



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo de fin de grado

Efecto del cultivo in vitro en
esferoides 3D sobre el tratamiento
con quimioterapia e inmunoterapia
en líneas de cáncer colorrectal
humano

Cristina Espeja Sánchez
Junio 2018

Directores: Julián Pardo Jimeno
Pilar Lanuza Morte

Departamento de Biología Molecular y Celular
Grupo de Inmunidad Efectora, Centro de Investigación Biomédica (CIBA)

Índice

1. Resumen/Abstract	Pág 1
2. Introducción	
2.1. Incidencia del cáncer colorrectal	Pág 2
2.2. Fisiopatología.....	Pág 2
2.3. Tratamientos	
2.3.1. Inmunoterapia con anticuerpos frente a EGFR	Pág 2
2.3.2. Quimioterapia	Pág 3
2.4. Posibles mecanismos de resistencia a terapias anti-EGFR	Pág 5
3. Antecedentes y objetivos	Pág 6
4. Materiales y métodos	
4.1. Cultivos celulares	
4.1.1. Líneas celulares empleadas	Pág 7
4.1.2. Mantenimiento, incubación y manipulación de líneas celulares	Pág 7
4.1.3. Recuento y viabilidad celular	Pág 7
4.1.4. Conservación de células y descongelación	Pág 8
4.1.5. Formación de cultivos en 3D por el método de la gota colgante	Pág 8
4.1.6. Disgregación de esferoides	Pág 8
4.2. Análisis del marcador de superficie EGFR	
4.2.1. Análisis de expresión de EGFR en cultivo 2D.....	Pág 9
4.2.2. Análisis de expresión de EGFR en cultivo 3D	Pág 9
4.3. Análisis de resistencia a doxorrubicina en líneas de CCR resistentes a quimioterapia	
4.3.1. Ensayo MTT para el análisis de resistencia a doxorrubicina en cultivo 2D..	
.....	Pág 9
4.3.2. Ensayo Prestoblue para el análisis de resistencia a doxorrubicina	
en cultivo 3D	Pág 10
4.4. Optimización del protocolo de análisis de citotoxicidad de cetuximab en	
líneas de cáncer colorrectal	
4.4.1. Análisis de citotoxicidad de cetuximab mediante citometría de flujo.....	Pág 10
4.4.2. Análisis de citotoxicidad de cetuximab mediante ensayo MTT	Pág 11
5. Resultados y discusión	
5.1. Caracterización de cultivos celulares de CCR en función de su	
expresión de EGFR	
5.1.1. Optimización de condiciones de marcaje	Pág 12
5.1.2. Expresión de EGFR en cultivos celulares de CCR en 2D	Pág 13
5.1.3. Expresión de EGFR en cultivos celulares de CCR en 3D	Pág 14
5.2. Caracterización de cultivos celulares de CCR en función de su	
resistencia o sensibilidad a doxorrubicina	Pág 16
5.3. Optimización del protocolo de análisis de citotoxicidad de cetuximab	
en líneas de CCR	
5.3.1. Análisis de citotoxicidad de cetuximab en líneas de CCR por	
citometría de flujo	Pág 18
5.3.2. Análisis de citotoxicidad de cetuximab en líneas de CCR	
mediante ensayo MTT	Pág 19
6. Conclusiones / Conclusions	Pág 21
7. Bibliografía	Pág 22

1. Resumen/ Abstract

El cáncer colorrectal es uno de los cánceres más comunes en la actualidad, con 1,2 millones de nuevos casos al año. Los tratamientos quimioterápicos han demostrado ser eficaces, pero a menudo los pacientes recaen en la enfermedad debido a resistencias a los fármacos. Como alternativa han surgido las terapias dirigidas que nos proporcionan mayor selectividad frente a las células tumorales y solucionan el problema de quimioresistencia. Una de ellas está basada en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ya que las células tumorales poseen un exceso de expresión. Existen diferentes terapias anti-EGFR entre las cuales se haya el uso de anticuerpos monoclonales, uno de los anticuerpos monoclonales más utilizados para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico es Cetuximab. Se ha descubierto que también existen resistencias a estos tratamientos, la mayoría producidas por mutaciones en la vía RAS/MAPK. Actualmente el cultivo celular más utilizado para el estudio in vitro del cáncer colorrectal es en monocapa, gran parte de los carcinomas sólidos tienen lugar en tres dimensiones, por lo que se han desarrollado métodos que nos proporcionan cultivos en tres dimensiones más adecuados para el estudio. La finalidad de este trabajo es observar la expresión de EGFR en diferentes líneas celulares de CCR y relacionarla con la resistencia o sensibilidad a una droga modelo, doxorubicina. Además se ha comparado la diferencia, tanto de expresión de EGFR como de resistencia a doxorubicina, entre el cultivo monocapa convencional y el cultivo tridimensional. Por último se ha optimizado un protocolo de análisis de citotoxicidad de cetuximab en líneas de cáncer colorrectal, con el fin de en un futuro comparar la efectividad de dicho anticuerpo en líneas celulares con mutaciones en la vía RAS/MAPK.

Colorectal cancer is one of the most common types of cancer in the world today, with 12 million cases per year. Chemotherapy treatment has proven to be efficient, however, due to patients becoming resistant to the medication, the cancer often returns. As an alternative, have sprung up targeted therapies that provide us with greater selectivity against tumour cells and solve the problem of chemoresistance. One of them is based on epidermal growth factor receptor (EGFR), since the tumor cells poses an expression excess. There are several anti-EGFR therapies like the one based on the use of monoclonal antibodies. One of the most used monoclonal antibody for treating metastatic colorectal cancer is Cetuximab. It has also been discovered some resistances to these treatments, mostly caused by mutations in the RAS/MAPK via. Currently, the most cell culture used for in vitro studies of colorectal cancer take place in monolayer. Most of the solid carcinomas take place in three dimensions, that is why different methods that provides us with cultures in these three dimensions have been developed for this study. The purpose of this study is to observe the expression of EGFR in different cellular lines of CRC and to relate it with the resistance or sensitivity of a model drug: doxorubicin. Further to this, the difference between the expression of the EGFR, as well as the resistance to doxorubicin between the conventional monolayer culture and the three-dimensional culture, has also been compared. Finally, a protocol analysis of cytotoxicity of cetuximab in lines of colorectal cancer has been optimized, in order to compare the effectiveness of this antibody when it comes to cells with mutations in RAS/MAPK via.

2. Introducción

1. Incidencia del cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los cánceres con más prevalencia e incidencia del mundo. Aproximadamente 1,2 millones de personas son diagnosticadas anualmente, con una mortalidad del 50%. El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común en hombres (746000 casos, 10.0% del total) y el segundo en mujeres (614000 casos, 9.2% del total). Además su prevalencia se ve aumentada año tras año por las dietas bajas en frutas y verduras y altas en carne roja, alimentos y grasa transformada, que se ha demostrado que confieren un mayor riesgo. Aproximadamente el 60% de los casos se diagnostican en países desarrollados y, después de Japón, Europa representa una de las regiones con tasas más altas tanto de incidencia (29,6 casos por 100000) como de mortalidad (13,3 casos por 100000). Dentro de Europa, España se posiciona ligeramente por encima de la media europea en términos de tasa de incidencia (30,4 por 100000), aunque la tasa de mortalidad es promedio (13,3 por 100000). [1,2]

2. Fisiopatología

El cáncer colorrectal es un tumor sólido producido por la transformación de las células de la mucosa intestinal en células tumorales. La mayoría de los cánceres colorrectales se desarrollan lentamente a lo largo del tiempo. Antes de la transformación tumoral usualmente se forma un crecimiento de tejido no canceroso (pólipo) en el revestimiento interno del colon, que puede evolucionar en cáncer con el tiempo. [3]

El microentorno del tumor es muy importante en el estudio del cáncer colorrectal, ya que las células tumorales se encuentran en el interior de una masa de tejido, donde establecen conexiones entre ellas y con otros componentes de la matriz extracelular. [3]

3. Tratamientos

3.1 Quimioterapia

En la actualidad el fármaco citotóxico indicado para el tratamiento de cáncer colorrectal es 5-fluorouracilo. Este es administrado de manera combinada con leucovorina y el agente de unión al ADN oxaliplatino (régimen FOLFOX), o con leucovorina y el inhibidor de topoisomerasa I irinotecán (régimen FOLFIRI). El 5-fluorouracilo, en el régimen FOLFOX, puede ser reemplazado por capecitabina, pero la combinación de capecitabina con irinotecán es más tóxica que FOLFIRI. [4,5]

A pesar de la eficacia de estos regímenes combinados, que han aumentado significativamente la tasa de respuesta y la supervivencia de pacientes con CCR metastásico (mCCR), solo 30-50% de los pacientes muestran una respuesta objetiva a cualquiera de las terapias combinadas. Por lo tanto, la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos es un problema clínico importante en el tratamiento de mCCR, causando la recaída de los pacientes en la enfermedad, la mayoría durante los primeros 3 años de su curación. [6,7]

Tanto 5-fluorouracilo como irinotecan y oxaliplatino son agentes que intervienen en la síntesis del ADN, ocasionando a las células la pérdida de su capacidad de división. La resistencia a estos fármacos puede deberse a una gran variedad de mecanismos como la inactivación de enzimas y bombas de eflujo. [6,8,9]

3.2 Inmunoterapia con anticuerpos frente a EGFR

Actualmente se estudian nuevos tratamientos dirigidos contra las células tumorales, que además de solucionar el problema de quimioresistencia, nos proporcionan mayor selectividad frente a las células cancerosas. Uno de ellos está basado en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). [12]

El receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR o HER1, es una glicoproteína que se encuentra en la superficie de algunas células. Posee tres dominios: un componente extracelular de unión a ligando, un segmento transmembrana lipofílico y un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa. Esta proteína juega un papel importante en muchas respuestas fisiológicas asociadas con el control de la proliferación celular. En ausencia de ligandos, los receptores EGF residen en la membrana de la célula de forma inactiva. Es necesaria la dimerización del receptor para que se produzca su activación, que puede ocurrir entre dos receptores idénticos, homodimerización, o entre distintos miembros de una misma familia, heterodimerización, generalmente con HER2, una proteína con un elevado potencial oncogénico. [10,11,12]

La dimerización y consiguiente activación puede tener lugar por la unión del ligando, factor de crecimiento epidérmico (EGF), por una elevada expresión de receptor o por transactivación. Existen dos hipótesis que tratan de explicar el proceso de dimerización por unión de ligando. El primero sugiere que el ligando se une directamente al receptor en forma monomérica, y es a continuación cuando se une a otro monómero generando el dímero. La segunda propone que la dimerización ocurre antes de que se de la unión del ligando, uniéndose este directamente al dímero. [10,11]

Cuando el factor de crecimiento está activo tiene lugar la activación de su tirosina quinasa y la transfosforilación de los residuos de tirosina, desencadenando cascadas de señalización intracelular (figura 1). La ruta de señalización más conocida de las iniciadas por el EGFR activado es la vía RAS/MAPK, que parece ser imprescindible para la proliferación celular. Otra vía importante tras la activación del EGFR es la del PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa), la cual genera señales de supervivencia celular y previene la apoptosis. [10,13]

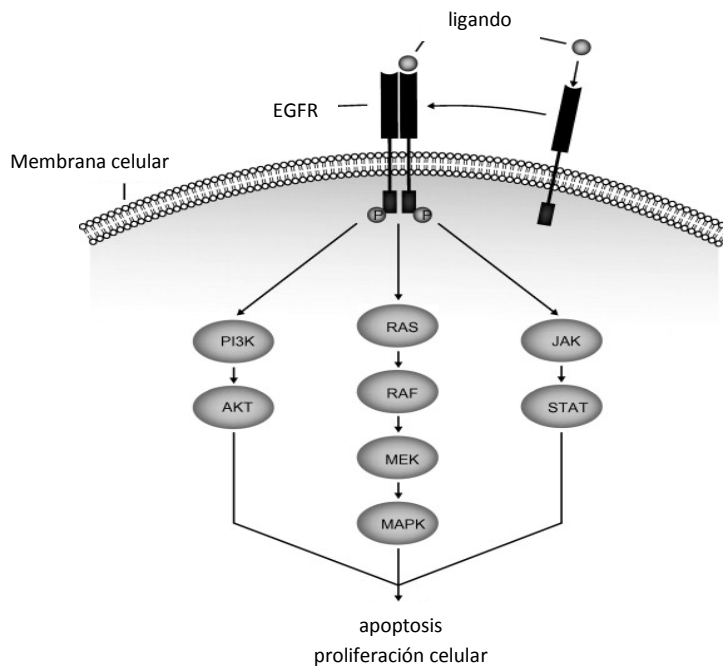


Figura 1. Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Adaptado de "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: Focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients" Monic Roengvoraphoj. et al. (2013).

La actividad de EGFR es esencial en el desarrollo del embrión, ya que participa en la organogénesis de muchos órganos. Sin embargo en el organismo adulto pierde este papel, salvo en casos concretos relacionados con el aparato reproductor y el embarazo. En el caso de las células tumorales se observa un exceso de expresión de EGFR, alcanzando valores de más de 2 millones de receptores por célula, mientras que en el caso de células no tumorales su nivel de expresión varía entre 20000 y 200000 moléculas por célula. Esto les confiere a las células tumorales una mayor capacidad de proliferación, diferenciación y supervivencia. [10,11]

Dada la gran diferencia de expresión observada en las células tumorales con respecto a las que no lo son, y la correlación directa de esta expresión con un peor pronóstico clínico, es de esperar que el EGFR sea una buena diana terapéutica, siendo objeto de estudio para nuevos tratamientos contra el cáncer. [13]

Existen dos terapias anti-EGFR basadas en diferentes modos de actuación. La primera se basa en el uso de inhibidores tirosina quinasa, capaces de bloquear la actividad enzimática de manera intracelular y la segunda en el uso de anticuerpos monoclonales que bloqueen la ruta por unión al receptor de membrana. [10,12]

Los anticuerpos monoclonales (mAb) comparten una secuencia de mecanismos de acción. En primer lugar se produce la unión del anticuerpo a la región extracelular del receptor, tras esto se internaliza el complejo receptor-anticuerpo, produciendo la inhibición de la vía de señalización mediada por EGFR, potenciando a su vez la estimulación de la respuesta inmune. [11]

Uno de los mAb más utilizados para el tratamiento de mCRC es Cetuximab, anticuerpo quimérico diseñado para inhibir de manera específica EGFR. El anticuerpo genérico se desarrolló combinando las regiones variables del anticuerpo precursor de ratón (mAB 225) con

las regiones constantes de inmunoglobulina G1, para reducir las posibles reacciones inmunológicas en pacientes. Dicho anticuerpo bloquea la dimerización provocando apoptosis y previniendo de esta manera el crecimiento del tumor. [11,13]

Cetuximab fue el primer anticuerpo monoclonal anti-EGFR aprobado por FDA (food and drug administration), para ser usado en humanos. Fue registrado como monoterapia, o en combinación con irinotecan, para el tratamiento de cáncer colorrectal con niveles altos de expresión de EGFR, en etapas tardías de la enfermedad, observándose en pacientes tratados una respuesta del 22.5%, aunque sin aumentar la supervivencia significativamente. Muchos resultados experimentales sugieren que el tratamiento con inhibidores de EGFR puede combinarse, con favorables resultados, con drogas citotóxicas, radiaciones ionizantes, citoquinas, y otros agentes que intervengan en el tratamiento de tumores con una elevada expresión del receptor. También se observó que los anticuerpos monoclonales y los inhibidores de tirosina quinasa tienen mecanismos de acción complementarios, ya que actúan en sitios diferentes, de manera no competitiva, teniendo la posibilidad de combinarlos para potenciar su efecto antitumoral. [10]

4. Posibles mecanismos de resistencia a terapias anti-EGFR

A pesar del avance científico que ha supuesto el descubrimiento de las terapias dirigidas, son muchos los pacientes con CCR que no se ven beneficiados por sus tratamientos. Esto puede deberse en gran medida a la heterogeneidad genética de los tumores, que es aún más elevada en el caso del cáncer colorrectal metastásico.[15]

Existen mecanismos de resistencia que pueden explicar este hecho, entre ellos se encuentra la ausencia de expresión o activación de EGFR, la coactivación con otros receptores y la presencia de mutaciones que activen moléculas de transducción de señales intracelulares, 40% de los casos. [11,15]

El 70% de CCR tienen alteraciones genéticas heterogéneas en genes que se ven envueltos en las señales de EGFR, afectando negativamente a la respuesta a mAbs. Estas alteraciones pueden estar en el tumor con anterioridad al tratamiento con mAbs, resistencia primaria, o surgir a partir de él por la presión selectiva que ejerce, resistencia secundaria. En el primer caso, tan solo el 10% de pacientes reacciona a mAbs de manera monoterápica, esto se debe en su mayor parte a mutaciones en KRAS (codones 12 y 13, exon 2). Esta no es la única causa ya que no todos los pacientes KRAS wt se benefician del tratamiento con mAbs, por lo que se están buscando nuevos biomarcadores de resistencia que puedan explicarlo, como mutaciones en BRAF y NRAS. Todas estas alteraciones convergen en la activación de la vía RAS/MAPK. Existen además mutaciones en PIK3CA (exon 20) y alteraciones en PTEN, que coexisten con mutaciones en RAS y se asocian con resistencia a mAbs. [15,17,18]

Existen alteraciones producidas por el propio tratamiento anti-EGFR, que inicialmente no se encontraban en el tumor. En este caso durante el tratamiento con Cetuximab se observa inicialmente una respuesta, que se ve truncada por la aparición de resistencia adquirida, limitando el beneficio de esta droga. Las bases moleculares de resistencia secundaria están poco estudiadas. Esta puede deberse a mutaciones en el dominio extracelular de EGFR, lo cual impide la unión de Cetuximab al receptor, a la amplificación de genes RTKs, como ERBB2 y MET, y a más comúnmente mutaciones en genes RAS, como KRAS y NRAS.[15,16,18]

3. Antecedentes y objetivos

Convencionalmente para el estudio *in vitro* del cáncer colorrectal se ha utilizado el cultivo en monocapa, pero se ha visto que los resultados no se relacionan siempre con lo observado en pacientes, lo que podría deberse en gran parte a que el desarrollo de los carcinomas sólidos *in vivo* se establece en tres dimensiones. [19]

Las células dentro de un tejido se encuentran encerradas en una masa estrechamente compactada. Dentro, las células establecen conexiones entre ellas y con componentes de la matriz extracelular. Por esta razón las fuerzas físicas y el entorno químico de las células en monocapa difieren mucho de las que se dan en un tejido tridimensional. En un cultivo bidimensional las células se cultivan sobre una superficie sólida plana, careciendo de las interacciones célula-célula y célula-matriz que están presentes en los tumores nativos. Se ha demostrado que esto tiene un marcado impacto en la morfología y señalización celular. [20,21]

En este grupo se ha optimizado el protocolo de formación y disgregación de cultivos celulares tridimensionales utilizando el método de la gota colgante, con diferentes objetivos, como el desarrollo de cultivos enriquecidos en células madre y protocolos de inmunoterapia basados en la capacidad citotóxica de las NK.

Se ha observado que existe una diferencia en la expresión de ligandos en 2D y 3D, influyendo la arquitectura 3D en la acción de tratamientos inmunoterápicos. He estado trabajando paralelamente a estos estudios en la optimización del modelo 3D, que es más representativo a nivel de arquitectura tumoral y microentorno.

En base a estos datos planteamos la hipótesis de que el cultivo en 3D podría modificar la sensibilidad a drogas quimioterápicas y a inmunoterapia de células de CCR, generando unos resultados más comparables con los observados *in vivo*.

Por ello el objetivo de este estudio es comparar la sensibilidad a doxorubicina de células de CCR en cultivos 2D o 3D y optimizar las condiciones para analizar su sensibilidad a cetuximab.

Se establecen los siguientes objetivos intermedios:

1. Caracterizar líneas de cáncer colorrectal en función a su sensibilidad/resistencia a drogas (doxorubicina).
2. Caracterizar líneas de cáncer colorrectal en función a su expresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico, EGFR.
3. Comparar la expresión de EGFR y la sensibilidad a doxorubicina en el modelo tridimensional de cultivo celular con el bidimensional, en monocapa.
4. Optimización del protocolo de análisis de citotoxicidad de cetuximab en líneas de cáncer colorrectal, Caco2 (KRAS wt, BRAF wt, PIK3 wt).

4. Materiales y métodos

4.1 Cultivos celulares

4.1.1 Líneas celulares empleadas

En este trabajo se han utilizado las líneas celulares humanas HCT116, HT29, CaCo2, LoVo, SK-CO-1, COLO 205 y DLD-1 provenientes de carcinomas colorrectales. Las células HCT116 (ATCC[®] CCL-247) y HT29 (ATCC[®] HTB-38). Las células CaCo2, cedidas por el grupo de la Dra. Ana Isabel Alcalde, de la facultad de veterinaria de Zaragoza. Las células LoVo y COLO205 cedidas por el grupo del Dr. José Díaz Pereira. Las células SK-CO-1 y DLD-1 cedidas por el laboratorio de Gabriel Gil. Las siete líneas celulares tienen una morfología similar a las células epiteliales y todas son adherentes, COLO 205 además también crece en suspensión.

4.1.2 Mantenimiento, incubación y manipulación de líneas celulares

Las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo de 25 o 75 cm² (Corning). Las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) suministrado por Sigma (España), salvo las COLO 205, para las que utilizamos medio RPMI-1640 (Sigma, España), ambos medios basales. Dichos medios se suplementaron con un 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma), Glutamax 2 mM y antibióticos (penicilina, 100 U/ml; estreptomycin, 100 µg/ml), estos últimos se añaden para evitar contaminaciones bacterianas, ya que los medios están destinados al cultivo de células humanas, mientras que el Glutamax se añade como fuente de L-glutamina, un aminoácido esencial que debe ser añadido justo antes de su uso, debido a su inestabilidad. Tras suplementarlos pasaremos a llamarlos medios completos. Las células fueron subcultivadas cada dos o tres días dependiendo de la velocidad de crecimiento y uso de las mismas. Los subcultivos fueron llevados a cabo mediante tripsinización de las células adherentes con Tripsina-EDTA (Sigma), haciendo una dilución 1:3. En el caso de COLO 205 se realizó la dilución sobre el conjunto de las células tripsinizadas y las células en suspensión que se encuentran en el sobrenadante, de esta manera no perdemos la población de células que se encuentran en suspensión. Los frascos de cultivo se mantuvieron en un incubador termostatzado a 37 °C en aire saturado de humedad y con regulación electrónica de flujo de CO₂ (Panasonic), manteniendo una concentración del 5%. Las manipulaciones se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar vertical (Telstar Bio All), en condiciones de esterilidad.

4.1.3 Recuento y viabilidad celular

Para realizar los recuentos y calcular la viabilidad celular, se tiñeron las células con azul Trypan, suministrado por Sigma. Este colorante es capaz de penetrar en las células que han perdido la integridad de su membrana, y por tanto están muertas, diferenciándolas de las células viables por su distinta coloración, ya que estas mantienen su membrana intacta y no internalizan el colorante. Para llevar a cabo esta técnica se realizó una dilución 1:1 de la suspensión celular y el colorante y se realiza el recuento utilizando la cámara Neubauer y el microscopio óptico (Nikon).

4.1.4 Conservación de células y descongelación

Para conservar las líneas celulares éstas se almacenaron congeladas en un ultracongelador a -80°C. Para ello se tripsinizaron las células con normalidad, como se explica en el apartado 4.1.2 y se centrifugaron a 85 xg durante 5 minutos, para que precipitasen tan solo las células viables, que son las que se quieren conservar. El sobrenadante se resuspendió en medio DMEM suplementado con 10% de dimetilsulfóxido DMSO, suministrado por Sigma. El DMSO es un agente criopreservante que evita los efectos perjudiciales de formación de cristales de hielo en el interior de la célula. A continuación se añadió a viales estériles de congelación, suministrados por Nunc (Dinamarca), dispuestos en una caja con hielo. Finalmente se introdujeron en un congelador a -80°C.

Para la descongelación de células, el contenido se resuspendió poco a poco conforme se iba descongelando en 10 ml de medio completo atemperado y se centrifugó a 85 xg durante 5 minutos, para que finalmente fueran recuperadas las células vivas en 5 mL de medio completo.

4.1.5 Formación de cultivos en 3D por el método de la gota colgante

Para la formación de cultivos en 3D in vitro se utilizó el método de la gota colgante. El método consiste en generar gotas que contienen una suspensión monocelular que proviene del cultivo en placa (2D). Gracias a la adición de un compuesto con alta tensión superficial, como la metilcelulosa, estas gotas que se disponen sobre la tapa de una placa Petri, quedan adheridas al plástico tras voltear la tapa. El fondo de la placa se mantiene cubierto con agua para miliQ para evitar la excesiva evaporación. En estas condiciones, debido a la gravedad, las células se deslizan hasta el final de la gota poniéndose en contacto unas con otras. En base a trabajos previos del grupo se ha establecido un periodo de incubación de 48 horas para que las líneas estudiadas generen un cultivo en 3D con forma de esfera (esferoide) que simula el entorno que se da en un tumor sólido real. El método ha sido optimizado para generar esferoides de 1000 células por gota. Para ello se preparó una mezcla de Medio DMEM completo suplementado con metilcelulosa (Methocel, Sigma), sobre esta se añadió un volumen de células adecuando para que la mezcla resultante tenga las siguientes proporciones: 10% de células en medio DMEM completo, 20% de Methocel y 70% de medio completo DMEM. De dicha mezcla, se generaron gotas de 25 µl sobre la tapa de una placa Petri y se incubó durante 48 h en la estufa a 37°C.

4.1.6 Disgregación de esferoides

Para realizar una caracterización posterior del fenotipo de las líneas celulares cultivadas en condiciones 3D es necesaria la disgregación de esferoides en células individuales. Para ello se recogieron los esferoides de la placa de Petri y se dispusieron en una placa de 96 pocillos de fondo cónico, suministrada por Nunc (Dinamarca). A continuación, se lavó con 0.5% de PBS y 2 mM de EDTA, se tripsinizaron y se incubaron en la estufa a 37°C entre 5 y 10 minutos. Tras la incubación, las adhesiones moleculares entre células se rompen y una rápida resuspensión mecánica permite la disgregación del esferoide.

4.2 Análisis del marcador de superficie EGFR

4.2.1 Análisis de expresión de EGFR en cultivo 2D

El análisis del nivel de expresión de EGFR se realizó mediante citometría de flujo FACScan (BD BioSciences). El citómetro es capaz de analizar de manera individual cada célula de una muestra dada. Por defecto, analiza el tamaño y la complejidad celular de cada célula pero además se puede incorporar mediciones de fluorescencia para poder analizar distintos fluoróforos. Se utilizó para el marcaje un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (Miltensyi), isotipo IgG1, marcado con el fluoróforo ficoeritrina (PE). Se llevó a cabo una optimización de las condiciones de marcaje, variando el número de células y la concentración de anticuerpo utilizando para ello la línea HCT-116. Las condiciones seleccionadas para realizar los ensayos sobre todas las líneas fueron 150000 células/ pocillo y una dilución 1:50 del anticuerpo o el isotipo IgG1-PE en PBS al 5% de SFB. El isotipo no reconoce ninguna proteína presente en la célula diana pero conserva todas las características inespecíficas del anticuerpo usado en el experimento, de manera que nos indica la presencia de posibles uniones inespecíficas. El marcaje se realizó en una placa de 96 pocillos de fondo cónico. Se dejó incubar durante 15 minutos a 4°C. Tras lavar la placa con PBS al 5% de SFB, el marcaje se fijó con paraformaldehído (PFA), suministrado por Scharlau, ya que evita la precipitación de las muestras y la formación de cristales, de esta manera puede pasar más tiempo hasta su análisis por citometría. A continuación se trasladó a un tubo de citometría en el cual se añadieron 200 µl de PBS 5% SFB. Se analizó la muestra mediante un citómetro de flujo.

4.2.2 Análisis de expresión de EGFR en cultivo 3D

Para estudiar si la arquitectura tridimensional afecta al nivel de expresión del receptor, se seleccionaron de modo representativo las líneas HCT116, HT29 y CaCo2. Se recogieron 10 esferoides/pocillo para alcanzar la densidad celular deseada. Los esferoides se disgregaron y se marcaron como se ha explicado en los 4.1.6 y 4.2.1.

4.2.3 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando la prueba t de Student, para la comparación de expresión de EGFR entre el modelo 2D y 3D, y un análisis de la varianza (ANOVA), para los datos de expresión de EGFR de las diferentes líneas celulares en 2D. La significancia estadística se estableció para una $P < 0.05$.

4.3 Análisis de resistencia a doxorrubicina en líneas de CCR resistentes a quimioterapia

4.3.1 Ensayo MTT para el análisis de resistencia a doxorrubicina en cultivo 2D

Analizamos la resistencia a doxorrubicina en las líneas celulares descritas en el apartado 4.1.1, que contienen mutaciones que las hacen resistentes a quimioterapia. Mediante este ensayo podemos valorar si existe una relación entre el estado mutacional y la quimiorresistencia. La sensibilidad de las líneas de CCR a doxorrubicina se determinó analizando el porcentaje de supervivencia (IC50) mediante bromuro de dimetiazolil difeniltetrazolium (MTT). El MTT es una molécula capaz de entrar en las células y ser metabolizada a azul de formazán; este

compuesto tiene color y es insoluble, precipitando en las células viables que son capaces de metabolizarlo.

Para cada una de las líneas a estudiar se sembraron placas de 96 pocillos de fondo plano (3000 células/pocillo, en un volumen de 100 μL) y se dejó incubar 24 horas a 37°C. para que las células se adhieran a la placa. Tras este periodo se añadieron a cada pocillo otros 100 μL de medio con una concentración apropiada de doxorubicina, cedida por el hospital miguel Servet, de manera que, en los 200 μL de volumen final, se obtuvieran las concentraciones de 0.096, 0.48, 0.96, 1.92, 9.6, 48 y 96 μM . El ensayo contó como punto control con un pocillo con células en medio sin doxorubicina y como blanco con pocillos sin células pero con las distintas concentraciones de doxorubicina, ya que es una droga que presenta fluorescencia y esta aumenta con la concentración. Cada una de las condiciones se ensayó por triplicado para tratar de evitar el error experimental. La placa se incubó 24 h para que actuara el fármaco. Tras la incubación, se añadieron 20 μl de MTT (bromuro de dimetiltiazolil difeniltetrazolium, Sigma) y se dejó incubar durante 2 horas en una estufa a 37°C. Una vez formados los cristales de formazán, se centrifugó a 2850 xg durante 15 minutos y tras retirar el sobrenadante, los cristales se disolvieron en, 100 μl de DMSO para leer la absorbancia a 540 nm.

4.3.2 Ensayo Prestoblue para el análisis de resistencia a doxorubicina en cultivo 3D

El reactivo PrestoBlue es una solución basada en Resazurina, esta molécula es un indicador redox que permite detectar la viabilidad celular por la conversión de una tinción no fluorescente de color azul a una de color rojo altamente fluorescente, en respuesta a una reducción química del medio de cultivo, resultado del crecimiento celular. Analizamos la resistencia a doxorubicina en cultivo 3D para las líneas celulares HCT116, HT29 y CaCo2, para determinar si la difusión en estas condiciones de cultivo puede afectar a la sensibilidad a la droga.

Para ello en una placa de 96 pocillos se dispusieron 2 esferoides por pocillo y se añadió doxorubicina a concentraciones finales de 0.096, 0.48, 0.96, 1.92, 9.6 μM en un volumen de 200 μl . Cada condición se analizó por triplicado, para intentar minimizar el error experimental, dejando también un triplicado de pocillos control sin fármaco. Teniendo como resultado una placa sembrada en 6 filas, para las 6 concentraciones de fármaco a estudiar, con tres columnas cada una, para cada línea celular. Se dejó incubar durante 24 horas para que actuara el fármaco, a continuación se añadieron 150 μl de PrestoBlue™ (Invitrogen) por pocillo y se dejó incubar durante 4 horas en una estufa a 37 °C. Tras el tiempo de incubación se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación 528/20 nm y 590/30 nm de emisión.

4.4 Optimización del protocolo de análisis de citotoxicidad de cetuximab en líneas de cáncer colorrectal

4.4.1 Análisis de citotoxicidad de cetuximab mediante citometría de flujo

Analizamos por citometría de flujo si el anticuerpo Cetuximab, cedido por el Servicio de Farmacia del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, tiene un efecto sobre la viabilidad celular, ya que inhibe las señales de supervivencia y proliferación que provienen del EGFR. Utilizamos la línea celular CaCo2, ya que es la única de las líneas utilizadas que no tiene mutaciones en la vía.

En primer lugar se dispusieron las células en una placa de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de 5000 células por pocillo en un volumen de 100 μl y se dejaron incubando en una

estufa a 37°C durante 12 horas, para que se adhirieran a la placa. Tras la incubación añadimos la cantidad correspondiente de anticuerpo a cada pocillo, siendo las concentraciones finales deseadas 10, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2500 µg/ml, en un volumen final de 200 µl. La placa se incubó durante 48 horas y se analizó la citotoxicidad ejercida por el anticuerpo mediante citometría de flujo. Para ello recogimos tanto las células muertas presentes en el sobrenadante, como las células vivas a través de la tripsinización de las células adheridas. La viabilidad celular se determinó mediante el marcaje de Anexina (1,5:100) y 7AAD (1:100) (1 µL de anexina-V-FITC + 1µL de AAD en 100 µL de tampón de unión a anexina por pocillo).

En células viables la fosfatidilserina se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular, cuando se empieza a desencadenar el proceso de la apoptosis, migra a la capa externa de dicha membrana, donde se da la unión a Anexina, por otro lado el 7AAD se internaliza en aquellas células que han perdido la integridad de la membrana plasmática. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, analizamos los resultados en el citómetro de flujo.

4.4.2 Análisis de citotoxicidad de cetuximab mediante ensayo MTT

Realizamos ensayos MTT para analizar la citotoxicidad de Cetuximab sobre la línea de cáncer colorrectal CaCo2, para poder comparar los resultados con los obtenidos por citometría. Para ello en primer lugar se dispusieron las células en una placa de 96 pocillos, a una densidad de 5000 células por pocillo en un volumen de 100 µl. Se incubaron 12 horas y se añadió el anticuerpo a las concentraciones descritas en el apartado 4.4.1. La placa se incubó 48 horas en una estufa a 37 °C. Tras la incubación se realizó el análisis de viabilidad por MTT como se ha explicado en el apartado 4.3.1.

5. Resultados y discusión

1. Caracterización de cultivos celulares de CCR en función de su expresión de EGFR

1.1. Optimización de condiciones de marcaje

En primer lugar para optimizar las condiciones de marcaje se realizó un experimento, con la línea celular HCT116, variando el número de células y la concentración de anticuerpo, anti-EGFR.

Se analizaron las siguientes condiciones de marcaje:

- 1 μ l de anti-EGFR en 50 μ l totales para 150000 células.
- 1 μ l de anti-EGFR en 100 μ l totales para 150000 células.
- 1 μ l de anti-EGFR en 100 μ l totales para 300000 células.

Se analizó también la fluorescencia de un control sin marcar y otro marcado con el isotipo, con la misma IGG que el anticuerpo Anti-EGFR pero sin ser específico, lo que nos permitirá observar las uniones inespecíficas.

Comparando la señal del control y el isotipo observamos que la fluorescencia emitida por las células de ambos pocillos es similar, por lo que podemos considerar que apenas se dan uniones inespecíficas y a partir de este ensayo solo utilizaremos como control las células sin marcar.

Se observó que para el marcaje en un volumen de 50 μ l para 150000 células, se obtuvo la mayor señal, puesto que el pico está más desplazado hacia la derecha del histograma (figura 2).

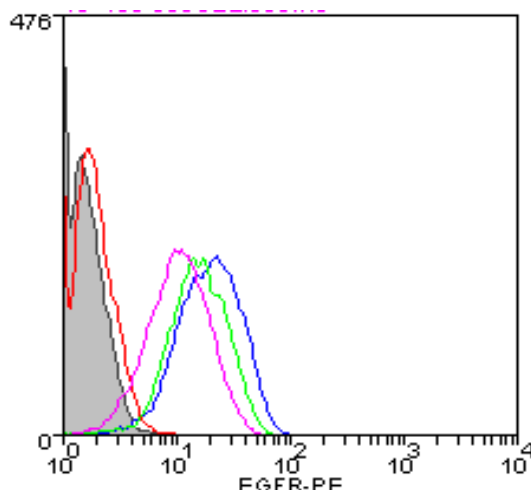


Figura 2. Análisis de expresión de EGFR en cultivos celulares de CCR. El histograma muestra una determinación representativa de la línea celular HCT116. La línea gris corresponde al control sin marcar, la roja al control del isotipo, la azul a las condiciones de marcaje de 50 μ l totales para 150000 células, la verde a las de 100 μ l totales para 150000 células y la rosa a las de 100 μ l totales para 300000 células

El segundo pocillo de mayor intensidad es el correspondiente a la condición de marcaje de 100 μ l para 150000 células, por lo que podemos ver que a mayor volumen total, el anticuerpo se encuentra más diluido por lo que la probabilidad de encuentro disminuye, reduciendo a su vez la fluorescencia. Esto se relaciona con el dato de fluorescencia obtenido para 100 μ l en 300000 células, donde además de la mayor dilución, al haber un mayor número de células el anticuerpo resulta insuficiente.

Tras los resultados observados, las condiciones seleccionadas para realizar los ensayos fueron 150000 células/ pocillo y una dilución 1:50 del anticuerpo o el isotipo IgG1-PE.

1.2. Expresión de EGFR en cultivos celulares de CCR en 2D

Se realizó la caracterización, en función de la expresión del ligando EGFR, de 7 líneas celulares de cáncer colorrectal en cultivo monocapa. El nivel de expresión de EGFR en las líneas marcadas con el anticuerpo monoclonal, se comparó con la expresión observada en el control sin marcar (figura 3).

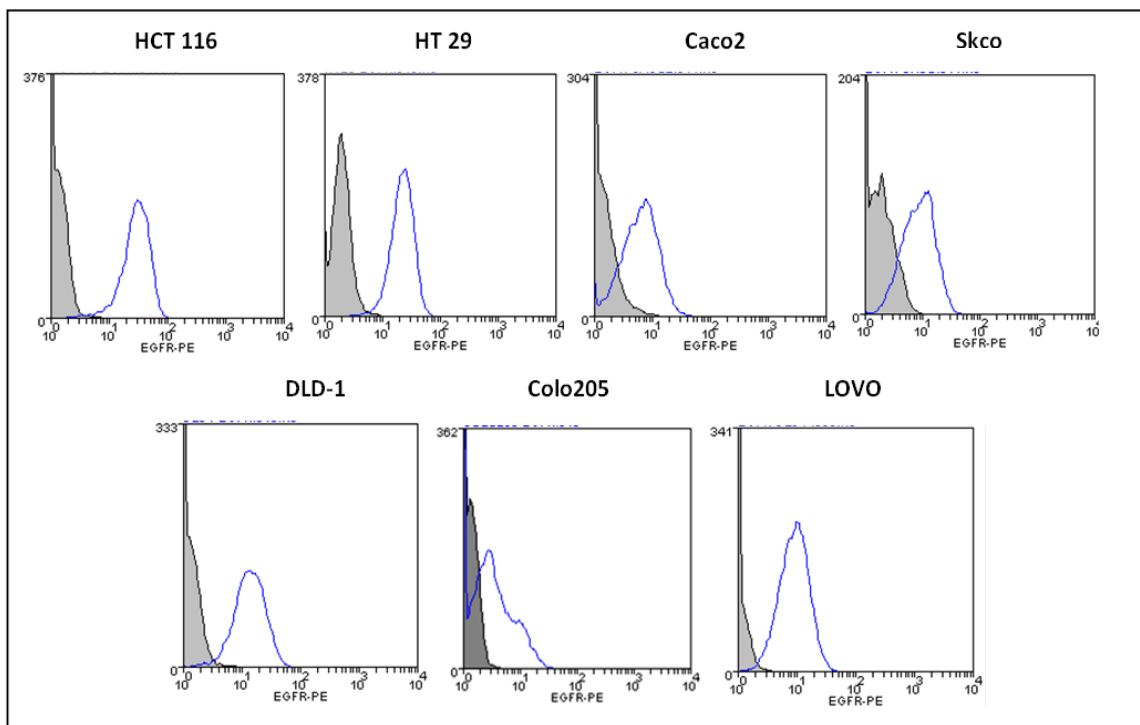


Figura 3. Histogramas representativos del marcaje de cada línea con mAb anti-EGFR y del control sin marcar. (n=3)

Para calcular la intensidad de fluorescencia se restó la intensidad obtenida en el control, ya que esta no se debe a EGFR, y se realizó la media de los experimentos de cada línea celular (figura 4).

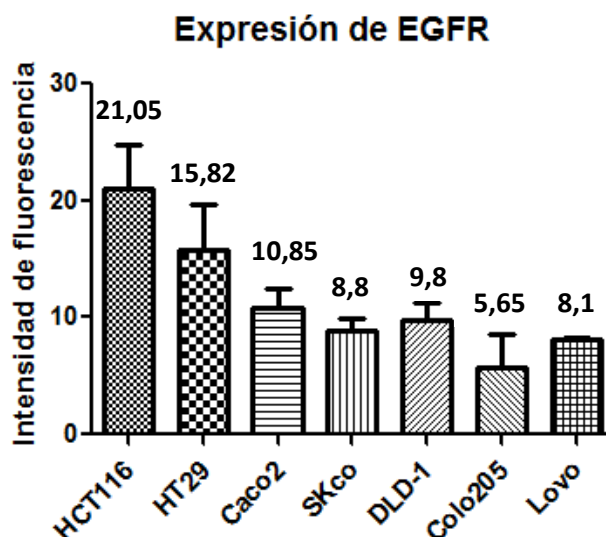


Figura 4. Intensidad media de fluorescencia observada en las diferentes líneas celulares de CCR, marcadas con anti EGFR-PE. (n=3)

Se observó que la expresión del ligando variaba de unas líneas celulares a otras, siendo la más alta HCT116 con un valor de 21,05 y la más baja Colo205 con 5,65. Ambos valores podrían indicar una muy baja expresión del ligando, lo que puede deberse a una mala unión del anticuerpo, por haberlo añadido en una concentración inferior a la necesaria, o a que estas líneas en concreto tengan muy poco ligando en su superficie celular. Si bien no se puede concluir mucho sobre esto ya que no tenemos líneas de referencia donde comparar.

A pesar de ello se obtienen diferencias significativas de expresión entre las diferentes líneas celulares de CCR, observadas estadísticamente con el test ANOVA ($P=0,0064 > 0,05$).

Los resultados se correlacionan con los obtenidos en estudios similares, donde las líneas celulares que presentan mayor nivel de expresión son HCT116 y HT29. En el caso de Colo205 y Caco2 en estudios anteriores se observó que apenas expresaban EGFR, lo que se asemeja a los resultados de expresión para la línea celular Colo205, que presenta la menor expresión de ligando de todas las líneas celulares de CCR estudiadas. [22,23]

1.3 Expresión de EGFR en cultivos celulares de CCR en 3D

Se estudió la expresión de EGFR de cultivos tridimensionales, seleccionados para ello, de las líneas celulares HCT116, HT29 y Caco2.

Se escogieron estas líneas celulares con el fin de comparar, en un futuro, la capacidad citotóxica de anticuerpos monoclonales anti-EGFR, en líneas celulares con mutaciones en la vía de señalización de EGFR (tabla 1).

Tabla 1. Mutaciones de las líneas celulares de CCR HCT116, HT29 y Caco2 en la vía de señalización de EGFR

LÍNEA CELULAR	ESTADO KRAS	ESTADO BRAF	ESTADO PIK3
HCT 116	Mutado	<i>wt</i>	Mutado
HT 29	<i>wt</i>	Mutado	mutado
CaCo2	<i>wt</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>

Los esferoides, obtenidos por el método de la gota colgante, nos proporcionan unas condiciones más semejantes a las de la realidad de los tumores sólidos, que el cultivo en monocapa, por lo que conviene observar si la expresión del ligando EGFR en estos cultivos 3D difiere de la expresión vista en el ensayo anterior de 2D (figura 5).

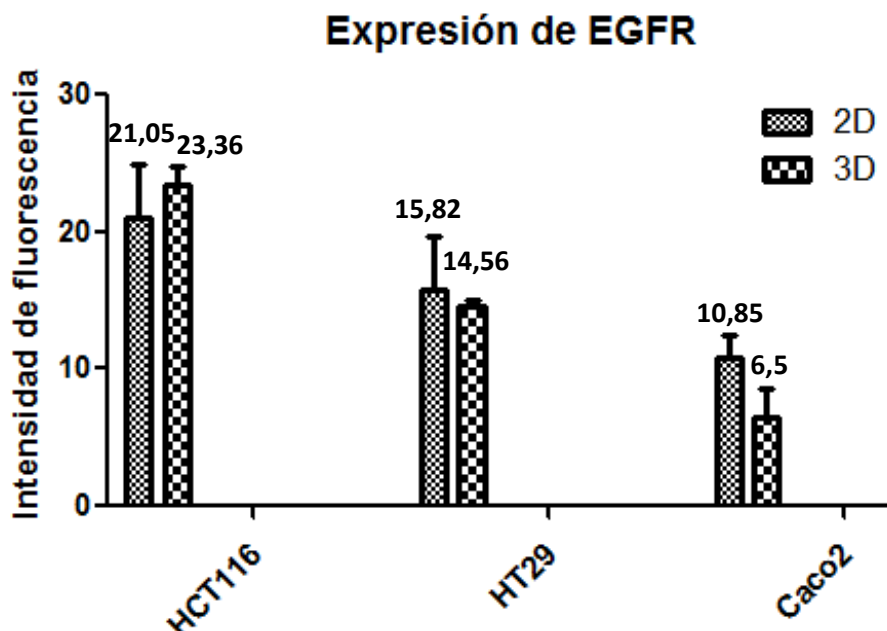


Figura 5. Intensidad de fluorescencia de las diferentes líneas celulares de CCR marcadas con anti EGFR-PE. (n=3)

Se observó que la expresión de EGFR prácticamente no variaba entre la obtenida en el cultivo 2D y el 3D. Para el caso de HCT116 la intensidad de fluorescencia aumentó en 3D, para HT29 y Caco2 disminuyó. Se analizaron los datos estadísticos con t-test observando que las variaciones entre las dos condiciones no eran significativas, al obtenerse un valor de $P > 0,05$.

Pese a que el cultivo en 3D tiene un microentorno que influye en muchos de los procesos tumorales de los tumores sólidos, el ligando EGFR se expresa de manera semejante a como lo hace en las células cultivadas en 2D, ambas con una expresión muy baja.

En estudios similares se observó que el nivel de expresión de otros receptores celulares sí variaba entre las células cultivadas en monocapa y en condiciones tridimensionales. [19]

En el caso concreto del ligando EGFR, en estudios anteriores también se observaron variaciones en la expresión entre ambas condiciones, disminuyendo el nivel de expresión de EGFR en la mayoría de líneas celulares de CCR salvo en el caso de HT29 donde se observaba una expresión similar. Estos resultados no se relacionan con los observados en este estudio, donde contemplamos que no existen diferencias significativas en el nivel de expresión entre el cultivo 2D y 3D. [22,23]

2. Caracterización de cultivos celulares de CCR en función de su resistencia o sensibilidad a doxorrubicina

Se realizó la caracterización, en función de la resistencia o sensibilidad a la droga modelo doxorrubicina, de 7 líneas celulares de cáncer colorrectal en cultivo monocapa. Para tres de ellas (HCT116, HT29 y Caco2) además se estudió la resistencia o sensibilidad a la droga en cultivos tridimensionales, con el fin de poder comparar los resultados en ambas condiciones.

Para estudiar la resistencia a esta droga modelo, se añadió doxorrubicina a concentraciones finales de 0.096, 0.48, 0.96, 1.92, 9.6 μM , y se estudió la toxicidad de la droga, a las distintas concentraciones, sobre las líneas celulares. Se calculó el IC50, que indica la concentración de droga necesaria para que la viabilidad celular sea del 50% (tabla 2).

Tabla 2. Sensibilidad a doxorrubicina de las diferentes líneas celulares de CCR (n=3).

Líneas celulares	IC50* en 2D	IC50* en 3D
HCT 116	1.57	1.79
HT 29	10.64	17.83
Caco 2	4.73	2.33
Skco	1.39	-
Lovo	1.51	-
Colo205	0.84	-
DLD-1	18.45	-

*IC50= Concentración inhibitoria 50

Se observó que la resistencia a la droga modelo varió considerablemente entre las diferentes líneas de CCR, siendo la más resistente la línea DLD-1 y las más sensibles HCT116, Skco, Lovo y Colo205. No se observó relación alguna entre el nivel de expresión de EGFR estudiado en el ensayo anterior y la resistencia a doxorrubicina.

En estudios similares se observó, que al igual que en este ensayo, la línea celular HCT116 apenas presentaba resistencia a drogas quimioterápicas, mientras que la HT29 era mucho menos sensible al tratamiento que el resto. [6]

Para estudiar la influencia del entorno en la resistencia o sensibilidad a drogas, en condiciones tridimensionales, se compararon los resultados obtenidos en 2D con los de 3D (figura 7).

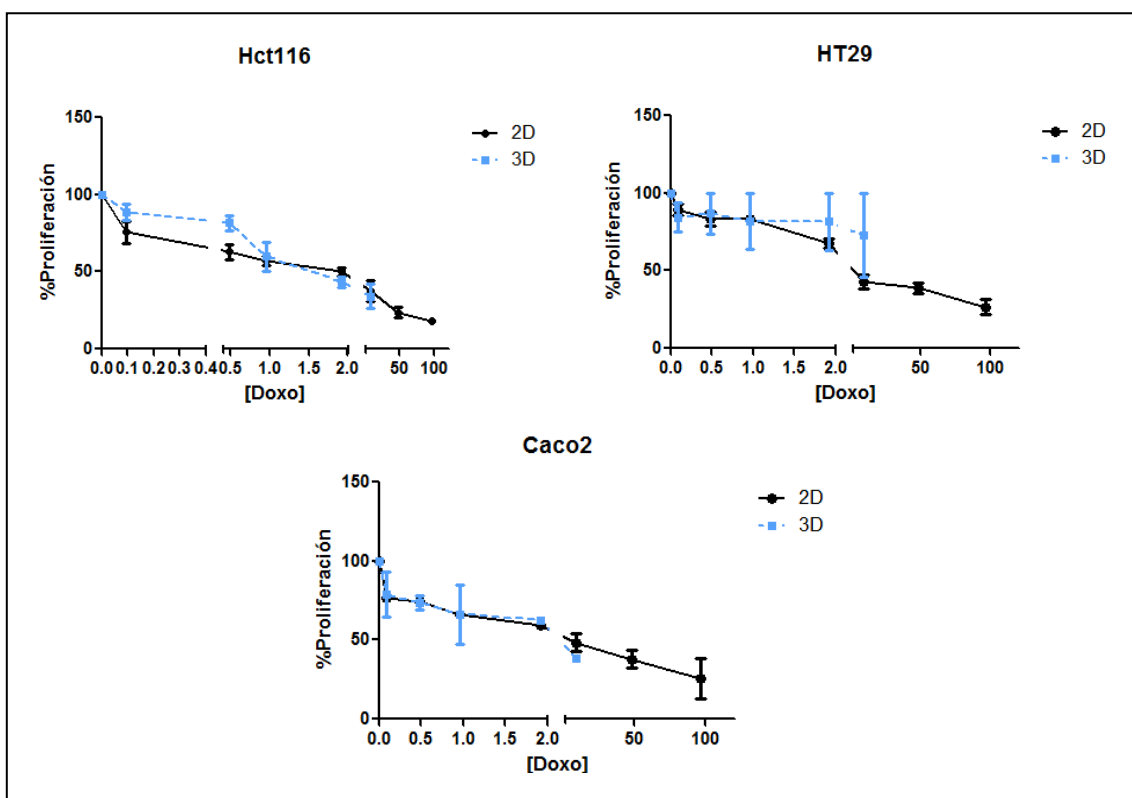


Figura 7. Gráficos de la variación en la viabilidad celular de las diferentes líneas celulares de CCR, en presencia de las diferentes concentraciones de doxorubicina. (n=3)

En el caso de HCT116 el IC50 aumentó desde un valor de 1.57 hasta uno de 1.79, en 2D y 3D respectivamente. Como podemos observar la línea HCT116 cultivada en 3D presentó una mayor resistencia a bajas concentraciones de doxorubicina, pero al alcanzar una determinada concentración se invirtió, siendo más sensible que la línea cultivada en monocapa.

En la línea celular HT29 observamos que la resistencia al fármaco aumentó considerablemente en la línea cultivada en tres dimensiones, obteniendo un valor de IC50 10.64 en 2D y 17.83 en 3D. Para el caso de Caco2 observamos gráficamente que la resistencia a doxorubicina apenas varió, obteniéndose un perfil de gráfica similar a la observada en 2D. El valor de IC50 disminuyó desde 4.73 en 2D, hasta un valor de 2.33 en 3D.

En estudios similares se ha observado que la actividad de diferentes fármacos puede diferir considerablemente según el modelo in vitro utilizado para el ensayo. Varios estudios sugieren que la heterogeneidad y los gradientes fisicoquímicos en los esferoides tumorales reducen su sensibilidad a los medicamentos, en comparación con la monocapa de células, aunque esto no es extrapolable a todos los casos. [6]

Estas variaciones en la actividad del fármaco pueden explicarse por las diferencias en la distribución y penetración del fármaco y la generación de hipoxia y ROS, entre otros factores. [6]

Los resultados de este estudio se asemejan a lo comentado anteriormente para el caso de la línea HT29, donde observamos cómo se hace mucho más resistente a la droga en el cultivo en 3D frente al cultivo monocapa, influyendo el microentorno en ese aumento de resistencia.

3. Optimización del protocolo de análisis de citotoxicidad de cetuximab en líneas de CCR

3.1. Análisis de citotoxicidad de cetuximab en líneas de CCR por citometría de flujo

Se estudió la citotoxicidad ejercida por el anticuerpo monoclonal cetuximab sobre la línea de CCR Caco2, con el fin de optimizar un protocolo de análisis del efecto del anticuerpo sobre las células tumorales.

Cetuximab es un anticuerpo monoclonal que inhibe de manera específica EGFR, bloqueando la dimerización y provocando apoptosis, previniendo de esta manera el crecimiento del tumor.

Se analizó la viabilidad celular en la línea Caco2 por ser una línea modelo, al no tener mutaciones en la vía de señalización del EGFR. El porcentaje de viabilidad celular se determinó con un marcaje de Anexina y 7AAD. Gracias a la anexina visualizaremos las células que se encuentran en etapas tempranas de apoptosis, ya que se une a la fosfatidilserina, proteína que migra al exterior de la membrana celular cuando se empieza a desarrollar el proceso apoptótico. Utilizaremos 7AAD para determinar aquellas células necróticas, o que se encuentren en etapas tardías de apoptosis, ya que se internaliza en aquellas células que han perdido la integridad de la membrana plasmática.

Observamos la viabilidad celular por citometría de flujo de Caco2 a diferentes concentraciones del anticuerpo monoclonal, observando el porcentaje de células en apoptosis y necrosis. (figura 8), así como la media en la variación de viabilidad celular a las diferentes concentraciones de cetuximab (figura 9).

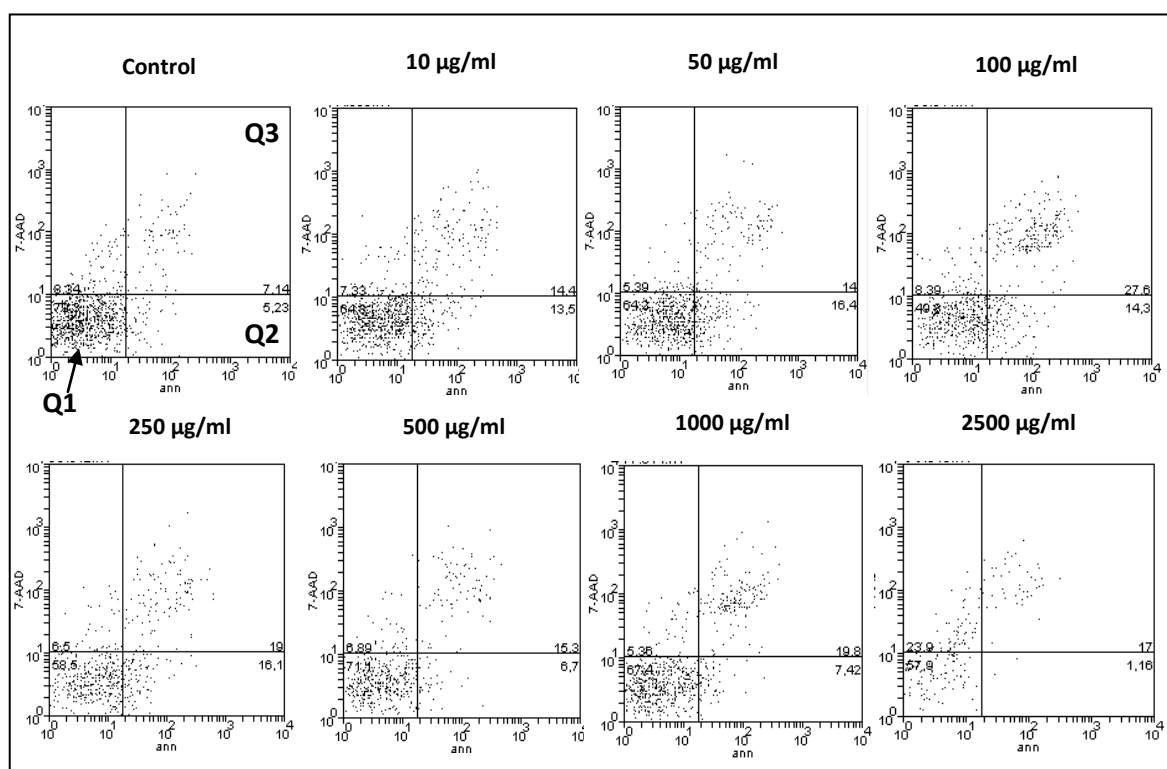


Figura 8. Diagrama de puntos de Caco2 mostrando el porcentaje de viabilidad celular (Q1), el de células en apoptosis (Q2) y el de células en necrosis (Q3) para diferentes concentraciones de cetuximab.

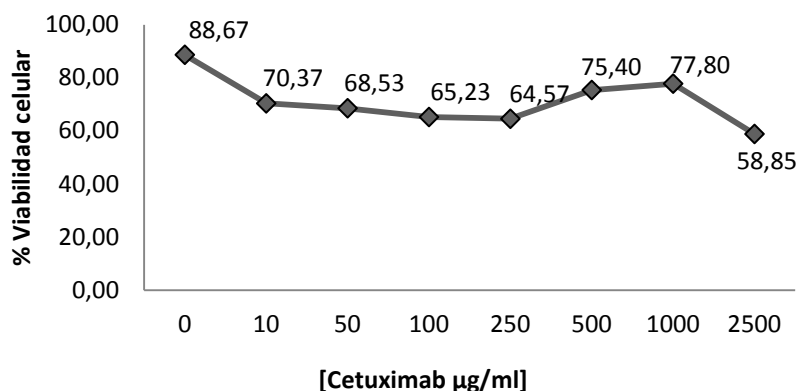


Figura 9. Gráfico de la media de la viabilidad celular de la línea Caco2, en presencia de diferentes concentraciones de cetuximab. (n=3)

El porcentaje de células viables disminuye conforme aumenta la concentración de anticuerpo monoclonal. A una concentración dada aumenta de nuevo el número de células viables, para al final disminuir de nuevo. Por lo que observamos que cetuximab ejerce cierta acción citotóxica sobre las células tumorales.

A pesar de que observamos una disminución en la viabilidad celular, las variaciones son pequeñas por lo que cetuximab ejerce acción sobre las células tumorales, pero no lo hace de manera muy efectiva. Existen numerosos estudios que corroboran que cetuximab no es muy efectivo contra las células tumorales de CCR, observándose curvas de crecimiento similares a las observadas en este ensayo. [22]

3.2. Análisis de citotoxicidad de cetuximab en líneas de CCR mediante ensayo MTT

Se estudió la citotoxicidad ejercida por el anticuerpo monoclonal cetuximab sobre la línea de CCR Caco2 mediante ensayo MTT. Para ello se utilizaron las mismas concentraciones de anticuerpo monoclonal que en el ensayo anterior, con el fin de comparar la efectividad del anticuerpo analizada por citometría de flujo con la obtenida mediante un ensayo MTT.

Observamos que el porcentaje de proliferación celular disminuye a medida que aumenta la concentración de cetuximab, obteniéndose un IC50 de 1227 µg/ml de cetuximab (figura 11).

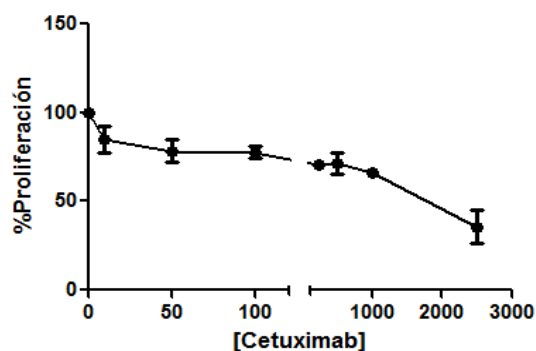


Figura 11. Gráfico representativo de la media del porcentaje de proliferación de la línea Caco2, en presencia de diferentes concentraciones de Cetuximab. (n=3)

Los resultados obtenidos mediante ensayo MTT se asemejan con los observados anteriormente en el citómetro de flujo. En el ensayo MTT estudiamos la variación en el porcentaje de crecimiento celular, mientras que en el citómetro medíamos el porcentaje de viabilidad celular.

En el caso del ensayo MTT se observó una mayor acción del anticuerpo monoclonal, por lo que se vio que la disminución del crecimiento celular era más notable que la disminución del porcentaje de células viables. Esto se debe a que el anticuerpo disminuye el crecimiento celular en mayor medida de lo que disminuye la viabilidad celular, al ejercer acción citotóxica sobre las células tumorales.

8. Conclusiones/Conclusions

1. El nivel de expresión de EGFR no varía entre las células cultivadas en 2D y 3D, obteniéndose valores similares en el ensayo por citometría de flujo.

2. Existen grandes diferencias de resistencia a doxorubicina entre las diferentes líneas de CCR, siendo algunas muy sensibles mientras que otras necesitan una concentración de droga muy elevada para disminuir su crecimiento celular.

3. La resistencia o sensibilidad a doxorubicina no se relaciona con el nivel de expresión de EGFR, puesto que no se observa correlación alguna entre los resultados obtenidos en ambos ensayos.

4. El microentorno proporcionado por el cultivo 3D proporciona ventajas a las células tumorales, HT29, ante tratamientos quimioterápicos, como doxorubicina, obteniéndose valores de resistencia mayores a los obtenidos en cultivo monocapa.

5. Mediante citometría de flujo se observa cierta acción citotóxica del anticuerpo monoclonal cetuximab sobre la línea celular de CCR Caco2. Disminuye el porcentaje de células viables hasta una concentración de anticuerpo dada, donde nuevamente aumenta.

6. El ensayo MTT revela acción de cetuximab sobre la línea celular de CCR Caco2, disminuyendo el porcentaje de proliferación a medida que aumenta la concentración del anticuerpo monoclonal.

1. The expression level of EGFR does not vary between cells grown in 2D and 3D, obtaining similar results in the flow cytometry test.

2. There are huge differences in the resistance to doxorubicin when it comes to the lines of CRC. Some of them are really sensitive whereas others need a high drug concentration level in order to lessen their cell growth.

3. The resistance or sensitivity to doxorubicin is not related with the expression level of EGFR since no correlation is observed between the results obtained in both trials.

4. The microenvironment provided by the 3D test, gives advantages to the tumor cells, HT29, when it comes to chemotherapeutic treatments such as doxorubicin, obtaining higher resistance levels than the ones obtained from monolayer culture.

5. Through flow cytometry certain cytotoxic action of the monoclonal antibody cetuximab is observed in the CRC Caco2 cell line. The percentage of viable cells decreases until a given antibody concentration from where it starts growing again.

6. The MTT test reveals the action of cetuximab in the CRC Caco2 line, decreasing the proliferation percentage as the concentration of the monoclonal antibody increases.

7. Bibliografía

1. Ferlay J. et al. (2013) "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012." *Eur J Cancer* 49 (6): 1374-1403.
2. Gemma Binefa. et al. (2014) "Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine" *World j gastroenterol* 20 (22): 6786-6808.
3. Mitchell S. Cappell (2005) "The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps" *Med Clin N Am* 89: 1-42.
4. Alan P. Venook. et al. (2017) " Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With KRAS WildType Advanced or Metastatic Colorectal Cancer" *JAMA* 317(23): 2392–2401.
5. Ernst J. Kuipers. et al. (2015) "Colorectal cancer" *Nature Reviews Disease Primers* 1: 15065.
6. Niels F. Jensen. et al. (2015) "Establishment and characterization of models of chemotherapy resistance in colorectal cancer: Towards a predictive signature of chemoresistance" *Molecular oncology* 9: 1169-1185.
7. Doğan Yazilitas. et al. (2016) "The clinical and pathological features affecting the time of relapse in patients with early stage colorectal cancer" *Journal of cancer research and therapeutics* 12 (4): 1257-1260.
8. El-akawi Z. et al. (1996) "Altered glutathione metabolism in oxaliplatin resistant ovarian carcinoma cells" *Cancer Lett* 105(1): 5-14.
9. Eric Raymond. et al. (2002) " Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin" *Molecular Cancer Therapeutic* 1: 227-235.
10. Diaz A, Lage A (2007) "Therapies based on inhibitors of the epidermal growth factor receptor: reaching for the future. *Biotechnología aplicada*. 24(1):10 -18.
11. Fernández JC, Pérez V (2006) "El receptor de EGF (EGFR): una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer y sus inhibidores". *Biocancer* 3.
12. Shi-Ming Tu, Mehmet A Bilen and Nizar M Tannir (2016) "Personalised cancer care: promises and challenges of targeted therapy" *Journal of the Royal Society of Medicine* 109(3): 98-105.
13. Veluchamy JP. et al. (2016) "Combination of NK Cells and Cetuximab to Enhance Anti-Tumor Responses in RAS Mutant Metastatic Colorectal Cancer". *PLoS ONE* 11(6):e0157830.
14. Monic Roengvoraphoj. et al. (2013) "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as initial therapy for non-small cell lung cancer: Focus on epidermal growth factor receptor mutation testing and mutation-positive patients". *Cancer Treatment Reviews* 39(8): 839-850.
15. Sandra Misale. et al. (2014) "Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer: From Heterogeneity to Convergent Evolution". *American Association for Cancer Research*.

16. Sandra Misale. et al. (2012) "Emergence of *KRAS* mutations and acquired resistance to anti EGFR therapy in colorectal cancer" *Nature* 486(7404): 532-536.
17. Rodrigo Dienstmann, Ramon Salazar, and Josep Tabernero (2015) "Overcoming resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer" ASCO educational book.
18. Beth O. Van Emburgh. et al. (2014) "Acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer" *Molecular oncology* 8: 1084-1094.
19. Pilar M. Lanuza. et al. (2018) "Activated human primary NK cells efficiently kill colorectal cancer cells in 3D spheroid cultures irrespectively of the level of PD-L1 expression" *Oncoimmunology*, e1395123.
20. Foty R (2011). "A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids" *JoVE* 51.
21. Sritama Nath and Gayathri R Devi (2016) "Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model" *Pharmacol Ther* 163: 94-108.
22. Teppei Matsuo. et al. (2011) "Analysis of the anti-tumor effect of cetuximab using protein kinetics and mouse xenograft models" *BMC Research Notes* 4(140).
23. Anna C. Luca. et al. (2013) "Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines" *PLoS One*. 8(3): e59689.