
**Toxicidad inducida por R2--
viniferina en células de cáncer de
mama HCC-1954: estudio en
cultivos 2D y 3D**

Trabajo Fin de Máster

Máster en Investigación Biomédica

Curso 2021-2022

Autora: Claudia Arguiñano Holguín

Directores: José Ignacio Ruiz Sanz y Maria Begoña Ruiz Larrea

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1. Estilbeno R2-viniferina	4
3.2. Cultivo celular en monocapa.....	5
3.3. Análisis de la citotoxicidad en cultivos monocapa	6
3.4. Cultivo celular en mamosferas	6
3.5. Análisis de crecimiento de las mamosferas y de su morfología externa.....	7
3.6. Determinaciones de glucosa y lactato	7
3.7. Análisis histoquímico de las mamosferas	7
3.8. Análisis inmunocitoquímico de las mamosferas	9
3.9. Análisis estadístico	9
4. RESULTADOS	10
4.1. Citotoxicidad	
A) Monocapas.....	10
B) Mamosferas	10
4.2. Estudio metabólico	
A) Monocapas.....	16
B) Mamosferas	17
5. DISCUSIÓN	18
6. CONCLUSIONES	20
ABREVIATURAS	22
BIBLIOGRAFÍA	23

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es el conjunto de múltiples enfermedades distintas que se caracterizan por el crecimiento y la proliferación celular descontrolada, propiedades que vienen dadas por alteraciones en el DNA como mutaciones, reordenamientos en los cromosomas o cambios epigenéticos (como la hipermetilación de promotores que induce la activación de oncogenes y la inhibición de genes supresores de tumores). Es heterogéneo y multifactorial, siendo las diferentes propiedades biológicas la causa principal del elevado índice de fracaso en los tratamientos médicos y de la elevada mortalidad mundial [1].

Según las cifras de 2022 aportadas por la Sociedad Española de Oncología Médica, se han registrado alrededor de 18,1 millones de nuevos casos en el mundo en 2020 y se estima que la incidencia en 2040 se incremente un 49,2%. Los tumores diagnosticados con mayor incidencia a nivel mundial en el año 2020 fueron los de mama, pulmón, colon y recto, próstata y estómago, siendo el cáncer de mama uno de los más frecuentes. Así, se estima que en 2022 se diagnosticarán en España 34.650 nuevos casos de cáncer de mama (el más frecuentemente diagnosticado en mujeres) [2].

El cáncer de mama se define como la neoplasia maligna celular de los tejidos mamarios. Durante muchos años se ha clasificado según los criterios de la Organización Mundial de la Salud de 1982 [3,4], fundamentándose en la estadificación TNM (origen y tamaño del Tumor, invasión de los Nódulos periféricos y Metástasis) y en aspectos histopatológicos [4]. Según esta clasificación, el cáncer de mama se divide en dos grandes grupos: (1) *in situ* e (2) invasivo, y estos a su vez se subdividen en los subtipos de carcinoma ductal y carcinoma lobulillar [5]. Sin embargo, el tratamiento clínico en base a esta clasificación no es preciso, habiéndose descrito casos de sobretreatmento o ausencia de efectos beneficiosos [6]. En los últimos años ha habido un avance exponencial en los estudios moleculares, con los cuales se han establecido diversos biomarcadores característicos del cáncer. Estos avances han permitido aplicar las terapias anticancerígenas utilizando los biomarcadores como dianas terapéuticas, incrementando su eficacia. Desde los estudios moleculares pioneros encabezados por Charles M. Perou a principios del siglo XXI, se han estudiado mediante micromatrices los perfiles genéticos tanto de las células sanas como de las cancerígenas del tejido mamario [7-11]. Los resultados de estas investigaciones han generado un conjunto de biomarcadores específicos en el cáncer de mama y como consecuencia actualmente la clasificación básica y tradicional se complementa con la molecular, permitiendo así pronosticar y tratar a las pacientes con mayor efectividad y éxito [12].

Un *biomarcador* se define como una característica molecular que puede medirse y evaluarse de manera objetiva como un indicador de un proceso biológico (tanto normal como patológico) o de una respuesta fisiológica (a un fármaco o una intervención terapéutica) [13]. A pesar del amplio rango de biomarcadores que se han correlacionado con el cáncer de mama (oncogenes, genes supresores de tumores, moléculas de adhesión, activadores o inhibidores de proteasas, etc), actualmente solo tres de ellos se tienen en cuenta en las prácticas clínicas, ya que se pueden aplicar a más del 75% de los casos: los receptores hormonales de estrógenos (ER), de progesterona (PR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) [14]. Según la presencia o ausencia de dichos receptores, el cáncer de mama se clasifica molecularmente como luminal (A o B), ductal y triple negativo o basal (Tabla 1) [5, 15].

Tipo molecular de cáncer de mama	ER y PR	HER2
Luminal A	+	-
Luminal B	+/-	-/+
HER2	+/-	+
Triple negativo (TNBC)/Basal	-	-

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama. + positivo, - negativo, +/- positivo predominante, -/+ negativo predominante

Conocer el perfil molecular del tumor ofrece la posibilidad de desarrollar tratamientos que inhiban dichos mecanismos tumorales potenciadores en cualquiera de las fases cancerígenas (iniciación, crecimiento y propagación del cáncer) [15].

Durante muchos años la fase experimental o preclínica en la investigación de nuevos tratamientos frente al cáncer se ha desarrollado *in vitro* en modelos de cultivo celular monocapa o de dos dimensiones (2D). Sin embargo, muchos de los tratamientos que resultaron positivos *in vitro* (en términos de citotoxicidad, eficacia y seguridad) mostraron efectos contrarios en la fase *in vivo*, impidiendo la continuación del estudio desde la fase experimental a la clínica e, incluso, algunos de los tratamientos que pudieron avanzar a la clínica no tuvieron efecto alguno en pacientes. Esto se debe a que los modelos 2D no simulan un microambiente tumoral real en aspectos fisiológicos como la proliferación, diferenciación, interacción celular u otros estímulos externos [16]. Gracias a los estudios pioneros dirigidos por Alison Aboutt en 2003, se ha conseguido recrear tumores sólidos por medio de cultivos tridimensionales (3D) que simulan dichas condiciones patofisiológicas, influyendo en el uso de esta nueva herramienta experimental [17].

Los cultivos 3D suponen un modelo *in vitro* ideal para el estudio de los efectos citotóxicos de nuevos agentes antitumorales, ya que recrean la estructura de un tejido *in vivo*, simulando las condiciones tumorales como el microambiente (hipoxia, nutrientes, factores de

crecimiento, etc), barreras biológicas e interacciones celulares. Lo que se pretende con la continua sofisticación de estos modelos 3D es conseguir los mismos resultados que en *in vivo* para que en un futuro no exista la necesidad de experimentar con modelos animales. Los posibles beneficios serían múltiples en aspectos económicos, de biocompatibilidad, éticos y de tiempo [16]. Sin embargo, la comunidad científica aún está muy lejos de conseguirlo. Por ello, en las últimas décadas se han desarrollado diferentes tipos de cultivos en 3D: (1) esferoides tumorales multicelulares o *multicelular tumor spheroids (MCTS)*, (2) 3D *scaffolds* prefabricados, (3) tumores incluidos en dispositivos chip o microfluidos y (4) bioimpresión en 3D. Dentro de esta gran variedad, los MCTS son los más usados en los proyectos de investigación de nuevos tratamientos, principalmente por la sencillez y el bajo coste económico. Se han descrito diversas técnicas para la recreación de dichos esferoides, como, por ejemplo, los cultivos en suspensión estática, en gota colgante, por medio de biorreactores, campos magnéticos o inclusión en geles. Además, dependiendo de la composición celular de los MCTS pueden ser homoesferoides (formado por una única línea celular tumoral) o heteroesferoides (esferoides tumorales en co-cultivo con otros tipos celulares) [18,19].

El descubrimiento de nuevos tratamientos anticancerígenos no invasivos es uno de los mayores puntos de interés en los que gira la investigación biomédica, siendo los antioxidantes naturales unos de los que más se están estudiando actualmente [20], especialmente los polifenoles [21]. Los polifenoles son compuestos naturales del metabolismo de las plantas, cuya función principal es la protección ante cualquier agente dañino (radiación UV, agentes patógenos, lesiones provocadas por otros animales, etc) [22]. Existe una gran variedad de polifenoles en la naturaleza que han demostrado un gran beneficio en la salud humana [23], siendo los estilbenos el grupo con mejores resultados en tratamientos anticancerígenos [24].

Los estilbenos se caracterizan por la presencia de uno o varios anillos aromáticos y de un grupo 1,2-difeniletileno. Están biodisponibles en muchas de las frutas de consumo humano [25], siendo la uva (*Vitis vinifera*) la que mayor porcentaje aporta en la dieta [26]. Dentro de este grupo de compuestos naturales, destaca el monómero resveratrol, ampliamente estudiado y para el cual se ha descrito que presenta efectos beneficiosos en un amplio espectro de enfermedades humanas (diabetes, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, infecciones virales como el SARS-CoV-2, cáncer, etc.) [27, 28]. Se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos para estudiar el efecto anticancerígeno de este compuesto, habiéndose obtenido resultados dispares y no concluyentes que dependen del tipo de cáncer. Aún queda mucho por investigar sobre las acciones del resveratrol frente al cáncer. Esta molécula genera una gran atracción científica y clínica, y también ha despertado el interés por sus derivados oligoméricos [29].

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, se caracterizó el efecto tóxico de diferentes oligoestilbenoides naturales extraídos de la vid en líneas celulares de hepatoma humano en un modelo bidimensional o monocapa. Los resultados mostraron que la R2-viniferina fue el estilbenoide citotóxico más potente [30].

Nuestra hipótesis es que la respuesta de las células tumorales a la R2-viniferina difiere entre un modelo de cultivo bidimensional o monocapa y un modelo de esferoide o tridimensional.

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster es caracterizar las mamosferas obtenidas según un protocolo desarrollado en nuestro laboratorio a partir de la línea celular de cáncer de mama humano HCC-1954 y comparar los efectos citotóxicos de la R2-viniferina entre ambos modelos de cultivo: monocapa (2D) y mamosfera (3D).

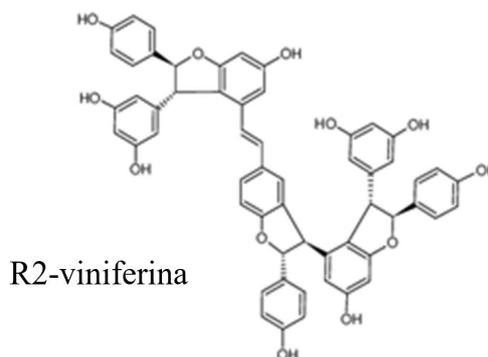
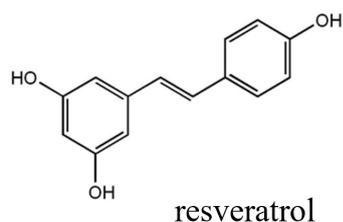
Para alcanzar dicho objetivo principal, se van a abordar los siguientes objetivos operativos:

- 1) Analizar el efecto citotóxico (viabilidad celular) de la R2-viniferina en cultivos 2D.
- 2) Caracterizar las mamosferas derivadas de la línea celular HCC-1954 en condiciones basales y después del tratamiento con R2-viniferina. Se analizará: a) el tamaño y la morfología, mediante análisis de imagen, b) las características histoquímicas de las mamosferas en cortes de parafina, y c) la organización estructural de las células que integran la mamosfera, mediante análisis inmunocitoquímico y microscopía confocal
- 3) Analizar el efecto de la R2-viniferina sobre el consumo de glucosa y la producción de lactato, como parámetros indicativos de función metabólica, en los dos modelos de cultivo: monocapa y mamosfera
- 4) A partir de los resultados obtenidos se extraerán las conclusiones del trabajo

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estilbeno R2-viniferina

El estilbenoide R2-viniferina es un compuesto natural procedente de la vid (*Vitis vinifera*), extraído, purificado y caracterizado por el grupo liderado por el profesor Tristan Richard (Universidad de Burdeos), con el que el nuestro grupo de investigación mantiene una estrecha colaboración. La R2-viniferina es un oligómero estilbenoide resultante de la condensación de 4 unidades de resveratrol.



Para los tratamientos celulares la R2-viniferina se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO).

3.2. Cultivo celular en monocapa

Se ha empleado la línea celular humana HCC-1954 (American Type Culture Collection) derivada de carcinoma ductal invasivo. Se caracteriza por la sobreexpresión de HER2/neu (receptor de proteína tirosinaquinasa erbB-2) y ausencia de receptores hormonales, tanto de estrógenos como de progesterona [31]. Los cultivos se incuban en frascos de 75 cm² (Corning) en medio de cultivo RPMI-1640 sin rojo fenol (Sigma), suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) (Linus), disolución antibiótica (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL estreptomycin) (Sigma), 2 mM de glutaMAX (Gibco), 3,7g/L de HCO₃Na, 10 mM HEPES (Sigma) en incubador a 37°C, y atmósfera de 5%CO₂ y 95% de humedad relativa.

Para los tratamientos con R2-viniferina, las células HCC-1954 se siembran en placas de 96 pocillos a una densidad de 3x10³ células/pocillo 24 h antes de la adición del estilbenoide (0-40 µM) (Figura 1).

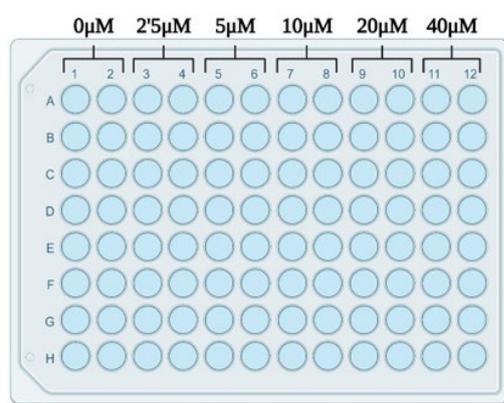


Figura 1. Placa de tratamiento

Las incubaciones se prolongan hasta 72 h, registrándose el crecimiento y reservando el medio condicionado cada 24 h (Figura 2). El control es suplementado con 0,02% DMSO, que es el vehículo en que se disuelve la R2-viniferina. Como control de progreso del cultivo en el

experimento se incluye una placa de referencia (tiempo T=0) que se retira a las 24 h de la siembra.

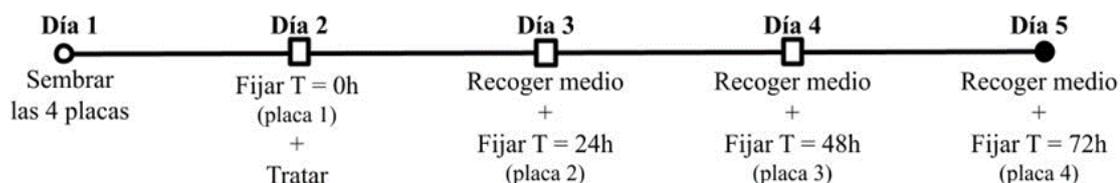


Figura 2. Esquema de la cronología de los tratamientos de los cultivos en monocapa.

3.3. Análisis de la citotoxicidad en cultivos monocapa

La valoración del efecto citotóxico de la R2-viniferina se aborda mediante la tinción con cristal violeta [32]. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se recogen muestras de medio para el posterior análisis de glucosa consumida y lactato producido, y las células adheridas se fijan con formaldehído al 4% durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Se retira el FA, se lavan las células fijadas con PBS y se añade el cristal violeta al 0,25%, incubándose durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, se lavan las placas con agua corriente. Las placas teñidas y secas se diluyen con ácido acético al 33% y se registra su absorbancia a una longitud de onda de 590 nm en lector de placas (Synergy HT BioTek, Winooski, VY, Estados Unidos). Los valores que se obtienen se normalizan respecto al valor registrado para la placa a tiempo T=0.

3.4. Cultivo celular en mamosferas

Para la formación de los esferoides se emplea la técnica de suspensión estática con fondo no adherente; es decir, se cubren los fondos de la placa de 96 pocillos con agarosa al 1% para impedir la adhesión celular. Con la agarosa solidificada, se siembran las células HCC-1954 a una densidad de 3×10^3 células/pocillo y se incuban a 37°C, en atmósfera de 5% CO₂ y 95% de humedad relativa durante siete días con el fin de formar las mamosferas. En cada pocillo se genera una mamosfera que es observada al microscopio y su imagen calibrada queda digitalizada (Olympus IX71, cámara Olympus DP71). Ese día, tras la captura de imágenes, se recogen muestras del medio condicionado para las determinaciones de glucosa consumida y de lactato producido, y los esferoides son tratados con concentraciones crecientes (0-40 µM) de R2-viniferina (0,02% DMSO en el caso de no adición del estilbenoide). Transcurridas 72 h de tratamiento, se repite el proceso fotográfico y de recogida de medio, para finalizar con la fijación de las mamosferas con FA hasta su utilización para los análisis inmunohistoquímicos e inmunocitoquímicos (Figura 3).

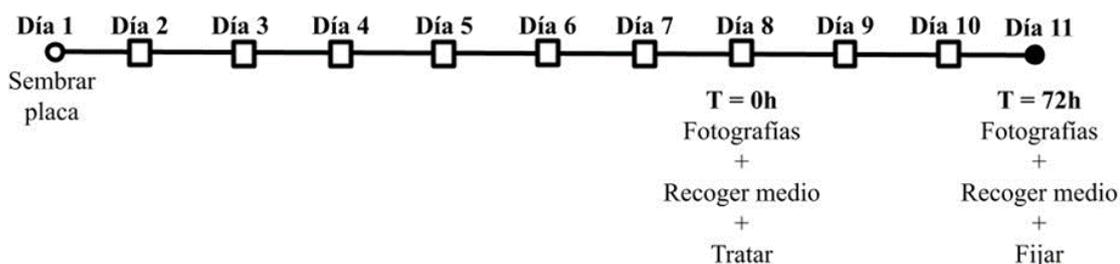


Figura 3. Esquema de la cronología de los tratamientos de los cultivos en mamosferas.

3.5. Análisis del crecimiento de las mamosferas y de su morfología externa

El tamaño de las mamosferas y sus rasgos morfológicos externos se determinan mediante análisis de las imágenes digitalizadas utilizando el programa informático *ImageJ (Fiji)* (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Se computa como parámetro de tamaño el *área*, de la que se deriva su radio (R) y el volumen (V) correspondiente al esferoide de radio R. Como descriptores de la morfología de la mamosfera se determina la *circularidad* y la *solidez*. Dado que de una misma mamosfera se digitalizan dos imágenes (a tiempo T=0 y al finalizar las 72 h de tratamiento) se puede hacer seguimiento de los parámetros anteriormente mencionados.

3.6. Determinaciones de glucosa y lactato

La determinación de glucosa y lactato, moléculas clave del metabolismo energético, se realiza mediante reacciones enzimáticas acopladas utilizando kits colorimétricos comerciales (Spinreact). Las absorbancias de las muestras del medio recogidas a los distintos tiempos se miden a una longitud de onda de 505 nm en lector de placas (Synergy HT BioTek, Winooski, VY, Estados Unidos). Se construyen rectas patrón con concentraciones conocidas de cada uno de los metabolitos, a partir de las cuales se transforman las absorbancias de las muestras en cantidades de glucosa y lactato.

3.7. Análisis histoquímico de las mamosferas

La preparación de los esferoides para el estudio histoquímico requiere su previa inclusión en parafina. Inicialmente, una vez lavado el esferoide previamente fijado en formaldehído, es depositado individualmente en una rejilla (Microsette I – 6 Compartiments Blue, *Simport Scientific*) y se tiñe 5 s con cristal violeta al 0,25%. La deshidratación se lleva a cabo de manera manual en alcoholes de graduación ascendente (50-100%), benzoato de metilo y citrosol, finalizando el proceso con la inclusión en parafina líquida a 60°C (Tabla 2).

	Reactivo	Tiempo	Número de veces
Fase I Fuera de la campana	Etanol 50%	1'	1
	Etanol 96%	30'	1
	Etanol 96%	15'	1
	Etanol 100%	15'	3
Fase II Dentro de la campana	Benzoato de metilo	1'	2
	Citrosol	45'	
Fase III Incubación a 60°C	Parafina líquida	30'	2

Tabla 2. Protocolo para el proceso de deshidratación previa a la inclusión en parafina

Los bloques de parafina son seccionados con microtomo, obteniéndose cortes de las mamíferas individuales de 4 µm de grosor. La preparación depositada sobre un portaobjetos se deja secar a 37°C durante 24 horas para su posterior tinción con hematoxilina y eosina (Tabla 3). Las muestras son observadas en el microscopio Olympus IX71 a diferentes aumentos (4x, 10x y 20x) y digitalizadas las imágenes calibradas con el software informático Cell^B .

Reactivo	Tiempo	Número de veces
Citrosol	10'	2
Citrosol	5'	1
Alcohol 100%	10'	1
Alcohol 96%	10'	1
Alcohol 96%	10'	1
Alcohol 70%	10'	1
Alcohol 50%	10'	1
Agua corriente del grifo	5'	1
Hematoxilina Harris	2'30''	1
Agua corriente del grifo	5'	1
Agua clorhídrica 0,3%	3''	1
Agua corriente del grifo	5'	1
Eosina	25'	1
Agua corriente del grifo	5'	1
Alcohol 50%	10'	1
Alcohol 70%	10'	1
Alcohol 96%	10'	1

Alcohol 100%	10'	2
Alcohol 100%: Citrosol 1:1	10'	1
Citrosol	5'	3

Tabla 3. Protocolo de tinción con hematoxilina-eosina

3.8. Análisis inmunocitoquímico de las mamosferas

Las mamosferas fijadas con formaldehído al 4% se lavan 3 veces con PBS (5 min/lavado) y se permeabilizan con TBS 10 mM pH 7,4/Tritón X-100 0,1% durante 5 min. Posteriormente se lavan 3 veces con TBS 10 mM (5min/lavado) y se bloquean durante 1 h a temperatura ambiente con 10% de SBF en TBS 10 mM. Para la detección de la proteína PON2 y de la proteína mitocondrial ATPVA, se adicionan los anticuerpos primarios diluidos en 5% de SBF en TBS 10 mM anti-PON2 (R&D Systems, dilución 1:100) y anti-ATPVA (Abcam, dilución 1:1000) y las muestras se incuban durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las muestras son lavadas 3 veces con TBS 10 mM y se incuban durante 1 h en oscuridad y temperatura ambiente con los apropiados anticuerpos secundarios (dilución 1:200 en 5% SBF en TBS 10 mM) conjugados a Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 633. La detección de la estructura del citoesqueleto se aborda marcando la actina con faloidina, para lo cual se incuba la preparación con faloidina conjugada con Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, dilución 1:100) durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente las preparaciones se lavan TBS 10 mM y se incuban con DAPI (5 µg/mL) para la detección de los núcleos celulares durante 10 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. La muestra queda montada en un portaobjetos utilizando glycergel sobre el que se deposita un cubreobjetos. Finalmente, se observan las preparaciones y se fotografían en el microscopio confocal del SGIker de Microscopía Analítica de la UPV/EHU.

3.9. Análisis estadístico

Para la recopilación, ordenación y transformación de los datos experimentales, y sus representaciones gráficas, se ha utilizado la hoja de cálculo Excel 2016. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics 24). Los datos numéricos mostrados corresponden a la media \pm error estándar (ES) de la media de réplicas biológicas de al menos $n \geq 3$. Para la comparación de medias se utilizaron las pruebas estadísticas *t* de Student, tanto para muestras pareadas como no pareadas, y test ANOVA de un factor con contrastes *posthoc*. En todos los casos se consideró $p < 0,05$ como límite de significación estadística.

4. RESULTADOS

En este proyecto se ha estudiado el efecto citotóxico de la R2-viniferina en la línea celular humana de cáncer de mama HCC-1954 en dos modelos de cultivo: A) monocapa y B) mamosfera.

4.1. Citotoxicidad

A) Monocapa

La proliferación celular en el modelo 2D se midió tras 24, 48 y 72 h de concentraciones crecientes de tratamiento por medio de tinción con cristal violeta (Figura 4).

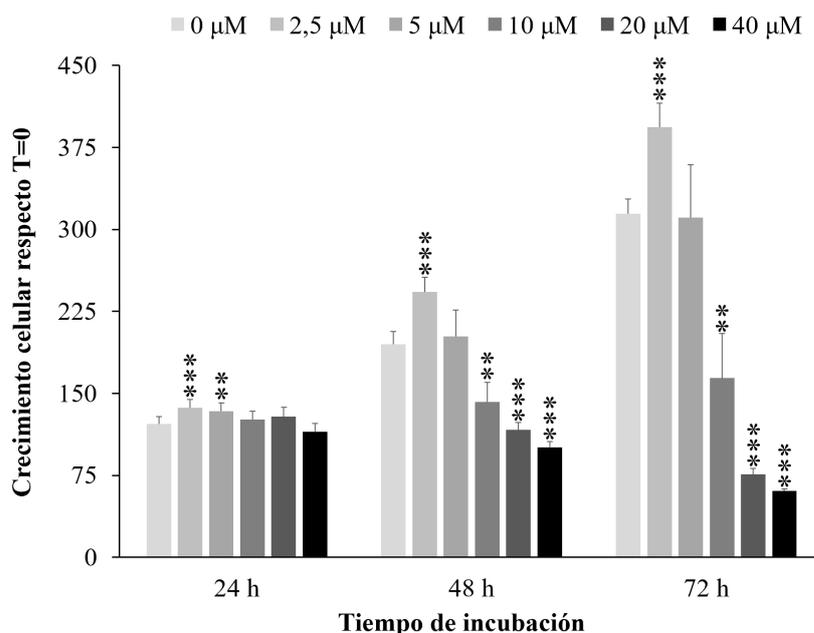


Figura 4. Efecto de la R2-viniferina sobre el crecimiento de células HCC-1954 en cultivos en monocapa. Se indican las concentraciones de R2-viniferina ensayadas. Los datos se normalizaron respecto al valor a tiempo 0. Los resultados son la media + EE para n=8 experimentos. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0.001, diferente del control al mismo tiempo.

La R2-viniferina ejerce un efecto bifásico. Así, a la concentración más baja (2,5 μM) fue proliferativo, mientras que a concentraciones mayores provocó la muerte celular, siendo el efecto significativo desde la concentración de 10 μM a 48 y 72 h.

B) Mamosfera

El protocolo para la formación de mamosferas derivadas de células HCC-1954 había sido desarrollado en nuestro laboratorio. Brevemente, como se describe en Materiales y Métodos, las células se siembran en placas de 96 pocillos recubiertas con agarosa al 1% en medio RPMI y se mantienen en incubador de CO₂ durante 7 días. Este protocolo ha demostrado la formación de mamosferas regulares y repetitivas, como se muestran en la Figura 5.

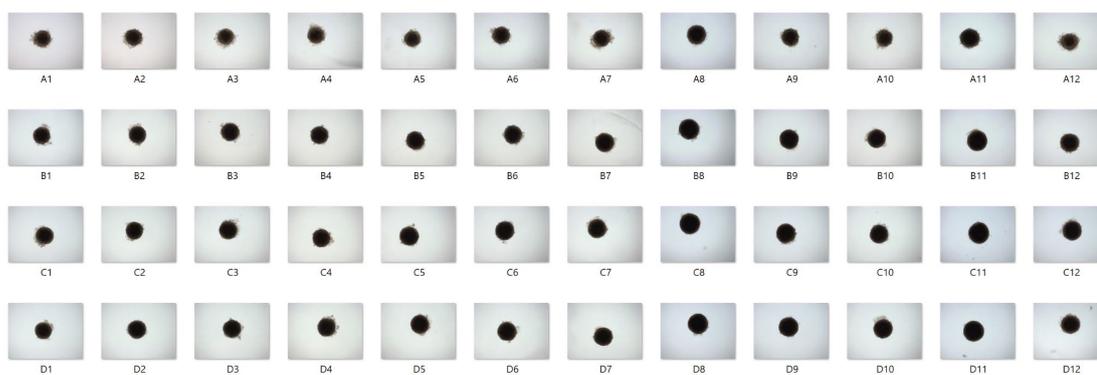


Figura 5. Mamosferas derivadas de la línea celular humana HCC-1954. Cada imagen corresponde a una mamosfera obtenida en cada pocillo. Se muestra un total de 48 esferoides en una única placa.

A continuación, mediante análisis de imagen, determinamos parámetros relacionados con el tamaño (área, radio, volumen) y la morfología (circularidad y solidez) de los esferoides en condiciones basales (tiempo 0) y después del tratamiento con R2-viniferina (72 h). En la Tabla 4 se muestran estos valores para cada grupo preasignado a tiempo 0, esto es, previo al tratamiento. Los valores fueron similares, no observándose en ningún caso diferencias estadísticamente significativas.

Tratamiento	Tamaño			Morfología	
	Área (mm ²)	Radio (mm)	Volumen (mm ³ x 10)	Circularidad	Solidez
0 μM	0,212 ± 0,006	0,257 ± 0,004	0,752 ± 0,029	0,502 ± 0,019	0,937 ± 0,005
2,5 μM	0,205 ± 0,006	0,253 ± 0,004	0,722 ± 0,029	0,477 ± 0,021	0,932 ± 0,005
5 μM	0,205 ± 0,006	0,253 ± 0,004	0,720 ± 0,028	0,547 ± 0,019	0,944 ± 0,004
10 μM	0,216 ± 0,006	0,259 ± 0,004	0,776 ± 0,030	0,542 ± 0,020	0,940 ± 0,005
20 μM	0,213 ± 0,006	0,259 ± 0,003	0,756 ± 0,025	0,565 ± 0,019	0,946 ± 0,004
40 μM	0,216 ± 0,006	0,260 ± 0,004	0,774 ± 0,029	0,543 ± 0,020	0,942 ± 0,005

Tabla 4. Caracterización del tamaño y la morfología de las mamosferas previo al tratamiento. Se muestran los valores correspondientes a cada grupo de tratamiento antes de añadir la R2-viniferina y son la media ± EE de n=60 esferoides por grupo de tratamiento.

En la Figura 6 se muestra el efecto de la R2-viniferina a distintas concentraciones y tiempos de incubación sobre el tamaño y la morfología de las mamosferas. El estilbenoide provocó a las concentraciones más altas (20 y 40 μM) una marcada ($p < 0,001$) disminución de los parámetros analizados.

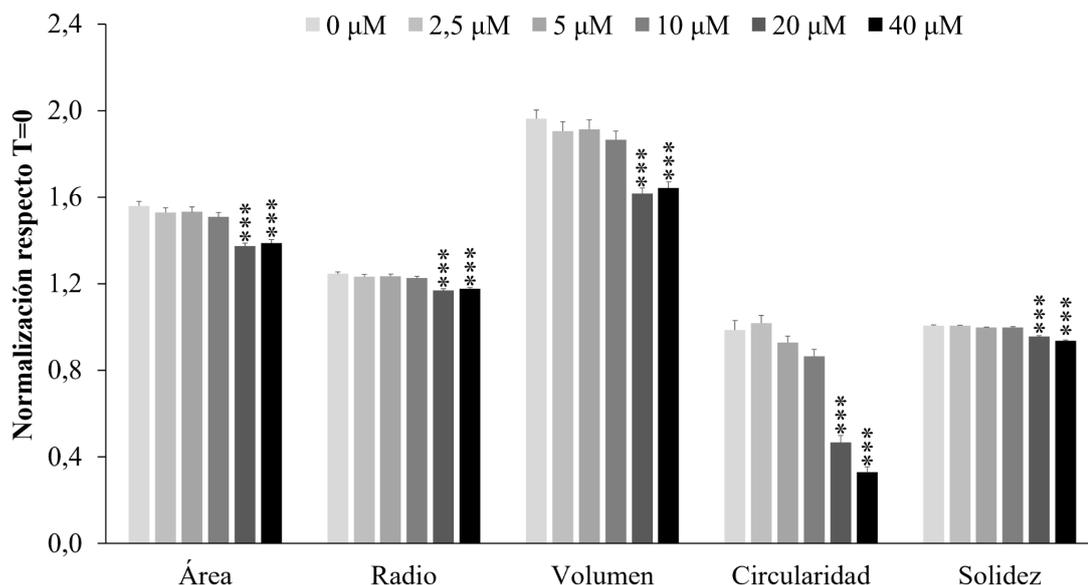


Figura 6. Efecto de la R2-viniferina sobre el tamaño (área, radio y volumen) y la morfología (circularidad y solidez) de las mamosferas. Las mamosferas se incubaron durante 72 h con R2-viniferina a las concentraciones indicadas. Transcurrido el tiempo, se tomaron fotografías en un microscopio invertido. Los valores se normalizaron respecto a los valores basales (tiempo 0) y son la media + EE de n=60 esferoides por grupo de tratamiento. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0.001, diferente del control al mismo tiempo.

Analizamos la estructura histoquímica del esferoide después de 72 h de tratamiento.

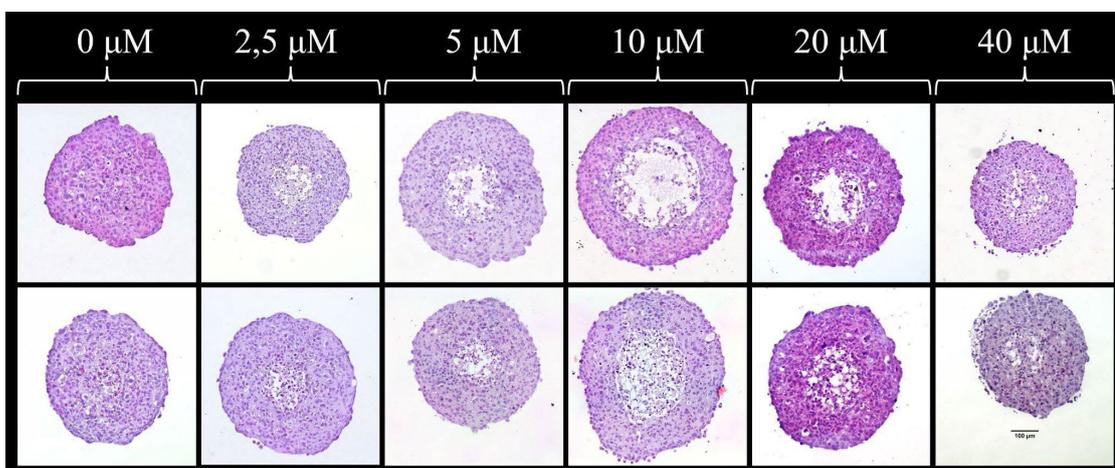


Figura 7. Efecto de la R2-viniferina sobre las características histoquímicas de las mamosferas. Las mamosferas se incubaron durante 72 h con R2-viniferina a las concentraciones indicadas. Transcurrido el tiempo, se procedió a la obtención de los cortes histoquímicos y a su análisis por microscopía. Se muestran por duplicado los cortes más representativos del ecuador del esferoide de diferentes mamosferas para cada grupo de tratamiento. La barra de escala mostrada corresponde a 100 μm.

Como se muestra en la Figura 7, en ausencia del estilbenoide la estructura de la mamosfera es, aparentemente, homogénea y sólida. En presencia de R2-viniferina se forma una cavidad central cuyo radio máximo se alcanza con la concentración de 10 μM.

Para concluir la caracterización de los esferoides, utilizamos análisis inmunocitoquímico, empleando anticuerpos fluorescentes y microscopía confocal. La mamosfera se tiñó con las sondas fluorescentes faloidina (marcador de citoesqueleto) y

anticuerpos frente a ATPVA sintasa (marcador mitocondrial) y paraoxonasa 2 (PON2), enzima antioxidante intracelular que en diferentes células se describe también en la mitocondria.

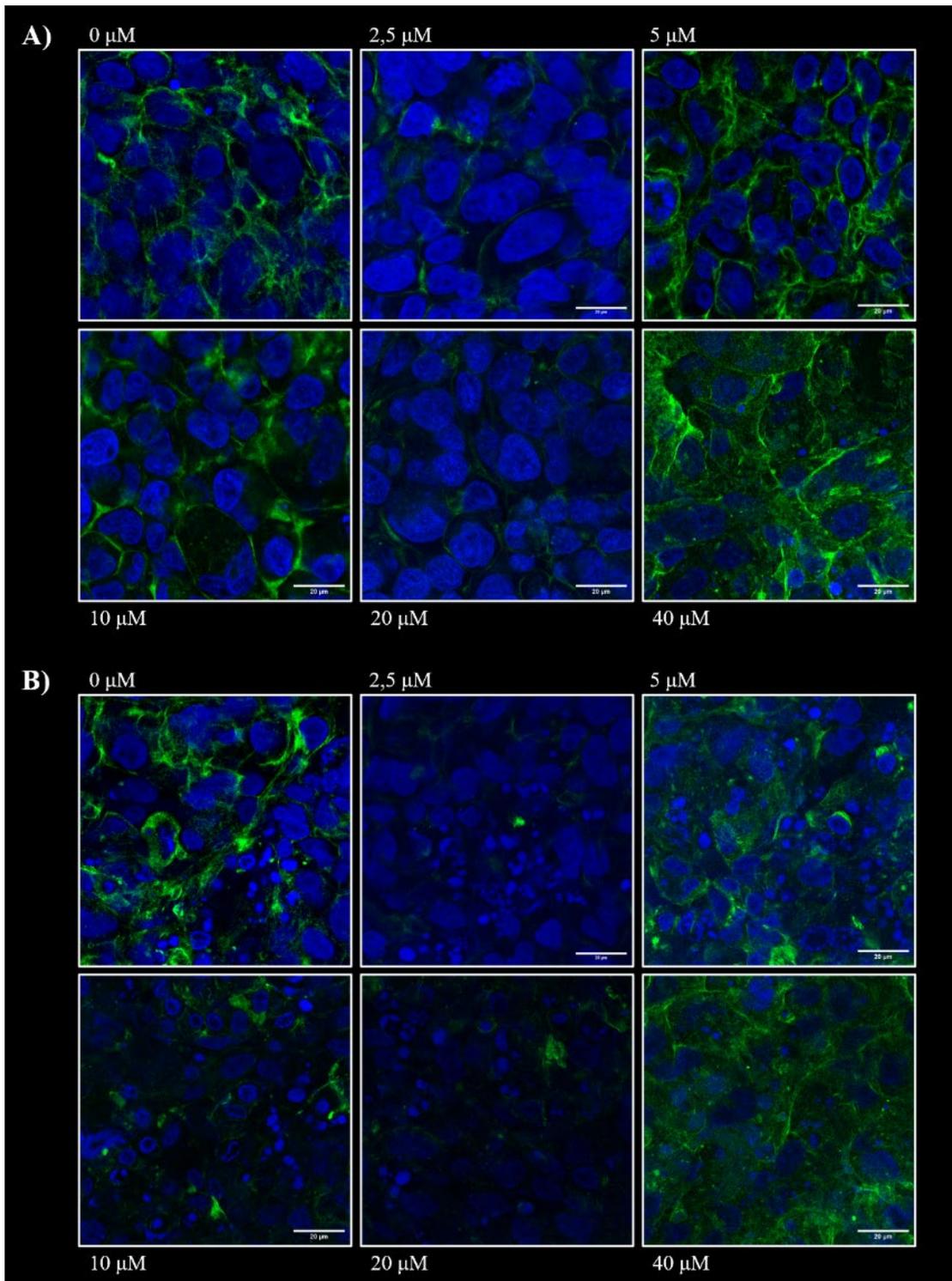


Figura 8. Disposición de los filamentos del citoesqueleto de actina en las células de las mamosferas. Las imágenes de fluorescencia obtenidas mediante microscopía confocal corresponden a regiones de las mamosfera a diferentes profundidades (**A**) periferia del esferoide y (**B**) zona interna. Se indican los tratamientos de las mamosferas con R2-viniferina durante 72 h. El citoesqueleto (verde) se hace visible por marcaje con faloidina, y los núcleos (azul) se contrastan con DAPI. La barra de escala corresponde a 20 μm.

En la Figura 8.A se aprecia en verde el entramado más o menos regular y envolvente del citoesqueleto de las células en el esferoide; esta disposición se hace mucho más irregular (desorganizada) en regiones más interiores de las mamíferas (Figura 8.B), y con distinción incluso del tratamiento recibido. Muy llamativa también es la aparición generalizada de numerosos núcleos pequeños y fragmentados (signo de apoptosis) en las imágenes tomadas en regiones internas de las mamíferas; este fenómeno cabe atribuirlo a las barreras físicas para la difusión de nutrientes y oxígeno que supone el crecimiento en la estructura tridimensional. Es importante tener también en cuenta que el abordaje confocal únicamente puede alcanzar capas poco profundas del esferoide, dada la limitación de la luz a atravesar un determinado umbral de grosor en el tejido.

En la Figura 9 se muestran los marcajes obtenidos para las mitocondrias y para PON2. Se realizó este abordaje en base a la importancia de la adaptación de la función mitocondrial en el cáncer de mama [33] y a la capacidad del enzima PON2 de modular la producción del estrés oxidativo de origen mitocondrial [34]. El estudio de este enzima ha adquirido una importante relevancia en nuestro grupo de investigación. Los datos obtenidos, aun siendo preliminares, indican que la colocación de PON2 en las mitocondrias es realmente menor como consecuencia del tratamiento con el estilbenoide.

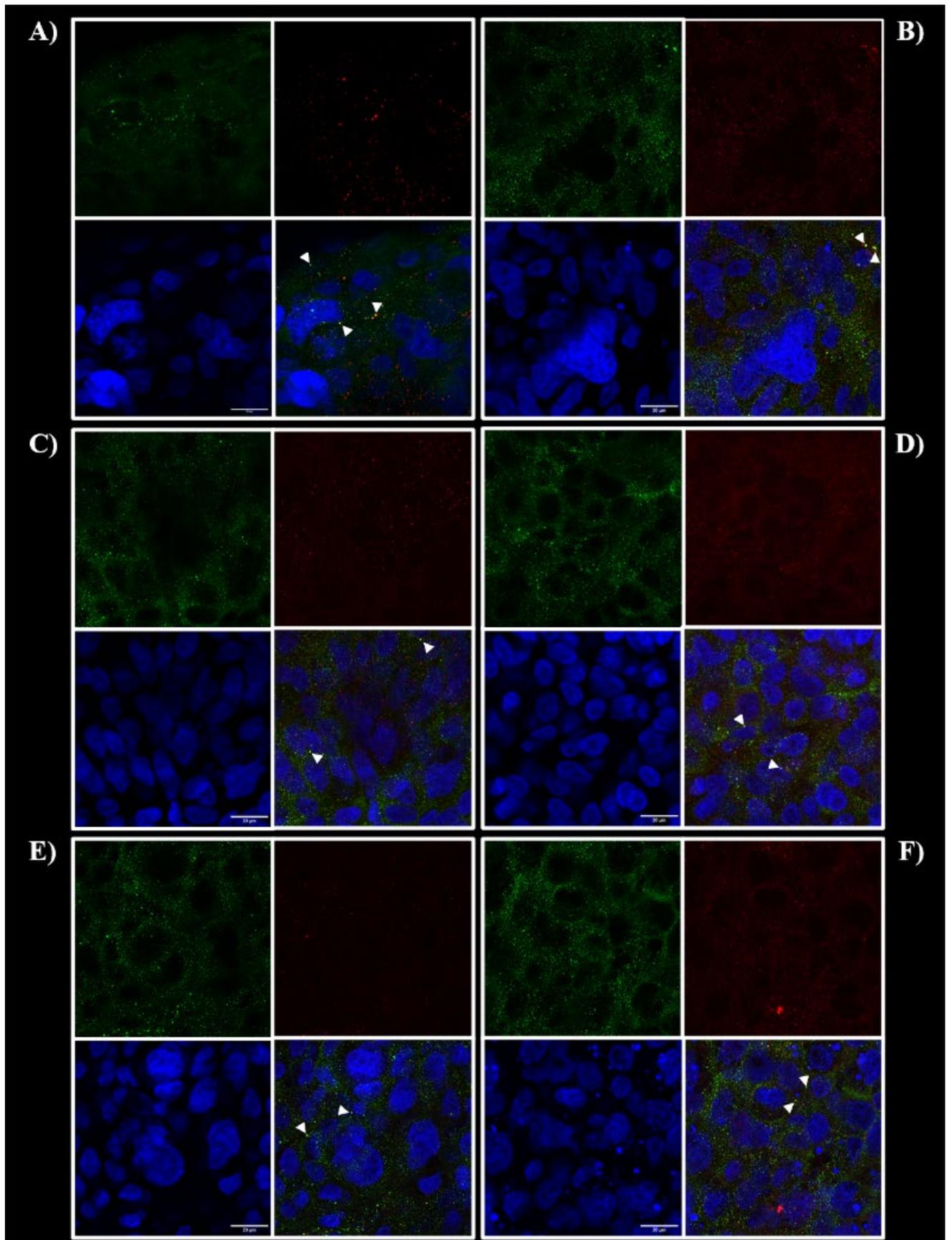


Figura 9. Distribución de las mitocondrias y de PON2 en las células de las mamosferas. Se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de mamosferas tratadas durante 72 h con R2-viniferina (A) 0 μM , (B) 2,5 μM , (C) 5 μM , (D) 10 μM , (E) 20 μM y (F) 40 μM . En verde se detecta

PON2 (cuadrante superior izquierdo); las mitocondrias (rojas, cuadrante superior derecho) se hacen visibles por marcaje con anti-ATPVA, y los núcleos (azul, cuadrante inferior izquierdo) se contrastan con DAPI. Los cuadrantes inferiores derechos corresponden a la imagen con los tres canales superpuestos. Las puntas de flecha blancas señalan la colocalización de los marcajes de PON2 y de mitocondria. La barra de escala corresponde a 20 μm .

4.2. Estudio metabólico

Analizamos el efecto de la R2-viniferina sobre el consumo de glucosa y la producción de lactato, como marcadores de la función metabólica celular, en los dos modelos de cultivo.

A) Monocapa

La R2-viniferina a las concentraciones de 2,5 y 5 μM provocó un aumento significativo del consumo de glucosa a 72 h (Figura 10.A). Estos resultados están en consonancia con el efecto proliferativo del estilbenoide a concentraciones bajas (Figura 4).

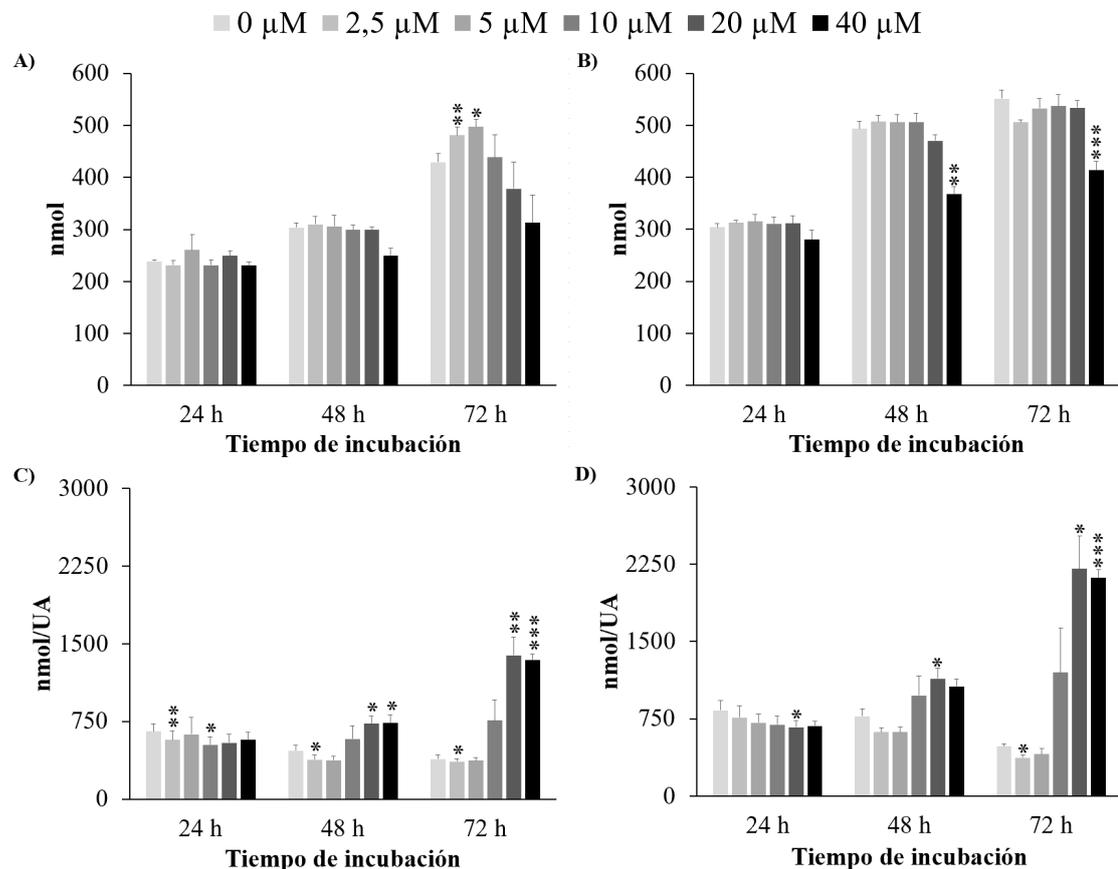


Figura 10. Efecto de la R2-viniferina sobre el consumo de glucosa y la producción de lactato en cultivos en monocapa. Se representa (A) y (C) glucosa consumida expresada en nmoles y en nmoles /unidad de absorbancia celular, y (B) y (D) lactato producido expresado en nmoles y en nmol/unidad de absorbancia celular. Los resultados son la media + EE para n=4 experimentos. *p < 0,05; **p < 0,01; *** p<0.001.

A concentraciones altas la R2-viniferina no se pudo constatar diferencias estadísticamente significativas en el consumo de glucosa. Sin embargo, cuando los datos se

expresan como consumo relativo al número de células, se observa que realmente el tratamiento hace más glucolíticas a las células que sobreviven (20 y 40 μM).

Respecto a la producción de lactato, la concentración más alta de R2-viniferina disminuyó marcadamente este parámetro a partir de 48 h (Figura 10.B). Como nos muestra la gráfica donde se representa la producción de lactato respecto al número de células, la disminución de la producción de lactato se debe más bien al menor número de células en el cultivo. El conjunto de estos resultados indica una actividad metabólica alterada, reforzando la citotoxicidad de la R2-viniferina.

B) Mamosferas

Para el modelo 3D se caracterizó el consumo de glucosa y la producción de lactato de las mamosferas para cada grupo preasignado a un tipo de tratamiento a tiempo 0 (Tabla 5), es decir, la caracterización metabólica durante el periodo de crecimiento y formación durante 7 días.

Tratamiento	Glucosa consumida		Lactato producido	
	nmol	$\mu\text{mol}/\text{mm}^3$	nmol	$\mu\text{mol}/\text{mm}^3$
0 μM	995 \pm 33	15 \pm 1	921 \pm 22	13 \pm 1
2,5 μM	1060 \pm 34	18 \pm 1	937 \pm 23	13 \pm 1
5 μM	1046 \pm 32	18 \pm 2	976 \pm 21	14 \pm 1
10 μM	1076 \pm 34	18 \pm 2	972 \pm 27	13 \pm 1
20 μM	1073 \pm 32	16 \pm 1	1012 \pm 25	13 \pm 0
40 μM	1004 \pm 31	16 \pm 1	1018 \pm 27	12 \pm 0

Tabla 5. Caracterización del consumo de glucosa y de la producción de lactato de las mamosferas previo al tratamiento. Se muestran los valores correspondientes a la media \pm error estándar del análisis de 60 esferoides por grupo de tratamiento. Los datos se expresan también relativo al volumen del esferoide.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los esferoides, por lo que queda establecido que los distintos grupos de mamosferas parten de similar situación metabólica.

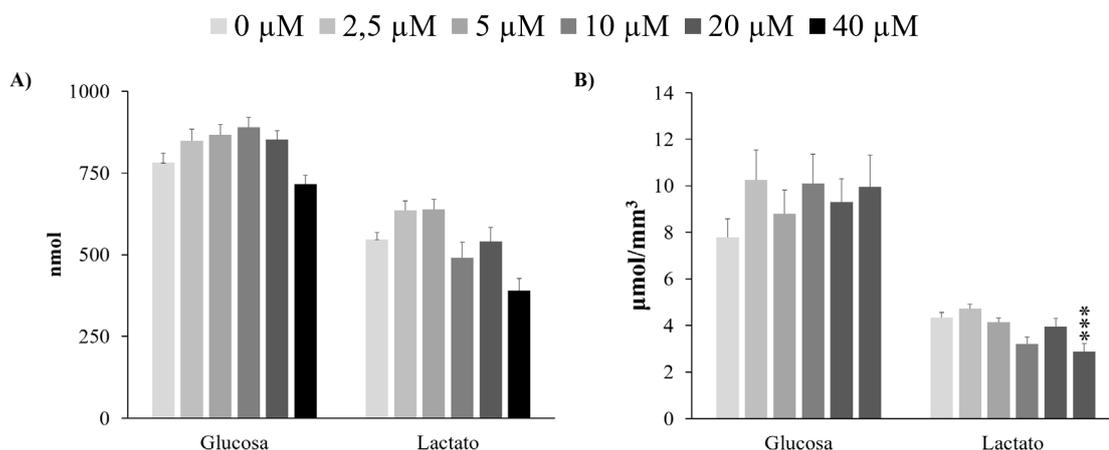


Figura 11. Efecto de la R2-viniferina sobre el consumo de glucosa y la producción de lactato de las mamosferas. Se representa la glucosa consumida y el lactato producido tras 72 h de tratamiento (A) expresados en nmoles y (B) expresados por volumen (mm^3) del esferoide. Los datos corresponden a la media + EE de 60 esferoides por grupo de tratamiento. *** $p < 0.001$.

Las mamosferas sometidas a tratamiento durante 72 h (Figura 11) no muestran diferencias estadísticamente significativas ni en el consumo de glucosa ni en la producción de lactato (Figura 11.A). Sin embargo, hay una menor producción de lactato por unidad de volumen del esferoide, que es estadísticamente significativa para 40 μM de R2-viniferina (Figura 11.B).

5. DISCUSIÓN

El proyecto aquí descrito partía como hipótesis una diferente respuesta al efecto citotóxico de R2-viniferina en las células crecidas en monocapa respecto al crecimiento tridimensional en forma de mamosfera. A la vista de los resultados descritos podemos constatar la veracidad de la hipótesis planteada de acuerdo a los resultados que hemos descrito y que a continuación se recopilan. En las células crecidas en monocapa el efecto de la R2-viniferina es de carácter bifásico, es decir, a bajas concentraciones (2,5 μM) induce proliferación celular mientras que a concentraciones superiores (10-40 μM) el efecto es citotóxico, siendo directamente proporcional al tiempo. Es posible que el efecto bifásico se deba al predominio de distintas propiedades de la R2-viniferina en el rango de concentraciones ensayadas: a bajas concentraciones predomina el carácter antioxidante de la R2-viniferina, confiriendo ciertas ventajas citoprotectoras a las células (activación de mecanismos de defensa, mantenimiento de la integridad del DNA, disminución de la lipoperoxidación, etc.); a concentraciones por encima de un umbral son otras las propiedades que desencadena múltiples acciones que propician la muerte celular [35]. A diferencia del modelo 2D, en el modelo 3D no se observa

comportamiento bifásico, sino únicamente un efecto citotóxico. La sensibilidad a la citotoxicidad inducida por R2-viniferina es inferior en 3D ($\geq 20 \mu\text{M}$) que en 2D ($\geq 10 \mu\text{M}$). Esta menor sensibilidad en los cultivos 3D suele describirse habitualmente en la bibliografía. Así, en general, las líneas celulares en cultivos 2D son, más sensibles a la acción tóxica de fármacos que en modelos de cultivos 3D [36-39], situación similar a la descrita en este trabajo.

En el estudio metabólico sobre el modelo de 2D el consumo de glucosa se ve afectado por el estilbenoide de modo bifásico, siendo coincidente al de proliferación-citotoxicidad: a bajas concentraciones de tratamiento aumenta el consumo mientras que disminuye a altas concentraciones. Esto no ocurre en la producción de lactato ya que entre 0-20 μM los niveles se mantienen similares, disminuyendo única y significativamente a 40 μM . Además de mostrar un efecto dosis-dependientes también es tiempo-dependiente, ya que para la glucosa se manifiesta tras las 72 h y para el lactato tras las 48 h. En el estudio metabólico en el modelo de 3D los resultados mostraron que el consumo de glucosa no se vio afectado por el tratamiento de forma estadísticamente significativa. Para conocer si las variaciones metabólicas dependían únicamente del número de células viables o de posibles alteraciones a nivel metabólico se han tenido en cuenta ambos parámetros (viabilidad y metabólico). En monocapas aumenta significativamente el consumo de glucosa y la producción de lactato por unidad celular de manera directamente proporcional a la dosis y al tiempo. Mientras que en las mamíferas no se observan resultados estadísticamente significativos para el consumo de glucosa, pero sí en la producción de lactato (40 μM), que, al contrario de las monocapas, disminuye significativamente. Los datos obtenidos del manejo de la glucosa y lactato nuevamente muestran que el efecto de la R2-viniferina depende del modo en que crecen las células estudiadas.

Se ha hecho una aproximación a la caracterización morfológica de las mamíferas y su alteración por la R2-viniferina. La histoquímica revela la formación de una cavidad central en las mamíferas tratadas con R2-viniferina a partir de 2,5 μM , alcanzando su mayor tamaño a 10 μM . Los datos obtenidos por microscopía confocal, por otra parte, con independencia del tratamiento, revelan que a medida que nos adentramos en el esferoide aumenta el grado de apoptosis. Por limitaciones inherentes a la metodología confocal, no podemos extraer conclusiones respecto al efecto del tratamiento sobre la apoptosis (se abordará en un futuro), pero sí es esperable que, al menos en parte, esta situación contribuya en parte a la formación de la cavidad central.

Los modelos *in vitro* son el comienzo de la fase experimental de cualquier tratamiento anticancerígeno, teniendo como objetivo el entendimiento del comportamiento del compuesto (en términos de eficacia) frente a las células. De los resultados de esta fase dependerá la

progresión hacia los modelos *in vivo* en la fase experimental. Sin embargo, el modelo tradicional *in vitro* dispone a las células en monocapas, por lo que únicamente es la cara apical la que interacciona con el ambiente. Mientras, todas las caras de las células del modelo tridimensional de esferoides interaccionan con el ambiente, ya que son simulaciones de un tumor sólido. Es por ello que el modelo 3D supone una mejor aproximación a recrear el microambiente tumoral que se da *in vivo*, ya que simula condiciones de hipoxia, disponibilidad de nutrientes, presencia de factores de crecimiento, etc. En muchas ocasiones los resultados obtenidos de cultivos en monocapa se muestran contradictorios a los que se puedan obtener en los modelos tridimensionales. Así, en este estudio se ha demostrado que el mismo tratamiento para la misma línea celular tiene efectos diferentes entre los dos modelos, el 2D y el 3D.

Finalmente, en este trabajo también hemos iniciado el abordaje de conocer la disposición de la red mitocondrial en las células que forman parte de la mamografía. El metabolismo de las células cancerosas no es estático, sino que se adapta a las necesidades celulares, y que vienen reguladas por las interacciones que la célula tumoral mantiene con su microentorno [38]. Dentro de la compleja red metabólica se encuentran las vías metabólicas mitocondriales, que se reprograman para modular el crecimiento del cáncer de mama, con lo que se generan señales de origen mitocondrial que influyen sobre las vías nucleares del tumor [40]. Nuestro grupo de investigación tiene una amplia trayectoria en el estudio la familia de las paroxonasas, que consta de PON1, PON2 y PON3. Las tres proteínas PON tienen propiedades antioxidantes. PON1 y PON3 están asociadas con HDL (lipoproteínas de alta densidad), mientras que PON2 es intracelular [41]. Se ha descrito que en la mitocondria PON2 se asocia con el complejo respiratorio mitocondrial III, e interaccionando con el coenzima Q10 previene la producción de anión superóxido y de estrés oxidativo de origen mitocondrial [42]. Los datos que hemos obtenido en este estudio sí nos han permitido encontrar una cierta colocación de PON2 con mitocondrias, menor a lo encontrado con otras líneas celulares. Aún nos queda por profundizar en este hecho y ponerlo en contexto de otras investigaciones. Aun así, también encontramos que esta colocación se hace menos frecuente con el tratamiento empleado. Las connotaciones que esto pudiera suponer quedan pendientes de estudios futuros.

6. CONCLUSIONES

1. La R2-viniferina tiene un efecto bifásico en la línea celular de cáncer de mama humano HCC-1954 en cultivo de monocapa, aumentando el crecimiento celular a la mínima concentración ensayada (2,5 μM) y provocando la muerte celular a partir de 10 μM .

2. En un modelo de cultivo 3D, la R2-viniferina a concentraciones igual o superior a 20 μM altera las características de las mamosferas desarrolladas a partir de la línea celular HCC-1954, que se reflejan en una reducción del tamaño (área, radio y volumen) y la morfología (circularidad y solidez). También modifica las características histoquímicas de las mamosferas, y la organización estructural de las células que componen las mamosferas.
3. La R2-viniferina a la concentración máxima ensayada (40 μM) provoca una disminución de la producción de lactato en las células en cultivos 2D y 3D, sin afectar al consumo de glucosa.
4. La R2-viniferina ejerce efectos citotóxicos diferenciados en cultivos 2D respecto a 3D, siendo el modelo de mamosfera menos sensible al tratamiento.

Los cultivos de mamosfera pueden considerarse un modelo de cultivo más adecuado para el estudio in vitro de compuestos anticancerígenos, ya que presentan unas características que reflejan la complejidad del tumor y simulan mejor el microentorno tumoral.

ABREVIATURAS

ER	Receptor hormonal de Estrógenos (del inglés <i>Estrogen Receptor</i>)
PR	Receptor hormonal de Progesterona (del inglés <i>Progesteron Receptor</i>)
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (del inglés <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>)
TNBC	Cáncer de mama triple negativo (del inglés <i>Triple Negative Breast Cancer</i>)
MCTS	Esferoides Tumoraes Multicelulares (del inglés <i>Multicelular Tumor Spheroids</i>)
RPMI	Del inglés <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
PBS	Tampón Fosfato Salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido

BIBLIOGRAFÍA

1. Joshi H, Michael F. Press. Molecular oncology of breast cancer. En: Bland KI, Copeland EM, Klimberg VS, Gradishar WJ, editores. *The Breast. Elsevier*; **2018**. p. 282-307.e5.
2. Las cifras del cáncer en España 2020 [Internet]. Seom.org. [citado el 4 de julio de **2022**].
3. Azzopardi JG, Chepick OF, Hartmann WH, Jafarey NA, Llombart-Bosch A, Ozzello L, et al. The world health organization histological typing of breast tumors—second edition. *Am J Clin Pathol*. **1982**;78(6):806–16.
4. Morrow M, Strom EA, Bassett LW, Dershaw DD, Fowble B, Giuliano A, et al. Standard for breast conservation therapy in the management of invasive breast carcinoma. *CA Cancer J Clin*. **2002**;52(5):277–300.
5. Vuong D, Simpson PT, Green B, Cummings MC, Lakhani SR. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*. **2014**;465(1):1–14.
6. Henderson IC. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100 000 women in 123 randomised trials. *Breast Dis Year B Q*. **2013**;24(1):76–8.
7. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999**;96(16):9212–7.
8. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. **2000**;406(6797):747–52.
9. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med*. **2006**;354(23):2463–72.
10. Gruvberger-Saal SK, Cunliffe HE, Carr KM, Hedenfalk IA. Microarrays in breast cancer research and clinical practice--the future lies ahead. *Endocr Relat Cancer*. **2006**;13(4):1017–31.
11. Gantier MP, McCoy CE, Rusinova I, Saulep D, Wang D, Xu D, et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res*. **2011**;39(13):5692–703.
12. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LFA, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. **2008**;216(2)
13. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. **2001**;69(3):89–95.
14. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. **2010**;12(4):207
15. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Integration of systemic chemotherapy in the management of primary breast cancer. *Oncologist*. **1998**;3(5):300–13.
16. Mehta G, Hsiao AY, Ingram M, Luker GD, Takayama S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J Control Release*. **2012**;164(2):192–204.
17. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature*. **2003**;424(6951):870–2.
18. Aggarwal V, Miranda O, Johnston PA, Sant S. Three dimensional engineered models to study hypoxia biology in breast cancer. *Cancer Lett*. **2020**;490:124–42
19. Lv D, Hu Z, Lu L, Lu H, Xu X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review). *Oncol Letters*. **2017**; 14(6): 6999-7010.
20. Pucci C, Martinelli C, Ciofani G. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalsecience*. **2019**;13:961

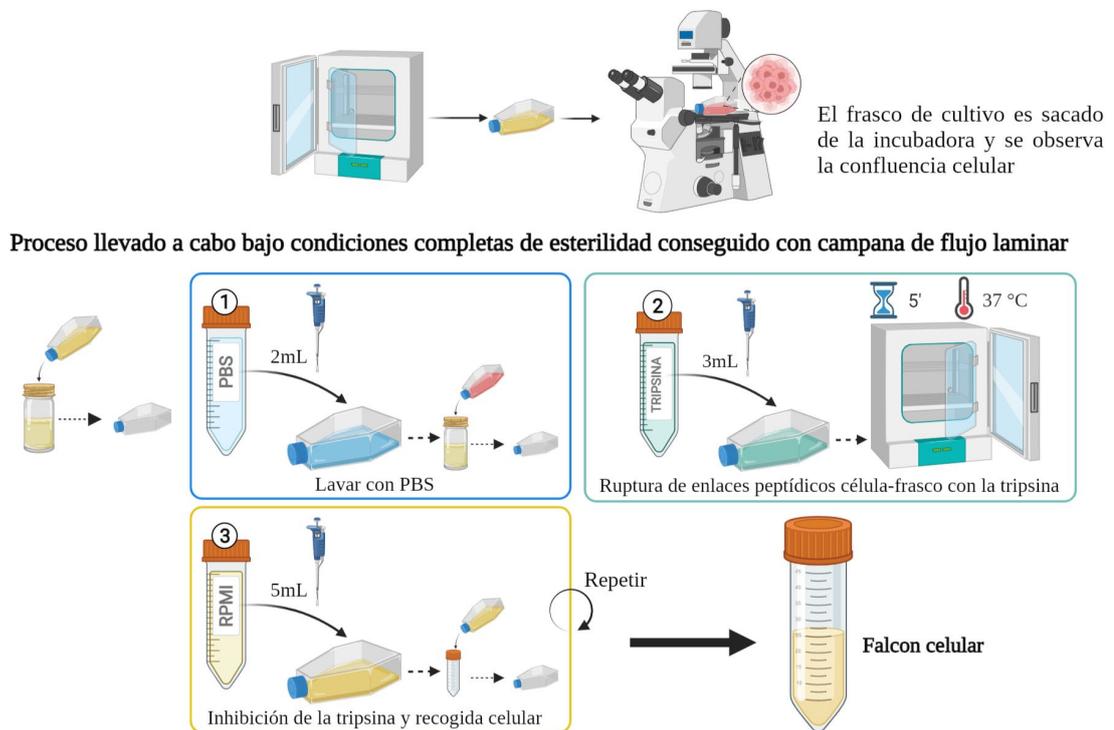
21. Abdal Dayem A, Choi HY, Yang G-M, Kim K, Saha SK, Cho S-G. The anti-cancer effect of polyphenols against breast cancer and cancer stem cells: Molecular mechanisms. *Nutrients*. **2016**;8(9):581.
22. Beckman CH. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol Mol Plant Pathol*. **2000**;57(3):101–10
23. Cháirez-Ramírez MH, de la Cruz-López KG, García-Carrancá A. Polyphenols as antitumor agents targeting key players in cancer-driving signaling pathways. *Front Pharmacol*. **2021**;12:710304.
24. Sirerol JA, Rodríguez ML, Mena S, Asensi MA, Estrela JM, Ortega AL. Role of natural stilbenes in the prevention of cancer. *Oxid Med Cell Longev*. **2016**;2016:3128951.
25. Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem*. **2001**;49(11):5315–21
26. Pugajeva I, Perkons I, Górnas P. Identification and determination of stilbenes by Q-TOF in grape skins, seeds, juice and stems. *J Food Compos Anal*. **2018**;74:44–52
27. Pagar KR, Khandbahale SV, Phadtare DG. The therapeutic potential of resveratrol: A review of clinical trials. *Asian J Pharm Res*. **2019**;9(3):193
28. Gligorijević N, Stanić-Vučinić D, Radomirović M, Stojadinović M, Khulal U, Nedić O, et al. Role of resveratrol in prevention and control of cardiovascular disorders and cardiovascular complications related to COVID-19 disease: Mode of action and approaches explored to increase its bioavailability. *Molecules*. **2021**;26(10):2834.
29. Xue Y-Q, Di J-M, Luo Y, Cheng K-J, Wei X, Shi Z. Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxid Med Cell Longev*. **2014**;2014:765832.
30. Aja, I., Ruiz-Larrea, M. B., Courtois, A., Krisa, S., Richard, T., & Ruiz-Sanz, J. I. Screening of Natural Stilbene Oligomers from *Vitis vinifera* for Anticancer Activity on Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Antioxidants*. **2020**; 9(6), 469
31. Al-Bader M, Ford C, Al-Ayadhy B, Francis I. Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Exp Ther Med*. **2011**;2(3):537–44.
32. Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc*. **2016**;2016(4).
33. Avagliano A, Ruocco MR, Aliotta F, Belviso I, Accurso A, Masone S, Montagnani S, Arcucci A. Mitochondrial Flexibility of Breast Cancers: A Growth Advantage and a Therapeutic Opportunity. *Cells* 2019;8(5):401
34. Devarajan A, Bourquard N, Hama S, Navab M, Grijalva VR, Morvardi S, Clarke CF, Vergnes L, Reue K, Teiber JF, Reddy ST. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(3):341-51.
35. Shaito A, Posadino AM, Younes N, Hasan H, Halabi S, Alhababi D, et al. Potential adverse effects of resveratrol: A literature review. *Int J Mol Sci*. **2020**;21(6):2084.
36. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Nakatsura T, Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep* **2015**;33(4):1837-43.
37. Souza AG, Silva IBB, Campos-Fernandez E, Barcelos LS, Souza JB, Marangoni K, Goulart LR, Alonso-Goulart V. Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Curr Pharm Des* **2018**;24:1689-1694.
38. Muguruma M, Teraoka S, Miyahara K, Ueda A, Asaoka M, Okazaki M, Kawate T, Kuroda M, Miyagi Y, Ishikawa T. Differences in drug sensitivity between two-dimensional and three-dimensional culture systems in triple-negative breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **2020**;533(3):268-274.

39. Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol* **2017**;14(1):11-31.
40. Jia D, Park JH, Jung KH, Levine H, Kaiparettu BA. Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States. *Cells* **2018**;7(3):21.
41. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* **2005**;38(2):153-63.
42. Parween F, Gupta RD. Insights into the role of paraoxonase 2 in human pathophysiology. *J Biosci* **2022**;47:4

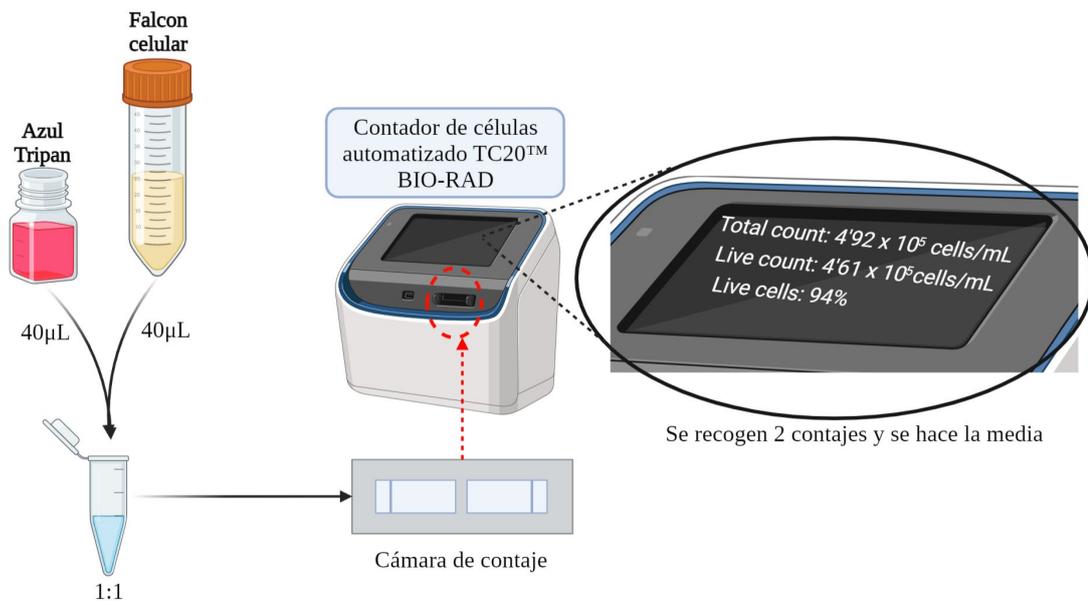
ANEXO I

Esquemas ilustrativos de la metodología

Figura 1. Representación gráfica del proceso de manipulación y contaje celular

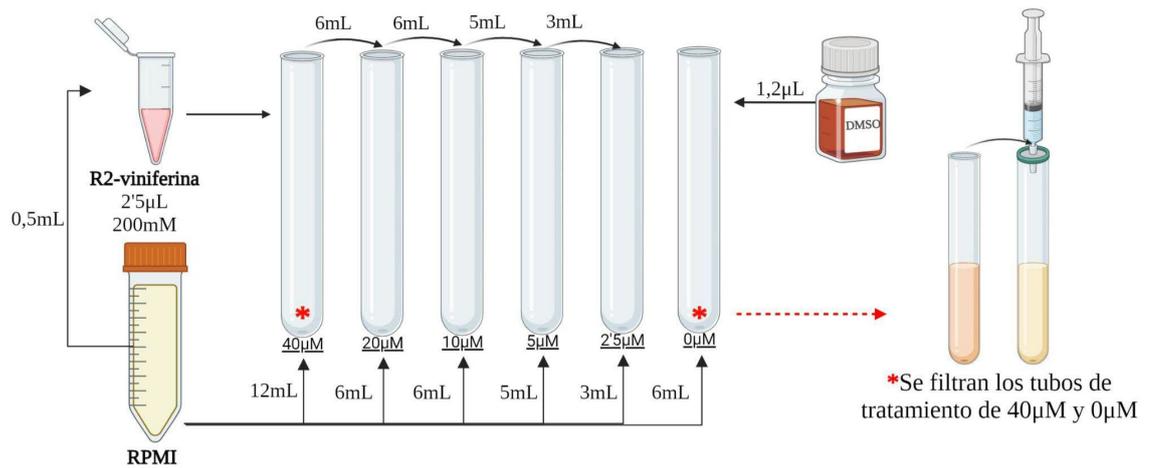


A) Disociación de las uniones célula-superficie para recoger las células del cultivo.

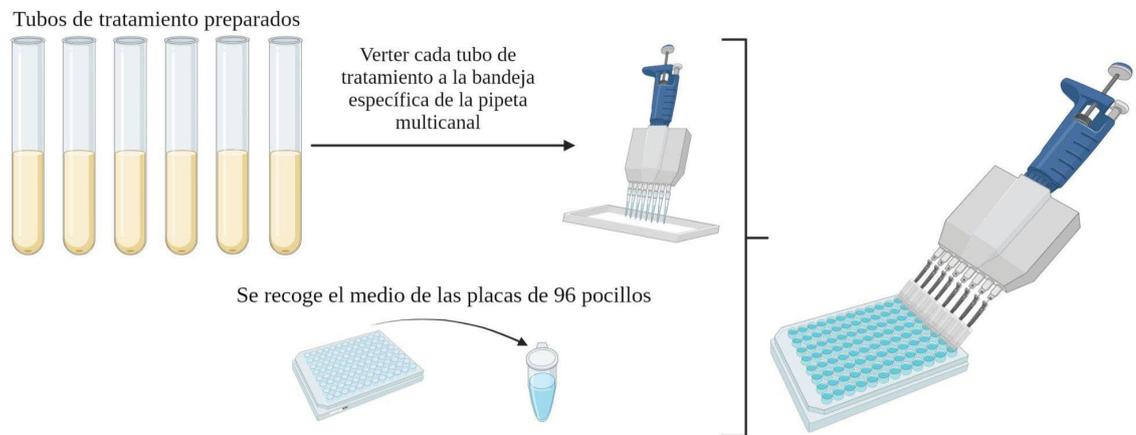


B) Contaje celular del cultivo por medio del Azul Tripán

Figura 2. Representación gráfica la preparación del tratamiento

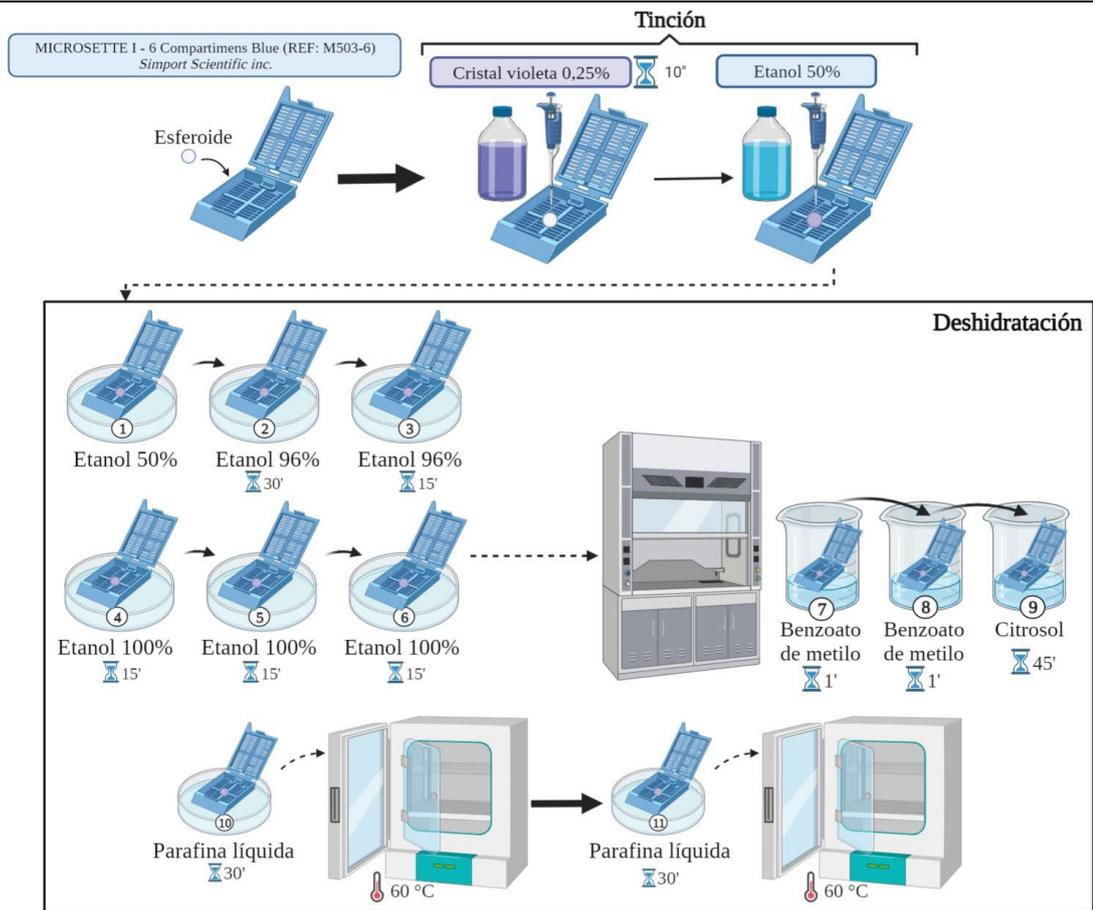


A) Preparación de los tubos de tratamiento a diferentes concentraciones de R2-viniferina y filtración de los tubos de tratamiento de 40μM y 0μM

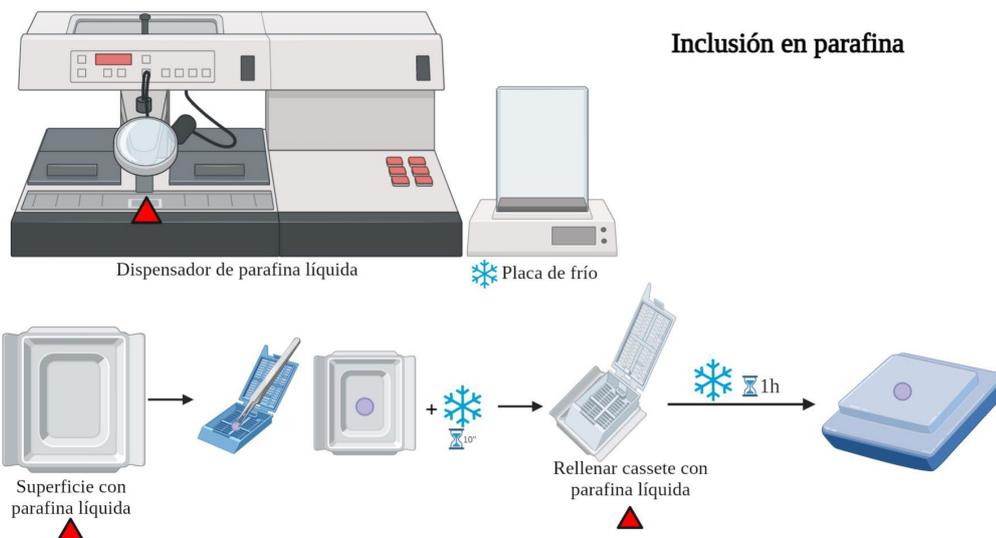


B) Adición de los tratamientos desde los tubos preparados a la placa de 96 pocillos con las células sembradas

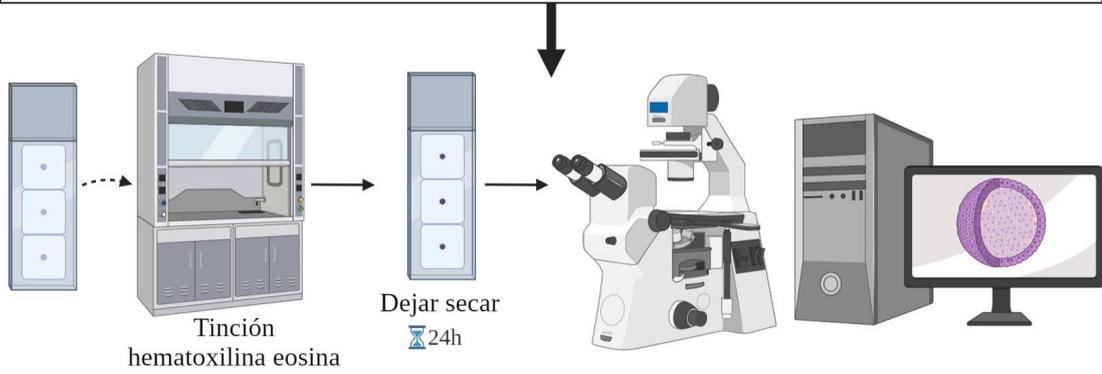
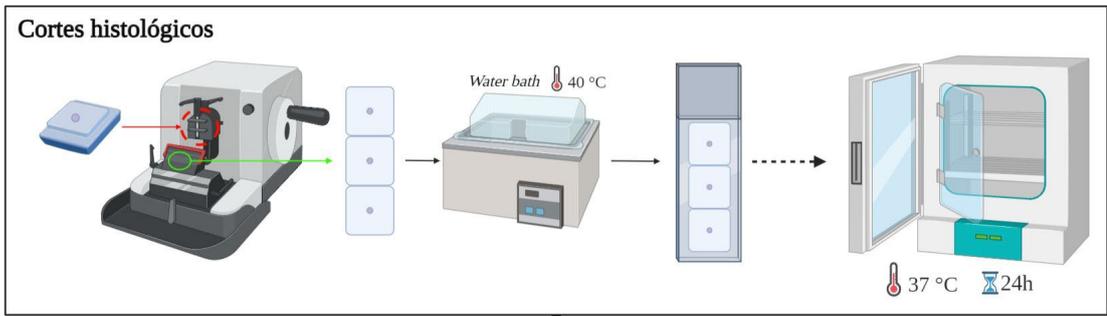
Figura 3. Representación gráfica del proceso de inclusión de parafina



A) Proceso de deshidratación para que la parafina líquida entre en el interior celular



B) Formación del bloque de parafina en el que se incluirá el esferoide



C) Realización de cortes histológicos de $4\mu\text{m}$ de grosor para su posterior observación en el microscopio confocal