

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y citodiagnóstico

“Estudio de viabilidad celular en organoides derivados de pacientes con cáncer de próstata ante enzalutamida, acetato de abiraterona y docetaxel, y su caracterización mediante marcadores de troncalidad, transición epitelio-mesénquima (EMT) y resistencia a múltiples fármacos (MDR)”

Alexis Joaquín Del Río Ramírez

Tutores de tesis: Héctor R. Contreras & Sebastián Indo.

**Laboratorio de Oncología Celular y Molecular
Departamento de Oncología Básico Clínica
Facultad de Medicina
Universidad de Chile**

15 de Diciembre de 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y citodiagnóstico

“Estudio de viabilidad celular en organoides derivados de pacientes con cáncer de próstata ante enzalutamida, acetato de abiraterona y docetaxel, y su caracterización mediante marcadores de troncalidad, transición epitelio-mesénquima (EMT) y resistencia a múltiples fármacos (MDR)”

Alexis Joaquín Del Río Ramírez

Tutores de tesis: Héctor R. Contreras & Sebastián Indo.

**Laboratorio de Oncología Celular y Molecular
Departamento de Oncología Básico Clínica
Facultad de Medicina
Universidad de Chile**

15 de Diciembre de 2023

Índice.

1. Introducción.....	7
1.1 La próstata.....	7
1.2 Epidemiología y factores de riesgo del CaP.....	7
1.3 Puntuación de Gleason, grupo ISUP, progresión y terapia del CaP.....	8
1.4 Modelos de estudio del CaP.....	9
1.5 Estudio de la viabilidad celular ante fármacos y caracterización de PDOs con CaP en base a marcadores de células madres cancerosas, transición epitelio mesénquima y de resistencia a múltiples fármacos.....	11
2. Hipótesis.....	14
3. Objetivo general.....	14
4. Objetivos específicos.....	14
5. Materiales y métodos.....	15
5.1 Metodología de cultivo.....	15
5.2 Colección de PDOs, fijación en paraformaldehído, inclusión en parafina y obtención de cortes.....	17
5.3 Hematoxilina & Eosina, Inmunohistoquímica cromogénica e Inmunofluorescencia indirecta.....	19
5.6 Ensayo de MTT.....	24
5.7 Análisis estadísticos.....	24
5.8 Consideraciones éticas.....	24
6. Resultados:.....	25
6.1 Las metodologías de cultivo utilizadas permitieron desarrollar PDOs con CaP a partir de cultivos primarios.....	25
6.2 La tinción de H&E evidencia la estructura conservada de PDOs cultivados en domos de Matrigel® y procesados con discos de gelatina en cortes histológicos y su heterogeneidad morfológica.....	27
6.3 La técnica de IHQ cromogénica refleja positividad para el marcador CD44 en cortes de PDOs 316.....	29
6.4 Inmunofluorescencia indirecta refuerza la positividad de CD133 y CD44 en cortes de PDOs 316.....	31
6.5 Los PDOs 316 son sensibles al tratamiento con enzalutamida, acetato de abiraterona y docetaxel, y su viabilidad celular es levemente superior en comparación a su contraparte 2D en el ensayo de MTT.....	33
7. Discusión.....	35
8. Conclusión.....	40
9. Bibliografía:.....	41

Abreviaturas:

2D: Bidimensional.

3D: Tridimensional.

ABCC1: Transportador de casete de unión a ATP C1.

ABCG2: Transportador de casete de unión a ATP G2.

ADT: Terapia de privación androgénica.

AR: Receptor de andrógenos.

CaP: Cáncer de próstata.

CRPC: Cáncer de próstata resistente a la castración.

CSC: Células madres cancerosas.

CYP17A1: Citocromo P450 17A1.

DAB: Diaminobencidina.

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DHT: Dihidrotestosterona.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EGF: Factor de crecimiento epidermal.

EMT: Transición epitelio-mesénquima.

GS: Puntuación de Gleason.

H&E: Tinción de Hematoxilina y Eosina.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

IHQ: Inmunohistoquímica.

ISUP: Sociedad Internacional de Patología Urológica.

LPI: Lisofosfatidilinositol.

mCRPC: Cáncer de próstata metastásico resistente a la castración.

MDR: Multirresistencia a drogas..

MEC: Matriz Extracelular.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

PBS: Buffer fosfato salino.

PCR: Reacción de polimerasa en cadena.

PDO: Organoides derivados de pacientes.

PFA: Paraformaldehído.

PIN: Neoplasia intraepitelial prostática.

PSA: Antígeno prostático específico.

T: Testosterona.

Resumen

El cáncer de próstata (CaP) corresponde al segundo diagnóstico más común de cáncer a nivel mundial y se espera que su incidencia aumente con el pasar de los años. Para el tratamiento de pacientes con CaP resistente a la castración metastásico (mCRPC), se destacan como terapias de primera línea las dirigidas al receptor de andrógenos (AR) mediante el uso de enzalutamida y acetato de abiraterona, la cual se puede acompañar por quimioterapia con docetaxel. Debido a su complejidad morfológica, genética y heterogeneidad celular; la elección de la terapia y tratamiento es todo un desafío estableciendo la necesidad de modelos de estudios que ayuden en la selección y predicción del mejor esquema terapéutico para el paciente. Dentro de los modelos de estudio *in vitro* de CaP destacan los organoides derivados de pacientes (*Patients Derived Organoids*, PDO) debido a sus ventajas respecto a otros modelos de estudio, sin embargo, poco se ha descrito en PDOs con CaP acerca de la viabilidad celular posterior a la administración de fármacos, y su caracterización con marcadores de células troncales cancerosas (*Cancer Stem Cells*, CSC), transición epitelio-mesenquimal (*Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT) y resistencia a múltiples fármacos (*Multidrug resistance*, MDR). Este estudio se centra en demostrar que los PDOs con CaP son un modelo de cultivo en el cual se puede evaluar la viabilidad celular ante los fármacos mencionados anteriormente mediante el ensayo de MTT y compararlos respecto a su contraparte 2D, además de caracterizarlos con marcadores de troncalidad, EMT y MDR mediante inmunohistoquímica (IHQ) cromogénica e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Este estudio también contempló el desarrollo y mejora de protocolos de cultivo y colección de PDOs. Los resultados obtenidos demuestran sensibilidad por parte de los PDOs ante los fármacos anteriormente mencionados además de mostrar una tendencia leve de mayor resistencia en comparación a su contraparte 2D, estos resultados no fueron significativos. La caracterización mediante IHQ cromogénica e IFI revelan positividad para los marcadores de CSC CD44 y CD133. Este trabajo de investigación es uno de los primeros acercamientos a caracterizaciones y evaluaciones de viabilidad celular de PDOs con CaP en el laboratorio de Oncología Celular y Molecular de la Universidad de Chile, sugiriendo mejoras en los protocolos desarrollados en este estudio respecto a cultivo de PDOs para ensayos farmacológicos, colección e IHQ cromogénica, además de combinaciones de fármacos e inclusión de otros marcadores y técnicas que permitan obtener resultados más certeros con el fin de ayudar y participar en desarrollo de la investigación en la medicina personalizada.

Palabras claves: Cáncer de próstata, organoides derivados de pacientes, viabilidad celular, CSC, EMT, MDR, enzalutamida, acetato de abiraterona, docetaxel.

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer diagnosis worldwide and its incidence is expected to increase over the years. For the treatment of patients with metastatic castration-resistant PCa (mCRPC), first-line therapies include those targeting the androgen receptor (AR) using enzalutamide and abiraterone acetate, which can be accompanied by chemotherapy with docetaxel. Due to its morphological and genetic complexity and cellular heterogeneity, the choice of therapy and treatment is a challenge, establishing the need for study models that help in the selection and prediction of the best therapeutic scheme for the patient. Among the in vitro CaP study models, patient-derived organoids (PDOs) stand out due to their advantages over other study models; however, little has been described in PDOs with CaP regarding cell viability after drug administration, and their characterization with markers of cancer stem cells (CSC), epithelial-mesenchymal transition (EMT) and multidrug resistance (MDR). This study focuses on demonstrating that PDOs with CaP are a culture model in which cell viability can be assessed against the drugs enzalutamide, abiraterone acetate and docetaxel by MTT assay and compared to their 2D counterparts, In addition to characterizing them with markers of CSC, EMT and MDR by chromogenic immunohistochemistry (IHC) and indirect immunofluorescence (IFI). This study also contemplated the development and improvement of PDO culture and collection protocols. The results obtained show sensitivity of the PDOs to the aforementioned drugs as well as greater resistance to them compared to their 2D counterpart. Characterization by chromogenic IHC and IFA revealed positivity for the stemness markers CD44 and CD133. This research work is one of the first approaches to characterization and cell viability evaluations of PDOs with PCa in the Cellular and Molecular Oncology laboratory of the University of Chile, suggesting improvements in the protocols developed in this study regarding PDO culture for pharmacological assays, collection and chromogenic IHC, in addition to drug combinations and inclusion of other markers and techniques that allow obtaining more accurate results in order to help and participate in the development of research in personalized medicine.

Key words: Prostate cancer, patient-derived organoids, cell viability, CSC, EMT, MDR, enzalutamide, abiraterone acetate, docetaxel.

1. Introducción.

1.1 La próstata

La próstata es un órgano con forma de pirámide ubicado bajo la vejiga y delante del recto, rodeando la uretra. Posee diferentes zonas histológicas las cuales tienen distintas implicaciones clínicas por las patologías que las pueden afectar. La zona de transición se encuentra cercana a la uretra prostática y constituye el 5% del tejido prostático normal, sin embargo, esta zona aumenta considerablemente su porcentaje en los hombres mayores debido a la hiperplasia prostática benigna. La zona central corresponde a una región en forma de cono entre la zona periférica y de transición, no es una zona común de procesos patológicos pero puede verse afectada secundariamente por procesos neoplásicos, mientras que la zona periférica corresponde a la zona más externa de la glándula, constituye el 70% del tejido prostático normal y presenta gran relevancia clínica ya que es el sitio de origen de la mayoría de las lesiones premalignas y de un 80% de los carcinomas prostáticos [1, 2, 3].

1.2 Epidemiología y factores de riesgo del CaP.

El cáncer de próstata (CaP) corresponde al segundo diagnóstico de cáncer más frecuente y la quinta causa de muerte por cáncer entre los hombres en el mundo, con 1.414.259 casos nuevos y 375.304 nuevas defunciones en el año 2020. La tasa de incidencia para el año 2020 fue tres veces mayor en países con índice de desarrollo humano alto o muy alto respecto a países de índice bajo o medio (37.5 casos nuevos por 100.000 personas v/s 11.3 casos nuevos por 100.000 personas), mientras que la mortalidad fue menos variable (8.1 y 5.9 nuevas defunciones por 100.000 personas, respectivamente) [4, 5, 9].

Según los datos otorgados por Globocan, en Chile la tasa de incidencia del CaP para el año 2020 fue de 56,7 casos nuevos por 100.000 personas, siendo el cáncer que presentó mayor incidencia. La tasa de mortalidad del CaP en Chile para el año 2020 fue de 14 nuevos decesos por cada 100.000 personas siendo la tercera causa de muerte por cáncer en hombres, solo por debajo del cáncer de estómago y pulmón, los cuales presentaron tasas similares (15.3 y 14.1 decesos nuevos por 100.000 personas, respectivamente) [5].

Se espera que en el futuro aumente la incidencia del CaP, debido al incremento de la esperanza de vida mundial y que uno de los principales factores de riesgo del CaP es la edad avanzada. Otros factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad son el síndrome metabólico, obesidad, pertenecer a grupos de raza afroamericana,

antecedentes familiares positivos de CaP y poseer mutaciones germinales en genes asociados al síndrome de cáncer de mama-ovario hereditario, tales como BRCA1 y BRCA2 (aumentando el riesgo de por vida de tres a ocho veces mayor de padecer CaP), así como los genes asociados al síndrome de Lynch: MSH2, MSH6, MLH1 y PMS2, y otros como HOXB13 y ATM [6, 7, 8, 9].

1.3 Puntuación de Gleason, grupo ISUP, progresión y terapia del CaP.

La mayoría de los CaP corresponden a adenocarcinomas, los cuales se clasifican según el sistema de puntuación de Gleason (GS). Esta clasificación se basa en el análisis de patrones histológicos de neoplasia a los cuales se le asigna un grado que va del 1 al 5 donde los patrones 1 a 3 se asocian a zonas que presentan estructuras glandulares bien delineadas con distancias glandulares variables, el grado 4 comprende glándulas mal formadas, fusionadas y/o cribiformes, mientras que el grado 5 se asocia a patrones de crecimiento con ausencia de diferenciación glandular y la presencia de comedonecrosis. La GS se calcula sumando el grado más común y el grado más alto en las biopsias [10]. En 2014 la Conferencia de clasificación de Gleason de la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP) adoptó el concepto de grupos de grados de CaP (grados ISUP) para alinear la clasificación del CaP con la de otros carcinomas y resaltar las diferencias clínicas de GS 7= 3+4 y GS 7= 4+3 otorgándoles un grado ISUP de 3 y 4 respectivamente [9, 11].

La transformación maligna de la próstata comprende varios pasos, se inicia como una neoplasia intraepitelial prostática (PIN) para luego seguir a un CaP localizado, avanzar a un CaP con invasión local y finalmente desarrollar metástasis [1].

La progresión del CaP es favorecida por los andrógenos, por lo que la terapia de privación androgénica (ADT) es el principal tratamiento para CaP localizado de riesgo intermedio [1, 6, 12]. La mayoría de los pacientes en primera instancia obtienen beneficios de este tratamiento cuyas mejoras se pueden observar en la reducción del tamaño del tumor y de los niveles del antígeno prostático específico (PSA), sin embargo, después de 2 a 3 años se produce resistencia a esta terapia y la enfermedad progresa a cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), el cual probablemente logre desarrollar metástasis en el tiempo (mCRPC), donde el 90% de ellas se desarrollan en el tejido óseo [12, 13]. El progreso hacia la resistencia a la castración se argumenta en el surgimiento de células cada vez más agresivas a partir de una pequeña población de células similares a células madres llamadas células troncales cancerosas (*Cancer Stem Cells*, CSC), las cuales presentan características de autorrenovación y diferenciación, por lo que se cree que la tumorigénesis, heterogeneidad tumoral y resistencia terapéutica es

responsabilidad de dichas células [14, 15], mientras que la metástasis se ve favorecida por el proceso de transición epitelio-mesénquima (*Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT), el cual permite que las células se diseminen usualmente a los linfonodos adyacentes, seguidos de metástasis en el hígado, pulmón y huesos [1].

Para el tratamiento de pacientes con mCRPC, se destacan como terapias de primera línea las dirigidas al receptor de andrógenos (AR), siendo el acetato de abiraterona, un inhibidor de la enzima citocromo P450 17A1 (CYP17A1), enzima crítica en la síntesis de andrógenos extragonadales y testiculares [16], clave en la mejora de la calidad de vida, control del dolor y reducción de complicaciones óseas atribuibles a la metástasis. La enzalutamida es un inhibidor de la señalización del AR capaz de impedir su translocación nuclear, la unión al DNA y el reclutamiento de coactivadores, además posee una mayor afinidad por el AR que la testosterona (T) induciendo la reducción del tumor [17] y aumentando la supervivencia global. La quimioterapia también es una opción para el tratamiento de mCRPC, donde se destaca el uso de docetaxel, un taxano que se une con alta afinidad a la tubulina interrumpiendo la dinámica de los microtúbulos, resultando en la detención del ciclo celular entre la etapa G2 y M inhibiendo la proliferación e induciendo la muerte celular [18], este fármaco también ha mostrado una mejora en la supervivencia global [7].

Debido a su complejidad morfológica, genética y heterogeneidad celular, la elección de la terapia y tratamiento se convierte en todo un desafío, estableciendo la necesidad de modelos de estudios que ayuden en la selección y predicción del mejor esquema terapéutico para el paciente. [12]

1.4 Modelos de estudio del CaP.

Los tumores sólidos crecen de manera tridimensional en presencia de un microambiente tumoral constituido por células no tumorales y matriz extracelular (EMC). Las células tumorales están sometidas a condiciones subóptimas de crecimiento como hipoxia, además de estar influenciadas por el contacto célula-célula y una variedad de señales tumorales y no tumorales [19].

En los últimos años los esfuerzos en lo que respecta a modelos de cultivo se han centrado en intentar reconstruir el microambiente tumoral, incluyendo las interacciones del tumor con el estroma, la adhesión intercelular y su señalización [19] focalizando los esfuerzos hacia el desarrollo y mejora de los modelos de estudio *in vitro* que permitan imitar el microambiente tumoral junto con otorgar una mejor reproducibilidad y menor inversión de tiempo en su establecimiento [20].

Se pueden destacar dentro de los modelos preclínicos de estudio del CaP *in vitro* a los cultivos de líneas celulares comerciales tradicionales entre las cuales se encuentran LNCaP, PC3, DU145, VCaP y NCI-H660. Las principales ventajas de estas líneas son su amplia disponibilidad, su bajo costo, facilidad de edición de genoma y su crecimiento eficiente, a pesar de que se tiene un gran conocimiento de estas líneas, presentan algunas desventajas, como la carencia de heterogeneidad celular, y que en ellas está ausente el microambiente tumoral e influencia del sistema inmune [12, 21]. Otro modelo *in vitro* para el estudio del CaP corresponde a los cultivos primarios en 2D, los cuales son cultivos desarrollados a partir de células provenientes directamente del tumor del paciente, sin embargo, este tipo de cultivo también presenta desventajas, como la ausencia de la mayoría de señales ambientales e inflamatorias y la posibilidad de pérdida de características originales del tumor debido a la adaptación de las células para la supervivencia *in vitro*, haciendo que muchas veces estas condiciones seleccionen clones específicos que no son necesariamente representativos del tumor original limitando su aplicación en estudios preclínicos [16, 19].

Los organoides derivados de pacientes (*Patients Derived Organoids*, PDO) corresponden a sistemas de cultivo que permiten a las células que provienen del tumor del paciente interactuar entre sí y con su entorno, generando estructuras tridimensionales. Se destacan por conservar las características fenotípicas, genotípicas y la heterogeneidad celular del tumor, junto con conservar la capacidad de diferenciación de células epiteliales. Se ha demostrado que los modelos PDO mantienen una alta concordancia de mutaciones y del perfil transcriptómico respecto a los tumores de pacientes de los que se derivaron. Junto con esto, estudios anteriores sugieren que los PDO podrían ser mejores predictores a la respuesta de fármacos como cetuximab o paclitaxel que los marcadores genéticos o moleculares debido a la congruencia demostrada en la respuesta a dichos fármacos por parte de los PDO y la desarrollada por los pacientes de los cuales derivaron. A esto se suman estudios que han demostrado una alta correlación de la respuesta a fármacos y las alteraciones moleculares presentes en los PDO. Lo mencionado establece una clara ventaja de los PDO como modelo preclínico respecto de los modelos clásicos 2D. Sin embargo, una de las consideraciones o limitaciones que presenta este modelo corresponde a que no está presente la respuesta inmune del paciente [12, 21, 24].

Considerando que un modelo *in vitro* de cáncer debería conservar las características fenotípicas, mutacionales y transcriptómica del tumor a estudiar, poder representar la heterogeneidad celular del tumor de origen, imitar el microambiente tumoral y ser capaz

de desarrollar una respuesta a fármaco que se correlacione a la del paciente, se destaca a los PDO como el modelo *in vitro* que conserva mejor estas características, ya que permite el análisis en profundidad de la heterogeneidad celular, prometedor en cuanto a la predicción de la respuesta a fármacos y una posible herramienta en la toma de decisiones terapéuticas en la medicina de precisión [22].

1.5 Estudio de la viabilidad celular ante fármacos y caracterización de PDOs con CaP en base a marcadores de células madres cancerosas, transición epitelio mesénquima y de resistencia a múltiples fármacos.

En los últimos años el enfoque del estudio de organoides se ha centrado en la búsqueda de mejoras del cultivo con el fin de lograr un aumento en su tasa de éxito de implementación en varios estadios del CaP aparte del mCRPC. Junto a lo anterior, los estudios también se han enfocado en la investigación de la biología que subyace al CaP y en demostrar las similitudes del organoide en términos moleculares, morfológicos y por sobre todo de la heterogeneidad celular y del microambiente tumoral respecto al tejido de origen [12, 20, 23, 24]. Con respecto a los tratamientos, los estudios en organoides han desarrollado el análisis y búsqueda molecular de mecanismos de resistencia a los medicamentos, como lo observado en el estudio de Beshiri *et al.*, quienes demostraron que PDOs de CaP con pérdida de dos copias de BRCA2 mostraban sensibilidad 100 veces mayor a olaparib en comparación a los PDOs de CaP con pérdida de una sola copia de este gen [12, 24].

Considerando las ventajas que otorga el modelo de PDOs, sería útil e interesante estudiar la viabilidad celular ante fármacos en PDOs de CaP desarrollados a partir de cultivos primarios. Esto es una estrategia apropiada para evaluar la acción y eficacia de medicamentos, ya que la mayoría repercute en procesos que la favorecen. Sumado a esto, es importante comparar la viabilidad de PDOs con respecto al cultivo primario debido a lo observado en otras investigaciones que sugieren una mayor resistencia a fármacos por parte de los modelos 3D tal como se observó en estudios de cáncer de mama triple negativo [25].

Además de evaluar la viabilidad celular, también es necesario caracterizar las células que componen los PDOs en base a marcadores moleculares implicados en distintas características y procesos que se asocian a la resistencia y progresión del tumor como la troncalidad tumoral, EMT y multirresistencia a drogas (*Multidrug resistance*, MDR).

Las CSC corresponden a una pequeña proporción de las células tumorales y se cree que son las responsables de la resistencia a la quimioterapia y radioterapia, mal pronóstico,

metástasis y recaída de la enfermedad por su alta capacidad de supervivencia, autorrenovación y proliferación. Estas células expresan marcadores de troncalidad como CD133 y CD44, los cuales corresponden a marcadores de superficie celular [15, 26, 27]; y SOX2, uno de los principales factores de transcripción encargado de mantener el estado pluripotente de células embrionarias y que se encuentra sobreexpresado en las CSC del CaP [28]. De acuerdo con lo anterior, resulta de utilidad analizar la presencia de dichas células y observar cómo se distribuyen en el entorno 3D de PDOs de CaP.

La EMT corresponde a un programa de transdiferenciación que se caracteriza por la pérdida de características epiteliales, entre ellas las moléculas de adhesión celular y la polaridad apico-basal, y la ganancia de características mesenquimatosas como la polaridad antero posterior y la migración e invasión mejoradas. Dentro de este proceso se destaca la acción de los factores de transcripción ZEB1 y Snail, las cuales inducen la EMT en las células epiteliales a través de la represión transcripcional directa de E-cadherina y otros componentes de unión epitelial como ocludinas [29, 30]. Estas proteínas se pueden usar como marcadores para evaluar células con características de EMT que compongan PDOs con CaP.

La multirresistencia a drogas (Multi Drugs Resistance, MDR) corresponde a mecanismos moleculares por los cuales las células cancerosas se hacen resistentes a terapias. Se ha informado la expresión elevada de los transportadores de salida de casete de unión a ATP (transportadores ABC) en una variedad de cánceres humanos como el cáncer de mama, pulmón y próstata. Estos transportadores utilizan la hidrólisis de ATP para catalizar el transporte de una gran variedad de sustratos como medicamentos contra el cáncer, donde se han destacado transportadores como ABCC1 [13]. La expresión *in vivo* de ABCC1 se correlaciona con la resistencia a los medicamentos y/o mal pronóstico en múltiples cánceres. Se ha demostrado la capacidad de ABCC1 de transportar lípidos y esteroides bioactivos lo cual puede sugerir la implicancia de este transportador en el desarrollo y progresión del cáncer. En el caso de células de CaP se demostró la participación de ABCC1 en un bucle autocrino donde las células tumorales son capaces de estimular su propia proliferación mediante la liberación de lisofosfatidilinositol (LPI) y la activación del receptor acoplado a proteína G GPR55, además que la inhibición de dicho transportador disminuyó el crecimiento de células de CaP *in vitro* y aumentó su sensibilidad al tratamiento con docetaxel *in vitro* e *in vivo*. [9], por lo que evaluar la presencia de estos transportadores en las células que conforman PDOs permitirá interpretar con mayor detalle los resultados de ensayos farmacológicos.

Sin embargo, pese a lo mencionado anteriormente, poco se ha descrito en PDOs de CaP obtenidos a partir de cultivos primarios respecto de la viabilidad celular posterior a la administración de fármacos ampliamente usados en el tratamiento del CaP como el acetato de abiraterona, enzalutamida y docetaxel y su comparación con modelos de crecimiento 2D, además de su caracterización morfológica con marcadores del eje CSC-EMT-MDR.

2. Hipótesis

El modelo de organoides derivados de pacientes (PDO) con CaP permite evaluar marcadores del eje CSC-EMT-MDR y viabilidad celular en respuesta a enzalutamida, acetato de abiraterona y docetaxel.

3. Objetivo general

Caracterizar PDOs con CaP obtenidos a partir de cultivo primario con marcadores de CSC, EMT y MDR, y evaluar el efecto de enzalutamida, acetato de abiraterona y docetaxel sobre su viabilidad celular comparandolos con su contraparte 2D.

4. Objetivos específicos

- a) Desarrollar y optimizar el protocolo de crecimiento, colección y procesamiento de PDOs a partir de cultivos primarios de tumores de pacientes con CaP para la obtención de cortes histológicos con su estructura conservada.
- b) Caracterizar PDOs en base a marcadores de CSC, EMT y MDR mediante Inmunohistoquímica (IHQ) cromogénica e inmunofluorescencia indirecta (IFI).
- c) Evaluar la viabilidad celular en PDOs y en modelos 2D en presencia de enzalutamida, acetato de abiraterona o docetaxel a través de ensayos de MTT.

5. Materiales y métodos

5.1 Metodología de cultivo.

El desarrollo de PDOs se realizó a partir de muestras de tejido metastásico de CaP provenientes de cultivos primarios almacenados a -80°C en el laboratorio de Oncología Celular y Molecular codificados como N° 316 (ver carta de aprobación Ética en punto 5.8)

Para el cultivo de PDOs se realizó una primera metodología de cultivo, sin embargo, debido a las dificultades en el proceso de colección de PDOs fue necesario incluir una segunda metodología que permitiera conservar la estructura de estos para la obtención de cortes.

La primera metodología empleada para la caracterización de PDOs consistió en depositar $50\ \mu\text{L}$ de Matrigel® (Corning, n° de cat. 356231), previamente descongelado a 4°C la noche anterior a la siembra y mantenido en un soporte frío para evitar su gelificación, en una placa de 24 pocillos esparciéndose por toda la superficie de cada pocillo con una pipeta Pasteur de punta curva para luego gelificar por 45 min a 37°C . Para la obtención de células del cultivo primario se precalentó en baño termostático las soluciones de buffer fosfato salino (PBS) 1X, tripsina (Fisher ChemAlert, n° de cat. T360-500) y DMEM F12 (Gibco, n° de cat. 11320-033) 7% suero fetal bovino (Capricorn scientific, n° de cat FBS-HI-12A) con 8 factores de crecimiento que corresponden a transferrina (Sigma, n° de cat. T8158), insulina (MERCK, n° de cat. 11061-68-0), selenio (Sigma, n° de cat. S-1382), vitamina A (Sigma, n° de cat. 68-26-8) y E (Sigma, n° de cat. T3251), hidrocortisona (Sigma, n° de cat. H-4001), dihidrotestosterona (DHT; Sigma, n° de cat. A8380) y factor de crecimiento epidermal (EGF; Sigma, n° de cat. 62253-63-8) a 37°C . Se evaluó la confluencia del cultivo y estando a un 100% se retiró el medio de cultivo, se lavó dos veces con PBS 1X, se agregaron 2 mL de tripsina y se dejó incubar por 5 minutos a 37°C para desprender las células. Terminado el tiempo se verificó que se desprendiera la totalidad de las células y se añadieron los mismos volúmenes de medio de cultivo para inactivar la tripsina, se resuspendió con pipeteo suave y se traspasó el contenido de la placa a un tubo falcon de 15 mL. El conteo de células se realizó con contador automático de células (Biorad, modelo TC20, Singapore). Se tomó un volumen de homogeneizado que contuviera 20.000 células las cuales se depositaron 6 pocillos con Matrigel® gelificado de la placa de 24 pocillos y se agregó $500\ \mu\text{L}$ de medio de cultivo. Los cultivos se incubaron por 5 días a 37°C a una atmósfera humidificada con 5% de CO_2 .

La segunda metodología de cultivo utilizada para caracterizar PDOs está representada en la figura 1. Una vez que cada cultivo primario consiguiera una confluencia del 100% se

precalentó en baño termostático las soluciones de PBS 1X, tripsina y DMEM F12 7% con 8 factores de crecimiento a 37°C. Se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS 1x y se aplicaron 2 mL de tripsina para desprender las células de la placa de cultivo. Posterior a este tiempo y asegurado el desprendimiento de todas las células de la placa, se inactivó la tripsina agregando el mismo volumen de medio de cultivo. Se depositaron 25 µL del homogeneizado obtenido en un tubo de 0,2 mL al cual luego se le agregó 25 µL de Matrigel®, previamente descongelado a 4°C la noche anterior a la siembra y mantenido en soporte frío para evitar su gelificación, los 50 µL de la mezcla homogeneizado-Matrigel® se depositó en el centro de un pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos sin esparcirlo en ella, formando así un domo el cual se gelificó a 37°C con la placa de cultivo invertida por 15 minutos para luego terminar de gelificar durante 20 minutos en posición normal, esto para favorecer la presencia de las células en el interior del domo y no contactando con el plástico del pocillo de cultivo, una vez gelificado se agregó 500 µL de medio de cultivo. El medio de cultivo fue renovado 2-3 veces por semana. Los PDOs se cultivaron durante 5 días a 37°C a una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Los PDOs se cultivaron en 3 oportunidades a partir de 3 pasajes distintos del cultivo primario.

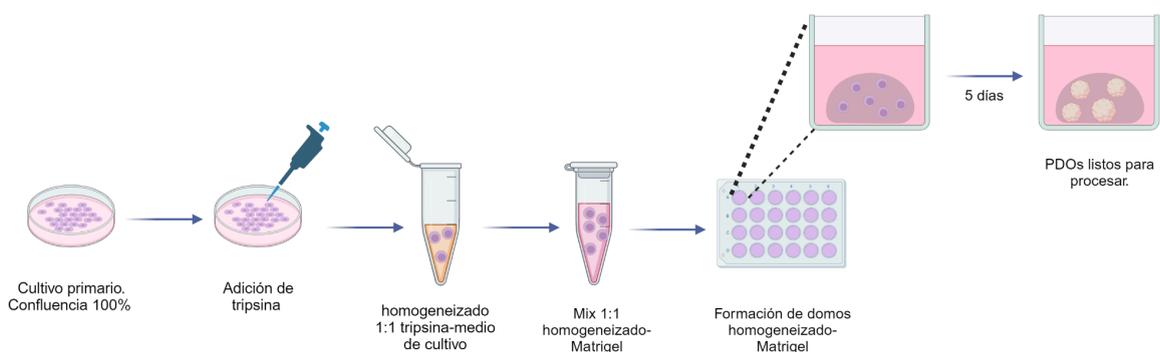


Figura 1: Metodología de cultivo 3D utilizada para la obtención de PDOs con estructura conservada a partir de cultivo primario. Una vez que el cultivo primario obtiene un 100% de confluencia en la placa de 60 mm de diámetro se añadió tripsina para desprender las células de la placa y se realizó un homogeneizado 1:1 con medio de cultivo de los cuales se obtienen 25 µL que se depositan en un tubo de 0,2 mL para luego agregar 25 µL de Matrigel® obteniendo un mix 1:1 con el fin de depositarlo en un pocillo de una placa de 24 pocillos formando un domo en su centro. El cultivo se dejó crecer durante 5 días permitiendo observar estructuras 3D de un tamaño apropiado para procesar. Figura creada con Biorender.com

Para los ensayos de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), se requirió que los cultivos primarios de 4 pasajes distintos de la línea 316 obtuvieran un 100% de confluencia en placas de 60 mm de diámetro. Se cultivaron PDOs en placas de 96 pocillos precalentadas, los PDOs se cultivaron en 32 pocillos para probar

6 concentraciones distintas para cada uno de los tres fármacos con su respectivo blanco y control de dimetilsulfóxido (DMSO), el experimento fue repetido en 4 ocasiones para 4 pasajes distintos donde cada cultivo de PDO tenía su respectiva réplica en 2D. La metodología de cultivo consistió en el depósito de 7 μ L de Matrigel[®] con un volumen de homogeneizado que contuviera 3.500 células y que no superase el volumen de Matrigel[®] formando un domo en el centro del pocillo el cual se gelificó a 37°C por 45 minutos, una vez gelificado se agregó 100 μ L de DMEM F12 7% v/v con 8 factores de crecimientos. El medio de cultivo se renovó 2-3 veces por semana. Los PDOs se cultivaron durante 5 días a 37°C a una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ hasta la incubación con fármacos. En el caso de los cultivos 2D se agregaron 3.500 células en cada pocillo junto a 100 μ L de medio de cultivo, el cultivo se repitió para 4 pasajes distintos y de manera cuadruplicada para las mismas condiciones que se mencionaron para el cultivo 3D.

5.2 Colección de PDOs, fijación en paraformaldehído, inclusión en parafina y obtención de cortes.

Para coleccionar los PDOs de la primera metodología de cultivo, se precalentó colagenasa (Gibco, n° de cat 17104-019) 0,2% p/v preparada en agua destilada, PBS 1X, DMEM F12 7% con 8 factores de crecimiento y el TrypLe (Gibco, n° de cat 12604-021) a 37°C. Para disgregar el Matrigel[®] se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se lavó con PBS 1X, se agregaron 200 μ L de colagenasa 0,2% p/v por pocillo y se incubó por 45 minutos a 37°C. Posterior a la incubación se retiró la colagenasa y se añadieron 200 μ L de TrypLe incubando por 10 minutos a 37°C para desprender los organoides. Finalizada la incubación se añadieron 200 μ L de medio de cultivo para inactivar el TrypLe, se homogeneizó suavemente y se traspasó a un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Para la obtención de un pellet de PDOs se centrifugó por 3 minutos a 300 g, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 μ L de paraformaldehído (PFA; MERCK, n° de cat. 1.04005.1000) 4% p/v en PBS 1X pH 7,1 y se fijó durante 1 hora. Una vez fijado se centrifugó por 3 minutos a 300g para obtener el pellet que contiene los PDOs fijados. Con el fin de generar un bloque celular se calentó gelatina (MERCK, n° de cat 1.04070.0500) 8% p/v a 37°C de la cual se tomó un volumen de 100 μ L para resuspender el pellet de organoides fijados. Una vez gelificados los bloques celulares, se fijó la gelatina con PFA 4% p/v en PBS 1X pH 7,1 por toda la noche, transcurrido este tiempo se retiró el fijador y el bloque celular se colocó en un cassette histológico para procesarlo en procesador automático de tejidos (Roundfin, RD-1301, Qiwing Street, Shengbei Dist., Shenyang, China) con el protocolo de procesamiento que comprendía un paso por etanol

70% v/v por 30 minutos, un paso por etanol 95% v/v por 30 minutos; tres pasos por etanol 100% v/v (Winkler, n° de cat. 155766), los dos primeros por 30 minutos y el último por 45 minutos; tres pasos por Xilol (EQUILAB, n° de cat. 07XILOLAAAA0001), los dos primeros por 30 minutos y el último por 45 minutos y 3 pasos por parafina (MERCK, n° de cat. 1.116092504) líquida a 60°C, los dos primeros por 30 minutos y el último por 45 minutos. Ya impregnado el bloque celular en parafina, se procedió a realizar la inclusión definitiva en parafina utilizando centro de inclusión (The Tissue-Tek TECTM 5, Sakura Finetek USA, Inc, Japan) donde el bloque celular se posicionó en el centro de un molde pequeño de inclusión para dispensar parafina líquida y luego solidificarla en una platina fría y así obtener un bloque de parafina con el bloque celular en su centro. Se obtuvo un corte de 3 μm de grosor para H&E con el fin de observar si se conservó la estructura de los PDOs.

La colección de PDOs y su procesamiento hasta la obtención de cortes en el caso de la segunda metodología se muestra en la figura 2. Con el fin de obtener cortes histológicos de los PDOs con su estructura conservada, se retiró el medio de cultivo de los pocillos de las placas de 24 pocillos y se realizó un lavado con PBS 1x para luego fijar los PDOs y Matrigel® agregando en cada pocillo 300 μL de PFA 4% p/v en PBS 1x pH 7,1 por 10 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto se añadieron 400 μL de gelatina 8% p/v en cada pocillo y se gelificó a 4°C por 20 minutos para luego con la parte posterior de una punta P5000 extraer el disco de gelatina con los PDOs en el domo de Matrigel® a modo de *punch* e invertir el disco de gelatina para añadir 100 μL de gelatina líquida en la base del disco con el fin de sellarlo, se terminó de gelificar por 20 minutos a 4°C. Una vez obtenidos los discos de gelatina con Matrigel® y PDOs completamente sellados, se dejaron en cassettes histológicos rotulados con el número 316 o 459, la fecha de colección y el pasaje que tenía el cultivo para fijar la gelatina con PFA 4% p/v en PBS 1x pH 7.1 por toda la noche a 4°C y luego ser procesados en procesador automático de tejidos con el protocolo de procesamiento que se describió anteriormente. Con los discos de gelatina con PDOs en su interior ya impregnados en parafina, se procedió a realizar la inclusión definitiva en parafina utilizando centro de inclusión donde se orientó en el centro de un molde pequeño el disco de gelatina para dispensar parafina líquida y luego solidificarla en una platina fría y así obtener un bloque de parafina con los discos de gelatina con PDOs en su interior. Se obtuvieron cortes de 2 μm de grosor usando microtomo los cuales se extendieron en baño termorregulado a 45°C, se recogieron en portaobjetos y se visualizó en microscopio óptico (Zeiss, modelo Axiolab 5, Suzhou, China) la presencia de PDOs, si estos estaban presentes el corte se dejaba nuevamente en el baño y se tomaron con portaobjetos previamente silanizados para dejarlos secar por una hora a 60°C en estufa. Para cada cultivo de PDO obtenido a partir de tres pasajes

distintos de cultivo primario se obtuvieron 8 cortes seriados, 6 para los marcadores de IHQ, 1 para HE y 1 para control negativo.

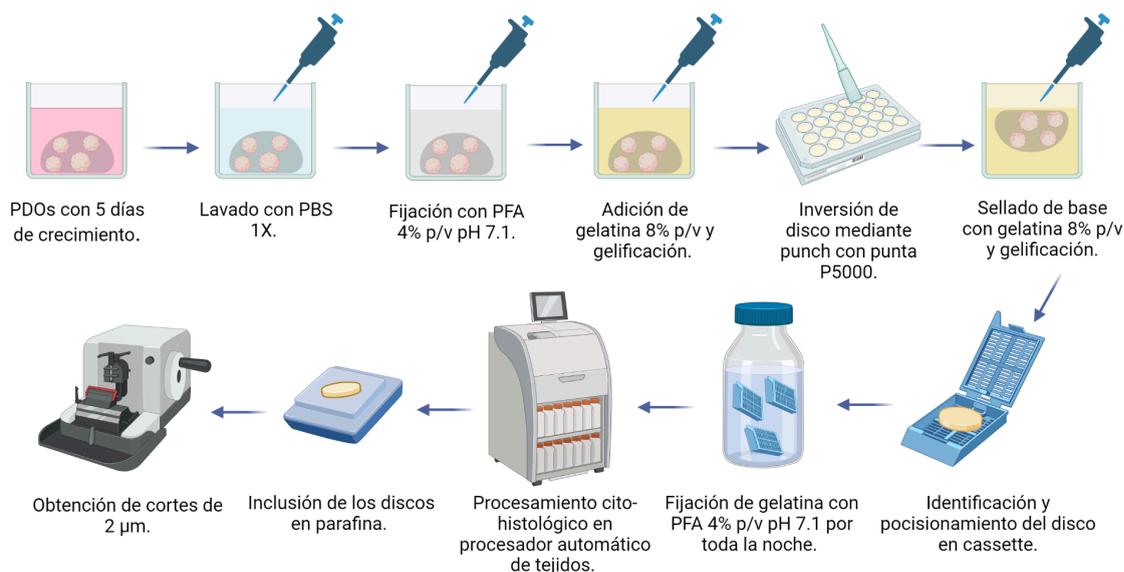


Figura 2: Procesamiento de PDOs en discos de gelatina para la obtención de cortes histológicos. Tras 5 días de crecimiento de los PDOs, se procedió a lavar con PBS 1X para fijar el Matrigel® y PDOs con PFA 4% p/v pH 7,1 para luego añadir gelatina 8% p/v y gelificar, una vez gelificado se invirtió el disco mediante un punch por la parte posterior de una punta P5000 con el fin de sellar la base con gelatina 8% p/v, el disco completamente sellado se posicionó en cassette histológico y se identificó con el número del cultivo, la fecha de colección y el pasaje, se fijó la gelatina en PFA 4% p/v pH 7,1 por toda la noche para luego ser procesado en procesador automático de tejidos, realizar la inclusión definitiva en parafina y obtener cortes de 2 µm de grosor. Figura creada con Biorender.com

5.3 Hematoxilina & Eosina, Inmunohistoquímica cromogénica e Inmunofluorescencia indirecta.

Una vez secos los cortes, se desparafinaron en 3 cambios de Xilol, el primero por 10 minutos y los dos siguientes por 5 minutos, los cortes se rehidrataron en una batería descendentes de etanoles 100, 100, 95 y 70% v/v por 5 minutos cada uno y se dejaron en agua destilada.

Para la tinción con H&E los cortes se tiñeron con hematoxilina (Leica, n° de cat 3801561), previamente filtrada, por 5 minutos para luego sumergir los cortes brevemente en agua corriente y virar por 30 segundos la tinción en tetraborato de sodio decahidratado (MERCK, n° de cat. 1303-96-4) saturado. Se evaluó la tinción nuclear en el microscopio óptico de luz y se lavó brevemente en agua destilada para teñir los cortes con eosina Y (MERCK, n° de cat. 17372-87-1) 0,1% p/v en etanol 70% v/v, previamente filtrada, por 15 segundos, finalizado este tiempo se evaluó la tinción citoplasmática en el microscopio

óptico de luz. Posterior a esto, se deshidrataron los cortes en pasos rápidos de etanol ascendentes (70, 95, 100 y 100% v/v) y luego por 2 pasos rápidos en xilol para finalmente montar con Eukitt (Fluka, n° de cat. 25608-33-7). Con el fin de limpiar el fondo de la gelatina/Matrigel ® se optó por realizar digestión con colagenasa 0,2% p/v por 10 minutos posterior a la recuperación antigénica con buffer citrato de sodio preparado a partir de ácido cítrico trisódico dihidratado (Sigma, n° de cat. C-7254) pH 6,0 en el caso de los cortes de PDOs cultivados y procesados con la segunda metodología.

Para la técnica de IHQ cromogénica los cortes se sometieron en primera instancia a recuperación antigénica por 30 minutos en buffer citrato de sodio pH 6,0 calentado a 90°C mediante el uso de vaporera (Oster, modelo 5711-052), una vez finalizada la recuperación los cortes se lavaron en 3 cambios de PBS 1X por 5 minutos cada uno, para luego dejar los cortes en cámara húmeda y delimitar sus alrededores con lápiz hidrófobo (ImmEdge, n° de cat. H-4000). Luego se incubó con colagenasa 0,2% p/v por 10 minutos para eliminar el fondo por el Matrigel ®. Posterior a esto se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (Hes) 0,3% v/v en metanol (Winkler, n° de cat.101510) por 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los cortes 3 veces en PBS 1X por 5 minutos cada uno y se bloqueó la reactividad inespecífica con suero equino 2,5% p/v (Vector laboratories, n° de cat. 30022) por 30 minutos a temperatura ambiente, posterior a esto se retiró el exceso de suero de cada corte. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C, las diluciones y características de los anticuerpos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1: Anticuerpos utilizados para la caracterización de PDOs.

Anticuerpo	Marca	Catálogo	Especie	Localización	Dilución
Anti CD133	Abcam	ab16518	Conejo	Membrana plasmática y citoplasma	1:100
Anti CD44	Abcam	ab51037	Conejo	Membrana plasmática	1:1000
Anti SOX-2	Abcam	ab92494	Conejo	Núcleo	1:100
Anti SNAIL	Cell signaling	3879	Conejo	Núcleo	1:100
Anti ZEB1	Abcam	ab203829	Conejo	Núcleo	1:100
Anti ABCC1	Cell signaling	14685	Conejo	Membrana plasmática y citoplasma	1:100

Transcurrido este tiempo, se lavaron los cortes 3 veces en PBS 1X por 5 minutos cada uno y se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario Biotinylated Universal Antibody, RTU. Anti mouse/rabbit IgG (Vector laboratories, n° de catálogo PK-7200) por 1 hora a 37°C. Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario se lavaron los cortes 3 veces en PBS 1X por 5 minutos cada uno y se incubó con el sistema de detección Vectastain Elite ABC Reagent, R.T.U. (Vector laboratories, n° de catálogo 30083) por 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los cortes 3 veces en PBS 1X por 5 minutos cada uno y se incubó con el cromógeno Diaminobencidina (DAB) del kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako, n° de catálogo K3468) por 3 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz, la reacción se detuvo lavando los portaobjetos en PBS 1X. Los núcleos se contrastaron con hematoxilina de Mayer durante 5 minutos y el viraje de la tinción se realizó con una mezcla 1:1 de carbonato de Litio (MERCK, n° de cat 554-13-2) y carbonato de sodio (MERCK, n° de cat. 497-19-8) por 3 minutos. Los cortes se deshidrataron en pasos rápidos de etanol ascendentes (70, 95, 100 y 100% v/v) y luego por 3 pasos rápidos en xilol para finalmente montar con Eukitt. Debido al fondo generado por el Matrigel® se decidió añadir una digestión con 50 µL de colagenasa 0,2% p/v por 10 minutos a 37°C posterior a los lavados con PBS 1X de la recuperación antigénica.

Para IFI los cortes se sometieron a recuperación antigénica por 30 minutos en buffer citrato de sodio pH 6,0 mediante el uso de vaporera, una vez finalizada la recuperación los cortes se lavaron en 3 cambios de PBS 1X por 5 minutos cada uno, se delimitaron los bordes de los cortes con lápiz hidrófobo para luego dejar los cortes en cámara húmeda y aplicar 50 µL de colagenasa 0,2% p/v por 10 minutos a 37°C, se lavaron los cortes 3 veces en PBS 1X por 5 minutos cada uno y se bloqueó la reactividad inespecífica con Suero equino 2,5% p/v por 30 minutos a temperatura ambiente, posterior a esto se retiró el exceso de suero de cada corte. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4°C, las diluciones y características de los anticuerpos se muestran en la tabla 1, sólo se modificaron las diluciones de los anticuerpos CD133 y ABCC1 a 1:100 y 1:50 respectivamente. Transcurrido este tiempo, se lavaron los cortes 3 veces en PBS 1X por 5 minutos cada uno y se incubaron por 40 minutos a 37°C con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 DaR (Life Technologies, n° de cat. A21207) para todos los marcadores ya que todos los anticuerpos provenían de conejo, la dilución utilizada fue 1:100. Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario se lavaron los cortes 3 veces en PBS 1X por 5 minutos cada uno y se incubó con 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Chem Cruz, n° de cat. SC-3598) a una concentración de 1,5 µg por mL de PBS 1X por 5 minutos seguido de dos lavados con PBS 1X por 3 minutos cada uno.

5.4 Obtención de imágenes.

Las imágenes fueron obtenidas en microscopio óptico mediante el uso de cámara digital (Zeiss, modelo AxioCam 5) para las H&E e IHQ cromogénicas, en microscopio invertido mediante el uso de cámara digital para las imágenes de cultivos y en microscopio óptico (Leica, modelo DM 2500) acoplado a una lámpara de mercurio y cámara digital (Leica, modelo DFC425) para las IFI. El análisis de la marca fluorescente se realizó con el software ImageJ 1.51w.

5.5 Incubación con fármacos.

Las concentraciones utilizadas para las incubaciones con fármacos se escogieron en base a lo descrito por Van Helmerick A. *et al* [32], para enzalutamida (Cayman, n° de cat. 915087-33-1) y acetato de abiraterona (MSN labs) fueron 0,1 μ M, 0,3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M y 30 μ M, mientras que las concentraciones utilizadas para docetaxel (Sigma, n° de cat. 01885) fueron de 0,03 nM, 0,1 nM, 0,3 nM, 1 nM, 3 nM y 10 nM, estas incubaciones se realizaron durante 48 horas. Una vez transcurridos los 5 días de crecimiento 3D y con los cultivos 2D a una confluencia del 100%, se realizó un lavado con PBS 1X y se añadieron 100 μ L de DMEM F12 7% suero fetal bovino con 8 factores de crecimiento en un pocillo mientras que a los otros se les añadió 99 μ L de medio de cultivo. Un pocillo fue utilizado como control al cual no se le añadió fármaco y se incluyó un control de vehículo de fármaco al cual se le añadió 1 μ L de DMSO mientras que a los demás pocillos se le añadió 1 μ L de la concentración de fármaco correspondiente 100 veces más concentrado para que al momento de añadir 1 μ L a los 99 μ L de medio que tenía ese pocillo se obtenga la concentración deseada. La distribución de las concentraciones de fármacos utilizadas y la organización de los cultivos en las placas de 96 pocillos se muestran en las figuras 3 y 4.

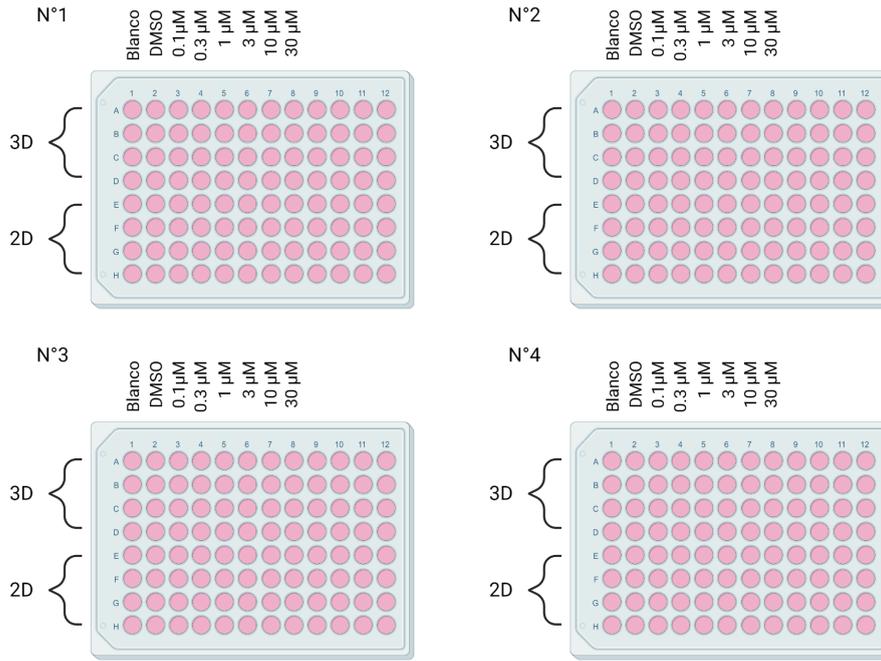


Figura 3: Distribución de las concentraciones de los fármacos Enzalutamida y acetato de Abiraterona en placas de 96 pocillos para cultivos 2D y 3D. La incubación con enzalutamida y acetato de abiraterona se realizó para 4 pasajes distintos de cultivos 2D y 3D de la línea 316, las concentraciones utilizadas en orden creciente fueron de 0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM y 30 µM. Se utilizó un control blanco en donde los cultivos solo estaban en presencia de medio de cultivo y un control de vehículo de fármaco de DMSO. Las incubaciones con los fármacos y controles se realizaron de manera cuadruplicada. Figura creada con Biorender.com

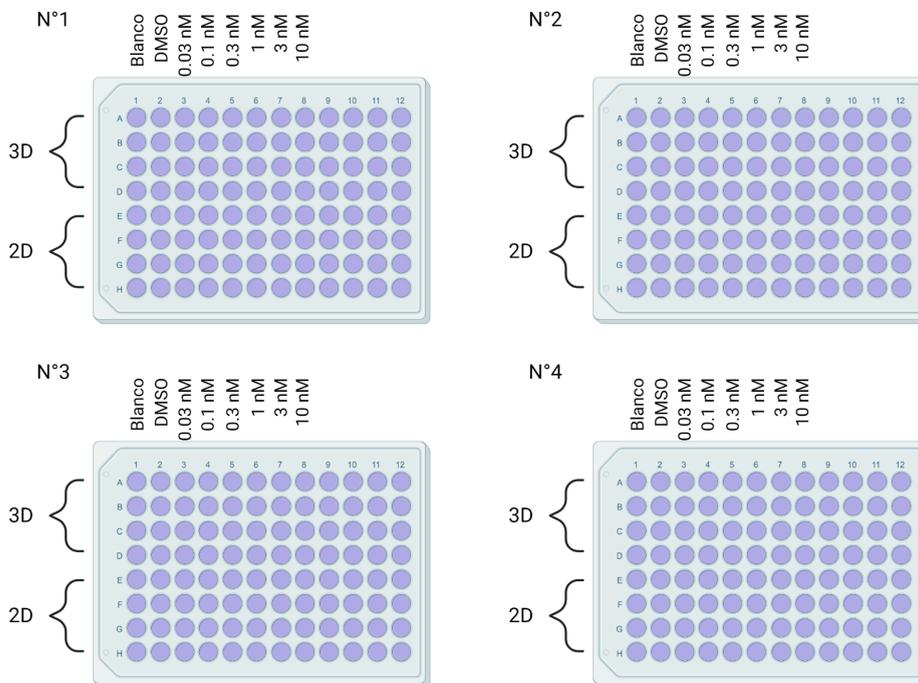


Figura 4: Distribución de las concentraciones de Docetaxel en placas de 96 pocillos para cultivos 2D y 3D. La incubación con Docetaxel se realizó para 4 pasajes distintos de cultivos 2D y 3D de la línea 316, las concentraciones utilizadas en orden creciente fueron de 0,03 nM, 0,1 nM,

0,3 nM, 1 nM, 3 nM y 10 nM. Se utilizó un control blanco en donde los cultivos solo estaban en presencia de medio de cultivo y un control de vehículo de fármaco de DMSO. Las incubaciones con Docetaxel y controles se realizaron de manera cuadruplicada. Figura creada con Biorender.com

5.6 Ensayo de MTT

La viabilidad de los PDOs con CaP posterior al tratamiento de fármacos se evaluó a través de la capacidad de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) basado en lo descrito por Grabinger T. *et al* [27]. Finalizadas las 48 horas de incubación con fármacos, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS 1X, luego se incubó con 100 μ L de solución de MTT (Sigma, n° de cat. M5655-1G) a una concentración final de 500 μ g/mL preparada en medio libre de rojo fenol RPMI 1640 (Gibco, 11835-030) durante 3 horas y media a 37°C a una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, se descartó la solución y se agregan 20 μ L de solución de SDS (Winkler, n° de cat. BM-1650) 2% p/v en agua destilada para solubilizar el Matrigel ® por 2 horas a 37°C. Posterior a esto, se agregó 100 μ L de DMSO (Winkler, n° de cat. DI-0755) el cual se incubó por 15 minutos con agitación a temperatura ambiente para solubilizar el MTT reducido y con ello medir la densidad óptica en el lector de absorbancia de microplacas Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) a 570 nm.

5.7 Análisis estadísticos.

El análisis de datos se obtuvo mediante la aplicación del test no paramétrico Mann Whitney utilizando el software GraphPad Prism 7.1 (GraphPad Software, Inc.). Los gráficos de concentraciones de fármacos con 48 horas de incubación v/s viabilidad celular normalizada también se realizaron con este software. Se considerará estadísticamente significativo un valor $p < 0,05$.

5.8 Consideraciones éticas.

Todos los protocolos de recolección, uso y procesamiento de tejidos han sido aprobados por el Comité de Ética institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (aprobaciones n.º 135-2015 y 083-2020; Autorización de uso del archivo de biopsias del Departamento de Patología de la Universidad de Chile). 03012016, Santiago, Chile.

6. Resultados:

6.1 Las metodologías de cultivo utilizadas permitieron desarrollar PDOs con CaP a partir de cultivos primarios.

Las metodologías de cultivo anteriormente descritas permitieron desarrollar PDOs a partir de cultivos primarios (figura 5). En los cultivos primarios (figura 5 A y B) se observan células que crecieron en contacto con el plástico de la placa de cultivo, estas células presentan morfología ovalada, redonda, algunas con un aspecto más fusado y/o con prolongaciones. Mediante la primera metodología de cultivo que consistía en el crecimiento de PDOs en una capa de Matrigel® (figura 5 C, D, E y F), se observa la formación de PDOs en dicha capa, estos se evidencian como estructuras 3D de distintos tamaños que crecieron en un mismo plano, su morfología es en su mayoría esférica, además de evidenciarse prolongaciones en los PDOs de mayor tamaño. La segunda metodología de cultivo consistió en el cultivo de PDOs en domos de Matrigel® (figuras 5 G, H, I y J), el crecimiento de PDOs se evidencia como múltiples estructuras 3D esféricas de distintos tamaños en diferentes planos donde aquellas que están en el plano de observación se visualizan enfocadas (flechas amarillas) mientras que las presentes encima o debajo del plano se muestran como estructuras esféricas desenfocadas y oscuras (flechas verdes).

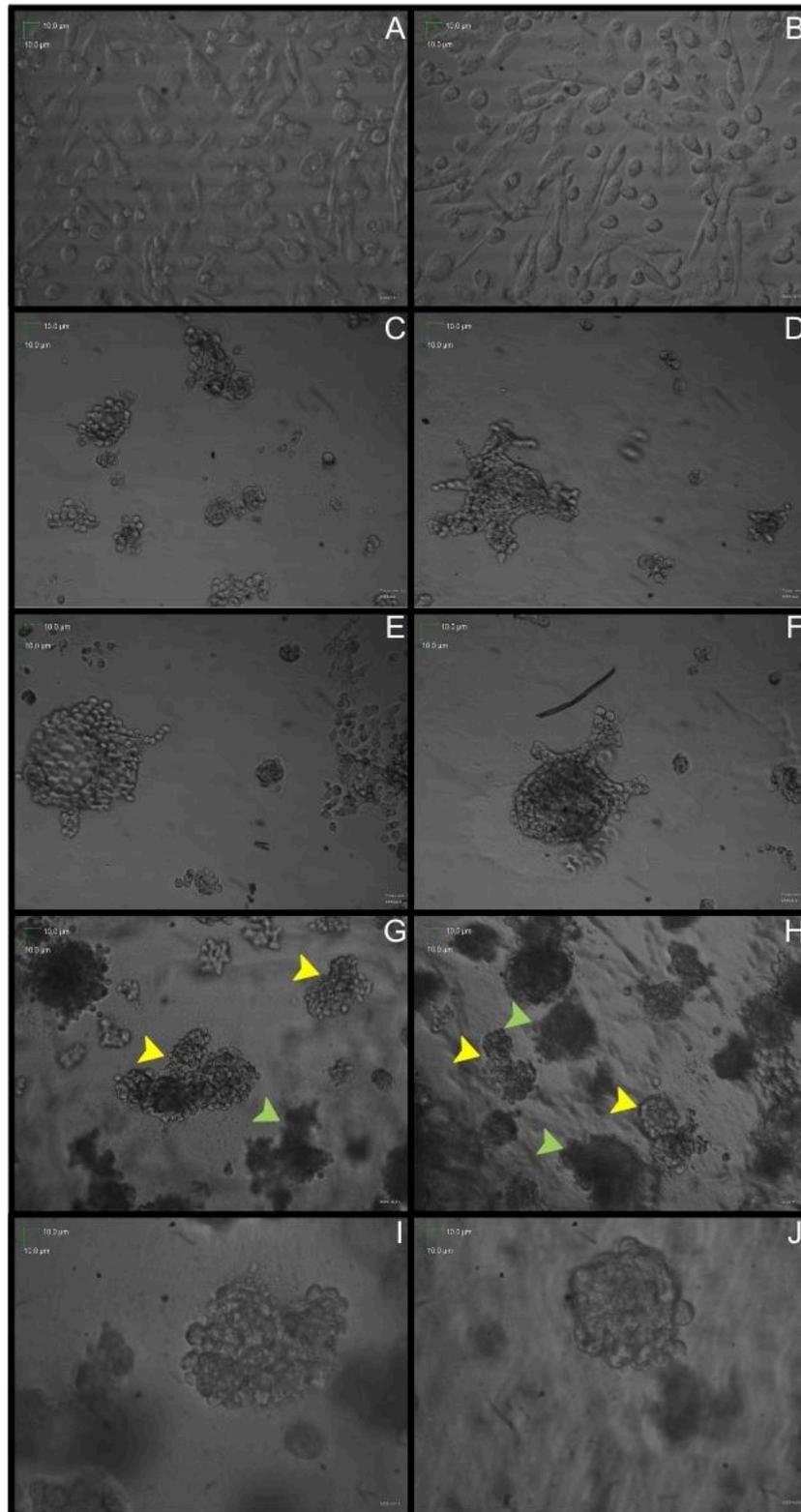


Figura 5: Microfotografías de cultivos primarios 316, PDOs cultivados en capa de Matrigel® y PDOs cultivados en domos de Matrigel®. A y B son microfotografías correspondientes a la línea de cultivo primario 316. C, D, E y F corresponden a microfotografías de cultivos de PDOs 316 obtenidos mediante la primera metodología de cultivo 3D. G, H, I y J corresponden a microfotografías de cultivos PDOs 316 obtenidos mediante la metodología de cultivo 3D en domos de Matrigel®. Las flechas amarillas en G y H señalan PDOs en el plano de foco mientras que las flechas verdes PDOs en otros planos desenfocados. Las figuras A, B, I y J presentan magnificación 35X mientras que las figuras C, D, E, F, G y H presentan magnificación 20X.

6.2 La tinción de H&E evidencia la estructura conservada de PDOs cultivados en domos de Matrigel® y procesados con discos de gelatina en cortes histológicos y su heterogeneidad morfológica.

Mediante la tinción de H&E se pudo evidenciar que la metodología de cultivo en domos de Matrigel® y procesamiento en discos de gelatina permitió la obtención de cortes de PDOs 316 con su estructura conservada dejando en evidencia su heterogeneidad morfológica. Las técnicas de H&E de metodología de cultivo en capa de Matrigel® y colección mediante bloque celular y el empleo de colagenasa, TrypLe y centrifugación (figura 6 A y B) evidencia los PDOs 316 perdieron su estructura durante el procesamiento, las células se observan aglomeradas sin una conformación clara de alguna estructura que se pueda asociar a las observadas en las figuras 5 E y F, estas en su mayoría son redondas, de distintos tamaños, presentan núcleo hipercromático el cual en algunos casos está en el centro de la célula y en otros en la periferia, además estos presentan diferentes tamaños. Al aplicar la metodología de cultivo de PDOs en domos de Matrigel® y colección mediante discos de gelatina se observan células conformando estructuras esféricas conservadas al corte inmersas en un fondo eosinófilo de gelatina y Matrigel®, las células que conforman estas estructuras presentan heterogeneidad morfológica la cual se evidencia notablemente en aquellas estructuras de mayor tamaño como la presente en la figura 6 C mientras que en estructuras de menor tamaño como las presentes en la figura 6 D se observa un grado menor de heterogeneidad morfológica. Con el fin de eliminar el fondo eosinófilo se aplicó una digestión rápida con colagenasa 0,2% p/v posterior a la recuperación antigénica, esto permitió obtener cortes de PDOs 316 conservados estructuralmente y sin fondo permitiendo un análisis con mayor detalle de las diferencias entre las estructuras formadas, las células que las conforman y del contraste entre la tinción nuclear-citoplasmática (figura 6 E, F, G y H), en las zonas con mayor densidad de células en las estructuras de mayor tamaño (figura 6 F, G y H) las células presentan morfología circular, variables en tamaño y características nucleares (flecha negra), mientras que en el centro se evidencian células de aspecto fusado formando un pseudo lumen (flecha roja), además que en algunos casos se pueden observar algunas estructuras pseudo cribiformes (figura F, círculo naranja), en el caso de las estructuras de menor tamaño como las mostradas en la figura E en las cuales también se logra evidenciar diferencias en lo que respecta a características nucleares.

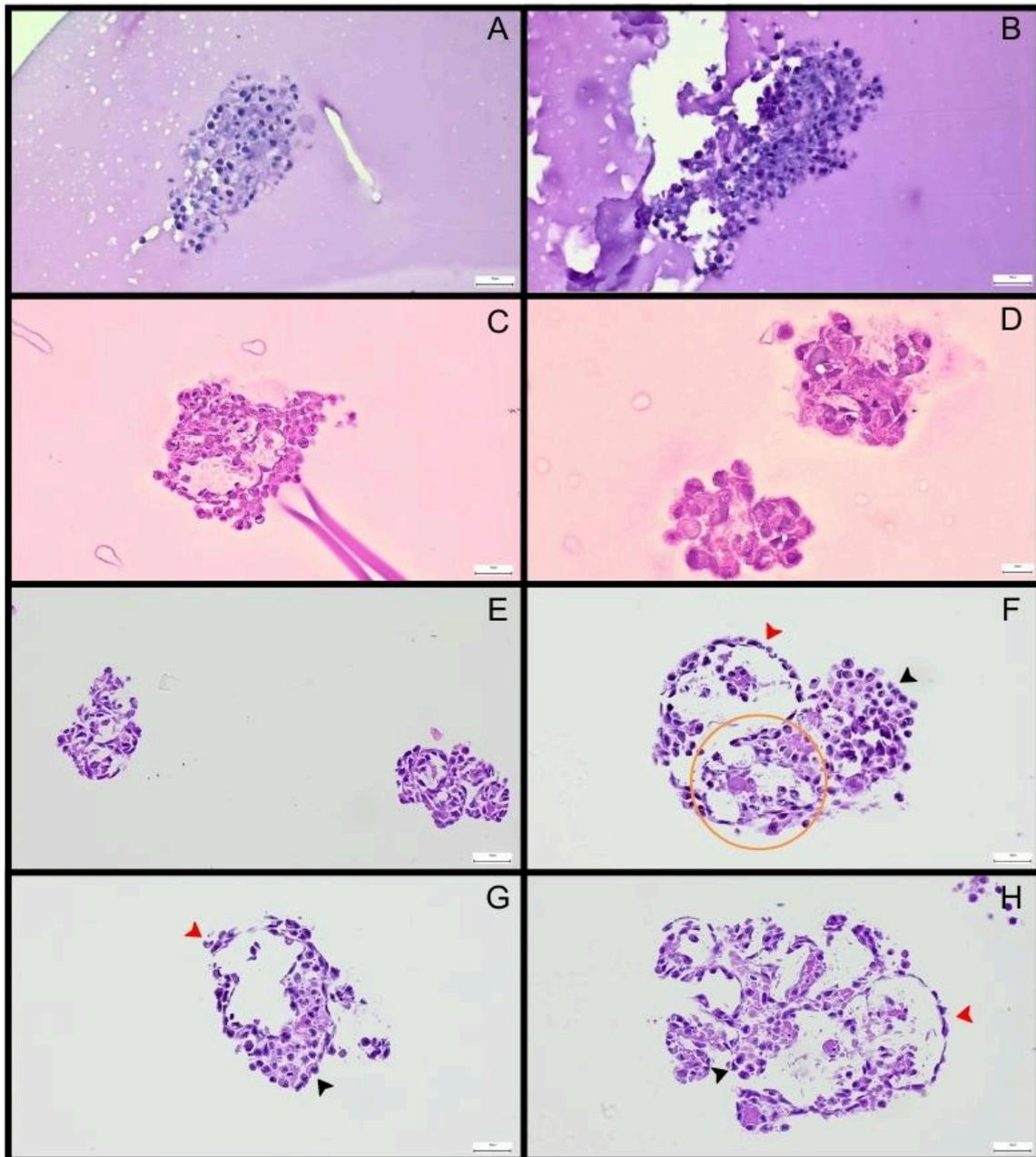


Figura 6: H&E de cortes histológicos de los bloques celulares de PDOs 316 obtenidos con la metodología de cultivo en capa de Matrigel® y colectados con el uso de collagenasa, TrypLe y centrifugación, y de cortes de PDOs 316 obtenidos con la metodología de colección mediante discos de gelatina. A y B corresponden a H&E de cortes de 2 µm de grosor de un bloque celular de PDOs 316 crecidos en capa de Matrigel® y colectados mediante el empleo de collagenasa, TrypLe y centrifugación. C y D corresponden a H&E sin la adición de collagenasa de cortes de 2 µm de grosor de los cultivos 3D colectados mediante discos de gelatina. E, F, G y H corresponden a H&E con adición de collagenasa en cortes de 2 µm de grosor de los cultivos 3D colectados mediante discos de gelatina. Las flechas rojas muestran células de aspecto fusado mientras que las flechas negras muestran células de morfología redonda. A, B, C, E, F, G y H presentan magnificación 30X, la barra de escala es de 50 µm, D presenta magnificación 50X, la barra de escala es de 20 µm.

6.3 La técnica de IHQ cromogénica refleja positividad para el marcador CD44 en cortes de PDOs 316.

La técnica de IHQ cromogénica se realizó para la identificación de los marcadores CD133, CD44, SOX 2, Snail, ZEB 1 y ABCC1 en cortes de PDOs 316 primeramente sin una digestión con colagenasa, sin embargo, los resultados obtenidos mostraron un fondo inespecífico color café alrededor de los PDOs 316 presentes como se observa en la figura 7 A, C, E, G y H, este fondo dificulta la interpretación de los resultados de los cuales solo se puede asegurar positividad para el marcador CD44 por su patrón específico e intenso de membrana (figura 7 C) mientras que para los marcadores CD133 y CD44 no es posible asegurar su positividad. Este problema se intentó solucionar mediante la incorporación de una digestión rápida con colagenasa posterior a la recuperación antigénica (figura 7 B, D, F, H, L y N, sin embargo, pese a que se eliminó el fondo, nuevamente CD44 el único marcador al cual se puede atribuir positividad por su marca intensa y específica en la membrana de las células que conforman los PDOs 316 (figura 7 D) mientras que los marcadores CD133 (figura 7 B) y ABCC1(figura 7 L) son difíciles de interpretar ya que la tinción citoplasmática puede ser producto de residuos de la digestión, SOX 2 (figura 7F), Snail (figura 7H) y ZEB 1 (figura 7J) se evidencian negativos.

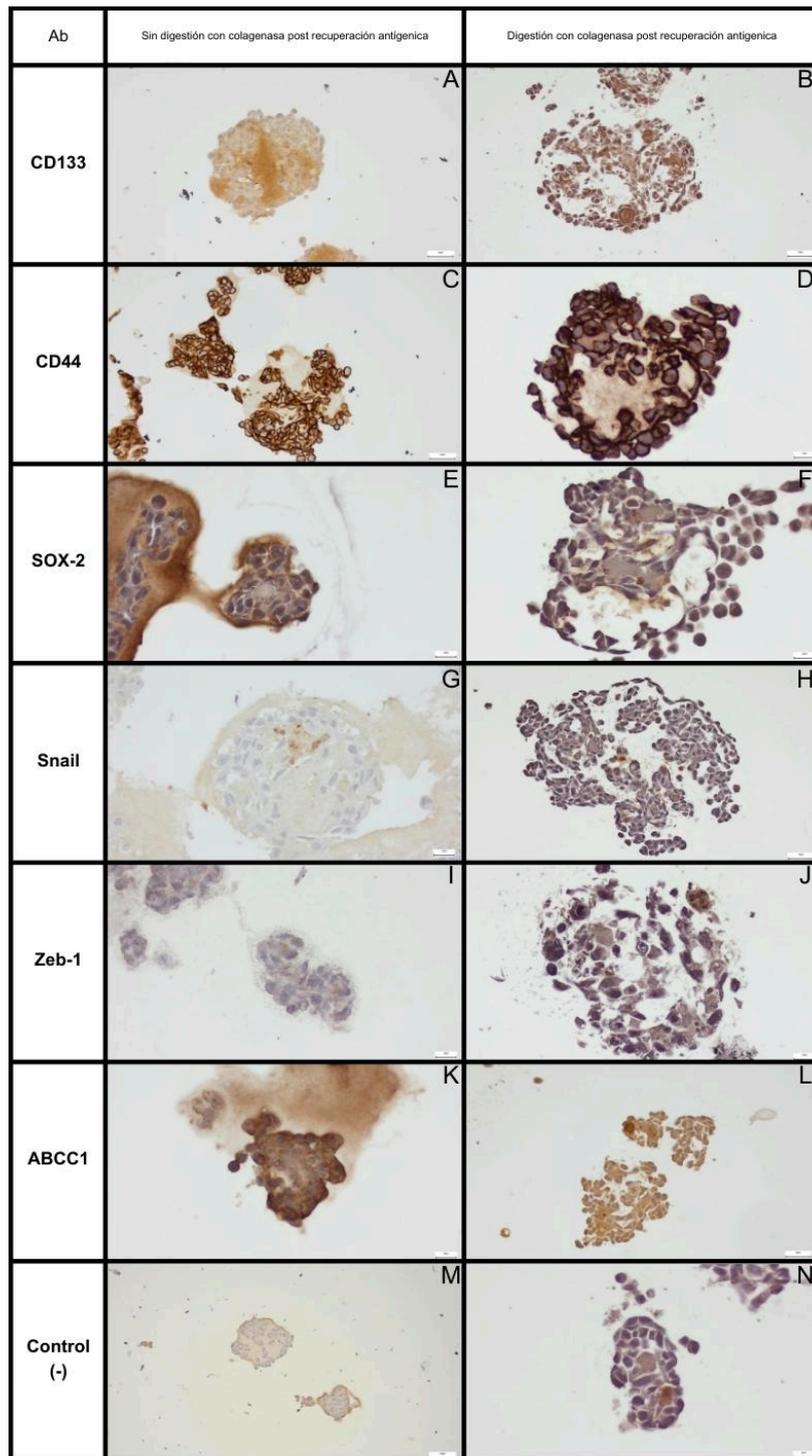


Figura 7: Técnica de IHQ cromogénica en cortes de PDOs 316 con y sin digestión mediante colagenasa post recuperación antigénica. Se observan cortes de PDOs 316 de 2µm de grosor con y sin digestión mediante colagenasa post recuperación antigénica a los cuales se les realizó la técnica de IHQ cromogénica para la identificación de CD133, CD44, SOX 2, Snail, ZEB-1 y ABCC1 con su respectivo control negativo. A, C, E, G, I, K y L corresponden a cortes de PDOs 316 con la técnica de IHQ cromogénica sin la digestión mediante colagenasa para los marcadores recién mencionados. B, D, F, H, J, L y N corresponden a cortes de PDOs 316 con la técnica de IHQ cromogénica con digestión mediante colagenasa post recuperación antigénica para los marcadores antes mencionados. Los aumentos corresponden a 20X para M, la barra de escala es de la barra de escala es de 100 µm. A, B, C, H y L presentan magnificación de 30X, la barra de

escala es de 50 μm . D, E, F, G, I, J, K y N presentan magnificación 50X, la barra de escala es de 20 μm .

6.4 Inmunofluorescencia indirecta refuerza la positividad de CD133 y CD44 en cortes de PDOs 316.

Los resultados de las IFI se muestran en la figura 8. Se observa panel de imágenes de IFI en cortes de PDOs 316, en la primera columna se muestran las imágenes de la señal del anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 DaR para cada identificación de marcador y control negativo, la segunda columna muestra la señal de DAPI y la tercera columna muestra la complementación de ambas señales. En el caso de CD133 se observa señal citoplasmática roja leve lo cual indicaría presencia de este antígeno en las células que conforman los PDOs 316 permitiendo confirmar la positividad de este marcador. En el caso de CD44 la señal obtenida se correlaciona a lo observado en las IHQ cromogénicas, se obtuvo un patrón de membrana rojo intenso en todas las células que conforman los PDOs 316. La señal para SOX 2, Snail, Zeb 1 y ABCC1 fue negativa.

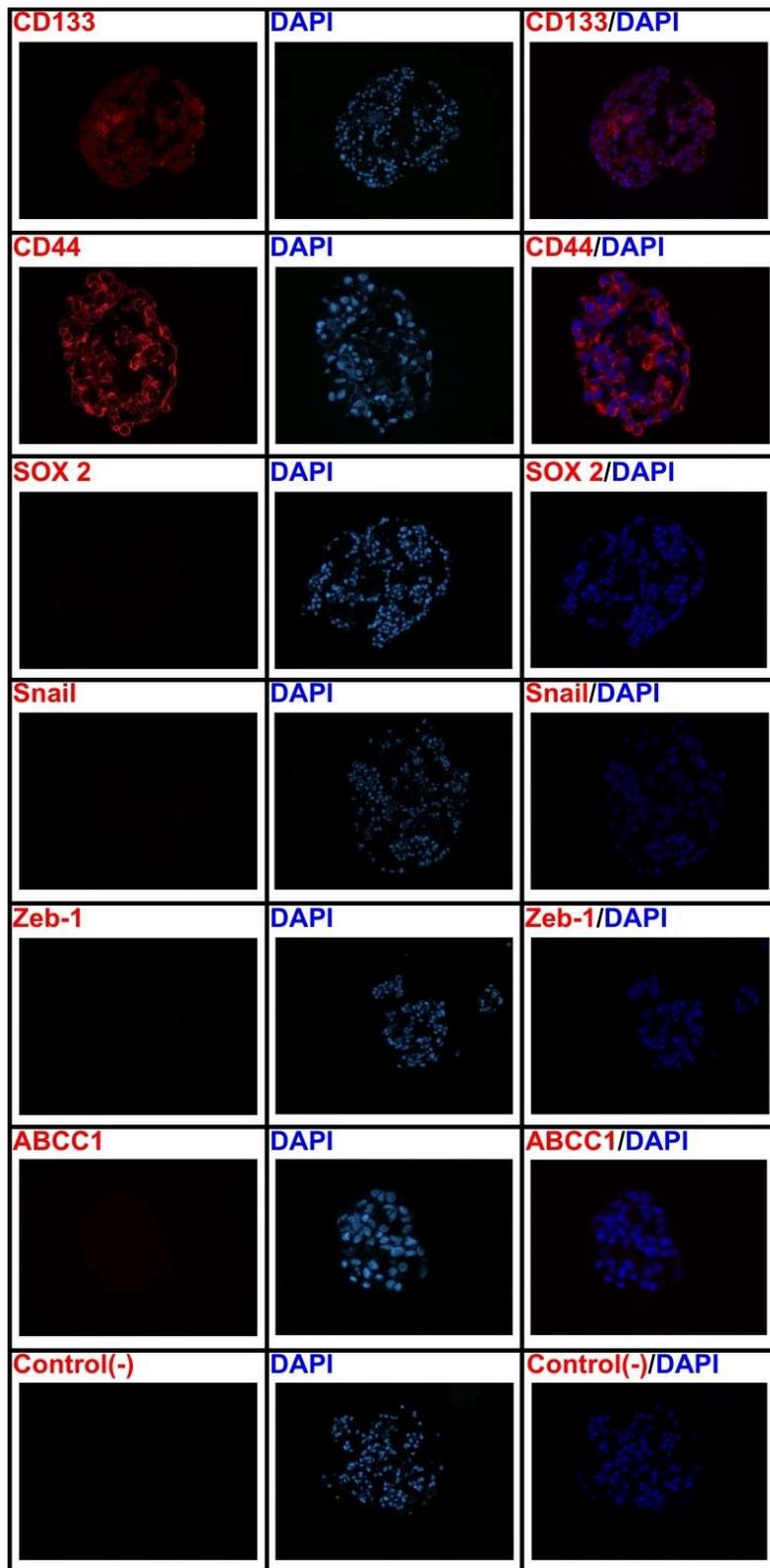


Figura 8: Técnica de Inmunofluorescencia indirecta en cortes de PDOs 316 para los marcadores CD133, CD44, SOX 2, Snail, ZEB 1 y ABCC1. En la columna de la izquierda se muestran las imágenes obtenidas para la señal del anticuerpo secundario Alexa fluor 594, por lo que también corresponde a la señal de los marcadores a caracterizar, la columna de en medio muestra la señal de DAPI y la columna de la derecha muestra el complemento entre ambas señales. La magnificación para CD133, SOX 2, Snail, Zeb 1 y control negativo fue de 30X, la magnificación para CD44, Zeb 1 y ABCC1 fue de 50X

6.5 Los PDOs 316 son sensibles al tratamiento con enzalutamida, acetato de abiraterona y docetaxel, y su viabilidad celular es levemente superior en comparación a su contraparte 2D en el ensayo de MTT.

Los resultados obtenidos de los ensayos de MTT se muestran en la figura 9. Se observa un decaimiento de la viabilidad de los PDOs 316 al estar en presencia de cada fármaco, esto indica que son sensibles al tratamiento con ellos, pese a que los resultados de la comparación entre la viabilidad de PDOs y la del cultivo primario tras la incubación con los fármacos no fue significativa, si se puede observar una leve tendencia de una mayor resistencia por parte de los PDOs 316 en varios puntos de la gráfica. En el caso del ensayo que incluía Enzalutamida (figura 9 A) se observa como la viabilidad tanto de los PDOs 316 como del cultivo primario cae a medida que se aumenta la concentración del fármaco lo que indicaría sensibilidad por parte de ambos cultivos a este fármaco, además los PDOs 316 presentan valores mayores en cuanto a viabilidad respecto a su contraparte 2D en los primeros puntos de la gráfica, mientras que en los puntos intermedios la viabilidad celular entre ambos es similar, al aumentar la concentración la viabilidad del modelo 3D vuelve a ser superior, sin embargo, en el último punto nuevamente vuelve a ser similar entre ambos modelos. En el caso del Acetato de Abiraterona (figura 9 B) también se observa que la viabilidad decae al aumentar las concentraciones del fármaco por parte de ambos tipos de cultivo, los PDOs 316 muestran valores mayores en cuanto a viabilidad en los primeros puntos de la gráfica, en puntos intermedios la viabilidad 3D es superada por la viabilidad 2D pero a mayores concentraciones la viabilidad 3D vuelven a ser mayor que la viabilidad 2D. Los resultados de docetaxel (figura 9 C) indican que los PDOs y cultivos primarios 316 también son sensibles a este fármaco, en este caso el modelo de PDOs 316 muestra valores mayores en cuanto a viabilidad en todos los puntos de la gráfica.

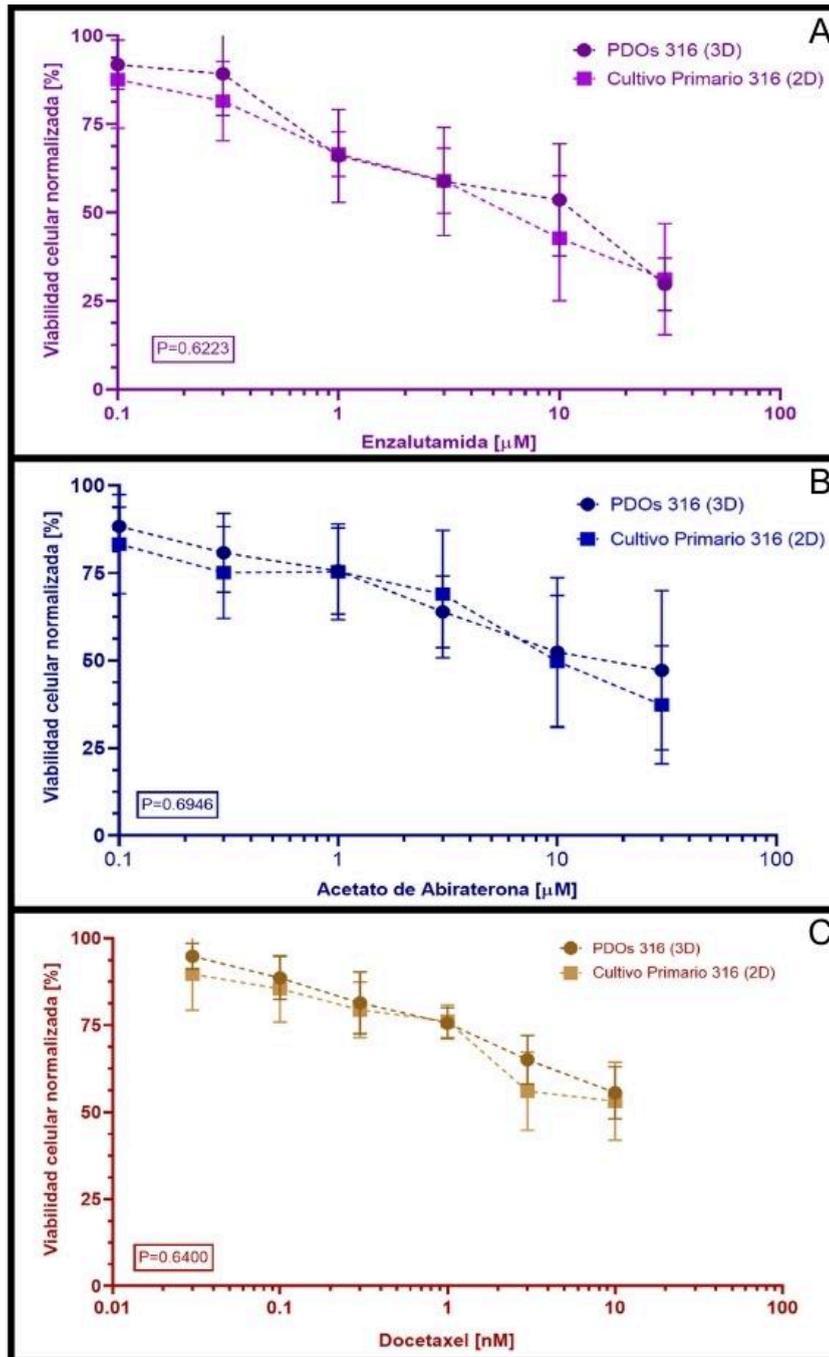


Figura 9: Viabilidad celular normalizada [%] de PDOs 316 (3D) y cultivo primario 316 (2D) vs concentraciones de fármacos después de 48 horas de incubación. Las gráficas muestran la viabilidad celular normalizada respecto al control del vehículo de fármaco DMSO. A corresponde a la gráfica de viabilidad celular normalizada de PDOs y cultivos primarios 316 vs Enzalutamida [μM], $P=0,6223$. B corresponde a la gráfica de viabilidad celular normalizada de PDOs y cultivos primarios 316 vs Acetato de Abiraterona [μM], $P=0,6946$. C corresponde a la gráfica de viabilidad normalizada de PDOs y cultivos primarios 316 vs Docetaxel [nM], $P=0,6400$. Todas las gráficas evidencian sensibilidad de ambas metodologías de cultivo ante los fármacos y una tendencia leve de mayor resistencia por parte del modelo de cultivo de PDOs.

7. Discusión.

Pese a la cantidad de protocolos de cultivos 3D de PDOs con CaP [20, 24, 26, 33], el éxito en su cultivo, mantención y colección resultó dificultoso, invirtiendo mucho tiempo del trabajo en ello. En este estudio se probaron dos técnicas de cultivo de PDOs a partir de cultivos primarios, ambas técnicas tuvieron éxito en la generación de estos como se muestra en la figura 5, sin embargo, el desafío fue a la hora de intentar recolectar estas estructuras. La metodología que incluía el uso de colagenasa, TrypLe y centrifugación no permitía conservar la estructura de los PDOs como se observó en la figura 6 A y B, sin embargo, esta metodología podría ser aplicable para experimentos que no requieran conservar la estructura 3D, como una reacción de polimerasa en cadena (PCR) o Western Blot. Se tuvo que redirigir la metodología a un sistema de cultivo y posterior colección que no involucre colagenasa, TrypLe y centrifugación, en este sentido se optó por la metodología de cultivo 1:1 homogeneizado-Matrigel® que señala Oberque J. *et al* [34] y se apostó por el diseño de una metodología de colección que incluía la fijación por 10 minutos en la misma placa de las estructuras 3D y Matrigel®, y su impregnación en gelatina, esta metodología de cultivo y colección tuvo éxito y permitió conservar la estructura 3D al momento de obtener cortes como se mostró en la figura 6 C y D, una metodología similar fue empleada por Cheaito K. *et al* [35] con la diferencia de que se fijó con PFA 4% p/v por 30 minutos otorgando una consistencia sólida que permitía la manipulación del domo de Matrigel® y su posterior depósito en un medio soportante. El protocolo se continuó mejorando puesto que la gelatina y Matrigel® otorgaba un fondo eosinófilo con tinción H&E entre los PDOs dificultando la observación de las células que los constituían, por lo que se realizó una digestión con colagenasa para eliminar la matriz (Figura 5 E-H). La eliminación del fondo también mejoró la observación de las características nucleares y forma de las células de los PDOs, en especial al comparar aquellas que estaban presentes en los sectores de mayor agrupación y aquellas que conforman los pseudolumenes, siendo de aspecto redondo y fusado, respectivamente. El tipo de estructuras que conforman las células de los PDOs 316 se asemejan a estructuras ductales, conformando pseudolumenes y estructuras semejantes a cribas o conformaciones más sólidas las cuales también han sido observadas en otros estudios de PDOs con CaP. [36], estas organizaciones que mostraron los PDOs 316 probablemente se asemejan a la organización que poseían en el tumor de origen como demostró Gao D. *et al* [33] al comparar la histología de 7 tumores de origen, con 7 patrones histológicos distintos, con sus respectivos PDOs obteniendo estructuras histológicamente similares.

Respecto a los resultados obtenidos en las caracterizaciones mediante IHQ cromogénicas estas mostraban un fondo de precipitado café inespecífico entre las estructuras 3D que puede dificultar la interpretación, este fondo también se observó en las IHQ cromogénicas realizadas para los marcadores AR, p63 y PSA en el estudio de Cheaito K. *et al* [35], donde también los PDOs se procesaron en compañía del Matrigel®. El Matrigel® es producido a partir del sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm cuyos principales componentes son laminina, colágeno IV, entancina y perlecan de sulfato de heparina, sin embargo, también se han identificado contaminantes xenógenos como señala Aisenbrey E. *et al* [37], lo que podría explicar la presencia de precipitado inespecífico alrededor de las estructuras 3D, puesto que el anticuerpo secundario utilizado tiene especificidad para IgG de conejo y ratón existiendo la posibilidad de que se genere una reacción cruzada con el Matrigel®. Pese a que el fondo se eliminó con colagenasa, solo se puede mencionar con seguridad que el marcador CD44 está positivo en las células que conforman los PDOs debido al patrón específico e intenso de membrana evidenciado, como se muestra en la figura 7 C y D, pero en el caso de los marcadores CD133 y ABCC1, los cuales poseen un patrón de marcaje citoplasmático, es difícil definir si la coloración café leve citoplasmática es atribuible a la presencia de dichos marcadores en las células o a residuos de Matrigel® o de su digestión. Para dilucidar esta problemática fue de gran ayuda la IFI principalmente por el uso del anticuerpo secundario fluorescente específico para IgG de conejo, cabe mencionar que probablemente el empleo de un anticuerpo secundario biotinilado específico solamente para IgG de conejo debería ayudar a disminuir el fondo inespecífico obtenido, además de mejoras en el protocolo de IHQ cromogénica como lavados con agitación y disminución del tiempo de incubación con el cromógeno DAB. Los resultados de la técnica de IFI observados en la figura 8 muestra positividad por parte de los PDOs 316 para los marcadores CD44 y CD133 con patrones de marca fluorescente roja en membrana y citoplasma respectivamente, estas marcas se presentan en todas las células que conforman los PDOs, lo mismo sucede con los demás marcadores; SOX 2, Snail, ZEB 1 y ABCC1 los cuales se evidencian negativos en todas las células. Lo mencionado anteriormente puede ser producto de que los PDOs se desarrollaron a partir de cultivos primarios 2D, es sabido que las células cultivadas en 2D no imitan el entorno del tejido tumoral, se pierden las interacciones célula-célula y célula entorno afectando la morfología, procesos de división y diferenciación, además de la expresión de genes y proteínas provocando la pérdida del fenotipo diverso y que muchas veces las condiciones de cultivo 2D seleccionen solo un tipo de célula [15, 34, 35], sin embargo, el panel presentado acá no basta para definir esto, es necesario incluir otros ensayos complementarios de expresión como RT-qPCR o Western blot para obtener resultados

más concretos, además sería útil e interesante evaluar la expresión de otros marcadores como aquellos asociados a una diferenciación luminal como AR, CK 8 y PSA o basal como CK 5, CK 14 y p63, puesto que las células basales también expresan CD44 [40], un estudio similar a esto que se plantea fue realizado por Cheaito K. *et al.* [35] donde se demostró la presencia de células luminales que expresaban CK 8, células basales que expresaban CK 5 y células con coexpresión para estos marcadores en algunas muestras de pacientes como en sus respectivos PDOs los cuales también presentaban positividad para los marcadores de troncalidad CD44 y CD49f. La positividad para los marcadores CD44 y CD133 demuestran que las células que conforman los PDOs caracterizados poseen características de CSC, estos marcadores fueron observados en más del 50% de los casos de CaP estudiados por Kalantari E. *et al.* [41] siendo mayor en los CaP de puntuación Gleason más baja mientras que en otro estudio se identificó una mayor intensidad de la expresión de CD44 y CD133 en muestras de grados Gleason medio [42], debido a esta heterogeneidad de resultados y a que las últimas investigaciones apuntan a las CSC como un blanco terapéutico eficaz para el tratamiento de CRPC [43, 44], se considera importante poder identificar estos marcadores para su estudio en muestras de pacientes y sus respectivos PDOs. Pese a que los marcadores de EMT y MDR se aprecian negativos en la técnica fluorescente, no se puede descartar la ausencia de estas características puesto que hay una amplia gama de proteínas implicadas en estos procesos, por ejemplo, en el proceso de EMT del CaP también están relacionadas los factores de transcripción Slug y Twist [45] mientras que en el caso de proteínas MDR se puede destacar a ABCG2 la cual se ha visto altamente expresada en otros estudios de CaP [46]. Tras demostrar positividad por parte de CD44 y CD133 es importante considerar en la caracterización otras moléculas como las recién mencionadas que también estén implicadas en los procesos de EMT y MDR [45, 46], ya que estos se encuentran íntimamente relacionados a la presencia de CSC, evidencia señala que el origen de las CSC puede generarse a partir del proceso de EMT y no por la transformación malignas de células madres prostáticas y viceversa, CSC pueden diferenciarse a células mesenquimales denominándose esta combinación de procesos como eje troncalidad-EMT [45], en el caso de MDR se ha observado que las CSC de CaP presentan una alta expresión de ABCG2 [46], este transportador está presente en biopsias de pacientes posterior a la ADT y su regulación positiva tras la privación de andrógenos en cultivo destacando que la población que expresa ABCG2 en la próstata presenta propiedades diferenciación y autorrenovación junto con favorecer la expulsión de agentes quimioterapéuticos como taxanos, mitoxantrona, doxorubicina e inhibidores de la tirosina quinasa y la mantención de la concentración de medicamentos bajo un nivel tóxico para la célula [47].

Respecto a la metodología para los ensayos de MTT los resultados observados en la figura 9 muestran sensibilidad por parte del cultivo primario y de los PDOs 316 a los fármacos observándose decaimiento de su viabilidad a medida que se aumentan las concentraciones de ellos, esto es relevante puesto que estudios han destacado el potencial de estos modelos para ser aplicados en la medicina personalizada creando perfiles de respuesta a fármacos en el CaP y otros cánceres [48, 49, 50], sin embargo, al comparar las viabilidades entre el cultivo primario y PDOs estas fueron similares demostrando una tendencia de viabilidad levemente superior por parte de los PDOs y sin diferencias significativas. Estos resultados sorprendieron puesto que estudios anteriores revelan que la estructura 3D otorga una sensibilidad reducida a los fármacos en comparación a su contraparte 2D. [32, 51, 52] Van Hemelryk *et al.* demostró la influencia de la estructura 3D al comparar la viabilidad de organoides ensamblados respecto a células PDO desensambladas ante los fármacos enzalutamida, acetato de abiraterona, docetaxel y cabazitaxel demostrando una menor sensibilidad al fármaco por parte de los PDOs [32]. Esta diferencia obtenida en los resultados presentados en este trabajo puede deberse a la metodología empleada, esta fue una de las más complejas de aplicar en el desarrollo de este trabajo de investigación, realizar los cultivos en Matrigel® demandó bastante tiempo puesto que se debía cultivar cada pocillo de manera individual y con mucha delicadeza por la pequeña área de trabajo en los pocillos de la placa de 96, esto complicó la reproducibilidad del ensayo, también es necesario estandarizar de forma precisa el cultivo de PDOs para pruebas farmacológicas prestando atención meticulosa en detalles técnicos como el andamio donde crecerán los PDOs, el número de células a cultivar, los tamaños y números las estructuras formadas, la concentración del fármaco y tiempo de exposición, además del tipo de ensayo a realizar [32], algunos de estos detalles se observaron durante el proceso de cultivo, por ejemplo, en la figura 5 se muestra que los PDOs varían en tamaño y esto también se interpola al número que crecen en los pocillos el cual también presenta variaciones por lo que aquellos puntos donde la viabilidad se vuelve más similar e incluso más baja que el cultivo 2D podría deberse a un menor número de estructuras 3D formadas. Los resultados obtenidos son un primer esbozo de la sensibilidad de los PDOs 316 ante los fármacos enzalutamida, acetato de abiraterona y docetaxel, es necesario poner atención a detalles dentro del protocolo de cultivo con PDOs, además de ampliar el número de repeticiones para obtener resultados significativos e incluir otros tiempos de mediciones de viabilidad celular, sumado a esto también se abre la posibilidad a probar combinaciones de estos fármacos puesto que se han centrado en dilucidar si el uso de combinaciones de estos y la inclusión de otros fármacos puede ayudar a obtener mejores resultados en los pacientes [53, 54].

Los protocolos, ensayos realizados y resultados obtenidos son unos de los primeros en cuanto a PDOs obtenidos a partir de cultivos primarios en el Laboratorio de Oncología Celular y Molecular de la Universidad de Chile, los protocolos de cultivo y colección de PDOs mostraron la generación efectiva de PDOs con CaP, su procesamiento hasta la obtención de cortes con su estructura conservada, la aplicación de IHQ cromogénica e IFI para la detección de marcadores, además de la realización de ensayos de viabilidad comúnmente usados como el ensayo de MTT. Esto deja abierta la posibilidad a seguir obteniendo PDOs a partir de cultivos primarios presentes en el laboratorio, de caracterizarlos en base a distintos marcadores y metodologías, además de realizar ensayos farmacológicos y mejorar los protocolos acá descritos con el fin de poder obtener mejores resultados y con ello contribuir y ser partícipes de la investigación en medicina personalizada.

8. Conclusión.

Los PDOs corresponden a modelos de cultivos 3D que permiten a las células que provienen del tumor del paciente interactuar entre sí y con su entorno generando estructuras tridimensionales las cuales conservan características fenotípicas y genotípicas del tumor de origen, esto los define como modelos que podrían ser mejores predictores a la respuesta de fármacos y relevantes dentro de la medicina personalizada.

Pese a las dificultades y desafíos que implicó el trabajo con cultivos 3D, se pudo cumplir con los objetivos propuestos: se lograron desarrollar PDOs a partir de cultivos primarios de tumores de pacientes con CaP mediante el desarrollo de dos metodologías de cultivo, el protocolo de desarrollo, colección y procesamiento de PDOs fue teniendo mejoras con el fin de obtener cortes estos con su estructura conservada, se pudo caracterizar estos PDOs en base a marcadores de CSC, EMT y MDR mediante IHQ cromogénica e IFI revelando positividad para los marcadores de troncalidad CD44 y CD133, además se logró evaluar la viabilidad celular en PDOs en presencia de enzalutamida, acetato de abiraterona y docetaxel a través de ensayos de MTT demostrando sensibilidad ante estos fármacos y una resistencia levemente mayor de los PDOs en comparación a su contraparte 2D. El cumplimiento de estos objetivos confirmó la hipótesis planteada. Pese a esto, los resultados obtenidos corresponden a primeras aproximaciones.

Este estudio desarrolló metodologías de cultivo, colección y procesamiento de PDOs eficaces estableciendo una base para el estudio mediante el modelo de PDOs de otros cultivos primario presentes en el laboratorio de Oncología Celular y Molecular de la Universidad de Chile contribuyendo con la potencial investigación en medicina personalizada.

9. Bibliografía:

1. Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. 2018 Sep; Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev.* 1;32(17-18):1105-1140. doi: 10.1101/gad.315739.118. PMID: 30181359; PMCID: PMC6120714.
2. Ittmann M. 2018 May; Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1;8(5):a030346. doi: 10.1101/cshperspect.a030346. PMID: 29038334; PMCID: PMC5932577.
3. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, Gillissen S, Van der Kwast T, Bristow RG. 2021 Feb 4; Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 7(1):9. doi: 10.1038/s41572-020-00243-0. PMID: 33542230.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. 2021 May; Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.*; 71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
5. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Observatory [Internet]. iarc.fr. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
6. Ministerio de salud de Chile (MINSAL). 2015 Nov; Guía Clínica AUGÉ CÁNCER DE PRÓSTATA en personas de 15 años y más. 2da edición. p16.
7. Sandhu S, Moore CM, Chiong E, Beltran H, Bristow RG, Williams SG. 2021 Sep. Prostate cancer. *Lancet.* 18;398(10305):1075-1090. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00950-8. Epub 2021 Aug 6. PMID: 34370973.
8. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. 2018 Dec 3; The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 8(12):a030361. doi: 10.1101/cshperspect.a030361. PMID: 29311132; PMCID: PMC6280714.
9. Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, Fanti S, Fossati N, Gandaglia G, Gillissen S, Grivas N, Grummet J, Henry AM, van der Kwast TH, Lam TB, Lardas M, Liew M, Mason MD, Moris L, Oprea-Lager DE, van der Poel HG, Rouvière O, Schoots IG, Tilki D, Wiegel T, Willemse PM, Cornford P. 2020 Nov 7; EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol.* 2021 Feb;79(2):243-262. doi: 10.1016/j.eururo.2020.09.042. PMID: 33172724.
10. van Leenders GJLH, Verhoef EI, Hollemans E. 2020 Sep 13. Prostate cancer growth patterns beyond the Gleason score: entering a new era of comprehensive tumour grading. *Histopathology.* 2020 Dec;77(6):850-861. doi: 10.1111/his.14214. PMID: 32683729; PMCID: PMC7756302.

11. Schatten H. 2018; Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies. *Adv Exp Med Biol.* ;1095:1-14. doi: 10.1007/978-3-319-95693-0_1. PMID: 30229546.
12. Zhou L, Zhang C, Zhang Y, Shi C. 2021 Sep 27. Application of Organoid Models in Prostate Cancer Research. *Front Oncol.* 11:736431. doi: 10.3389/fonc.2021.736431. PMID: 34646778; PMCID: PMC8504437.
13. Emmanouilidi A, Casari I, Gokcen Akkaya B, Maffucci T, Furic L, Guffanti F, Brogginini M, Chen X, Maxuitenko YY, Keeton AB, Piazza GA, Linton KJ, Falasca M. 2020 Jul 23. Inhibition of the Lysophosphatidylinositol Transporter ABCC1 Reduces Prostate Cancer Cell Growth and Sensitizes to Chemotherapy. *Cancers (Basel).* 12(8):2022. doi: 10.3390/cancers12082022. PMID: 32718079; PMCID: PMC7465469.
14. Vaddi PK, Stamnes MA, Cao H, Chen S. 2019 Sep 8. Elimination of SOX2/OCT4-Associated Prostate Cancer Stem Cells Blocks Tumor Development and Enhances Therapeutic Response. *Cancers (Basel).* 11(9):1331. doi: 10.3390/cancers11091331. PMID: 31500347; PMCID: PMC6769476.
15. Al Salhi Y, Sequi MB, Valenzi FM, Fuschi A, Martoccia A, Suraci PP, Carbone A, Tema G, Lombardo R, Cicione A, Pastore AL, De Nunzio C. 2023 Apr 24. Cancer Stem Cells and Prostate Cancer: A Narrative Review. *Int J Mol Sci.* 24(9):7746. doi: 10.3390/ijms24097746. PMID: 37175453; PMCID: PMC10178135.
16. Ryan CJ, Smith MR, de Bono JS, Molina A, Logothetis CJ, de Souza P, Fizazi K, Mainwaring P, Piulats JM, Ng S, Carles J, Mulders PF, Basch E, Small EJ, Saad F, Schrijvers D, Van Poppel H, Mukherjee SD, Suttman H, Gerritsen WR, Flaig TW, George DJ, Yu EY, Efsthathiou E, Pantuck A, Winkquist E, Higano CS, Taplin ME, Park Y, Kheoh T, Griffin T, Scher HI, Rathkopf DE; COU-AA-302 Investigators. 2013 Jan 10. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med.* 368(2):138-48. doi: 10.1056/NEJMoa1209096. Epub 2012 Dec 10. Erratum in: *N Engl J Med.* 2013 Feb 7;368(6):584. PMID: 23228172; PMCID: PMC3683570.
17. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, de Wit R, Mulders P, Chi KN, Shore ND, Armstrong AJ, Flaig TW, Fléchon A, Mainwaring P, Fleming M, Hainsworth JD, Hirmand M, Selby B, Seely L, de Bono JS; AFFIRM Investigators. 2012 Sep 27. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med.* 367(13):1187-97. doi: 10.1056/NEJMoa1207506. Epub 2012 Aug 15. PMID: 22894553.

18. Rizzo M. 2021 Jan. Mechanisms of docetaxel resistance in prostate cancer: The key role played by miRNAs. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 1875(1):188481. doi: 10.1016/j.bbcan.2020.188481. Epub 2020 Nov 17. PMID: 33217485.
19. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. 2017 Mar. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. 108(3):283-289. doi: 10.1111/cas.13155. PMID: 28064442; PMCID: PMC5378268.
20. Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, Chen Y, Clevers H. 2016 Feb. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc*. 11(2):347-58. doi: 10.1038/nprot.2016.006. Epub 2016 Jan 21. PMID: 26797458; PMCID: PMC4793718.
21. Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. 2019 Jan 20. Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells*. 8(1):74. doi: 10.3390/cells8010074. PMID: 30669516; PMCID: PMC6357050.
22. Castellón EA. 2019 May. Patient-derived organoids: New co-clinical model to predict treatment response in cancer? *Oral Dis*. 25(4):928-930. doi: 10.1111/odi.12988. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30281877.
23. Servant R, Garioni M, Vlajnic T, Blind M, Pueschel H, Müller DC, Zellweger T, Templeton AJ, Garofoli A, Maletti S, Piscuoglio S, Rubin MA, Seifert H, Rentsch CA, Bubendorf L, Le Magnen C. 2021 Aug. Prostate cancer patient-derived organoids: detailed outcome from a prospective cohort of 81 clinical specimens. *J Pathol*. 254(5):543-555. doi: 10.1002/path.5698. Epub 2021 Jun 2. PMID: 33934365; PMCID: PMC8361965.
24. Beshiri mL, Tice CM, Tran C, Nguyen HM, Sowalsky AG, Agarwal S, Jansson KH, Yang Q, McGowen KM, Yin J, Alilin AN, Karzai FH, Dahut WL, Corey E, Kelly K. 2018 Sep 1. A PDX/Organoid Biobank of Advanced Prostate Cancers Captures Genomic and Phenotypic Heterogeneity for Disease Modeling and Therapeutic Screening. *Clin Cancer Res*. 24(17):4332-4345. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0409. Epub 2018 May 10. PMID: 29748182; PMCID: PMC6125202.
25. Huang Z, Yu P, Tang J. 2020 Jun. Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model. *Onco Targets Ther*. 11;13:5395-5405. doi: 10.2147/OTT.S249756. PMID: 32606757; PMCID: PMC7295545.
26. Acikgoz E, Soner BC, Ozdil B, Guven M. 2021 Jul. CD133+/CD44+ prostate cancer stem cells exhibit embryo-like behavior patterns. *Acta*

- Histochem.123(5):151743. doi: 10.1016/j.acthis.2021.151743. Epub 2021 Jun 20. PMID: 34157581.
27. Yang J, Aljitiawi O, Van Veldhuizen P. 2022 Nov 5. Prostate Cancer Stem Cells: The Role of CD133. *Cancers (Basel)*. 14(21):5448. doi: 10.3390/cancers14215448. PMID: 36358865; PMCID: PMC9656005.
 28. Vaddi PK, Stamnes MA, Cao H, Chen S. 2019 Sep 8. Elimination of SOX2/OCT4-Associated Prostate Cancer Stem Cells Blocks Tumor Development and Enhances Therapeutic Response. *Cancers (Basel)*. 11(9):1331. doi: 10.3390/cancers11091331. PMID: 31500347; PMCID: PMC6769476.
 29. López-Moncada F, Torres MJ, Lavanderos B, Cerda O, Castellón EA, Contreras HR. 2022 May 24. SPARC Induces E-Cadherin Repression and Enhances Cell Migration through Integrin $\alpha\beta 3$ and the Transcription Factor ZEB1 in Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 23(11):5874. doi: 10.3390/ijms23115874. PMID: 35682554; PMCID: PMC9180154.
 30. Odero-Marah V, Hawsawi O, Henderson V, Sweeney J. 2018 Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol*. 1095:101-110. doi: 10.1007/978-3-319-95693-0_6. PMID: 30229551.
 31. Grabinger T, Luks L, Kostadinova F, Zimberlin C, Medema JP, Leist M, Brunner T. 2014 May 15. Ex vivo culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy. *Cell Death Dis*. 5(5):e1228. doi: 10.1038/cddis.2014.183. PMID: 24832600; PMCID: PMC4047863.
 32. Van Hemelryk A, Mout L, Erkens-Schulze S, French PJ, van Weerden WM, van Royen ME. 2021 Oct 22. Modeling Prostate Cancer Treatment Responses in the Organoid Era: 3D Environment Impacts Drug Testing. *Biomolecules* 11(11):1572. doi: 10.3390/biom11111572. PMID: 34827570; PMCID: PMC8615701.
 33. Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquinta PJ, Karthaus WR, Gopalan A, Dowling C, Wanjala JN, Undvall EA, Arora VK, Wongvipat J, Kossai M, Ramazanoglu S, Barboza LP, Di W, Cao Z, Zhang QF, Sirota I, Ran L, MacDonald TY, Beltran H, Mosquera JM, Touijer KA, Scardino PT, Laudone VP, Curtis KR, Rathkopf DE, Morris MJ, Danila DC, Slovin SF, Solomon SB, Eastham JA, Chi P, Carver B, Rubin MA, Scher HI, Clevers H, Sawyers CL, Chen Y. 2014 Sep 4. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*. 2014 Sep 25;159(1):176-187. doi: 10.1016/j.cell.2014.08.016. PMID: 25201530; PMCID: PMC4237931.
 34. Obreque J, Vergara-Gómez L, Venegas N, Weber H, Owen GI, Pérez-Moreno P, Leal P, Roa JC, Bizama C. 2023 Dec 2. Advances towards the use of

- gastrointestinal tumor patient-derived organoids as a therapeutic decision-making tool. *Biol Res.* 56(1):63. doi: 10.1186/s40659-023-00476-9. PMID: 38041132; PMCID: PMC10693174
35. Cheaito K, Bahmad HF, Hadadeh O, Msheik H, Monzer A, Ballout F, Dagher C, Telvizian T, Saheb N, Tawil A, El-Sabban M, El-Hajj A, Mukherji D, Al-Sayegh M, Abou-Kheir W. 2022 Jan. Establishment and characterization of prostate organoids from treatment-naïve patients with prostate cancer. *Oncol Lett.* 23(1):6. doi: 10.3892/ol.2021.13124. Epub 2021 Nov 5. PMID: 34820005; PMCID: PMC8607232.
 36. Chua CW, Shibata M, Lei M, Toivanen R, Barlow LJ, Bergren SK, Badani KK, McKiernan JM, Benson MC, Hibshoosh H, Shen MM. 2014 Oct. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat Cell Biol.* 16(10):951-61, 1-4. doi: 10.1038/ncb3047. Epub 2014 Sep 21. PMID: 25241035; PMCID: PMC4183706.
 37. Aisenbrey EA, Murphy WL. 2020 May 27. Synthetic alternatives to Matrigel®. *Nat Rev Mater.* 2020 Jul;5(7):539-551. doi: 10.1038/s41578-020-0199-8. PMID: 32953138; PMCID: PMC7500703.
 38. Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. 2018 Jun. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 14(4):910-919. doi: 10.5114/aoms.2016.63743. Epub 2016 Nov 18. PMID: 30002710; PMCID: PMC6040128.
 39. Nath S, Devi GR. 2016 Jul. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther.* 163:94-108. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013. Epub 2016 Apr 8. PMID: 27063403; PMCID: PMC4961208.
 40. Collins AT, Maitland NJ. 2006 May 2. Prostate cancer stem cells. *Eur J Cancer.* 2006 Jun;42(9):1213-8. doi: 10.1016/j.ejca.2006.01.037. PMID: 16632344.
 41. Kalantari E, Asgari M, Nikpanah S, Salarieh N, Asadi Lari MH, Madjd Z. 2017 Jan 12. Co-Expression of Putative Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD133 in Prostate Carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2017 Oct;23(4):793-802. doi: 10.1007/s12253-016-0169-z. PMID: 28083789.
 42. Castellón EA, Valenzuela R, Lillo J, Castillo V, Contreras HR, Gallegos I, Mercado A, Huidobro C. 2012. Molecular signature of cancer stem cells isolated from prostate carcinoma and expression of stem markers in different Gleason grades and metastasis. *Biol Res.* 45(3):297-305. doi: 10.4067/S0716-97602012000300011. PMID: 23283439.

43. Kushwaha PP, Verma S, Kumar S, Gupta S. 2022 Jun 1. Role of prostate cancer stem-like cells in the development of antiandrogen resistance. *Cancer Drug Resist.* 5(2):459-471. doi: 10.20517/cdr.2022.07. PMID: 35800367; PMCID: PMC9255247.
44. Koukourakis IM, Platoni K, Kouloulias V, Arelaki S, Zygogianni A. 2023 Oct 4. Prostate Cancer Stem Cells: Biology and Treatment Implications. *Int J Mol Sci.* 24(19):14890. doi: 10.3390/ijms241914890. PMID: 37834336; PMCID: PMC10573523.
45. Castellón EA, Indo S, Contreras HR. 2022 Nov 29. Cancer Stemness/Epithelial-Mesenchymal Transition Axis Influences Metastasis and Castration Resistance in Prostate Cancer: Potential Therapeutic Target. *Int J Mol Sci.* 23(23):14917. doi: 10.3390/ijms232314917. PMID: 36499245; PMCID: PMC9736174.
46. Castillo V, Valenzuela R, Huidobro C, Contreras HR, Castellon EA. 2014 Jun 27. Functional characteristics of cancer stem cells and their role in drug resistance of prostate cancer. *Int J Oncol.* 2014 Sep;45(3):985-94. doi: 10.3892/ijo.2014.2529. PMID: 24990514; PMCID: PMC4121425.
47. Sabnis NG, Miller A, Titus MA, Huss WJ. 2016 Nov 17. The Efflux Transporter ABCG2 Maintains Prostate Stem Cells. *Mol Cancer Res.* 15(2):128-140. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0270-T. PMID: 27856956; PMCID: PMC5290130
48. Ooft SN, Weeber F, Dijkstra KK, McLean CM, Kaing S, van Werkhoven E, Schipper L, Hoes L, Vis DJ, van de Haar J, Prevoo W, Snaebjornsson P, van der Velden D, Klein M, Chalabi M, Boot H, van Leerdam M, Bloemendal HJ, Beerepoot LV, Wessels L, Cuppen E, Clevers H, Voest EE. 2019 Oct 9. Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci Transl Med.* 11(513):eaay2574. doi: 10.1126/scitranslmed.aay2574. PMID: 31597751.
49. Wensink GE, Elias SG, Mullenders J, Koopman M, Boj SF, Kranenburg OW, Roodhart JmL. 2021 Apr 12. Patient-derived organoids as a predictive biomarker for treatment response in cancer patients. *NPJ Precis Oncol.* 5(1):30. doi: 10.1038/s41698-021-00168-1. PMID: 33846504; PMCID: PMC8042051.
50. Karkampouna S, La Manna F, Benjak A, Kiener M, De Menna M, Zoni E, Grosjean J, Klima I, Garofoli A, Bolis M, Vallerga A, Theurillat JP, De Filippo MR, Genitsch V, Keller D, Booij TH, Stirnimann CU, Eng K, Sboner A, Ng CKY, Piscuoglio S, Gray PC, Spahn M, Rubin MA, Thalmann GN, Kruihof-de Julio M. 2021 Feb 18. Patient-derived xenografts and organoids model therapy response in prostate cancer. *Nat Commun.* 12(1):1117. doi: 10.1038/s41467-021-21300-6. PMID: 33602919; PMCID: PMC7892572.
51. Chambers KF, Mosaad EM, Russell PJ, Clements JA, Doran MR. 2014 Nov 7. 3D Cultures of prostate cancer cells cultured in a novel high-throughput culture

- platform are more resistant to chemotherapeutics compared to cells cultured in monolayer. *PLoS One*. 9(11):e111029. doi: 10.1371/journal.pone.0111029. Erratum in: *PLoS One*. 2015;10(4):e0125641. PMID: 25380249; PMCID: PMC4224379.
52. Mosaad E, Chambers K, Futrega K, Clements J, Doran MR. 2018 May 24. Using high throughput microtissue culture to study the difference in prostate cancer cell behavior and drug response in 2D and 3D co-cultures. *BMC Cancer*. 18(1):592. doi: 10.1186/s12885-018-4473-8. PMID: 29793440; PMCID: PMC5968610.
53. Efstathiou E, Titus M, Wen S, Troncso P, Hoang A, Corn P, Prokhorova I, Araujo J, Dmuchowski C, Melhem-Bertrandt A, Patil S, Logothetis CJ. 2019 Apr 20. Enzalutamide in Combination with Abiraterone Acetate in Bone Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer Patients. *Eur Urol Oncol*. 2020 Feb;3(1):119-127. doi: 10.1016/j.euo.2019.01.008. PMID: 31412017; PMCID: PMC7204265.
54. Chen MK, Liang ZJ, Luo DS, Xue KY, Liao DY, Li Z, Yu Y, Chen ZS, Zhao SC. 2022 Feb 17. Abiraterone, Orteronel, Enzalutamide and Docetaxel: Sequential or Combined Therapy? *Front Pharmacol*. 13:843110. doi: 10.3389/fphar.2022.843110. PMID: 35250590; PMCID: PMC8891580.