



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias Químicas
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

**“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EN UN MODELO
CELULAR 3D DE CÁNCER CERVICOUTERINO”**

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias Farmacobiológicas

PRESENTA

Lic. Enf. Ana Jared Tenorio Salazar

DIRECTORA

Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana

CO-DIRECTOR

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

San Luis Potosí, S.L.P

diciembre 2021

Proyecto realizado en:

Unidad de Innovación en Diagnóstico celular y molecular de la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (Ciacyt) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



“El programa de Maestría en Ciencias Farmacológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 003382, en el Nivel en desarrollo. Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 760293



"EVALUACIÓN IN VITRO DE FÁRMACOS ANTINEOPLASICOS EN UN MODELO CELULAR 3D DE CÁNCER CERVICOUTERINO by Ana Jared Tenorio Salazar is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias Químicas
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

“EVALUACIÓN *IN VITRO* DE FÁRMACOS ANTINEOPLASICOS EN UN MODELO CELULAR 3D DE
CÁNCER CERVICOUTERINO”

Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Farmacobiológicas

PRESENTA

Lic. Enf. Ana Jared Tenorio Salazar

Comité tutorial

Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana
Directora
Catedrático CONACYT
Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT)

Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Co-Directora
Laboratorio de Inmunología y Biología Celular y Molecular
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Dr. José Pérez Urizar
Asesor
Lab. Farmacología
Fac. Ciencias Químicas, UASLP

Dr. Francisco Javier Pérez Vázquez
Asesor
Catedrático CONACYT
CIACYT-MEDICINA, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

San Luis Potosí, S.L.P.

Noviembre 22, 2021

Comité Académico del Posgrado

En Ciencias Farmacobiológicas

Facultad de Ciencias Químicas / UASLP

Presente._

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría L.E. Ana Jared Tenorio Salazar, titulada “EVALUACIÓN *IN VITRO* DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EN UN MODELO CELULAR 3D DE CÁNCER CERVICOUTERINO”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 8 de diciembre de 2021 a las 12 hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.

ATENTAMENTE

Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana _____

Director de Tesis

Dra. Diana Patricia Portales Pérez _____

Co-Director

Dr. José Trinidad Pérez Urizar _____

Asesor

Dr. Francisco Javier Pérez Vázquez _____

Asesor

Para mi Mamá, por confiar siempre en mí.

RESUMEN

Introducción: El cáncer cervicouterino es el segundo cáncer más común en la población mexicana femenina. Los regímenes de quimioterapia en esta situación se asocian con una toxicidad sustancial, una eficacia deficiente. Por este panorama, es necesario explorar nuevos citotóxicos, terapias y combinaciones farmacológicas. Un modelo *in vitro* ideal para el estudio de fármacos es el cultivo de Esferoides Tumorales. El modelo conserva características y funcionalidades importantes del tumor *in vivo*, permitiendo una identificación más eficiente de los fármacos que tienen efecto en células cancerígenas. **Objetivo:** Evaluar 4 fármacos antineoplásicos utilizados en el tratamiento de tumores sólidos en un modelo celular 3D (esferoides) formado a partir de células de pacientes con diagnóstico de cáncer cervicouterino. **Metodología:** Se obtuvieron 5 muestras provenientes de pacientes con cáncer cervicouterino (CaCu) obtenidas del banco de tumores del Instituto Nacional de Cancerología. Se evaluó citotoxicidad y apoptosis en interacción con antineoplásicos. Se construyeron curvas dosis-respuesta para cada uno de los fármacos. Se realizaron ensayos de tablero de ajedrez para evaluar sinergismos entre pares de fármacos. Ensayos por triplicado. Para el análisis estadístico se utilizó GraphPad Prisma V.8, las pruebas de ANOVA, y post-hoc Tukey. **Resultados:** Obtuvimos una eficacia de formación del cultivo en esferoide de 71%. La doxorubicina mostro disminuir la viabilidad significativamente ($p=0.001$). La construcción de curvas dosis-respuesta mostró variaciones en cuanto a la sensibilidad de los fármacos para cada paciente. **Conclusiones:** Nuestros resultados mostraron que el cultivo en esferoide es más resistente a los antineoplásicos que el cultivo convencional 2D y es una herramienta útil para mimetizar respuestas *in vivo*. Cada paciente responde de manera diferente a los tratamientos administrados, sugiriendo que un tratamiento personalizado tiene el potencial para mejorar la respuesta a la quimioterapia de las pacientes con CaCu.

Palabras clave: Modelo celular 3D, Esferoides Tumorales, Fármacos antineoplásicos, Cáncer Cervicouterino.

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is the second most common cancer in the female Mexican population. Chemotherapy regimens are associated with substantial toxicity, poor efficacy. Due to this panorama, it is necessary to explore new cytotoxic drugs, therapies, and pharmacological combinations. An ideal *in vitro* model for the study of drugs is the culture of Tumor Spheroids. The model preserves important characteristics and functionalities of the tumor *in vivo*, allowing a more efficient identification of drugs that influence cancer cells. **Objective:** To evaluate 4 antineoplastic drugs used in the treatment of solid tumors in a 3D cell model (spheroids) formed from cells of patients diagnosed with cervical cancer. **Methodology:** 5 samples were obtained from patients with cervical cancer (CaCu) obtained from the tumor bank of the National Cancer Institute. Cytotoxicity and apoptosis were evaluated in interaction with antineoplastic drugs. Dose-response curves were constructed for each of the drugs. Checkerboard tests were performed to evaluate synergisms between drug pairs. Trials in triplicate. For statistical analysis GraphPad Prisma V.8, ANOVA tests, and Tukey post-hoc tests were used. **Results:** We obtained a spheroid culture formation efficiency of 71%. Doxorubicin was shown to significantly decrease viability ($p = 0.001$). The construction of dose-response curves showed variations in the sensitivity of the drugs for each patient. **Conclusions:** Our results showed that spheroid culture is more resistant to antineoplastic agents than conventional 2D culture and is a useful tool to mimic responses *in vivo*. Each patient responds differently to the treatments administered, suggesting that personalized treatment has the potential to improve the response to chemotherapy of patients with CaCu.

Keywords: Tumor Spheroids ,3D culture, Antineoplastic drugs, CaCu.

Índice

RESUMEN.....	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
III MARCO TEORICO	8
3.1 Cáncer	8
3.2 Cáncer Cervicouterino	8
3.3 Anatomía del cuello uterino.....	9
3.4 Virus del papiloma humano.....	10
3.5 Fisiopatología del Cáncer Cervicouterino	12
3.6 Neoplasia Intraepitelial Cervical	13
3.7 Factores de Riesgo del Cáncer Cervicouterino	14
3.8 Métodos de tamizaje	15
3.9 Diagnostico	16
3.10 Clasificación FIGO.....	17
3.11 Esferoides Tumoraes Multicelulares.....	18
3.12 Antecedentes históricos de cultivos en esferoide.....	19
3.13 Principales ventajas del modelo en esferoide.....	19
3.14 Proceso de formación del esferoide	20
3.15 Esferoides formados a partir de diferentes tipos celulares	22
3.16 Modelo de cultivo en esferoides en la investigación clínica	22
3.17 Esferoides en ensayos farmacológicos.....	23
IV. HIPÓTESIS	25
V. OBJETIVOS	25
5.1 General.....	25
5.2 Específicos.....	25
VI. METODOLOGÍA	26
6.1. Tipo y diseño de estudio.....	26

6.2. Límites de espacio y tiempo.....	26
6.3 Universo y muestra.....	26
6.4 Variables	26
6.5 Cultivos monocapa	26
6.6 Cultivo de esferoides de células HeLa	27
6.7 Cultivo de esferoides tumorales a partir de muestras de pacientes CaCu.....	27
6.8 Tinción DAPI.....	27
6.9 Ensayos de viabilidad	28
6.10 Prueba de LDH citotoxicidad celular.	28
6.11 Ensayos de citotoxicidad.....	28
6.12 Ensayo para determinar adición sinergismo y antagonismo	29
6.12 Análisis estadístico.....	30
VII CONSIDERACIONES ÉTICAS	31
7.1 Nacionales	31
7.2 Internacionales	34
VIII. RESULTADOS	36
8.1 Cultivos celulares.....	36
8.2 Viabilidad y apoptosis de cultivos 3D tratados con fármacos antineoplásicos	36
Marcador no definido.	
8.3 Concentraciones Efectivas ₅₀ de fármacos antineoplásicos sobre esferoides de CaCu	
8.4 Ensayos de Tablero de ajedrez.....	
8.5 Ensayos de liberación de ALDH.....	
IX. Discusión	
X. Conclusiones.....	
XI. Agradecimientos	37
XII. Referencias	38
XIII. Anexos	44
ANEXO 1. Operacionalización de las variables	44

ANEXO 2 Carta de no conflicto de intereses	46
ANEXO 3 Carta de conformidad de autoría	47
ANEXO 4 Carta de aprobación INCAN.....	48

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer en la actualidad representa un gran reto social, debido a que su incidencia aumenta con el desarrollo económico y social de los países, puesto que a mayor esperanza de vida corresponde una mayor población en los grupos etarios en los que las neoplasias aparecen con más frecuencia, El cáncer es un problema de salud pública pues es una enfermedad con una alta morbilidad y mortalidad. Por lo que se deben poner en marcha planes de acción que van desde la prevención hasta el tratamiento de los pacientes con esta afección^(1, 2).

Actualmente el cáncer se ha convertido en la segunda causa de muerte a nivel mundial, con una incidencia de 4 millones de casos en 2020, previéndose que para el 2030 más de 1,6 millones de personas morirán por esta causa según la OPS (Organización Panamericana de la Salud), debido a los cambios demográficos y a una mayor exposición a los factores de riesgo.^(3, 4)

Aunque esta enfermedad es más frecuente en el hombre, en el grupo de edad de 25 a 50 años, las mujeres tienen la tasa de incidencia más alta, debido fundamentalmente a los cánceres ginecológicos, entre ellos, el cáncer cervicouterino que es el más frecuente del aparato genital femenino⁽¹⁾, ocupando las primeras causas de mortalidad femenina por tumores malignos según datos de GloboCan2018; en cuanto a los datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) es el segundo tipo de cáncer más frecuente en las mujeres de las regiones menos desarrolladas, se estima en 2018 unos 570 000 nuevos casos (el 84% de los nuevos casos mundiales).

La incidencia de cáncer de cuello uterino varía considerablemente de una región a otra del mundo, con diferencias de hasta 20 veces entre las incidencias más altas y bajas. Dentro de la región en general América del Norte tiene la morbimortalidad más baja, mientras en el resto de América se observa gran variabilidad⁽²⁾. A pesar de esto, en términos generales ocupa el segundo lugar dentro de todos los tipos de cánceres entre las mujeres en el mundo, precedido por el de mama, considerándose un importante problema de salud pública⁽⁵⁾.

En México, es un problema que se presenta principalmente en la población de nivel socioeconómico bajo⁽⁶⁾; y muy frecuentemente en estadios avanzados al momento del diagnóstico. Es importante mencionar que en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se iniciaron, desde 1960, actividades de detección de esta neoplasia; sin embargo, la evaluación del impacto sobre su ocurrencia y letalidad ha sido objeto de innumerables tropiezos para sistematizar una vigilancia epidemiológica permanente. A pesar de los programas de detección establecidos para enfermedad preinvasora, se continúan realizando diagnósticos tardíos, y los tratamientos resultan poco eficaces, y en ocasiones solo de tipo paliativo. Esto origina un mal pronóstico y una menor sobrevida del paciente⁽⁷⁾.

La infección por el virus del papiloma humano (HPV) es el factor etiológico considerado en el cáncer cervical y está íntimamente relacionado con la conducta sexual. Se ha demostrado que el ADN del VPH está presente en la mayoría de las lesiones intraepiteliales del tracto genital femenino y en más del 99% de los cánceres cervicales, en particular los subtipos VPH 16 y VPH 18, que se cree que causan el 70% de los casos de cáncer de cuello uterino^(2, 5).

El cáncer de cuello uterino incluye las neoplasias malignas que se desarrollan en la porción fibromuscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina. Por lo general, se trata de un cáncer de crecimiento lento que es posible que no presente síntomas pero que puede detectarse a través de pruebas de cribado^(1, 8). Por su posición anatómica el cérvix es uno de los órganos que permite de forma sencilla el examen físico por observación directa y su estudio citológico e histológico, dando lugar a una detección precoz de las lesiones premalignas, precursoras de las lesiones invasoras del cuello uterino^(9, 10).

Los médicos recurren a la estadificación histopatológica del tumor. Sin embargo, existen deficiencias de este enfoque que radican en el hecho de que los pacientes responden en forma diferente frente a la farmacoterapia, debido a factores genéticos, epigenéticos y ambientales, en donde la contribución de cada factor varía en cada

fármaco. Es por esto que la evaluación funcional del tumor individual es de mayor valor clínico que la huella molecular^(11, 12).

En los tumores sólidos existen limitaciones de la quimioterapia, principalmente a los mecanismos que median la resistencia a los fármacos a nivel celular. Las mutaciones genéticas funcionales u otros cambios que afectan la expresión de genes que codifican proteínas que influyen en la captación, el metabolismo y la excreción de fármacos.

Para que un fármaco antineoplásico elimine una alta proporción de células cancerosas en un tumor sólido, debe distribuirse por toda la vasculatura del tumor, atravesar las paredes de los vasos y atravesar el tejido tumoral. Además, debemos tomar en cuenta el microambiente tumoral que se caracteriza por gradientes marcados en la concentración del fármaco, gradientes en la tasa de proliferación celular y por regiones de hipoxia y acidez. Todo esto influye en la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento farmacológico.

La difusión de un fármaco está determinada por su gradiente de concentración en el tejido tumoral; por diversas propiedades del fármaco, incluido su tamaño, forma molecular, su solubilidad en agua y lípidos; por la composición y estructura de la matriz extracelular; que incluye tanto el metabolismo como la unión del fármaco a los componentes tisulares. En este estudio realizamos ensayos con cuatro fármacos antineoplásicos diferentes, tomando en cuenta las diferentes características físicas químicas, además cada fármaco tiene diferente mecanismo de acción y son utilizados comúnmente en la clínica para el tratamiento de tumores sólidos.

Actualmente un enfoque prometedor es probar la respuesta terapéutica de las células cancerosas obtenidas del propio tumor del paciente hacia una variedad de medicamentos. Los métodos para propagar células cancerosas varían desde monocapa de células en 2D a sistemas de cultivo en 3D. Son numerosas las áreas científicas en las que se están utilizando los esferoides como modelos de cultivo 3D

para el desarrollo de investigaciones biomédicas, moviéndonos desde los cultivos 2D hacia una nueva era de los estudios *in vitro*, la era de los cultivos en 3D^(13, 14).

El cultivo 3D representa un método con numerosas ventajas para modelar tumores de pacientes *in vitro*. Las células cancerosas viables se pueden aislar del tejido tumoral recién obtenido y, posteriormente, se exponen a fármacos terapéuticos en condiciones experimentales controladas, lo cual resulta en una alternativa dirigida hacia enfoques innovadores, asequibles, eficientes y efectivos⁽¹⁴⁾.

II. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La incidencia de cáncer de cuello uterino es heterogénea al rededor del mundo, con marcadas diferencias en la incidencia^(2, 5, 9). En cuanto a la mortalidad, las tasas son discrepantes, por diferencias en la prevalencia de los factores de riesgo^(10, 15). En este contexto, la calidad de vida de una mujer se ve profundamente afectada, considerando que son las mujeres de bajos recursos aquellas que presentan más probabilidades de morir, debido a la falta de infraestructura para la investigación y tratamiento oportuno^(2, 16).

Entre los tumores genitales femeninos, el más frecuente es el de cérvix, ubicado como el tercer cáncer más común en la población mexicana femenina⁽¹⁷⁾. Se ha destacado en los últimos años que el cáncer cervical se encuentra en franco aumento, globalmente se diagnostican aproximadamente 500 000 nuevos casos de cáncer cervicouterino y cerca del 80% corresponde a los países de ingresos económicos bajos^(5, 9).

En 2019 México fue sede de la “Reunión Regional de Vacunación contra el VPH hacia la Eliminación del Cáncer Cervicouterino en las Américas”, en donde se reportaron aproximadamente 72,000 casos de mujeres diagnosticadas con cáncer de cuello uterino en las Américas cada año, siendo la primera o segunda causa de cáncer en mujeres en la mayoría de los países en la región. En San Luis Potosí el último informe oficial por la secretaría de Salud (2019) reportó que en 2018 ocurrieron 98 muertes por Cáncer de Cuello Uterino, estimando que cada 4 días muere una mujer por este cáncer⁽¹⁸⁾.

La meta fundamental de la investigación citológica cervical es identificar a las mujeres que requieren evaluación adicional con colposcopia para detectar la presencia de lesiones precursoras de cáncer, si se detectan anomalías se obtiene una muestra de tejido para realizar una biopsia, si resulta positiva para estadios de NIC (Neoplasia Intraepitelial cervical) avanzado o cáncer se interviene quirúrgicamente en conjunto con tratamiento quimioterapéutico.

Como se mencionó anteriormente, en entornos de bajos recursos, no se ha tenido el éxito con estas medidas, por esto se buscan alternativas dirigidas hacia enfoques innovadores, asequibles, eficientes y efectivos^(19, 20). Respecto al tratamiento quimioterapéutico los pacientes responden en forma diferente frente a la farmacoterapia, debido a factores genéticos, epigenéticos y ambientales, que afectan a las proteínas que metabolizan o transportan los fármacos, sus blancos terapéuticos (receptores) o ambos, en donde la contribución de cada factor varía en cada fármaco^(11, 21).

Por lo anterior han surgido nuevos enfoques, como el desarrollo de nuevos fármacos, nuevas formas de quimioterapia y nuevos sistemas de entrega de fármacos. Un enfoque prometedor es probar la respuesta terapéutica de las células cancerosas obtenidas del propio tumor del paciente hacia una variedad de medicamentos. Las células cancerosas viables pueden aislarse del tejido tumoral recién obtenido, mantenerse viables y cultivarse en condiciones *in vitro* para posteriormente exponerse a fármacos terapéuticos^(14, 22).

Extensas pruebas demuestran que el cultivo 3D de células cancerosas imita *in vivo* afecciones tumorales más cercanas que el cultivo 2D convencional pues este modelo se basa en la detección de alto rendimiento de miles de entidades químicas y biológicas en condiciones de ensayo altamente estandarizadas⁽²²⁾. La configuración 3D permite una identificación más eficiente de las drogas que tienen efecto en células cancerígenas.

Los modelos de tumores sólidos que han sido útiles para estudio de fármacos son los esferoides tumorales multicelulares. Uno de los aspectos que permite el modelo de cultivo son estudios de penetración de medicamentos, se han obtenido resultados favorables para la doxorubicina, metotrexato, vincristina, vinblastina para el 5-fluorouracilo⁽²³⁾.

Otra de las ventajas de los sistemas de cultivo 3D es que tienen el potencial de evaluar la respuesta terapéutica más rápido y a un costo menor que otros modelos,

el cultivo en esferoides se puede mantener viable hasta por 21 días⁽¹⁴⁾ permitiendo ensayos a largo plazo, al tiempo que conservan características y funcionalidades importantes del tumor original.

En este estudio se tomó en cuenta la terapia antineoplásica en nuestro país que, de acuerdo a la guía de práctica clínica, “Diagnóstico y Tratamiento de Cáncer Cérvicouterino” de la Secretaria de Salud, 2010 indica para este tipo de tumores el manejo farmacológico es el Cisplatino, algunas veces en combinación con Paclitaxel. Sin embargo, en ocasiones el tratamiento resulta no ser eficaz.

El diseño y desarrollo de fármacos nuevos no tiene avances rápidos que cubran las necesidades clínicas, por esto existen otras alternativas como el reposicionamiento de fármacos. Realizar nuevas investigaciones con fármacos ya empleados en la clínica asegura reducir costos y tiempo, ya que se conocen los perfiles de seguridad y farmacocinética, lo que reduce el riesgo en comparación con otras estrategias⁽²⁴⁾.

En este caso, con la implementación de cultivos en esferoide y la evaluación de fármacos antineoplásicos con mecanismo de acción distinto obtenemos un panorama específico de la respuesta de cada paciente, esta información es útil para superar las limitaciones de la terapia actual, además podemos sustentar tratamientos específicos según las respuestas individuales, asegurando una mejor respuesta al tratamiento.

III ANTECEDENTES

3.1 Cáncer

El problema del cáncer es claramente uno de los desafíos sanitarios más relevantes de nuestra época. En el siglo XX, emergió un nuevo perfil epidemiológico en el cual las enfermedades crónicas y degenerativas, especialmente la patología cardiovascular y el cáncer, se constituyeron en las primeras causas de muerte⁽²⁵⁾. El cáncer se considera un conjunto de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden dañando a tejidos y órganos, ya que se producen cambios en los genes que controlan la forma como funcionan nuestras células, especialmente la forma como crecen y se dividen.

Según la Organización mundial de la Salud (OPS) en 2020 el cáncer es la segunda causa principal de muerte en las Américas⁽²⁶⁾. La carga del cáncer se puede reducir mediante la implementación de estrategias basadas en la evidencia para su prevención, tamizaje, detección temprana, tratamiento y también para mejorar el acceso a los cuidados paliativos. Los factores de riesgo modificables más comunes para el cáncer, son compartidos con los de otras enfermedades no transmisibles, e incluyen: el consumo de tabaco, el uso nocivo de alcohol, baja ingesta de frutas y verduras y falta de actividad física.

Se prevé para el 2030, que el número de personas recién diagnosticadas con cáncer aumentará en 32% y ascenderá a más de 5 millones de personas por año en las Américas, debido a que la población está envejeciendo, los estilos de vida están cambiando y a la exposición a factores de riesgo.

3.2 Cáncer Cervicouterino

El cáncer cervicouterino es en el ámbito mundial el segundo cáncer entre las mujeres, solo precedido por el de mamas con altas tasas de incidencia⁽⁵⁾, se presenta en un amplio rango de edad, usualmente en la quinta o sexta décadas de la vida (promedio de 54 años). En contraste, las lesiones intraepiteliales, que son precursoras de la enfermedad invasiva, frecuentemente ocurren en mujeres más jóvenes (a menudo por debajo de los 40 años)⁽¹⁸⁾.

Cada año, más de medio millón de mujeres en el mundo son diagnosticadas con cáncer de cuello uterino, y poco más de un cuarto de millón mueren de la enfermedad, cerca de nueve de cada diez de estas muertes ocurren en países de ingresos medios bajos, donde la tasa de mortalidad es del 85% , ocasionando profundas consecuencias económicas y sociales⁽¹⁶⁾.

La OPS menciona que en América Latina y el Caribe, el cáncer cervicouterino sigue siendo uno de los tipos más frecuentes en mujeres y se puede prevenir con la vacunación contra el virus del papiloma humano (VPH), además del tamizaje y el tratamiento de las lesiones precancerosas.

El cáncer de cuello uterino es causado principalmente por el virus del papiloma humano (VPH). Los avances en biología celular, molecular e inmunología han permitido conocer el rol del VPH en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino, cuya vía de contagio es a través del contacto sexual. Estas infecciones pueden resolverse espontáneamente o progresar a la aparición clínica de la enfermedad, manifestándose más notablemente como displasia cervical que puede progresar a cáncer.^(16, 27).

El desarrollo del cáncer cervical, generalmente, es muy lento y comienza como una afección precancerosa llamada displasia, cuando una célula escapa a los controles de división y muerte celular y comienza a proliferar descontroladamente. Todas las células de un organismo multicelular complejo están sometidas a un riguroso control que abarca tanto su potencial de proliferación y diferenciación, como la muerte celular por senescencia o apoptosis. El triángulo que se establece entre los índices de proliferación, diferenciación y apoptosis constituye la base sobre la cual se asienta la homeostasia de órganos y tejidos⁽²⁸⁾.

3.3 Anatomía del cuello uterino

El tracto genital inferior femenino está formado por el cuello uterino, la vagina y la vulva. El cuello uterino es la porción inferior del útero, delimitado por arriba por el istmo y protruye en la vagina. Es un órgano cilíndrico y fibroso, que tiene una longitud

promedio de 3 a 4 cm. Mide entre 2,5 y 3 cm de longitud en la nulípara y se ubica hacia atrás en forma oblicua. Se divide en la porción vaginal o exocérvix cubierta por células escamosas y el canal o endocérvix cubierta por células glandulares. La zona de transición o transformación es donde se encuentran estos dos tipos de células y se denomina unión pavimentoso-cilíndrica, esta zona cambia por el envejecimiento o por dar a luz, identificar la zona de transformación tiene gran importancia en la colposcopia, pues casi todas las manifestaciones de carcinogénesis cervical ocurren en esta zona.

El exocérvix es la parte más fácilmente visible del cuello uterino; el endocérvix, en gran parte no visible, es contiguo al orificio cervical externo. El ectocérvix está recubierto por un epitelio escamoso estratificado rosado, de múltiples capas celulares, mientras que un epitelio cilíndrico rojizo de una única capa celular recubre el endocérvix. Las capas celulares intermedia y superficial del epitelio escamoso contienen glucógeno. El cuello uterino está recubierto por epitelio escamoso estratificado no queratinizante y por epitelio cilíndrico. Estos dos tipos de epitelio confluyen en la unión escamoso-cilíndrica.

3.4 Virus del papiloma humano

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es el principal agente causal conocido de cáncer cervicouterino. Se estima que 80% de la población mundial contraerá VPH en algún momento de su vida, en un plazo de 2-5 años después de iniciar la actividad sexual. Algunos datos concluyen que el coito es la vía primaria de infección genital y estos datos están respaldados por información documentada de la presencia de verrugas en genitales de parejas sexuales⁽²⁹⁾.

De esta manera, tanto hombres como mujeres están involucrados en la cadena epidemiológica de la infección, pudiendo ser acarreadores asintomáticos, transmisores y también víctimas de la infección por VPH. Los factores asociados con la infección por VPH esencialmente están relacionados con el comportamiento sexual, como es la edad de inicio de vida sexual, un alto número de parejas sexuales a lo largo de la vida, o contacto sexual con individuos de alto riesgo⁽³⁰⁾.

Los virus del papiloma infectan los epitelios de los vertebrados, donde pueden causar neoplasias o persistir asintómicamente, estos tienen genomas de ADN bicatenarios circulares de aproximadamente 8 kb de tamaño y típicamente contienen ocho genes, son pequeños virus de DNA, de doble cadena, cuya actividad transformante se explica principalmente por la actividad de sus oncoproteínas E6 y E7. Estas proteínas se unen a un sin número de reguladores celulares importantes en el control de procesos biológicos como: la apoptosis, proliferación celular, estabilidad cromosómica, transcripción de genes (oncogenes y genes supresores de tumor), diferenciación celular y la respuesta inmunológica, entre otros^(31, 32).

Después de una infección natural solo la mitad de las mujeres desarrollan anticuerpos contra VPH detectables, los cuales probablemente no son protectores⁽³³⁾. Los VPH infectan el epitelio cervical sin entrar en la circulación, por lo que las partículas no se exponen eficazmente al sistema inmune. Como resultado, la vigilancia inmunológica típica, que involucra el tráfico de células especializadas desde el sitio de la infección hasta órganos linfoides secundarios, se encuentra limitada o abatida. Aunado a esto, una vez dentro de la célula, la partícula del papilomavirus puede utilizar múltiples mecanismos para abatir la respuesta inmune que es necesaria para la eliminación de la infección⁽³⁴⁾.

La infección por el virus de papiloma humano se puede clasificar en: primero una infección latente, que se caracteriza por la presencia de VPH en las células o tejidos que son aparentemente normales y sin ninguna manifestación de enfermedad. Sin embargo, el virus está ahí y en ocasiones puede ser detectado por técnicas específicas como Hibridación in situ o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Posteriormente la infección subclínica se manifiesta por cambios microscópicos en el epitelio cervical (coilocitos, displasias) detectados en las citologías o cortes histológicos de los tejidos afectados.

La presencia de VPH en este punto se puede verificar mediante el uso de un colposcopio que evidencia cambios de coloración en el cuello uterino después de aplicar una solución de ácido acético; estos cambios se asocian a la infección con

VPH y una posible lesión premaligna. Finalmente la infección clínica se manifiesta por la aparición de tumores visibles y es en esta etapa donde podemos encontrar gran cantidad de tejido positivo para VPH⁽³¹⁾.

Los papilomavirus han cohabitado con la especie humana a través de miles de años, sufriendo pocos cambios en su composición genómica. Basado en el análisis de secuencia de DNA, se han reconocido más de 200 genotipos de VPH que causan un diverso rango de lesiones epiteliales⁽³⁵⁾, 30 tipos son responsables de infecciones ano-genitales. Su potencial de la magnitud de los subtipos del VPH se clasifica en 3 grupos. Los tipos 16 y 18 son los genotipos más frecuentes asociados a cáncer cervical, vulvar, de pene y anal. Los tipos 6 y 11 están asociados al desarrollo de lesiones benignas como verrugas y condiloma acuminado. A nivel evolutivo todos los papilomavirus que se conocen se han agrupado en 16 géneros y los VPH se agrupan en 5 de estos géneros. Los dos géneros de VPH más importantes son los papilomavirus Alpha (α) y los Beta (β). La mayoría de los VPH que infectan área genital pertenecen al género Alpha⁽³⁶⁾.

3.5 Fisiopatología del Cáncer Cervicouterino

La metaplasia escamosa del cuello uterino consiste en el reemplazo fisiológico del epitelio cilíndrico evertido al exocérnix por un epitelio escamoso neoformado de células de reserva subyacentes a las cilíndricas. La parte del cuello uterino en la que se produce metaplasia escamosa se denomina zona de transformación.

En la unión escamo-columnar del epitelio cervical es la zona donde es mucho más susceptible por infección de VPH, de ahí es el lugar más frecuente (hasta el 90%) de la localización del carcinoma. El epitelio cervical tiene una organización estratificada, en donde las células de la capa basal mantienen la capacidad de mitosis. En el resultado de la división celular, se da origen a dos células idénticas; una de ellas se dirige al estrado superior para poder completar la diferenciación terminal y la segunda se mantiene en el estrato basal como célula de ciclado y de recambio.

Cuando la célula es infectada por el VPH, el genoma viral es sintetizado en las células basales a partir de copias episomales (unidad extracromosómica replicante que funciona autónomamente o con un cromosoma), afectando a la progenie en donde las células iniciarán la infección y aquella destinada al cambio de estrato epitelial y estos presentarán la expresión de genes tardíos dando lugar a la fase vegetativa del ciclo de vida del VPH. Por último, el ADN viral es empaquetado en la cápside y los viriones son liberados para reiniciar un nuevo ciclo de vida.

El VPH hay dos ciclos para la replicación viral; uno es la infección lítica en la que el virus llega a las células parabasales con mucha capacidad de replicación, se introduce en el citoplasma y posteriormente en el núcleo; y la infección lisogénica aquí se ve afectado directamente al genoma celular como en el caso del VPH de alto riesgo como es el 16 y 18.

3.6 Neoplasia Intraepitelial Cervical

La historia natural del cáncer cérvico uterino implica la progresión gradual de una serie de etapas secuenciales en que las células del cérvix presentan ciertas anomalías histológicas conocidas como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). En 1990 se propuso la terminología histopatológica, NIC de bajo grado, comprendía anomalías como atipia colocítica, lesiones NIC I (displasia leve), y NIC de alto grado, comprendía NIC II y NIC III, y finalmente cáncer invasor^(27, 37).

Puede sospecharse NIC por examen citológico con la técnica de Papanicolaou o mediante examen colposcópico. El diagnóstico de NIC se establece por examen histopatológico de una biopsia cervical. Para clasificar la NIC se observa la proporción del espesor epitelial que presenta células maduras y diferenciadas. Los grados más avanzados de NIC suelen tener una mayor proporción del espesor epitelial con células indiferenciadas y solo una delgada capa superficial de células maduras, diferenciadas. Conforme se incrementa la gravedad de la NIC aumenta el número de figuras mitóticas, que pueden verse en las capas epiteliales superficiales. Las configuraciones anormales de las figuras mitóticas también se tienen en cuenta al establecer el diagnóstico final⁽³⁸⁾.

3.7 Factores de Riesgo del Cáncer Cervicouterino

Conforme a lo establecido en la guía de práctica clínica (GPC) prevención y detección oportuna del cáncer cérvico uterino en el primer nivel de atención, (actualización 2011) y la Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello del útero y de la mama en la atención primaria; se mencionan los siguientes factores de riesgo

Mujer en el grupo de 25 a 64 años de edad:

La edad promedio de las mujeres que por primera vez reciben un diagnóstico de cáncer cervicouterino es entre 50 y 55 años. Al contrario de muchos otros tipos de cáncer que afectan con poca frecuencia a los adultos jóvenes, el cáncer cervical puede afectar a las mujeres jóvenes de entre veinte y treinta años.

Inicio temprano de relaciones sexuales (antes de los 18 años):

En la adolescente se produce una metaplasia activa, o lo que es igual, una transformación celular del epitelio columnar en metaplásico y de este en escamoide, incrementándose el potencial de interacción entre el carcinógeno (semen y traumas del coito) y el cuello uterino.

Múltiples parejas sexuales (tanto del hombre como de la mujer):

El número de parejas sexuales aumenta el riesgo de padecer cáncer cervicouterino por los diferentes contactos sexuales.

Multiparidad (más de cuatro partos):

Se aumenta el riesgo de cáncer cervicouterino debido a mayor número de contactos sexuales, a traumas cervicales, desgarros del parto no suturados con más exposición a virus oncogénicos y a cambios hormonales con posible acción carcinogénica.

Tabaquismo:

La nicotina, una vez en el torrente sanguíneo, al llegar al cuello uterino se transforma en un oncogén capaz de inducir cambios mitogénicos en las células cervicales. Las mujeres fumadoras tienen dos veces más riesgo que las no fumadoras.

Nunca haberse practicado estudio citológico:

Más de la mitad de los casos se detectan en mujeres que no participan en revisiones regulares.

Antecedentes de enfermedades de transmisión sexual:

Las infecciones de transmisión sexual son una clase relativamente común de bacterias o virus que puede infectar el sistema reproductor. Se transmiten mediante el contacto sexual. Algunos estudios han indicado que las mujeres cuyos resultados de análisis de sangre muestran evidencia de una infección sexual pasada o actual contienen mayor riesgo de cáncer de cuello uterino que las mujeres con un análisis de sangre normal.

3.8 Métodos de tamizaje

La prevención del cáncer cervical recae en dos categorías principales: prevención primaria y secundaria. La prevención primaria se caracteriza por la promoción de estilos de vida saludables y comportamientos que minimicen el riesgo de cáncer cervical. La prevención secundaria, involucra la detección temprana de la enfermedad para prevenir su diseminación, Su propósito, es la detección en etapas tempranas y así prevenir su potencial progresión a cáncer cervical^(26, 39).

Las pruebas de detección de cáncer de cuello uterino disponibles consisten en la prueba de Papanicolaou y, en algunas mujeres, la prueba de PCR para VPH aunque su costo elevado hace que sea inaccesible a poblaciones de bajos ingresos^(16, 18). La citología cervicovaginal (Papanicolaou) es el método más fiable para detectar el cáncer pre invasivo. Esta prueba detecta el 90% de los cambios cervicales precoces. Aunque algunos autores cuestionan la validez de este por los falsos negativos (hasta el 25%) que puede deberse a defectos de la toma, y errores en la interpretación del laboratorio. También por los falsos positivos (15%) seguramente por alteraciones

celulares debidas a inflamaciones agudas, atrofas o alteraciones producidas por el VPH.

Consiste en el estudio de células descamadas del cérvix y del fondo del saco vaginal y cuyos componentes son células epiteliales del cuello y vagina, células no epiteliales (leucocitos, hematíes, histocitos), gérmenes (bacilos, hongos, virus). Estos componentes del frotis dependen de la localización de la toma, edad de la mujer, momento del ciclo y tratamientos.

Dentro de las anomalías de las células epiteliales se describen dos categorías: lesiones intraepiteliales escamosas debajo y de alto grado (LIS), entre las LIS de bajo grado se incluyen cambios celulares asociados con VPH y displasia leve (NIC1), en las LIS de alto grado se incluyen lesiones que se consideran displasia moderada (NIC 2), severa (NIC3) y carcinoma in situ (CIS)

Por otro lado, la colposcopia es una exploración complementaria que contribuye al estudio y localización de las lesiones del epitelio cervical. El diagnóstico colposcópico de la NIC depende del reconocimiento de 4 características principales: la intensidad, la acetoblancura, los bordes y el contorno superficial de las zonas acetoblanas, las características vasculares y los cambios cromáticos después de la aplicación de yodo⁽⁴⁰⁾.

El método considerado como el estándar de oro para diagnóstico es la biopsia la cual consiste en la extracción de tejido cervical en la cual el raspado endocervical es una herramienta diagnóstica efectiva en cerca del 90% de los casos. La conización se realiza cuando los resultados de la colposcopia son insatisfactorios, este procedimiento implica la extracción de un fragmento en forma de cono del tejido del cérvix y del endocérvix. Este procedimiento puede realizarse con bisturí, láser o electro-bisturí de radiofrecuencia.

3.9 Diagnostico

Según la guía de práctica clínica “Diagnóstico y tratamiento del Cáncer Cervicouterino”, toda paciente con sospecha de cáncer cervicouterino deberá ser

corroborada mediante colposcopia y toma de estudio histopatológico el cual se realizará mediante: toma de biopsia dirigida, curetaje endocervical y/o como diagnóstico. El estudio de todas las pacientes debe incluir historia clínica completa, examen físico completo, toma de citología y biopsia.

3.10 Clasificación FIGO

En México la estadificación clínica del cáncer cervical es usando los criterios de la Federación Internacional de Gineco-obstetricia (FIGO), esta clasificación es usada para los cánceres de órganos reproductores femeninos, incluyendo el cáncer de cuello uterino. Hasta ahora, la estadificación de FIGO se basaba principalmente en el examen clínico con la adición de ciertos procedimientos permitidos por FIGO para cambiar la estadificación. En 2018, esto fue revisado por el Comité de Oncología Ginecológica de FIGO para permitir la obtención de imágenes y hallazgos patológicos, cuando estén disponibles, para asignar la etapa.

ESTADIO DESCRIPCIÓN

I	El carcinoma esta estrictamente confinado al cérvix (la extensión al cuerpo uterino debe ser irregular)
IA	Carcinoma invasor que puede ser diagnosticado solo por microscopia, con máxima profundidad de invasión <5mm ²
IA1	Invasión estromal <3 mm de profundidad
IA2	Invasión estromal ≥3 mm y <5 mm en profundidad
IB	Carcinoma invasivo con medida de invasión más profunda ≥5 mm (mayor que el estadio IA). Lesión limitada al cuello uterino
IB1	Carcinoma invasor con profundidad ≥5 mm de invasión estromal, y <2 cm en su máxima dimensión
IB2	Carcinoma invasor ≥2 cm y <4 cm en su máxima dimensión
IB3	Carcinoma invasor ≥4 cm en su máxima dimensión
II	El carcinoma invade más allá del útero, pero no se ha extendido al tercio inferior de la vagina ni a la pared pélvica.
IIA	Compromiso limitado a los dos tercios superiores de la vagina, sin compromiso parametrial
IIA1	Carcinoma invasivo <4 cm en su máxima dimensión
IIA2	Carcinoma invasivo ≥4 cm en su máxima dimensión
IIB	Con afección parametrial pero no hasta la pared pélvica
III	El carcinoma involucra el tercio inferior de la vagina y se extiende hasta la pared pélvica y causa hidronefrosis o disfunción renal

	e involucra ganglios linfáticos pélvicos y para-aórticos
IIIA	El carcinoma involucra el tercio inferior de la vagina, sin extensión a la pared pélvica.
IIIB	Extensión a la pared pélvica y/o hidronefrosis o disfunción renal
IIIC	Afectación de los ganglios linfáticos pélvicos y para-aórticos, independientemente del tamaño y extensión del tumor
IIIC1	Solo metástasis de ganglios linfáticos pélvicos
IIIC2	Metástasis de ganglios linfáticos para-aórticos
IV	El carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis verdadera o ha afectado (probado por biopsia) a la mucosa de la vejiga o el recto. (Un edema ampolloso, como tal, no permite asignar un caso a la etapa IV)
IVA	Propagación a órganos pélvicos adyacentes
IVB	Propagación a órganos distantes

Tabla 1 Estadificación FIGO para CaCu (2018)

Las clasificaciones FIGO y TNM han sido prácticamente idénticas al describir la extensión anatómica de la enfermedad. La clasificación revisada de FIGO ahora está más estrechamente alineada con la clasificación TNM. La nomenclatura TNM se ha utilizado hasta ahora para documentar el estado de la enfermedad ganglionar y metastásica. La etapa se asignará únicamente después de que todos los informes de imágenes y patología estén disponibles. No se puede modificar más tarde. La estadificación FIGO 2018 incluye la participación de los nodos y, por lo tanto, permite la selección y evaluación de la terapia, así como la estimación del pronóstico y el cálculo de los resultados finales⁽⁴¹⁾.

3.11 Esferoides Tumorales Multicelulares

Los esferoides tumorales son un modelo de cultivo 3D de agrupaciones celulares que se beneficia de la propiedad natural de agregarse que muestran varios tipos celulares, poseen la capacidad de que las células crecen en forma tridimensional la cual está influida por factores de señalización.

Las células no se encuentran adheridas a un soporte, sino que forman un agregado celular de forma esferoidal en el interior de un líquido pipeteable durante todo el tiempo que dura el cultivo. Además, las células no requieren un andamiaje externo o interno para agregarse, se pueden unir unas a otras, mimetizando un ambiente

fisiológico similar al del tejido de procedencia. Por otro lado, el esferoide puede originar su propia matriz extracelular⁽⁴²⁾.

3.12 Antecedentes históricos de cultivos en esferoide

Los orígenes del método de cultivo 3D se remontan a los años 40's por Holtfreter y Moscona con sus investigaciones acerca de morfogenesis, utilizando reagregados esferoidales de células. Más tarde en los años 70's Sutherland utilizó esferoides tumorales para evaluar su respuesta a agentes terapéuticos.

Posteriormente diversos estudios se centraron en el desarrollo de una variedad de enfoques para el crecimiento de células en 3D^(43, 44). Otros estudios se centraron en el desarrollo/síntesis de varias matrices para apoyar el crecimiento celular en estructuras 3D^(45, 46) y muchos otros se centraron en los comportamientos de las células cultivadas en 3D en comparación con las células cultivadas en 2D^(47, 48).

En la práctica este modelo puede ser utilizado en diversas investigaciones de tipo biomédico, siempre y cuando se den las condiciones adecuadas para formar los esferoides. Dentro de los campos científicos en los que se han utilizado con éxito los esferoides son la Biología Celular (adhesión, migración y morfogénesis), la Virología (aislamiento, propagación y cuantificación de virus, interacción célula-virus); la Farmacología (evaluación de fármacos); la Inmunología (uso de moduladores inmunitarios); la cirugía (comportamiento de células de diferentes tejidos, como las de hueso y cartílago en diferentes medios o frente a diferentes materiales); Oncobiología (recreación de tumores, estudio de quimiocinas en células cancerosas o terapia basada en anticuerpos); la Biología del desarrollo y de la Fertilización (desarrollo de embriones)⁽¹³⁾.

3.13 Principales ventajas del modelo en esferoide

Por estudios de microambiente y comportamiento espacial de las células tumorales, y sobre las necesidades de métodos eficaces de expansión de las células, han puesto en evidencia la necesidad de disponer de procedimientos nuevos, que

permitan cultivar células en un entorno lo más similar posible al del tejido del que forman parte en el organismo vivo⁽¹³⁾.

Se ha propuesto el uso de modelos de cultivo en tres dimensiones (3D), denominados esferoides tumorales multicelulares. Este método tiene una amplia variedad de usos: permiten investigaciones *in vitro* sobre las relaciones estructura-función celulares en situaciones normales o patológicas; en estudios sobre la interacción célula-sustancias o estructuras del medio orgánico, tales como los factores de crecimiento, las citocinas, los componentes de la matriz extracelular, etc, para el diagnóstico clínico.

Debido a la estructura tridimensional nativa de los carcinomas, que es responsable de numerosas interacciones autócrinas y parácrinas relacionadas a la progresión del tumor, resulta difícil que dicha red de interacciones pueda ser recreada en el modelo de cultivo en monocapa, en donde los contactos célula-célula están disminuidos y pierden la heterogeneidad asociada con un tumor sólido⁽⁴⁹⁾.

En contraste el cultivo de esferoides presenta una compleja red organizada con interacciones tridimensionales célula-célula y célula-matriz extracelular (uniones comunicantes, desmosomas y E-cadherina, principalmente), por lo que cada célula individual está expuesta a diferentes condiciones de espacio y de disponibilidad de nutrientes. Estudios recientes revelan que la capacidad que poseen las células para crecer en forma tridimensional está influida por factores de señalización del suero tales como antígeno carcinoembrional, interferón- γ , IGFII, heregulina β 1, plasmina, y Ecadherina. La integridad del esferoide se mantiene por el incremento de uniones estrechas, comunicantes y desmosomas entre las células y un aumento de matriz extracelular^(49, 50).

3.14 Proceso de formación del esferoide

El crecimiento de los esferoides es consecuencia de la multiplicación de los clonógenos de la población celular que los constituye, su crecimiento puede ser manipulado o modificando por las condiciones del medio ambiente en donde se

desarrollan⁽⁵¹⁾, estudios recientes han demostrado que los esferoides se pueden mantener viables por un periodo promedio de 10 días sin mostrar cambios significativos en cuanto a muerte celular⁽¹⁴⁾.

Existen diversas variables del cultivo de esferoides, las cuales se determinan en relación con su origen. Los Esferoides Tumorales Multicelulares clonogénicos provienen de células tumorales o explante de tejido, en una primera fase de cultivo se forma un núcleo primario, la segunda fase consiste en agitación orbital suave que favorece la consolidación del esferoide. Este tipo de esferoide puede ser monocultivo (un solo tipo celular) o co-cultivos (varios tipos celulares).

La continua compactación de las células cancerígenas durante la vida media de los esferoides genera la formación de distintas zonas internas como en los microtumores sólidos⁽⁵²⁾. A nivel estructural se pueden distinguir tres capas de poblaciones celulares: un centro apoptótico/necrótico (que solo aparece en esferoides con diámetro mayor de 500 μ m) es la más profunda y donde se acumulan los desechos metabólicos de la zona de proliferación, ésta en un esferoide maduro es la zona más grande por la matriz extracelular que se alarga continuamente en función de que la zona necrótica se llene de desechos. La zona necrótica puede alcanzar unos 300-500 μ m de diámetro^(13, 52).

La siguiente es una capa intermedia de células con tendencia a diferenciarse también llamada zona de senescencia es una zona donde debido a la ausencia de nutrientes, las células de cáncer disminuyen su proliferación hasta que desaparece por completo en función de la concentración de los nutrientes. En esta zona existe una alta tensión generada por el peso de la zona de proliferación. El diámetro de esta zona es muy difícil de determinar, pero es la zona con menor diámetro, por último, se encuentra una capa externa de células en proliferación, es la capa donde se lleva a cabo la proliferación celular, esta existe debido a la dependencia de las células de cáncer al medio de cultivo⁽¹³⁾

Las células tumorales solo pueden crecer en la superficie y no en zonas más internas debido a la falta de vascularización. El diámetro de esta zona es de 100-200 μm . El modelo de esferoides clonogénicos en particular es utilizado para investigaciones de hipoxia^(53, 54). Por otro lado, los esferoides tumorales multicelulares agregados no cuentan con la formación de un núcleo primario, las células solo se agregan a consecuencia de la agitación orbital a la que son sometidos y la mayor parte de las capas contienen células en proliferación. Las uniones celulares en este caso pueden ser disociadas fácilmente por fuerzas mecánicas y son empleados principalmente para el estudio de penetrabilidad de fármacos o vectores de terapia génica^(51, 52).

Cabe destacar que tanto líneas celulares como células obtenidas de tejidos pueden formar ambos tipos de esferoides.

3.15 Esferoides formados a partir de diferentes tipos celulares

Las células del esferoide preservan su fenotipo celular específico, el cual es característico del tejido diferenciado. Característicamente los esferoides tienen un patrón de crecimiento, este patrón no varía de acuerdo con el tipo celular de procedencia, pero sí con la variante de cultivo que se utilice (esferoides clonogénicos o esferoides agregados). Cuando se inicia un cultivo el crecimiento es lento, seguido de una fase de crecimiento exponencial y finalmente se presenta nuevamente un crecimiento lento con una fase de meseta en la cual mantienen su tamaño final⁽⁴²⁾.

La morfología de los esferoides exhibe diversos tipos de estructura; dependiendo del linaje celular del que procedan, por ejemplo en cultivos provenientes de tejido mamario humano, las células se agrupan y forman estructuras acinares, además de que conservan patrones de expresión de proteínas del tejido de origen⁽⁵⁵⁾.

3.16 Modelo de cultivo en esferoides en la investigación clínica

El modelo puede evaluar respuestas específicas de un tumor, por ejemplo, el metabolismo celular de células neoplásicas, señalización celular, gradientes bioquímicos, proliferación, diferenciación, expresión génica, penetración de fármacos, resistencia a radioterapia, resistencia farmacológica, etc⁽¹⁴⁾.

Se ha utilizado el modelo 3D como una prueba predictiva para evaluar la hiperradiosensibilidad de las células neoplásicas de líneas celulares de cáncer de mama expuestas a dosis bajas de radiación. Como resultado de este estudio se desarrolló un método que permitió determinar la radiosensibilidad de los esferoides con suficiente precisión y con una perturbación mínima de las muestras experimentales. Aportando contribuciones a la comprensión de la respuesta de tumores mamarios a la radioterapia⁽⁵⁶⁾.

La toxicidad a nivel hepático es un campo ampliamente estudiado, ha habido una serie de avances en la comprensión de las funciones de los hepatocitos, la señalización celular y los mecanismos de toxicidad hepática. La desdiferenciación de los hepatocitos en un cultivo de células 2D (cultivo en monocapa) está bien establecida y acompaña a una reducción en las principales funciones hepáticas⁽⁵⁷⁾. Esto es particularmente relevante para los hepatocitos, que tienen forma poligonal y están multipolarizados para presentar al menos dos superficies basolaterales y dos apicales.

La generación de modelos y las técnicas de cultivo 3D de hepatocitos han mejorado la estabilidad celular, logrando mantener la función hepática presente *in vivo*. Los modelos son aptos para el uso rutinario y la adaptación de alto rendimiento los hace particularmente deseables en el contexto del descubrimiento industrial de fármacos⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾.

3.17 Esferoides en ensayos farmacológicos

Los procesos de descubrimiento y validación de fármacos deben integrar tanto el cribado de cultivo celular 2D como el estudio en animales⁽⁶¹⁾, cumpliendo con el procedimiento estándar antes de los ensayos clínicos. Sin embargo, los datos recopilados del sistema celular 2D a menudo resultaban engañosos para las respuestas *in vivo* como se mencionó anteriormente, y los modelos animales hasta la actualidad siguen siendo costosos, requieren mucho tiempo, son controvertidos con dilemas éticos e inconsistentes debido a las diferencias de especies⁽⁶²⁾.

El descubrimiento de fármacos podría ser uno de los enfoques más importantes del modelo en esferoide. Este método se ha desarrollado en estudios de cáncer de colon⁽¹⁴⁾, próstata⁽⁶³⁾, mama⁽⁵⁵⁾, hígado⁽⁵⁹⁾, mas no se encontró bibliografía relacionada a modelos de CaCu. Por lo que es de interés estudiar el comportamiento de esferoides tumorales de pacientes con CaCu para evaluar el efecto de los fármacos con los que se trata dicha neoplasia para desarrollar estrategias terapéuticas eficaces con un enfoque a la medicina personalizada.

IV. HIPÓTESIS

Existirán diferencias entre los tratamientos con fármacos antineoplásicos sobre modelos celulares 3D formados a partir de pacientes con diagnóstico de CaCu.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar 4 fármacos antineoplásicos utilizados en el tratamiento de tumores sólidos sobre un modelo celular 3D (esferoides) formado a partir de células de pacientes con diagnóstico de CaCu.

5.2 Específicos

Evaluar la respuesta de cultivos monocapa al ser expuestos a los diferentes tratamientos propuestos

Generar la densidad celular adecuada para sembrar esferoides homogéneos en placa de 96 pozos

Evaluar el efecto de tratamientos conocidos y establecer EC_{50}

Evaluar en modelos en esferoide los efectos de combinaciones buscando sinergismos.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Tipo y diseño de estudio

El presente estudio es cuantitativo, transversal analítico.

6.2. Límites de espacio y tiempo

Las muestras recolectadas proceden del banco de tumores del Instituto Nacional de Cancerología, Autorización del Protocolo: 133300410C0026.

El procesamiento y análisis de las muestras se realizó en la Coordinación para la Innovación y aplicación de la Ciencia y la Tecnología (CIACYT), unidad de Innovación en Diagnóstico Celular y Molecular, de la universidad Autónoma de San Luis Potosí en el periodo Octubre 2020, agosto de 2021.

6.3 Universo y muestra

Universo: Mujeres diagnosticadas con cáncer cervicouterino (NIC II- CaCu *In situ*), tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología.

Población: 5 muestras de células de exfoliado cervical de Mujeres diagnosticadas con cáncer cervicouterino (CaCu *In situ* y CaCu IIB) provenientes del banco de tumores del Instituto Nacional de Cancerología.

Muestra: El método de muestreo será no probabilístico por conveniencia, se recolectarán 5 muestras del banco de tumores del Instituto Nacional de Cancerología de mujeres diagnosticadas con cáncer cervicouterino en etapas localmente avanzadas.

6.4 Variables

Las variables se encuentran en el anexo 1.

6.5 Cultivos monocapa

Para determinar las diferencias entre cultivos en monocapa y cultivos en esferoide se utilizaron células HeLa para los cultivos monocapa; se sembraron 20'000 células por pozo en caja de 96 pozos (Eppendorf) en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico (penicilina), a 37°C. 5% de flujo de CO₂.

6.6 Cultivo de esferoides de células HeLa

Se realizó el conteo de células en cámara de Neubauer para sembrar 20'000 células por pozo en caja de 96 pozos Corning® spheroid microplates ULA (Ultra-Low Attachment surface), las células fueron sembradas en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico (penicilina), para posteriormente incubar a 37°C. 5% de flujo de CO₂ por 72 horas.

Se observó la formación de esferoides por medio de microscopía (Microscopio Invertido Leica Thermo Fisher).

6.7 Cultivo de esferoides tumorales a partir de muestras de pacientes CaCu

Se obtuvieron muestras provenientes de pacientes con CaCu (CaCu *In situ* según la clasificación FIGO) para posteriormente realizar conteo de células en cámara de Neubauer.

Se estableció la densidad celular adecuada para sembrar 200 µL de la muestra original en una caja de 96 pozos Corning® spheroid microplates ULA (Ultra-Low Attachment surface), las células fueron sembradas en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico (penicilina), a 37°C. 5% de flujo de CO por 72 horas.

Se determina cultivo esferoidal, cuando se visualizan bordes regulares sin células individuales claramente definidas. Se observó la formación de esferoides por medio de microscopía (Microscopio Invertido Leica Thermo Fisher).

6.8 Tinción DAPI

Se empleó la tinción DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) para visualizar la organización celular en esferoides. El colorante DAPI es capaz de teñir los núcleos de células vivas, accede al ADN celular donde tiene gran afinidad a las bases nitrogenadas adenina y timina.

Utilizamos esferoides formados a partir de células humanas de cáncer cervicouterino en estadio IIB. Se añadió el colorante DAPI en la placa de 96 pozos Corning® spheroid microplates ULA (Ultra-Low Attachment surface) para llevar a incubar por 5

minutos a 37° protegido de la luz. La tinción se observó en microscopio de fluorescencia 358/461nm.

6.9 Ensayos de viabilidad

Se determinó la viabilidad y apoptosis con el kit ApoLive-Glo™ Multiplex el cual mide el número de células viables como marcador de citotoxicidad como la activación de caspasa como marcador de apoptosis para determinar el mecanismo de muerte celular.

La primera parte del ensayo mide la actividad de un marcador de proteasa de viabilidad celular.

La segunda parte del ensayo utiliza Caspase-Glo que proporciona un sustrato de caspasa-3/7 luminógeno, para detectar la activación de la caspasa, un biomarcador clave de la apoptosis.

6.10 Prueba de LDH citotoxicidad celular.

El aumento de la actividad de LDH conduce a varios tipos de tumores malignos, sirve como marcador para cáncer de células madre y se correlaciona con mal pronóstico.

La actividad de esta enzima se determinó por el kit de análisis de Cayman LDH Cytotoxicity. La lactato deshidrogenasa es una enzima citosólica soluble que se libera en el medio de cultivo después de la pérdida de la integridad de la membrana como resultado de la citotoxicidad inducida por compuestos.

Una vez que se tienen formados los esferoides, en una placa de 96 pocillos se agregaron 50µL de la enzima ALDH, posterior a esto se tomó lecturas de absorbancias en espectrofotómetro a 450 nm.

6.11 Ensayos de citotoxicidad

Se realizaron ensayos de citotoxicidad de los esferoides en interacción con cisplatino, 5 fluoracilo, taxol, doxorubicina en placa de 96 pozos de $2,5 \times 10^4$, cada uno con al menos un esferoide, se sembró uno para el control y tres para cada una de las concentraciones del fármaco a probar (10, 50, 100 µM/L).

La citotoxicidad fue evaluada por medio del kit ApoLive-Glo y se construyeron las curvas dosis respuesta para cada fármaco. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

6.12 Ensayo para determinar adición sinergismo y antagonismo

Previamente se determinó la Concentración Fraccional Inhibitoria (CFI) de cada componente basándose en las EC_{50} individuales.

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos que contenían un esferoide, se adicionó a la placa diluciones de dos distintos fármacos (A y B) (Figura 2), incubando la placa a las condiciones de temperatura y tiempo óptimas. Estas contienen concentraciones ($\mu\text{M/L}$) que incluyen valores mayores y valores menores a la EC_{50} determinada previamente para cada fármaco por separado.

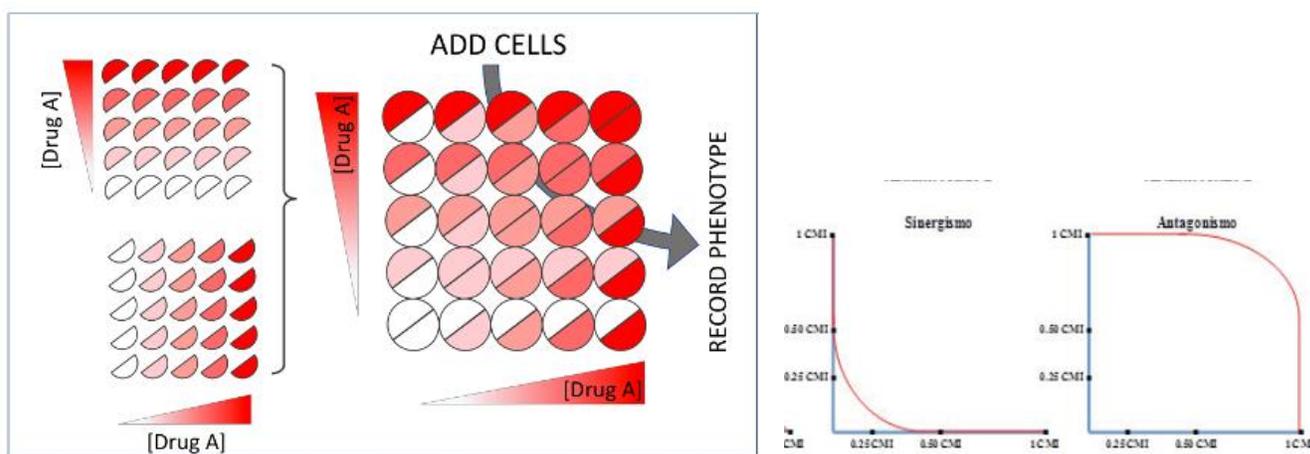


Figura 1 Representación gráfica del modelo tablero de ajedrez: Gráficamente en el eje de las abscisas se ubican las diluciones del fármaco A y en el eje de las ordenadas se distribuyen las mismas diluciones del fármaco B, de forma que la primera casilla es la correspondiente a un valor de cero (control) que multiplica al valor de la CMI de A y B

6.12 Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico GraphPad Prisma V8. Los valores de **p**: *** $p=0.001$; ** $p=0.01$; * $p=0.05$

La prueba de ANOVA fue utilizada para determinar diferencias de viabilidad entre cultivos monocapa y cultivos en esferoide.

Para determinar si el tiempo de exposición a los fármacos influía en la viabilidad y apoptosis se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías.

Se construyeron curvas dosis-respuesta para determinar EC_{50} para cada fármaco.

En los ensayos de liberación de ALDH se empleó ANOVA con poshoc Tukey.

VII CONSIDERACIONES ÉTICAS

7.1 Nacionales

Esta investigación tiene nivel de riesgo mínimo, basados en el REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, artículo 17 inciso II, la cual menciona que los estudios que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos o psicológicos de diagnósticos o tratamiento rutinarios se encuentran dentro de esta categoría. Además, se consideran los aspectos según el título segundo capítulo uno:

Artículo 13.-En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberá prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar.

Artículo 14. En el inciso II, se fundamentará en la experimentación previa realizada en, en laboratorios o en otros hechos científicos; el inciso VI que la investigación deberá ser realizada por profesionales de la salud a que se refiere el artículo 114 de este Reglamento, con conocimiento y experiencia para cuidar la integridad del ser humano, bajo la responsabilidad de una institución de atención a la salud que actúe bajo la supervisión de las autoridades sanitarias competentes y que cuente con los recursos humanos y materiales necesarios, que garanticen el bienestar del sujeto de investigación; y el inciso VII el cual indica que se debe contar con el dictamen favorable de las Comisiones de Investigación y ética.

Artículo 16.- En las investigaciones en seres humanos se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación.

En este aspecto se tomará en consideración la LEY FEDERAL DE PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES EN POSESIÓN DE LOS PARTICULARES, la cual menciona lo siguiente:

- Artículo 3 inciso IV.- Se consideran datos personales sensibles: Aquellos datos personales que afecten a la esfera más íntima de su titular, o cuya utilización indebida pueda dar origen a discriminación o conlleve un riesgo

grave para éste. En particular, se consideran sensibles aquellos que puedan revelar aspectos como origen racial o étnico, estado de salud presente y futuro, información genética, creencias religiosas, filosóficas y morales, afiliación sindical, opiniones políticas, preferencia sexual.

- Artículo 6.- Los responsables en el tratamiento de datos personales, deberán observar los principios de licitud, consentimiento, información, calidad, finalidad, lealtad, proporcionalidad y responsabilidad, previstos en la Ley.
- Artículo 9.- Tratándose de datos personales sensibles, el responsable deberá obtener el consentimiento expreso y por escrito del titular para su tratamiento, a través de su firma autógrafa, firma electrónica, o cualquier mecanismo de autenticación que al efecto se establezca.
- CAPÍTULO IV- Del Ejercicio de los Derechos de Acceso, Rectificación, Cancelación y Oposición
- Artículo 28.- El titular o su representante legal podrán solicitar al responsable en cualquier momento el acceso, rectificación, cancelación u oposición, respecto de los datos personales que le conciernen. (**Derechos de ARCO**)

Estos derechos estipulan que el titular de los datos personales podrá poner en marcha por sí mismo las siguientes acciones:

- **Acceso:** obligará a la búsqueda dentro de sus bases de información de los datos de quien esté ejerciendo el derecho y se tendrá por cumplida cuando se ponga a su disposición la información solicitada
- **Rectificación:** será requerida cuando los datos sean incorrectos, imprecisos, incompletos o estén desactualizados. En este derecho el titular será quien indique las modificaciones a realizarse y aportará la documentación oportuna para sostener su petición

- **Cancelación:** su objetivo será pedir la anulación de la información existente en sus bases de datos para cesar el tratamiento de los mismos
- **Oposición:** este derecho posibilita al titular a solicitar a quien lleve a cabo el tratamiento de sus datos, de abstenerse de hacerlo en determinadas situaciones (elige en qué circunstancias se usará su información). En este evento, el solicitante explicará las razones por las cuales se está oponiendo

Del Título sexto capítulo único:

Artículo 113.- La conducción de la investigación estará a cargo de un investigador principal, quien deberá ser un profesional de la salud y tener la formación académica y experiencia adecuada para la dirección del trabajo a realizar.

Se atienden los requerimientos aquí mencionados, contando con las instalaciones y equipo de laboratorio de acuerdo con las normas técnicas, que garanticen la contención física idónea para el manejo seguro de agentes biológicos.

Una vez terminados los ensayos los desechos en estado líquido se inactivarán según la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo, el material de contención de los cultivos después de ser sometido a la autoclave se colocará en solución de cloro al 2%, se lavará con solución jabonosa y abundante agua. Cabe mencionar que el laboratorio CIAAS de la CIACyT, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí cuenta con el equipo y la infraestructura necesaria para el manejo de este tipo de desechos

Para los derechos no conflicto de intereses se anexan (Anexo 2), y de autoría principal, las cartas correspondientes donde quedan estipulados los puntos de conformidad de los involucrados en este estudio. (Anexo 3).

7.2 Internacionales

Según la declaración de Helsinki, la investigación debe estar basada en los principios científicos y éticos que la justifican. Se debe realizar solo cuando exista seguridad de que no se daña a nadie ni se expone a riesgos innecesarios.

Este protocolo se ajusta a la Declaración de Helsinki refiriéndose al apartado I correspondiente a los principios básicos, en sus numerales 2, 6,7, 9,11.

2. El diseño y la realización de cualquier procedimiento experimental o no experimental, que implique a personas debe formularse claramente en un protocolo que debe presentarse a la consideración, comentario y guía de un comité nombrado especialmente, independientemente del investigador y del promotor, siempre que este comité independiente actúe conforme a las leyes y ordenamientos del país en el que se realice el estudio experimental.

6. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre todos los otros intereses.

7. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos).

9. En toda investigación con personas, cada participante debe ser informado suficientemente de los objetivos, métodos, beneficios y posibles riesgos previstos y las molestias que el estudio podría acarrear. Las personas deben ser informadas que son libres de no participar o de revocar en cualquier momento su consentimiento a la participación.

11. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la

confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.

16. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la educación, formación y calificaciones científicas y éticas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificada apropiadamente.

22. La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria.

23. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación al comité de ética de investigación pertinente antes de comenzar el estudio.

VIII. RESULTADOS

8.1 Cultivos celulares

a. El cultivo en esferoide exhibe notable resistencia a antineoplásicos

Para conocer si los cultivos en esferoides muestran discrepancias en pruebas de citotoxicidad en comparación a los cultivos en monocapa realizamos ensayos con ambos tipos de cultivo exponiéndolos a CDDP, 5-FU y PTX, a diferentes concentraciones, se incubaron por 96h y se tomó lectura de viabilidad.

La figura 2 muestra las diferentes respuestas de células cultivadas en monocapa (M) y en esferoide (E). Se observa que para cada caso de tratamiento aplicado los cultivos en esferoide muestran mayor resistencia, en contraste el cultivo en monocapa sin importar el fármaco es más sensible, las lecturas de absorbancia muestran un decremento en cuanto a la viabilidad de las células en cultivo. Prueba estadística ANOVA poshoc Tukey.

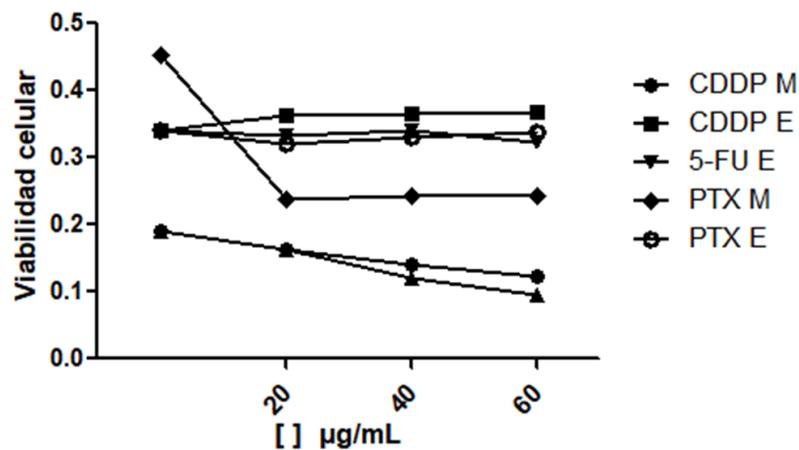


Figura 2 Cultivos en monocapa y cultivos en esferoides tratados con diferentes concentraciones de fármacos antineoplásicos. CDDP, cis-diaminodicloroplatino(II); 5-fu, 5-fluoracilo; paclitaxel, PTX. Monocapa (M), esferoide (E). P=0.05 tukey

XI. Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Cancerología por proveer las muestras del banco de Tumores. NÚMERO DE PROTOCOLO:012/048/OMI / CB/20

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por proveer la beca No. CVU: 760293 que hizo posible la realización de este trabajo.

XII. Referencias

1. Espín Falcón JC, Almeida AC, Acosta Gómez Y, Valdés Mora M, Rivera MO. Acerca del cáncer cervicouterino como un importante problema de salud pública. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 2012;28(4):735-46.
2. Marañón Cardonne T, Mastrapa Cantillo K, Flores Barroso Y, Vaillant Lora L, Landazuri Llago S. Prevención y control del cáncer de cuello uterino. *Correo Científico Médico*. 2017;21(1):187-203.
3. García RB, Enfermera E, del Segura V. Historia y filosofía de los cuidados paliativos. Martínez, MB; Monleón M; Carretero, Y; García, MT *Enfermería en cuidados paliativos y al final de la vida España: Elsevier*. 2012:16-29.
4. Scarinci IC, Garcia FAR, Kobetz E, Partridge EE, Brandt HM, Bell MC, et al. Cervical cancer prevention: new tools and old barriers. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2010;116(11):2531-42.
5. Ferrá Torres TM, Estrada Abreu DR, Bermejo Bencomo W. Factores de riesgo medioambientales del cáncer cervicouterino. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2009;13(2):0-.
6. Srivastava S, Shahi UP, Dibya A, Gupta S, Roy JK. Distribution of HPV genotypes and involvement of risk factors in cervical lesions and invasive cervical cancer: a study in an Indian population. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2014;3(2):61.
7. Escandón C, Benítez MG, Navarrete J, Vázquez JL, Martínez OG, Escobedo J. Epidemiología del cáncer cervicouterino en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública de México*. 1992;34(6):607-14.
8. Marth C, Landoni F, Mahner S, McCormack M, Gonzalez-Martin A, Colombo N. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2017;28:72-83.
9. Santana Serrano C, Chávez Roque M, Viñas Sifontes LN, Hernández López E, Cruz Pérez J. Diagnóstico precoz del cáncer cérvicouterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2011;37(2):213-22.
10. Lau Serrano D, Millán Vega MM, Fajardo Tornés Y, Sánchez Alarcón C. Lesiones preinvasivas del cuello uterino. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2012;38(3):366-77.
11. Quiñones L, Roco Á, Cayún JP, Escalante P, Miranda C, Varela N, et al. Clinical applications of pharmacogenomics *Farmacogenómica como herramienta fundamental para la medicina personalizada: Aplicaciones en la práctica clínica*. 2017 145(4), 483-500.
12. Benedí J, Gómez del Río MA. Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia profesional*. 2006;20(2):60-4.

13. Peñalver JM, Abad MAE, Méndez VFM, Peñafiel AC, Cortés MPS. Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. *Eubacteria*. 2015(34):3.
14. Jeppesen M, Hagel G, Glenthoj A, Vainer B, Ibsen P, Harling H, et al. Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. *PloS one*. 2017;12(9):e0183074.
15. Robles SC, White F, Peruga A. Tendencias de la mortalidad por cáncer del cuello de útero en las Américas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*; 121 (6), dic. 1996.
16. Galán-Rodas E, Vélez CD, Rodas JL. Tamizaje citológico para cáncer de cuello uterino: una problemática emergente. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*. 2013;6(2):52-4.
17. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Global cancer observatory: cancer today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. *International journal of cancer* 144.8 (2019)
18. Amaya J, Restrepo S. Tamizaje para cáncer de cuello uterino: cómo, desde y hasta cuándo. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*. 2005;56(1):59-67.
19. Dórame-López NA, Tejada-Tayabas LM, Galarza-Tejada DM, Moreno-González MM. Detección precoz del cáncer en la mujer, enorme desafío de salud en México. Algunas reflexiones. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 2017;16(3):14-22.
20. Nour NM. Cervical cancer: a preventable death. *Reviews in Obstetrics and Gynecology*. 2009;2(4):240.
21. Montiel Carbajal MM, Urquidi Treviño LE. Factores de riesgo asociados a cancer cervicouterino y de mama. *Revista Sonorense Psicología*. 1998;12(1):30-6.
22. Kuo C-T, Wang J-Y, Lin Y-F, Wo AM, Chen BPC, Lee H. Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array. *Scientific reports*. 2017;7(1):4363.
23. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(19):1441-54.
24. Carranza-Aranda AS, Segura-Cabrera A, Cárdenas-Vargas A, Herrera-Rodríguez SE. Reposicionamiento de fármacos identificados por métodos computacionales (SVBS), para su uso como terapias contra el cáncer. *Salud Jalisco*. 2020;7(1):48-57.
25. Barrios E, Garau M. Cancer: magnitude of the problem in the world and in Uruguay, epidemiological aspects. *ANALES DE LA FACULTAD DE MEDICINA-UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA URUGUAY*. 2017;4(1):9-+.
26. Lewis MJ. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. 2004 3(3), 206-208.

27. Vicuña NC, Hernández GA, Alcázar LF, Garrón GWM, Zúñiga IP, editors. Cáncer cervicouterino 2009. *Anales de Radiología, Mexico*, 8(1), 61-79.
28. Villafuerte Reinante J, Hernández Guerra Y, Reina A, Elisa Z, Naranjo Hernández L, González Alonso JÁ, et al. Aspectos bioquímicos y factores de riesgo asociados con el cáncer cervicouterino. *Revista Finlay*. 2019;9(2):138-46.
29. Martínez-Galiano JM. El virus del papiloma humano (VPH): Un problema importante para la salud pública en vías de solución. *Index de Enfermería*. 2007;16(58):42-4.
30. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic oncology*. 2008;110(3):S4-S7.
31. Lizano-Soberón M, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A. Infección por virus del papiloma humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología*. 2009;4:205-16.
32. Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, Zur Hausen H, de Villiers E-M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70-9.
33. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2007;370(9590):890-907.
34. Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Current cancer drug targets*. 2007;7(1):79-89.
35. Jaled M, Moreno HC. Virus papiloma humano (HPV) Parte II-clínica y terapéutica. *Dermatología Argentina*. 2010;16(2):102-9.
36. Reimers LL, Anderson WF, Rosenberg PS, Henson DE, Castle PE. Etiologic heterogeneity for cervical carcinoma by histopathologic type, using comparative age-period-cohort models. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2009;18(3):792-800.
37. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(1):11-22.
38. GenÓmica MENCENB. Identificación y caracterización de variantes en los genes HOXC13 y HOXD13 de mujeres mexicanas con cáncer cervical. 2018. . Tesis Doctoral. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.
39. Ball C, Madden JE. Update on cervical cancer screening: Current diagnostic and evidence-based management protocols. *Postgraduate medicine*. 2003;113(2):59-70.
40. de Nucci AAP, Habich D. InfoFASGO• Tracto Genital Inferior y Colposcopia Triage en el Screening Molecular del Cáncer de Cuello Uterino: Diferentes opciones, Nuevas oportunidades. *FASGO CIENCIA*. 2016;15:73-89
41. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2018;143:22-36.

42. Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular oncology*. 2007;1(1):84-96.
43. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2011(51):e2720.
44. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of biomolecular screening*. 2006;11(8):922-32.
45. Li Q, Chen C, Kapadia A, Zhou Q, Harper MK, Schaack J, et al. 3D models of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer metastasis: high-throughput screening assay development, validation, and pilot screen. *Journal of biomolecular screening*. 2011;16(2):141-54.
46. Holmes B, Zhu W, Li J, Lee JD, Zhang LG. Development of novel three-dimensional printed scaffolds for osteochondral regeneration. *Tissue Engineering Part A*. 2015;21(1-2):403-15.
47. Nyga A, Cheema U, Loizidou M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *Journal of cell communication and signaling*. 2011;5(3):239.
48. Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer K-L, et al. Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PloS one*. 2013;8(3).
49. Pérez JCG, Castilla ME, Zajgla JM, Lagunas VM. Esferoides tumorales multicelulares en la evaluación de estrategias terapéuticas anticancerosas. *Revista de Educación Bioquímica*. 2006;25(4):101-7.
50. Novak JF, Trnka F. Proenzyme therapy of cancer. *Anticancer research*. 2005;25(2A):1157-77.
51. Aranda Haro M. Los esferoides multicelulares como test predictivos de radiosensibilidad y radiocurabilidad tumoral: Universidad de Granada; 2003. Tesis doctoral. 188p
52. Alemán Miranda LL, Valenzuela Reyes MB. Comparación del crecimiento y morfología de esferoides tumorales obtenidos por agitación mecánica. Licenciatura en Ingeniería Biomédica. 2017. Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez
53. Sheth DB, Gratzl M, oacgr. Electrochemical mapping of oxygenation in the three-dimensional multicellular tumour hemi-spheroid. *Proceedings of the Royal Society A*. 2019;475(2225):20180647.
54. Sutherland RM, Durand RE. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. *Spheroids in cancer research*: Springer; 1984. p. 24-49.
55. Rosenbluth JM, Schackmann RCJ, Gray GK, Selfors LM, Li CM-C, Boedicker M, et al. Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages. *Nature communications*. 2020;11(1):1-14.

56. Guirado D, Aranda M, Ortiz M, Mesa JA, Zamora LI, Amaya E, et al. Low-dose radiation hyper-radiosensitivity in multicellular tumour spheroids. *The British journal of radiology*. 2012;85(1018):1398-406.
57. Godoy P, Hengstler JG, Ilkavets I, Meyer C, Bachmann A, Müller A, et al. Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor β -induced apoptosis. *Hepatology*. 2009;49(6):2031-43.
58. Kost DP, Michalopoulos GK. Effect of 2% dimethyl sulfoxide on the mitogenic properties of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor in primary hepatocyte culture. *Journal of cellular physiology*. 1991;147(2):274-80.
59. Tateno C, Yoshizato K. Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *The American journal of pathology*. 1996;148(2):383.
60. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of toxicology*. 2013;87(8):1315-530.
61. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*. 2014;12(4):207-18.
62. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I, editors. *Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems* 2005: Elsevier.
63. Hedlund TE, Duke RC, Miller GJ. Three-dimensional spheroid cultures of human prostate cancer cell lines. *The Prostate*. 1999;41(3):154-65.
64. Mikhail AS, Eetezadi S, Allen C. Multicellular tumor spheroids for evaluation of cytotoxicity and tumor growth inhibitory effects of nanomedicines in vitro: a comparison of docetaxel-loaded block copolymer micelles and Taxotere®. *PloS one*. 2013;8(4):e62630.
65. Cesarz Z, Tamama K. Spheroid culture of mesenchymal stem cells. *Stem cells international*. 2016;2016.
66. Nederman T, Norling B, Glimelius B, Carlsson J, Brunk U. Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer research*. 1984;44(7):3090-7.
67. Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *AACR. Cancer research*; 2012.15;72(10):2473-80.
68. Quintana LUZEA. Cultivo celular 3D. *Universitarios Potosinos*. 2019;236:4-10.
69. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Lomas C, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based

- functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC biology*. 2012;10(1):1-21.
70. Lee JM, Mhaweche-Fauceglia P, Lee N, Parsanian LC, Lin YG, Gayther SA, et al. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro. *Laboratory investigation*. 2013;93(5):528-42.
71. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of cell science*. 2012;125(13):3015-24.
72. Khetan S, Burdick JA. Patterning network structure to spatially control cellular remodeling and stem cell fate within 3-dimensional hydrogels. *Biomaterials*. 2010;31(32):8228-34.
73. Mittler F, Obeid P, Rulina AV, Haguët V, Gidrol X, Balakirev MY. high-Content Monitoring of drug effects in a 3d spheroid Model. *Frontiers in oncology*. 2017;7:293.
74. Gambari R, Hau DKP, Wong WY, Chui CH. Sensitization of Hep3B hepatoma cells to cisplatin and doxorubicin by corilagin. *Phytotherapy Research*. 2014;28(5):781-3.
75. Gimenez-Bonafe P, Tortosa A, Perez-Tomas R. Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Current cancer drug targets*. 2009;9(3):320-40.
76. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Prisco MG, et al. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(13):4299-311.
77. Willyard C. When drugs unintentionally affect gut bugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17(6):383-4.
78. Vuong C, Yeh AJ, Cheung GYC, Otto M. Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Expert opinion on investigational drugs*. 2016;25(1):73-93.
79. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-41.
80. García M, Vecino E. Vías de señalización intracelular que conducen a la apoptosis de las células de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 2003;78(7):351-64.
81. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and-independent mechanisms. *Science*. 1999;286(5443):1358-62.

XIII. Anexos

ANEXO 1. Operacionalización de las variables

VARIABLE INDEPENDIENTE

Variable	Definición	Tipo	Escala de medición	Operacional
Esferoides Tumorales	Modelo de cultivo 3D que aprovecha la tendencia natural a agregarse que muestran muchos tipos celulares, para crear masas multicelulares de forma esferoidal.	Nominal	Escala (Densidad celular determinada por $OD_{\lambda 570/590}$)	0: Control 1: 1×10^{-1} 2: 1×10^{-2} 3: 1×10^{-3}

VARIABLE DEPENDIENTE

Variable	Definición	Tipo	Escala de medición	Operacional
Cisplatino	Agente citotóxico. Se une al ADN, ARN para formar enlaces intracatenarios, estos aductos alteran la conformación del ADN e inhiben a la ADN polimerasa.	Nominal	Numérica	10 μ M/L 50 μ M/L 100 μ M/L
5-fluoracilo	Antimetabolito que inhibe la timidilato sintetasa y, por lo tanto, interfiere con	Nominal	Numérica	10 μ M/L

	la síntesis del ADN y ARN			50 µM/L 100 µM/L
Doxorrubicina	Crea complejos por intercalación entre pares de bases de ADN dañando la hélice e interfiriendo en la cadena de elongación.	Nominal	Numérica	10 µM/L 50 µM/L 100 µM/L
Taxol	Fármaco antimicrotubulos. Que inhibe la dinámica de reorganización normal de la célula esencial para las funciones vitales en las fases mitótica e interfase	Nominal	Numérica	10 µM/L 50 µM/L 100 µM/L

ANEXO 2 Carta de no conflicto de intereses



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS



La que suscribe L.E. Ana Jared Tenorio Salazar alumna de la Maestría en Ciencias Farmacobiológicas manifiesta que es autor principal del presente trabajo de tesis titulado “EVALUACIÓN IN VITRO DE FÁRMACOS ANTINEOPLASICOS EN UN MODELO CELULAR 3D DE CÁNCER CERVICOUTERINO” bajo la dirección de la Dra. Luz Alcántara Quintana y co-directora la Dra. Diana Patricia Portales Pérez.

Declaran que no tienen ninguna situación de conflicto de intereses real, potencial o evidente incluyendo ningún tipo de interés financiero o de otro tipo.

L.E. Ana Jared Tenorio Salazar

Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

ANEXO 3 Carta de conformidad de autoría



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS



A quien corresponda:

A través de la presente nos permitimos informar que para los involucrados en el protocolo de investigación titulado “EVALUACIÓN IN VITRO DE FÁRMACOS ANTINEOPLASICOS EN UN MODELO CELULAR 3D DE CÁNCER CERVICOUTERINO”, no tienen conflicto de interés considerando desde la generación del presente proyecto hasta la publicación de resultados y los datos que del mismo se generen.

Se dará el debido crédito a los participantes como autor principal correspondiente a la L.E. Ana Jared Tenorio Salazar, como co-autores a la Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana y la Dra, Diana Patricia Portales Pérez por lo que todos tendrán obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de investigación y serán responsables de la integridad y exactitud de los informes, además de aceptar en común acuerdo las normas éticas de la entrega de la información, para lo cual será necesario la publicación de los resultados negativos y positivos, mismos que podrán estar a disposición del público en general.

Se acepta estar de acuerdo con lo estipulado en el presente documento.

L.E. Ana Jared Tenorio Salazar

Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana

Dra, Diana Patricia Portales Pérez

ANEXO 4 Carta de aprobación INCAN



Ciudad de México a 28 de febrero de 2021

Dra Luz Eugenia Alcántara Quintana, Catedra CONACYT, Investigador Principal,
CIACYT, UASLP

Por medio de la presente me permito hacer de su conocimiento de la resolución de la Autorización del Protocolo: 133300410C0026, titulado "Evaluación *In Vitro* de Fármacos Antineoplásicos en un modelo celular 3D de Cáncer cervicouterino", con fecha de ingreso del: 30 de Agosto de 2020, con el siguiente NÚMERO DE PROTOCOLO:012/048/OMI / CB/20 en donde usted funge como Director de Tesis de la estudiante de maestría en el posgrado de ciencias farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí; LE. Jared Tenorio Salazar. El protocolo esta aprobado por dos años, no omito mencionar que debe entregar la Tesis, así como darle agradecimientos al Instituto Nacional de Cancerología por proveerles las muestras de nuestro banco de Tumores. Sin otro particular, agradezco la atención prestada a la presente, reciba un cordial saludo.

Atentamente,

Dra. Jazmin Marlen Pérez Rojas
Investigador en Ciencias Médicas D
Instituto Nacional de Cancerología

Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, CP. 04500, Ciudad de México, Ciudad de México.
Tel.: (55) 56005200 ext. 200, www.incan.salud.gob.mx

