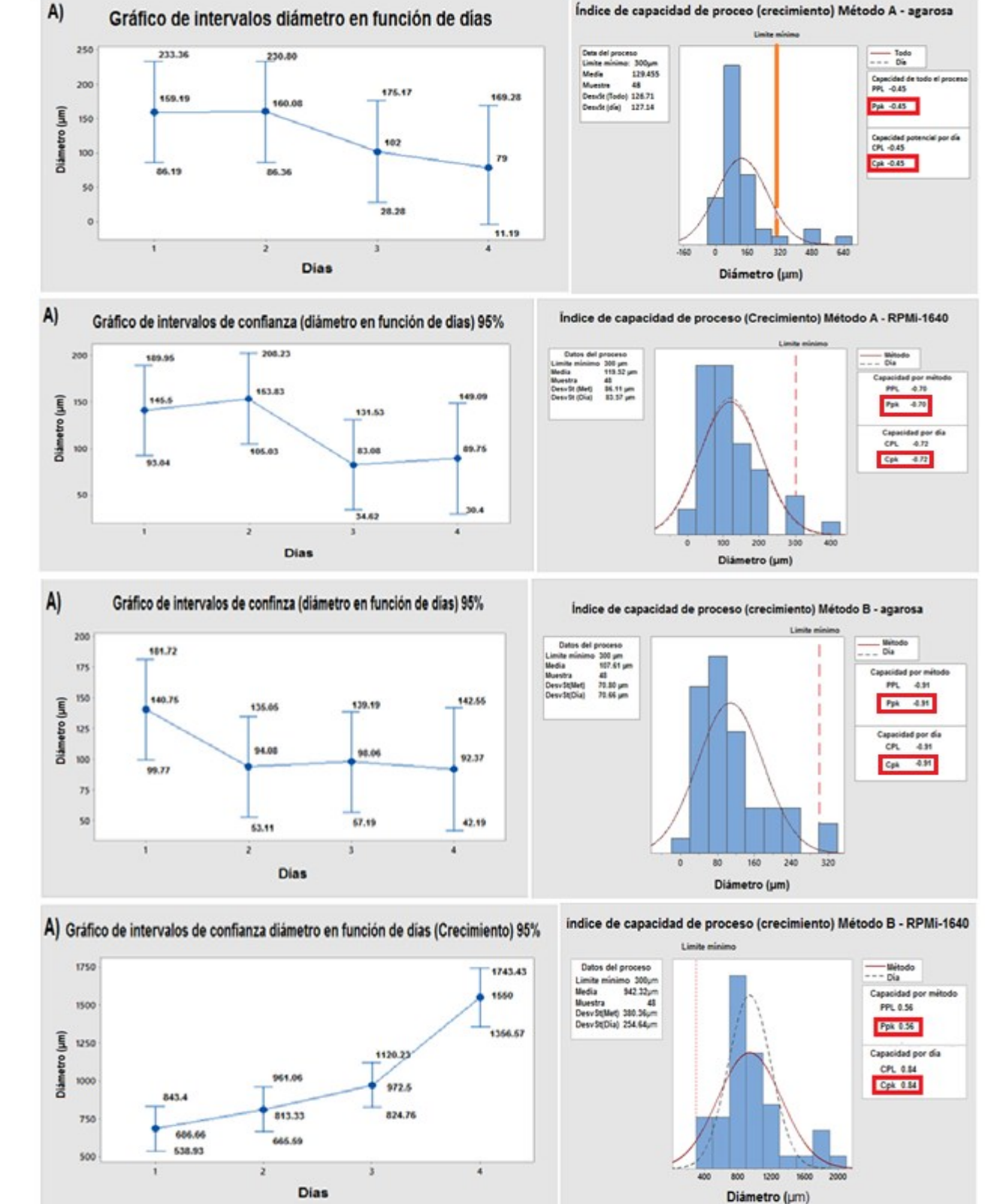


Figura 7. Comparativo del crecimiento y diámetro de los ET obtenidos por los cuatro métodos.

## Conclusiones

La agarosa y el medio RPMi-1640 al servir como aditivos tienen un efecto significativo sobre las propiedades de los ET. Se encontró que los tubos Eppendorf tienen un efecto en el rendimiento de la agarosa y el medio RPMi-1640 (Figura 8). En los tubos Eppendorf interactuaron la fuerza centrífuga y los aditivos esto amplificó el diámetro y rendimiento de los ET por agitación mecánica a 6 minutos y medio RPMi-1640, además, se amplificó tres veces el diámetro de los ET de la metodología M. Blunden *et al.* 2016 (Figura 9).

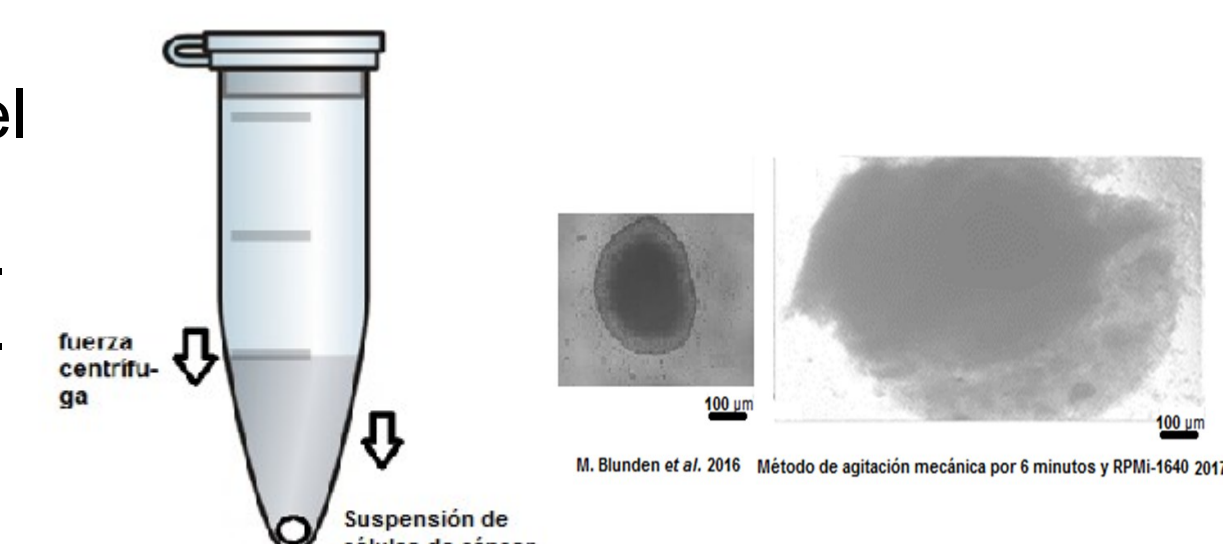


Figura 8. Efecto de los tubos Eppendorf.

Figura 9. Mejora de la metodología de M. Blunden *et al.* 2016

## Referencias

- [1] R. Akasov, A. Gileva, D. Zaytseva-Zotova, S. Burov, I. Chevalot, E. Guedon and E. Markvicheva, "3D *in vitro* co-culture models based on normal cells and tumor spheroids formed by cyclic RGD-peptide induced cell self-assembly", *Biotechnology Letters*, vol. 39, no. 1, pp. 45-53, 2016.
- [2] W. Wang, M. Dang, Z. Zhang, J. Hu, T. Eyster, L. Ni and P. Ma, "Dentin regeneration by stem cells of apical papilla on injectable nanofibrous microspheres and stimulated by controlled BMP-2 release", *Acta Biomaterialia*, vol. 36, pp. 63-72, 2015.
- [3] M. Blunden, H. Lu and M. Stenzel, "Enhanced Delivery of the RAPTA-C Macromolecular Chemotherapeutic by Conjugation to Degradable Polymeric Micelles", *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 12, pp. 4177-4188, 2013.