



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**Establecimiento de organoides derivados de pacientes
con carcinoma colorrectal como modelo para
cribado de drogas con acción antitumoral**

María Fernanda Gutiérrez Bravo

Directores de la Tesis Doctoral

Dr. Andrés Cervantes Ruipérez

Dra. Josefa Castillo Aliaga

Tutora

Dra. María Dolores Bernal Membrilla

Enero 2022

Valencia, España



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

INCLIVA | VLC
Biomedical Research Institute

Dr. ANDRÉS CERVANTES RUIPÉREZ, Catedrático de Medicina de la Universitat de València y jefe del Servicio de Oncología Médica en el Hospital Clínico Universitario de Valencia, y Dra. JOSEFA CASTILLO ALIAGA, Profesora Ayudante Doctor de la Universitat de València.

CERTIFICAN

Que Dña. MARÍA FERNANDA GUTIÉRREZ BRAVO, graduada en Ingeniería en Biotecnología por la Universidad Internacional SEK Ecuador, ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo de investigación original recogido en la presente memoria titulada “**Establecimiento de organoides derivados de pacientes con carcinoma colorrectal como modelo para cribado de drogas con acción antitumoral**”.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València dentro del Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología.

Valencia, a 07 de enero del 2022

Dr. Andrés Cervantes Ruipérez

Director de Tesis

Dra. Josefa Castillo Aliaga

Directora de Tesis

Ratificación de la Tutora con su firma:

Dra. María Dolores Bernal Membrilla

Tutora de Tesis

DEDICATORIA

A mis abuelos.

En especial a mi abue Olguita, quien me enseñó a estudiar desde chiquita,
y a quien perdí en el camino, pero nunca se fue de mi lado.

A mis padres, siempre.

Todos mis logros son por y para ustedes.

“Es bueno saber que no sabes. Es bueno decirlo. Eso también es del Lethani”

- Patrick Rothfuss
El Temor de un Hombre Sabio

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas que durante estos años han contribuido a la realización de este trabajo de investigación, y a mi formación como investigadora, les doy mis más sinceras gracias.

Al Dr. Andrés Cervantes, por darme la oportunidad de formarme en un grupo de investigación multidisciplinar y de alto nivel.

A la Dra. Josefa Castillo, por todo su apoyo, sus consejos y sus críticas constructivas, en su afán por guiarme siempre en la dirección correcta.

A todos los miembros del laboratorio, pasados y presentes, por su apoyo experimental y moral, y, sobre todo, por su compañía.

A la Universidad de Valencia, mi *Alma Mater* en España.

Para la realización de esta Tesis Doctoral, María Fernanda Gutiérrez Bravo ha disfrutado de una subvención del Programa Santiago Grisolia (GRISOLIAP/2017/161) para la promoción de la investigación científica, el desarrollo tecnológico y la innovación en la Comunidad Valenciana, a través de la Conselleria de Educación, Investigación, Cultura y Deporte de la Generalitat Valenciana.

Tras los agradecimientos formales, ahora vienen los agradecimientos informales:

Durante todo este tiempo metida entre *papers* y pipetas, he tenido la suerte de seguir nutriendo mi curiosidad, de perseguir mi *ikigai*. Elena, gracias por ir a buscarme y animarme a aplicar, que por el miedo al no sé, casi me pierdo este capítulo de mi vida. Casi.

Gracias a mis directores, Andrés y Pepa, porque me abrieron las puertas a un mundo de conocimiento que no sabía que me interesaba tanto. ¡Gracias por apostar por mí! Especialmente, tengo que agradecer a Pepa por su paciencia conmigo, por guiarme y devolverme a tierra cuando mi mente quería irse por otros lados.

Sin duda, quiero agradecer a Pilar, Kike y Tani de la UMP, que me han respondido a mis (muchas e intensas) preguntas de las seqs. También a Sheila, Arturo y Carlos, los bioinfos que han corrido conmigo para que las gráficas lleguen a tiempo. Y a Zahara, que detrás de bastidores ha dedicado mucho tiempo a las inmunos de mis bichos. Gracias.

A mis chics del laboratorio, tanto a los que me recibieron inicialmente, como a los actuales, Manu, Blanquis y Paco, mil gracias por la compañía, el apoyo y los cafés. Dios sabe que la ciencia se mueve a base de cafeína en ese lab. Manu, gracias por ser mi conejillo de indias para “aprender a enseñar”, espero haber estado a la altura :) gracias por las sesiones de psicólogo de 4-6 con cita previa, y gracias por ser de los pocos en preguntar y escuchar mi versión... *let it be*

A Ana, quien comenzó como compi de lab y terminó siendo una amiga del alma. No puedo hacer más que repetirte una y mil veces, gracias. Por escucharme, las cosas buenas y las cosas malas, por tus abrazos de oso y por ser paño de lágrimas. Y por hacerme partícipe de tus victorias y tus pausas. Gracias por ser mi angelito a 9000 km de mi casa <3 Trueno y Dess no son las únicas que salen de un abismo con un vínculo, créeme.

A mis queridos iberitos: Lau, Albert, Aleh y Emilio, que han llegado a ser parte de mi familia del otro lado del charco, y que también hacen ciencia, así que han escuchado las victorias y penurias de esta tesis, más de una vez. Gracias por ser familia, lejos de la familia. Les quiero.

También quiero darle las gracias a mis primos, Bea y Hernán, que, aunque llevan años viviendo aquí, nos recibieron en sus casas, a George y a mí, como que nos hubiesen conocido desde siempre. Gracias por todo el apoyo y el cariño, y ese calor hogareño que tanta falta nos hizo. Gracias por recibirnos como hijos y por estar siempre atentos a nosotros.

Obviamente, gracias a mis papis y a mi hermana, porque, aunque no se enteran de que hago de mi vida, han estado pendientes de mí, todos y cada uno de los días que he estado lejos. Un mensajito o una foto me han ayudado a mantener mi cordura. Gracias a mi mami por las velitas encendidas, a mi papi por sus palabras de aliento, y a mi patuchis, por sus mensajitos random y por las fotos de mi gato.

Y finalmente, gracias a mi compañero de vida, George aka Ligre. Las palabras se me quedan cortas para expresarte las INMENSAS gracias que siento. Tu más que nadie sabes lo que esta tesis ha costado, entre sangre, sudor y (muchas) lágrimas. Gracias por tus *peer-reviews*, por enseñarme los básicos de bioinfo y a no perder tanto la paciencia con R. Gracias por los findes de D&D y las interminables aventuras en el mundo de Yralliah. Desconectar así no tiene comparación. Simplemente, gracias por estar. Si pasamos una pandemia y una tesis doctoral juntos, cualquier reto que se nos venga encima es, con perdón, weas.

“Primero la obligación, y después la devoción”. Abue, gracias por eso. Devoción, ahí te voy.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE ANEXOS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN BREVE.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 CANCER COLORECTAL.....	12
1.1.1 Incidencia y epidemiología del cáncer colorrectal (CCR).....	12
1.1.2 Estadaje y clasificación molecular del cáncer colorrectal.....	13
1.1.3 Alteraciones genómicas en cáncer colorrectal.....	19
1.1.4 Alteraciones transcriptómicas en cáncer colorrectal.....	32
1.1.5 Localización del tumor primario e implicaciones clínico-patológicas.....	34
1.1.6 Tratamientos del cáncer colorrectal.....	35
1.2 LOS ORGANOIDES COMO MODELO PRECLÍNICO EN INVESTIGACIÓN.....	39
1.2.1 Antecedentes e historia de los organoides.....	39
1.2.2 Ventajas y limitaciones del cultivo de organoides.....	41
1.2.3 Aplicaciones biomédicas de los organoides.....	44
1.2.4 Organoides como modelo de cáncer colorrectal.....	47
OBJETIVOS.....	50
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
2.1 Selección, reclutamiento de pacientes y circuito de recogida de muestras.....	53
2.2 Cultivo de organoides.....	54
2.2.1 Procesamiento del tejido primario.....	54
2.2.2 Composición de los medios de cultivo.....	55
2.2.3 Mantenimiento y control del cultivo de organoides.....	57
2.2.4 Pase y ampliación del cultivo de organoides.....	57
2.2.5 Criopreservación y descongelación de organoides.....	58
2.2.6 Nomenclatura de los organoides.....	58
2.3 Caracterización morfológica de los organoides y el tejido de origen.....	59
2.3.1 Inclusión en Parafina y tinción con hematoxilina-eosina (H&E).....	59
2.3.2 Inmunohistoquímica (IHQ).....	60

2.3.3 Inmunofluorescencia (IF)	60
2.4 Determinación de la tasa de crecimiento de los organoides.....	61
2.5 Caracterización molecular de organoides y tejidos tumorales.....	62
2.5.1 Extracción de DNA genómico de organoides tumorales y tejido tumoral congelado	62
2.5.2 Análisis del perfil de número de copias de organoides y tejidos tumorales.....	63
2.5.3 Generación de librerías y secuenciación de DNA	63
2.5.4 Extracción de RNA total de organoides tumorales y tejido tumoral congelado	64
2.5.5 Generación de librerías y RNA-seq.....	64
2.5.6 Generación de librerías y microRNA-seq.....	64
2.5.7 Procesamiento de datos de secuenciación de DNA	65
2.5.8 Procesamiento de datos de secuenciación de RNA.....	65
2.5.9 Procesamiento de datos de secuenciación de microRNA	66
2.6 Ensayos de sensibilidad a fármacos	66
2.6.1 Análisis estadísticos de los ensayos de fármacos	68
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
3.1 Establecimiento de un protocolo para el procesamiento de muestras de tejido procedentes de pacientes con cáncer colorrectal localizado y posterior establecimiento y mantenimiento de cultivos de organoides en 3D.....	70
3.1.1 Establecimiento de un protocolo para el cultivo de organoides derivados de tejido tumoral y normal procedente de pacientes con carcinoma colorrectal	70
3.1.2 Resumen de las condiciones evaluadas en el protocolo de establecimiento de organoides derivados de tejido tumoral y tejido normal de pacientes con cáncer colorrectal localizado	80
3.2 Generación de un biobanco de Organoides Tumorales (CTOs) y Organoides Normales (CNOs) derivados de pacientes con CCR	81
3.3 Caracterización morfológica y molecular de CTOs	87
3.3.1 Caracterización morfológica de los CTOs	88
3.3.2 Caracterización molecular de los CTOs y del tejido de origen.....	92
3.3.3 Ensayo de crecimiento de las líneas de organoides	134
3.4 Organoides como modelo predictivo de respuesta a fármacos usados en el tratamiento de CCR	136
3.4.1 Ensayos de sensibilidad de los CTOs al tratamiento con quimioterápicos	136
3.4.2 Tratamiento de CTOs con inhibidores de dianas específicas.....	142
CONCLUSIONES.....	150
REFERENCIAS	153
ANEXOS.....	175

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos diagnosticados y muertes asociados a cáncer a nivel mundial en 2020 ..	12
Figura 2. Modelo de Vogelstein.	14
Figura 3. Esquema representativo de los estadios de cáncer colorrectal descrito por la AJCC.	15
Figura 4. Clasificación de los subtipos moleculares del cáncer colorrectal.	18
Figura 5. Vía de señalización mediada por WNT.	21
Figura 6. Vías de señalización mediadas por EGF.	24
Figura 7. Vía de señalización de NOTCH.	26
Figura 8. Vía de señalización de BMP/ TGF- β	27
Figura 9. Vía de señalización de HIPPO.	29
Figura 10. Vía de señalización de p53.	31
Figura 11. Anatomía del colon.	34
Figura 12. Fármacos utilizados en el tratamiento del CCR.	38
Figura 13. Historia de la investigación en organoides.	40
Figura 14. Comparación entre los diferentes modelos que existen para el estudio y modelado del cáncer in vitro.	42
Figura 15. Organoides de cáncer colorrectal localizado (CCRL) se establecen y crecen en diferentes concentraciones de BME.	75
Figura 16. Crecimiento progresivo de un organoide tumoral de cáncer de colon localizado en presencia del medio de cultivo MC y medio de cultivo ST	79
Figura 17. Cultivo de organoides derivados de pacientes con carcinoma colorrectal.	82
Figura 18. Descripción del biobanco de organoides derivados de pacientes con cáncer colorrectal localizado.	85
Figura 19. Los organoides de cáncer de colon localizado recapitulan las características morfológicas del tumor del cual provienen.	89
Figura 20. Los organoides de cáncer de colon localizado exhiben la presencia de distintas poblaciones celulares del epitelio intestinal.	92
Figura 21. Las mutaciones que se encuentran de forma frecuente en cáncer colorrectal están presentes en los CTOs.	96
Figura 22. Perfil de número de copias del genoma de los CTOs y sus tejidos correspondientes.	100
Figura 23. Alteraciones más frecuentes en el número de copias genómicas en CCRL.	101
Figura 24. Perfil de número de copias de los CTOs y tejidos correspondientes.	103

Figura 25. Análisis de componentes principales (PCA) de los organoides y los tejidos de origen correspondientes, tanto tumorales como normales.....	112
Figura 26. Análisis de expresión diferencial de genes en organoides tumorales y organoides normales derivados de pacientes con cáncer colorrectal.....	114
Figura 27. Análisis funcional de los términos de ontología génica (GO) enriquecidos en los organoides tumorales.....	116
Figura 28. Matriz de distancias que indica la correlación de los organoides con su tejido de origen..	123
Figura 29. Análisis de expresión diferencial de genes en CTOs derechos e izquierdos.	125
Figura 30. Análisis de enriquecimiento funcional de ontología génica (GO) enriquecidos en los organoides tumorales derechos.	126
Figura 31. Análisis de expresión diferencial de miRNAs en organoides tumorales derechos vs izquierdos.	129
Figura 32. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes relacionados con los miRNAs diferencialmente expresados en CTOs derechos.....	131
Figura 33. Análisis de expresión diferencial de miRNAs en tejido tumoral derecho vs izquierdo. ..	132
Figura 34. Los organoides exhiben tiempos distintos de crecimiento..	135
Figura 35. Curva de sensibilidad de los CTOs al tratamiento con 5-FU.....	138
Figura 36. Curva de sensibilidad de los CTOs al tratamiento con Oxaliplatino.	139
Figura 37 Curva de sensibilidad de los CTOs al tratamiento con 5-FU y oxaliplatino, en combinación..	140
Figura 38. Ensayo de sensibilidad de los CTOs a Alpelisib.....	145
Figura 39. Ensayo de sensibilidad de los CTOs a Trametinib.....	146
Figura 40. Ensayo de sensibilidad de los CTOs a SN38.....	147
Figura 41. Ensayo de sensibilidad de los CTOs a Erlotinib.....	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer colorrectal.....	17
Tabla 2. Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos en el estudio.....	54
Tabla 3. Composición del Medio Basal (MB)	55
Tabla 4. Composición del Medio Completo (MC) para establecimiento y crecimiento de CTOs	56
Tabla 5. Composición del Medio Comercial (ST) para establecimiento y crecimiento de CNOs	56
Tabla 6. Listado de anticuerpos para Inmunohistoquímica	60
Tabla 7. Listado de anticuerpos para Inmunofluorescencia.....	61
Tabla 8. Fármacos utilizados y las concentraciones empleadas en los ensayos de sensibilidad.	67
Tabla 9. Resumen de las condiciones evaluadas en la puesta a punto del protocolo para establecimiento de organoides tumorales y normales derivados de pacientes con cáncer colorrectal.	80
Tabla 10. Características clínico-patológicas de los tumores de los cuales derivan las 6 líneas CLP de CTOs seleccionadas.	88
Tabla 11. Eventos amplios de cnLOH presentes en organoides derivados de tumores de CCR de estadio avanzado.	109
Tabla 12. Detalle de los organoides tumorales y normales incluidos en el análisis de expresión diferencial de genes.....	111
Tabla 13. Lista de los 10 genes con una mayor expresión en organoides tumorales con respecto a organoides normales.	118
Tabla 14. Lista de los 10 genes con menor expresión en organoides tumorales con respecto a organoides normales	121
Tabla 15. Genes alterados en CTOs derechos en relación con CTOs izquierdos.....	127

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Detalles clínico-patológicos de los pacientes de los cuales se han derivado los 27 CTOs incluidos en el biobanco de organoides	176
Anexo 2. Tabla de las ganancias y pérdidas reportadas en los organoides tumorales, resultantes del análisis del perfil de número de copias cromosomales.....	178
Anexo 3. Términos GO enriquecidos para los genes diferencialmente expresados en organoides tumorales con respecto a organoides normales.	189
Anexo 4. Términos GO enriquecidos para los genes diferencialmente expresados en CTOs derechos, en comparación con CTOs izquierdos.	192
Anexo 5. Términos GO enriquecidos para los genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados en CTOs derechos, en comparación con CTOs izquierdos.	193
Anexo 6. Términos GO enriquecidos para los genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados en tejidos tumorales derechos, en comparación con tejidos tumorales izquierdos.	195
Anexo 7. Detalle de los miRNAs diferencialmente expresados en los tejidos tumorales derechos de CCR.	196
Anexo 8. Análisis de expresión diferencial de miRNAs en tejido tumoral vs tejido normal proveniente de pacientes con CCR.	197
Anexo 9. Ensayo de sensibilidad de los CTOs a 5-FU, Oxaliplatino y a la combinación de ambos.	198

ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracilo	H&E	Hematoxilina y Eosina
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>	HCUV	Hospital Clínico Universitario de Valencia
BME	<i>Basement Membrane Extract</i>	IF	Inmunofluorescencia
CAFs	<i>Cancer Associated Fibroblasts</i>	IHQ	Inmunohistoquímica
CCP	Cultivos de corto plazo	iPSC	<i>inducible pluripotent stem cells</i>
CCR	Cáncer Colorrectal	lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
CCRL	Cáncer Colorrectal Localizado	LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
CCRm	Cáncer Colorrectal Metastásico	MB	Medio Basal
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica	MC	Medio Completo
CIMP	<i>CpG Islands Methylation Phenotype</i>	miRNA	micro RNA
CIN	<i>Chromosome Instability</i>	MMR	<i>Mismatch Repair</i>
CLP	Cultivos de largo plazo	MSI	<i>Microsatellite instability</i>
CMS	<i>Consensus Molecular Subtypes</i>	MSS	<i>Microsatellite stable</i>
cnLOH	<i>Copy neutral Loss of Heterozygosity</i>	NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
CNO	<i>Colon Normal Organoid</i>	PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
CNT	<i>Colon Normal Tissue</i>	PDO	<i>Patient Derived Organoid</i>
CNV	<i>Copy Number Variation</i>	PDX	<i>Patient Derived Xenografts</i>
CTO	Colon Tumor Organoid	SCNA	<i>Somatic Copy Number Alterations</i>

CTT	Colon Tumoral Tissue	ssGSEA	<i>Single Sample Gene Set Enrichment Analysis</i>
DCS	<i>Deep Crypt Secretary</i>	ST	<i>StemCell medium</i>
DFS	<i>Disease Free Survival</i>	TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
DMSO	Dimetil Sulfoxido	TPM	Transcritos por Millón
DO	<i>Disease Ontology</i>	UCIM	Unidad Central de Investigación en Medicina
ECM	<i>Extracelular Matrix</i>	UICC	<i>The Union for International Cancer Control</i>
EMT	Transición Epitelio-Mesénquima	UMP	Unidad de Medicina de Precisión
GO	<i>Gene Ontology</i>		
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis		

RESUMEN BREVE

El cáncer colorrectal (CCR) es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial, y es el tercero en incidencia. En los últimos años se han realizado grandes avances para entender mejor los aspectos clínico-patológicos y moleculares del CCR lo que ha conducido a una mejora de las terapias y aumentado la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, pese a estos avances muchos pacientes no se benefician de los tratamientos, lo que evidencia la necesidad de búsqueda de nuevos biomarcadores de respuesta y modelos preclínicos adecuados que permitan avanzar hacia una medicina más personalizada. En este contexto, la tecnología de los organoides ha revolucionado el estudio *in vitro* del cáncer, y presenta un gran potencial de aplicabilidad a la práctica clínica, tanto como modelos para estudios a nivel molecular como posibles modelos predictivos de respuesta a fármacos.

En este trabajo se describe la puesta a punto de un protocolo para el establecimiento de organoides tumorales (CTOs) y normales (CNOs) derivados de pacientes con cáncer colorrectal localizado, tratados en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) y la generación de un biobanco de estos modelos en el Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA. Tanto los organoides como el tejido del cual derivan, se han caracterizado a nivel morfológico y molecular observándose una elevada correlación entre ellos. A nivel genómico, se utilizó un panel de secuenciación NGS de diseño interno y se observó que los organoides exhibían las mismas mutaciones presentes en el tejido del cual derivaban. Del mismo modo, los organoides tumorales presentaban un perfil de número de copias genómico que coincidía con el perfil del tejido de origen. Por otro lado, fue importante observar que, al analizar los perfiles de expresión génica, mediante secuenciación de RNA, también existía una alta correlación cuando se comparaba el componente epitelial del tejido con los organoides derivados y además, este perfil de expresión se conservaba en los diferentes pases del cultivo. Todos estos análisis comparativos organoide/tejido a nivel molecular son un buen indicativo de hasta qué punto estas estructuras generadas están estrechamente relacionadas con el tumor de origen y permiten plantear estudios funcionales que ayuden a entender mejor el CCR.

Varios estudios sugieren que la localización del tumor primario en el colon influye sobre las características clínico-patológicas de la enfermedad, separando en dos entidades distintas al CCR derecho y CCR izquierdo. Sin embargo, hasta el momento no se han utilizado los organoides para

identificar biomarcadores que expliquen estas diferencias. En este trabajo se realizó un análisis de expresión diferencial entre organoides tumorales derechos versus izquierdos y se encontraron 632 genes diferencialmente expresados. También se realizó un estudio comparativo de expresión a nivel de miRNAs que llevó a la identificación de cinco miRNAs diferencialmente expresados en organoides derechos, todos ellos subexpresados en esta condición.

Por otro lado, una de las ventajas que presentan los organoides es la facilidad de manipulación *in vitro* que podría permitir el cribado de fármacos en base al perfil molecular del paciente del cual derivan, ayudando a decidir el tratamiento más adecuado. En este trabajo, se ha puesto a punto un protocolo para evaluar la respuesta de los organoides al tratamiento con diferentes fármacos.

En primera instancia, se realizó un ensayo de sensibilidad de los CTOs a quimioterápicos utilizados en el tratamiento del CCR y los organoides exhibieron distintos patrones de sensibilidad. La respuesta a quimioterápicos no se pudo relacionar con el estadio tumoral, sin embargo, si se observó que los organoides derivados de tumores localizados de estadio avanzado, localizados en el lado derecho del colon, exhibieron una menor sensibilidad al tratamiento con quimioterápicos. Estos resultados requieren una validación con mayor número de organoides.

De forma paralela, se evaluó la respuesta de los CTOs a fármacos inhibidores de dianas específicas, en base a las alteraciones moleculares presentes en las diferentes líneas de organoides, y se observaron diferencias entre ellos, acorde a lo esperado y reportado en la literatura, lo que parece indicar que su comportamiento se asemeja a lo que realmente ocurre en los pacientes.

Este trabajo ha contribuido a la generación de un procedimiento robusto y eficaz para la generación y caracterización de organoides tumorales procedentes de pacientes con CCR localizado con un gran potencial traslacional. En última instancia, se espera que este tipo de estudios puedan ayudar a comprender mejor esta enfermedad y conducir a tratamientos más personalizados en los pacientes con cáncer.

INTRODUCCIÓN

1.1 CANCER COLORECTAL

1.1.1 Incidencia y epidemiología del cáncer colorrectal (CCR)

El cáncer colorrectal (CCR) se define como una neoplasia epitelial maligna del intestino grueso y/o recto. Los tumores malignos colorrectales pueden originarse en cada una de las tres capas: mucosa, muscular y serosa, sin embargo, más del 90% de los CCR son adenocarcinomas. El CCR es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial y el tercero en incidencia. Hasta el 2020 se detectaron un total de 1.93 millones de casos nuevos de CCR diagnosticados a nivel mundial, lo que se traduce en un 10% de los casos totales de cáncer. En cuanto a la mortalidad, el cáncer colorrectal comprende el 9.4% del total de muertes relacionadas con cáncer, y solamente en el 2020 se estimaron alrededor de 935000 muertes relacionadas con esta enfermedad (Figura 1). En hombres, el CCR es el tercero en incidencia (10.6%), por detrás del cáncer de pulmón (14.3%) y de próstata (14.1%), mientras que, en mujeres, es el segundo cáncer con mayor incidencia (9.4%) después del cáncer de mama (24.5%) [1].

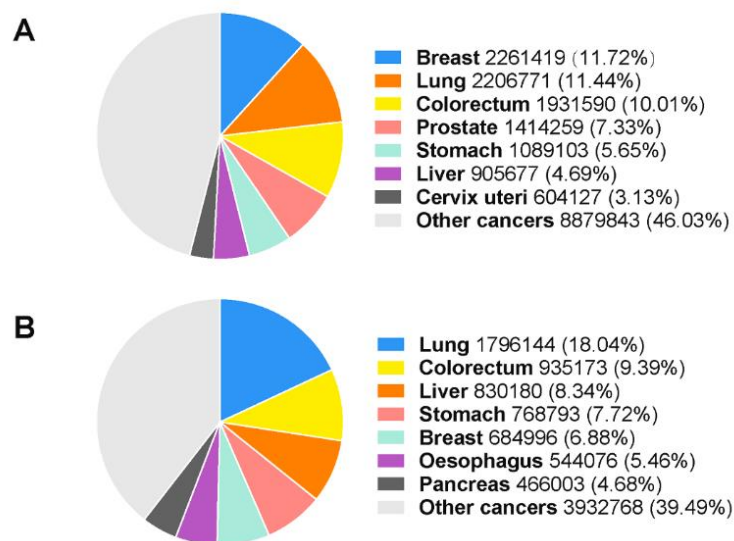


Figura 1. Número de casos diagnosticados (A) y muertes (B) asociados a cáncer a nivel mundial en 2020. Figura de Sung et al., 2021 [1]

Uno de los factores involucrados en el desarrollo de cáncer colorrectal es la edad. Más del 90% de casos ocurren en pacientes mayores de 50 años [2], aunque también se ha observado un aumento en la incidencia en adultos jóvenes menores de 50 años, en la población estadounidense [3].

El cáncer colorrectal generalmente es una enfermedad asintomática en estadios iniciales. Cuando aparecen síntomas como la anemia, dolor abdominal y sangrado rectal, los pacientes se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad. Por esta razón, se han implementado y fomentado programas de cribado para la población en general, utilizando herramientas menos invasivas que la colonoscopia convencional, como por ejemplo los test fecales, con el fin de detectar esta enfermedad en estadios iniciales y poco agresivos, donde el tratamiento es más efectivo [1,4].

La incidencia y mortalidad del cáncer colorrectal varía por regiones y países. Se ha visto una mayor incidencia en zonas con un alto nivel de desarrollo, como la Unión Europea, Australia y América del Norte. De hecho, la incidencia del cáncer colorrectal puede ser considerado como un marcador de desarrollo socioeconómico, ya que su incidencia en países en vías de desarrollo ha ido aumentando en los últimos años. El principal factor de riesgo en países con un alto índice de desarrollo es el sedentarismo, causando una menor actividad física y aumento de peso, lo cual está relacionado directamente con un mayor riesgo de padecer cáncer colorrectal. Otros factores de riesgo son el consumo de carne roja y alimentos ultra procesados, así como el consumo de alcohol y tabaco [1].

1.1.2 Estadiaje y clasificación molecular del cáncer colorrectal

Se ha descrito que la evolución genómica del cáncer colorrectal se da de una manera progresiva, en la cual el estadio corresponde directamente con el número de mutaciones adquiridas durante la progresión de la lesión, desde adenomas hasta procesos metastásicos [5]. Se estima que, de la carga mutacional observada en un caso de CCR, solamente 10 serían mutaciones conductoras o mutaciones *drivers* [6].

En 1988, Bert Vogelstein describió un proceso secuencial de adquisición de mutaciones y alteraciones relacionadas con el desarrollo y progresión de la tumorigénesis colorrectal [7]. En este modelo, que se conoce actualmente como Modelo de Vogelstein, se muestra una serie de pasos en donde la adquisición de mutaciones específicas y de alteraciones en el número de copias, se correlaciona con la transformación de la mucosa normal a adenoma inicial con grado bajo de displasia, posteriormente a adenoma tardío o adenoma con grado alto de displasia, y finalmente, adenocarcinoma (Figura 2).

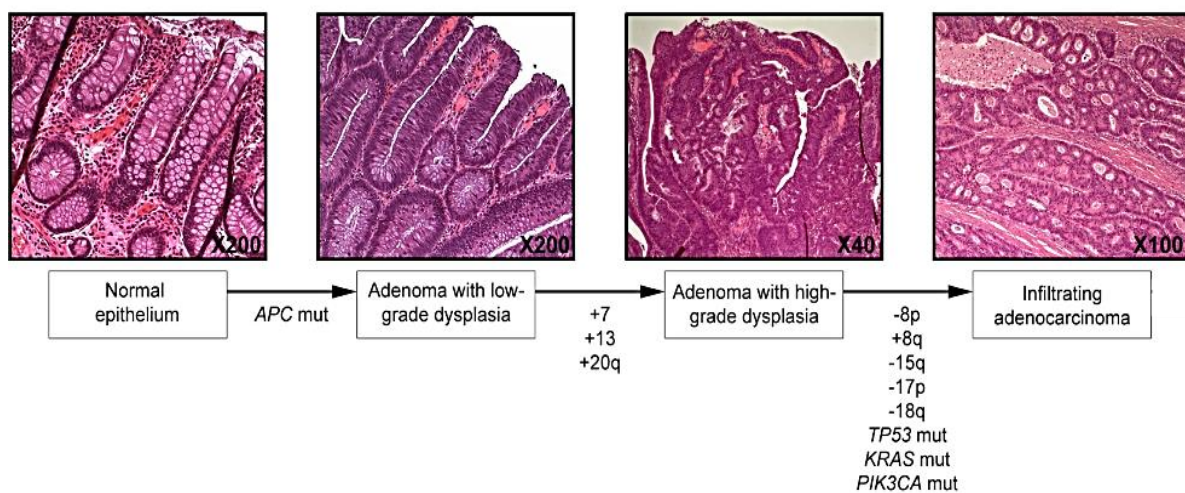


Figura 2. Modelo de Vogelstein. Este modelo describe los eventos mutacionales de cada estadio durante la generación y progresión del cáncer colorrectal desde la mucosa normal hasta el adenocarcinoma de colon. Imagen obtenida de Ried et al., 2019 [8].

El Comité Conjunto Americano del Cáncer (*American Joint Committee on Cancer, AJCC*) establece un sistema de clasificación tumoral en base a la descripción clínico-patológica y diseminación del cáncer. Según la evolución del cáncer colorrectal, los tumores se clasifican en 5 estadios. El estadio 0, o también denominado cáncer *in situ*, indica que existen células altamente proliferativas en la capa más superficial de la mucosa intestinal o *muscularis mucosae*. El estadio I indica el crecimiento del cáncer a través de la mucosa y la infiltración hacia la submucosa o *muscularis propria*. En el estadio II, el tumor ha infiltrado capas más externas de la mucosa intestinal, invadiendo la capa muscular y llegando hasta la capa subserosa y serosa. El estadio III comprende infiltración tumoral hacia las capas más externas

de la mucosa intestinal, así como también incluye la afectación a los nódulos linfáticos cercanos. Los tumores de estadio I, II y III se consideran tumores primarios o localizados. Finalmente, el estadio IV o estadio metastásico, comprende cualquier tumor que ha infiltrado cualquier capa de la mucosa intestinal, ha afectado a nódulos linfáticos y se ha diseminado por el cuerpo llegando a invadir otros órganos lejos del tumor primario [9].

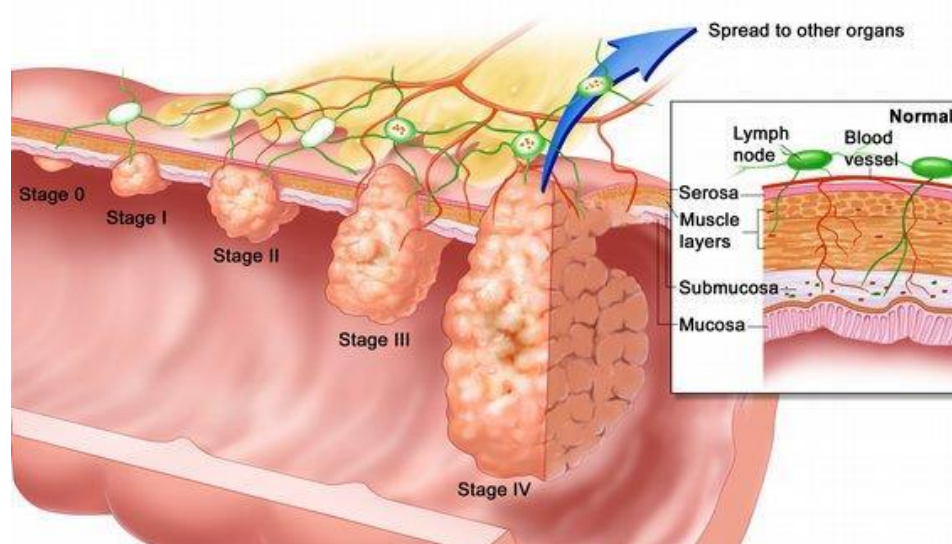


Figura 3. Esquema representativo de los estadios de cáncer colorrectal descrito por la AJCC. El gráfico en el recuadro indica la ampliación de una región donde se detallan las capas del colon que se ven afectadas durante la carcinogénesis. Imagen de The National Institutes of Health, 2015 [10].

Por otro lado, el sistema de clasificación TNM desarrollado por la AJCC en colaboración con la UICC (*The Union for International Cancer Control*), indica las características fisiopatológicas del tumor, como el tamaño y grado de infiltración del tumor (T), afectación de los nodos linfáticos (N) y presencia de metástasis fuera del sitio del tumor primario (M) [11]. En estadios iniciales el carcinoma *in situ* o T0, indica que las células de cáncer se limitan a la zona epitelial o a la *lámينا propia*. El parámetro T1 indica invasión del cáncer a la submucosa, T2 implica la invasión de la *muscularis propria*, T3 se refiere a la invasión tumoral en la *muscularis propria* y al tejido adiposo colorrectal, y T4 indica la invasión tumoral hacia otras estructuras. Se ha dividido este último en T4a y T4b, lo cual indica la invasión del peritoneo visceral o la invasión de otros órganos o estructuras, respectivamente [12].

En cuanto a la afectación de los nodos linfáticos, el parámetro N0 indica que no existen nodos afectados, N1a indica la invasión tumoral de 1 nodo linfático, N1b de 2-3 nodos y N1c indica la presencia de depósitos tumorales en otras zonas locales, aunque no sea en los nodos linfáticos; N2a se refiere al tejido tumoral invadiendo de 4-6 nodos linfáticos y N2b la invasión de más de 7 nodos [12,13].

El parámetro M o de metástasis se clasifica en M1a, cuando la metástasis se limita a un solo órgano, M1b cuando la metástasis se localiza en más de un órgano y M1c indica la metástasis peritoneal con presencia o ausencia de metástasis en otros órganos fuera del tumor primario [11,12].

Ambas clasificaciones, AJCC y TNM, se utilizan de forma combinada en la práctica clínica para referirse a las características de un tumor. Por ejemplo, un tumor de estadio I corresponde al estadiaje T1N0M0 o T2N0M0. La correspondencia de estas clasificaciones se detalla en la Tabla 1.

Sin embargo, debido a la gran variabilidad que existe en el pronóstico y en la respuesta de los pacientes a los tratamientos, este sistema no parece predecir eficazmente la eficiencia de los tratamientos. Por esta razón, se han desarrollado otros métodos de clasificación del CCR que se basan en las características moleculares del tumor, y han ganado bastante popularidad en los últimos años [5,14–16].

Tabla 1. Clasificación TNM del cáncer colorrectal. Tabla adaptada de Tong et al., 2018 [12].

Estadíaaje AJCC		Estadíaaje TNM		
		T	N	M
Estadio 0		Tis	N0	M0
Estadio I		T1-2	N0	M0
Estadio II	IIA	T3	N0	M0
	IIB	T4a	N0	M0
	IIC	T4b	N0	M0
Estadio III	IIIA	T1-2	N1/N1c	M0
		T1	N2a	M0
	IIIB	T3-4a	N1/N1c	M0
		T2-3	N2a	M0
		T1-2	N2b	M0
	IIIC	T4a	N2a	M0
		T3-4a	N2b	M0
		T4b	N1-2	M0
Estadio IV	IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a
	IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1b
	IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1c

La clasificación molecular del CCR comprende 4 grupos denominados CMS (por sus siglas en inglés *Consensus Molecular Subtype*). El subtipo CMS1, o subtipo inmunológico, corresponde al 14% de los casos de CCR y comprende tumores hipermutados, con inestabilidad de microsatélites (MSI) y con activación importante de la respuesta inmune. Presentan un genoma hipermetilado, principalmente en las islas CpG, lo que genera un fenotipo CIMP (*CpG Islands Methylation Phenotype*). En este tipo de tumores son frecuentes las mutaciones que afectan al gen *BRAF* y a genes que codifican proteínas involucradas en el mecanismo de reparación por apareamiento erróneo de bases (MMR – *Mismatch Repair*). El subtipo CMS2, o subtipo canónico, comprende el 37% de casos totales, y abarca tumores epiteliales con inestabilidad cromosómica (CIN) que generalmente poseen una activación en la señalización de las vías de WNT y MYC. Estos tumores se caracterizan por presentar un alto número de

alteraciones somáticas del número de copias (SCNAs). El subtipo CMS3, o subtipo metabólico, comprende tumores del tipo epitelial con una desregulación prominente en vías metabólicas y representa el 13% de casos. Se caracteriza por poseer tanto MSI, SCNAs y CIMP, y además presenta mutaciones en el gen *KRAS*. Por último, el subtipo CMS4, el subtipo mesenquimal, generalmente presenta activación en la vía de TGF- β ; los tumores de este subtipo presentan mayor grado de invasión del estroma y mayor presencia de angiogénesis tumoral, siendo uno de los subtipos más agresivos y con peor pronóstico, y corresponde al 23% de los tumores diagnosticados (Figura 4) [6,17,18].

También se ha descrito que los subtipos CMS se distribuyen siguiendo un patrón general, aunque no específico, a lo largo del colon y recto. Los tumores localizados en el lado derecho del colon, incluyen una mayor proporción de los subtipos CMS1 y CMS3, mientras que CMS2 y CMS4 se localizan mayoritariamente en tumores del lado izquierdo [19].

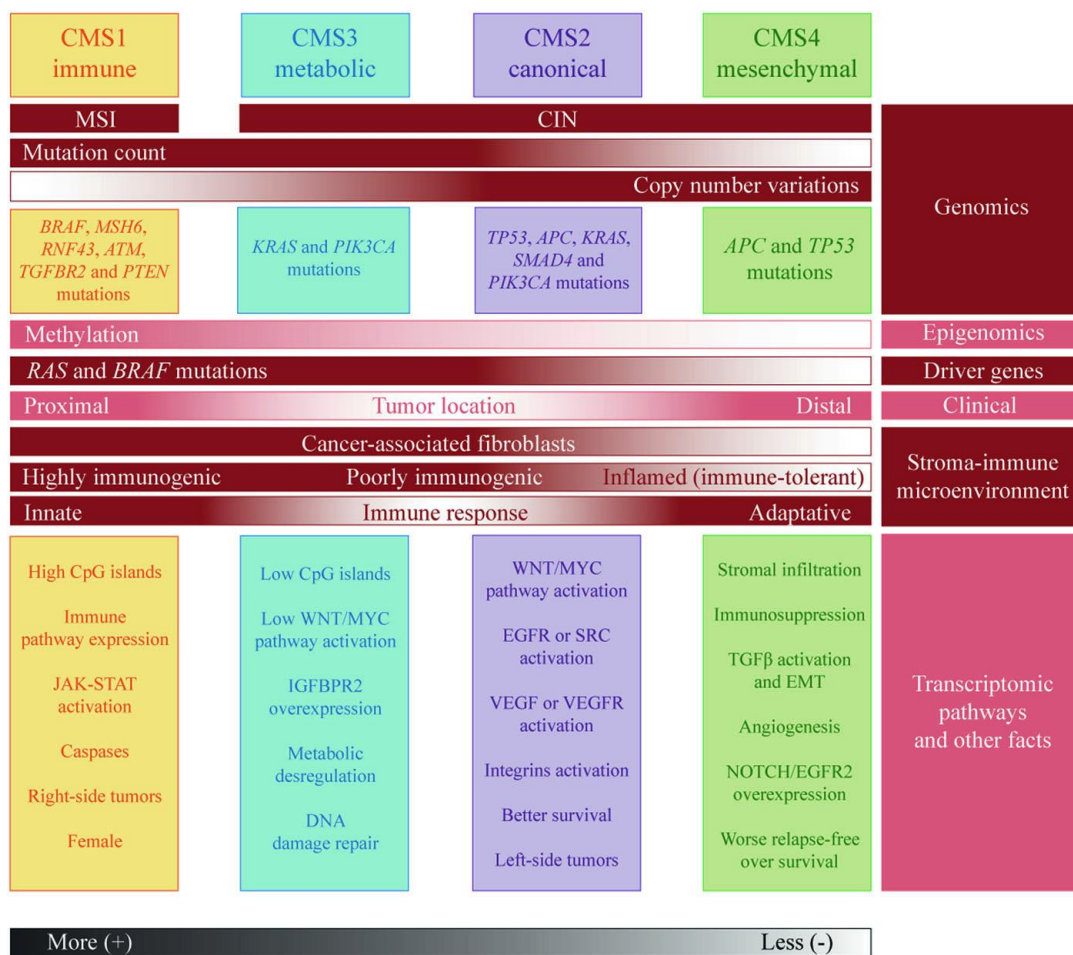


Figura 4. Clasificación de los subtipos moleculares del cáncer colorrectal. Imagen de López-Cortés et al., 2020 [18].

1.1.3 Alteraciones genómicas en cáncer colorrectal

Más del 90% de los casos de cáncer colorrectal tienen su origen en las células epiteliales del intestino [20] y por esta razón, las células madre del epitelio del intestino han sido foco de investigación como posibles iniciadoras del cáncer colorrectal [21,22] y como potenciales dianas de tratamiento.

Las células de cáncer presentan características distintivas del estado normal que promueven su transformación hacia un estado más agresivo, caracterizado por ventajas genéticas y metabólicas que aceleran la proliferación celular, una respuesta alterada a situaciones de estrés y a la muerte celular, capacidad de migración e invasión, entre otras. En los tumores se puede observar una alteración del microambiente, la vascularización de los tejidos y cambios en la modulación de la respuesta inmune [23]. Según el Modelo de Vogelstein, el cáncer se desarrolla y progresa a través de la adquisición de mutaciones conductoras que desencadenan la acumulación de más mutaciones, que confieren estas ventajas proliferativas y de supervivencia a las células tumorales. De forma general, estas mutaciones se dan en genes efectores de las vías de señalización implicadas en el mantenimiento de la homeostasis en el nicho intestinal: WNT, EGFR, NOTCH, TGF- β /BMP, HIPPO y p53 [24].

1.1.3.1 Vía de señalización de WNT

Una de las vías de mayor importancia para el mantenimiento de las células madre intestinales y su capacidad proliferativa es la vía de WNT. Las proteínas de WNT son factores que estimulan el crecimiento y la proliferación celular, por lo que su desregulación está estrechamente ligada con el desarrollo de cáncer [24,25].

En el epitelio intestinal, las células Paneth son las principales proveedoras de ligandos WNT, en forma de WNT3 [26]. La activación de esta vía de señalización en el nicho intestinal ocurre entre dos células que están en contacto estrecho una con otra, debido principalmente a la baja solubilidad de los ligandos WNT; por esta razón se genera un gradiente de concentración de WNT más concentrado en los fondos de las criptas de Lieberkühn y que disminuye conforme se acerca a los extremos de las vellosidades intestinales [25,26]. Aunque las células Paneth son las principales productoras de WNT, varios estudios apuntan a que existen fuentes redundantes de producción de este ligando, que pueden localizarse en el estroma más cercano a las células madre intestinales [27,28], aunque no existe un consenso respecto a

este hecho. El colon carece de células Paneth, pero se ha descrito una población celular que cumple su misma función, denominadas células DCS (por sus siglas en inglés *Deep Crypt Secretary*). Estas células se encuentran flanqueando las células madre en las criptas del colon, de la misma manera que las células Paneth del intestino y proveen la señalización necesaria para su mantenimiento [25,29].

El gen *APC* es un gen supresor tumoral que actúa como regulador negativo de la vía de WNT (Figura 5), alterada en el 93% de los casos de CCR [6,30]. *APC* forma parte del complejo de destrucción AXINA/*APC*, junto con la proteína del supresor tumoral axina 2 (*AXIN2*) y las quinasas *GSK3* y *CK1*; este complejo promueve la degradación constitutiva de β -Catenina en el citoplasma. En condiciones normales, la vía de WNT se activa mediante la unión de los ligandos WNT a un complejo transmembrana formado por receptores Frizzled (*FZD*) y *LRP5-LRP6*, que inactivan al complejo de destrucción AXINA/*APC*, permitiendo la acumulación de β -Catenina en el citoplasma y su translocación al núcleo. Aquí, la β -Catenina actúa como coactivador de factores de transcripción de la familia TCF/LEF y promueve la expresión de genes diana de esta vía [24]. β -Catenina además regula el crecimiento celular y la adhesión, así como el crecimiento independiente del anclaje en células epiteliales tumorales. En cáncer colorrectal, *APC* se encuentra mutado en más del 80% de casos de tumores no hipermutados, y en más del 50% en tumores hipermutados [6], causando una pérdida de función de la proteína. De esta manera, el complejo de destrucción AXINA/*APC* no es capaz de degradar la β -Catenina en el citoplasma, causando su acumulación y traslocación al núcleo. Debido a que *APC* forma parte del complejo de destrucción, la señalización se vuelve independiente de la presencia o ausencia del factor WNT. Esta es una de las características de los tumores de cáncer colorrectal que exhiben mutaciones en *APC*, su crecimiento es independiente de la señalización por el factor WNT.

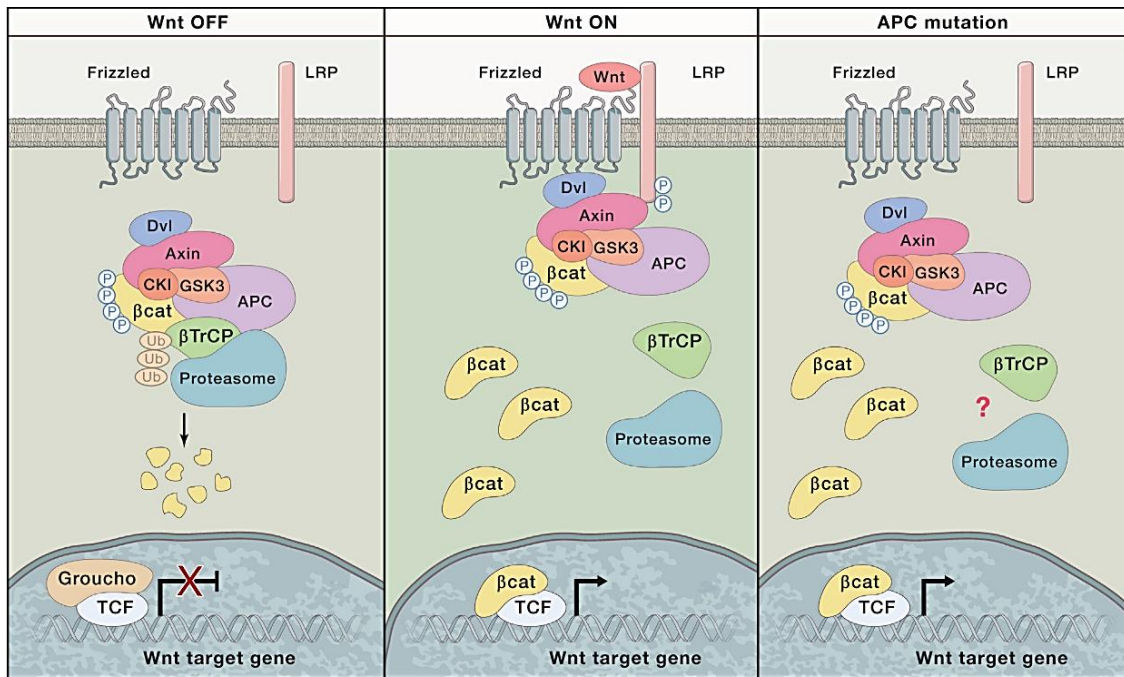


Figura 5. Vía de señalización mediada por WNT. En ausencia de WNT, el complejo de destrucción AXIN/APC induce la degradación de β -Catenina presente en el citoplasma. En presencia de WNT, se inhibe el complejo de destrucción, la β -Catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde promueve la expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Cuando APC no funciona correctamente, se obtiene el mismo resultado que tras la activación de WNT, causando la activación constitutiva de la vía de señalización, independiente de WNT. Imagen de Nusse & Clevers, 2017 [24].

Otros genes involucrados en la señalización de WNT son el gen que codifica la proteína axina 2 (*AXIN2*), y el gen que codifica la proteína de reclutamiento de membrana de APC 1 (*AMER1*) que actúa como estabilizador del complejo de destrucción AXINA/APC y promueve la degradación de β -Catenina en el citoplasma; ambos genes, *AXIN2* y *AMER1*, también se encuentran mutados en CCR, aunque en menor proporción que *APC*. Por ejemplo, se ha reportado que el 23% y el 37% de casos presentan mutaciones que inactivan a *AXIN2* y *AMER1*, respectivamente [6]. En esta misma vía, las mutaciones en el gen que codifica la proteína 7 que contiene repeticiones F-box / WD (*FBXW7*) se asocian con el desarrollo de CCR; esta E3-ubiquitina ligasa está involucrada en la degradación proteolítica de onco-proteínas como Notch, c-Myc y la ciclina E [31]. De igual manera, las mutaciones en el gen de la β -Catenina (*CTNNB1*) son del tipo activadoras, y aunque se encuentran en una frecuencia menor (< 10%), proveen a las células de la capacidad de crecimiento independiente de esta vía de señalización [32].

Por otro lado, la vía de WNT posee otros activadores, las R-spondinas (RSPO). Estas moléculas permiten la activación de WNT mediante su unión a receptores de membrana de la familia LGR. Cuando las R-spondinas se unen a un receptor LGR, se recluta a ZNRF3 o RNF43, ambas E3- ubiquitina ligasas, que son responsables de la constante degradación y regeneración de receptores FZD. De este modo, la unión de R-spondinas a los receptores LGR aumenta la cantidad de receptores FZD disponibles para la unión de ligandos WNT, y la activación subsecuente de la vía [24,25]. En cáncer colorrectal no se ha descrito la implicación de mutaciones en los genes que codifican las R-spondinas, aunque si se ha relacionado su nivel de expresión con la progresión tumoral. Niveles bajos en la expresión de R-spondina 2 (RSPO2) es frecuente en cáncer colorrectal, y correlaciona con el grado de diferenciación tumoral, su tamaño y la progresión a metástasis, por lo que se ha sugerido su papel como supresor tumoral en la regulación de la vía de WNT [33].

1.1.3.2 Vía de Señalización mediada por el Factor de Crecimiento Epitelial (EGFR)

La vía de señalización mediada por el factor de crecimiento epitelial (EGF) tiene un papel importante en la regulación del crecimiento, la proliferación y diferenciación celular, así como también en la migración, supervivencia y apoptosis [34]. La activación de esta vía está coordinada por el receptor de EGF (EGFR) también conocido como ERBB1 o HER1, que posee actividad tirosina quinasa, y a través de la cual cataliza la activación de las vías de las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) [25]. Este receptor está sobreexpresado en la mayoría de tumores; específicamente en CCR, la sobreexpresión de EGFR se ha encontrado en más del 60% de tumores diagnosticados, por lo que se considera un proto-oncogén [35].

El receptor del factor de crecimiento epitelial o EGFR está localizado en la membrana celular, y contiene un dominio extracelular en donde se unen una serie de ligandos, entre ellos EGF o TGF α ; un dominio transmembrana; y un dominio intracelular, el cual está involucrado en la activación posterior de la vía mediante su actividad de tirosina quinasa [36].

En la figura 6 se muestran las vías activadas tras la unión de ligandos al receptor ERBB1. En la activación mediada por PI3K, su reclutamiento a la membrana media la conversión de PIP2

en PIP3. Esta molécula, PIP3, activa AKT, que a su vez participa en la activación de dianas involucradas en la supervivencia, proliferación celular y prevención de apoptosis, como mTORC1 o GSK3 β . Por otro lado, se activa la vía RAS/MAPKs que a través de activar la quinasa ERK activa factores transcripcionales involucrados en la expresión de genes relacionados con la proliferación y la regulación del ciclo celular [34].

Dentro de la vía de señalización de las MAPKs, se encuentra una familia de genes relacionados con el desarrollo y progresión del cáncer colorrectal, la familia RAS. Entre sus integrantes se encuentran el oncogén viral del sarcoma murino de Harvey (*HRAS*), el oncogén viral del sarcoma murino de Kirsten (*KRAS*) y el oncogén viral de neuroblastoma (*NRAS*), que codifican proteínas con actividad GTPasas y que cumplen un papel fundamental en el control del ciclo celular y proliferación [37]. Cerca del 45% de casos de CCR poseen mutaciones activadoras en *KRAS*, *NRAS* o *HRAS*. De estos tres genes, *KRAS* presenta la frecuencia de mutación más alta en pacientes con cáncer colorrectal, con un 42% de casos [38]. Este estado de activación constitutiva promueve su unión a las proteínas de la familia RAF, que actúan generando una sobre activación de genes relacionados con proliferación, mediados por la proteína quinasa ERK. En cáncer colorrectal, el gen *BRAF* también se ha visto altamente implicado en el desarrollo de la enfermedad [39].

Finalmente, los receptores activados de ERBB1 actúan como proteínas activadoras de la familia de proteínas tirosina quinasas independientes de receptores (SRC), que junto con la quinasa Janus (JAK) catalizan la activación de las proteínas transductores de señales y activadoras de transcripción (STAT) y su translocación al núcleo [25]. El 95% de pacientes con cáncer colorrectal primario presentan una sobre expresión de proteínas SRC y en metástasis hepáticas existe un incremento de 2.2 veces los niveles de expresión si se compara con la mucosa normal [40].

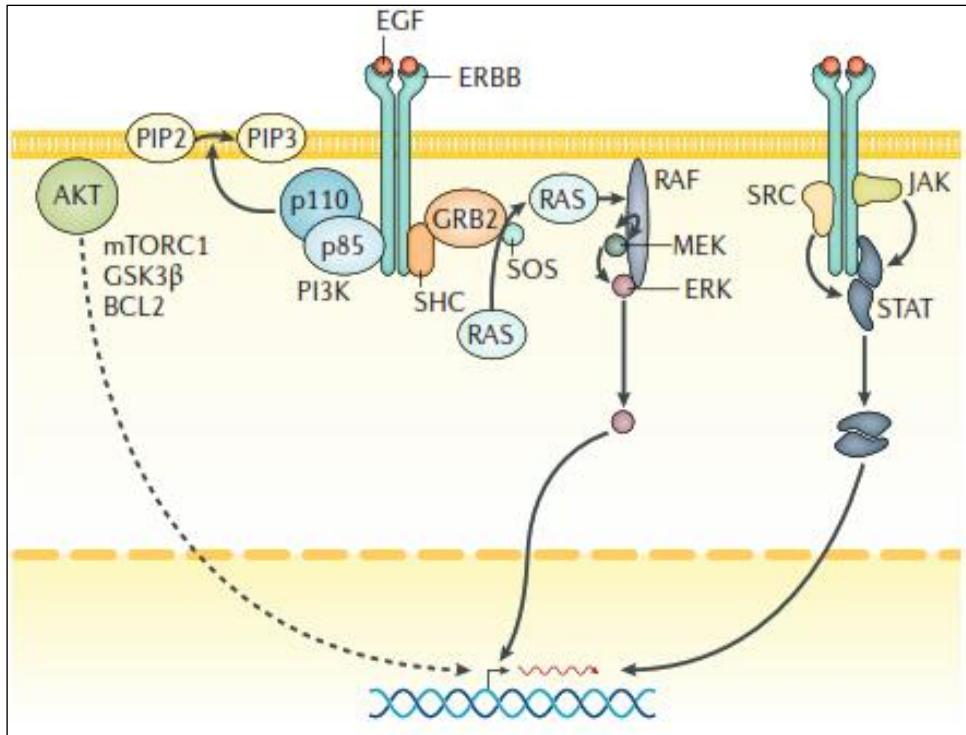


Figura 6. Vías de señalización mediadas por EGF. El receptor EGFR (también conocido como ERBB1 o HER1) posee un dominio extracelular, que permite la unión de sus ligandos, y un dominio intracelular, que cataliza la actividad quinasa. Por un lado, EGFR activa la señalización mediada por PI3K hacia la vía de AKT/mTORC1, mientras que, por otro lado, también ayuda en la activación de la vía de señalización de las MAPK mediada por RAS/RAF/MEK/ERK. Los receptores EGFR también catalizan la señalización mediada por JAK/STAT, permitiendo el reclutamiento de SRC, que ayudan a la fosforilación de las proteínas STAT y su traslocación en el núcleo. En los tres casos, la activación de estas vías permite la expresión de genes relacionados con la proliferación y regulación del ciclo celular. Imagen de Gehart & Clevers, 2018 [25].

Los ligandos EGF y TGF α , son producidos en el nicho intestinal, y se unen al receptor ERBB1, altamente expresado por las células madre intestinales. Por esta razón, se ha relacionado la alta actividad de la vía de EGF con una alta tasa de proliferación de las células madre tumorales [25]. Debido a que un aumento en EGF está relacionado con la proliferación desmesurada de células, esta vía está controlada estrictamente en el nicho intestinal. Las células madre expresan el gen de las repeticiones ricas en leucina y dominios similares a la inmunoglobulina1 (*LRIG1*) que actúa como regulador negativo de EGF, de forma conjunta con el receptor, aunque el mecanismo por el cual *LRIG1* regula EGF aún no se conoce en profundidad [25,41]. Sin embargo, se ha encontrado que los niveles de expresión de *LRIG1* son bajos en tejidos de tumores colorrectales, aunque esta medida no se considera como un factor de pronóstico en los pacientes [42].

1.1.3.3 Vía de Señalización de NOTCH

La vía de señalización de NOTCH es esencial para la regulación del crecimiento celular, proliferación, diferenciación y determinación del linaje de las células en los tejidos. Esta vía de señalización inhibe la diferenciación de las células madre y promueve su mantenimiento en las criptas [43]. En el epitelio intestinal humano existen 5 ligandos de NOTCH: Jagged-1, Jagged-2, Delta-like-1 (DLL1), Delta-like -3 (DLL3) y Delta-like-4 (DLL4); por otro lado, los receptores son NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 y NOTCH4. La señalización de NOTCH se realiza estrictamente mediante contacto celular, debido a que tanto los receptores de NOTCH como sus ligandos son proteínas que poseen un dominio transmembrana [44].

La vía de NOTCH se activa cuando el receptor se une a un ligando y causa un corte proteolítico en el dominio intracelular de NOTCH1 (NICD); este fragmento se transloca al núcleo, en donde se une al regulador transcripcional de la proteína de unión a señales de recombinación para la región de inmunoglobulina Kappa J (RBPJ). Cuando RBPJ no está unido a NICD actúa como un represor transcripcional; por el contrario, cuando se une a NCID es un activador transcripcional de los genes diana de esta vía (Figura 7). La célula que recibe esta señal auto inhibe su capacidad de producir ligandos para NOTCH1, lo que se conoce como inhibición lateral, causando que todas las células a su alrededor sean incapaces de activar la vía de NOTCH. Este mecanismo de encendido/apagado es altamente efectivo y asegura que haya una tasa equilibrada entre los progenitores de los linajes celulares en la zona de amplificación, entre el linaje de células absorbentes y células secretoras [25].

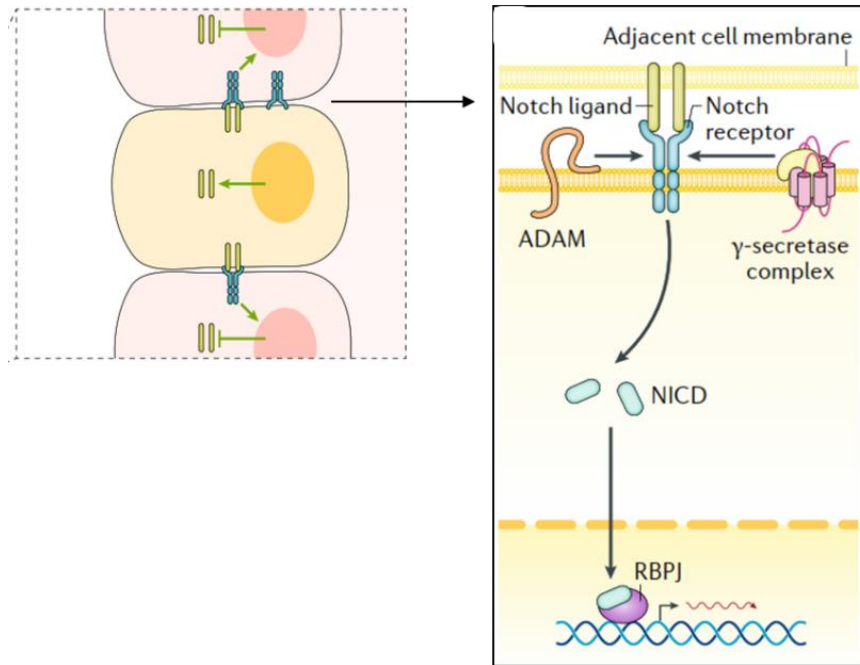


Figura 7. Vía de señalización de NOTCH. La señalización se da entre dos células adyacentes, debido a que tanto los receptores como los ligandos son proteínas de membrana. Cuando el ligando DLL1 o DLL4 se unen al receptor NOTCH1, el dominio intracelular de NOTCH (NICD) se rompe y se transloca al núcleo, en donde se une con RBPJ y activa la transcripción de varios genes relacionados con el crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Imagen adaptada de Gehart & Clevers, 2018 [25].

En CCR esta vía está alterada, en general por sobreexpresión, tanto de los ligandos como de los receptores de NOTCH. Niveles elevados de expresión de NOTCH1 se han correlacionado con la progresión tumoral, el estadiaje avanzado de los tumores y metástasis. Aguas abajo en la vía de NOTCH, se encuentra el factor de transcripción 1 BHLH de la familia Hes (*HES1*), que se encuentra sobreexpresado en CCR. *HES1* es un regulador negativo del factor de transcripción similar a Kruppel (*KLF4*), que es un represor transcripcional que se ha visto subexpresado en cáncer colorrectal. Además, la expresión constitutiva de NOTCH1 promueve la expresión de Jagged-1, que a su vez participa en la activación de otro ligando NOTCH; esta serie de activaciones se ha correlacionado con la expresión de genes implicados en la transición epitelio-mesénquima (EMT) a través de la interacción de NOTCH con los factores de transcripción SNAI1 y SNAI2 [44].

1.1.3.4 Vía de Señalización de TGF- β /BMP

La vía de las proteínas morfogénicas óseas (BMP) actúa de manera distinta al resto de señalización en el nicho intestinal. Mientras que los factores de la familia de WNT y EGF activan la capacidad proliferativa de las células madre, la vía de las BMP actúa de manera contraria, inhibiendo las señales de proliferación de estas células y promoviendo la diferenciación celular. En el epitelio intestinal, BMP también genera un gradiente parecido al de WNT, pero en dirección contraria (Figura 8A); así, BMP está más concentrado en los extremos de las vellosidades intestinales mientras que al fondo de las criptas su concentración es muy baja. Estas señales son estrictamente reguladas para evitar que el nicho se quede sin células madre intestinales; por esta razón, las células mesenquimales, como miofibroblastos o células musculares lisas, que están más cerca de las criptas intestinales producen inhibidores de BMP, como por ejemplo Noggin, Gremlin1, Gremlin2 o Chordin-like1 [25,45].

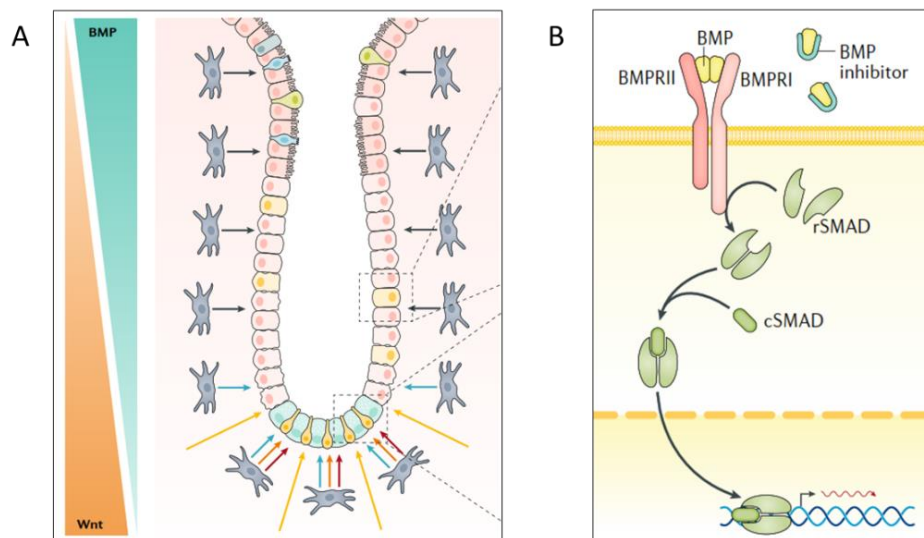


Figura 8. Vía de señalización de BMP/ TGF- β . A. En el nicho intestinal se han observado dos gradientes que recorren verticalmente las criptas y vellosidades intestinales. La señalización mediante BMP genera un gradiente de más concentración en los extremos de las vellosidades y menor concentración en las criptas, lo contrario al gradiente generado por WNT. Cuanto mayor es la concentración de BMP, mayor es la diferenciación de las células de los linajes epiteliales intestinales, y las señales de proliferación celular se inhiben. B. Los receptores BMPRI y BMPRII forman un dímero para interactuar con los ligandos de BMP. Esto cataliza la fosforilación y activación de las proteínas homólogas madres contra decapentapléjico reguladas por receptores (R-SMAD), que interactúan a su vez con SMAD4 para generar un complejo, que se transloca al núcleo y regula la expresión génica mediante el reclutamiento de la maquinaria de remodelación de cromatina y el acoplamiento con factores de transcripción específicos de tejidos. Imagen adaptada de Gehart & Clevers, 2018 [25].

En el epitelio intestinal, BMP2 y BMP4 son los ligandos principales de esta vía y pertenecen a la superfamilia de TGF- β . El receptor de BMP consta de dos dominios intermembrana (BMPR tipo I y BMPR tipo II) los cuales dimerizan al unirse a sus ligandos (Figura 8B). Cuando se unen a su receptor (BMPR1a), estos ligandos activan la fosforilación de SMAD1, SMAD5 o SMAD8, que se unirán posteriormente a SMAD4 y se translocarán al núcleo. Las proteínas SMAD tienen una afinidad alta por la unión al DNA, por lo que en el núcleo actúan como reguladores de la expresión mediante el reclutamiento de la maquinaria de remodelamiento de la cromatina [25,46].

En cáncer colorrectal, las mutaciones que inactivan estos genes son comunes; por ejemplo, SMAD4 se encuentra mutado en alrededor del 15 – 20% de casos de cáncer colorrectal [6]. Esta vía de señalización trabaja de forma paralela y contraria a la vía de WNT, y funciona como su modulador, dependiente del estado de las proteínas SMAD4 y p53. Cuando estas proteínas no poseen alteraciones en tumores de CCR, entonces BMP inhibe la señalización mediada por WNT, sin embargo, cuando SMAD4 está subexpresado, BMP no es capaz de contrarrestar a la vía de WNT [47].

1.1.3.5 Vía de Señalización de HIPPO

La vía de señalización de HIPPO está implicada en la regulación de la proliferación, crecimiento y apoptosis celular, así como en la determinación del tamaño de los tejidos y órganos y en su homeostasis, y se ha descrito que podría contribuir a la estimulación de la recuperación de los tejidos tras sufrir algún tipo de daño [48]. Sin embargo, esta vía de señalización actúa en convergencia con otras vías, principalmente porque sus efectores actúan como co-reguladores transcripcionales; por esto, la vía de HIPPO depende del estado de activación de efectores de otras vías con las cuales mantiene relación, como por ejemplo la vía de WNT, EGFR, NOTCH Y TGF β /BMP [49]. En esta vía de señalización se encuentran las quinasas similares a Ste20, MST1 y MST2 (Hippo/Hpo en *Drosophila*, y por el cual hereda el nombre la vía de señalización) que catalizan la activación de las quinasas LATS1 y LATS2 por fosforilación. Posteriormente, estas quinasas fosforilan a los reguladores transcripcionales de la proteína 1 asociada a Yes (YAP) y al co-activador transcripcional con motivos de unión a PDZ (TAZ), que son retenidos en el citoplasma mediante la unión a las proteínas 14-3-3 o se degradan a través

del complejo de destrucción AXINA/APC (Figura 9). En cambio, cuando las proteínas MST y LATS están inactivas, YAP y TAZ entran al núcleo y promueven la transcripción de genes asociados a la proliferación y diferenciación celular [50].

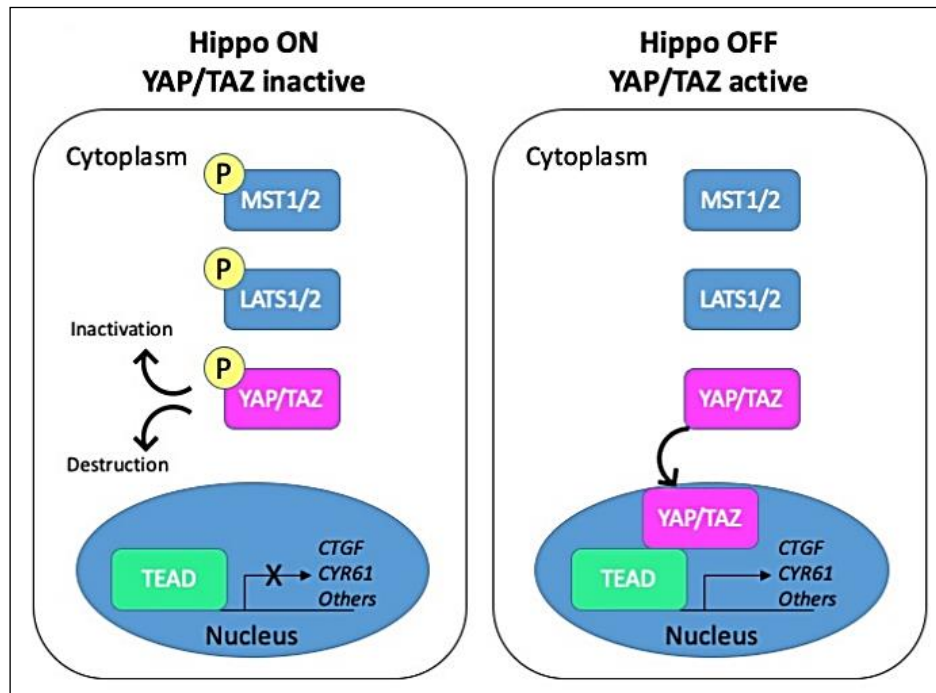


Figura 9. Vía de señalización de HIPPO. Cuando esta vía se encuentra activa, las quinasas MST1/2 se fosforilan y a su vez fosforilan a las quinasas LATS1/2. Finalmente, estas quinasas fosforilan a YAP/TAZ, lo que promueve su unión a las proteínas 14-3-3 para su retención e inactivación en el citoplasma, o su destrucción. Cuando no existe esta fosforilación en las proteínas MST/LATs, YAP/TAZ se translocan al núcleo en donde activan la transcripción de genes asociados a esta vía. Figura de Mouillet-Richard & Laurent-Puig, 2020 [49].

La señalización mediada por HIPPO está implicada en la regeneración tisular tras daño, promoviendo la regeneración de células Paneth y células madre intestinales, por lo que se ha descrito la sobreexpresión de YAP y TAZ en los procesos de tumorigénesis asociados a hiperplasia de las criptas [25].

Por otro lado, también se ha descrito la regulación de la vía de EGFR por YAP. En condiciones normales, RAS regula negativamente a la proteína supresora de la señalización mediada por citocina 6 (SOCS6), que funciona como sustrato de reconocimiento para YAP y cataliza su degradación. Cuando RAS está activada constitutivamente, la cantidad de SOCS6 disminuye

notablemente, causando una acumulación de YAP. Una de las dianas transcripcionales de YAP es la anfiregulina (*AREG*), un ligando de ERBB1 que promueve la activación de la vía de EGFR, generando un ciclo de activación oncogénico redundante. La sobreexpresión de *AREG* se ha reportado en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal [48,51]; además, los niveles altos de *AREG* en el suero de pacientes con CCR se ha correlacionado con tumores de estadio avanzado, así como una mayor invasión tumoral y metástasis [52].

Es interesante destacar que, también se ha visto que la sobreexpresión de YAP está asociada con resistencia al tratamiento con cetuximab en combinación con 5-fluorouracilo y oxaliplatino, en pacientes con enfermedad avanzada en estadio metastásico con un genotipo salvaje de *KRAS*, y que además correlaciona con un mal pronóstico en cualquier estadio de la enfermedad [49].

1.1.3.6 Vía de Señalización de p53

La proteína p53 es un factor de transcripción inducible por estrés que regula una variedad de genes en distintas vías de señalización. Esta proteína, también conocida como el “guardián del genoma”, está codificada por el gen *TP53*, y juega un papel importante en regulación del ciclo celular y la estabilidad general del genoma [53,54]. Cuando esta vía de señalización se activa, p53 activa a la E3-ubiquitina ligasa MDM2, que es un regulador negativo de p53. MDM2 cataliza la ubiquitinación y degradación de p53, generando un bucle de retroalimentación negativo que regula los niveles de p53 en las células en condiciones normales [54]. En condiciones de estrés, el gen *TP53* se sobre expresa en las células, causando la acumulación de la proteína p53, que activa la transcripción del gen inhibidor de quinasas dependientes de ciclina 1A (*CDKN1A* o p21), que inhibe la transición de la fase G1 a fase S, causando una parada del ciclo celular, para permitir la reparación del DNA (Figura 10). Cuando los daños al DNA son mayores y no se pueden reparar, se activan otros efectores, como el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina 2A (*CDKN2A* o p16) y el gen de la Leucemia promielocítica (*PML*) que causarían senescencia celular; por otro lado, el regulador de apoptosis BCL2, el gen de la proteína Noxa (*PMAIP1*) y el componente 3 de unión a BCL2 (*BBC3*) son activados por p53 para inducir apoptosis celular [55].

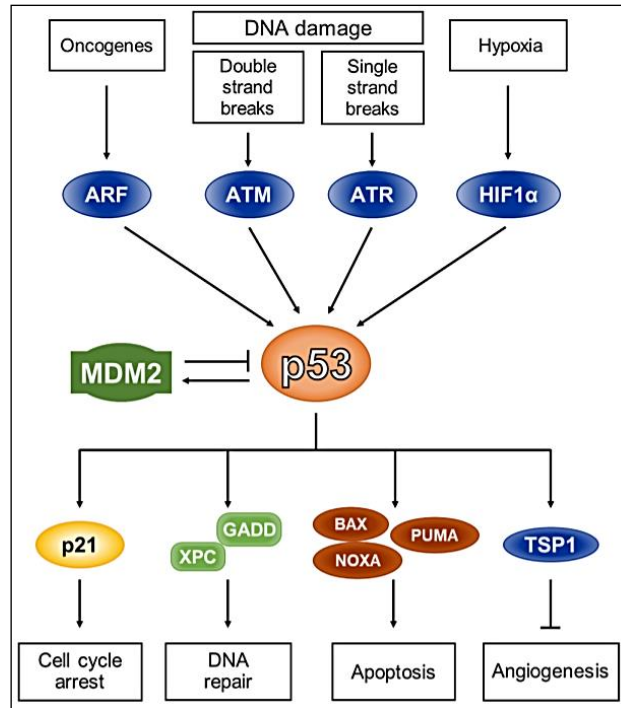


Figura 10. Vía de señalización de p53. En presencia de estrés celular como daño del DNA, estrés citotóxico, hipoxia, entre otros, se activa la cascada de señalización dependiente de p53 que activa o bien a p21, que induce una parada del ciclo celular, o activa otros efectores para generar senescencia o apoptosis. Las mutaciones en CCR generan ganancias o pérdidas de función de la proteína de p53, que influyen en su actividad como supresor tumoral y pueden promover características oncogénicas. Figura de Toma-Jonik et al., 2019 [56].

En cáncer colorrectal, alrededor del 60% de casos presentan alteraciones en la proteína p53. Se ha descrito que las mutaciones en *TP53* en tumores de CCR derecho son menos frecuentes (34%) que en tumores izquierdos (45%), aunque las razones por las cuales esto sucede se desconocen [54,55]. Es interesante destacar que las mutaciones en *TP53* que generan tanto ganancias como pérdidas de función en la proteína son responsables del desarrollo y proliferación tumoral. La pérdida de función de p53 está involucrada en la represión de la actividad de sus dianas transcripcionales, como p21 o p16, evitando que las señales de parada del ciclo celular o senescencia actúen correctamente. Por otro lado, las mutaciones que generan ganancias de función se han asociado a mutaciones sin sentido que ocurren en el dominio de unión al DNA, causando una pérdida de afinidad en la unión entre p53 y el DNA. Debido a que p53 funciona como un tetrámero, las ganancias de función se han descrito como mutaciones dominantes, ya que la proteína mutante es capaz de unirse a proteínas salvajes

p53 y limitan su función [57]. Las mutaciones de *TP53* se han asociado con la capacidad de metástasis del CCR, y se ha observado que los pacientes con una proteína p53 inactiva presentan de forma frecuente tumores de estadio avanzado y exhiben peores pronósticos que aquellos pacientes con una proteína del tipo salvaje. Las pérdidas del número de copias en el brazo corto del cromosoma 17 (17p), en donde está localizado el gen *TP53*, también se han reportado como un factor importante en la progresión de adenoma a carcinoma colorrectal [8]. Es importante resaltar que alrededor del 80% de tumores de CCR no hipermutados que presentan mutaciones sin sentido en *TP53* también presentan eventos de pérdida de heterocigosidad frecuentes, asociados a la pérdida del alelo salvaje.

1.1.4 Alteraciones transcriptómicas en cáncer colorrectal

De forma general, los análisis integrados del perfil mutacional, perfil de número de copias y expresión génica de tumores de cáncer colorrectal exhiben una desregulación de las vías de señalización de WNT, EGFR, PI3K, TGF- β y p53, descritas anteriormente. De éstas, la vía de WNT es la vía de señalización más frecuentemente alterada, en más del 90% de los tumores de CCR [6].

En CCR también se ha reportado un cambio general en las dianas de MYC con respecto al tejido sano, lo que cuadra con su rol como uno de los marcadores de inicio, crecimiento y progresión del cáncer colorrectal de estadios iniciales hacia estadios avanzados [58]. La activación de MYC se ha relacionado con la activación de la vía de WNT y la inactivación de la vía de TGF- β , que se encuentran frecuentemente alteradas en CCR, como se ha descrito anteriormente [6].

Las alteraciones somáticas en el número de copias (*Copy Number Variation*, CNV) a nivel genómico también generan un impacto en el perfil transcriptómico de la enfermedad. Los tumores presentan ganancias o duplicaciones en genes con actividad oncogénica, mientras que las regiones con genes supresores tumorales normalmente se encuentran perdidas. Por ejemplo, se ha descrito que las ganancias en 8q, 13q y 20q, así como las pérdidas en 8p, 15q, 17p y 18q pueden representar marcadores de progresión tumoral, ya que la presencia de 2 o más de estas alteraciones puede predecir con un 80% el riesgo de progresión de adenoma a

carcinoma. Sin embargo, es importante resaltar que, la asociación que existe entre las alteraciones de CNV y el nivel de expresión génica se ha evaluado solamente en los genes con actividad oncogénica o supresores tumorales, dejando un poco al margen la expresión de otros genes que no codifican proteínas, sino distintos tipos de RNA como los lncRNAs, miRNAs o ncRNAs, pero que se encuentran dentro de las mismas regiones, y de los que en muchos casos se desconoce el efecto que su expresión pueda ejercer sobre el proceso general de tumorigénesis [8].

Los micro-RNAs (miRNAs) son los RNAs no codificantes más estudiados a los que se les asigna un papel relevante en la regulación postranscripcional de la expresión génica en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal. En los últimos años, el papel de los miRNAs en el desarrollo, progresión y metástasis del CCR se ha reconocido ampliamente, y se les ha considerado como posibles biomarcadores de diagnóstico [59,60]. Los miRNAs son moléculas pequeñas de RNA no codificante, de alrededor de 18-22 nucleótidos de longitud, que actúan principalmente como reguladores negativos, uniéndose a las secuencias complementarias en la región sin traducción del extremo 3' (3'UTR) de sus RNAs mensajeros (mRNAs) diana, lo cual lleva a su degradación y por ende, a la inhibición de la traducción de estos mRNAs [61].

Además, se han relacionado los cambios en la expresión de algunos miRNAs con los subtipos moleculares CMS. Por ejemplo, en el subtipo CMS2 se ha encontrado una sobre expresión de un grupo de miRNAs de la familia hsa-miR-17-92, que están relacionados directamente con la señalización de MYC y sus dianas; el subtipo CMS3 se encuentra con frecuencia una baja expresión de hsa-let-7, acompañado de una expresión alta de *KRAS*. Por otro lado, la familia de miRNAs hsa-miR-200 se ha relacionado con la regulación del proceso de EMT, encontrándose subexpresadas en el subtipo CMS4 o mesenquimal, considerado el subtipo más agresivo y con peor pronóstico [17]. De forma interesante, se han encontrado algunos miRNAs circulantes en el plasma de pacientes con CCR, cuyos niveles se encuentran alterados, y que se pueden considerar biomarcadores de la enfermedad [60]. De hecho, la detección de miRNAs en sangre puede constituir un método no invasivo de diagnóstico emergente, que podría complementar el cribado mediante colonoscopia, método utilizado para diagnóstico de CCR.

1.1.5 Localización del tumor primario e implicaciones clínico-patológicas

El colon y el recto integran la parte final del tracto digestivo. Con fines de segmentación y localización del tumor primario, el colon se ha dividido en dos regiones. El colon derecho o proximal incluye el cecum, el colon ascendente y el colon transverso, hasta antes de la región esplénica; el colon izquierdo o distal incluye a la flexión esplénica, el colon descendente, la región sigmoidea y el recto (Figura 11). Anatómicamente, el colon derecho surge del intestino medio embrionario, mientras que el colon izquierdo se origina a partir del intestino grueso embrionario. Se ha descrito que los tumores que se originan en el colon son clínica y molecularmente distintos, en base a su localización [19]. Los pacientes que presentan un tumor localizado en el colon derecho tienen una menor tasa de supervivencia que los pacientes con tumores localizados en el colon izquierdo. Además, los tumores en colon derecho se suelen relacionar con pacientes de mayor edad, un tamaño mayor del tumor y estadios avanzados de la enfermedad [62].

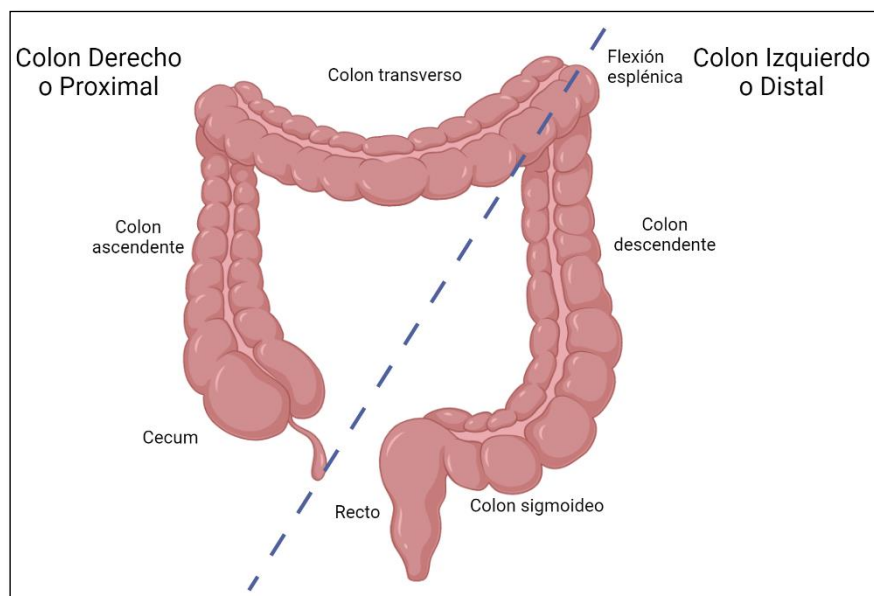


Figura 11. Anatomía del colon. El colon derecho o proximal comprende al cecum, el colon ascendente y el colon transverso, hasta antes de la flexión esplénica. El colon izquierdo o distal, incluye a la flexión esplénica, el colon descendente, la región sigmoidea y el recto. Figura creada en BioRender.com

En relación con las alteraciones moleculares también se han observado diferencias. Los tumores que se originan en el lado derecho del colon presentan un genotipo diploide, pero con una alta tasa de mutaciones acumuladas, es decir, son tumores hipermutados. Presentan, además, en mayor porcentaje, inestabilidad de microsatélites (MSI) y están enriquecidos en mutaciones en los genes *BRAF*, *PIK3CA* y *TGFBR2*. En su mayoría se clasifican dentro de los subtipos CMS1 y CMS3, aunque también pueden pertenecer a los otros subtipos moleculares. Por otro lado, los tumores izquierdos generalmente presentan una gran cantidad de eventos de pérdida de heterocigidad (LOH) e inestabilidad cromosómica (CIN). Presentan una mayor frecuencia de mutaciones en *KRAS*, y amplificaciones en *EGFR/HER2*, así como niveles altos de expresión de anfiregulina (*AREG*) y epiregulina (*EREG*). Principalmente se clasifican dentro de los subtipos CMS2 y CMS4 [19,62,63].

1.1.6 Tratamientos del cáncer colorrectal

El tratamiento oncológico del cáncer de colon y recto resecable es la cirugía. No obstante, dependiendo del estadio, de las características del tumor y de los riesgos para el paciente, la cirugía se complementa con diferentes tratamientos de quimioterapia, radioterapia o terapia dirigida en estadios más avanzados de la enfermedad.

En las últimas décadas se han realizado grandes avances para entender mejor los aspectos clínico-patológicos y moleculares del cáncer colorrectal que puedan aportar luz sobre nuevos tratamientos eficaces para esta enfermedad. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, el tratamiento estándar para CCR localizado y metastásico está basado en la quimioterapia mediante citotóxicos, y en menor medida, en terapias biológicas diseñadas para actuar sobre dianas específicas [18].

Por una parte, los citotóxicos comprenden moléculas que actúan inhibiendo la replicación del DNA. El principal quimioterápico es el 5-fluorouracilo (5-FU), un inhibidor de la enzima timidilato sintasa. Esta enzima cataliza la síntesis del timidilato (dTMP), un metabolito necesario para la correcta síntesis y reparación del DNA [64]. Este fármaco se puede usar en combinación con el oxaliplatino, un agente alquilante que previene la replicación y la transcripción ya que actúa como intercalante del DNA, produciendo enlaces cruzados entre

las bases del DNA [65]. De igual forma, el 5-FU se puede combinar con el Irinotecan, un inhibidor de la enzima Topoisomerasa 1 (TOP1). El irinotecan es un análogo de la camptotecina, y se metaboliza en el hígado para dar lugar al metabolito activo SN-38, que posee la actividad inhibitoria de TOP1. El Irinotecan en combinación con leucovorina (LV) y 5-FU se conoce como régimen FOLFIRI, y es usado ampliamente como tratamiento de primera línea para pacientes con cáncer colorrectal avanzado [66].

Gracias a los avances realizados en el estudio de la biología molecular del cáncer, se han desarrollado algunas terapias biológicas que permiten actuar específicamente sobre dianas moleculares. Estas terapias comprenden principalmente a inhibidores que se administran en combinación con la quimioterapia en pacientes de CCR estadio IV [67–69]. En este grupo están el inhibidor del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) o terapia anti-EGFR y los fármacos anti-angiogénicos.

En el caso de los inhibidores de EGFR, principalmente se ha aprobado el uso de anticuerpos monoclonales, como el *cetuximab* y *panitumumab*. En esta misma categoría, se están estudiando moléculas inhibitoras de tirosina quinasas, pero ninguna ha recibido aprobación para su uso terapéutico. Por otro lado, algunos fármacos anti-angiogénicos aprobados para su uso en pacientes con CCR incluyen al *bevacizumab*, un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el inhibidor del factor de crecimiento de placenta *alibercept* [69–71].

El tratamiento con los inhibidores de EGFR se restringe a los pacientes con un genotipo salvaje de RAS ya que los pacientes con mutaciones en RAS exhiben una activación constitutiva de la vía, haciendo que estos tratamientos no sean efectivos. En este contexto, *bevacizumab* es el único tratamiento dirigido que existe para pacientes con mutaciones en RAS; por esto, otras terapias buscan actuar en efectores o moléculas de señalización aguas abajo de estas vías. Por ejemplo, como prueba de concepto se ha descrito el uso de inhibidores de MEK como el *Trametinib* en combinación con el inhibidor de quinasa CDK4/6 *Palbociclib* en modelos con genotipo *KRAS* mutante, como líneas celulares de CCR y en xenoinjertos derivados de pacientes, en donde se han visto resultados prometedores [72].

En la vía de señalización de RAS/MAPK también se encuentra el gen *BRAF*, cuya mutación V600E se ha asociado con una mala respuesta a los tratamientos. En estos casos se ha recomendado el uso de *Vemurafenib*, un inhibidor de la enzima serina/treonina quinasa BRAF V600E, en pacientes con CCR metastásico avanzado [18]. Un estudio reciente determinó que el tratamiento simultáneo con *cetuximab*, *irinotecan* y *vemurafenib* resulta efectivo en el tratamiento de pacientes con CCR que presentan la mutación *BRAF V600E* en comparación con el tratamiento solo con *cetuximab* e *irinotecan* [73].

Por otro lado, se ha descrito el uso de anticuerpos como el *trastuzumab* en el tratamiento de pacientes con CCR avanzado que exhiben una amplificación en *HER2*. El *trastuzumab* se ha utilizado en combinación con el *lapatinib*, un inhibidor del dominio intracelular con actividad tirosina quinasa de EGFR y *HER2*, en un ensayo clínico denominado HERACLES, para evaluar la actividad de una doble terapia dirigida en pacientes con mCCR con *KRAS* salvaje y amplificación en *HER2*, mostrándose buenos resultados en este subgrupo de pacientes [74].

Adicionalmente, se ha propuesto el tratamiento con inhibidores de la proteína de muerte programada 1 (PD-1), como el *nivolumab* o el *pembrolizumab*, en pacientes con cáncer colorrectal metastásico con deficiencia en el sistema de reparación de desajustes en el DNA (dMMR) y con inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H) [75].

El estudio de las vías de señalización implicadas en el desarrollo y progresión de cáncer colorrectal, así como el de sus efectores y sus funciones es un punto de gran importancia para el avance en la búsqueda y descubrimiento de nuevas terapias dirigidas (Figura 12). De esta forma, el tratamiento de los pacientes podría basarse en las alteraciones moleculares individuales que presentan, avanzando hacia una medicina de precisión personalizada.

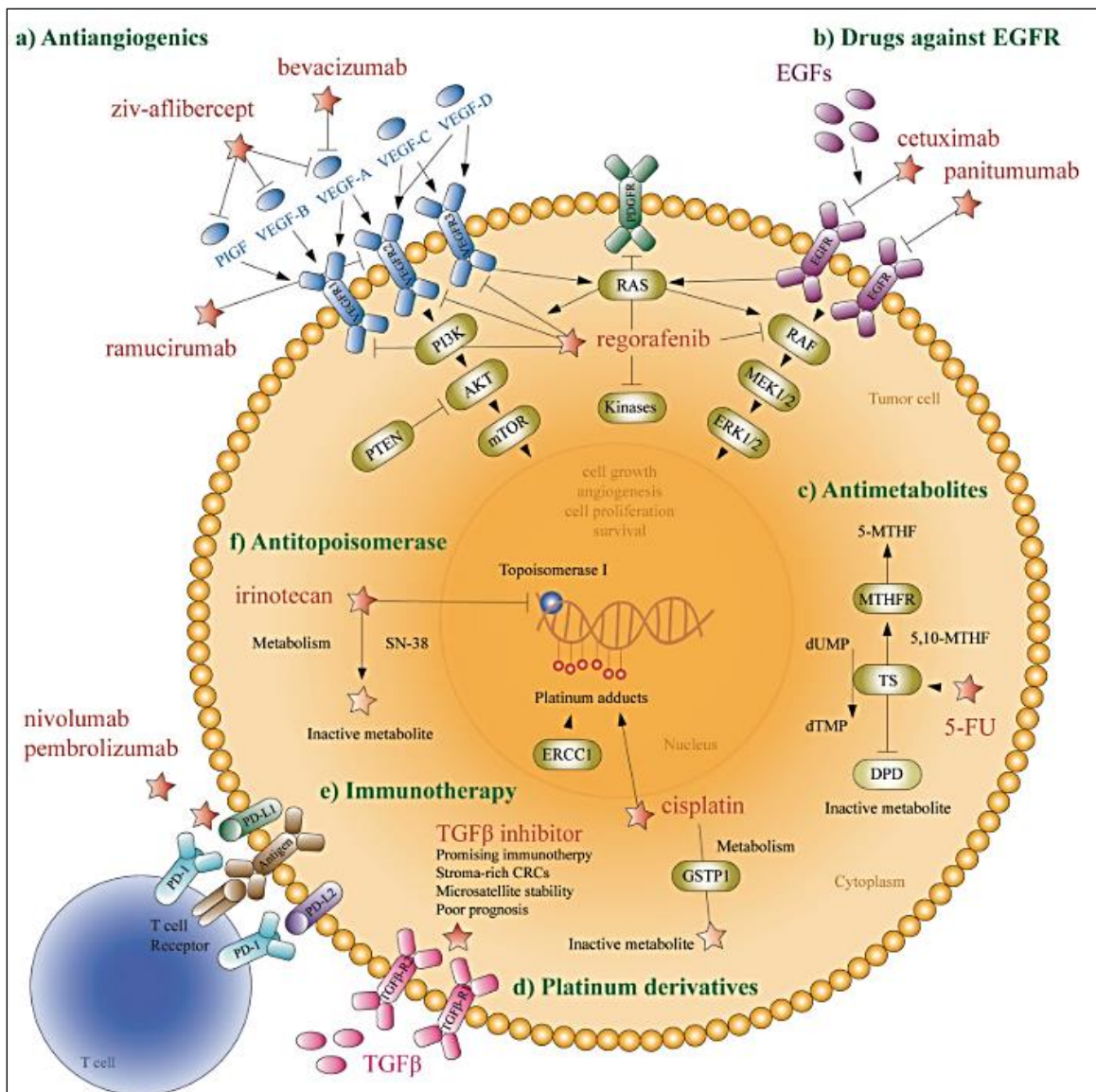


Figura 12. Fármacos utilizados en el tratamiento del CCR. Las terapias biológicas incluyen el tratamiento con anticuerpos e inhibidores de dianas específicas. Por ejemplo, la terapia anti-EGFR, como el cetuximab, inhibe la señalización a través de esta vía y por tanto, la activación de MAPK y PI3K; por otro lado, las terapias con anti-angiogénicos, como el bevacizumab, evitan la activación por la unión de VEGF a sus receptores. Las terapias biológicas se utilizan de forma general junto con la quimioterapia basada en citotóxicos. En esta categoría se encuentra el 5-FU, el oxaliplatino y el irinotecan. Figura de López-Cortés et al., 2020 [18].

1.2 LOS ORGANOIDES COMO MODELO PRECLÍNICO EN INVESTIGACIÓN

1.2.1 Antecedentes e historia de los organoides

En el epitelio intestinal, las células madre presentes en las criptas intestinales son las responsables de generar y mantener la renovación celular, dando lugar a células altamente proliferativas, que se diferencian en los diferentes tipos celulares epiteliales maduros; sin embargo, hasta hace poco se desconocían las características de esta subpoblación celular, lo que dificultaba su estudio *in vitro*. Los cultivos primarios derivados de pacientes exhibían un tiempo de crecimiento corto, ya que, en su mayoría, las células estaban diferenciadas en los diferentes linajes celulares y la composición del medio de cultivo no era el adecuado para el mantenimiento de las células madre [76].

En el año 2007, un grupo de investigación liderado por el Dr. Hans Clevers, identificó el receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (Lgr5) en el intestino de ratones, un marcador específico de células madre intestinales. Este hallazgo permitió localizar a estas células en las criptas intestinales, así como su aislamiento y el estudio de las condiciones óptimas para su cultivo [77]. Un par de años más tarde, el mismo grupo de investigación describió por primera vez la generación de un sistema de cultivo *in vitro* en 3 dimensiones usando esta población de células murinas Lgr5+ aisladas y, utilizando una matriz extracelular artificial para embeber las células, de modo que se proveía un soporte físico para su ensamblaje en estructuras tridimensionales [21].

Este sistema de cultivo contenía Matrigel, rico en laminina, que reemplazaba la matriz extracelular (ECM) y factores de crecimiento presentes en el nicho intestinal descritos previamente, incluido el factor de crecimiento epitelial (EGF), Noggin, WNT y R-spondin. Este coctel de factores permitió establecer un cultivo de organoides murinos capaz de mantener estas estructuras estables, a largo plazo y con características similares al epitelio intestinal, con la facilidad de la manipulación y mantenimiento *in vitro*. Posteriormente, este sistema se adaptó para el establecimiento de organoides intestinales humanos, y se añadieron al coctel de factores el inhibidor de TGF- β A83-01 y el inhibidor de p38 SB202190. Finalmente, se introdujo el uso del inhibidor de la quinasa Rho, para evitar la muerte por *anoikis* celular en las primeras etapas del cultivo [14].

La expresión de LGR5 no es exclusiva de las células madre intestinales, sino que se encuentra también en otros tejidos, como el pulmón, estómago, próstata, glándulas mamarias, hígado, páncreas, entre otros. Esta característica ha permitido el establecimiento de organoides a partir de una variedad de tejidos, con una estrategia similar a la utilizada con el epitelio intestinal [78] a lo largo de estos últimos años, y de una manera exponencial (Figura 13). El cultivo de organoides, o cultivos 3D, ha supuesto un gran avance para el estudio del desarrollo de enfermedades como el cáncer. Estos modelos son muy relevantes no solo en la investigación básica sino también en investigación traslacional, donde se proponen como modelos preclínicos de modelado de enfermedades, cribado de fármacos y respuesta a drogas. Suponen un paso más hacia una medicina de precisión y personalizada [79].

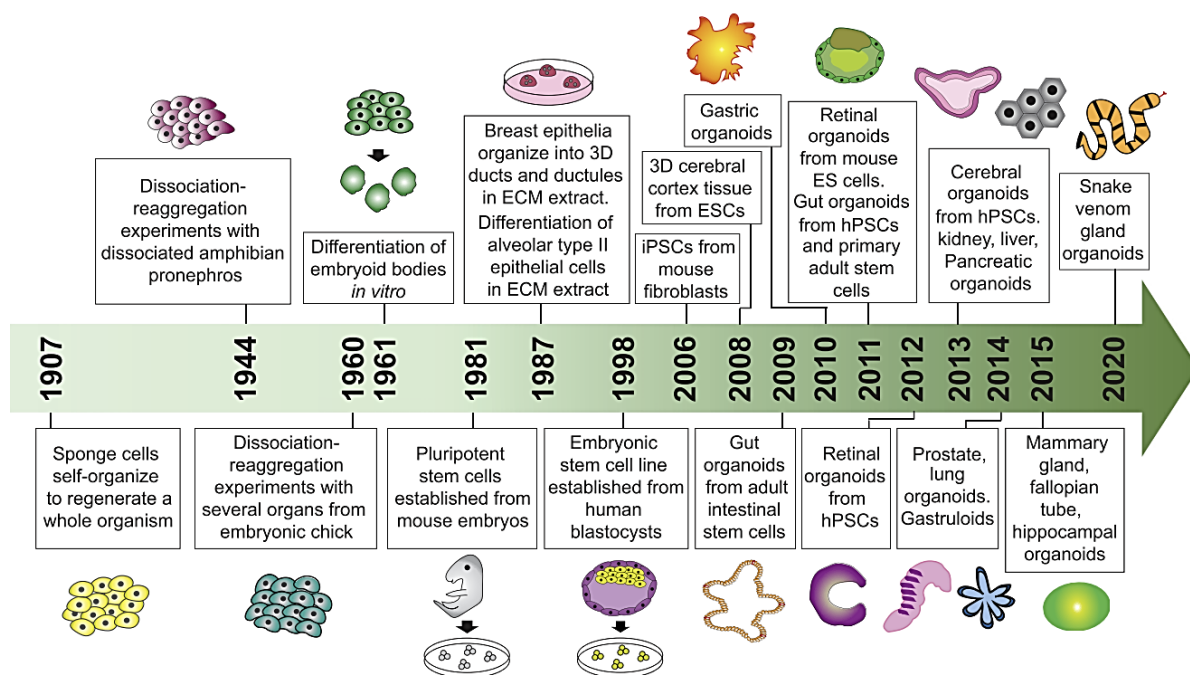


Figura 13. Historia de la investigación en organoides. Inicialmente, se estudió la capacidad de las células de formar agregados y regenerarse en estructuras definidas. En 1907 se usaron células de la esponja marina, que al ser disgregadas eran capaces de juntarse y formar una nueva esponja. Posteriormente, estos experimentos se llevaron a cabo en varios organismos, como anfibios y embriones de pollo. El siguiente avance llega con el estudio de las células pluripotentes intestinales establecidas a partir de embriones de ratón. También se observa la importancia de la matriz extracelular en la organización y señalización entre células, para formar agregados celulares. En el año 2007, llega el mayor hito en la investigación en organoides, cuando Sato y colaboradores demuestran por primera vez que las células madre adultas del intestino de ratón son capaces de diferenciarse y formar estructuras similares a las criptas, y que contienen las diferentes subpoblaciones celulares intestinales. A partir de este punto, la investigación con organoides se ha expandido rápidamente

durante los últimos años, y se ha extendido a varios órganos y modelos de enfermedad. Algunos ejemplos incluyen organoides de pulmón, páncreas, hígado, cerebro, endometrio y algunos nuevos modelos no humanos, como los organoides derivados de glándulas de veneno de serpientes, para el estudio de la venómica y la producción de suero antiofídico. Figura de Corró et al., 2020 [80].

1.2.2 Ventajas y limitaciones del cultivo de organoides

Las líneas celulares inmortalizadas de pacientes han sido el principal modelo para el estudio del cáncer *in vitro*, debido a su facilidad de manipulación y su bajo coste. Estos modelos en 2D comprenden células no diferenciadas, unipotentes y que carecen de señalización célula/matriz extracelular (EMC) y célula-célula propias de un tejido. A raíz del desarrollo de la tecnología de células madre pluripotentes inducibles (iPSCs) fue posible derivar modelos específicos de un paciente, permitiendo estudiar las alteraciones propias de un individuo, a diferencia de las líneas celulares inmortalizadas [81]; sin embargo, el costo, tiempo, recursos y conocimiento necesarios para establecer y manipular estos cultivos aún constituyen un desafío [78,82]. Sin embargo, ambos modelos, líneas celulares 2D e iPSCs, no recrean las condiciones de un tumor *in vivo*, como son el microambiente tumoral, vascularización, soporte y estructura. Con el fin de representar de manera similar las condiciones fisiológicas tumorales *in vivo*, se desarrollaron los Xenoinjertos Derivados de Pacientes (PDXs) en modelos murinos que permiten estudiar el proceso de establecimiento y desarrollo de varios tipos de cáncer en un ambiente fisiológicamente similar al humano. De igual manera, los ratones modificados genéticamente se han usado en el estudio y modelado del cáncer, por ejemplo, los ratones $Apc^{Min/+}$ se utilizan como modelos para estudiar el síndrome de FAP (*familial adenomatous polyposis*). Este modelo en particular presenta una mutación heterocigótica en el codón 850 del gen APC, generando una proteína trunca, que da lugar a un fenotipo similar al que exhiben los pacientes con FAP [83]. Sin embargo, la poca reproducibilidad y alto costo de manipulación de la experimentación con animales limita su uso en el cribado masivo de fármacos.

El modelo de organoides se sitúa como un modelo intermedio entre las líneas celulares y los modelos murinos. Los organoides recapitulan en cierta medida, algunas de las características del tejido del cual derivan, como la morfología celular, interacciones intercelulares y con la matriz extracelular, preservando la capacidad de las células de autoorganizarse en estructuras

complejas propias del tejido de origen [81]. Su manipulación es similar a las líneas en 2D en condiciones *in vitro*, se pueden propagar indefinidamente bajo las condiciones necesarias de cultivo y se dispone de material en poco tiempo, por lo que constituyen un buen modelo para el cribado masivo de fármacos entre otras muchas aplicaciones [84] (Figura 14). Los organoides se pueden establecer desde muestras iniciales pequeñas, como las biopsias de manera paciente-específica [14,85] y se pueden almacenar en biobancos para su uso posterior. Estos biobancos representan recursos valiosos para aplicaciones clínicas, como los análisis ómicos para la estratificación de pacientes y el cribado de fármacos enfocados a la medicina de precisión [14,86,87]. El amplio rango de tejidos de los cuales es posible derivar organoides ha hecho que este tipo de cultivos se convierta en el cultivo celular por defecto en muchos estudios biomédicos actuales [76,88].









	 GEMM	 MDO	 MDOX	 CLs	 PDX	 iPS	 PDO	 PDOX
Wild-type cell culture	+	+	+	-	-	+	+	-
Preinvasive cancer models	+	+	+	-	-	+	+	+
Invasive cancer models	+	+	+	+	+	+	+	+
Metastatic cancer models	+	+	+	+	+	+	+	+
Cost	\$\$\$\$	\$\$	\$\$\$	\$	\$\$	\$\$	\$\$	\$\$\$
Time	++++	+	++	+	++++	+++	++	+++
Success rate	high	med	med	med	med	low	med	med
Throughput therapies	low	med	low	high	low	high	med	low

Figura 14. Comparación entre los diferentes modelos que existen para el estudio y modelado del cáncer *in vitro*. Las líneas celulares (CLs) se han usado ampliamente para estudiar los diferentes aspectos moleculares del cáncer. También se han usado las líneas iPSC (induced pluripotent stem cells) para modelar la enfermedad de pacientes de forma individual. Los modelos murinos facilitan el estudio del cáncer en el contexto de microambiente tumoral y similitud de las condiciones *in vivo*. En esta figura se representan los ratones genéticamente modificados (Genetic Engineered Mouse Models, GEMM), ratones con injertos de organoides murinos (Murine-derived Organoids Xenografts, MDOX), ratones con injertos derivados de pacientes (Patient-derived Xenografts, PDX), ratones con injertos de organoides derivados de pacientes (Patient-derived organoid xenograft, PDOX). Los organoides derivados de ratones (Murine-derived organoids, MDO) y los organoides derivados de pacientes (Patient-derived organoids, PDO) permiten el modelado del cáncer y la manipulación *in vitro*. Figura de Tuveson & Clevers, 2019 [84].

Los organoides se pueden utilizar para el modelado del proceso de tumorigénesis, por la capacidad de las células madre tumorales de dividirse y diferenciarse en las poblaciones celulares propias del tumor del cual derivan. Sin embargo, este modelo carece de

microambiente tumoral, por lo que no recapitula enteramente las condiciones *in vivo* de la enfermedad [89]. Se ha descrito que la matriz extracelular y el microambiente tumoral juegan un papel importante en la señalización, crecimiento y propagación del cáncer [14,16,90,91], por lo que la falta del microambiente en el cultivo de organoides limita la capacidad de predicción de respuesta a diferentes tratamientos experimentales. No obstante, recientes estudios tratan de sortear este problema mediante el uso de cocultivos con otros tipos celulares, como fibroblastos asociados al tumor (*Cancer Associated Fibroblasts*, CAFs), Células mononucleares en sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) o linfocitos procedentes del tumor [92,93].

Los organoides representan la heterogeneidad celular propia del tejido del cual derivan, a diferencia de los cultivos en 2D. Los organoides contienen las células madre adultas del tejido inicial que son capaces de dividirse y diferenciarse en las diferentes poblaciones celulares que están presentes en el epitelio del tejido *in vivo*. Esta característica de los organoides ha permitido modelar los tejidos de forma individual con gran precisión, y les permite actuar como modelos precisos de enfermedades humanas, como el cáncer. Sin embargo, esta misma heterogeneidad puede influir en el cribado de fármacos, haciendo los resultados poco reproducibles entre diferentes biobancos de organoides derivados de un mismo órgano [81,84]. Aun así, los organoides han allanado el camino para los descubrimientos y aplicaciones en la biología humana y han representado un avance en la práctica clínica al proporcionar una plataforma para la detección de fármacos enfocado en la medicina de precisión.

Una limitación que presenta esta tecnología, y que ya se está tratando de resolver, es la falta de protocolos estandarizados específicos para el establecimiento y criopreservación de organoides, a pesar del gran crecimiento que han tenido en los últimos años como modelos de investigación. En la última década, se han desarrollado una gran cantidad de biobancos de organoides murinos y organoides derivados de pacientes, basados en el protocolo inicial descrito por Sato y colaboradores para su establecimiento, incluyendo ciertas modificaciones, lo que ha generado que no exista un protocolo estándar para el modelo de organoides. A diferencia de los biobancos de tejidos, células y muestras líquidas, la generación de un biobanco de organoides derivados de pacientes requiere un nivel mucho más alto de

coordinación, recursos adicionales y experiencia científica [94]. De hecho, el volumen de datos asociados a estos biobancos es mucho mayor, sin embargo, no existe un consenso sobre qué información relevante debe ser recogida con relación a la generación de estos cultivos y los pacientes de los que derivan. Por ejemplo, los detalles clínico-patológicos del paciente y el historial de tratamientos asociados a su patología antes o después de recoger la muestra de la cual se establecen organoides; las condiciones de establecimiento, cultivo y crecimiento a largo plazo de los organoides y las características morfológicas y moleculares, así como las estrategias definidas para el ensayo de fármacos. Toda esta información varía entre los biobancos de organoides derivados de pacientes y la necesidad de homogeneizar criterios es clara, si la finalidad es que estos modelos de organoides sean útiles para futuras decisiones clínicas [95].

1.2.3 Aplicaciones biomédicas de los organoides

Como se ha descrito anteriormente los organoides representan una nueva tecnología con un gran potencial en aplicaciones tanto en investigación básica, traslacional como en la clínica [89]. Los organoides han sido utilizados de forma mayoritaria para el modelado de enfermedades y estudios de toxicología como herramienta de la medicina de precisión [80], pero también exhiben un abanico amplio de aplicaciones. Algunos ejemplos se discuten a continuación.

1.2.3.1 Modelado de enfermedades genéticas

En el año 2013, Dekkers y colaboradores aplicaron esta tecnología para el estudio de la fibrosis quística en organoides intestinales generados a partir de pacientes. Esta enfermedad está causada por mutaciones en el gen *CFTR*, que codifica una proteína transmembrana que forma un canal de aniones y se expresa en células epiteliales del intestino y del pulmón. Las mutaciones en este gen causan un mal plegamiento de la proteína, que conduce a una degradación prematura, evitando que cumpla sus funciones celulares. Los pacientes con fibrosis quística acumulan moco en el recubrimiento epitelial de pulmones e intestino, que está asociado a infecciones bacterianas persistentes y resulta en una baja tasa de absorción de nutrientes y desnutrición [96]. El tratamiento para la fibrosis quística consiste en potenciadores o correctores de la expresión de *CFTR*, diseñados para mutaciones específicas;

pero existe un gran número de individuos que no obtienen beneficios tras la administración de este tipo de drogas y otros presentan mutaciones distintas para las que no se ha aprobado un tratamiento [97,98]. Dekkers y colaboradores generaron un ensayo robusto para detectar la funcionalidad de la proteína CFTR en organoides intestinales derivados de pacientes, utilizando forskolina, un compuesto capaz de activar el transporte aniónico dependiente de CFTR. En organoides sanos, con *CFTR* salvaje, la forskolina activa el transporte activo de agua e iones hacia el lumen interno de los organoides, causando que éstos se hinchen. En cambio, en organoides derivados de pacientes con fibrosis quística, que presentan una proteína CFTR deficiente, la forskolina no es capaz de inducir este comportamiento [96]. En otro estudio posterior, se utilizaron los organoides derivados de un paciente con fibrosis quística para evaluar una batería de fármacos y ayudar a las decisiones clínicas en su tratamiento. Este paciente presentó una mutación F508del en un alelo del gen *CFTR*, pero el tratamiento indicado para esta mutación específica no estaba surtiendo efecto en el paciente. Los investigadores derivaron organoides de una biopsia rectal del paciente, y luego utilizaron este modelo para evaluar una batería de fármacos que se utilizan convencionalmente en el tratamiento de la fibrosis quística. Los resultados de este ensayo permitieron encontrar un fármaco que presentó resultados positivos *in vitro*, y con el cual, posteriormente se trató al paciente, mejorando su estado de salud en unos pocos meses [99]. En este contexto, los organoides presentaron una herramienta para el cribado masivo de compuestos que ayudaron en la toma de decisiones clínicas para el tratamiento de pacientes con fibrosis quística.

1.2.3.2 Modelado de enfermedades infecciosas

Varios estudios se han basado en el potencial de los organoides de recapitular la fisiología y funciones del tejido de origen para estudiar los procesos infectivos de algunos virus, bacterias y parásitos [80]. Por ejemplo, los organoides han servido de herramienta para estudiar la relación huésped-patógeno en enfermedades infecciosas como la neumonía, la influenza, la infección por *H. pylori*, infección por *Cryptosporidium*, el síndrome respiratorio del medio oriente (MERS) y más recientemente, la enfermedad de COVID-19 [89,100,101].

Lamers y colaboradores usaron un modelo de organoides intestinales para evaluar la capacidad del coronavirus SARS-CoV-2 de infectar el epitelio intestinal, como una diana

secundaria de infección. Los síntomas respiratorios son típicos en pacientes con COVID-19, sin embargo, el 25% de estos pacientes presentan síntomas gastrointestinales. En este estudio, los autores encontraron que el epitelio intestinal permite la replicación viral del SARS-CoV-2, mediado por la interacción con el receptor ACE2, por el cual el virus ingresa a las células [101]. Los organoides, por tanto, representan un modelo con gran capacidad de generar resultados en un corto periodo de tiempo lo que puede tener una importante repercusión en diferentes aplicaciones clínicas.

1.2.3.3 Medicina regenerativa

Los organoides han tenido un gran impacto en el área de la medicina regenerativa y biología del desarrollo, ya que se basan en la capacidad de las células madre de autoorganizarse y autoensamblarse en estructuras complejas. Esta misma capacidad es la que desempeña un papel crucial en la reparación de tejidos u órganos dañados después de una lesión. Actualmente, los tejidos u órganos dañados se pueden reemplazar con tejidos u órganos sanos provenientes de un donante; sin embargo, existe una cantidad limitada de estos órganos y el problema grave de rechazo en el individuo que recibe el trasplante. Por este motivo, se han buscado otras fuentes de tejidos que sean accesibles para su uso inmediato en medicina regenerativa. La tecnología de organoides posee un gran potencial de aplicación en este contexto. Por ejemplo, Yui y colaboradores generaron organoides de colon derivados de ratones, e introdujeron una secuencia que expresaba GFP bajo el control del promotor de Lgr5. Posteriormente, trasplantaron estos organoides en el intestino de ratones con colitis ulcerativa y observaron que tras 4 semanas, las regiones dañadas del intestino de los ratones se veían recuperadas y expresaban el marcador de GFP [102].

En un estudio reciente, este modelo ha permitido la generación de organoides de piel derivados de células madre embrionarias de ratón. Este modelo recapitula los aspectos importantes del desarrollo tegumentario que da origen a las células precursoras de la epidermis [103], lo que permite estudiar en mayor detalle el proceso de regeneración de la piel y sus mecanismos de reparación a nivel estructural. Además, los organoides de piel han permitido el estudio de regeneración de los folículos capilares, lo cual constituye un avance importante en la medicina estética [104].

1.2.3.4 Oncología

Las líneas celulares de cáncer, los modelos murinos o los PDX han sido los modelos más utilizados para la investigación en cáncer. Como se ha descrito, los organoides presentan una gran cantidad de aplicaciones y se prevé que también en oncología tengan un gran impacto. La capacidad de los organoides de modelar el cáncer, incluyendo su complejidad molecular y aspectos como el perfil mutacional o respuesta a fármacos, los hacen una herramienta fundamental en la investigación básica y traslacional. En la actualidad existen una gran variedad de biobancos de organoides derivados de pacientes, entre los cuales se encuentran organoides de colon y recto, próstata, páncreas, hígado, mama, estómago, pulmón, endometrio, mucosa oral y cerebro[14,85–87,105–113]. Una de las ventajas de este modelo es que se pueden generar tanto organoides tumorales como organoides de tejido sano de un mismo paciente, lo que puede permitir seleccionar fármacos que se dirijan específicamente a las células tumorales, con un mínimo impacto en las células sanas [110].

1.2.4 Organoides como modelo de cáncer colorrectal

En cáncer colorrectal, el uso de los organoides como modelo de estudio ha abierto un abanico de posibilidades en la investigación tanto básica como traslacional. Esta enfermedad se origina en las células madre intestinales, por lo que el rol de esta población celular en la tumorigénesis se ha descrito ampliamente en la literatura. Sin embargo, aún existe cierto debate sobre los marcadores específicos de estas células. Como se ha explicado anteriormente, la identificación de las células LGR5+ como células madre del intestino permitió su aislamiento y estudio para posteriormente dar lugar a las condiciones necesarias para su mantenimiento y cultivo *in vitro*. Sato y colaboradores reportaron por primera vez la capacidad de estas células para dar origen a las estructuras propias del epitelio intestinal [21], abriendo las puertas a la tecnología de organoides. Por esta razón, era de esperar que el CCR fuera el primer cáncer que se modeló con esta tecnología. A partir de este estudio, la capacidad de generar organoides se tomó como un indicador de la presencia de células madre intestinales, a las cuales se les atribuyó el marcador LGR5+. Esta metodología luego se aplicó a tejido proveniente del colon, en donde se observó que las células capaces de generar organoides presentaron una mayor expresión de EPHB2, por lo cual, a la población de células madre en el colon se le atribuyó este marcador [79].

El modelo de organoides ha permitido la manipulación genética para el estudio de las mutaciones secuenciales que dan origen al cáncer colorrectal. Como se ha descrito anteriormente, esta enfermedad se genera por la acumulación gradual de mutaciones en genes específicos como *APC*, *TP53*, *KRAS* y *PIK3CA*. En los organoides, se ha utilizado la manipulación genética mediante tecnología CRISPR/CAS9 para introducir de forma consecutiva estas mutaciones en organoides derivados de mucosa normal, lo que ha permitido recrear *in vitro* las mutaciones que dan origen a la carcinogénesis y estudiar la dependencia de estos tumores a los factores presentes en el nicho intestinal [114].

En el área de investigación traslacional, los organoides han permitido realizar ensayos de cribado de fármacos a gran escala, gracias a su facilidad de manipulación, disminuyendo el uso de animales para este fin. En este contexto, la generación de biobancos de organoides de cáncer colorrectal aumenta enormemente la disponibilidad de modelos de esta enfermedad para el cribado de posibles fármacos con potencial uso terapéutico, así como también para la evaluación de la respuesta a fármacos que se utilizan de forma común en el tratamiento del cáncer colorrectal. Por ejemplo, Van de Wetering y colaboradores generaron un biobanco de organoides derivados de pacientes con CCR, y determinaron el perfil mutacional de cada organoide y el tejido correspondiente, observando una alta correlación. Por otro lado, evaluaron la asociación entre los genes con mutaciones específicas y la respuesta de los organoides a una batería de fármacos, identificando, por ejemplo, grupos de organoides con una pérdida de función en *TP53* que presentaron resistencia al inhibidor de *MDM2*, nutlin-3A, o un grupo de organoides con mutaciones en *KRAS* que presentaron resistencia a tratamiento anti-EGFR [14]. Estas asociaciones de genes y fármacos se han reportado en la literatura, y al observarse en los organoides, recalcan la utilidad y capacidad de predicción de este modelo. El uso de organoides tumorales intestinales como modelos de cribado de fármacos tiene una utilidad enorme en la aceleración del descubrimiento de nuevos fármacos enfocados al tratamiento del CCR [115], y pueden permitir descartar fármacos que no presentan actividad antes de ser incluidos en ensayos con animales de manera más eficaz que las líneas 2D [115]. Esto supone un avance en cuanto al uso de líneas celulares, ya que alrededor del 95% de fármacos que presentan actividad en cultivo 2D no alcanzan los ensayos clínicos [79]. Además, el perfil molecular de los organoides derivados de pacientes puede

revelar cambios genéticos que puedan ser responsables de la resistencia a ciertos medicamentos, que podrían usarse para estratificar a los pacientes en regímenes de tratamiento específicos más adecuados [116].

A pesar de que los organoides han revolucionado el cómo entendemos y estudiamos el cáncer colorrectal, y presentan una herramienta útil para la medicina de precisión, se debe tener en cuenta cuáles son sus limitaciones como un modelo de enfermedad. Como se ha discutido anteriormente, los organoides recapitulan las alteraciones genéticas, morfológicas y el perfil de respuesta a drogas de la población epitelial intestinal, pero deja de lado componentes importantes como el microambiente tumoral, que incluye a otros tipos celulares que se han visto involucrados en el proceso de tumorigénesis y que pueden repercutir en los resultados de un tratamiento específico. En un ensayo clínico reciente, denominado SENSOR (*Selecting Cancer Patients for Treatment Using Tumor Organoids*), se evaluó la capacidad de predicción de respuesta de organoides de CCR metastásico (CCRM) a varios fármacos aprobados para el tratamiento de esta enfermedad, así como algunos fármacos en fase avanzada de desarrollo clínico, y posteriormente trasladar estos resultados al tratamiento de los pacientes. Los resultados de este ensayo determinaron que, aunque se observó sensibilidad en algunos de los organoides tratados, estos resultados no se replicaron en los pacientes al recibir el tratamiento. Sin embargo, los autores discuten que existen varios factores limitantes que pueden afectar a la calidad del estudio, entre ellos la tasa baja de éxito en el establecimiento de organoides de CCRM (57%) ligada principalmente a la baja celularidad tumoral presente en las biopsias, el deterioro de los pacientes durante el desarrollo del estudio, que causa su salida de la cohorte de estudio, y el número limitado de pacientes (n = 31) que limita la capacidad de predicción de los fármacos utilizados *in vitro* [117].

OBJETIVOS

La tecnología de los organoides podría suponer una revolución en la manera en que estudiamos el cáncer colorrectal. Si bien las líneas celulares 2D han sido muy útiles, sus limitaciones para traducir los hallazgos a la clínica condicionan su uso. Por otro lado, los estudios en animales han sido fundamentales en el estudio del cáncer, pero las diferencias inter-especie limitan la capacidad predictiva de estos modelos, y su coste es muy elevado. Todo ello conduce a una necesidad urgente de la implementación de nuevos modelos de investigación con mayor capacidad predictiva. En este contexto, los organoides derivados de pacientes brindan una posibilidad como modelo de enfermedad en cáncer. Los organoides son cultivos 3D que representan modelos *ex vivo* del tejido de origen. Estos modelos replican las características genéticas del tumor del paciente del que derivan y permiten estudiar el tumor de un individuo específico en condiciones de laboratorio.

Aunque con sus limitaciones, este novedoso modelo preclínico presenta un gran potencial, no solo para entender los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo y progresión del CCR, sino también por su capacidad de predicción de respuesta a fármacos en pacientes. Sin embargo, se necesitan muchos estudios que avalen su utilización en ambos sentidos, y que permitan en un futuro su implementación en la práctica clínica. A tal efecto, en este trabajo de tesis doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estandarizar un protocolo para el establecimiento, mantenimiento y congelación de organoides derivados de pacientes con cáncer colorrectal localizado.
2. Generar un biobanco de organoides derivados de pacientes con CCR localizado.
3. Caracterizar los organoides generados tanto a nivel morfológico como molecular para determinar si éstos reflejan las alteraciones del tejido del paciente del que derivan.
4. Comparar el perfil de expresión génica entre organoides derivados de tumores localizados en el colon derecho o izquierdo para identificar biomarcadores de pronóstico o de respuesta a fármacos.
5. Analizar la expresión diferencial de micro-RNAs entre organoides tumorales derivados de colon derecho e izquierdo, que ayuden a entender los mecanismos moleculares subyacentes a las diferencias clínicas de estas dos entidades.
6. Evaluar la utilidad de los organoides como modelo predictivo de respuesta a fármacos.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Selección, reclutamiento de pacientes y circuito de recogida de muestras

Entre febrero del 2018 y diciembre del 2020 se incluyeron 43 pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal localizado (CCRL) en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV), atendidos por oncólogos del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA. Los pacientes que participaron en este estudio firmaron un documento de consentimiento informado de biobanco que permitió la recogida y procesamiento de muestras biológicas destinadas a la investigación. Los datos clínico-patológicos de los pacientes se incluyen en la Tabla 2.

Para facilitar el desarrollo del estudio, se generó un circuito interconectado de recogida y procesamiento de muestras en el que trabajan de forma conjunta oncólogos, cirujanos, endoscopistas, patólogos e investigadores. Los oncólogos revisan periódicamente las listas de cirugías planificadas con la intención de identificar pacientes que vayan a ser sometidos a una cirugía de resección tumoral; una vez identificados y con el consentimiento informado debidamente firmado por el paciente, se comunica a los cirujanos la intención de recoger esta muestra en fresco. Tras la cirugía, la pieza llega rápidamente al servicio de Anatomía Patológica que introduce pequeños fragmentos (1-2 cm) tanto del tumor como de la región normal adyacente, a una distancia de 5 cm del tumor, en diferentes tubos de PBS frío para su procesamiento posterior en el laboratorio. En todos los casos, además se recogen muestras tumorales y normales para su inclusión en parafina y para su conservación, congeladas en fresco. En el caso de muestras de endoscopia el investigador recibe directamente los fragmentos de tejido en la sala de endoscopias.

El circuito cumple con lo dictaminado en el consentimiento informado, en el Reglamento Institucional y en las normativas ético-legales (Ley de Investigación Biomédica, de 3 de Julio; Real Decreto 1716/2011, sobre biobancos). Este procedimiento ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HCUV, número 2017/070.

Tabla 2. Características clínico-patológicas de los pacientes (n=43) incluidos en el estudio.

Edad promedio	67.8 (12 – 89 años)		
		(n)	(%)
Sexo	Masculino	25	58%
	Femenino	18	42%
Estadaje AJCC	I	7	16%
	II	16	37%
	III	15	35%
	IV	4	9%
	Adenoma	1	2%
Localización de la lesión primaria en colon	Derecho	20	47%
	Izquierdo	23	53%

2.2 Cultivo de organoides

2.2.1 Procesamiento del tejido primario

De las muestras de tejido obtenidas, se separó una parte para conservarla en fresco congelada a -80°C y el resto fue procesado para el establecimiento de organoides.

Las muestras de tejido se lavaron 8 – 10 veces con 5 mL de PBS frío, y se incubaron durante 30 minutos con PBS suplementado con antibióticos 2X (Penicilina-Estreptomicina 2%, primocina 200 µg/mL) a temperatura ambiente (TA). Tras este periodo, se realizaron un par de lavados con PBS frío para eliminar el antibiótico, y la muestra se cortó en fragmentos más pequeños con ayuda de un bisturí. Los fragmentos se incubaron con Liberasa (0.3 U/mL; Roche, 05401020001) y un inhibidor de ROCK Y-27632 (10 µM; BioScience, 129830-38-2) durante 1 hora en un baño a 37°C, pipeteando vigorosamente cada 10 minutos. A continuación, el tejido digerido se filtró por un filtro de 70 µm (Fisherbrand Sterile Cell Strainer, 22363548) y se sedimentaron las células liberadas por centrifugación (500 x g, 5 minutos, 4°C) en un tubo Eppendorf estéril de 50 mL (Eppendorf DNA LoBind Conical Tubes, 0030122232). Como paso opcional, con la intención de eliminar los eritrocitos y solo si el sedimento presentaba un halo de color rojo, se añadió 1 mL de ACK Lysing Buffer (Thermo,

Cat. No. A1049201), se resuspendió el sedimento celular y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Posteriormente, las células se resuspendieron en 1 mL de Medio Basal (MB, Tabla 3) y se procedió a su conteo mediante cámara de Neubauer. A continuación, se plaquearon 200 000 – 300 000 células por pocillo en placas no adherentes de 24 pocillos (P24W, CellStar, 662102) en gotas o domos de 30 μ L de matriz extracelular BME al 50% (R&D, 3533-010-002). Las placas se incubaron durante 20 minutos a 37°C, para permitir que la gota solidifique y finalmente se añadieron 500 μ L de Medio de cultivo Completo (MC, Tabla 4) para organoides tumorales o 500 μ L de medio comercial ST (Tabla 5) (Intesticult™ Organoid Growth Medium Human, StemCell Technologies, 06010) para los organoides derivados de tejido normal. En ambos casos, se añadió al medio un inhibidor de ROCK, Y-27632 a una concentración final de 10 μ M.

Las placas se mantuvieron en un incubador, en ambiente húmedo a 37°C y con un contenido de CO₂ del 5%.

2.2.2 Composición de los medios de cultivo

Tabla 3. Composición del Medio Basal (MB)

Componente	Referencia
DMEM/F-12	StemCell, 36254
HEPES 10 mM	Biowest, L0180-100
L- Glutamina 2 mM	Biowest, X0551-100
Penicilina/Estreptomina 1.50 X	Biowest, L0018-100
Primocina 150 μ g/mL	InvivoGen, ant-pm-1
Suplemento N2 1X	StemCell, 07152
Suplemento Neurocult SM1 1X	StemCell, 05711

Tabla 4. Composición del Medio Completo (MC) para establecimiento y crecimiento de CTOs

Componente	Referencia
Medio Basal (MB) (ver Tabla 3)	-
N-acetil L-cisteina 1 mM	SIGMA, A9165-25G
Nicotinamida 10 mM	SIGMA, N0636-500G
EGF 50 ng/mL	StemCell Technologies, 78006
Noggin 100 ng/mL	StemCell Technologies, 78060
A-8301 0,5 μ M	TOCRIS, 2939
SB202190 10 μ M	TOCRIS, 1264
Gastrina 10 nM	TOCRIS, 3006
R-Spondina 1 500 ng/mL	StemCell Technologies, 78213.1
FGF-10 10 ng/mL	StemCell Technologies, 78037.2
Prostaglandina E2 10 nM	TOCRIS, 2296
Y-27632 10 μ M	TOCRIS 1254

Tabla 5. Composición del Medio Comercial (ST) para establecimiento y crecimiento de CNOs

Factor	Referencia
Intesticult™ OGM Human Basal Medium (1 Volumen)	StemCell Technologies, 06010
Organoid Supplement (1 Volumen)	StemCell Technologies, 06010
Penicilina/Estreptomicina 1.50 X	Biowest, MS00DR100R
Primocina 150 μ g/mL	InvivoGen, ant-pm-1
Y-27632 10 μ M	TOCRIS 1254

2.2.3 Mantenimiento y control del cultivo de organoides

El medio de cultivo de los organoides se refrescó cada 48 horas para mantener siempre una concentración adecuada de los factores necesarios para su establecimiento y crecimiento. El medio se eliminó con una pipeta y se añadieron 500 μ L de medio fresco previamente atemperado, manteniendo intacto el domo de BME.

El crecimiento del cultivo de organoides se monitorizó al microscopio. Se recogieron datos como la densidad de organoides, morfología, estado de crecimiento y control de posibles contaminaciones, entre otros. Toda esta información se digitalizó y se adjuntó en la información disponible en la base de datos del biobanco de Organoides.

2.2.4 Pase y ampliación del cultivo de organoides

Cuando el cultivo de organoides alcanzó una densidad elevada se realizó una ampliación de éste. Para ello no fue necesario disociar hasta célula única los organoides, sino que se realizó una tripsinización parcial. En primer lugar, se eliminó el medio de cultivo del pocillo y se disgregó el domo de BME con PBS frío, en un tubo de 15 mL no adherente (Eppendorf DNA LoBind Conical Tubes, 0030122208). El tubo se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos, a 4°C, para ayudar a deshacer el BME y liberar los organoides. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200 μ L de tripsina Express (Life technologies, 12605-010) previamente atemperada a 37°C y el inhibidor de ROCK Y-27632, a una concentración final de 10 μ M. Se resuspendió el sedimento celular y se incubó en el baño a 37°C durante 5 minutos. Tras este tiempo se resuspendió el cultivo nuevamente con una pipeta para ayudar a la disgregación mecánica de los organoides. A continuación, se añadieron 2 mL de medio MB frío y se centrifugó el tubo a 500 x g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en un volumen determinado de BME 50% en MB (1:1). Este volumen depende de la dilución del cultivo original que se quiera realizar, dependiendo de la densidad y la tasa de crecimiento observada en cada línea de organoides. Se resuspendió con una pipeta con cuidado de no generar burbujas y se plaquearon 30 μ L de la suspensión por cada domo, en el centro de un pocillo de una placa de 24 pocillos (P24W). La placa se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 20 minutos, para permitir que el BME solidifique y posteriormente, se añadieron 500 μ L del medio correspondiente, suplementado con el inhibidor de ROCK Y-27632 10 μ M, dejando caer el medio por la pared del pocillo para preservar el domo de BME.

2.2.5 Criopreservación y descongelación de organoides

Para la congelación de organoides, se eliminó el medio de cultivo del pocillo y se añadieron 1000 µL de medio de congelación Bambanker (Cultek, BB02) frío. Se resuspendió hasta que el domo de BME no fuese visible. Este volumen se transfirió a un criovial (ThermoScientific, 377267) y se guardó a -80°C durante 24 horas en un recipiente CoolCell (-1°C/min). Transcurrido este periodo, el criovial fue trasladado al Biobanco de INCLIVA, y se almacenó en nitrógeno líquido.

Para la descongelación, el criovial se descongeló parcialmente a 37°C durante 1 – 2 minutos. A continuación, la suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf de 15 mL con 5 mL de medio MB y se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos, a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en 30 µL de BME 50% en MB, y se plaqueó en un domo, en el centro de un pocillo de una placa P24W. La placa se incubó en la estufa a 37°C para que el BME solidifique y se añadieron 500 µL del medio correspondiente, previamente atemperado a 37°C y suplementado con el inhibidor de ROCK Y-27632 a una concentración de 10 µM.

Los datos referentes a la criopreservación (nombre de la línea de organoide, número de pase, fecha, posición en Biobanco) se recogieron y almacenaron en la base de datos correspondiente al Biobanco de Organoides.

2.2.6 Nomenclatura de los organoides

Los organoides tumorales de colon primario se denominaron CTOs (*Colon Tumor Organoids*) y aquellos derivados de tejido normal se denominaron CNOs (*Colon Normal Organoid*). Las siglas van acompañadas de un número que corresponde al número de muestra recogida y procesada. En los casos en que se tomó más de una muestra del mismo tumor, este código va seguido de la identificación de cada parte, por ejemplo, -P01 y -P02, para indicar que se han tomado de 2 sitios distintos de un mismo tumor.

Los fragmentos de tejido de los que derivan estos organoides, almacenados en fresco a -80°C o incluidos en parafina se denominaron CNT (*Colon Normal Tissue*) y CTT (*Colon Tumoral Tissue*), y el mismo número de la muestra correspondiente.

2.3 Caracterización morfológica de los organoides y el tejido de origen

2.3.1 Inclusión en Parafina y tinción con hematoxilina-eosina (H&E)

Para preparar los organoides, se eliminó el medio del pocillo y se recogió el domo de BME con 500 μ L de PBS frío en un tubo Eppendorf de 50 mL. El pocillo se lavó con 500 μ L adicionales de PBS frío y se recogió en el mismo tubo. Se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos, a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 500 μ L de formaldehído al 4% frío, se resuspendió y se incubó 45 minutos a 4°C. A continuación, se colocó una alícuota de histogel (Thermo Scientific, HG-4000-012) en un termobloque, precalentado a 80°C, durante 1 – 2 minutos, o hasta que el histogel estuviese líquido. El tubo con los organoides fijados se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. La alícuota de histogel se atemperó durante 1 minuto y se añadieron lentamente 4 gotas de histogel sobre el sedimento de organoides utilizando una pipeta Pasteur, y se resuspendió la suspensión. El tubo se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, el bloque de histogel se extrajo del tubo, se transfirió a un cassette de histología y se introdujo en un procesador de tejidos automático (LEICA ASP6025), el cual deshidrata y parafina la muestra. Finalmente, se enfrió y cortó el bloque en secciones de 3 μ m en un microtomo y se montaron en cristales portaobjetos; estos portaobjetos se secaron a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se realizó la tinción.

Las piezas de tejido obtenidas por resección quirúrgica se fijaron en formaldehído al 10% tamponado. Tras la fijación, se introdujeron muestras de tejido representativo, tanto de la parte normal como de la tumoral, en cassettes de histología, y se introdujeron en el procesador de tejidos automático para su parafinización, al igual que los cassettes de organoides.

La desparafinación y tinción H&E, tanto de los cristales de organoides como de tejido, se realizó de forma automática en el equipo PT Link (Dako, PT10126) en el departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina (Hematoxilina: Dako, CS700; Eosina: Dako, CS701).

2.3.2 Inmunohistoquímica (IHQ)

Los cristales de parafinas de organoides se incubaron a 60°C en la estufa durante media hora y luego se desenmascararon en el equipo PT Link (Dako, PT10126) en tampón citrato (Target Retrieval Solution, Citrate pH 6, S236984-2; Target Retrieval Solution, Citrate pH 9, S236784-2) en el Departamento de Anatomía Patológica, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS de las muestras y el bloqueo de la peroxidasa endógena con la solución DakoREAL™ Peroxidase-Blocking (Dako, S2023) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo, se lavó nuevamente con PBS y se incubó la muestra con los anticuerpos primarios diluidos en solución EnVision FLEX Antibody Diluent (Dako, K8006) durante 45 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados consecutivos con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las referencias y concentraciones a las que se usan los anticuerpos primarios y secundarios se detallan en la Tabla 6. Se realizaron 3 lavados finales con PBS y 1 lavado con agua destilada, y se reveló usando Liquid DAB+Substrate Chromogen System (Dako, K3467), durante 5 minutos. Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina durante aproximadamente 10 minutos, y se montaron con Entellan (Merck, 1.07961.0500).

Tabla 6. Listado de anticuerpos para Inmunohistoquímica

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Referencia	Dilución
CK20	Dako	IR777	1:1
MUC2	Dako	IR658	1:1
CDX2	Dako	IR080	1:1
Anticuerpo secundario			
EnVision Flex/HRP	Dako	GV82311-2	1:1

2.3.3 Inmunofluorescencia (IF)

Los cristales de parafinas de organoides se incubaron a 60°C en la estufa durante media hora y luego se desenmascararon en el equipo PT Link en tampón citrato en el Departamento de Anatomía Patológica, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se

realizaron 3 lavados consecutivos con PBS, se añadió el anticuerpo primario diluido en solución EnVision FLEX Antibody Diluent (Dako, K8006), y se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS, se añadió el anticuerpo secundario diluido en PBS, y se incubó durante 1 hora en oscuridad. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS antes de su visualización.

Los organoides montados se observaron en un microscopio confocal espectral (LEICA TCS SP8), en el servicio de Microscopía Confocal de la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM), de la Universidad de Valencia. Los anticuerpos usados para inmunofluorescencia se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Listado de anticuerpos para Inmunofluorescencia

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Referencia	Dilución
E-Cadherin	Cell Signalling	3195T	1:200
KI67	Dako	IR626	1:1
Anticuerpos secundarios			
Ant- rabbit AlexaFluor647	Life Technologies	A31573	1:250
Anti-mouse AlexaFluor488	Invitrogen	A21121	1:250

2.4 Determinación de la tasa de crecimiento de los organoides

Los organoides se recuperaron en PBS frío y se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C para eliminar el BME tal y como se detalla en el apartado 2.2.4. El sedimento se resuspendió en 200 µL de tripsina Express suplementada con inhibidor de ROCK Y-27632 (10 µM), previamente atemperada a 37°C. En este caso, el objetivo fue disgregar los organoides hasta obtener células únicas, por lo que la incubación con tripsina se realizó durante 15 minutos en el baño a 37°C, pipeteando cada 5 minutos para favorecer la disgregación. A continuación, se añadieron 2 mL de medio MB frío y se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en medio MB. Se realizó un conteo de células utilizando la cámara de Neubauer y se sembraron 2000 células en 5 µL de BME 50% en medio MB en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (P96W) de fondo cóncavo (SARSTEDT, 83.3925500). Se incubó a 37°C durante 10 minutos para permitir que solidifique el BME y

posteriormente, se añadieron 100 μ L de medio MC suplementado con inhibidor de ROCK Y-27632 (10 μ M), a cada pocillo.

Los organoides se mantuvieron en cultivo durante diferentes tiempos hasta un total de 168 horas, refrescando el medio cada 48 horas. Durante este tiempo, se recogieron medidas de la viabilidad por triplicado, a las 0, 48, 96 y 168 horas de crecimiento, utilizando el reactivo CellTiter-Glo 3D[®] (Promega, G7570) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el reactivo Cell Titer Glo 3D y la placa de cultivo se atemperaron a 22 – 23°C durante al menos 15 minutos, y se añadió 1V de reactivo en cada pocillo; se disgregó el BME con pipeta y se resuspendió con cuidado de no formar burbujas. La placa se incubó a TA en oscuridad, durante 25 minutos. Posteriormente, se realizó la lectura de la luminiscencia en el equipo Fluoroskan Ascent FL (Thermoscientific). Se realizaron dos réplicas experimentales independientes, con un triplicado biológico en cada uno de los diferentes tiempos de la curva de crecimiento.

Se definió la tasa de crecimiento como el cociente entre la medida final (48, 96, 168 horas) y la medida inicial (tiempo 0 tomado 1 hora tras la siembra inicial de los organoides) de la luminiscencia y normalizada a porcentaje. Las medias de los triplicados se analizaron mediante GraphPad Prism V8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com), para determinar el área bajo la curva (AUC) para cada línea de organoide, para lo cual se usó un modelo de crecimiento exponencial Malthusiano (GraphPad Prism V8.0.1, Curve Fitting Guide).

2.5 Caracterización molecular de organoides y tejidos tumorales

2.5.1 Extracción de DNA genómico de organoides tumorales y tejido tumoral congelado

Para la extracción de DNA genómico, tanto de tejido congelado (tumoral y normal) como de organoides, se utilizó el kit QIAmp[®] DNA Micro Kit (Qiagen, 56304) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la extracción de tejido se utilizaron alrededor de 10 mg de tejido tumoral congelado y en el caso de organoides se utilizó 1 pocillo de una placa P24W, con una densidad elevada de organoides.

El DNA genómico se cuantificó mediante espectrofotometría en Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

2.5.2 Análisis del perfil de número de copias de organoides y tejidos tumorales

Con el fin de detectar alteraciones en el número de copias del genoma presentes en los organoides y en los tejidos correspondientes, el DNA aislado se analizó mediante el Array GeneChip® Cytoscan HD (ThermoFisher Scientific, Cat. No. 901835), en el Servicio de Análisis Multigénico de la UCIM.

Los datos obtenidos se analizaron con el software *ChAS Chromosome Analysis Suite* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Versión: 4.1.0.90 (r29400)) mediante un protocolo de trabajo de Muestra Simple (*CytoscanHD_Array Single Sample Analysis*), tomando como referencia la versión del genoma hg38. Posteriormente, los resultados se visualizaron en el portal de *ChAS Chromosome Analysis Suite*. Para determinar las alteraciones presentes en las muestras, se utilizó un filtro de 50 sondas por región y un tamaño de 100 kpb para ganancias, y 25 sondas por región y un tamaño de 100 kpb para pérdidas. Las alteraciones totales reportadas se analizaron utilizando R Studio (versión 1.2.5033) para generar los gráficos finales, con el paquete GenVisR [118].

2.5.3 Generación de librerías y secuenciación de DNA

Tanto la generación de librerías como la secuenciación del DNA de organoides y tejidos se realizó en la Unidad de Medicina de Precisión (UMP) del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA (Valencia). Las librerías se prepararon utilizando el kit HyperPlus Library Prep (Roche Diagnostics) y posteriormente, se realizó el enriquecimiento de las librerías generadas utilizando el kit Targeted Enrichment (Roche Diagnostics). La secuenciación se realizó con un panel de diseño propio de la UMP, denominado OncoSpot v1 [119]. La secuenciación *paired-end* se llevó a cabo en plataformas Illumina como MiSeq y NextSeq en función del número de muestras procesadas por tanda, con una profundidad media de 7 millones de lecturas por muestra. El panel OncoSpot, en su versión 1 consta de 87 genes (4 genes completos y 83 en los que únicamente se siguen *hotspots*); este panel contiene genes de interés en tumores

sólidos, entre los que se encuentran genes frecuentemente mutados en cáncer colorrectal como *APC*, *KRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *BRAF*, *ERBB2*, *FBXW7*, entre otros.

2.5.4 Extracción de RNA total de organoides tumorales y tejido tumoral congelado

Para la extracción de RNA total de organoides y de tejido congelado se utilizó el kit miRVana (Invitrogen, AM1561), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la extracción de tejido, se utilizaron alrededor de 10 mg de tejido tumoral congelado y en el caso de organoides se utilizó 1 pocillo de una placa P24W, con una densidad elevada de organoides. La cuantificación y análisis de integridad del RNA total extraído se realizó mediante el sistema TapeStation (Agilent Technologies).

El RNA extraído se almacenó a -80°C.

2.5.5 Generación de librerías y RNA-seq

Se utilizaron 400 ng de RNA total para la generación de librerías, utilizando los kits NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® Module (#E7760S), NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina® (Dual index Primers Set1) Module (#E7600S) y NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (#E7490S) (New England BioLabs) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La secuenciación *paired-end* se llevó a cabo en un instrumento NextSeq (Illumina, NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (300 Cycles), 20024908) con una profundidad de aproximadamente 33 millones de lecturas por muestra.

2.5.6 Generación de librerías y microRNA-seq

Para la generación de librerías de microRNAs, se partió de 50 ng de RNA total, y se utilizó el kit CleanTag™ Small RNA Library Preparation Kit (Trilink Biotechnologies, L-3206) y los adaptadores para secuenciación Index Primer Set 1 de Illumina (Trilink Biotechnologies, L-3204-24) según las especificaciones del fabricante. La secuenciación *single-end* se llevó a cabo en la plataforma NextSeq con una configuración de 75 x 1 ciclos, con una profundidad de aproximadamente 5 millones de lecturas por muestra.

2.5.7 Procesamiento de datos de secuenciación de DNA

Los datos crudos de secuenciación se procesaron en la Unidad de Bioinformática de INCLIVA, utilizando un *script* personalizado.

De las tablas generadas con los datos de secuenciación de DNA para identificación de mutaciones, se filtraron aquellas cuyo impacto fue de tipo “modificador”, y aquellas mutaciones que generaron una variante sinónima. Se eliminaron también aquellas mutaciones que se detectaron con una frecuencia alélica menor al 5%, y aquellas que presentaron una frecuencia poblacional mayor al 17%, siguiendo las recomendaciones de cribado de la Unidad de Medicina de Precisión. Los datos resultantes tras el cribado se analizaron mediante un *script* personalizado en R Studio (versión 1.2.5033) utilizando el paquete ggplot2 [120] para la generación de los gráficos.

2.5.8 Procesamiento de datos de secuenciación de RNA

El análisis bioinformático de los datos de RNA-seq se inició con el preprocesado de las librerías de RNA-seq con el programa fastp v0.20.1 [121]. Este paso consistió en la eliminación de las lecturas que eran demasiado cortas o de baja calidad, la eliminación de las bases de los extremos que tuvieron baja calidad y la eliminación de adaptadores. A continuación las lecturas se alinearon al genoma de referencia hg38 mediante STAR v2.7.6.a [122]. Las lecturas alineadas contra el transcriptoma se utilizaron para cuantificar los niveles de expresión a nivel de transcrito con el programa RSEM v1.3.1 [123]. El análisis de los resultados de cuantificación se llevó a cabo en R v4.1.1. Las medidas de expresión se agregaron a nivel de gen con el paquete tximport [124]. Para cada análisis de expresión diferencial, se realizó un filtrado previo de los genes poco expresados, descartando todos aquellos que tuvieran menos de 2 transcritos por millón (TPM) en tantas muestras como el mayor de los grupos de contraste más uno. Los análisis de expresión diferencial se llevaron a cabo con el paquete DESeq2 [125]. Con las listas de genes diferencialmente expresados obtenidas en el paso anterior, se realizaron análisis de enriquecimiento funcional con el paquete clusterProfiler [126]. Se determinaron como términos enriquecidos aquellos con un p-valor ajustado por FDR menor a 0,05.

2.5.9 Procesamiento de datos de secuenciación de microRNA

Las lecturas crudas fueron preprocesadas con el software fastp [121] para la eliminación de adaptadores y bases con una baja calidad. Seguidamente, se utilizó el pipeline de análisis smRNA-seq de nf-core [127] con los parámetros por defecto. La cuantificación de la expresión de los miRNAs maduros se realizó con SAMtools idxstats [128]. Posteriormente, se eliminaron en todas las muestras los miRNAs que daban un conteo de 0 en alguna de ellas. Los análisis de expresión diferencial se realizaron con el paquete DESeq2 [125]. Se determinaron como diferencialmente expresados aquellos miRNAs con un p-valor ajustado por FDR menor a 0,05 y valor de fold-change en escala logarítmica en base 2 y en valor absoluto mayor a 1. Para cada análisis de expresión diferencial, se extrajeron los genes diana de los miRNAs significativos de la base de datos miRTarBase [129]. El listado de genes resultantes se utilizó para realizar un análisis de enriquecimiento funcional con el paquete ClusterProfiler [130]. Se determinaron como términos enriquecidos aquellos con un p-valor ajustado por FDR menor a 0,05.

Las matrices de distancias y de correlación fueron calculadas utilizando los datos normalizados mediante la función “*variance stabilizing transformation*” (VST) del paquete DESeq2 y eliminando posteriormente el efecto de grupo con la función *removeBatchEffect* del paquete limma [131]. En el caso de la comparativa “Organoides tumorales Derechos vs Izquierdos” antes de realizar esta transformación se agregaron los conteos de los triplicados por paciente.

2.6 Ensayos de sensibilidad a fármacos

Los organoides se disgregaron mediante tripsinización hasta célula única y se sembraron en una placa P96W como se ha descrito en el apartado 2.4. El cultivo se mantuvo durante 48 horas en incubación a 37°C para permitir la formación de organoides antes del tratamiento con los fármacos.

Para el tratamiento de los organoides, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se añadieron 100 µL de medio de cultivo MC suplementado con el fármaco de estudio a diferentes concentraciones durante 120 horas. Al finalizar el tiempo del ensayo, se evaluó la

viabilidad celular mediante el kit de CellTiter-Glo 3D[®] (Promega, G7570) siguiendo las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se cuantificó utilizando el equipo Fluoroskan Ascent FL (Thermoscientific).

Los fármacos utilizados en los ensayos de sensibilidad se detallan en la Tabla 8. Los quimioterápicos 5-Fluorouracilo (5-FU) y Oxaliplatino se obtuvieron directamente del Servicio de Farmacia del HCUV. Se utilizaron también inhibidores de dianas específicas: Alpelisib (BYL719. Selleckchem, S2814), Trametinib (GSK1120212. Selleckchem, S2673), Erlotinib (Selleckchem, S7786) y SN38 (Selleckchem, S4908). Las concentraciones de los compuestos utilizados en los ensayos de sensibilidad se detallan en la Tabla 8 y se basaron en datos previos del laboratorio y datos obtenidos de la literatura. Las concentraciones de los fármacos utilizados aparecen en los gráficos en el apartado de resultados, transformadas en logaritmo en base 10.

Para cada fármaco se realizaron al menos dos experimentos independientes, con un triplicado biológico en cada uno de ellos. En todos los ensayos se incluyeron pocillos control de organoides tratados con medio MC y el vehículo en el que está disuelto cada fármaco; en el caso de los inhibidores, medio MC suplementado con DMSO a una concentración máxima de 0.2%.

Tabla 8. *Fármacos utilizados y las concentraciones empleadas en los ensayos de sensibilidad.*

Compuesto	Concentraciones
5-Fluorouracilo	1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M
Oxaliplatino	1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M
Alpelisib	0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M y 5 μ M
Trametinib	0.1 nM, 1 nM, 2.5 nM, 5 nM y 10 nM
Erlotinib	0.1 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M y 5 μ M
SN38	1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM y 500 nM

2.6.1 Análisis estadísticos de los ensayos de fármacos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en base al número de variables que se debían comparar. Los datos de viabilidad obtenidos de los ensayos de fármacos se normalizaron frente a los pocillos control (sin tratamiento), dando a estos el valor del 100% de la viabilidad. Los valores normalizados se analizaron en GraphPad Prism V8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). En primera instancia, se llevó a cabo un análisis de la normalidad de los datos mediante una prueba de *Saphiro-Wilk*. Para generar las curvas de dosis-respuesta se utilizó un modelo de regresión no lineal de mínimos cuadrados (Dosis-Respuesta – Inhibición, con pendiente variable de 4 parámetros) y los valores del AUC se calcularon en base a las curvas generadas. Para la comparación de las medias de los ensayos de fármacos se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. Un p-valor por debajo de 0.05 se consideró significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Establecimiento de un protocolo para el procesamiento de muestras de tejido procedentes de pacientes con cáncer colorrectal localizado y posterior establecimiento y mantenimiento de cultivos de organoides en 3D

3.1.1 Establecimiento de un protocolo para el cultivo de organoides derivados de tejido tumoral y normal procedente de pacientes con carcinoma colorrectal

Con el fin de generar organoides a partir de tejido tumoral procedente de pacientes con cáncer colorrectal localizado, se utilizó como referencia el protocolo descrito por Sato y colaboradores (2011), utilizando una matriz extracelular para mantener y promover el crecimiento de estructuras tridimensionales a partir de células de cáncer de colon aisladas de biopsias de pacientes [22]. Esta matriz constituye un soporte físico en el cual se embeben las células aisladas del tejido, y a la cual se añade el medio de cultivo que contiene los factores propios del nicho de las células madre intestinales. La composición del medio de cultivo consta de factores de crecimiento y componentes relacionados con el mantenimiento y proliferación de estas células. Los factores EGF, Noggin y RSPO1 constituyen el coctel mínimo necesario para el mantenimiento de las células madre intestinales [132]. Adicionalmente, se incluyeron otros factores al medio, gastrina, SB202190, A-8301, PGE2 y FGF10, utilizados en varios estudios con organoides tumorales donde se demuestra que aumentan la eficacia en el establecimiento y crecimiento a largo plazo en cultivo [14,108]. Por otro lado, otro factor importante fue la incorporación del inhibidor de la quinasa Rho (Y27632), que evita la muerte por anoikis en los pasos en los que se trabaja con célula única. En su mayoría, la dependencia de los organoides de los factores presentes en el medio de cultivo se relaciona con su perfil mutacional; por ejemplo, los organoides con mutaciones en la vía de WNT suelen exhibir crecimiento independientemente de los factores WNT3A y RSPO1 [133,134].

Dado que más del 94% de tumores colorrectales presentan mutaciones activadoras de la vía de WNT, predominantemente en el gen *APC* [6], el factor WNT3A no se usó en la composición del medio de cultivo para el establecimiento de organoides tumorales. Para el establecimiento de organoides normales si fue necesario incluir este factor en la composición del medio de cultivo.

La composición final del medio de cultivo para organoides tumorales (definido como medio MC), así como el medio comercial utilizado en el cultivo de organoides normales (definido como medio ST, StemCell) se detalla en las Tablas 4 y 5 de Materiales y Métodos.

3.1.1.1 Obtención de células individuales a partir de muestras de tejido tumoral y normal reseco de pacientes con carcinoma colorrectal localizado

Uno de los primeros pasos que requirió la estandarización de las condiciones de trabajo fue el procesamiento del tejido tumoral. En la literatura, se combina la digestión mecánica y la digestión enzimática del tejido para obtener células individualizadas. Inicialmente, el aislamiento de criptas de mucosa normal se realiza con soluciones quelantes, como el EDTA [21,135]. En los tejidos tumorales es más frecuente el uso de enzimas, como la colagenasa, dispasa, hialuronidasa o tripsina [14,22,108] que ayudan a la disgregación de la matriz extracelular del tejido, con un impacto mínimo sobre la viabilidad de las células individuales [136]. Durante la puesta a punto, se partió de un fragmento de tejido tumoral de aproximadamente 0.5 x 0.5 centímetros.

La digestión se realizó con Liberasa, una mezcla de Colagenasa I y Colagenasa II; además se añadió el factor Y27632 para evitar la muerte por anoikis de las células epiteliales en suspensión durante el tiempo de digestión [14]. Se probaron dos tiempos de digestión, 30 y 60 minutos, combinando con disgregación mecánica por pipeteo, cada 15 minutos. En una primera evaluación visual a los 30 minutos, se podían ver trozos grandes de tejido que aún no se habían disgregado lo suficiente. La evaluación del sobrenadante al microscopio indicó que había células individuales en suspensión, sin embargo, tras la digestión de 60 minutos se observaron mayor cantidad de células en suspensión, menos trocitos de tejido intactos, y más pequeños. Además, se realizó una medida de la viabilidad celular a los 30 y 60 minutos de digestión, mediante tinción con Yoduro de Propidio, y no se observaron diferencias, por lo que se decidió establecer un tiempo de 60 minutos de digestión.

3.1.1.2 Presencia de eritrocitos en la muestra de tejido inicial

Durante la puesta a punto, se observó que en ocasiones había una gran cantidad de eritrocitos tras el paso de la digestión del tejido que se observaban posteriormente en el domo de BME junto a las células epiteliales. Es importante decir que, aunque la presencia de eritrocitos en el cultivo no parecía afectar a la tasa de establecimiento y crecimiento de organoides, si dificultaba el proceso de seguimiento y evaluación morfológica de los mismos mediante microscopía. La alta densidad de eritrocitos en la matriz extracelular también inestabilizaba al domo que finalmente acaba disgregándose, comprometiendo la característica 3D del cultivo de organoides. Por esta razón, se decidió añadir un paso de lisis de eritrocitos al protocolo de establecimiento, aunque en bibliografía no existe un consenso sobre este aspecto.

Finalmente se decidió la inclusión o no de este paso, previo al plaqueo, dependiendo de una evaluación visual del sedimento celular tras la primera centrifugación del tejido digerido. De manera que aquellas muestras que presentaban un alto porcentaje de eritrocitos, donde se observaba un anillo de color rojo en la parte superior del sedimento celular, eran tratadas con un tampón de lisis de eritrocitos, tal y como se describe en materiales y métodos. En cambio, si el sedimento era de un color blanquecino uniforme, se procedía con el protocolo sin incluir este paso.

3.1.1.3 Porcentaje de matriz extracelular para el cultivo de organoides

Varios autores señalan el uso de matrices extracelulares como por ejemplo el Matrigel® o el *Basement Membrane Extract* (BME). Ambas son preparaciones de membrana basal solubilizada extraída de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm, tumor rico en proteínas de matriz extracelular, como laminina, colágeno IV, entactina, perlecan, proteasas y algunos factores de crecimiento [82]. El Matrigel y el BME son las matrices que se usan más habitualmente en los cultivos tridimensionales y, además, con una formulación que elimina los factores de crecimiento para poder controlar mejor el tipo y concentración final de estos factores. También existen otro tipo de matrices, utilizadas en menor medida, con formulaciones sintéticas, como Colágeno I o geles de polietilenglicol. Por lo tanto, existen una gran variedad de condiciones descritas en la literatura sin un consenso establecido, no solo entorno a que matriz extracelular utilizar, sino en cuanto a

la concentración de estas matrices donde se van a generar los organoides. Como se ha comentado, la mayoría de autores utilizan Matrigel o BME para embeber las células y además lo utilizan a una concentración del 100%, sin embargo, en muchos trabajos no se especifica el porcentaje utilizado [14,22,102,133–135,137–140]. Además, en algunos casos se describe el uso de concentraciones más bajas según el tipo de aplicación, como por ejemplo la utilización de porcentaje de matriz del 5% en ensayos de sensibilidad a fármacos [14,85].

Por esta razón, se decidió evaluar en nuestras manos la eficiencia en el establecimiento y crecimiento de los organoides a diferentes porcentajes de matriz extracelular. En un primer momento se probaron tanto BME como Matrigel, pero debido a que los organoides no mostraron diferencia de crecimiento entre estas dos matrices extracelulares (datos no mostrados), se seleccionó el BME, por cuestiones de disponibilidad y facilidad de compra. Para probar que concentración de BME era más adecuada, se prepararon diferentes diluciones de esta matriz en un rango de concentración desde 5% a un 100% como se detalla en la Figura 15. Las células embebidas en las diferentes diluciones de BME se plaquearon en el centro de un pocillo de una placa de 96 pocillos (P96W) y se añadió medio MC suplementado con factor Y27632, ya que se trataba de una muestra tumoral. Los organoides se formaron tras las primeras 24 horas de incubación y se siguió su crecimiento durante 11 días.

Los resultados indicaron que los organoides se establecieron y crecieron en todas las condiciones que fueron evaluadas; sin embargo, su morfología dependió en gran medida de la concentración de BME en el domo (Figura 15). Los organoides que se establecieron en las condiciones de 5%, 10% y 15% de BME exhibieron estructuras más alargadas, varias adherencias a la placa de cultivo, a pesar de utilizar placas anti-adherentes, y presentaron tamaños más grandes, pero sin una estructura tridimensional clara. Además, en estas condiciones no se formó un domo, sino que la gota se esparció por el pocillo. En estos casos, el cambio del medio de cultivo fue difícil, por lo que se optó por retirar un poco del volumen y añadir medio fresco por encima del cultivo. Es importante resaltar que estas condiciones no son óptimas, ya que es difícil asegurar una concentración óptima de los componentes del medio durante todo el tiempo de cultivo y es más complicada su manipulación.

En las concentraciones de 20% y 25% de BME, se observó la formación de un domo que se mantuvo al añadir el medio de cultivo; a partir del día 6, el domo se rompió debido a la manipulación para el seguimiento, por lo que se dificultó el cambio de medio. Los organoides presentaron una estructura tridimensional, quística y sin adherencias, y aumentaron de tamaño progresivamente; en las zonas comprometidas del domo, algunos organoides precipitaron al fondo del pocillo en donde formaron un cultivo en monocapa. En las concentraciones de 50% y 75% de BME se observaron organoides quísticos, que mantuvieron la estructura tridimensional y aumentaron de tamaño con los días en cultivo. En estas condiciones, el domo de BME se mantuvo intacto durante los cambios de medio y soportó la manipulación para el seguimiento mediante microscopía. Finalmente, la concentración de 100% de BME presentó organoides quísticos y con estructura tridimensional definida, aunque su tamaño fue menor al de los organoides en 50% y 75% de BME. Es importante recalcar que trabajar con los porcentajes más elevados de BME, 75% y 100%, resulta dificultoso y requiere de una mayor rapidez y destreza. El BME polimeriza rápidamente a temperatura ambiente y por lo tanto la suspensión celular en esta matriz y plaqueo en forma de domo debe realizarse de manera muy ágil.

Debido a la facilidad de manipulación en cultivo y a la estabilidad del domo durante el seguimiento, así como la capacidad de mantener la morfología tridimensional de los organoides, se seleccionó la condición de 50% de BME para el establecimiento y mantenimiento de organoides.

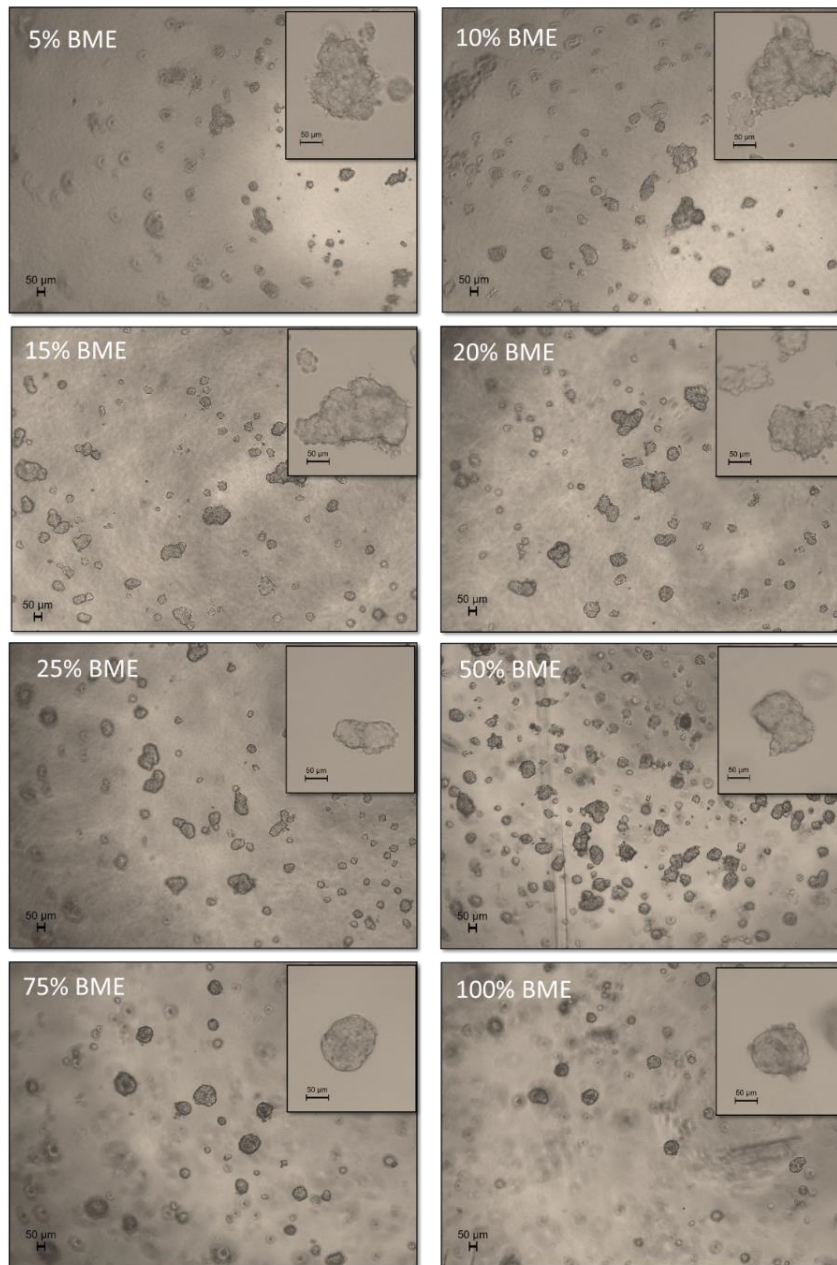


Figura 15. Organoides de cáncer colorrectal localizado (CCRL) se establecen y crecen en diferentes concentraciones de BME. La estructura se vuelve más compacta en porcentajes mayores de BME y los organoides adquieren una morfología quística. En menores porcentajes de BME los organoides presentan adherencias en sus bordes. Enfoque 5X, barra de escala 50 µm. Enfoque en la imagen ampliada 20X, barra de escala 50 µm.

3.1.1.4 Densidad celular inicial

En la literatura se describió inicialmente el cultivo de organoides intestinales a partir de la recolección y purificación de criptas intestinales que en condiciones óptimas y con los factores de crecimiento adecuados, formaban estructuras tridimensionales [21]. Posteriormente, se establecieron con éxito organoides derivados de células madre

intestinales individuales, seleccionadas en base a la expresión del marcador LGR5. Estas células eran capaces de generar, por si solas, una estructura tridimensional, rica en células proliferantes en un par de semanas. Posteriormente, estas células se diferenciaban hasta representar todas las poblaciones celulares presentes en el epitelio intestinal [22]. En estos casos, la cuantificación inicial de criptas o células individuales LGR5+ constituye un paso importante para iniciar el cultivo de organoides. Por otro lado, Ootani y colaboradores señalaron el establecimiento de organoides derivados de fragmentos de tejido, generando un cultivo con un componente epitelial y un componente mesenquimal, que contribuía al mantenimiento de las condiciones del nicho intestinal [141].

En nuestro laboratorio, se optó por la digestión del tejido tumoral hasta célula única, con el fin de obtener células madre intestinales que dieran origen a los organoides, ya que la morfología de las criptas se pierde durante el proceso de tumorigénesis en el tejido. Además, se decidió no realizar la selección y purificación de células madre por citometría por dos motivos, en primer lugar, para no perder la mayoría de células en el proceso, sobre todo cuando se parte de biopsias pequeñas; y por otro lado, porque se pensó que la presencia de otros tipos celulares en un inicio podría ayudar al establecimiento de los organoides [141]. Sin embargo, si consideramos necesaria la puesta a punto de la densidad celular inicial óptima en el domo al inicio del establecimiento, ya que varias observaciones nos indicaban que era una cuestión crítica. Así, tras el proceso de digestión, se cuantificó el número de células obtenidas en la suspensión y se evaluó la capacidad de establecimiento de 40, 100, 500, 1000, 2000 y 4000 células/ μ L de BME, en un domo de 50 μ L.

Los resultados indicaron que, cuanto mayor era la densidad celular inicial, los organoides se formaban más rápido y mantenían un ritmo de crecimiento constante; por otro lado, cuanto menor era la densidad celular inicial, más tiempo se necesitaba para que se formaran los organoides, y se observó un ritmo de crecimiento más lento. En condiciones de muy baja densidad inicial (40 células / μ L), los organoides no se formaron y las células individuales murieron al cabo de pocos días a pesar de añadir al medio el factor Y27632 que inhibe la muerte por *anoikis*. La concentración de 4000 células/ μ L presentó los mejores resultados, en donde se observó la formación de organoides 24 horas tras la siembra inicial; se formaron estructuras quísticas que aumentaron de tamaño

constantemente y fue posible la ampliación en un periodo corto de tiempo, entre los días 7 y 10 de cultivo.

En un estudio reciente, Li y colaboradores (2021) hablan de la compresión volumétrica como un regulador físico del crecimiento de organoides derivados de intestino de ratón (Li et al., 2021). Indican que, el agrupamiento celular generado por la rigidez de la matriz extracelular contribuye a la cascada de señalización de WNT, mediada por el receptor LRP6. También señalan que, aunque la compresión volumétrica tiene un papel fundamental en la homeostasis del tejido intestinal, ya que mantiene la señalización intra e intercelular, también puede estar involucrada en el proceso de tumorigénesis, junto con otros procesos, como por ejemplo el estrés físico y mecánico que generan los tumores sobre el tejido y la concentración de las señales resultantes en los procesos tumorales.

Esto podría indicar la importancia de la señalización y comunicación celular durante el establecimiento de los organoides tumorales, y su relación con la densidad inicial de células en el domo. Es importante señalar que, en este caso, se partió de una suspensión celular que puede contener toda clase de células presentes en el tumor, y la densidad inicial no representa la cantidad de células madre intestinales en el cultivo, pero sí podría influir en la proximidad de las células y su comunicación paracrina. Es importante destacar que una densidad demasiado elevada de células tampoco sería conveniente, porque impediría la adecuada difusión de los factores en el medio de cultivo, además de resultar en un consumo excesivo de los componentes del medio.

3.1.1.5 Composición del medio de cultivo

El desarrollo inicial de los organoides derivados de células madre adultas se basó en los conocimientos básicos sobre las vías de señalización que gobiernan el desarrollo del epitelio intestinal adulto, la vía de WNT, del factor de crecimiento epidérmico (EGF), NOTCH y las proteínas morfogénicas óseas (BMP) [45]. De esta manera se definió que el cóctel de factores mínimo necesario para el establecimiento de organoides intestinales se componía de agonistas de la vía de WNT y EGF y de inhibidores de las BMP [21,78]. El factor EGF y el inhibidor de BMP (NOGGIN) promueven la proliferación de las células madre y ayuda al crecimiento y mantenimiento de los organoides en cultivo. La proteína

R-spondina 1 (RSPO1), ligando del receptor LGR5, causa la hiperplasia de las células madre intestinales, ayudando a su renovación. Por otro lado, el inhibidor de TGF- β (A-83-01) y el inhibidor de p38 (SB202190) ayudan al mantenimiento de las células madre intestinales obtenidas a partir de tejido y son necesarios para el establecimiento de los cultivos de organoides a largo plazo [143]. Como se discutió anteriormente, el factor WNT constituye un regulador general de la proliferación celular y diferenciación de las células intestinales; sin embargo, no se usó en la formulación debido a la alta proporción de tumores independientes de la señalización de WNT reportados en literatura, considerando que alrededor del 94% de los casos de CCR presentan mutaciones en esta vía. No obstante, es importante recalcar la importancia de este factor en el desarrollo de organoides derivados de tejido no tumoral, y se planteó su uso para los cultivos de CNOs.

En varios estudios con organoides derivados de tejido normal, se utiliza WNT3A recombinante o medio condicionado con WNT3A [14,22]. Sin embargo, existe un medio comercial formulado para el establecimiento y mantenimiento de organoides intestinales derivados de tejido humano que contiene el factor WNT3A en su composición, aunque se desconoce la concentración final de éste y de los otros factores en el medio.

Decidimos evaluar la capacidad de crecimiento de los organoides en este medio comercial, al cual lo denominamos medio ST (StemCell), no solo en organoides normales sino también en los tumorales, en un intento de aumentar la eficiencia en el establecimiento de organoides tumorales. Se evaluó el crecimiento de un organoide tumoral, CTO4, durante 10 días en medio de cultivo ST y se comparó con su crecimiento en medio MC. Los dos medios se suplementaron con antibióticos y con factor Y27632.

Durante el periodo de crecimiento, se realizaron fotos de ambas condiciones, y posteriormente, las imágenes se procesaron con el software ImageJ, permitiendo el cálculo de las áreas aproximadas en micras de 10 organoides individuales en cada condición. Las medias de estas medidas se representan en la Figura 16. Los resultados indican que los organoides crecen en los dos medios de cultivo, pero se observó un mayor crecimiento en el medio de cultivo ST al final de los 10 días, en comparación con el medio MC.

Sin embargo, a pesar de la mayor eficiencia en el crecimiento de organoides en este medio comercial comparado con el crecimiento en el medio MC, se planteó la posibilidad de que en este medio no selectivo (medio ST con WNT3A) hubieran crecido organoides no tumorales, procedentes de células normales presentes en el disgregado celular inicial. Para descartar esta posibilidad se realizó un análisis genómico y se comparó con el tejido tumoral de origen. La secuenciación determinó que este organoide no presentaba las mutaciones que se encontraban en el tejido. Por lo tanto, se confirmaba que el tejido original contenía células epiteliales normales junto con las tumorales y que, durante el establecimiento del cultivo, se dieron las condiciones para que se establecieran dos tipos de organoides, CTOs y CNOs. El medio ST permitió la proliferación de los CNOs con más eficiencia, desplazando poco a poco a los organoides tumorales en el cultivo.

Por esta razón, se decidió utilizar el medio MC para el establecimiento de CTOs, del cual conocemos su composición, y no contiene WNT3A; de esta manera, es posible seleccionar las poblaciones de células tumorales y evitar el establecimiento de organoides normales. El medio de cultivo comercial ST solo se usó para el establecimiento y crecimiento de organoides derivados de tejido normal (CNOs).

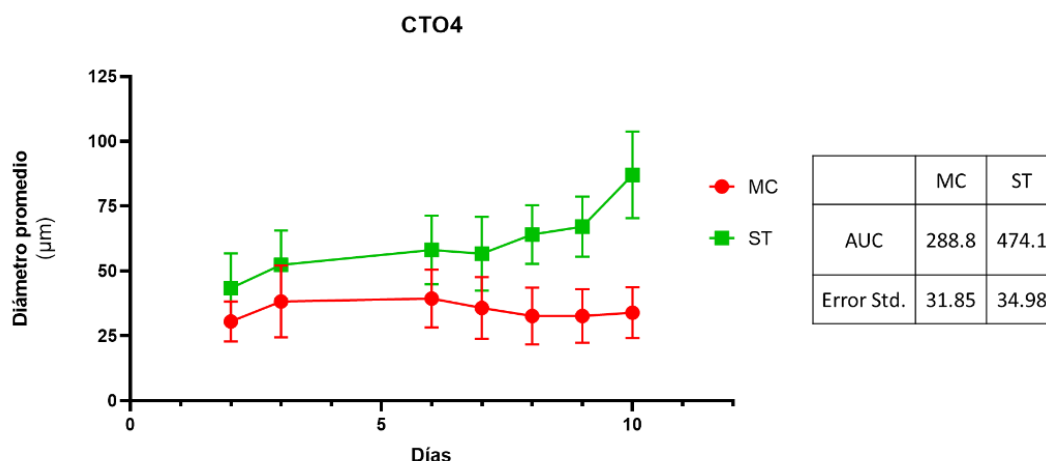


Figura 16. Crecimiento progresivo de un organoide tumoral de cáncer de colon localizado en presencia del medio de cultivo MC (línea roja, círculo) y medio de cultivo ST (línea verde, cuadrado). Las medidas indican el diámetro promedio en μm de 10 organoides medidos en cada punto. Las medidas del diámetro se obtuvieron mediante el software ImageJ. A la derecha se indica el valor del AUC y el error estándar calculados para cada condición.

3.1.2 Resumen de las condiciones evaluadas en el protocolo de establecimiento de organoides derivados de tejido tumoral y tejido normal de pacientes con cáncer colorrectal localizado

Las condiciones que se han evaluado y modificado, y los cambios incluidos en el protocolo final se detallan en la Tabla 9. El protocolo final para el establecimiento de organoides derivados de tejido tumoral y tejido normal de pacientes con cáncer colorrectal localizado se detalla en apartado de Materiales y Métodos.

Tabla 9. Resumen de las condiciones evaluadas en la puesta a punto del protocolo para establecimiento de organoides tumorales y normales derivados de pacientes con cáncer colorrectal.

Paso en el protocolo	Condiciones probadas	Condición con mejor resultado	Justificación
Digestión	Digestión enzimática y mecánica 30' Digestión enzimática y mecánica 60'	Enzimática + mecánica 60'	Se liberan mayor cantidad de células en suspensión y no se ve comprometida la viabilidad celular.
Lisis eritrocitos	+ Tampón de lisis - Tampón de lisis	Uso en muestra con sedimento rojo o no se observa	Elimina los eritrocitos sin afectar al establecimiento y crecimiento de organoides
Densidad celular inicial	40 células/ μ L 100 células/ μ L 500 células/ μ L 1000 células/ μ L 2000 células/ μ L 4000 células/ μ L	4000 células/ μ L	Se observan organoides tras las primeras 24 horas de establecimiento. Los organoides aumentan de tamaño más rápido en condiciones de mayor densidad / μ L de BME
% Matriz extracelular en domo	5% 10% 15% 20% 25% 50% 75% 100%	50%	Sustenta el crecimiento de organoides, mantiene las estructuras tridimensionales, permite la manipulación del cultivo.

Medio de cultivo	Medio Completo (MC) – Ver tabla 4 de Materiales y métodos Medio Comercial StemCell (ST) – Ver tabla 5 de Materiales y métodos	MC para CTOs ST para CNOs	Los dos medios soportan el establecimiento y crecimiento de organoides en cada condición, pero el medio MC es un medio selectivo que se requiere para asegurar el establecimiento de organoides tumorales. Para organoides normales se requiere de medio + WNT3A (ST). Este factor no lo contiene el medio selectivo MC.
------------------	--	----------------------------------	---

3.2 Generación de un biobanco de Organoides Tumorales (CTOs) y Organoides Normales (CNOs) derivados de pacientes con CCR

Tras la puesta a punto de un procedimiento óptimo para la generación de organoides derivados tanto de tejido tumoral como normal de pacientes con CCR se decidió iniciar la generación de un biobanco. Este biobanco de organoides representa una gama de modelos preclínicos con un gran potencial en investigación en cáncer colorrectal.

En la Figura 17 se muestra una representación de los organoides establecidos. Los organoides tumorales (CTOs) presentaron una morfología quística, en algunos casos con un lumen central grande y en otros casos eran densos y sin lumen (Figura 17A). Normalmente, los organoides una vez generados aumentaban de tamaño con el tiempo hasta que alcanzaban su tamaño máximo en aproximadamente 7 – 10 días, y en este momento se procedió a la ampliación o pase del cultivo (Figura 17B).

Los organoides normales (CNOs) se formaron a los pocos días de la siembra, y aumentaron de tamaño de forma similar a los organoides tumorales. Presentaron estructuras tan variadas como los organoides tumorales, en algunos casos exhibieron invaginaciones del borde que recuerdan al epitelio intestinal. Por lo general, el cultivo de organoides difirió morfológicamente de su contraparte tumoral (Figura 17C). Además, durante los pases, fueron más resistentes a la digestión y presentaron tiempos más largos para su disgregación que los organoides tumorales.

Se ha observado que es importante disgregar y ampliar los organoides antes de que éstos alcancen un gran tamaño; este tiempo es variable entre cultivos, por lo que es importante

el seguimiento visual; de lo contrario, las células comienzan un proceso de muerte, se acumula *debris* a su alrededor y se pierde la definición de sus bordes. Un organoide muerto o inviable se asemeja a un agrupamiento de células individuales sin estructura definida (Figura 17D).

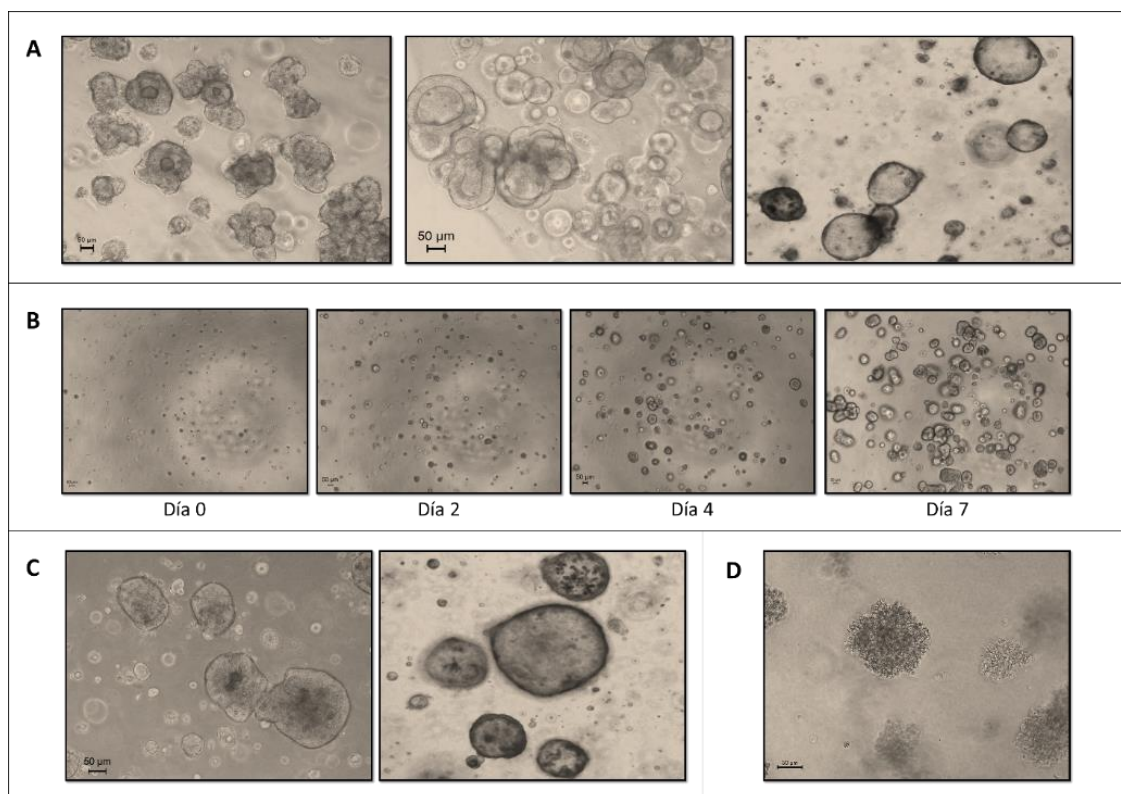


Figura 17. Cultivo de organoides derivados de pacientes con carcinoma colorrectal. A. Los organoides muestran diferentes morfologías en cultivo: densos sin lumen (panel izquierdo), esféricos con un lumen central pequeño (panel central), quísticos con lumen central grande y pared fina (panel derecho). Objetivo 10X. B. Crecimiento secuencial de un organoide tumoral durante 7 días. Objetivo 5X. C. Morfología de un organoide derivado de tejido normal (izquierda) y su contraparte tumoral (derecha). Objetivo 10X. D. Morfología de un organoide inviable. Objetivo 10X.

Del total de pacientes incluidos en el estudio ($n = 43$), se recogieron 105 muestras totales, que incluyeron muestras tumorales, de una o dos partes del mismo tumor, y muestras de tejido normal.

De éstas, previo a su procesamiento, se eliminaron aquellas que provenían de pacientes ocluidos, semiocluidos o que presentaron una prótesis intestinal ($n = 8$). Estas muestras no se tuvieron en cuenta para determinar la tasa de éxito del cultivo de organoides.

Durante el procesamiento y establecimiento de organoides, de 56 de las muestras iniciales no fue posible derivar un cultivo de organoides. La principal causa de fallo fue la calidad de la muestra inicial (42.86%); en este caso, fue muy común observar una baja celularidad tras el proceso de digestión del tejido. También se presentaron casos de elevada fibrosis o necrosis en el tejido de partida, lo que dificultó la obtención de células individuales sanas e influyó directamente sobre el establecimiento de los organoides. Al ser un cultivo puramente epitelial, la eficiencia de su establecimiento y crecimiento va a depender de la cantidad de células madre epiteliales presentes en el tejido de origen tras la digestión. Si la muestra exhibe una baja celularidad, es menos probable tener una población de células madre en cantidad suficiente para favorecer el establecimiento inicial del cultivo. Por otro lado, la menor eficiencia podría atribuirse también a la heterogeneidad tumoral, ya que no todas las células tumorales van a poder generar un organoide en las condiciones de cultivo utilizadas [144] de manera que ciertos clones celulares podrían crecer más rápido que otros, o no crecer en absoluto.

Otro factor importante que afectó al establecimiento de organoides fue la contaminación del cultivo, ya que representó un porcentaje de pérdida del 26.8% de los cultivos. Van de Wetering y colaboradores reportaron un 15% de pérdida de cultivo de organoides debido a la contaminación con bacterias y levaduras [14]. La contaminación de un cultivo de organoides es un factor de riesgo a la hora de establecer un biobanco, ya que compromete la integridad de otros cultivos que se puedan establecer en el mismo periodo de tiempo. Durante las fases iniciales de recolección de muestras, se incluyeron los pacientes con oclusión o con prótesis intestinales. La mayoría de estas muestras se perdieron durante la primera semana de establecimiento del cultivo debido a la carga elevada de bacterias que se desarrollaron a pesar de incluir antibióticos en la composición del medio de cultivo y de la realización de muchos lavados previos a la disgregación del tejido. Además, en algunos casos, esta contaminación se propagó dentro del incubador, lo que resultó en la afectación de otras líneas de organoides. Algunas de estas líneas se recuperaron con un tratamiento puntual con antibióticos a una concentración más elevada (2%) durante un periodo corto de tiempo, sin embargo, otras líneas se perdieron. Por esta razón, el circuito de recolección de la muestra se actualizó para evitar la toma de muestras de pacientes con estas condiciones, como se ha comentado anteriormente.

Por otro lado, en algunos casos se observó como algunas líneas de organoides a pesar de un establecimiento óptimo inicial tras la primera o segunda semana de cultivo decaen, y finalmente se pierden (25%). Estos organoides mantuvieron tamaños pequeños, no presentaron cambios en su crecimiento ni densidad y se mantuvieron hasta que presentaron signos de apoptosis. Se ha descrito que podría existir un pequeño grupo de casos de CCR que serían dependientes de WNT, y dadas las condiciones de cultivo estándar, sin incluir el factor WNT3A, estos casos serían raramente establecidos [134]. Estos tumores normalmente no exhiben mutaciones en los genes involucrados en la vía de WNT, como por ejemplo *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), *AXIN2* (*Axin-Related Protein 2*), *FAM123B* (también conocido como *AMER1 - APC Membrane Recruitment Protein 1*), *CTNNB1* (*Catenin Beta 1*) o *TCF7L2* (*Transcription Factor 7 Like 2*) [6] pero presentan otras mutaciones conductoras que se relacionan con la carcinogénesis colorrectal. Es posible que dentro de este grupo de organoides que decayeron con el tiempo, se encuentren casos de CCR dependientes de WNT, o que su establecimiento se vea afectado por otras condiciones de cultivo, como puede ser la sensibilidad al factor SB202190 o a condiciones de normoxia, tal como se ha reportado en estudios de dependencia de organoides derivados de CCR a los factores presentes en el nicho intestinal [134].

Otras causas en el fallo del establecimiento incluyeron problemas en el proceso de congelación/ descongelación (3.57%) en el que se observó una pérdida de integridad de los organoides tras la descongelación y el cultivo no se recuperó; y finalmente, por problemas no determinados un 1.79% no se estableció en absoluto (Figura 18A).

De las 41 líneas de organoides derivadas exitosamente, 27 corresponden a organoides tumorales o CTOs, una línea corresponde a un organoide derivado de un adenoma (incluido en el biobanco, pero no en los análisis siguientes), y 13 son organoides normales o CNOs. Las características clínico-patológicas de los pacientes de los cuales derivan los CTOs se reportan en el Anexo 1. Durante el crecimiento de los organoides en cultivo, se observó que existían líneas que se mantuvieron estables durante los pases y se congelaron y descongelaron sin perder la viabilidad, dando lugar a organoides estables que mantuvieron un buen ritmo de crecimiento; a estos organoides se les consideró cultivos de largo plazo (CLP). En cambio, otras líneas se mantuvieron en cultivo durante 15 – 45

días, tiempo tras el cual, su viabilidad comenzó a decaer. Algunas de éstas presentaron peor crecimiento tras el primer pase del cultivo y otras se congelaron, pero al descongelarlos, los organoides no se recuperaron. A estas líneas se les consideró cultivos de corto plazo (CCP).

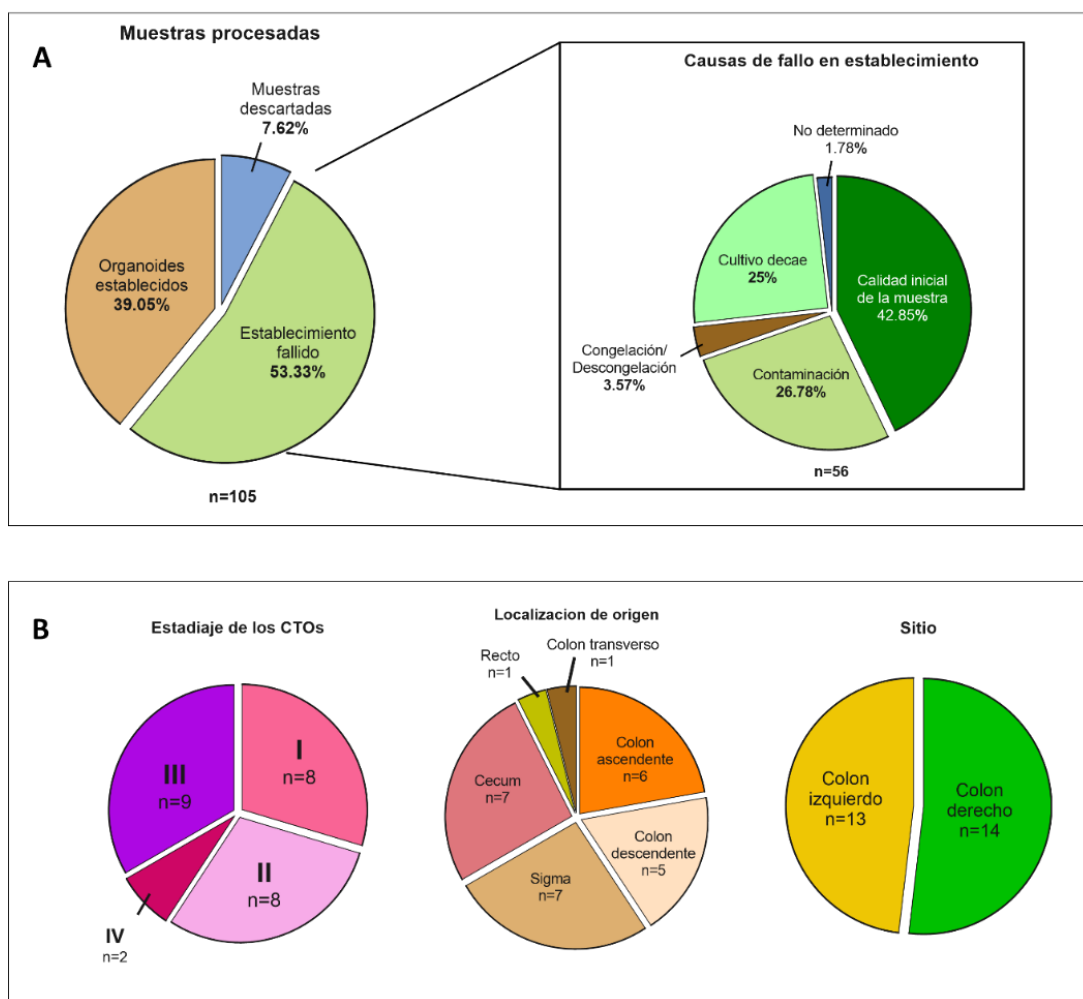


Figura 18. Descripción del biobanco de organoides derivados de pacientes con cáncer colorrectal localizado. **A.** El total de muestras recogidas para el procesamiento se divide en: muestras descartadas; muestras de las cuales se establecieron organoides de cultivos a largo plazo (CLP) y corto plazo (CCP); y muestras de las cuales no fue posible establecer organoides. También se detallan las causas del fallo en el establecimiento de estos cultivos. **B.** Detalle de los CTOs incluidos en el biobanco, divididos por: estadiaje del tumor de origen (izquierda), localización específica del tumor de origen (medio) y si corresponde al colon derecho o colon izquierdo (derecha).

Considerando los cultivos de corto y largo plazo, la tasa de éxito en el establecimiento de CNOs fue del 43% (13/30), mientras que para CTOs, la tasa de éxito fue del 40.3% (27/67). En literatura, la tasa de éxito en el establecimiento de organoides varía entre el 30 – 90% de éxito, dependiendo del tipo y la cantidad inicial de tejido, el tratamiento previo del

paciente y la presencia de necrosis o de epitelio sano en la muestra tumoral de partida [14,108,145,146].

Del total de CTOs establecidos, 14 provienen de un tumor localizado en el lado derecho del colon mientras que 13 provienen de tumores localizados en el lado izquierdo. En relación con el estadiaje, el biobanco generado contiene organoides derivados de tumores estadio I (n=8), estadio II (n=8), estadio III (n=9), estadio IV (n=2), y adenoma (n=1); este último no se incluyó en los análisis posteriores ni en la caracterización del Biobanco de organoides de CCR. En cuanto a la localización en el colon, el Biobanco contiene CTOs derivados de tumores localizados en el colon ascendente (n=6), colon transversal (n=1), colon descendente (n=5), región sigmoidea (n=7), cecum (n=7) y recto (n=1) (Figura 13B). No se encontró una diferencia significativa en la eficiencia del establecimiento de CTOs dependiente del sitio, el estadiaje o la localización del tumor primario, definida por una prueba de Chi-cuadrado (p-valor de la eficiencia por sitio = 0.72; p-valor de la eficiencia por estadiaje = 0.49; p-valor de la eficiencia por localización = 0.27).

3.3 Caracterización morfológica y molecular de CTOs

El cultivo de organoides presenta claras ventajas frente a otros modelos preclínicos que hacen de este modelo una herramienta muy útil para la medicina de precisión, tal como se ha descrito anteriormente en la introducción. Obviamente, si se pretenden utilizar los cultivos de organoides como modelos personalizados del tumor de un paciente, el primer paso ha de ser la confirmación de que estos cultivos reflejan las características moleculares del tejido de origen. Por ello, la caracterización molecular de los cultivos de organoides y el tejido del que derivan constituye el primer paso antes de iniciar cualquier otro tipo de análisis.

Por otro lado, también es importante resaltar una de las limitaciones de este tipo de cultivos, y es el tiempo de crecimiento, ya que los cultivos que crecen en menor medida pueden representar tiempos de experimentación muy largos que afecten a la aplicación de este tipo de modelos en las decisiones clínicas. No todos los organoides se establecen y crecen de manera óptima y el tiempo necesario para la ampliación del cultivo y sus posteriores aplicaciones es un factor que se debe tener en cuenta.

Por esta razón, en el trabajo que se presenta a continuación, para ciertos tipos de análisis, como los experimentos de sensibilidad a fármacos o algunos tipos de caracterización molecular, que requieren una mayor amplificación de los cultivos, se seleccionaron 6 líneas de organoides CLP de crecimiento rápido y mantenido en el tiempo. De estas 6 líneas, 3 de ellas corresponden a organoides derivados de tumores localizados en el lado derecho del colon, mientras que 3 corresponden al lado izquierdo. En algunos casos, se han derivado dos cultivos de organoides de dos zonas distintas del tumor primario. Los organoides que derivan del mismo tumor llevan el mismo número, así que, para diferenciarlos, se ha agregado -P01 o -P02 a la nomenclatura de cada organoide. Las características de estas líneas se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10. Características clínico-patológicas de los tumores de los cuales derivan las 6 líneas CLP de CTOs seleccionadas.

CTO*	Estadaje tumoral	Sitio	Localización	Descripción histológica	Grado histológico	Estado de microsatélites
CTO36-P2	I	Derecho	Cecum	Adenocarcinoma	Bajo	MSS
CTO51-P01	II	Izquierdo	C. descendente	Adenocarcinoma	Alto	MSS
CTO65-P02	III	Derecho	C. transverso	Adenocarcinoma	Alto	MSS
CTO71-P01	III	Derecho	Cecum	Adenocarcinoma	Bajo	MSS
CTO77-P01	II	Izquierdo	Sigma	Adenocarcinoma	Bajo	MSS
CTO84-P02	I	Izquierdo	C. descendente	Adenocarcinoma	Bajo	MSS

* De algunos de los tumores se han establecido dos cultivos de organoides derivados de dos regiones alejadas del tumor. Para diferenciarlas, se ha añadido a la nomenclatura del organoide: P01 o P02. No siempre crecen ambos como CLP.

3.3.1 Caracterización morfológica de los CTOs

3.3.1.1 Tinción hematoxilina - eosina y comparación con el tejido tumoral de origen

La tinción con Hematoxilina y Eosina permitió obtener información sobre la forma y estructura celular de los organoides. Algunos CTOs presentaban una estructura quística, borde fino y lumen central grande. Se observó una capa fina de células epiteliales cuboidales, con un núcleo central y que se agrupan en la periferia del organoide dejando un lumen grande central vacío. Por otro lado, los organoides densos y sin lumen presentaron varias capas de células epiteliales sobrepuestas que asemejan a células columnares, con un núcleo central (Figura 19). Al comparar los organoides con el tejido tumoral del paciente del cual derivan, se observan características histopatológicas propias del tumor y que se mantienen en el cultivo.

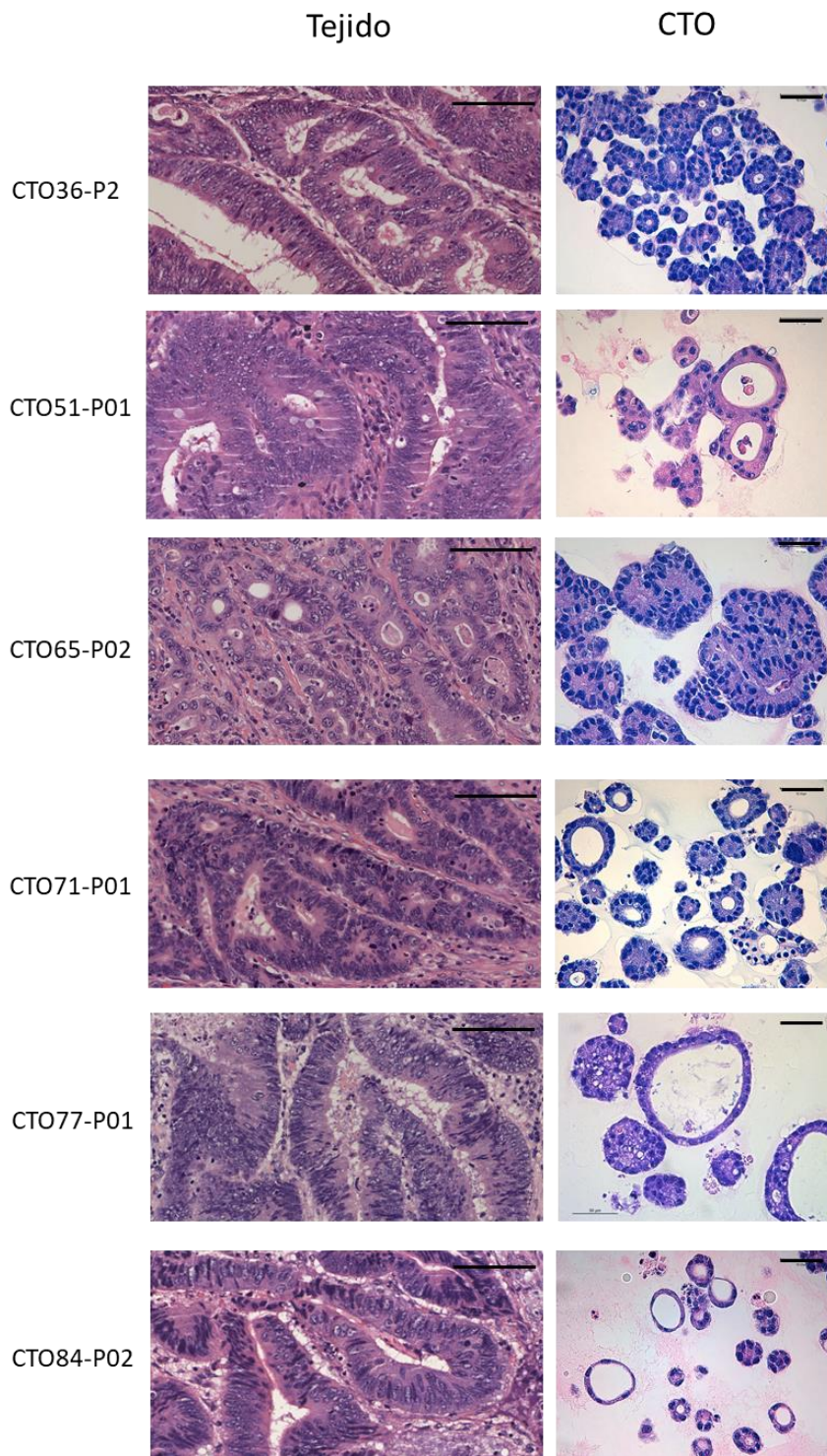


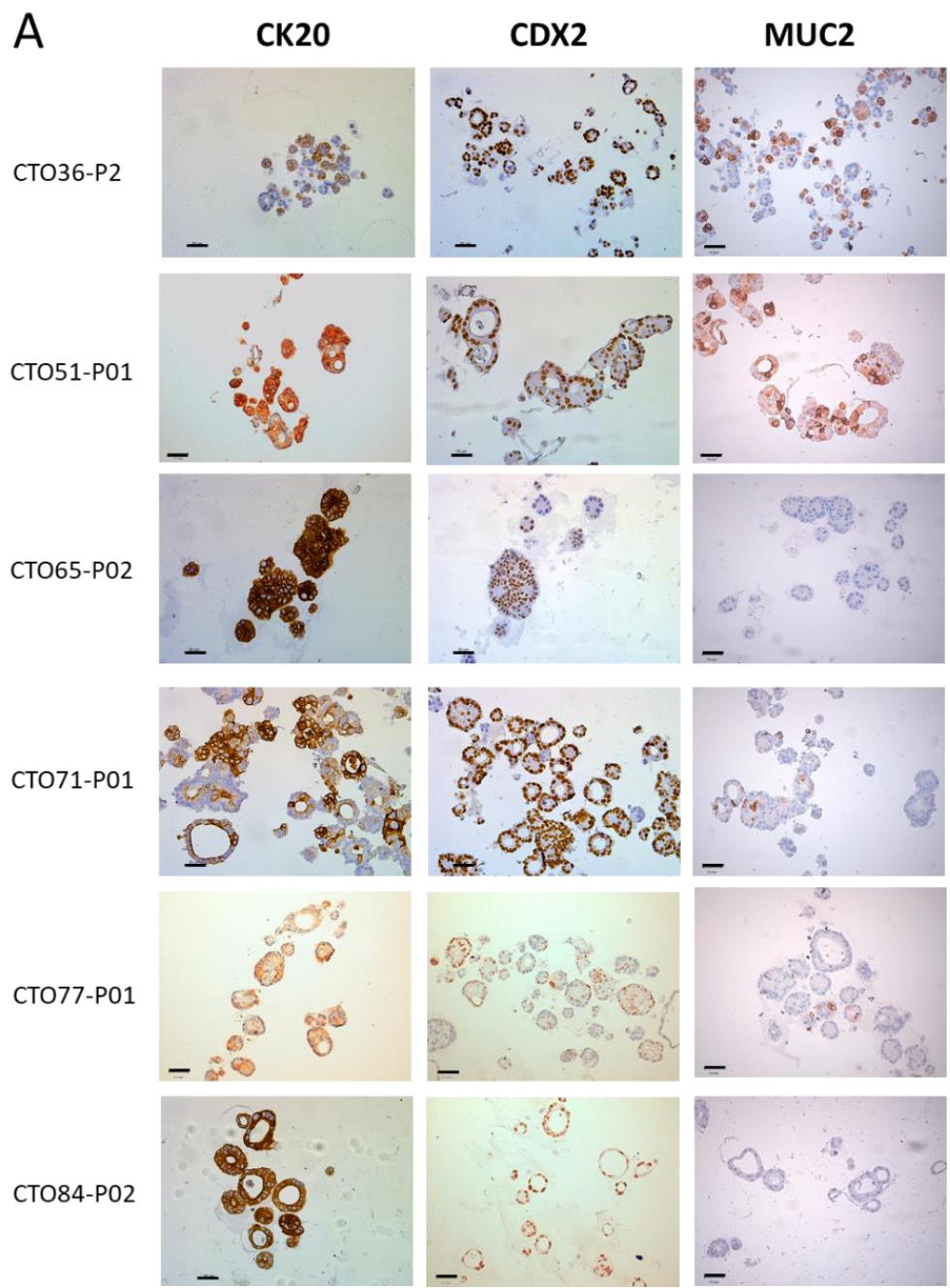
Figura 19. Los organoides de cáncer de colon localizado recapitulan las características morfológicas del tumor del cual provienen. Tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) de los organoides derivados de pacientes (barra de escala 50 μm) y del tejido tumoral correspondiente (barra de escala 100 μm). Las imágenes del tejido se adquirieron con el escáner de preparaciones Ventana iScan HT (Roche, Ventana Medical System, Inc. Tucson, USA) del departamento de Anatomía Patológica. Las imágenes de los organoide se adquirieron en un microscopio Leica (DMD108) de la UCIM.

3.3.1.2 Tinción inmunohistoquímica/inmunofluorescencia de CTOs

La tinción mediante inmunohistoquímica en organoides mostró la presencia de las células epiteliales tumorales diferenciadas en distintos linajes presentes en el epitelio intestinal (Figura 20A). Algunos organoides presentaron células mucinosas, marcadas con MUC2 en las tinciones. En CTO84-P02 y CTO65-P02 no se observó expresión de MUC2. En CTO36-P2 y CTO51-P01, se observó una mayor cantidad de células marcadas dentro de los organoides; por el contrario, en CTO71-P01 y CTO77-P01 se observó esta tinción en menor proporción; el marcaje indica pocas células por organoide e inclusive algunos organoides sin marcaje. Se ha descrito que MUC2 se expresa de forma diferencial en el tejido tumoral, principalmente adenocarcinomas, y su expresión se ha asociado con la agresividad general de la enfermedad y estadios tumorales avanzados [147]. En organoides derivados de metástasis de cáncer colorrectal se ha observado este patrón de expresión, en la cual no se observa expresión de MUC2 o se observa en aproximadamente 25-40% de las células en los organoides [148].

También se observaron células positivas para el marcador epitelial CK20, que indica la composición de los organoides, puramente epiteliales. Los organoides además presentaron una tinción positiva nuclear para CDX2, un factor de transcripción nuclear específico del tejido intestinal, que se observó en todos los CTOs evaluados. La pérdida de CDX2 parece estar asociada con la tumorigénesis de varios tipos de cáncer. La ausencia o niveles de expresión bajos se han asociado como un posible marcador de recaída en pacientes con cáncer colorrectal localizado, ya que es un regulador de la expresión de genes involucrados en la diferenciación celular, específicos del intestino [149–151]

La inmunofluorescencia mostró la presencia de células proliferantes, positivas para KI67, cuya distribución varía en cada organoide, lo cual indica que los organoides contienen células que promueven la renovación celular constante en estas estructuras. Además, se observó un marcaje fuerte con E-Caderina (CDH1) en todos los CTOs, que se encuentra en la membrana de las células epiteliales y cuya función es ayudar a las células vecinas a adherirse entre sí para organizarse y formar estructuras definidas.



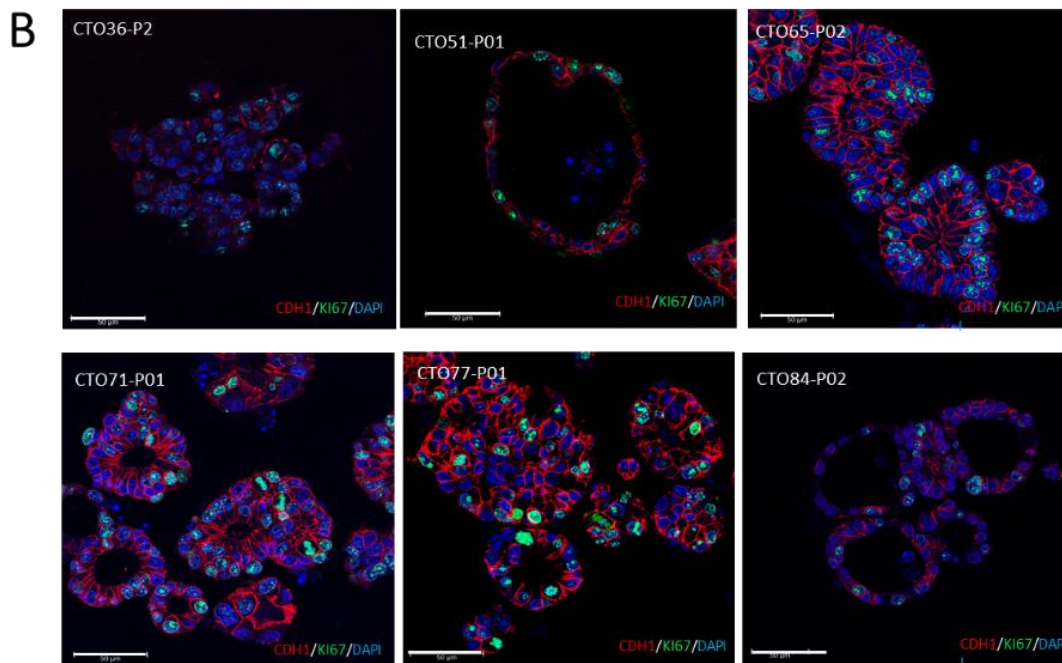


Figura 20. Los organoides de cáncer de colon localizado exhiben la presencia de distintas poblaciones celulares del epitelio intestinal. **A.** Tinción mediante inmunohistoquímica de CTOs para el marcaje de células epiteliales (CK20), células intestinales (CDX2) y células mucinosas (MUC2). Barra de escala 50 μm. **B.** Tinción mediante inmunofluorescencia de CTOs para el marcaje de proliferación celular (KI67). Las uniones célula a célula se marcan en rojo (CDH1) y los núcleos en azul (DAPI). Barra de escala 50 μm.

3.3.2 Caracterización molecular de los CTOs y del tejido de origen

3.3.2.1 Análisis del perfil mutacional de los CTOs y del tejido de origen mediante un panel de diseño interno de secuenciación NGS.

Como ya se ha comentado, para que los organoides puedan constituir una herramienta útil de la medicina de precisión, estos modelos deben ser capaces de representar fielmente las características del tumor del individuo del que proceden, y de esta manera contribuir a guiar las acciones clínicas orientadas al tratamiento personalizado de cada paciente.

Con el fin de determinar las mutaciones presentes en los organoides, y poder correlacionar con las mutaciones presentes en los tejidos, se llevó a cabo la secuenciación de los CTOs seleccionados (Tabla 10) y de los tejidos correspondientes. Además, también

se incluyeron CTOs que presentaron un crecimiento constante durante las primeras semanas de establecimiento. En total, se incluyeron los CTOs y tejidos correspondientes de 11 pacientes para secuenciación NGS, utilizando el panel Oncospot V1, descrito en el apartado de Materiales y Métodos.

Lo que se observó es que, en general, hay una buena correlación entre las mutaciones detectadas en el organoide y en el tejido del cual se originan (media de la correlación de Pearson $R^2 > 0.90$, desviación estándar 0.07). Se observó también que, en su gran mayoría, la frecuencia mutacional es mayor en el organoide que en el tejido (Figura 21A). Esto es lo esperado ya que los organoides son cultivos puramente epiteliales y por tanto las mutaciones no quedan diluidas como en el tejido, por la presencia de otros tipos celulares. En definitiva, los organoides reflejan las mutaciones presentes en los tejidos tumorales de los que proceden y por tanto podrían constituir un buen modelo personalizado para estos pacientes.

El gen más frecuentemente mutado en nuestros modelos de CTO fue *KRAS*, en un 77% de los casos (10/13, Figura 21A). Este gen está mutado en el 40% de los casos totales de cáncer colorrectal, aproximadamente [6] y por tanto, se detectó con una mayor frecuencia en nuestros modelos, lo que podría indicar una mayor eficiencia en el establecimiento dependiente de la presencia de esta mutación. Sin embargo, si se ha conseguido el establecimiento de líneas salvajes para el gen *KRAS*, concretamente las líneas CTO22, CTO71-P01 y CTO77-P01, siendo dos de ellas de características de crecimiento óptimo a largo plazo (CLP). Los CTOs con *KRAS* mutado presentan mutaciones en los codones 12 (n = 7), 13 (n = 1) y 61 (n = 2) (Figura 21B) que coinciden con mutaciones activadoras que comúnmente se detectan en este gen en la literatura. Estas mutaciones se consideran patogénicas y su presencia se asocia a una mala prognosis en CCR [152]. Es importante destacar que dos de nuestros modelos, CTO34-P1 y CTO84-P02 presentan una mutación G12S de *KRAS*, que es menos frecuente en cáncer colorrectal, siendo reportada en menos del 10% de los casos [153].

El gen *APC* presentó una frecuencia de mutación del 54% en nuestros CTOs (7/13, Figura 21A). Según datos del consorcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), del proyecto Adenocarcinoma de Colon (COAD, por sus siglas en inglés), *APC* es el gen que aparece con mayor frecuencia mutado en cáncer colorrectal; cerca del 80% de los casos de tumores

no hipermutados, y alrededor del 50% de tumores hipermutados exhiben mutaciones inactivadoras [6]. Sin embargo, estas mutaciones generalmente no causan una pérdida completa de la proteína APC; más del 90% de mutaciones causan codones de parada prematuros o cambios en la pauta de lectura, dando lugar a proteínas truncadas pero estables, que no son capaces de cumplir su función [154]. Notablemente, todas las mutaciones que se encontraron en los CTOs incluyen cambios en la pauta de lectura (FS) o codones de parada prematuros (CP), lo cual concuerda con los datos reportados en la literatura. Por otro lado, también se ha visto que un 14% de las mutaciones en *APC* corresponden a mutaciones sin sentido [154]. En nuestros CTOs no encontramos este tipo de mutaciones, que aparecerán probablemente cuando ampliemos nuestro biobanco.

El gen *TP53* se encontró mutado en un 23% de los CTOs (3/13), en las líneas CTO22, CTO65-P02 y CTO84-P02, presentando una variante sin sentido del gen. Aunque las mutaciones en *TP53* se han reportado en alrededor de un 60% de casos totales de cáncer colorrectal [6], la baja frecuencia de esta mutación en nuestra cohorte podría deberse al bajo número de muestras. De forma general, estos casos abarcan mutaciones sin sentido de este gen supresor tumoral [57], lo cual concuerda con las mutaciones observadas en los CTOs. Es importante recalcar que las líneas CTO65-P02 y CTO84-P02 exhiben ambos una frecuencia mutacional del 100%, lo que indicaría una presencia posible de un evento de pérdida de heterocigocidad y la selección clonal de esta característica en cultivo, lo cual fue posible corroborar en los análisis de número de copias, que se describen en el siguiente apartado.

El gen de *PIK3CA* aparece mutado en 6 líneas de CTOs, representando una frecuencia de mutación del 46% en la cohorte de estudio. Las mutaciones en *PIK3CA* se han reportado con una frecuencia de 10 – 20% en cáncer colorrectal [6,155]. En este caso, la frecuencia de esta mutación en nuestra cohorte es superior al reportado, pero es importante recalcar que el número de muestras de CTOs es limitado. Alrededor del 80% de estas mutaciones están localizadas en 2 zonas de mutaciones frecuentes del gen, E542 y E545 en el dominio helicoidal, y en H1047 en el dominio quinasa de *PIK3CA*, lo cual se ha correlacionado con una ganancia de función y la adquisición de características oncogénicas [156]. Las mutaciones que se encontraron en los CTOs corresponden a E545K, que está presente en

las líneas CTO34-P1, CTO37-P01 y CTO65-P02, seguida de la mutación E453K en las líneas CTO51-P01 y CTO51-P02, y la mutación Q546K en CTO49 (Figura 21B).

Algunos genes mutados que aparecen solamente en una línea incluyen a *MET*, *ERBB2*, *PTEN*, *BRAF*, *SMAD4*, *FBXW7*, *KIT*, los cuales se han reportado en cáncer colorrectal con frecuencias mutacionales menores al 20% [6].

Además, se observaron mutaciones en los genes de *CDKN2A*, *MYC* y *GNAQ*, que aparecen con una frecuencia mutacional menor al 15%. El inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A (*CDKN2A*) es un gen que actúa como supresor tumoral y está involucrado en la señalización y modulación de la apoptosis celular, y se ha visto alterado en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal [157]. La mutación D74A en este gen aparece en las líneas CTO71-P01, CTO77-P01 y CTO84-P02 en los organoides con una frecuencia mutacional menor al 6%, pero no se observa en los tejidos. Asimismo, se observó una mutación en el gen de la proteína de unión a nucleótidos de guanina, subunidad Alfa Q (*GNAQ*) en la línea CTO37-P01, igualmente aparece solo en el organoide, con una frecuencia mutacional menor al 10%. Es importante notar que estas mutaciones, en *CDKN2A* y *GNAQ*, no se han descrito en la tumorigénesis colorrectal, y aunque aparecen en regiones frecuentemente mutadas, por si solas no constituyen una mutación conductora o patogénica. Sin embargo, la detección de estas mutaciones en los organoides sugiere que este modelo es capaz de exhibir alteraciones presentes en el tejido en muy baja frecuencia. De esta manera, mutaciones que pasarían desapercibidas en tejido podrían ser detectadas en los organoides derivados. Este hecho sugiere que los organoides pueden en el diagnóstico precoz de alteraciones que aparecen en muy baja frecuencia e influir en la toma de decisiones clínicas para el tratamiento del paciente.

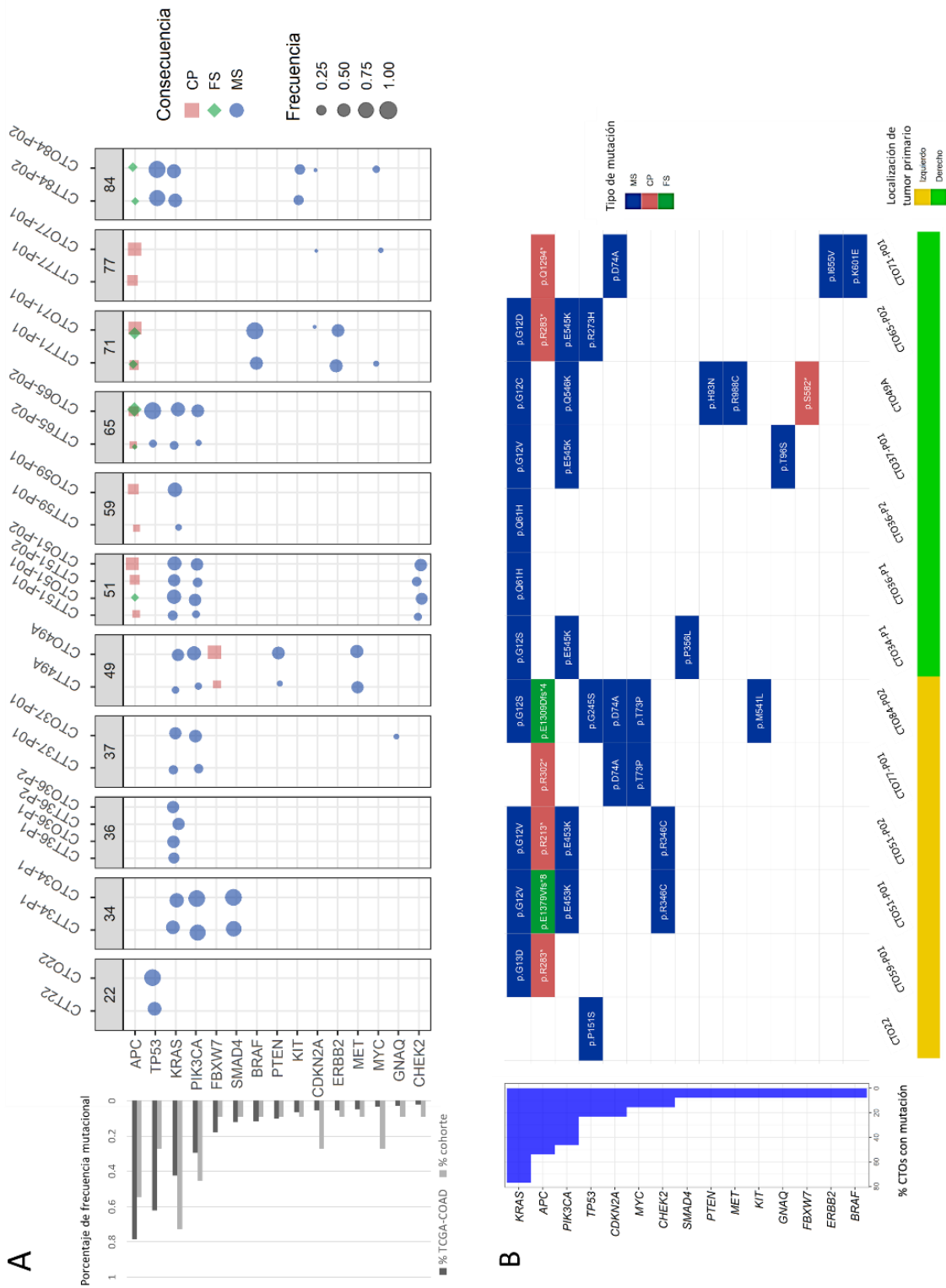


Figura 21. Las mutaciones que se encuentran de forma frecuente en cáncer colorrectal están presentes en los CTOs. **A.** El gráfico de puntos muestra las mutaciones en los CTOs y en los tejidos correspondientes. El tamaño del punto indica la frecuencia mutacional presente en cada muestra, y el color describe la clase de mutación (MS: cambio de sentido; FS: cambio en la pauta de lectura; CP: codón de parada). En el gráfico de barras localizado a la izquierda se muestra la frecuencia de las mutaciones encontradas en los CTOs (negro) y se comparan con los casos descritos en la base

de datos del consorcio TCGA, proyecto COAD (gris). **B.** Se muestran las variantes mutacionales de los CTOs. El color del recuadro indica el tipo de mutación (MS, FS o CP). A la izquierda se muestra la frecuencia de mutación de cada gen en los CTOs, ordenados de mayor a menor. El color de la barra inferior corresponde a la localización del tumor de origen (amarillo: colon izquierdo; verde: colon derecho).

En el caso del gen *MYC*, la mutación T73P aparece en las líneas CTO77-P01 y CTO84-P02, y en el tejido de CTO71-P01. *MYC* es un proto-oncogén que está involucrado en la regulación de varios puntos de control celular, incluyendo la parada del ciclo celular, apoptosis y senescencia. Por si sola, la activación de *MYC* puede considerarse una alteración importante en el desarrollo y progresión del cáncer [58] ya que es capaz de pasar por alto estos puntos de control, reforzando las características moleculares propias de la tumorigénesis y se encuentra mutado en varios tipos de cáncer; en este caso, la mutación T73P no es considerada patogénica, pero está descrita como una mutación presente en una zona frecuentemente mutada de este gen.

Por otro lado, también se detectó una mutación en el gen del Receptor Tirosina Quinasa 2 (*ERBB2* o *HER2*), con una frecuencia alélica cercana al 50% tanto en el organoide CTO71-P01 como en el tejido. Esta mutación, I655V, se ha descrito como un posible biomarcador en cáncer de mama [158,159], pero no se ha descrito en CCR.

Es importante recalcar que, aunque el objetivo principal de esta tesis no consiste en profundizar en estudios funcionales de las diferentes alteraciones detectadas, la generación del biobanco de organoides y la caracterización molecular de cada uno de estos modelos tiene un gran valor para futuras investigaciones.

3.3.2.2 Análisis del perfil de variación de número de copias en el genoma de los CTOs y los tejidos de origen correspondientes

El análisis del número de copias genómicas de los CTOs reveló la presencia de aneuploidía en todas las líneas evaluadas, y se observó una alta concordancia con sus tejidos de origen correspondientes (Figura 22). Los CTOs derivados de un mismo tumor pero que procedían de regiones alejadas (nombrados como -P01; -P02) también presentaron perfiles similares entre ellos.

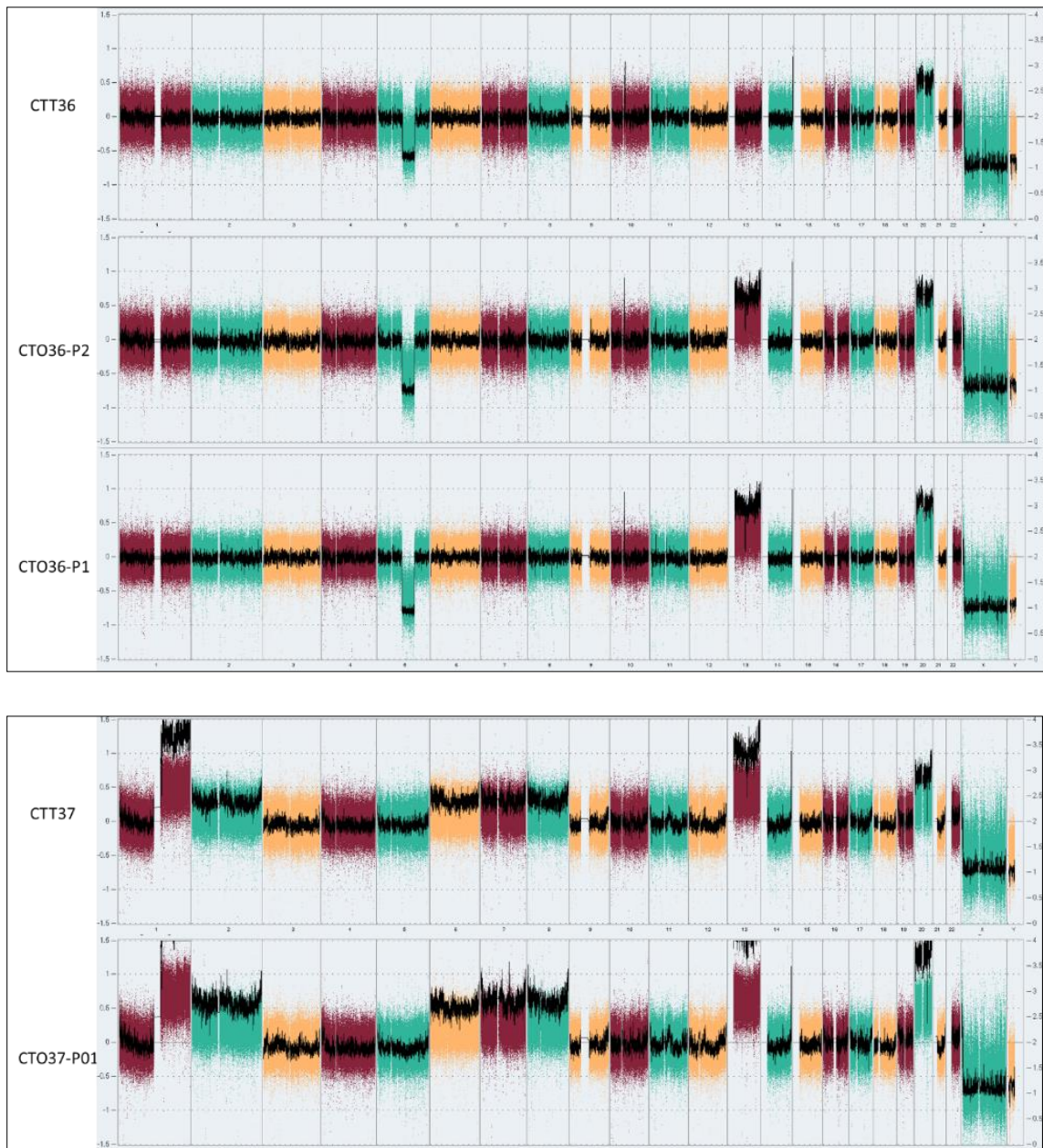


Figura 22. Continúa en la siguiente página.

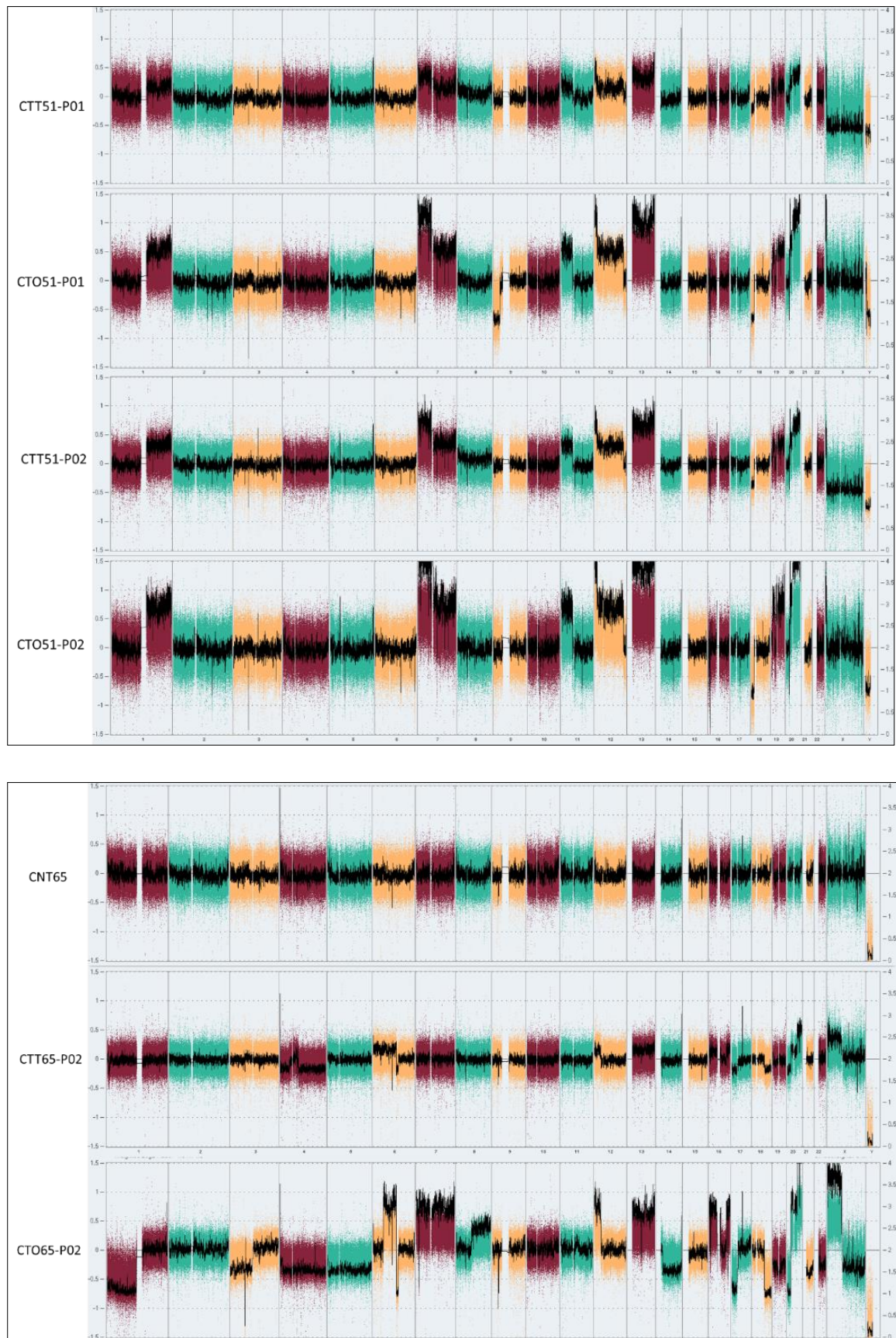


Figura 22. Continúa en la siguiente página.

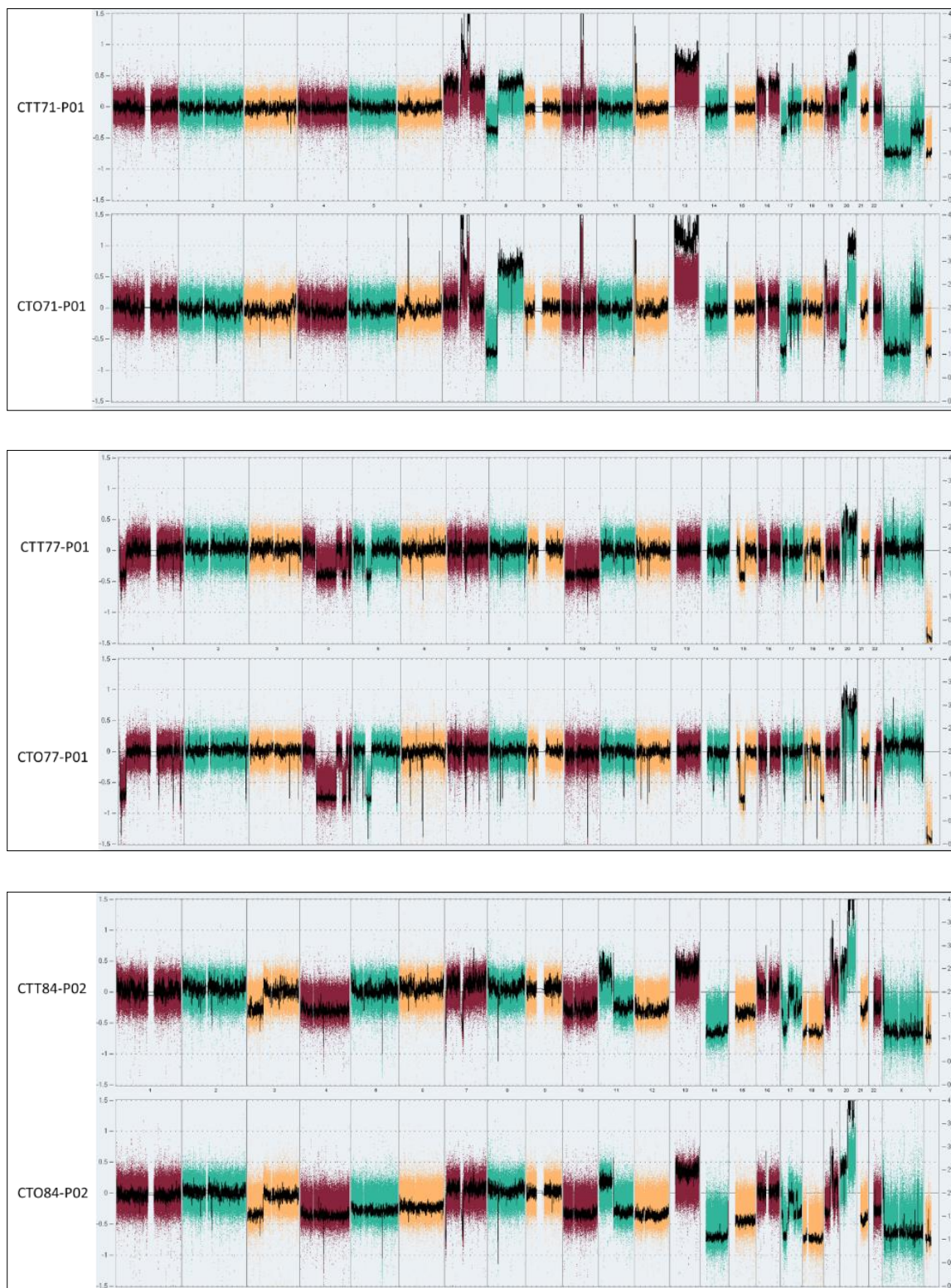


Figura 22. Perfil de número de copias del genoma de los CTOs y sus tejidos correspondientes. Las líneas CTO36-P1 y CTO36-P2, y CTO51-P01 y CTO51-P02 presentaron las mismas alteraciones en ambos CTOs derivados de regiones alejadas del mismo tumor. En el análisis se incluyó el perfil del tejido normal CNT65, en el cual no se observaron las alteraciones que se observan en su contraparte tumoral.

Según Ried y colaboradores (2019) las alteraciones de número de copias en cáncer colorrectal que se observan de forma común en tumores de estadios avanzados, también se han encontrado en lesiones no malignas o pretumorales, como los adenomas, indicando la presencia de eventos específicos de ganancias o pérdidas en ciertas regiones del genoma previos a la malignización de las lesiones. De forma general, las ganancias en los cromosomas 7, 8q, 13 y 20q, y las pérdidas en los cromosomas 8p, 17p y 18, se han relacionado con la progresión de adenoma a carcinoma en CCR, y se ha reportado que la presencia de dos o más de estas alteraciones es capaz de detectar con un 80% de exactitud el riesgo de progresar en la enfermedad [8]. Adicionalmente, las pérdidas en los cromosomas 1p, 4 y 22q se han reportado como posibles marcadores de pronóstico desfavorable en CCR [32]. La Figura 23 muestra los cromosomas que presentan una mayor frecuencia de alteraciones en CCRL.

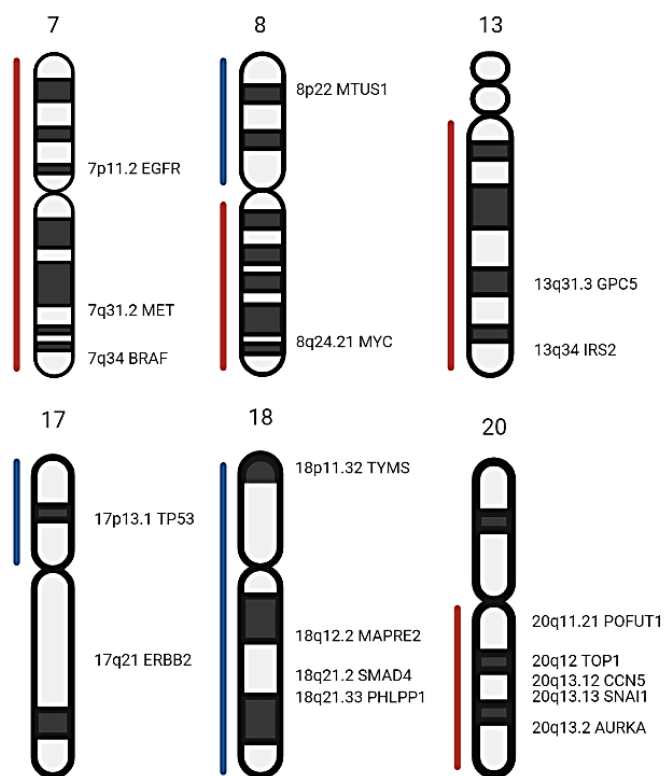


Figura 23. Alteraciones más frecuentes en el número de copias genómicas en CCRL. Se muestran los cromosomas frecuentemente alterados, con los genes implicados en el desarrollo y progresión de cáncer y su localización. En azul se indica una pérdida de la región, y en rojo, una ganancia. Imagen creada con BioRender.com.

El análisis individual del número de copias en las muestras reveló que, en la mayor parte de los casos, las alteraciones detectadas estaban presentes tanto en el organoide como en el tejido de origen, aunque en proporciones distintas. En el tejido, la presencia de distintas poblaciones celulares puede dar lugar a un perfil de número de copias compuesto; por un lado, el perfil de la población de células epiteliales tumorales y, por otro lado, el perfil de las células mesenquimales, vasculares e inmunes presentes en el tumor. En el organoide, el perfil de número de copias revela las alteraciones presentes en la población epitelial pura aislada del resto de células, por lo que corresponde solo al componente epitelial tumoral. Por esto, en algunos casos los tejidos exhibieron las ganancias y pérdidas en mosaico, mientras que en el organoide correspondiente se observaron las alteraciones sin esta condición. Por ejemplo, el tejido CTT65-P02 y el organoide CTO65-P02 exhibieron un perfil de alteraciones que no correspondían de manera evidente; el informe de Anatomía Patológica reveló que existió un 40% de células tumorales presentes en el tejido inicial, por lo que este resultado apoya la idea de la heterogeneidad tumoral del tejido que influye sobre el perfil de número de copias que exhibe, y la diferencia que existe con el perfil de la población epitelial pura, contenida en los organoides. En este caso, además se incluyó el perfil del número de copias genómicas del tejido normal CNT65 como control, el cual no mostró ninguna alteración (Figura 22). Las ganancias y pérdidas de los CTOs y los tejidos correspondientes se resumen en la Figura 24B. En el anexo 2 se presenta una información detallada sobre las alteraciones presentes en los organoides.

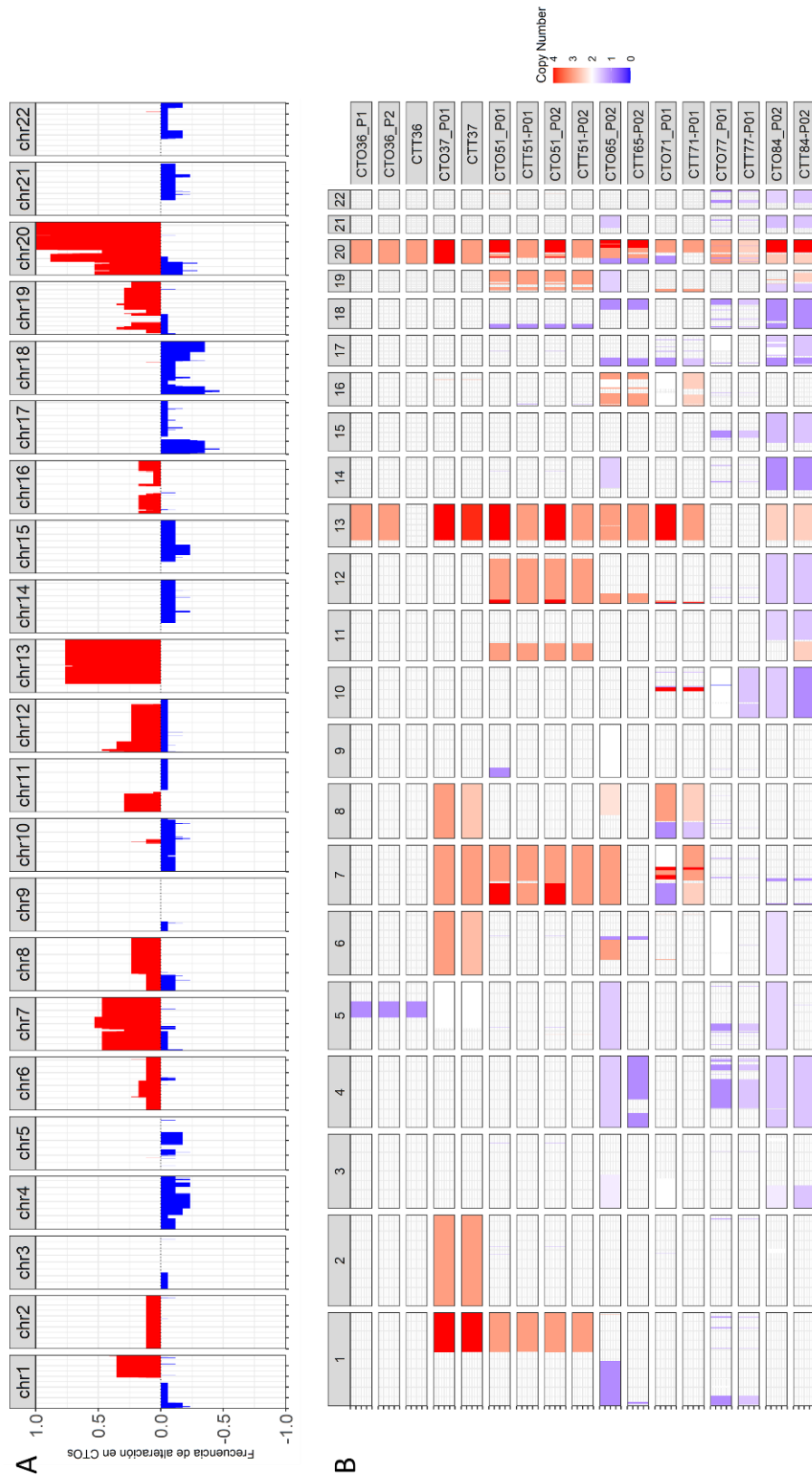


Figura 24. Perfil de número de copias de los CTOs y tejidos correspondientes. **A.** Frecuencia de ganancias y pérdidas en la cohorte de CTOs evaluados. Las ganancias se representan de color rojo, y las pérdidas de color azul. La posición de la alteración indica la localización en el cromosoma. **B.** Ganancias y pérdidas en los CTOs y tejidos evaluados. En rojo están representadas las ganancias y en azul las pérdidas. La intensidad del color representa el número de copias del cromosoma.

De forma general, los CTOs presentaron una mayor frecuencia de ganancias en los cromosomas 1q, 7, 13 y 20, y en menor medida, en los cromosomas 2, 6, 8, 11p, 12, 16 y 19; por otro lado, las pérdidas con mayor frecuencia se localizaron en los cromosomas 17p y 18, y con menor frecuencia en los cromosomas 1p, 4, 5, 8p, 9p, 14, 15, 20q, 21 y 22 (Figura 24A). Las alteraciones que exhiben los CTOs de la cohorte, por tanto, concuerdan con el modelo expuesto anteriormente (Figura 23). A continuación, se describe la presencia de estas alteraciones en los CTOs evaluados y la relación de genes implicados en estas zonas, que están involucrados en CCR, así como otros eventos altamente implicados en esta enfermedad.

El 100% de los CTOs (8/8) presentaron una ganancia en la región 20q; en esta región se encuentran varios genes que se han relacionado con el proceso de tumorigénesis y progresión del cáncer colorrectal, como Aurora Quinasa A (*AURKA*), el Factor de nucleación de microtúbulos *TPX2*, Topoisomerasa 1 (*TOP1*) y la Proteína O-Fucosiltransferasa 1 (*POFUT1*). Las ganancias en esta región (20q), se han encontrado de forma frecuente en casos de CCR, y se ha utilizado como un indicador de mala prognosis, por la capacidad oncogénica de varios genes localizados en esta zona [160]. Por ejemplo, la región 20q13 contiene a los genes de la Proteína Ósea Morfogénica 7 (*BMP7*), la Proteína 217 Dedo de Zinc (*ZNF217*) y la proteína SNAI1 Dedo de Zinc (*SNAI1*), que se han relacionado con la capacidad migratoria y agresividad de las células tumorales y el proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (EMT) en CCR [161]. De forma más específica, algunos oncogenes que se han involucrado directamente en la carcinogénesis colorrectal incluyen al Proto-oncogén *SRC*, cuya sobreexpresión se ha asociado con la agresividad y progresión del CCR localizado y metastásico [40]; la proteína similar a Catenina Beta 1 (*CTNNB1*) involucrada en la señalización de la vía de WNT; el *roadblock* de cadena ligera de dineína tipo 1 (*DYNLRB1*) el cual se ha involucrado en la activación de la vía de MEK/ERK [162] y el gen del complejo *GNAS*, el cual se ha visto involucrado en la señalización de RAS junto con la Proteína Quinasa A (PKA) [163].

También se encontró que el 87.5% de CTOs (7/8) presentaron una ganancia en el cromosoma 13, donde se localizan los genes *CDX2* y *CDK8*, cuya sobreexpresión se ha relacionado con características tumorigénicas y con la actividad de la vía de WNT [8].

Otra de las alteraciones más frecuentes en cáncer colorrectal corresponde a las ganancias en 8q y las pérdidas en 8p. En las líneas CTO37-P01, CTO71-P01 y CTO65-P02 se observó una ganancia en 8q. Específicamente, la región 8q24.21 contiene al protooncogén *MYC*. La activación o sobreexpresión de *MYC* se ha relacionado con la iniciación y el mantenimiento de varios tipos de cáncer [58] y se ha reportado su sobreexpresión con la activación de la vía de WNT o la desregulación de alguno de sus efectores, lo que ocurre de forma común en CCR [6,146]. Por otro lado, la línea CTO71-P01 presentó una pérdida del brazo corto del cromosoma 8 (8p); la helicasa dependiente de ATP del Síndrome de Werner (*WRN*) está localizada en la región 8p12 y su pérdida se ha relacionado con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal avanzado y metastásico [164]. En esta misma región se localizan los genes de la Proteína de andamio asociada a microtúbulos 1 (*MTUS1*) y la Proteína fosfatasa 2 Subunidad catalítica Beta (*PPP2CB*), que se han reportado como posibles candidatos supresores tumorales y los cuales se han encontrado inactivados o perdidos en CCR [160], y asimismo se encuentran perdidos en la línea CTO71-P01.

Las líneas CTO51-P01, CTO51-P02 y CTO65-P02 presentaron una ganancia del brazo largo del cromosoma 7 (7q); la línea CTO71-P01 presentó también ganancias puntuales en la misma región. En este cromosoma se localiza el gen que codifica el Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial (*EGFR*), en la región 7p11.2, cuya amplificación se ha asociado a mala prognosis [160] y cuya sobreexpresión se detecta en más del 60% de los casos de CCR [35]. La activación de este receptor activa a su vez las vías de MAPK y PI3K, por lo que su sobreexpresión señala hacia una mayor proliferación y supervivencia celular [25]. Concretamente, la línea CTO71-P01 presentó un evento de pérdida de heterocigosidad neutral (cnLOH) en las regiones correspondientes a *EGFR* y *MET*. Dicho evento sugiere la existencia previa de la pérdida de un alelo, seguido de la duplicación del alelo restante. Es necesario notar que este alelo presentó mutaciones en *MET* del tipo “modificador” y en *EGFR* del tipo “variante sinónima”, pero que no se tomaron en cuenta por los filtros aplicados en el cribado del panel de mutaciones y porque no representan mutaciones patogénicas, según las bases de datos evaluadas. En este caso, aunque esta región se mantiene en un número de copias igual a 2, es importante señalar la presencia de este evento en esta región, que incluye a estos dos oncogenes. Además, en la región 7q se

encuentran los genes *CYP3A5* (Familia 3 de citocromo p450, subfamilia A, polipéptido 5) y *CYP3A7* (Familia 3 de citocromo p450, subfamilia A, polipéptido 7), que están sobreexpresados en casos de CCRL y además están involucrados en el metabolismo de fármacos comúnmente utilizados para el tratamiento de cáncer [160,165].

En el caso de CTO36-P1 y CTO36-P2, ambos organoides provenientes de un mismo tumor derecho de estadio I, los perfiles de CN son prácticamente iguales, presentando las alteraciones en las mismas regiones. Sin embargo, en el caso de CTO51-P01 se observa una pérdida en el cromosoma 9p, que no está en el organoide CTO51-P02. Estos organoides derivan de un mismo tumor izquierdo, de estadio II. En estos perfiles se observan una mayor cantidad de alteraciones que corresponden con un estadio avanzado de la enfermedad, y esta pérdida que está presente solo en CTO51-P02 indicaría la selección clonal de esta alteración.

La pérdida del cromosoma 17p, que se encontró en las líneas CTO65-P02, CTO71-P01, CTO77-P01 y CTO84-P02 contiene al supresor tumoral *TP53*, localizado en la región 17p13.1. Las pérdidas que se localizan en esta región se han reportado en un 56% de los tumores de CCR [6]. En las muestras CTO65-P02 y CTO84-P02 se observó que *TP53* presentaba una frecuencia de mutación del 100% en el panel Oncospot (Figura 21), lo que correlacionaría con la pérdida de un alelo. En el caso de las líneas CTO71-P01 y CTO77-P01, aunque no exhiben mutaciones en *TP53*, sí que se encontró una pérdida del número de copias en la región 17p, que podría contribuir a una menor expresión de este supresor tumoral afectando su función.

El gen *APC* se encuentra localizado en la región q22 del cromosoma 5, y su desregulación, pérdida o inactivación correlaciona de forma altamente frecuente con el desarrollo de CCR [8,160]. Las líneas CTO36-P1, CTO36-P2, CTO65-P02 y CTO84-P02 presentaron una pérdida en esta región, mientras que la línea CTO37-P01 presentaba un evento de cnLOH. Es importante recalcar que las líneas CTO36-P1, CTO36-P2 y CTO37-P01 no presentaron mutaciones en *APC*, como se observó en la secuenciación, pero la pérdida del número de copias sugiere una desregulación de la vía de WNT mediada por la pérdida del número de copias de *APC*.

En la misma vía de WNT se encuentra el gen *FBXW7*, un gen supresor tumoral que se encuentra en el cromosoma 4, en la región q31.3. La pérdida de este gen se ha asociado con una mayor agresividad del CCR, ya que está involucrado en la regulación de *MYC* y la vía de señalización mediada por NOTCH [160]. Las líneas CTO65-P02, CTO77-P01 y CTO84-P02 presentaron una pérdida en esta región, lo que sugiere una pérdida en el gen de *FBXW7*, y en consecuencia, una pérdida de su función como supresor tumoral, promoviendo las características oncogénicas en estos tumores.

Se ha descrito que las alteraciones en el número de copias pueden contribuir al desarrollo y progresión del CCR por una desregulación de la expresión de los genes presentes en las regiones afectadas; sin embargo, también pueden tener un efecto sobre la expresión alterada de RNAs no codificantes con un papel fundamental, cada vez más conocido, en la regulación de la expresión génica. De hecho, en los últimos años, muchos son los autores que han destacado su potencial como biomarcadores en el cribado y caracterización de los tumores primarios y metastásicos [60,166–169]. Este tipo de análisis escapa a los objetivos de esta tesis, pero los datos obtenidos quedan disponibles para el análisis de RNAs no codificantes contenidos en estas regiones y su relevancia en el contexto del CCR en futuras investigaciones.

En cuanto a las diferencias entre organoides derechos e izquierdos, no se encontró una diferencia de las alteraciones presentes en los CTOs. Las alteraciones observadas, tanto ganancias como pérdidas, concuerdan con las regiones que se han reportado alteradas en la literatura en tumores primarios de CCR, son independientes del sitio donde se localice el tumor, son específicas de una muestra y exhiben una sensibilidad de detección mayor que en el tejido correspondiente.

Aunque no se han estudiado en gran medida, los eventos de cnLOH parecen constituir un mecanismo importante en la carcinogénesis colorrectal. Por ejemplo, un estudio reciente señala la importancia de los eventos de cnLOH en CCR sincrónico, y propone que éstos se relacionarían con el origen clonal de esta clase de tumores en CCRL [170]. En este contexto, los organoides constituyen una herramienta valiosa de estudio para esta clase de eventos, ya que presentan el perfil de la población celular epitelial pura. En los CTOs evaluados, se encontraron eventos de cnLOH amplios en todos los organoides derivados de tumores de estadio avanzado; en contraste, no se observaron eventos de cnLOH en

organoides establecidos de tumores de estadios iniciales (Tabla 11). Este fenómeno se podría incluir en investigaciones posteriores que busquen identificar la implicación de los eventos amplios de cnLOH en la transición de estadios iniciales a estadios avanzados en CCR, utilizando organoides como modelo de la enfermedad.

Tabla 11. Eventos amplios de *cnLOH* presentes en organoides derivados de tumores de CCR de estadio avanzado. Se ha definido un evento amplio de *cnLOH* en el cual está implicado más del 50% de la totalidad del brazo del cromosoma y se ha calculado el porcentaje de *cnLOH* con relación al tamaño total de dicho brazo, en *kpb*. Eventos en el mismo brazo de un cromosoma están marcados en gris. Las columnas de *min* y *max* indican las coordenadas del fin y el inicio del evento de *cnLOH*, respectivamente.

Muestra	Cromosoma	Brazo	min	max	Tamaño (kpb)	% <i>cnLOH</i> en brazo
CTO77-P01	6	p	184719	58415219	58230.501	98.50%
CTO77-P01	6	q	60355929	80205915	19849.987	17.83%
CTO77-P01	6	q	80723433	170599026	89875.594	80.74%
CTO77-P01	10	p	49722	38694038	38644.317	96.95%
CTO77-P01	10	q	41716748	87420357	45703.61	48.73%
CTO77-P01	10	q	88657742	133613032	44955.291	47.93%
CTO77-P01	17	q	41152680	83084062	41931.383	72.41%
CTO71-P01	3	p	20936	79545685	79524.75	87.81%
CTO71-P01	7	p	44167	57960277	57916.111	97.03%
CTO71-P01	7	q	63001326	159326530	96325.205	97.51%
CTO71-P01	16	p	39561	5859379	5819.819	15.94%
CTO71-P01	16	p	7170158	35986173	28816.016	78.92%
CTO71-P01	16	q	46430577	90096867	43666.291	81.42%
CTO65-P02	6	p	184719	41198511	41013.793	69.38%
CTO65-P02	9	p	192129	25242183	25050.055	59.02%
CTO65-P02	9	p	25377023	39213998	13836.976	32.60%
CTO65-P02	9	q	68398884	138130876	69731.993	73.25%
CTO65-P02	16	q	50214108	72911221	22697.114	42.32%
CTO65-P02	19	p	260912	24322835	24061.924	92.08%
CTO65-P02	19	q	27782420	58586385	30803.966	95.20%
CTO37-P01	5	q	57105764	69530419	12424.656	9.40%
CTO37-P01	5	q	71376112	181265320	109889.209	83.11%
CTO51-P01	19	p	260912	21201072	20940.161	79.94%
CTO51-P02	19	p	260912	21201072	20940.161	79.94%

3.3.2.3 Análisis del perfil de expresión génica de CTOs y sus tejidos correspondientes mediante RNA-seq

El estudio genómico descrito en los apartados anteriores demuestra que los organoides recapitulan las alteraciones presentes en los tejidos tumorales de origen, de forma que estos cultivos en 3D podrían constituir un buen modelo preclínico para estos pacientes. Sin embargo, no siempre existe una relación lineal causa-efecto entre las alteraciones genómicas detectadas y su expresión o función en las células afectadas. El control de la expresión génica juega un papel clave en este sentido y por ello en este proyecto nos planteamos ir un paso más allá en la caracterización de los modelos de organoides generados. Para ello se realizaron análisis del perfil de expresión mediante secuenciación de RNA tanto de los organoides de CLP como de los tejidos de origen.

Los estudios de expresión génica en organoides descritos en la literatura son limitados. Por ejemplo, Van de Wetering y colaboradores realizaron un análisis de expresión diferencial entre organoides normales y organoides tumorales derivados de pacientes. En este estudio, los autores determinaron que los organoides normales tenían un perfil de expresión muy similar entre ellos, mientras que los organoides tumorales exhibían un patrón de expresión más heterogéneo entre pacientes [14]. Un estudio equivalente realizado en tumores de aparición temprana en CCR reportó resultados similares al comparar los perfiles de expresión génica de organoides normales y tumorales, derivados de estos tumores [87]. Sin embargo, la mayor parte de estudios de expresión génica en CCR se han realizado en muestras de tejidos tumorales de pacientes, lo cual incluye la expresión de otros componentes celulares presentes en el tejido, aparte de la expresión del componente epitelial.

Las preguntas a las que se trató de dar respuesta mediante los análisis de RNA-seq fueron varias. En primer lugar, se comparó la expresión de organoides normales y tumorales en la búsqueda de hechos diferenciales a nivel de expresión en estos modelos puramente epiteliales. Este análisis fue utilizado en la búsqueda de biomarcadores implicados en el desarrollo y progresión del CCR y en la comparativa organoide/tejido. En segundo lugar, se realizó una comparativa de los perfiles de expresión de los organoides tumorales y sus tejidos de origen para determinar si los organoides constituyen un buen modelo

funcional, no solo genético, para los pacientes de los que derivan. En tercer lugar, se realizó una comparativa entre organoides tumorales derivados de CCR derecho e izquierdo, en la búsqueda de hechos diferenciales entre estas dos entidades que puedan aportar luz sobre las diferencias a nivel de progresión y respuesta a fármacos.

En este análisis se incluyeron 6 líneas de organoides tumorales y 3 líneas de organoides normales (Tabla 12) así como los tejidos correspondientes. Los organoides utilizados, tanto tumorales como normales, corresponden a CLP, debido a la facilidad de experimentación, como se ha discutido anteriormente. Las muestras de organoides tumorales fueron secuenciadas por triplicado, en las cuales se incluyeron tres pases distintos a lo largo del cultivo de los organoides, con el fin de determinar si existen diferencias en la expresión de genes en una misma línea, durante el mantenimiento del cultivo a lo largo del tiempo. Los organoides normales fueron secuenciados por duplicado, y los tejidos una vez.

Tabla 12. Detalle de los organoides tumorales y normales incluidos en el análisis de expresión diferencial de genes. Los organoides utilizados en este estudio corresponden a CLP. En la tabla se indica si el cultivo corresponde a organoides tumorales (T) o normales (N), si provienen de un tumor derecho (D) o izquierdo (I) y el estadiaje del tumor primario.

Organoides	T/N	D/I	Estadiaje tumoral
CNO34	N	D	-
CTO36-P2	T	D	I
CNO51	N	I	-
CTO51-P01	T	I	II
CTO65-P02	T	D	III
CTO71-P01	T	D	III
CTO77-P01	T	I	II
CNO75	N	I	-
CTO84-P02	T	I	I

El análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés de *Principal Component Analysis*) mostró una segregación de las muestras en 4 grupos diferentes: organoides tumorales, organoides normales, tejidos tumorales y tejidos normales (Figura

25A). Las muestras no presentaron diferencias de expresión definidas por las tandas de secuenciación (Figura 25B).

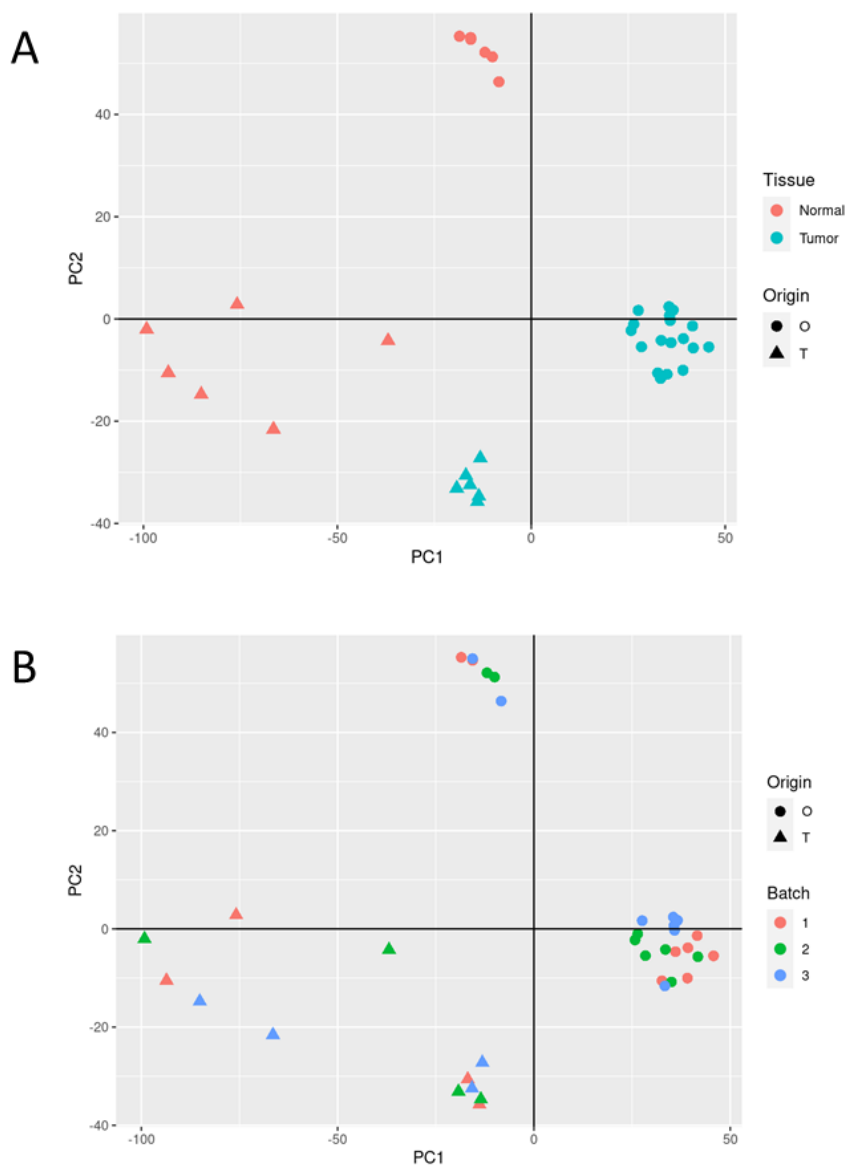


Figura 25. Análisis de componentes principales (PCA) de los organoides y los tejidos de origen correspondientes, tanto tumorales como normales. **A.** Las muestras se dividen en 4 grupos definidos: organoides normales (denotado por círculo naranja), organoides tumorales (círculo verde), tejidos normales (triángulo naranja) y tejidos tumorales (triángulo verde). **B.** Las muestras se secuenciaron en tres tandas diferentes de secuenciación; en cada una se incluyó tejidos y organoides, tanto muestras normales como tumorales. El PCA muestra la distribución homogénea de las muestras en los 4 grupos anteriormente descritos, independientemente de la tanda de secuenciación; esto evidencia que los resultados son comparables y que no existió un efecto externo introducido por la tanda de secuenciación.

3.3.2.3.1 Comparativa de los perfiles de expresión de organoides tumorales y organoides normales

Para determinar las diferencias en la expresión de genes entre los organoides tumorales y los organoides normales, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial entre estos grupos. En este análisis se utilizó un filtro de Transcritos por Millón (TPM) mayor o igual a 2, en al menos 6 muestras, para eliminar aquellos genes con una expresión muy baja. En total, se encontraron 3389 genes diferencialmente expresados ($\log_2FC_{abs} > 1$, $p\text{-val}_{adj} < 0.05$) en el grupo de organoides tumorales con respecto al grupo de organoides normales (Figura 26A). Un análisis de agrupamiento sin supervisión evidenció que los organoides normales se agruparon consistentemente, mientras que los organoides tumorales mostraron un patrón de expresión diferencial más heterogéneo (Figura 26B). Se observó un patrón similar en el perfil de expresión entre los duplicados de los CNOs y los triplicados de los CTOs, lo cual indica que la expresión génica es consistente entre países. Otros autores ya observaron esta estabilidad en los perfiles de expresión génica en los países y no solo en el perfil mutacional de los organoides tumorales derivados de cáncer colorrectal provenientes de tumores MSS en condiciones de cultivo de largo plazo [14,87,134], lo que coincide con nuestros resultados.

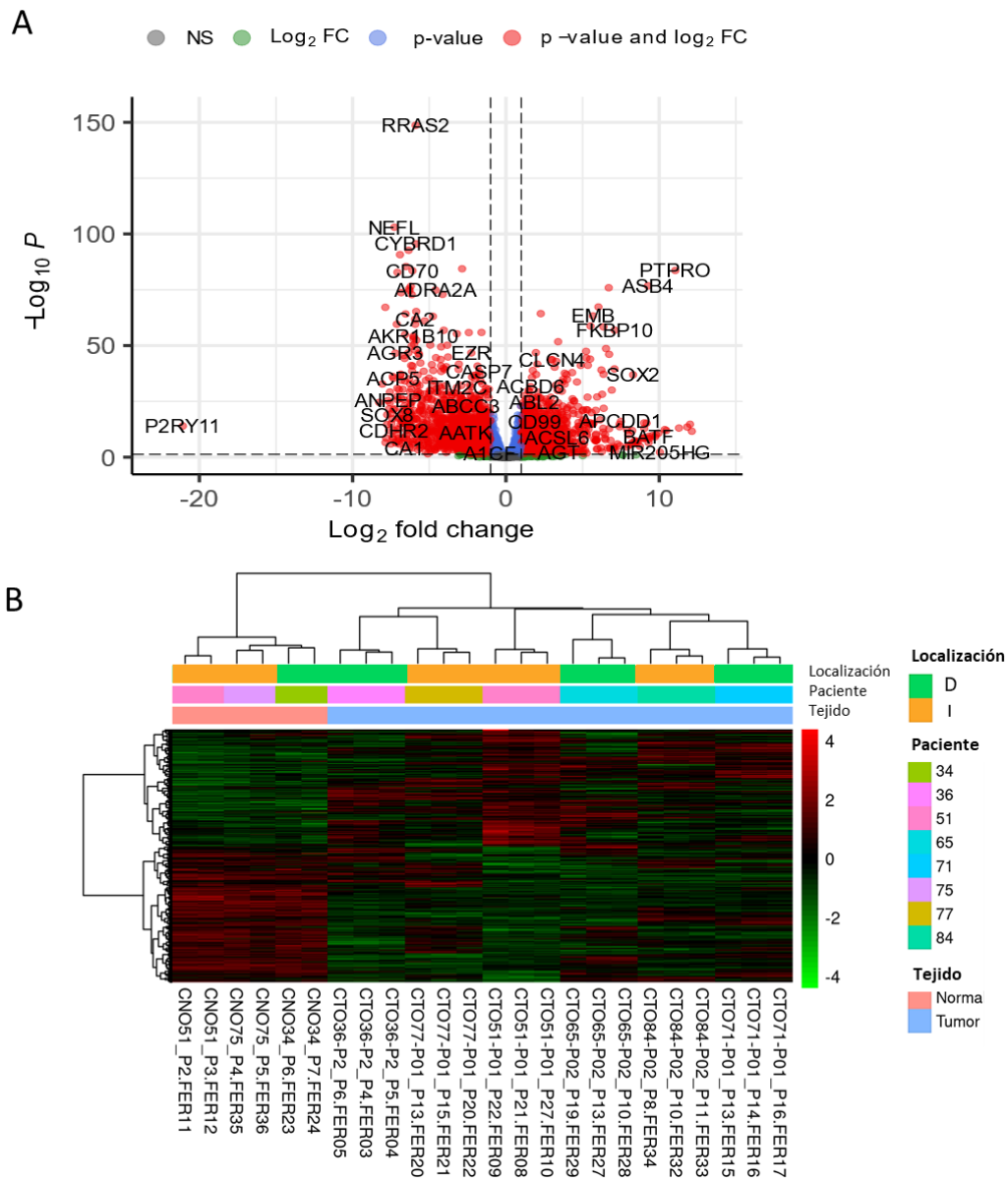
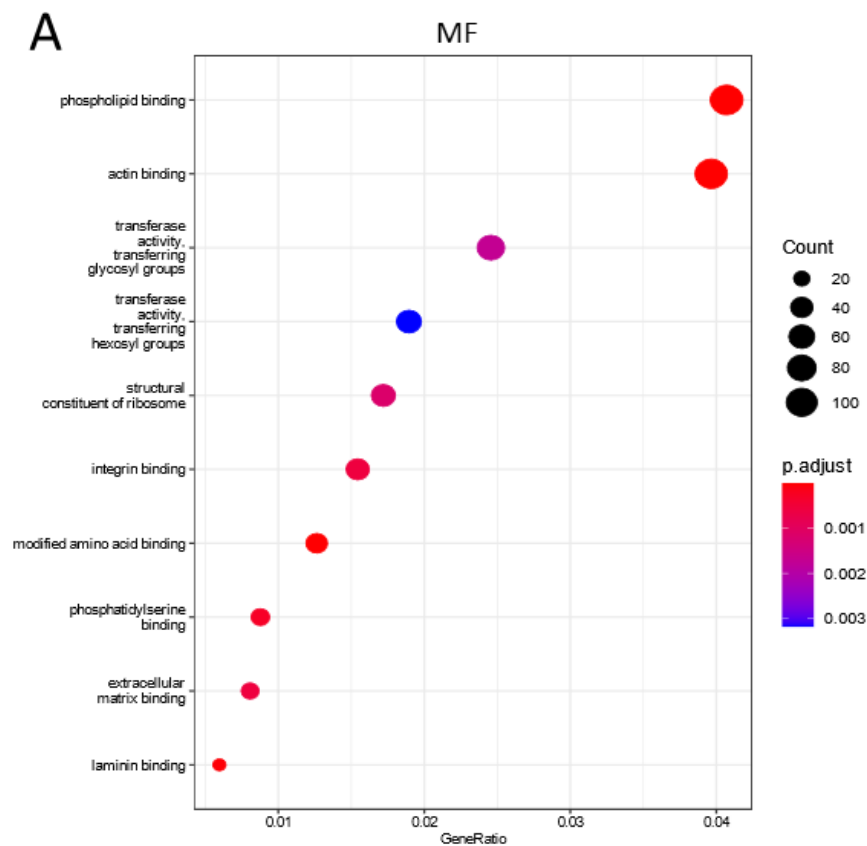


Figura 26. Análisis de expresión diferencial de genes en organoides tumorales y organoides normales derivados de pacientes con cáncer colorrectal. **A.** Se encontraron 3389 genes diferencialmente expresados (DE) en organoides tumorales con relación a organoides normales. El análisis se realizó usando un $\log_2FC_{abs} > 1$ y un $p\text{-val}_{adj} < 0.05$ y se representan en el volcano-plot con círculos rojos. Los círculos verdes indican genes que poseen un $\log_2FC_{abs} > 1$; los círculos azules indican genes con un $p\text{-val}_{adj} < 0.05$. Los círculos grises indican genes que no pasan estos filtros y por tanto no son significativos (NS). **B.** El análisis de agrupamiento sin supervisión mostró que los organoides normales se agrupan entre ellos, y presentan un perfil de expresión muy similar. Por otro lado, el perfil de los organoides tumorales es bastante heterogéneo. Los duplicados (CNOs) y los triplicados (CTOs) de los organoides se agrupan, y presentan un perfil similar. La barra lateral indica el valor del \log_2FC .

El análisis de enriquecimiento funcional reveló que los términos de ontología génica, o términos GO, más representados en CTOs se asociaron a funciones moleculares de unión de fosfolípidos y del citoesqueleto de actina, y a componentes celulares relacionados a la adhesión focal célula-sustrato y uniones célula-célula y procesos biológicos de respuesta a estrés oxidativo y secreción de péptidos (Figura 27, Anexo 3).



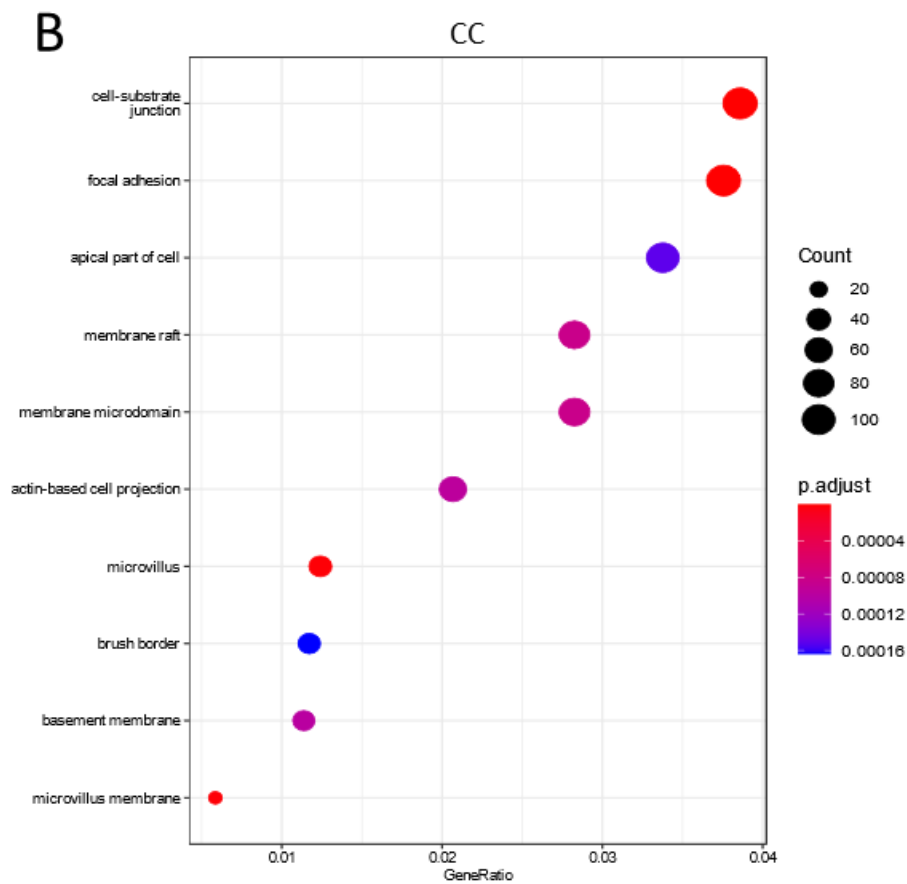


Figura 27. Análisis funcional de los términos de ontología génica (GO) enriquecidos en los organoides tumorales, en base a la función molecular (MF) (A) y a los componentes celulares (CC) (B). Se utilizó un p-valor <0.05 como punto de corte.

Para profundizar en el análisis de expresión diferencial se realizó una selección de los 10 genes más expresados en los organoides tumorales respecto a los organoides normales y se realizó una búsqueda bibliográfica que se resume en la Tabla 13. Se encontraron genes que ya habían sido relacionados con varios tipos de cáncer. Entre ellos se encuentra el gen *LINC01234*, con una expresión mucho más elevada en los CTOs respecto a los CNOs ($\log_2FC = 12.01$); *LINC01234* es un gen de RNA no codificante que pertenece a la clase de RNAs largos no codificantes (lncRNAs), y recientemente se ha descrito su sobreexpresión en muestras de tejido tumoral de colon, asociada con un menor tiempo de supervivencia en pacientes [171]. *LINC01234* promueve la proliferación, migración e invasión de células tumorales e inhibe su apoptosis. Otro gen que se encontró sobreexpresado en los CTOs es *Sine Oculis 1 (SIX1)* ($\log_2FC = 10.46$), cuya expresión se ha correlacionado con una mayor agresividad tumoral, EMT y mal pronóstico en varios tipos de cáncer; además, se ha visto que contribuye a un cambio en el microambiente tumoral favoreciendo el

reclutamiento de macrófagos asociados al tumor y estimulado la angiogénesis [172]. El gen *NR2F1*, que codifica un receptor nuclear, también se encontró sobreexpresado en los CTOs ($\log_2FC = 10.35$) y aunque este gen no se ha correlacionado con cáncer colorrectal, sí que se ha descrito en cáncer de cabeza y cuello, próstata, pulmón y mama, donde su expresión se encuentra disminuida. Sin embargo, en otros estudios se ha demostrado que la sobreexpresión de este gen podría contribuir a periodos largos de supervivencia libre de enfermedad (DFS) en cáncer de cabeza y cuello y en cáncer de próstata, con una clara influencia sobre la enfermedad mínima residual [173]. Otro gen que mostró una elevada diferencia de expresión fue el gen Regulador de P53 *PURPL*, un lncRNA que regula negativamente los niveles basales de p53 y promueve la tumorigénesis colorrectal [174,175].

Algunos de los genes más diferencialmente expresados en CTOs con respecto a CNOs, como el gen *LOC105372926* ($\log_2FC = 12.12$) no se han relacionado en la literatura con el CCR. Sería interesante, en un futuro, poder indagar sobre el papel de este gen de RNA no codificante en la tumorigénesis colorrectal, sobre todo teniendo en cuenta el valor de sobreexpresión que exhibe en organoides tumorales.

Entre otros genes sobreexpresados a parte de esta lista, también se encontró el gen de la caja D1 de Forkhead (*FOX1D*) sobreexpresado en CTOs, cuya actividad se ha relacionado con una mayor actividad proliferativa en líneas celulares de NSCLC (Li et al., 2018); también en cáncer colorrectal parece estar relacionado con la evasión de la apoptosis y posible marcador de mal pronóstico [177,178]. Asimismo, se corrobora en nuestros datos la sobreexpresión de genes que ya han sido previamente descritos en estudios con organoides tumorales de CCR, como *APCDD1*, *PROX1*, *PTCH1* y *BAMBI* [14].

Tabla 13. Lista de los 10 genes con una mayor expresión en organoides tumorales con respecto a organoides normales. La tabla incluye el log2FC y el p-valor ajustado (p-val-aj.), una descripción breve de la función del gen y si se ha reportado en algún tipo de cáncer, en la literatura.

Gen	log2FC	p-val. Aj.	Función	Reportado en literatura	Referencia
<i>LOC105372926</i>	12.13	2.91E-11	ncRNA	no reportado	-
<i>LINC01234</i>	12.01	3.15E-14	lncRNA	Carcinoma de células escamosas y cáncer gástrico	[171]
<i>FGF20</i>	11.82	4.80E-13	Mitógeno. Activación de la vía PI3K/AKT	no reportado	-
<i>FIRRE</i>	11.28	1.32E-12	Mantenimiento de represión de la cromatina. Regula estabilidad de mRNAs durante la respuesta inmune innata.	Linfoma difuso de células B grandes	[179]
<i>PTPRO</i>	11.05	3.67E-81	Puede tener rol en activación de SRC quinasas.	Candidato supresor tumoral, se ha observado subexpresado en varios tipos de cáncer	[180]
<i>SIX1</i>	10.46	1.49E-11	Relación a vías de WNT/Hedgehog/NOTCH	Expresión alterada se observa en varios tipos de cáncer	[172]
<i>NR2F1</i>	10.36	5.90E-12	Regulador transcripcional	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y de cáncer de próstata	[173]
<i>MIR205HG</i>	10.04	0.015056	lncRNA	Cáncer de cérvix y	[181,182]

				carcinoma de células escamosas de pulmón.	
<i>SAMD3</i>	9.94	1.99E-10	no reportado	no reportado	-
<i>PURPL</i>	9.79	9.94E-10	lncRNA	Cáncer colorrectal	[174,175]

Para completar el análisis de los genes diferencialmente expresados entre CTOs y CNOs, se seleccionaron los 10 genes con una menor expresión en los CTOs (Tabla 14). En esta lista de genes, el gen del receptor purigénico P2Y11 (*P2RY11*) fue el que presentaba una diferencia de expresión más llamativa ($\log_2FC = -21.08$). La expresión de este receptor se ha visto ligada a la capacidad de migración de células tumorales de hígado y páncreas. En este mismo estudio, los autores señalan que el silenciamiento de *P2RY11* en células epiteliales del ducto biliar, conocidos como colangiocitos, disminuye la fosforilación de la serina treonina quinasa 11 (STK11); esta quinasa es responsable de la activación de PTEN, y en su ausencia, este supresor tumoral no se activa, induciendo una respuesta pro oncogénica en estas células [183]. Sin embargo, no se encontró ninguna referencia a su expresión en cáncer colorrectal y, por tanto, sería interesante evaluar su papel en CCR en futuros estudios.

Se observó también una baja expresión de moesina (*MSN*) ($\log_2FC = -8.27$), un componente de la membrana celular que está involucrada en el reconocimiento célula-célula y en la señalización para el movimiento celular. En CCR solo hay un estudio que demuestra una expresión disminuida de *MSN* en la línea celular CACO2 [184].

También se encontró una baja expresión del gen que codifica la proteína 3 similar a la banda 4.1 (*EPB41L3*) ($\log_2FC = -8.06$), el cual se ha reportado como un gen supresor tumoral y cuya expresión se ha visto disminuida tanto en cáncer gástrico como en cáncer de colon [185]. De igual manera, la expresión del gen de la UDP-glucuronosiltransferasa 1-1 (*UGT1A1*) y UDP-glucuronosiltransferasa 2B17 (*UGT2B17*) se encontró disminuida en los CTOs ($\log_2FC = -7.88$ y -7.86 , respectivamente). Estas proteínas están involucradas en la transformación de moléculas pequeñas como los esteroides, bilirrubina, hormonas y fármacos, en metabolitos excretables (Entrez entry for *UGT1A1*), pero sus efectos en la tumorigénesis no han sido explorados.

Otro gen cuya expresión se encontró subexpresada ($\log_2FC = -7.69$) es la Alanil Aminopeptidasa (ANPEP), cuya baja expresión se ha reportado en casos de cáncer colorrectal asociado a colitis ulcerativa [187].

En algunos casos, la diferencia de expresión observada no coincide con lo descrito en la bibliografía. Por ejemplo, la expresión del factor de transcripción SRY-Box 8 (*SOX8*) disminuye en los CTOs respecto a los CNOs ($\log_2FC = -7.74$), sin embargo, un estudio reportó que la sobreexpresión, y no la subexpresión, de *SOX8* correlacionaba con un mal pronóstico en cáncer colorrectal, así como con el estadio de la enfermedad y con la presencia de metástasis en nódulos linfáticos[188].

Tabla 14. Lista de los 10 genes con menor expresión en organoides tumorales con respecto a organoides normales. La tabla incluye el log2FC y el p-valor ajustado (p-val-aj.), una descripción breve de la función del gen y si se ha reportado en algún tipo de cáncer, en la literatura.

Gen	log2FC	p-val. Aj.	Función	Reportado en literatura	Referencia
<i>P2RY11</i>	-21.0781	1.70E-13	Receptor purigénico. Señalización mediante GPCR	Expresión alterada en varios tipos de cáncer gastrointestinales	[183]
<i>MSN</i>	-8.27256	1.55E-23	Reconocimiento célula- célula y señalización para movimiento celular.	Cáncer de colon	[184,189]
<i>EPB41L3</i>	-8.06364	1.71E-31	Supresor tumoral que inhibe proliferación celular y promueve apoptosis.	Cáncer gástrico y de colon	[185]
<i>UGT1A1</i>	-7.86747	4.49E-65	Metabolismo del irinotecan.	Cáncer de colon	[190,191]
<i>UGT2B17</i>	-7.85683	1.56E-06	Metabolismo de andrógenos	Cáncer de próstata y de mama	[192,193]
<i>SERPINB2</i>	-7.81781	2.00E-08	Marcador de tumorigénesis en células madre de varios tipos de cáncer.	Cáncer de mama y de páncreas	[194–196]
<i>NR1H4</i>	-7.75315	3.82E-14	Regula la estabilidad de c-Myc	Cáncer de colon	[197]
<i>SOX8</i>	-7.7447	2.85E-18	Determinación de destino celular.	Cáncer hepatocelular	[188]
<i>ANPEP</i>	-7.69146	2.59E-24	Promueve angiogénesis, crecimiento tumoral y metástasis	Leucemia y linfoma	[187]
<i>DHRS9</i>	-7.62604	1.37E-11	Inhibición de la proliferación celular, inducción de la diferenciación celular y apoptosis	Cáncer de próstata y de colon	[198,199]

Otros genes, fuera de esta lista, pero que también presentaron una subexpresión que se ha indicado previamente en CCR son *RRAS2*, algunos miembros de la familia MUC (*MUC1*, *MUC17*, *MUC20*, etc.), y *CDHR2*, que se han visto involucrado en el desarrollo y progresión del CCR, como es el caso de la señalización RAS/ERK en el caso de *RRAS2* [37], y en procesos de adhesión celular y señalización de membrana, como las proteínas MUC y *CDHR2* [200,201].

3.3.2.3.2 Comparativa de los perfiles de expresión génica de organoides tumorales y su tejido tumoral correspondiente

Para llegar a una comparativa óptima entre organoides y sus tejidos correspondientes, es necesario realizar una serie de correcciones, ya que es necesario eliminar el ruido generado por la expresión de otros tipos celulares a parte de las células epiteliales presentes en los tejidos [202].

El procedimiento utilizado fue el siguiente: en primer lugar, se analizó la expresión diferencial entre organoides normales y tumorales, tal como se describe en el apartado anterior, se consideró a este conjunto de genes específicamente expresados por los organoides tumorales, como la “expresión tumoral del componente epitelial”. En un segundo paso, se tomó esta lista de genes para comparar los organoides y tejidos tumorales en conjunto, y se descartan los genes expresados exclusivamente por los organoides y no por el tejido, a lo que se asignó una “expresión dependiente de las condiciones de cultivo”. Con la lista de genes que quedó “tumoral epitelial y no dependiente de condiciones de cultivo” se realizó la comparativa de cada organoide con su tejido correspondiente. En la Figura 28 se muestra una matriz de correlación entre organoides y tejidos tumorales correspondientes antes y después de la corrección aplicada. Antes de eliminar el ruido de la expresión de genes en los tejidos, se observa una buena correlación entre los organoides tumorales y sus tejidos correspondientes, indicado por un color azul oscuro en la matriz de distancias (Figura 28A), aunque se observan ciertos puntos en los cuales un tejido correlaciona con organoides derivados de otros pacientes. Sin embargo, al comparar el set de genes “específicos de células epiteliales del tumor y no dependiente de las condiciones de cultivo”, la correlación que existe entre los organoides y su tejido correspondiente es más evidente, como se muestra

en la Figura 28B. Estos resultados indican que los organoides constituyen un modelo que representa el perfil de expresión génica del componente tumoral epitelial del tejido del cual derivan.

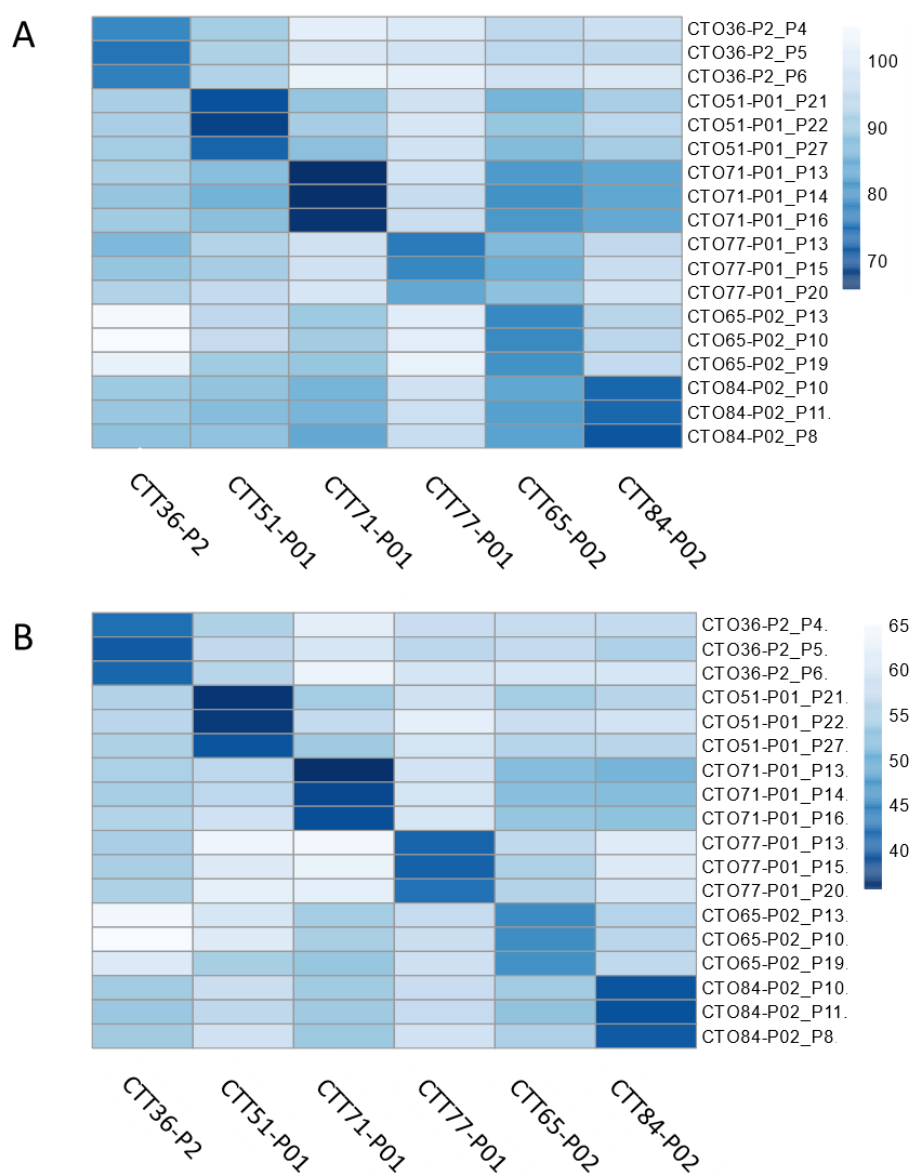


Figura 28. Matriz de distancias que indica la correlación de los organoides con su tejido de origen. En el análisis se incluyeron triplicados de los organoides, en diferentes pases de cultivo. **A.** El análisis de correlación se realizó con todos los datos de los genes diferencialmente expresados en cada muestra, organoides y tejidos. **B.** Al aplicar la corrección en los tejidos para eliminar el ruido acarreado por otras poblaciones celulares y el componente del cultivo, se observa una buena correlación entre organoides y tejido del cual derivan. Esta matriz indica la correlación de los organoides con el componente epitelial tumoral del tejido del cual derivan.

3.3.2.4 Comparativa de organoides tumorales derechos y organoides tumorales izquierdos

Uno de los objetivos planteados en esta tesis doctoral fue el análisis de los perfiles de expresión entre organoides derivados de tumores localizados en el colon derecho o izquierdo para identificar posibles biomarcadores de pronóstico o de respuesta a fármacos. En la literatura muchos trabajos apuntan a una clara diferencia, no solo en el perfil mutacional sino también en el perfil de expresión génica entre tumores localizados en el lado derecho o izquierdo del colon. Estos estudios se han realizado principalmente en muestras de tejido tumoral. Se ha demostrado que los tumores del lado derecho del colon presentan en su mayoría un genotipo hipermutado, con prevalencia de inestabilidad de microsatélites (MSI), enriquecidos en mutaciones en *BRAF*, *PIK3CA* y *TGFBR2*, y que abarcan en su mayoría tumores de los subtipos moleculares CMS1 y CMS2. Por otro lado, los tumores localizados en el lado izquierdo normalmente presentan un genotipo con una mayor cantidad de eventos de LOH, inestabilidad cromosómica y enriquecidos en mutaciones en *KRAS*, amplificaciones en *EGFR* y *HER2*, y con niveles altos de expresión de epiregulina (*EREG*) y anfiregulina (*AREG*), dos ligandos de la familia de receptores HER. Estos tumores están representados por los subtipos CMS2 y CMS4, por lo que generalmente presentan una mayor proporción en la activación de dianas de *MYC* que su contraparte derecha [19,62,63,203].

Dado que entre nuestros organoides de CLP contábamos con una cohorte balanceada respecto a la localización del tumor primario (3 en colon derecho y 3 en colon izquierdo) y a pesar de que el número de modelos es limitado, decidimos realizar un análisis de expresión diferencial entre estos dos tipos de organoides. Los modelos seleccionados fueron las líneas CTO36-P2, CTO65-P02, CTO71-P01, derivadas de tumores derechos, y las líneas CTO51-P01, CTO77-P01 y CTO84-P02, derivadas de tumores izquierdos. Las características clínico-patológicas de los pacientes de los cuales derivan los organoides se encuentran en la Tabla 10.

Hasta la fecha en la literatura, no se ha reportado este tipo de análisis en modelos de organoides derivados de pacientes, por lo que se pensó que este tipo de estudio podría aportar luz en la búsqueda de nuevos biomarcadores de respuesta, dadas las diferencias de estos tumores observadas en la clínica y a que estos modelos reflejan fielmente el

fenotipo tumoral del tejido de origen. En el futuro se añadirán más modelos a estos análisis.

En el análisis de expresión diferencial entre organoides tumorales derechos e izquierdos se encontró un total de 632 genes diferencialmente expresados ($\log_2FC_{abs} > 1$, $p\text{-val}_{adj} < 0.05$) (Figura 29).

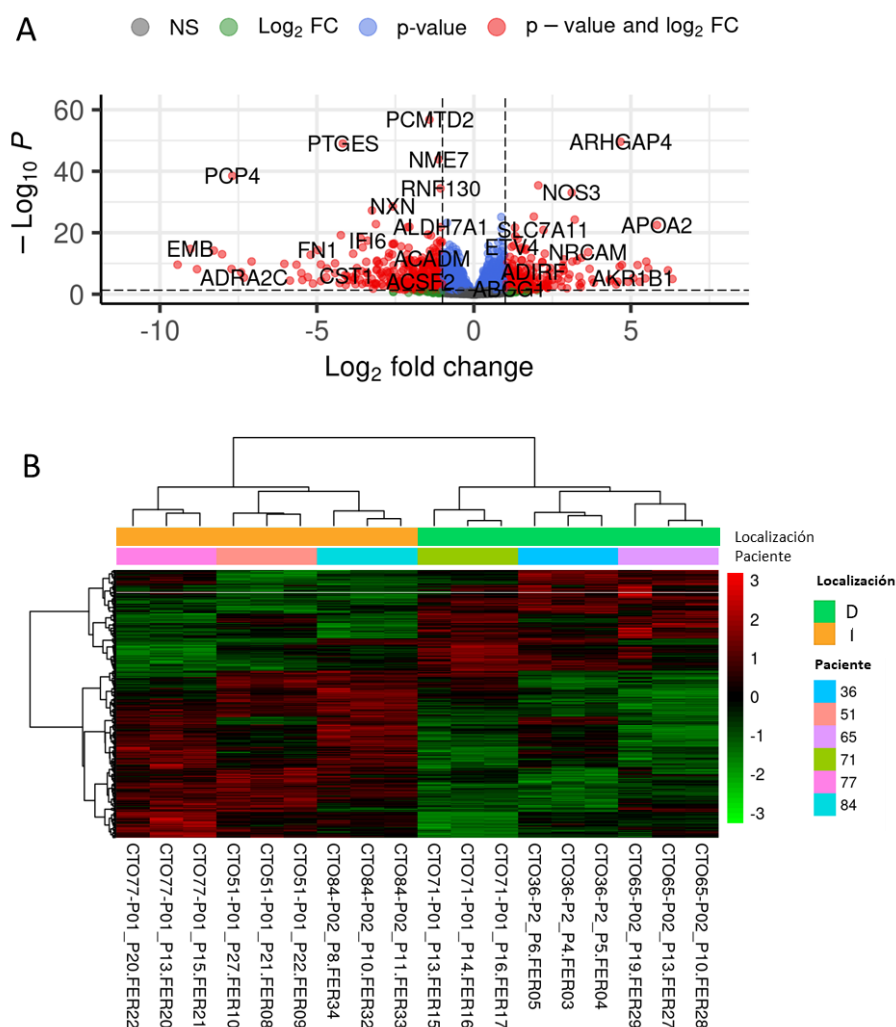


Figura 29. Análisis de expresión diferencial de genes en CTOs derechos e izquierdos. **A.** Se encontraron 632 genes diferencialmente expresados (DE) en organoides tumorales derechos con relación a los organoides tumorales izquierdos. El análisis se realizó usando un $\log_2FC_{abs} > 1$ y un $p\text{-val}_{adj} < 0.05$. En el volcano-plot los genes DE se representan con círculos rojos. Los círculos verdes indican genes que poseen un $\log_2FC_{abs} > 1$; los círculos azules indican genes con un $p\text{-val}_{adj} < 0.05$. Los círculos grises indican genes que no pasan estos filtros y por tanto no son significativos (NS). **B.** El análisis de agrupamiento sin supervisión mostró que los CTOs se dividen en dos grupos: CTOs derechos (barra superior verde) y CTOs izquierdos (barra superior amarilla). Por otro lado, el perfil de los organoides tumorales es bastante heterogéneo. Los duplicados (CNOs) y los triplicados (CTOs) de los organoides se agrupan, y presentan un perfil similar. La barra lateral indica el valor del \log_2FC .

Entre los términos GO enriquecidos en organoides derechos se encontró los procesos biológicos de “adhesión célula-sustrato” y términos relacionados con respuesta inmune (Figura 30, Anexo 4).

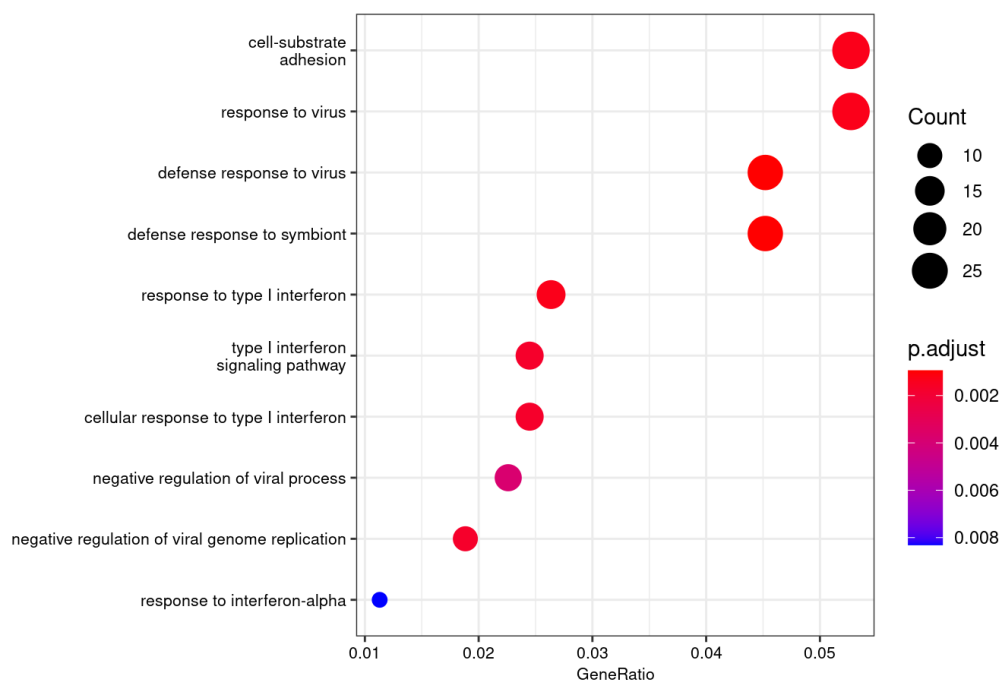


Figura 30. Análisis de enriquecimiento funcional de ontología génica (GO) enriquecidos en los organoides tumorales derechos, en base a los procesos biológicos (BP). Se utilizó un p-valor <0.05 como punto de corte.

El gen con una menor expresión en organoides derechos fue la proteína Dedo de zinc con dominio SCAN 18 (*ZSCAN18*) ($\log_2FC = -9.43$). Un estudio reportó que esta proteína presentaba una subexpresión significativa en muestras de tejido de cáncer colorrectal en comparación con muestras de mucosa normal [204] y también se ha relacionado la pérdida de su actividad con una ventaja de crecimiento independiente de anclaje celular en cáncer renal [205], un proceso relevante en el inicio del EMT y metástasis. Es interesante ver que la subexpresión de este gen se observó en organoides derechos, asociados con una mayor agresividad [19,63]. Por otro lado, el gen con una mayor expresión en los organoides derechos en comparación con los izquierdos, fue el gen que codifica la ubiquitina ligasa, *RNF217* ($\log_2FC = 6.32$). Un estudio reciente ha correlacionado la expresión de esta proteína con la progresión del CCR en pacientes, y se ha visto que una mayor expresión correlaciona con un peor pronóstico de supervivencia

a largo plazo [206]. Algunos genes de interés reportados en literatura y relacionados con cáncer se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Genes alterados en CTOs derechos en relación con CTOs izquierdos. El log₂FC indica sobreexpresión en los CTOs derechos si el valor es positivo, y subexpresión si es negativo.

Gen	log ₂ FC	p-val.aj.	Función	Reportado en tipo de cáncer	Referencia
RNF217	6.324276	0.000197	Ubiquitina ligasa	Cáncer colorrectal	[206]
RBP1	6.182941	7.19E-07	Transporte de retinol celular	Cáncer de próstata y de cérvix	[207,208]
APOA2	5.831221	2.36E-20	Apolipoproteína, metabolismo de lípidos	Cáncer de páncreas	[209]
SNURF	5.550983	1.76E-07	Coregulador transcripcional	Cáncer testicular	[210]
PWAR6	5.492483	2.17E-09	lncRNA	Cáncer de páncreas y glioma	[211,212]
MME	5.458432	0.000144	Actividad peptidasa, degrada factores de crecimiento mitogénicos como FGF-2 e IGF.	Subexpresado en varios tipos de cáncer	[213]
ZNF486	5.278427	0.001106	Proteína dedo de zinc	Cáncer de próstata	[214]
SNRPN	5.215453	2.09E-08	Coregulador transcripcional	Cáncer testicular	[210]
AKR1B1	5.075708	0.000112	Aldo-Keto reductasa	Sobreexpresión en varios tipos de cáncer	[215,216]
VCAN	4.911792	0.001102	Componente mayoritario de la matriz extracelular, involucrado en adhesión celular, migración, y morfogénesis tisular	Cáncer gástrico, cáncer de mama	[217,218]

ZSCAN18	-9.43633	1.72E-08	Proteína dedo de zinc	Cáncer colorrectal y cáncer renal	[204,205]
EMB	-9.03056	4.37E-13	Glicoproteína transmembrana, involucrada en la señalización célula-ECM	Cáncer de mama, cáncer de próstata	[219,220]
SATB2-AS1	-7.71815	2.89E-07	RNA antisentido	Cáncer colorrectal, osteosarcoma	[221,222]
PCP4	-7.69351	7.46E-36	Regulador de la actividad de calmodulina	Carcinoma de la corteza suprarrenal	[223]

3.3.2.5 Perfil de expresión de miRNAs de organoides y tejidos tumorales

El estudio de los miRNAs ha ido tomando fuerza en los últimos años, y se han estudiado como moléculas con un alto potencial como biomarcadores terapéuticos, considerando su papel en el desarrollo, progresión y metástasis del CCR [59]. Debido a su papel como reguladores de la expresión génica, se han asociado a la modulación de varias vías de señalización implicadas en esta enfermedad, como la vía de WNT, EGFR, TGF- β y TP53. También se ha observado que la expresión de estos RNAs no codificantes puede ser detectada en sangre, lo cual ha generado un interés como posibles biomarcadores de ayuda al diagnóstico mediante técnicas no invasivas [60]. Recientemente, un estudio evaluó la correlación de la expresión de miRNAs en base a la localización del tumor primario en muestras de tejido de CCR [224]. En este estudio, los autores encontraron 17 miRNAs sobre expresados en CCR izquierdo, que participan en las vías de señalización de mTORC, WNT y PIK3CA-AKT, mientras que, por otro lado, encontraron 15 miRNAs diferencialmente expresados en muestras de tejido de CCR derecho, involucrados en la señalización mediada por TGF- β . Sin embargo, no existen estudios de expresión diferencial en organoides. Por esta razón, nos planteamos evaluar el perfil de expresión de miRNAs en los CTOs y determinar posibles diferencias en el perfil de expresión entre CTOs derechos e izquierdos.

3.3.2.6 Análisis del perfil de expresión de miRNAs en los CTOs derechos vs CTOs izquierdos mediante miRNA-seq

En la figura 31 se muestran los resultados del análisis de expresión diferencial de miRNAs entre CTOs derechos e izquierdos. En este análisis se incluyó un triplicado biológico de cada organoide, y se mantuvieron los mismos parámetros de cribado que se usaron en los análisis anteriores ($\log_2FC_{abs} > 1$, $p\text{-val}_{adj} < 0.05$). Como se indicó en el apartado 2.5.9, los conteos de los miRNAs de cada paciente se sumaron para obtener un análisis más robusto. Los resultados mostraron 5 miRNAs diferencialmente expresados en organoides derechos, todos ellos subexpresados en esta condición. Estos miRNAs incluyen a hsa-let-7e-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-1269a, hsa-miR-99b-3p y hsa-miR-99b-5p.

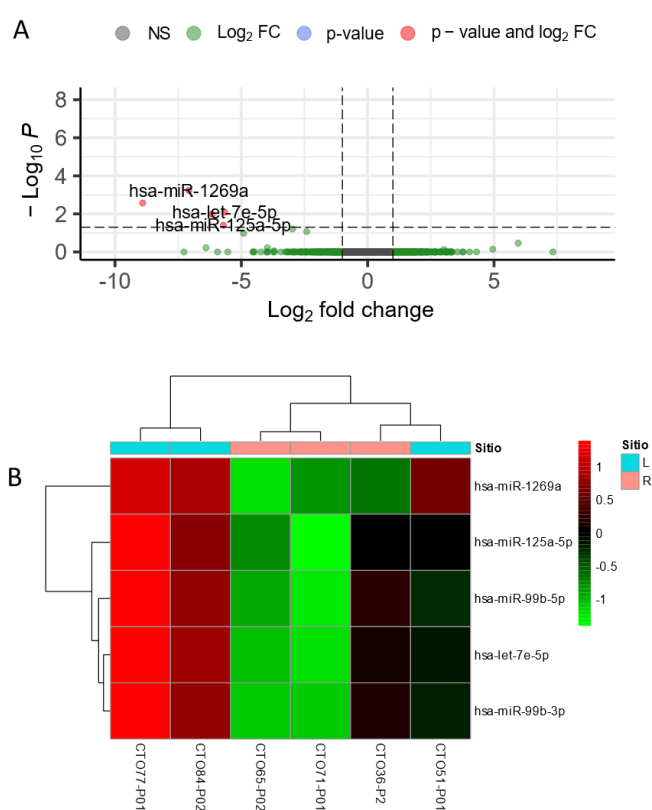
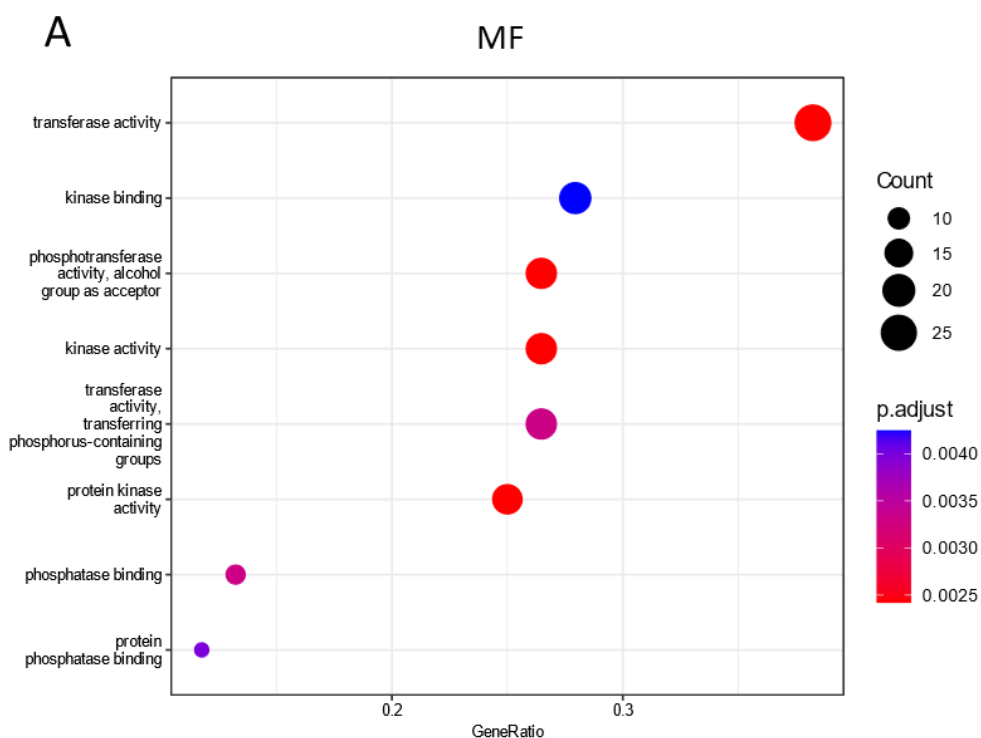


Figura 31. Análisis de expresión diferencial de miRNAs en organoides tumorales derechos vs izquierdos. **A.** Se encontraron 5 miRNAs diferencialmente expresados en CTOs derechos ($\log_2FC_{abs} > 1$, $p\text{-val}_{adj} < 0.05$). En el volcano-plot, los miRNAs DE se representan con círculos rojos. Los círculos verdes indican miRNAs que poseen solo un $\log_2FC_{abs} > 1$; los círculos azules indican miRNAs solo con un $p\text{-val}_{adj} < 0.05$. Los círculos grises indican miRNAs que no pasaron estos filtros y por tanto no son significativos (NS). **B.** El análisis de agrupamiento sin supervisión mostró que los CTOs se dividen en CTOs derechos e izquierdos; las muestras CTO36-P2 y CTO51-P01 se agruparon junto con los CTOs derechos, aunque la expresión muestra una diferencia de este grupo. La barra lateral indica el valor del Log₂FC.

A continuación se realizó una búsqueda de los genes diana de estos 5 miRNAs y se encontraron un total de 70 genes, según la base de datos de miRTarBase [129]. De esta base de datos se seleccionaron aquellos genes que han sido validados experimentalmente por qPCR, *Western Blot* o *Reporter Assay*, lo cual indica que la relación de estos miRNAs con los genes diana reportados está respaldada con evidencia fuerte. El análisis de enriquecimiento funcional de los genes diana exhibió un enriquecimiento en los términos GO de “regulación positiva de la proliferación celular”, “regulación positiva de la fosforilación”, “actividad transferasa” y “actividad quinasa”. En cuanto a vías de señalización, los genes estuvieron relacionados con “resistencia a inhibidores de tirosina quinasa de EGFR” y “señalización mediante PI3K-AKT” (Figura 32, Anexo 5).



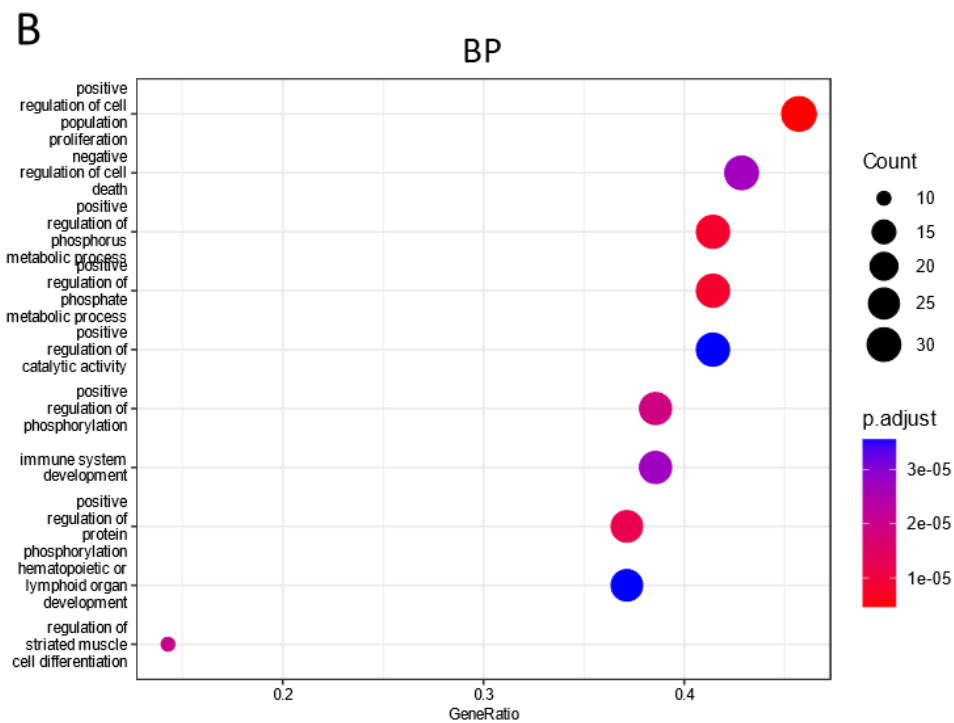


Figura 32. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes relacionados con los miRNAs diferencialmente expresados en CTOs derechos, en comparación con los CTOs izquierdos. Se muestran los términos enriquecidos en funciones moleculares (MF) (A) y en procesos biológicos (BP)(B). El tamaño del círculo indica el número de genes asociados al término enriquecido y el color indica el p-valor ajustado correspondiente.

En la literatura se ha reportado que en tejido tumoral izquierdo se encuentran sobreexpresados los miRNAs de la familia hsa-let7, hsa-miR-125 y hsa-miR-99, entre otros [224], lo cual concuerda con los resultados observados en nuestros CTOs. El análisis diferencial de miRNAs se ha descrito sobre todo en cohortes de tejido normal y tumoral de CCR, con un número limitado de muestras, y normalmente estos estudios se apoyan en cohortes de validación obtenidas de bases de datos como, por ejemplo, el TCGA-COAD. En nuestro caso, el análisis de expresión diferencial de miRNAs en tejidos derechos e izquierdos correspondientes a nuestros CTOs también mostró una diferencia de expresión entre los dos grupos evaluados (Figura 33).

3.3.2.7 Análisis del perfil de expresión de miRNAs en los tejidos derechos vs tejidos izquierdos mediante miRNA-seq

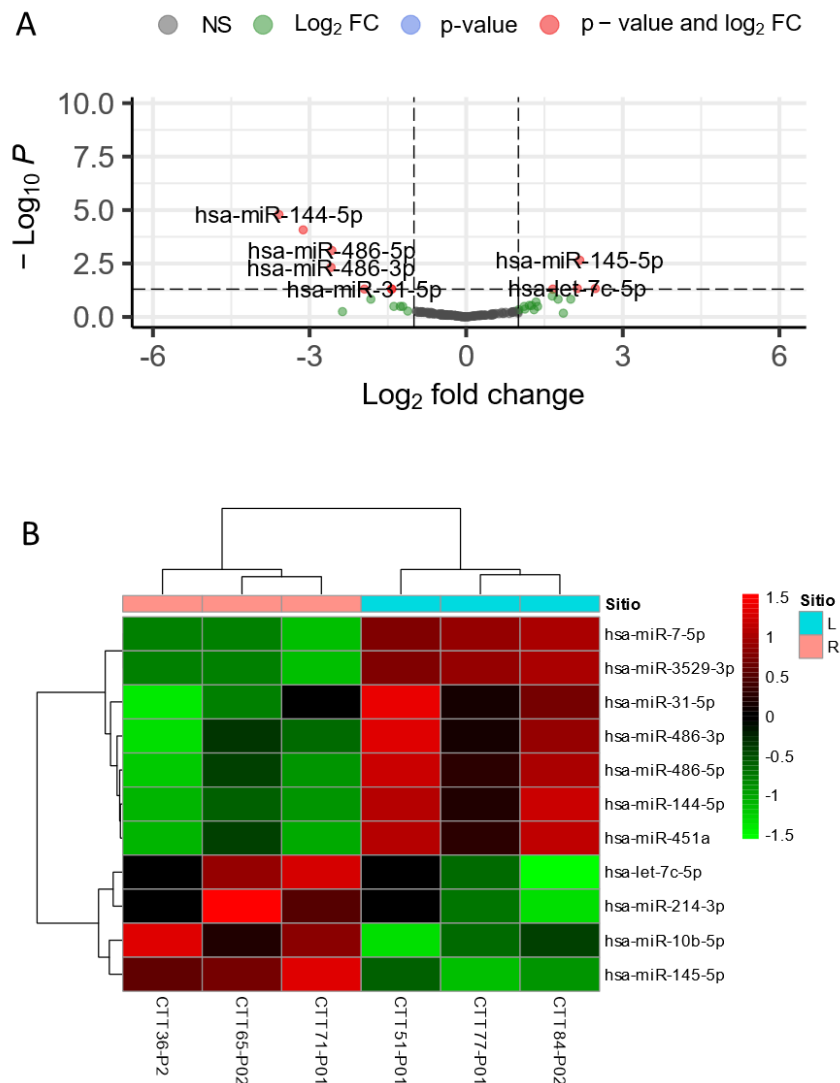


Figura 33. Análisis de expresión diferencial de miRNAs en tejido tumoral derecho vs izquierdo. **A.** Se encontraron 11 miRNAs diferencialmente expresados en tejido tumoral derecho ($\log_2FC_{abs} > 1$, $p\text{-}val_{adj} < 0.05$). En el volcano-plot, los miRNAs DE se representan con círculos rojos. Los círculos verdes indican miRNAs que poseen solo un $\log_2FC_{abs} > 1$; los círculos azules indican miRNAs solo con un $p\text{-}val_{adj} < 0.05$. Los círculos grises indican miRNAs que no pasaron estos filtros y por tanto no son significativos (NS). **B.** El análisis de agrupamiento sin supervisión mostró que los tejidos se agrupan en base a su localización. La barra lateral indica el valor del Log₂FC.

En tejido tumoral derecho se encontraron 11 miRNAs sobre expresados ($\log_2FC_{abs} > 1$, $p\text{-}val_{adj} < 0.05$), cuyo análisis de enriquecimiento funcional evidenció el enriquecimiento en

los términos GO de “regulación negativa de la muerte celular”, “regulación de la adhesión celular” y “uniones de quinasas” (Anexo 6).

El miRNA hsa-miR-214-3p fue el miRNA con mayor expresión en tejido tumoral derecho ($\log_2FC = 2.47$). Este miRNA está implicado en la regulación de la metiltransferasa *EZH2*, que está involucrada en la metilación de las histonas H3 y H4, y en el mantenimiento del estado reprimido de la cromatina. Los niveles bajos de esta metilación se han observado en el desarrollo de varios tipos de cáncer [225]. Por otro lado, hsa-miR-144-5p fue el miRNA con los niveles más bajos de expresión en tejido tumoral derecho ($\log_2FC = -3.58$). Este miRNA se ha visto involucrado en el cáncer de células renales de células claras (*clear cell renal cell carcinoma*, ccRCC); los niveles bajos de hsa-miR-144-5p junto con niveles altos de hsa-miR-186-3p en plasma de pacientes con ccRCC correlaciona con una peor supervivencia general [226]. Sin embargo, no se han encontrado referencias al papel de este miRNA en CCR. Los miRNAs diferencialmente expresados en tejido tumoral derecho se muestran en detalle en el Anexo 7. De forma complementaria, también se realizó este análisis en tejido normal vs tejido tumoral, en el cual se observa una expresión diferencial de miRNAs en el tejido tumoral en comparación con el tejido normal (Anexo 8), pero ya que estas diferencias se han descrito ampliamente en literatura [6,17,59,60,62] y que nuestro objetivo es centrarnos en las diferencias moleculares de la enfermedad entre CCR derecho e izquierdo, estos resultados no se discuten más a fondo.

Como se ha comentado previamente, el análisis diferencial de miRNAs no se ha realizado en organoides tumorales derivados de pacientes con CCR, lo cual es por tanto, novedoso. Sin embargo, es necesario señalar que el número de muestras evaluadas en esta tesis limita el alcance de los resultados obtenidos. Por esta razón, sería recomendable realizar estudios futuros de caracterización de los perfiles de miRNAs de CTOs que complementen este tipo de análisis, con un mayor número de muestras de organoides tumorales derechos e izquierdos. Además, en este contexto, sería interesante realizar un estudio similar con organoides derivados de tumores con estadios distintos, para intentar correlacionar los perfiles de expresión de miRNAs con un estadio tumoral en concreto.

3.3.3 Ensayo de crecimiento de las líneas de organoides

Durante el seguimiento de los cultivos de organoides establecidos, se detectó una diferencia de crecimiento entre las líneas de organoides; algunas crecían rápidamente de manera que cada semana se debía realizar un pase del cultivo, mientras que otras líneas, por el contrario, tardaban más de una semana en crecer hasta una densidad suficientemente elevada como para realizar un pase. Nos pareció interesante poder caracterizar de manera objetiva este hecho diferencial y, por otro lado, determinar que tiempos son los adecuados para la realización de los ensayos de sensibilidad a fármacos, ya que los organoides deberían estar en una fase de crecimiento exponencial en el momento de iniciar el tratamiento y durante todo el periodo que durará el mismo.

Con el fin de cuantificar la diferencia de crecimiento en las líneas de CTOs, se cuantificó a diferentes tiempos el número de células vivas durante un periodo de 7 días, tal y como se describe en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos. En este análisis se incluyeron además dos organoides derivados de un mismo tumor, CTO36-P1 y CTO36-P2, para poder comparar el crecimiento entre ellos.

Para poder comparar los perfiles de crecimiento de los diferentes organoides, se calculó el valor del AUC (*Area Under the Curve*) de la curva del crecimiento de los CTOs (Figura 34A y 34B). Las líneas CTO36-P1 y CTO36-P2 exhibieron los valores más altos de AUC, pero también mostraron una variabilidad alta en relación con el resto de CTOs. En cultivo, estos organoides crecieron muy rápidamente tras los pases, y formaron organoides en las primeras 24 horas de crecimiento, que luego aumentaron de tamaño rápidamente. Por otro lado, la línea CTO84-P02 presentó el AUC más bajo de la lista, se formaron organoides a las 48 horas tras el pase y alcanzaron una densidad alta tras 10 – 12 días de crecimiento.

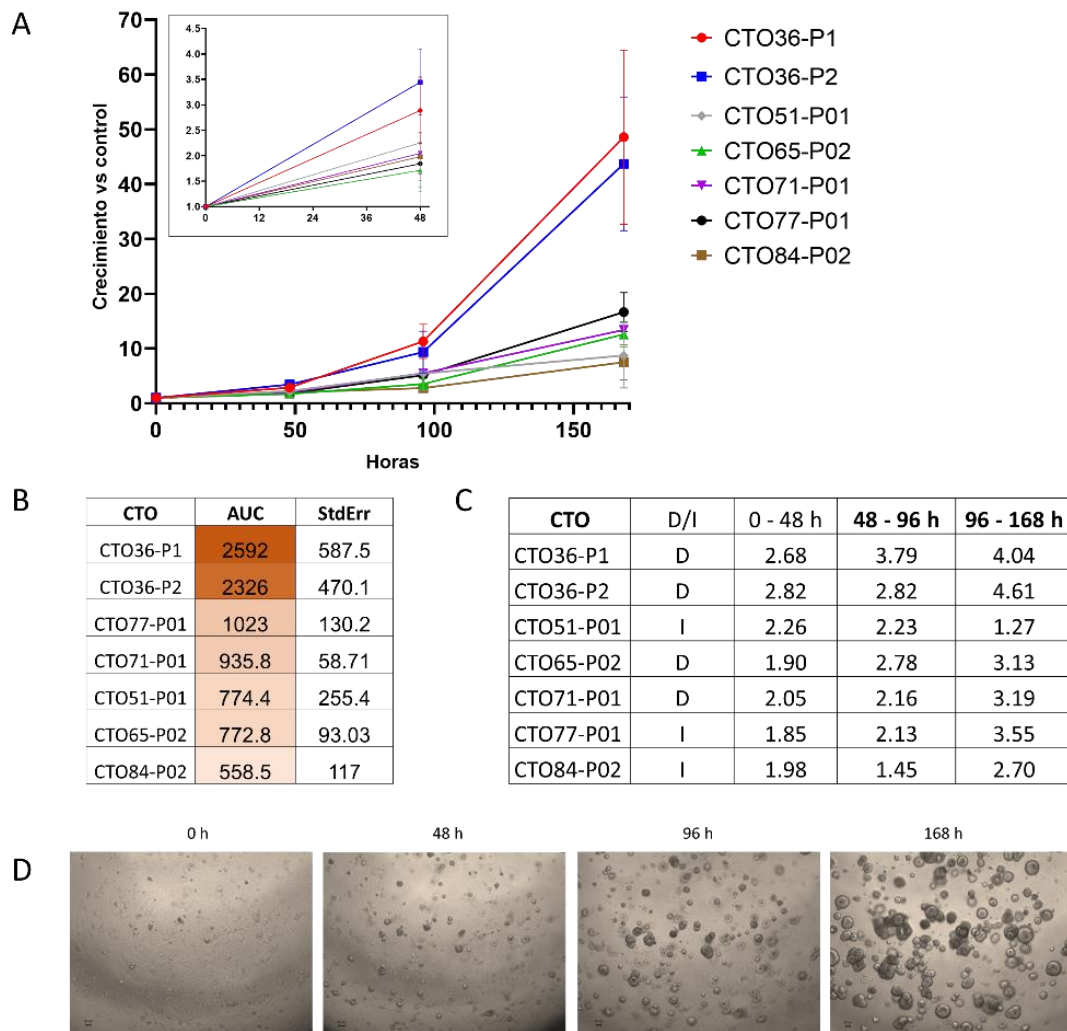


Figura 34. Los organoides exhiben tiempos distintos de crecimiento. **A.** Medidas del crecimiento de los CTOs durante 7 días en cultivo. Las medidas de la luminiscencia se realizaron a las 0h, 48h, 96h y 168h. El gráfico inset muestra la diferencia de crecimiento durante las primeras 48 horas. **B.** Valores del AUC en el crecimiento de CTOs. Los valores más altos se encuentran marcados en naranja, y la intensidad disminuye a valores menores de AUC. **C.** Los organoides exhiben una tasa de crecimiento diferencial desde las primeras 48 horas y esta diferencia se mantiene en las siguientes medidas, hasta las 168 horas. La tasa de crecimiento representa el promedio de los valores medidos en cada tiempo, calculando la razón entre la medida final y la inicial de la viabilidad celular. Se indica si el CTO proviene de un tumor derecho (D) o izquierdo (I). **D.** Crecimiento secuencial de la línea CTO36-P2 observado en cultivo durante 168 horas, a modo de ejemplo. Barra de escala 50 μ m.

Por otro lado, las líneas CTO51-P01, CTO65-P02, CTO71-P01 y CTO77-P01 de estadios II y III presentaron un crecimiento similar entre ellas, con un AUC similar. En cultivo, estas

líneas formaron organoides entre las 24-48 horas después del pase, que aumentaron de tamaño progresivamente, hasta pasarlos entre los días 8-10.

No se observó una diferencia en el crecimiento entre CTOs derechos e izquierdos, o dependiente del estadio; será interesante seguir acumulando este tipo de datos para poder observar algún tipo de correlación, con un número mayor de muestras. Por otro lado, con una n mayor se podrá analizar si el AUC de crecimiento de un organoide refleja o se puede correlacionar con alguna característica interesante en la clínica de los pacientes de los que derivan.

Además, la caracterización de la curva de crecimiento de los organoides nos ha permitido establecer un periodo óptimo para los ensayos de sensibilidad a fármacos, de manera que en las primeras 48 horas tras el plaqueo en todos los casos observamos una tasa de crecimiento cercana a 2, y, por tanto, esto nos indica que el cultivo se ha duplicado y está proliferando activamente. Establecemos este tiempo tras el plaqueo para inicial los tratamientos con fármacos. Observamos además que, tras 7 días en cultivo, la mayoría de estos cultivos siguen creciendo activamente y no se ha llegado al estado estacionario, por tanto, determinamos un margen de tiempo óptimo de duración de los tratamientos de entre 5 y 7 días.

3.4 Organoides como modelo predictivo de respuesta a fármacos usados en el tratamiento de CCR

3.4.1 Ensayos de sensibilidad de los CTOs al tratamiento con quimioterápicos

Una de las ventajas que presentan los organoides es la facilidad de manipulación *in vitro* que puede permitir el cribado de fármacos de forma masiva y en base al perfil molecular del paciente del cual derivan. Se prevé que este potencial permita en un futuro que distintos fármacos se puedan probar en condiciones de laboratorio y que estos resultados se puedan trasladar a la clínica, ayudando a decidir el tratamiento más adecuado. Como se ha explicado en la introducción, esto ya se ha llevado a cabo en fibrosis quística y se han tomado decisiones de tratamiento en pacientes en base a la respuesta de los organoides derivados de sus tejidos [99]. En cáncer, ya existen ensayos clínicos que tratan

de demostrar este gran potencial de los organoides, como el ensayo clínico SENSOR [117] el cual no arrojó buenos resultados preliminares, haciendo hincapié en las limitaciones del estudio y en posibles mejoras del diseño experimental para futuras investigaciones.

En este trabajo se ha puesto a punto un protocolo óptimo para la realización de ensayos de sensibilidad a fármacos y se han llevado a cabo tratamientos, tanto con quimioterápicos como con tratamientos dirigidos a dianas concretas, como se explicará en el siguiente apartado. Los cultivos de organoides utilizados corresponden a las líneas de CLP descritas anteriormente (Tabla 10).

En primero lugar se evaluó la sensibilidad de los CTOs al tratamiento de primera línea con agentes quimioterápicos; los CTOs se expusieron a varias concentraciones de 5-Fluorouracilo (5-FU), Oxaliplatino y a la combinación de ambos, simulando el tratamiento inicial que reciben los pacientes diagnosticados con CCRL avanzado, que han sido sometidos a cirugía para resear el tumor.

Los perfiles de respuesta a cada tratamiento permitieron identificar distintos niveles de respuesta a los fármacos evaluados entre las líneas de organoides. Se realizaron al menos dos ensayos independientes con tres réplicas biológicas cada uno, y los valores del AUC fueron reproducibles entre ensayos de la misma línea (R cuadrado > 0.85 , Anexo 9).

El tratamiento con 5-FU mostró un comportamiento diferencial entre 2 grupos de organoides (Figura 35), un grupo que mostraban menor sensibilidad al tratamiento, CTO65-P02, CTO71-P01 y CTO84-P02, y otro grupo más sensible, CTO36-P1, CTO36-P2, CTO51-P01 y CTO77-P01. Es importante notar que las dos líneas derivadas del paciente 36, CTO36-P1 y CTO36-P2, y la línea CTO84-P01 provienen de tumores de estadio I y que CTO36-P01 y CTO36-P02 están en el grupo de organoides sensibles, mientras que CTO84-P02 presenta una menor sensibilidad al tratamiento. En contraste, las líneas CTO65-P02 y CTO71-P01 presentaron la menor sensibilidad observada en respuesta al tratamiento, presentando los valores de AUC más elevados. Estas dos líneas provienen de tumores derechos de estadio III, y su comportamiento correlacionaría con lo que se ha visto en la práctica clínica, en donde esta clase de tumores responden en menor medida a los tratamientos.

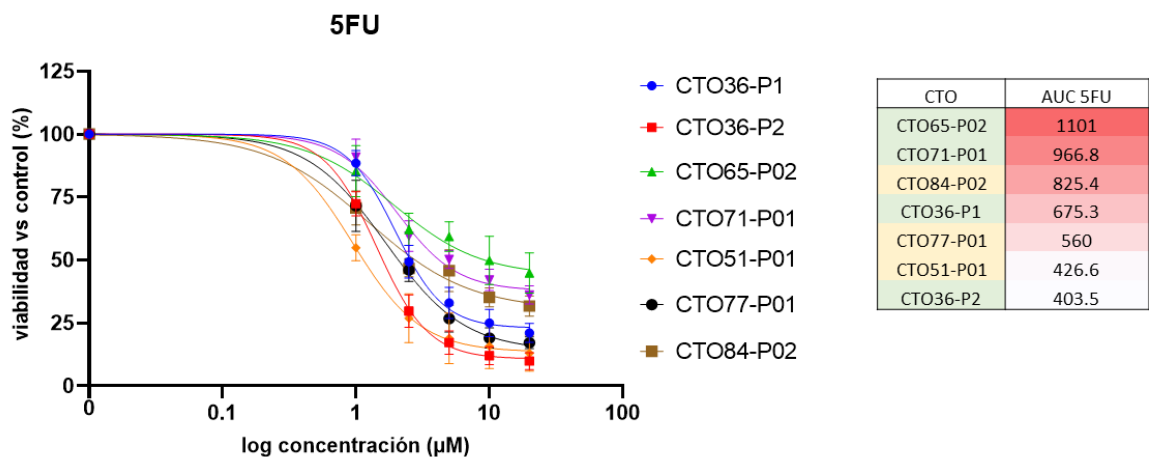


Figura 35. Curva de sensibilidad de los CTOs al tratamiento con 5-FU. Se representa la viabilidad de las líneas de CTOs en porcentaje con respecto a un control sin tratamiento (100%), en presencia de diferentes concentraciones de 5-FU, expresadas en logaritmo en base 10. La tabla a la derecha del gráfico indica los valores del AUC medidos para cada CTO. El color de las celdas de los CTOs indica si proceden de un tumor derecho (verde) o izquierdo (amarillo).

En la práctica clínica, una de las opciones de tratamiento estándar para pacientes con cáncer colorrectal incluye tratamiento adyuvante con 5-FU o capecitabina, con o sin oxaliplatino. Como se ha descrito anteriormente, el oxaliplatino es un agente alquilante, que previene la replicación del DNA y la transcripción. En este contexto, aunque este fármaco no se utilice en el tratamiento de los pacientes de forma individual, decidimos evaluar la sensibilidad de los CTOs al oxaliplatino, para luego poder comparar los resultados de la combinación de ambos fármacos. Los resultados indicaron una división de los CTOs en dos grupos: las líneas CTO84-P02, CTO65-P02 y CTO71-P01 exhibieron una menor sensibilidad al tratamiento con oxaliplatino, mientras que las líneas CTO36-P1, CTO36-P2, CTO51-P01 y CTO77-P01 presentaron mayor sensibilidad (Figura 36). En este ensayo se observó una separación más definida que con el tratamiento de 5-FU, pero las líneas se mantienen en los mismos grupos de sensibilidad.

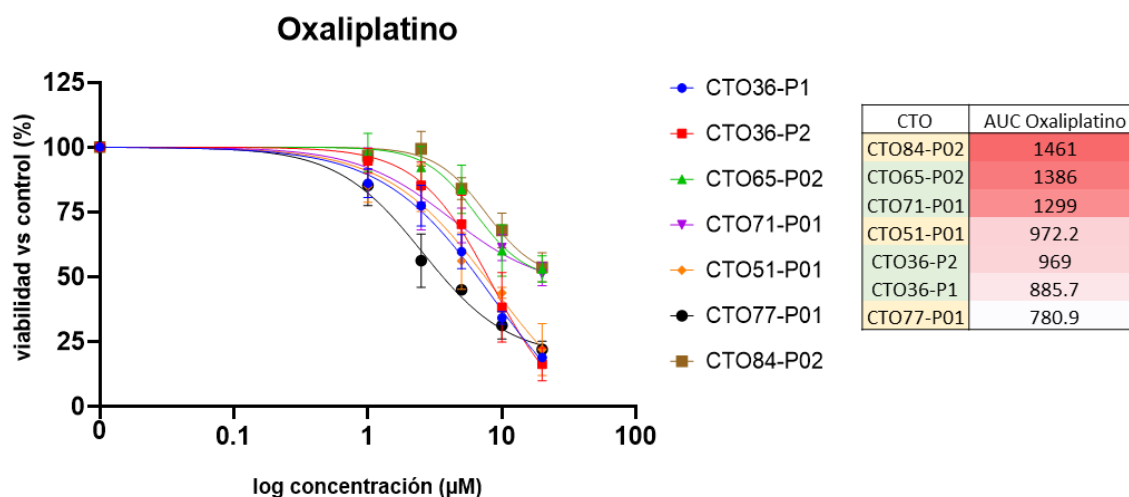


Figura 36. Curva de sensibilidad de los CTOs al tratamiento con Oxaliplatino. Se representa la viabilidad de las líneas de CTOs en porcentaje con respecto a un control sin tratamiento (100%), en presencia de diferentes concentraciones de oxaliplatino, expresadas en logaritmo en base 10. La tabla a la derecha del gráfico indica los valores del AUC medidos para cada CTO. El color de las celdas de los CTOs indica si proceden de un tumor derecho (verde) o izquierdo (amarillo).

Una vez realizados los tratamientos individuales, se evaluó la respuesta de los CTOs al tratamiento del 5-FU en combinación con el oxaliplatino. Se ha descrito que el uso de oxaliplatino amplifica la sensibilidad de los tumores cuando se combina con el 5-FU o la capecitabina, en comparación con el uso de estos compuestos de manera individual, en el tratamiento de adyuvancia en CCR [227]. Como se observa en la Figura 37, los resultados mostraron una mayor sensibilidad generalizada de los CTOs en comparación con la sensibilidad obtenida con cada uno de los compuestos usados de manera individual. De forma interesante, los dos grupos de organoides que se formaron en base a la sensibilidad observada en los ensayos anteriores, se mantienen cuando se usan el 5-FU y el oxaliplatino en combinación. Las líneas CTO65-P02, CTO71-P01 y CTO84-P02 presentan una sensibilidad menor a la combinación con los valores más altos de AUC; por otro lado, las líneas CTO77-P01, CTO51-P01, CTO36-P1 y CTO36-P2 presentaron una sensibilidad mayor al tratamiento con valores menores del AUC.

Aunque las líneas CTO36 (-P1 y -P2) y CTO84-P02 provienen de tumores de estadio I, respondieron de forma diferente al tratamiento con 5-FU y oxaliplatino. Por un lado, las líneas CTO36-P1 y -P2, presentaron una mayor sensibilidad, mientras que CTO84-P02, exhibió una menor sensibilidad al tratamiento.

Es importante recalcar la sensibilidad menor que presenta la línea CTO84-P02 a los tratamientos utilizados. El perfil de alteraciones cromosómicas de este CTO presenta varias pérdidas del número de copias a lo largo del genoma. Llama la atención principalmente la pérdida del número de copias en la región que contiene al gen supresor tumoral *TP53*, además de que este gen presentó una frecuencia mutacional del 100%, con la mutación puntual G245S. Esta mutación puntual se encuentra en una zona frecuentemente mutada del gen de *TP53*, y se ha observado que causa una pérdida de función de la proteína p53, que resulta de un cambio conformacional de su estructura y que afecta a su capacidad de unión al DNA [228]. Asimismo, se observó una pérdida en el gen supresor tumoral *FBXW7* en esta línea y en la región del cromosoma 18 que contiene a *SMAD2*, *SMAD4* y *SMAD7*, que se asocian con progresión tumoral [160]. El perfil de mutaciones y de número de copias de esta línea se asemejó más a las líneas de organoides de estadio más avanzado, lo cual puede contribuir al comportamiento de CTO84-P02 en el tratamiento con 5-FU y oxaliplatino de forma individual, y en la combinación. Sería interesante analizar también a nivel de expresión qué diferencias presenta respecto a otras líneas estadio I más sensibles al tratamiento, como el CTO36 (-P1/-P2). Estos estudios se realizarán en un futuro tratando de aumentar el número de CTOs en los diferentes análisis.

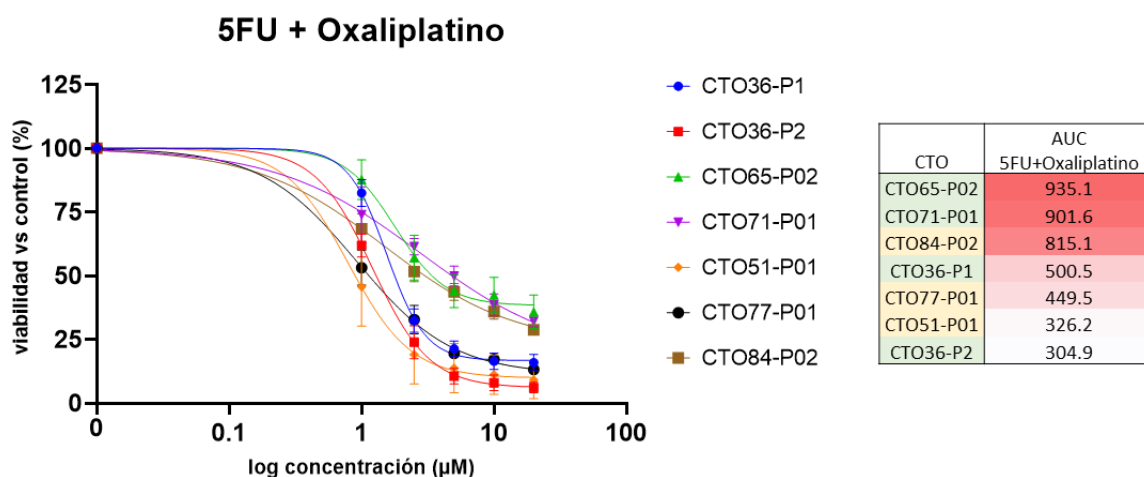


Figura 37 Curva de sensibilidad de los CTOs al tratamiento con 5-FU y oxaliplatino, en combinación. Se representa la viabilidad de las líneas de CTOs en porcentaje con respecto a un control sin tratamiento (100%), en presencia de diferentes concentraciones de la combinación 5-FU+oxaliplatino, expresadas en logaritmo en base 10. La tabla a la derecha del gráfico indica los valores del AUC medidos para cada CTO. El color de las celdas de los CTOs indica si proceden de un tumor derecho (verde) o izquierdo (amarillo).

En cuanto a la respuesta mostrada por los CTOs derivados de tumores de estadio III, se observó que las líneas CTO65-P02 y CTO71-P01 exhibieron una menor sensibilidad al tratamiento, en comparación con las líneas CTO77-P01 y CTO51-P01, ambos de estadios II. En este caso, concuerda que las líneas con mayor sensibilidad al tratamiento en combinación de 5-FU y oxaliplatino corresponden a organoides izquierdos, mientras que los CTOs derechos mostraron una menor sensibilidad. Se ha descrito en literatura que los tumores originarios en el lado derecho del colon suelen responder con menor frecuencia a tratamientos y suelen ser más agresivos, mientras que los del lado izquierdo suelen responder mejor y presentan mejor pronóstico en la supervivencia de los pacientes a largo plazo [19,229]. Sin embargo, es necesario incluir un mayor número de muestras de organoides para sustentar esta observación, y poder comprobar si realmente los organoides establecidos responden de manera diferencial dependiente de la localización del tumor del cual derivan, sea derecho o izquierdo.

El número de pacientes de los que derivan los organoides analizados es muy limitado y heterogéneo en términos de estadiaje y localización, por lo que no ha sido posible realizar comparativas de respuesta de los organoides con la respuesta de los pacientes en la clínica.

Solo los pacientes P65 y P71 recibieron tratamiento con capecitabina tras la cirugía, ya que ambos presentaron tumores de estadio III, cuya localización primaria era el colon derecho. En el caso del paciente P71, el tratamiento tuvo que ser suspendido por toxicidad, tras 3 ciclos de tratamiento administrado. Tanto el paciente P71 como el paciente P65, que sí recibió el tratamiento, a día de hoy están libres de enfermedad. En los tratamientos *in vitro*, los organoides CTO65-P02 y CTO71-P01 exhibieron una menor sensibilidad tanto al 5-FU y al oxaliplatino de forma individual, como a la combinación de ambos fármacos.

El paciente P51 presentó un tumor de estadio II de alto riesgo localizado en el colon izquierdo, y no recibió tratamiento. Este paciente falleció por causas ajenas al tumor. En los ensayos de sensibilidad, el organoide CTO51-P01 exhibió una sensibilidad alta en el tratamiento con 5-FU y oxaliplatino de forma individual y en combinación. El organoide

CTO77-P01 respondió de manera similar al tratamiento; el paciente P77 presentó un tumor de estadio II, localizado en el colon izquierdo, y para el cual no recibió tratamiento tras la cirugía. Actualmente este paciente está libre de enfermedad y no presenta progresión tumoral.

Por otro lado, los pacientes P36 y P84, presentaban un tumor de estadio I, localizado en colon derecho y colon izquierdo, respectivamente. Estos pacientes no recibieron tratamiento tras la cirugía y permanecen libres de enfermedad. En los ensayos de sensibilidad, las líneas CTO36-P1 y CTO36-P2, que derivan de dos sitios distintos del mismo tumor del paciente P36, respondieron de manera similar al tratamiento con 5-FU, oxaliplatino y la combinación de los dos fármacos. En contraste, la línea CTO84-P02 presentó una respuesta menos sensible al tratamiento, exhibiendo un patrón similar a las líneas de organoides de estadios avanzados. El paciente P84 no ha presentado una progresión en la enfermedad.

3.4.2 Tratamiento de CTOs con inhibidores de dianas específicas

El gran potencial de los organoides como modelo preclínico es que constituyen cultivos celulares derivados directamente de los tumores de cada paciente, que pueden ser amplificados en laboratorio y caracterizados molecularmente. Estas características hacen de los organoides un modelo con un gran potencial predictivo de respuesta a fármacos paciente-específica, donde, además, dependiendo de las alteraciones presentes en el tumor, se pueden probar diferentes estrategias terapéuticas.

Decidimos evaluar la respuesta de nuestros CTOs de CLP al tratamiento con inhibidores dirigidos a dianas específicas, en concordancia con las mutaciones detectadas en el panel de secuenciación Oncospot o de alteraciones presentes en el análisis del número de copias descritos en apartados anteriores. En este contexto se decidió evaluar la sensibilidad de los organoides a inhibidores de la TOP1 y del receptor EGFR, dos dianas frente a las cuales existen tratamientos aprobados para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal avanzado, irinotecan y cetuximab, respectivamente. El irinotecan es metabolizado en el hígado y en la mucosa intestinal para producir el metabolito activo SN38 [230]. Por esta razón, en los organoides se utilizó la forma activa del irinotecan, SN38. Del mismo modo, aunque en la práctica clínica se utiliza el inhibidor de EGFR

cetuximab para el tratamiento de los pacientes, en el cultivo de organoides decidimos reemplazar el uso de este anticuerpo por erlotinib, un compuesto que actúa inhibiendo EGFR a nivel de su actividad tirosina quinasa efectuada por el dominio intracelular de este receptor, que suelen ser más efectivos que los anticuerpos *in vitro*, ya que estos parecen ser bloqueados por diferentes componentes de los medios de cultivo.

Además, se evaluó la sensibilidad a un inhibidor de MEK (trametinib) y un inhibidor de PIK3CA (alpelisib), que, aunque no se utilizan en el tratamiento del cáncer colorrectal, se utiliza en el tratamiento de otros tipos de cáncer. El trametinib se utiliza en el tratamiento de melanoma localmente avanzado o metastásico, así como en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) [72,231,232]. Por otro lado, el alpelisib es un medicamento utilizado para el tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado o metastásico; recientemente, un ensayo clínico denominado ALCAP (*Alpelisib and Capecitabine in Patients With PIK3CA Mutant mCRC Patients*) se está llevando a cabo para determinar su efectividad junto con la capecitabina para el tratamiento de CCRm con mutaciones en *PIK3CA*, y cuyos resultados se esperan para el año 2025.

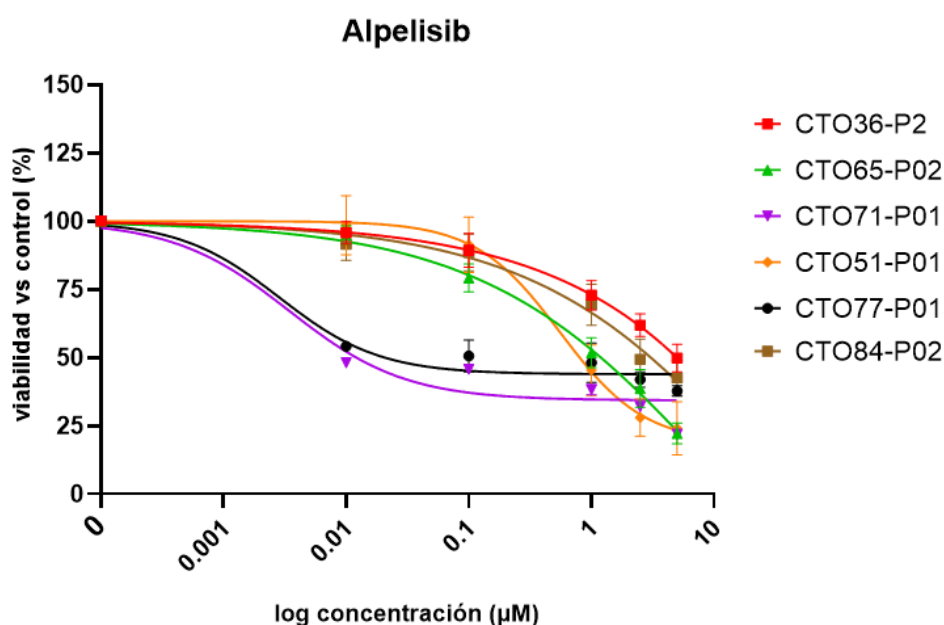
3.4.2.1 Ensayo de sensibilidad de CTOs al inhibidor de PIK3CA, Alpelisib

Las mutaciones activadoras de *PIK3CA* se han investigado ampliamente como posibles biomarcadores y dianas accionables en varios tipos de cáncer, por lo que se han desarrollado algunos inhibidores dirigidos a esta proteína y que se usan en la práctica clínica. Por ejemplo, *Idelalisib* fue el primer inhibidor de este tipo aprobado para el uso en enfermedades de las células tipo B, el *Umbralisib*, usado en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, o *Alpelisib*, aprobado para su uso en cáncer de mama de estadios avanzados [234]. En cáncer de mama, la presencia de mutaciones activadoras en *PIK3CA* se ha relacionado positivamente con la sensibilidad de los pacientes a este inhibidor [235].

De los CTOs evaluados, dos de ellos, CTO65-P02 y CTO51-P01, presentaron una mutación activadora de *PIK3CA* y respondieron de forma similar al tratamiento con *Alpelisib*. Se observó una sensibilidad ligeramente mayor en estas líneas en relación con otros CTOs sin mutaciones en *PIK3CA* (Figura 38). Se ha descrito que el tipo de mutación de *PIK3CA* podría estar asociada a la respuesta al tratamiento con *Alpelisib*, pero no se ha podido relacionar de forma concreta a una mutación específica [85]. Los dos CTOs presentaron

una mutación en el residuo 545 (CTO65-P02) y 543 (CTO51-P01), y exhiben una sensibilidad mayor que las otras líneas. Es importante tener en cuenta que estas dos líneas además presentaron una mutación activadora en *KRAS*, y que mantiene la vía de las MAPKs activa constitutivamente, y lo cual podría influir en el resultado obtenido.

Por otro lado, las líneas CTO71-P01 y CTO77-P01 presentaron una mayor sensibilidad inicial en las concentraciones más bajas de *Alpelisib*, pero la viabilidad no cayó en concentraciones mayores. La línea CTO71-P01 no presenta mutaciones en *PIK3CA*, pero tampoco en *KRAS*. Sin embargo, esta línea tiene una mutación en *BRAF* K601E, que se ha descrito que afecta al dominio quinasa, causando un efecto activador sobre *MEK* [236]. En este contexto, sería interesante evaluar la sensibilidad combinada a *Alpelisib* y *Trametinib* en esta línea. Por otro lado, la línea CTO77-P01 también presentó una sensibilidad mayor en las concentraciones más bajas del tratamiento, lo cual concuerda con la ausencia de mutaciones en *PIK3CA*. Las líneas CTO36-P2 y CTO84-P02 exhibieron menor sensibilidad al tratamiento con *Alpelisib*; estas líneas no presentaron mutaciones en *PIK3CA* y tienen mutaciones activadoras en *KRAS*. Los valores obtenidos de AUC de las distintas líneas de organoides sugiere que el estado mutacional de *PIK3CA*, por sí solo no es capaz de predecir la respuesta a *Alpelisib*, lo que ya se ha observado en otros casos [144].



Inhibidor de PIK3CA : Alpelisib

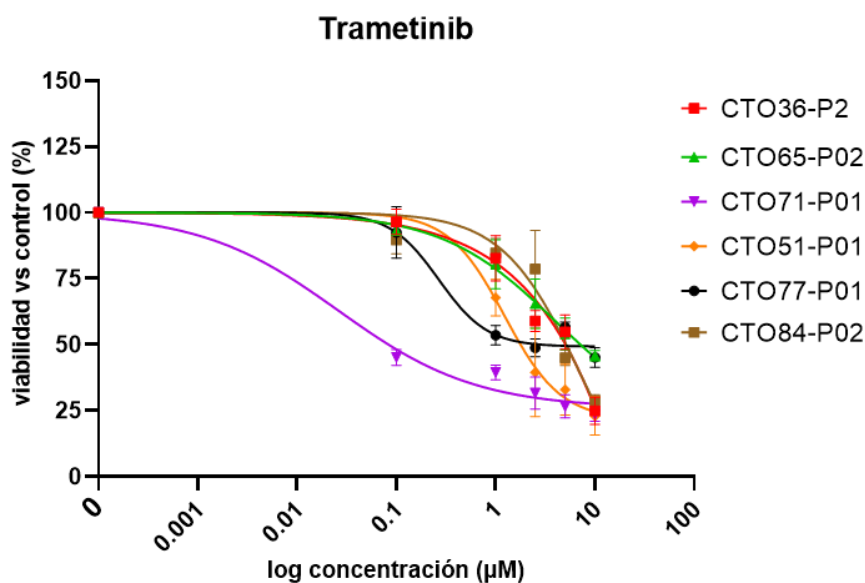
Línea de organoide	CTO36-P2	CTO84-P02	CTO77-P01	CTO65-P02	CTO51-P01	CTO71-P01
AUC Aleplisib	322.8	284	217.1	211.6	191.1	162.6
PIK3CA mut				E545K	E453K	

Figura 38. Ensayo de sensibilidad de los CTOs a Alpelisib. El ensayo de sensibilidad representa la viabilidad de las líneas de CTOs en porcentaje, en presencia de Alpelisib en diferentes concentraciones, expresadas como logaritmo en base 10, con respecto a un control sin tratamiento (100%). La tabla indica los valores del AUC medidos para cada línea de CTO y las mutaciones en PIK3CA, si están presentes.

3.4.2.2 Ensayo de sensibilidad de CTOs al inhibidor de MEK, Trametinib

En el ensayo de sensibilidad con el inhibidor de MEK, *Trametinib*, la línea CTO71-P01 presentó una clarísima mayor sensibilidad en relación con el resto de las líneas (Figura 39). Esta línea exhibe una mutación activadora en *BRAF*, por lo que la inhibición de MEK afecta directamente sobre la señalización aguas abajo de esta vía. La línea CTO77-P01 exhibe una sensibilidad intermedia al tratamiento con *Trametinib*; esta línea no presentó mutaciones en *KRAS*, *BRAF* o *PIK3CA*. Por otro lado, las líneas CTO36-P2, CTO51-P01, CTO65-P02 y CTO84-P02 presentaron una menor sensibilidad al tratamiento. Aunque las líneas CTO65-P02 y CTO51-P01 presentan mutaciones activadoras en *PIK3CA* y *KRAS*, CTO51-P01 presentó una sensibilidad un poco mayor que CTO65-P02. Estas dos líneas provienen de tumores de estadio avanzado; CTO65-P02 proviene de un tumor derecho

estadio III, mientras que CTO51-P01 proviene de un tumor izquierdo de estadio II de alto riesgo. Sin embargo, no se puede determinar si esta diferencia de respuesta se debe a la localización, debido al número de muestras limitado. Además, existen otros factores que pueden afectar a la diferente sensibilidad de los organoides, como la presencia de otro tipo de alteraciones, ya sean a nivel genómico o de expresión génica. Finalmente, las líneas CTO36-P2 y CTO84-P02, ambos provenientes de tumores de estadio I, y con mutaciones activadoras en *KRAS*, exhiben un patrón de sensibilidad similar a *Trametinib*.



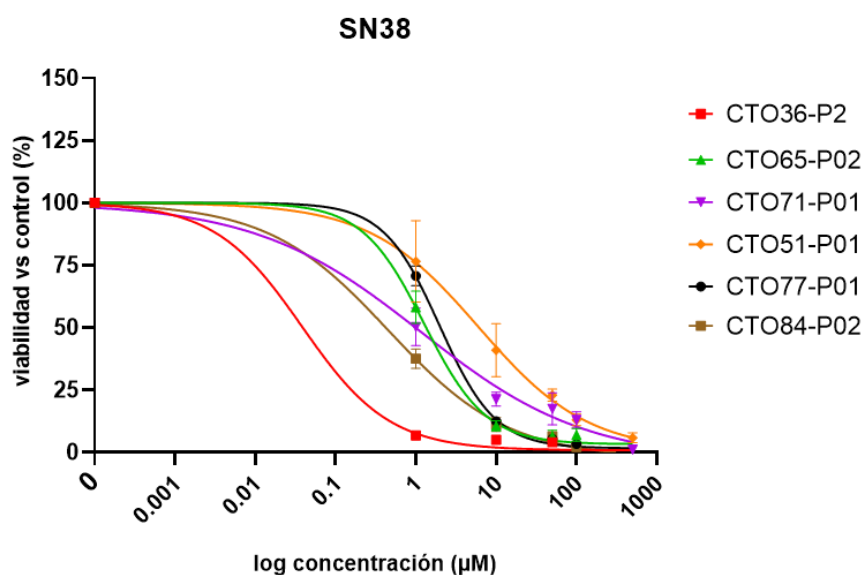
Inhibidor de MEK : Trametinib

Línea de organoide	CTO65-P02	CTO84-P02	CTO77-P01	CTO36-P2	CTO51-P01	CTO71-P01
AUC Trametinib	596.2	549.2	538.1	537.7	394.3	296.3
PIK3CA mut	KRAS G12D PIK3CA E545K	KRAS G12S		KRAS Q61H	KRAS G12V PIK3CA E453K	BRAF K601E

Figura 39. Ensayo de sensibilidad de los CTOs a Trametinib. El ensayo de sensibilidad representa la viabilidad de las líneas de CTOs en porcentaje, en presencia de Trametinib en diferentes concentraciones, expresadas como logaritmo en base 10, con respecto a un control sin tratamiento (100%). La tabla indica los valores del AUC medidos para cada CTO y las mutaciones en los efectores en la vía de EGFR.

3.4.2.3 Ensayo de sensibilidad de CTOs al inhibidor de TOP1, SN38

El metabolito SN38 es la forma activa del Irinotecan, un inhibidor del gen de la topoisomerasa I (*TOP1*) y se suele usar solo o en combinación con 5-FU u oxaliplatino, seguido de terapias dirigidas como *bevacizumab* o *cetuximab*, para el tratamiento de CCRm [237]. *TOP1* se ha descrito como un oncogén que presenta un número de copias elevado en tejido tumoral de cáncer colorrectal, ya que está involucrado en los procesos de replicación, transcripción y reparación del DNA [238]. Todos los CTOs mostraron una sensibilidad al tratamiento con SN38 dependiente de la dosis (Figura 40). Aunque todos los CTOs exhibieron un número de copias elevado del gen *TOP1*, esto no correlaciona con la mayor o menor sensibilidad mostrada por las líneas de organoides. Las líneas derivadas de tumores de estadio I, CTO36-P2 y CTO84-P02, presentaron una mayor sensibilidad al tratamiento que las líneas derivadas de tumores de estadios II y III, pero es necesario incluir más muestras para corroborar esta observación.



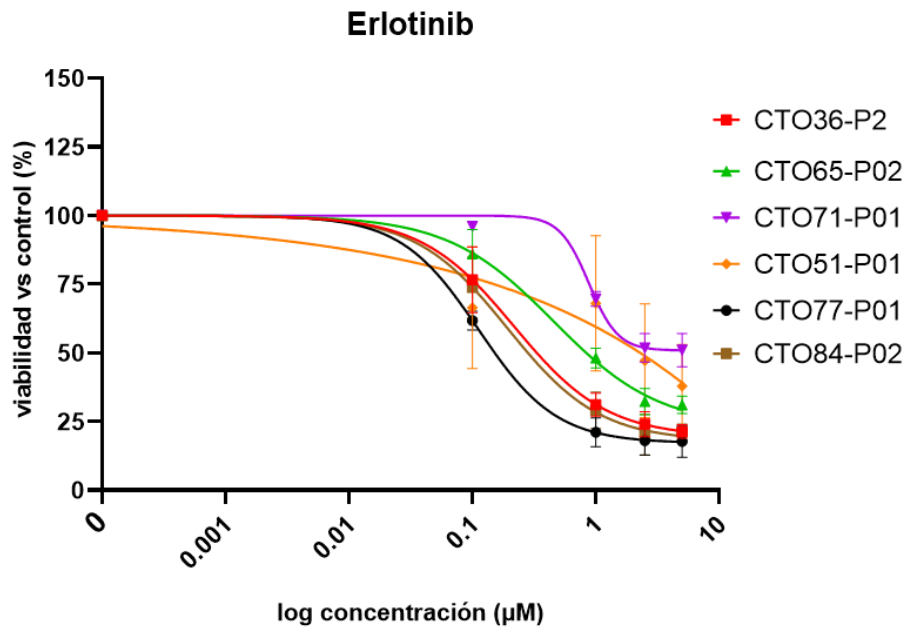
Inhibidor de TOP1 : SN38

Línea de organoide	CTO51-P01	CTO71-P01	CTO65-P02	CTO77-P01	CTO84-P02	CTO36-P2
AUC SN38	6557	4752	2366	1608	1252	909.1
CN TOP1	4	3	3	3	4	3

Figura 40. Ensayo de sensibilidad de los CTOs a SN38. El ensayo de sensibilidad presenta la viabilidad de los CTOs en presencia de SN38 en diferentes concentraciones, expresadas como logaritmo en base 10, con respecto a un control sin tratamiento (100%). La tabla indica los valores del AUC medidos para cada CTO y el número de copias del gen de *TOP1* de cada línea.

3.4.2.4 Ensayo de sensibilidad de CTOs al inhibidor de EGFR, Erlotinib

Finalmente, se evaluó la sensibilidad de las líneas de CTOs a erlotinib (Figura 41), un inhibidor de EGFR. En la práctica clínica, se utiliza *cetuximab*, un anticuerpo monoclonal que actúa sobre el dominio extracelular de EGFR, inhibiendo su capacidad de unirse a sus ligandos. El erlotinib en cambio, es un inhibidor de la actividad tirosina quinasa del dominio intracelular de EGFR, implicada en la activación de las vías de señalización aguas abajo [36]. En la práctica clínica, el tratamiento con inhibidores de EGFR, en combinación con quimioterapia, está indicado en pacientes con un genotipo salvaje de *KRAS*. En este contexto, la línea CTO77-P01 presentó una sensibilidad mayor a *erlotinib*, lo cual concuerda con su genotipo salvaje de *KRAS*. Las líneas CTO36-P2 y CTO84-P02 presentaron una sensibilidad similar al tratamiento con *erlotinib*. Ambas líneas exhiben una mutación en *KRAS*, lo cual influye en la activación constitutiva de esta vía, independientemente de EGFR. Por otro lado, las líneas CTO65-P02 y CTO51-P01 presentaron una menor sensibilidad al tratamiento con *erlotinib*. Estas líneas poseen mutaciones en *KRAS* y *PIK3CA*, lo cual contribuye a la activación de las vías de las MAPKs y PI3K, respectivamente. La línea CTO71-P01 exhibió la menor sensibilidad con respecto a los otros CTOs frente al tratamiento con *erlotinib*; esta línea presentó una mutación en *BRAF*, la cual puede estar contribuyendo a la activación de MEK y a la activación subsecuente de la vía, independiente de EGFR. En cáncer colorrectal, se ha relacionado un número de copias elevado del gen de *EGFR* con mal pronóstico en los pacientes [8]; sin embargo, también existen datos que apuntan a que los pacientes con un mayor número de copias en *EGFR* se benefician más con el tratamiento anti-EGFR, que aquellos pacientes con un número de copias bajo de este gen [8,239]. La línea CTO71-P01 presentó un evento de cnLOH en el gen de *EGFR*, lo cual implica una pérdida en este gen. La mutación en *BRAF* y la presencia de esta alteración genómica podrían explicar la sensibilidad menor al tratamiento con erlotinib, aunque para evaluar esta hipótesis, serán necesarios estudios adicionales.



Inhibidor de EGFR : Erlotinib

Línea de organoide	CTO71-P01	CTO51-P01	CTO65-P02	CTO36-P2	CTO84-P02	CTO77-P01
AUC Erlotinib	304.1	261.6	209.3	155.7	143.6	119.5
CN EGFR	2 (cnLOH)	4	3	2	2	2
Mutación Downstream	BRAF K601E	KRAS G12V PIK3CA E453K	KRAS G12D PIK3CA E545K	KRAS Q61H	KRAS G12S	

Figura 41. Ensayo de sensibilidad de los CTOs a Erlotinib. El ensayo de sensibilidad indica la viabilidad de los CTOs a erlotinib en diferentes concentraciones, expresadas como logaritmo en base 10, con respecto a un control sin tratamiento (100%). La tabla indica los valores del AUC medidos para cada CTO, el número de copias del gen de EGFR y las mutaciones de la vía de EGFR.

CONCLUSIONES

1. Se han derivado organoides de tejido sano y tejido tumoral procedente de pacientes con carcinoma colorrectal localizado, y se han establecido y mantenido durante largos periodos de tiempo, bajo condiciones adecuadas de cultivo *in vitro*.
2. Se ha generado un biobanco de organoides derivados de pacientes con cáncer colorrectal localizado, que consta de 27 líneas de organoides tumorales y 13 líneas de organoides normales.
3. La tasa de éxito de establecimiento de organoides tumorales es del 40.3% y del 43% en organoides normales, siendo dependiente del tipo, y la cantidad y calidad inicial de tejido, así como de los problemas asociados a la contaminación inicial de la muestra.
4. Los organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de colon localizado recapitulan el perfil mutacional y el perfil de número de copias genómicas del tejido del cual derivan.
5. Los organoides representan el perfil de expresión génica del componente epitelial del tejido de origen y, por tanto, constituyen un buen modelo funcional para los pacientes de los que derivan.
6. Los estudios de expresión a nivel de RNA entre organoides tumorales y normales señalan la presencia de genes diferencialmente expresados que podrían contribuir al desarrollo y progresión del cáncer colorrectal localizado.
7. Existe un perfil de expresión génica diferencial tanto a nivel de RNA total como de expresión de miRNAs, dependiente de la localización del tumor en el colon derecho o izquierdo, que podrían arrojar luz sobre la diferente biología de estos tumores.
8. Existen diferencias en el perfil de respuesta de los organoides al tratamiento con 5-FU, oxaliplatino y a la combinación 5-FU+oxaliplatino, pero no se ha encontrado una relación con el estadio tumoral. Entre organoides derivados de tumores de estadio localmente avanzado, los organoides derechos presentan menor sensibilidad a estos tratamientos. Será necesario aumentar el número de modelos utilizados para confirmar estas observaciones. En líneas generales, los organoides tumorales presentan una sensibilidad predecible a los diferentes tratamientos diana testados de acuerdo con las alteraciones que presentan. Así, los organoides con mutaciones en *PIK3CA* presentan una sensibilidad mayor al tratamiento con Alpelisib.

9. La línea CTO71-P01, que presenta una mutación en *BRAF*, exhibe una sensibilidad mucho mayor al tratamiento con Trametinib, y los organoides con mutaciones en *KRAS*, *PIK3CA* o *BRAF* exhiben menor sensibilidad al tratamiento con erlotinib, que la línea salvaje para estos genes.
10. El número de líneas utilizado en este trabajo limita el alcance de los resultados presentados, por lo que es recomendable aumentar el número de muestras, para poder validar los resultados obtenidos.

REFERENCIAS

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/CAAC.21660.
2. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Dyba, T.; Randi, G.; Bettio, M.; Gavin, A.; Visser, O.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries and 25 Major Cancers in 2018. *Eur. J. Cancer* **2018**, *103*, 356–387, doi:10.1016/j.ejca.2018.07.005.
3. Bhandari, A.; Woodhouse, M.; Gupta, S. Colorectal Cancer Is a Leading Cause of Cancer Incidence and Mortality among Adults Younger than 50 Years in the USA: A SEER-Based Analysis with Comparison to Other Young-Onset Cancers. *J. Investig. Med.* **2017**, *65*, 311, doi:10.1136/JIM-2016-000229.
4. Xi, Y.; Xu, P. Global Colorectal Cancer Burden in 2020 and Projections to 2040. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 101174, doi:10.1016/J.TRANON.2021.101174.
5. Bijlsma, M.F.; Sadanandam, A.; Tan, P.; Vermeulen, L. Molecular Subtypes in Cancers of the Gastrointestinal Tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 333–342, doi:10.1038/nrgastro.2017.33.
6. The Cancer Genome Atlas Network Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer. *Nature* **2013**, *487*, 330–337, doi:10.1038/nature11252.Comprehensive.
7. Vogelstein, B.; Fearon, E.; Hamilton, S.; Kern, S.; Preisinger, A.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A.; Bos, J. Genetic Alterations During Colorectal-Tumor Development. *N. Engl. J. Med.* **1988**, *319*, 525–532, doi:10.1097/00043764-198910000-00001.
8. Ried, T.; Meijer, G.A.; Harrison, D.J.; Grech, G.; Franch-Expósito, S.; Briffa, R.; Carvalho, B.; Camps, J. The Landscape of Genomic Copy Number Alterations in Colorectal Cancer and Their Consequences on Gene Expression Levels and Disease Outcome. *Mol. Aspects Med.* **2019**, *69*, 48–61, doi:10.1016/j.mam.2019.07.007.
9. The American Cancer Society Colorectal Cancer Stages Available online: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html> (accessed on 10 November 2021).
10. National Institutes of Health (NIH) Advances in Colorectal Cancer Research Available online: <https://www.nih.gov/research-training/advances-colorectal-cancer-research> (accessed on 11 November 2021).
11. Weiser, M.R. AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2018**, *25*, 1454–1455, doi:10.1245/s10434-018-6462-1.
12. Tong, G.J.; Zhang, G.Y.; Liu, J.; Zheng, Z.Z.; Chen, Y.; Niu, P.P.; Xu, X.T. Comparison of the Eighth Version of the American Joint Committee on Cancer Manual to the Seventh Version for Colorectal Cancer: A Retrospective Review of Our Data. *World J. Clin. Oncol.* **2018**, *9*, 148, doi:10.5306/WJCO.V9.I7.148.

13. PDQ Adult Treatment Editorial Board Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65858/> (accessed on 11 November 2021).
14. Van De Wetering, M.; Francies, H.E.; Francis, J.M.; Bounova, G.; Iorio, F.; Pronk, A.; Van Houdt, W.; Van Gorp, J.; Taylor-Weiner, A.; Kester, L.; et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell* **2015**, *161*, 933–945, doi:10.1016/j.cell.2015.03.053.
15. Bogaert, J.; Prenen, H. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Ann. Gastroenterol.* **2014**, *27*, 9–14, doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130235.
16. Calon, A.; Lonardo, E.; Berenguer-Llargo, A.; Espinet, E.; Hernando-Momblona, X.; Iglesias, M.; Sevillano, M.; Palomo-Ponce, S.; Tauriello, D.V.F.; Byrom, D.; et al. Stromal Gene Expression Defines Poor-Prognosis Subtypes in Colorectal Cancer. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 320–329, doi:10.1038/ng.3225.
17. Guinney, J.; Dienstmann, R.; Wang, X.; De Reyniès, A.; Schlicker, A.; Soneson, C.; Marisa, L.; Roepman, P.; Nyamundanda, G.; Angelino, P.; et al. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1350–1356, doi:10.7303/syn2623706.
18. López-Cortés, A.; Paz-y-Miño, C.; Guerrero, S.; Jaramillo-Koupermann, G.; León Cáceres, Á.; Intriago-Baldeón, D.P.; García-Cárdenas, J.M.; Guevara-Ramírez, P.; Armendáriz-Castillo, I.; Leone, P.E.; et al. Pharmacogenomics, Biomarker Network, and Allele Frequencies in Colorectal Cancer. *Pharmacogenomics J.* **2020**, *20*, 136–158, doi:10.1038/s41397-019-0102-4.
19. Hanna, D.L.; Lenz, H.J. How We Treat Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **2020**, *18*, 253–257.
20. Fleming, M.; Ravula, S.; Tatishchev, S.F.; Wang, H.L. Colorectal Carcinoma: Pathologic Aspects. *J. Gastrointest. Oncol.* **2012**, *3*, 153–173, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030.
21. Sato, T.; Vries, R.G.; Snippert, H.J.; Van De Wetering, M.; Barker, N.; Stange, D.E.; Van Es, J.H.; Abo, A.; Kujala, P.; Peters, P.J.; et al. Single Lgr5 Stem Cells Build Crypt-Villus Structures in Vitro without a Mesenchymal Niche. *Nature* **2009**, *459*, 262–265, doi:10.1038/nature07935.
22. Sato, T.; Stange, D.E.; Ferrante, M.; Vries, R.G.J.; Van Es, J.H.; Van Den Brink, S.; Van Houdt, W.J.; Pronk, A.; Van Gorp, J.; Siersema, P.D.; et al. Long-Term Expansion of Epithelial Organoids from Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology* **2011**, *141*, 1762–1772, doi:10.1053/j.gastro.2011.07.050.
23. Fouad, Y.A.; Aanei, C. *Revisiting the Hallmarks of Cancer*; 2017; Vol. 7;.
24. Nusse, R.; Clevers, H. Wnt/B-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **2017**, 985–999, doi:10.1016/j.cell.2017.05.016.

25. Gehart, H.; Clevers, H. Tales from the Crypt: New Insights into Intestinal Stem Cells. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *16*, 19–34, doi:10.1038/s41575-018-0081-y.
26. Clevers, H.C.; Bevins, C.L. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**, *75*, 289–311, doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183744.
27. Kabiri, Z.; Greicius, G.; Madan, B.; Biechele, S.; Zhong, Z.; Zaribafzadeh, H.; Aliyev, J.; Wu, Y.; Bunte, R.; Williams, B.O.; et al. Stroma Provides an Intestinal Stem Cell Niche in the Absence of Epithelial Wnts. **2014**, doi:10.1242/dev.104976.
28. Durand, A.; Donahue, B.; Peignon, G.; Letourneur, F.; Cagnard, N.; Slomianny, C.; Perret, C.; Shroyer, N.F.; Romagnolo, B. Functional Intestinal Stem Cells after Paneth Cell Ablation Induced by the Loss of Transcription Factor Math1 (Atoh1). *PNAS* **2012**, *109*, doi:10.1073/pnas.1201652109.
29. Sasaki, N.; Sachs, N.; Wiebrands, K.; Ellenbroek, S.I.J.J.; Fumagalli, A.; Lyubimova, A.; Begthel, H.; Van Den Born, M.; Van Es, J.H.; Karthaus, W.R.; et al. Reg4+ Deep Crypt Secretory Cells Function as Epithelial Niche for Lgr5+ Stem Cells in Colon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, E5399–E5407, doi:10.1073/pnas.1607327113.
30. Snippert, H.J.; Schepers, A.G.; Van Es, J.H.; Simons, B.D.; Clevers, H. Biased Competition between Lgr5 Intestinal Stem Cells Driven by Oncogenic Mutation Induces Clonal Expansion. *EMBO Rep.* **2013**, *15*, 62–69, doi:10.1002/embr.201337799.
31. Wang, Z.; Inuzuka, H.; Fukushima, H.; Wan, L.; Gao, D.; Shaik, S.; Sarkar, F.H.; Wei, W. Emerging Roles of the FBW7 Tumour Suppressor in Stem Cell Differentiation. *EMBO Rep.* **2011**, *13*, 36–43, doi:10.1038/EMBOR.2011.231.
32. Hong, S.N. Sung Noh Hong • Genetic and Epigenetic Alterations of CRC. **2018**, *16*, 327–337, doi:10.5217/ir.2018.16.3.327.
33. Wu, C.; Qiu, S.; Lu, L.; Zou, J.; Li, W.F.; Wang, O.; Zhao, H.; Wang, H.; Tang, J.; Chen, L.; et al. RSPO2-LGR5 Signaling Has Tumour-Suppressive Activity in Colorectal Cancer. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, doi:10.1038/NCOMMS4149.
34. Tang, X.; Liu, H.; Yang, S.; Li, Z.; Zhong, J.; Fang, R. Epidermal Growth Factor and Intestinal Barrier Function. **2016**, doi:10.1155/2016/1927348.
35. Pabla, B.; Bissonnette, M.; Konda, V.J. Colon Cancer and the Epidermal Growth Factor Receptor: Current Treatment Paradigms, the Importance of Diet, and the Role of Chemoprevention. *World J. Clin. Oncol.* **2015**, *6*, 133, doi:10.5306/WJCO.V6.I5.133.
36. Subbiah, V.; Dumbrava, E.I.; Jiang, Y.; Thein, K.Z.; Naing, A.; Hong, D.S.; Fu, S.; Piha-Paul, S.A.; Tsimberidou, A.M.; Janku, F.; et al. Dual EGFR Blockade with Cetuximab and Erlotinib Combined with Anti-VEGF Antibody Bevacizumab in Advanced Solid Tumors: A Phase 1 Dose Escalation Triplet Combination Trial. *Exp. Hematol. Oncol.* **2020**, *9*, 1–8, doi:10.1186/S40164-020-00159-1/FIGURES/1.
37. Rio-Vilariño, A.; Del Puerto-Nevado, L.; García-Foncillas, J.; Cebrián, A. Ras Family of Small Gtpases in Crc: New Perspectives for Overcoming Drug Resistance. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, doi:10.3390/cancers13153757.

38. Simanshu, D.K.; Nissley, D. V.; McCormick, F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* **2017**, *170*, 17–33, doi:10.1016/J.CELL.2017.06.009.
39. Sanz-Garcia, E.; Argiles, G.; Elez, E.; Taberero, J. BRAF Mutant Colorectal Cancer: Prognosis, Treatment, and New Perspectives. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2017**, *28*, 2648–2657, doi:10.1093/ANNONC/MDX401.
40. Jin, W. Regulation of Src Family Kinases during Colorectal Cancer Development and Its Clinical Implications. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, doi:10.3390/CANCERS12051339.
41. Jensen, K.B.; Watt, F.M. *Single-Cell Expression Profiling of Human Epidermal Stem and Transit-Amplifying Cells: Lrig1 Is a Regulator of Stem Cell Quiescence*; 2006;
42. Bakherad, M.; Salimi, M.; Angaji, S.A.; Mahjoubi, F.; Majidizadeh, T. LRIG1 Expression and Colorectal Cancer Prognosis. *BMC Med. Genomics* **2021**, *14*, doi:10.1186/S12920-020-00846-2.
43. Yavropoulou, M.P.; Yovos, J.G. The Role of Notch Signaling in Bone Development and Disease. *Hormones* **2014**, *13*, 24–37, doi:10.1007/BF03401318.
44. Vinson, K.E.; George, D.C.; Fender, A.W.; Bertrand, F.E.; Sigounas, G. The Notch Pathway in Colorectal Cancer. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 1835–1842, doi:10.1002/IJC.29800.
45. Clevers, H. The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell* **2013**, *154*, 274–284, doi:10.1016/J.CELL.2013.07.004.
46. Salazar, V.S.; Gamer, L.W.; Rosen, V. BMP Signalling in Skeletal Development, Disease and Repair. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 203–221, doi:10.1038/nrendo.2016.12.
47. Voorneveld, P.W.; Kodach, L.L.; Jacobs, R.J.; Van Noesel, C.J.M.; Peppelenbosch, M.P.; Korkmaz, K.S.; Molendijk, I.; Dekker, E.; Morreau, H.; Van Pelt, G.W.; et al. The BMP Pathway Either Enhances or Inhibits the Wnt Pathway Depending on the SMAD4 and P53 Status in CRC. *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 122–130, doi:10.1038/bjc.2014.560.
48. Wierzbicki, P.M.; Rybarczyk, A. The Hippo Pathway in Colorectal Cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2015**, *53*, 105–119, doi:10.5603/FHC.A2015.0015.
49. Mouillet-Richard, S.; Laurent-Puig, P. YAP/TAZ Signalling in Colorectal Cancer: Lessons from Consensus Molecular Subtypes. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 1–18, doi:10.3390/cancers12113160.
50. Varelas, X.; Miller, B.W.; Sopko, R.; Song, S.; Gregorieff, A.; Fellouse, F.A.; Sakuma, R.; Pawson, T.; Hunziker, W.; McNeill, H.; et al. The Hippo Pathway Regulates Wnt/Beta-Catenin Signaling. *Dev. Cell* **2010**, *18*, 579–591, doi:10.1016/J.DEVCEL.2010.03.007.
51. Hong, X.; Nguyen, H.T.; Chen, Q.; Zhang, R.; Hagman, Z.; Voorhoeve, P.M.; Cohen, S.M. Opposing Activities of the R as and H Ippo Pathways Converge on Regulation of YAP Protein Turnover . *EMBO J.* **2014**, *33*, 2447–2457, doi:10.15252/embj.201489385.
52. Chayangsu, C.; Khunsri, S.; Sriuranpong, V.; Tanasanvimon, S. The Correlations between

- Serum Amphiregulin and Other Clinicopathological Factors in Colorectal Cancer. *J. Gastrointest. Oncol.* **2017**, *8*, 980–984, doi:10.21037/jgo.2017.08.15.
53. Cho, Y.H.; Ro, E.J.; Yoon, J.S.; Mizutani, T.; Kang, D.W.; Park, J.C.; Il Kim, T.; Clevers, H.; Choi, K.Y. 5-FU Promotes Stemness of Colorectal Cancer via P53-Mediated WNT/ β -Catenin Pathway Activation. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-19173-2.
 54. Li, X.L.; Zhou, J.; Chen, Z.R.; Chng, W.J. P53 Mutations in Colorectal Cancer- Molecular Pathogenesis and Pharmacological Reactivation. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 84–93, doi:10.3748/wjg.v21.i1.84.
 55. Michel, M.; Kaps, L.; Maderer, A.; Galle, P.R.; Moehler, M. The Role of P53 Dysfunction in Colorectal Cancer and Its Implication for Therapy. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 1–24, doi:10.3390/cancers13102296.
 56. Toma-Jonik, A.; Vydra, N.; Janus, P.; Widłak, W. Interplay between HSF1 and P53 Signaling Pathways in Cancer Initiation and Progression: Non-Oncogene and Oncogene Addiction. *Cell. Oncol.* **2019**, *42*, 579–589, doi:10.1007/s13402-019-00452-0.
 57. Nakayama, M.; Oshima, M. Mutant P53 in Colon Cancer. *J. Mol. Cell Biol.* **2019**, *11*, 267–276, doi:10.1093/JMCB/MJY075.
 58. Gabay, M.; Yulin, L.; Felsher, D. MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. **2009**, *36*, 186–194.
 59. Balacescu, O.; Sur, D.; Cainap, C.; Visan, S.; Cruceriu, D.; Manzat-Saplacan, R.; Muresan, M.S.; Balacescu, L.; Lisencu, C.; Irimie, A. The Impact of MiRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19123711.
 60. Ardila, H.J.; Sanabria-Salas, M.C.; Meneses, X.; Rios, R.; Huertas-Salgado, A.; Serrano, M.L. Circulating MiR-141-3p, MiR-143-3p and MiR-200c-3p Are Differentially Expressed in Colorectal Cancer and Advanced Adenomas. *Mol. Clin. Oncol.* **2019**, *11*, 201–207, doi:10.3892/mco.2019.1876.
 61. Shirmohamadi, M.; Eghbali, E.; Najjary, S.; Mokhtarzadeh, A.; Kojabad, A.B.; Hajiasgharzadeh, K.; Lotfinezhad, P.; Baradaran, B. Regulatory Mechanisms of MicroRNAs in Colorectal Cancer and Colorectal Cancer Stem Cells. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 776–789, doi:10.1002/jcp.29042.
 62. Hu, W.; Yang, Y.; Li, X.; Huang, M.; Xu, F.; Ge, W.; Zhang, S.; Zheng, S. Multi-Omics Approach Reveals Distinct Differences in Left- and Right-Sided Colon Cancer. *Mol. Cancer Res.* **2018**, *16*, 476–485, doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0483.
 63. Lee, M.S.; Menter, D.G.; Kopetz, S. Right versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. *JNCCN J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **2017**, *15*, 411–419, doi:10.6004/jnccn.2017.0038.
 64. Bao, X.; Wu, J.; Kim, S.; LoRusso, P.; Li, J.; Author, C. Pharmacometabolomics Reveals Irinotecan Mechanism of Action in Cancer Patients HHS Public Access. *J Clin Pharmacol*
-

- 2019**, *59*, 20–34, doi:10.1002/jcph.1275.
65. Mehmood, R.K. Review of Cisplatin and Oxaliplatin in Current Immunogenic and Monoclonal Antibodies Perspective. *Oncol. Rev.* **2014**, *8*, 36–43, doi:10.4081/oncol.2014.256.
 66. Gustavsson, B.; Carlsson, G.; MacHover, D.; Petrelli, N.; Roth, A.; Schmoll, H.J.; Tveit, K.M.; Gibson, F. A Review of the Evolution of Systemic Chemotherapy in the Management of Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **2015**, *14*, 1–10, doi:10.1016/J.CLCC.2014.11.002.
 67. Rogers, J.E. Patient Considerations in Metastatic Colorectal Cancer - Role of Panitumumab. *Onco. Targets. Ther.* **2017**, *10*, 2033–2044, doi:10.2147/OTT.S115430.
 68. Verdaguer, H.; Tabernero, J.; Macarulla, T. Ramucirumab in Metastatic Colorectal Cancer: Evidence to Date and Place in Therapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2016**, *8*, 230–242, doi:10.1177/1758834016635888.
 69. Jang, H.J.; Kim, B.J.; Kim, J.H.; Kim, H.S. The Addition of Bevacizumab in the First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis of Randomized Trials. *Oncotarget* **2017**, *8*, 73009–73016, doi:10.18632/ONCOTARGET.20314.
 70. Hurwitz, H.I.; Honeycutt, W.; Haley, S.; Favaro, J. Long-Term Treatment with Bevacizumab for Patients with Metastatic Colorectal Cancer: Case Report. *Clin. Colorectal Cancer* **2006**, *6*, 66–69, doi:10.3816/CCC.2006.N.023.
 71. Scartozzi, M.; Vincent, L.; Chiron, M.; Cascinu, S. Aflibercept, a New Way to Target Angiogenesis in the Second Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer (MCRC). *Target. Oncol.* **2016**, *11*, 489–500, doi:10.1007/S11523-016-0447-4.
 72. Lee, M.; Helms, T.; Feng, N.; Gay, J.; Chang, Q.; Tian, F.; Wu, J.; Toniatti, C.; Heffernan, T.; Powis, G.; et al. Efficacy of the Combination of MEK and CDK4/6 Inhibitors in Vitro and in Vivo in KRAS Mutant Colorectal Cancer Models. *Oncotarget* **2016**, *7*, 39595–39608, doi:10.18632/ONCOTARGET.9153.
 73. Kopetz, S.; Guthrie, K.A.; Morris, V.K.; Lenz, H.J.; Magliocco, A.M.; Maru, D.; Yan, Y.; Lanman, R.; Manyam, G.; Hong, D.S.; et al. Randomized Trial of Irinotecan and Cetuximab With or Without Vemurafenib in BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer (SWOG S1406). *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, 285–294, doi:10.1200/JCO.20.01994.
 74. Sartore-Bianchi, A.; Trusolino, L.; Martino, C.; Bencardino, K.; Lonardi, S.; Bergamo, F.; Zagonel, V.; Leone, F.; Depetris, I.; Martinelli, E.; et al. Dual-Targeted Therapy with Trastuzumab and Lapatinib in Treatment-Refractory, KRAS Codon 12/13 Wild-Type, HER2-Positive Metastatic Colorectal Cancer (HERACLES): A Proof-of-Concept, Multicentre, Open-Label, Phase 2 Trial. *Lancet. Oncol.* **2016**, *17*, 738–746, doi:10.1016/S1470-2045(16)00150-9.
 75. Ganesh, K.; Stadler, Z.K.; Cercek, A.; Mendelsohn, R.B.; Shia, J.; Segal, N.H.; Diaz, L.A. Immunotherapy in Colorectal Cancer: Rationale, Challenges and Potential. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 361–375, doi:10.1038/S41575-019-0126-X.

76. Barbáchano, A.; Fernández-barral, A.; Bustamante-madrid, P.; Prieto, I.; Rodríguez-salas, N.; Larriba, M.J.; Muñoz, A. Organoids and Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 1–24, doi:10.3390/cancers13112657.
77. Barker, N.; Van Es, J.H.; Kuipers, J.; Kujala, P.; Van Den Born, M.; Cozijnsen, M.; Haegebarth, A.; Korving, J.; Begthel, H.; Peters, P.J.; et al. Identification of Stem Cells in Small Intestine and Colon by Marker Gene Lgr5. *Nature* **2007**, *449*, 1003–1007, doi:10.1038/nature06196.
78. Kretschmar, K.; Clevers, H. Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Dev. Cell* **2016**, *38*, 590–600, doi:10.1016/j.devcel.2016.08.014.
79. Young, M.; Reed, K.R. Organoids as a Model for Colorectal Cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **2016**, *12*, 281–287, doi:10.1007/S11888-016-0335-4.
80. Corrà, C.; Novellasdemunt, L.; Li, V.S.W. A Brief History of Organoids. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2020**, *319*, C151–C165, doi:10.1152/AJPCELL.00120.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH00072087490002.JPEG.
81. Kim, J.; Koo, B.K.; Knoblich, J.A. Human Organoids: Model Systems for Human Biology and Medicine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 571–584, doi:10.1038/s41580-020-0259-3.
82. Edmondson, R.; Broglie, J.J.; Adcock, A.F.; Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* **2014**, *12*, 207–218, doi:10.1089/adt.2014.573.
83. McCart, A.E.; Vickaryous, N.K.; Silver, A. Apc Mice: Models, Modifiers and Mutants. *Pathol. Res. Pract.* **2008**, *204*, 479–490, doi:10.1016/j.prp.2008.03.004.
84. Tuveson, D.; Clevers, H. Cancer Modeling Meets Human Organoid Technology. *Science (80-.)*. **2019**, *364*, 952–955, doi:10.1126/science.aaw6985.
85. Driehuis, E.; Kolders, S.; Spelier, S.; Löhmußaar, K.; Willems, S.M.; Devriese, L.A.; de Bree, R.; de Ruiter, E.J.; Korving, J.; Begthel, H.; et al. Oral Mucosal Organoids as a Potential Platform for Personalized Cancer Therapy. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 852–871, doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1522.
86. Sachs, N.; de Ligt, J.; Kopper, O.; Gogola, E.; Bounova, G.; Weeber, F.; Balgobind, A.V.; Wind, K.; Gracanin, A.; Begthel, H.; et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* **2018**, *172*, 373–386.e10, doi:10.1016/j.cell.2017.11.010.
87. Yan, H.H.N.; Siu, H.C.; Ho, S.L.; Yue, S.S.K.; Gao, Y.; Tsui, W.Y.; Chan, D.; Chan, A.S.; Wong, J.W.H.; Man, A.H.Y.; et al. Organoid Cultures of Early-Onset Colorectal Cancers Reveal Distinct and Rare Genetic Profiles. *Gut* **2020**, *69*, 2165–2179, doi:10.1136/gutjnl-2019-320019.
88. Ooft, S.N.; Weeber, F.; Dijkstra, K.K.; McLean, C.M.; Kaing, S.; van Werkhoven, E.; Schipper, L.; Hoes, L.; Vis, D.J.; van de Haar, J.; et al. Patient-Derived Organoids Can Predict Response to Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Sci.*

- Transl. Med.* **2019**, *11*, 1–10, doi:10.1126/scitranslmed.aay2574.
89. Heydari, Z.; Moeinvaziri, F.; Agarwal, T.; Pooyan, P.; Shpichka, A.; Maiti, T.K.; Timashev, P.; Baharvand, H.; Vosough, M. Organoids: A Novel Modality in Disease Modeling. *Bio-Design Manuf.* **2021**, *4*, 689–716, doi:10.1007/S42242-021-00150-7.
 90. Neal, J.T.; Li, X.; Zhu, J.; Giangarra, V.; Grzeskowiak, C.L.; Ju, J.; Liu, I.H.; Chiou, S.H.; Salahudeen, A.A.; Smith, A.R.; et al. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell* **2018**, *175*, 1972–1988.e16, doi:10.1016/j.cell.2018.11.021.
 91. Takashi, A.; Hideaki, K.; Ryo, F.; Matsuyuki, S.; Takashi, S.; Shimpei, M.; Hideyuki, S.; Akihiro, Y.; Takeshi, N.; Keiko, N.; et al. Cancer-Associated Fibroblasts Secrete Wnt2 to Promote Cancer Progression in Colorectal Cancer. *Cancer Med.* **2019**, *8*, 6370–6382, doi:10.1002/CAM4.2523.
 92. Dijkstra, K.K.; Cattaneo, C.M.; Weeber, F.; Chalabi, M.; van de Haar, J.; Fanchi, L.F.; Slagter, M.; van der Velden, D.L.; Kaing, S.; Kelderman, S.; et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-Culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell* **2018**, *174*, 1586–1598.e12, doi:10.1016/j.cell.2018.07.009.
 93. Tsai, S.; McOlash, L.; Palen, K.; Johnson, B.; Duris, C.; Yang, Q.; Dwinell, M.B.; Hunt, B.; Evans, D.B.; Gershan, J.; et al. Development of Primary Human Pancreatic Cancer Organoids, Matched Stromal and Immune Cells and 3D Tumor Microenvironment Models. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 1–13, doi:10.1186/s12885-018-4238-4.
 94. Perrone, F.; Zilbauer, M. Biobanking of Human Gut Organoids for Translational Research. *Exp. Mol. Med.* **2021**, *53*, 1451–1458, doi:10.1038/s12276-021-00606-x.
 95. Botti, G.; Bonito, M. Di; Cantile, M. Organoid Biobanks as a New Tool for Pre-Clinical Validation of Candidate Drug Efficacy and Safety. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **2021**, *13*, 17.
 96. Dekkers, J.F.; Wiegerinck, C.L.; De Jonge, H.R.; Bronsveld, I.; Janssens, H.M.; De Winter-De Groot, K.M.; Brandsma, A.M.; De Jong, N.W.M.; Bijvelds, M.J.C.; Scholte, B.J.; et al. A Functional CFTR Assay Using Primary Cystic Fibrosis Intestinal Organoids. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 939–945, doi:10.1038/nm.3201.
 97. Wainwright, C.; Elborn, S.; Ramsey, B.; Marigowda, G.; Huang, X.; Cipolli, M.; Colombo, C.; Davies, J.; De Boeck, K.; Flume, P.; et al. Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 220–231, doi:10.1056/NEJMoa1409547.
 98. Van Goor, F.; Yu, H.; Burton, B.; Hoffman, B.J. Effect of Ivacaftor on CFTR Forms with Missense Mutations Associated with Defects in Protein Processing or Function ☆ , ☆☆. **2014**, doi:10.1016/j.jcf.2013.06.008.
 99. Chakradhar, S. Put to the Test: Organoid-Based Testing Becomes a Clinical Tool. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 796–799, doi:10.1038/NM0717-796.
 100. Zhou, J.; Li, C.; Zhao, G.; Chu, H.; Wang, D.; Yan, H.H.N.; Poon, V.K.M.; Wen, L.; Wong,

- B.H.Y.; Zhao, X.; et al. Human Intestinal Tract Serves as an Alternative Infection Route for Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Sci. Adv.* **2017**, *3*, doi:10.1126/sciadv.aao4966.
101. Lamers, M.M.; Beumer, J.; Vaart, J. Van Der; Knoop, K.; Puschhof, J.; Breugem, T.I.; Ravelli, R.B.G.; Schayck, J.P. Van; Mykytyn, A.Z.; Duimel, H.Q.; et al. SARS-CoV-2 Productively Infects Human Gut Enterocytes. *Science (80-.)*. **2020**, *369*, 50–54, doi:10.1126/science.abc1669.
 102. Yui, S.; Nakamura, T.; Sato, T.; Nemoto, Y.; Mizutani, T.; Zheng, X.; Ichinose, S.; Nagaishi, T.; Okamoto, R.; Tsuchiya, K.; et al. Functional Engraftment of Colon Epithelium Expanded in Vitro from a Single Adult Lgr5 + Stem Cell. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 618–623, doi:10.1038/nm.2695.
 103. Lee, J.; Boescke, R.; Tang, P.-C.; Hartman, B.H.; Heller, S.; Koehler, K.R. Hair Follicle Development in Mouse Pluripotent Stem Cell-Derived Skin Organoids HHS Public Access. *Cell Rep* **2018**, *22*, 242–254, doi:10.1016/j.celrep.2017.12.007.
 104. Su, Y.; Wen, J.; Zhu, J.; Xie, Z.; Liu, C.; Ma, C.; Zhang, Q.; Xu, X.; Wu, X. Pre-Aggregation of Scalp Progenitor Dermal and Epidermal Stem Cells Activates the WNT Pathway and Promotes Hair Follicle Formation in in Vitro and in Vivo Systems. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, doi:10.1186/s13287-019-1504-6.
 105. Li, Y.F.; Gao, Y.; Liang, B.W.; Cao, X.Q.; Sun, Z.J.; Yu, J.H.; Liu, Z.D.; Han, Y. Patient-Derived Organoids of Non-Small Cells Lung Cancer and Their Application for Drug Screening. *Neoplasma* **2020**, *67*, 430–437, doi:10.4149/NEO_2020_190417N346.
 106. Yan, H.H.N.; Siu, H.C.; Law, S.; Ho, S.L.; Yue, S.S.K.; Tsui, W.Y.; Chan, D.; Chan, A.S.; Ma, S.; Lam, K.O.; et al. A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening. *Cell Stem Cell* **2018**, *23*, 882–897.e11, doi:10.1016/J.STEM.2018.09.016.
 107. Driehuis, E.; Van Hoeck, A.; Moore, K.; Kolders, S.; Francies, H.E.; Gulersonmez, M.C.; Stigter, E.C.A.; Burgering, B.; Geurts, V.; Gracanin, A.; et al. Pancreatic Cancer Organoids Recapitulate Disease and Allow Personalized Drug Screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 26580–26590, doi:10.1073/PNAS.1911273116.
 108. Vlachogiannis, G.; Hedayat, S.; Vatsiou, A.; Jamin, Y.; Fernández-Mateos, J.; Khan, K.; Lampis, A.; Eason, K.; Huntingford, I.; Burke, R.; et al. Patient-Derived Organoids Model Treatment Response of Metastatic Gastrointestinal Cancers. *Science (80-.)*. **2018**, *359*, 920–926, doi:10.1126/science.aao2774.
 109. Kopper, O.; de Witte, C.J.; Löhmußaar, K.; Valle-Inclan, J.E.; Hami, N.; Kester, L.; Balgobind, A.V.; Korving, J.; Proost, N.; Begthel, H.; et al. An Organoid Platform for Ovarian Cancer Captures Intra- and Interpatient Heterogeneity. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 838–849, doi:10.1038/s41591-019-0422-6.
 110. Dutta, D.; Heo, I.; Clevers, H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends Mol. Med.* **2017**, *23*, 393–410, doi:10.1016/j.molmed.2017.02.007.
 111. Beumer, J.; Artegiani, B.; Post, Y.; Reimann, F.; Gribble, F.; Nguyen, T.N.; Zeng, H.; Van

- den Born, M.; Van Es, J.H.; Clevers, H. Enteroendocrine Cells Switch Hormone Expression along the Crypt-to-Villus BMP Signalling Gradient. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *20*, 909–916, doi:10.1038/s41556-018-0143-y.
112. Cristobal, A.; van den Toorn, H.W.P.; van de Wetering, M.; Clevers, H.; Heck, A.J.R.; Mohammed, S. Personalized Proteome Profiles of Healthy and Tumor Human Colon Organoids Reveal Both Individual Diversity and Basic Features of Colorectal Cancer. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 263–274, doi:10.1016/j.celrep.2016.12.016.
113. Jacob, F.; Salinas, R.D.; Zhang, D.Y.; Nguyen, P.T.T.; Schnoll, J.G.; Wong, S.Z.H.; Thokala, R.; Sheikh, S.; Saxena, D.; Prokop, S.; et al. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-Tumoral Heterogeneity. *Cell* **2020**, *180*, 188-204.e22, doi:10.1016/J.CELL.2019.11.036.
114. Matano, M.; Date, S.; Shimokawa, M.; Takano, A.; Fujii, M.; Ohta, Y.; Watanabe, T.; Kanai, T.; Sato, T. Modeling Colorectal Cancer Using CRISPR-Cas9-Mediated Engineering of Human Intestinal Organoids. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 256–262, doi:10.1038/NM.3802.
115. Jabs, J.; Zickgraf, F.M.; Park, J.; Wagner, S.; Jiang, X.; Jechow, K.; Kleinheinz, K.; Toprak, U.H.; Schneider, M.A.; Meister, M.; et al. Screening Drug Effects in Patient-derived Cancer Cells Links Organoid Responses to Genome Alterations. *Mol. Syst. Biol.* **2017**, *13*, 955, doi:10.15252/msb.20177697.
116. Drost, J.; Clevers, H. Organoids in Cancer Research. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 407–418, doi:10.1038/s41568-018-0007-6.
117. Ooft, S.N.; Weeber, F.; Schipper, L.; Dijkstra, K.K.; McLean, C.M.; Kaing, S.; van de Haar, J.; Prevoo, W.; van Werkhoven, E.; Snaebjornsson, P.; et al. Prospective Experimental Treatment of Colorectal Cancer Patients Based on Organoid Drug Responses. *ESMO Open* **2021**, *6*, 100103, doi:10.1016/J.ESMOOP.2021.100103.
118. Skidmore, Z.; Wagner, A.; Lesurf, R.; Campbell, K.; Kunisaki, J.; Griffith, O.; Griffith, M. GenVisR: Genomic Visualizations in R. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 3012–3014.
119. Tarazona, N.; Gimeno-Valiente, F.; Gambardella, V.; Zuñiga, S.; Rentero-Garrido, P.; Huerta, M.; Roselló, S.; Martinez-Ciarpaglini, C.; Carbonell-Asins, J.A.; Carrasco, F.; et al. Targeted Next-Generation Sequencing of Circulating-Tumor DNA for Tracking Minimal Residual Disease in Localized Colon Cancer. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 1804–1812, doi:10.1093/annonc/mdz390.
120. Wickham, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer-Verlag New York, 2016; ISBN 978-3-319-24277-4.
121. Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i884–i890, doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTY560.
122. Dobin, A.; Davis, C.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21, doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635.

123. Li, B.; Dewey, C. RSEM: Accurate Transcript Quantification from RNA-Seq Data with or without a Reference Genome. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, doi:10.1186/1471-2105-12-323.
124. Sonesson, C.; Love, M.; Robinson, M. Differential Analyses for RNA-Seq: Transcript-Level Estimates Improve Gene-Level Inferences. *F1000Research* **2015**, *4*, doi:10.12688/F1000RESEARCH.7563.2.
125. Love, M.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, doi:10.1186/S13059-014-0550-8.
126. Wu, T.; Hu, E.; Xu, S.; Chen, M.; Guo, P.; Dai, Z.; Feng, T.; Zhou, L.; Tang, W.; Zhan, L.; et al. ClusterProfiler 4.0: A Universal Enrichment Tool for Interpreting Omics Data. *Innov. (New York, N.Y.)* **2021**, *2*, doi:10.1016/J.XINN.2021.100141.
127. Ewels, P.A.; Peltzer, A.; Fillinger, S.; Patel, H.; Alneberg, J.; Wilm, A.; Garcia, M.U.; Di Tommaso, P.; Nahnsen, S. The Nf-Core Framework for Community-Curated Bioinformatics Pipelines. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 276–278, doi:10.1038/S41587-020-0439-X.
128. Danecek, P.; Bonfield, J.K.; Liddle, J.; Marshall, J.; Ohan, V.; Pollard, M.O.; Whitwham, A.; Keane, T.; McCarthy, S.A.; Davies, R.M.; et al. Twelve Years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience* **2021**, *10*, doi:10.1093/GIGASCIENCE/GIAB008.
129. Huang, H.Y.; Lin, Y.C.D.; Li, J.; Huang, K.Y.; Shrestha, S.; Hong, H.C.; Tang, Y.; Chen, Y.G.; Jin, C.N.; Yu, Y.; et al. MiRTarBase 2020: Updates to the Experimentally Validated MicroRNA-Target Interaction Database. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D148–D154, doi:10.1093/NAR/GKZ896.
130. Yu, G.; Wang, L.G.; Han, Y.; He, Q.Y. ClusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes among Gene Clusters. *OMICS* **2012**, *16*, 284–287, doi:10.1089/OMI.2011.0118.
131. Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e47, doi:10.1093/NAR/GKV007.
132. Sato, T.; Clevers, H. Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. *Science (80-)*. **2013**, *340*, 1190–1194, doi:10.1126/science.1234852.
133. Jung, P.; Sato, T.; Merlos-Suárez, A.; Barriga, F.M.; Iglesias, M.; Rossell, D.; Auer, H.; Gallardo, M.; Blasco, M.A.; Sancho, E.; et al. Isolation and in Vitro Expansion of Human Colonic Stem Cells. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1225–1227, doi:10.1038/nm.2470.
134. Fujii, M.; Shimokawa, M.; Date, S.; Takano, A.; Matano, M.; Nanki, K.; Ohta, Y.; Toshimitsu, K.; Nakazato, Y.; Kawasaki, K.; et al. A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 827–838, doi:10.1016/j.stem.2016.04.003.

135. Koledova, Z. *3D Cell Culture Models*; Humana Press: Brno, Czech Republic, 2017; ISBN 9781493970193.
136. Failli, A.; Consolini, R.; Legitimo, A.; Spisni, R.; Castagna, M.; Romanini, A.; Crimaldi, G.; Miccoli, P. The Challenge of Culturing Human Colorectal Tumor Cells: Establishment of a Cell Culture Model by the Comparison of Different Methodological Approaches. *Tumori* **2009**, *95*, 343–347, doi:10.1177/030089160909500312.
137. Broutier, L.; Andersson-Rolf, A.; Hindley, C.J.; Boj, S.F.; Clevers, H.; Koo, B.K.; Huch, M. Culture and Establishment of Self-Renewing Human and Mouse Adult Liver and Pancreas 3D Organoids and Their Genetic Manipulation. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 1724–1743, doi:10.1038/nprot.2016.097.
138. Crespo, M.; Vilar, E.; Tsai, S.Y.; Chang, K.; Amin, S.; Srinivasan, T.; Zhang, T.; Pipalia, N.H.; Chen, H.J.; Witherspoon, M.; et al. Colonic Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells for Modeling Colorectal Cancer and Drug Testing. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 878–884, doi:10.1038/nm.4355.
139. Gjorevski, N.; Sachs, N.; Manfrin, A.; Giger, S.; Bragina, M.E.; Ordóñez-Morán, P.; Clevers, H.; Lutolf, M.P. Designer Matrices for Intestinal Stem Cell and Organoid Culture. *Nature* **2016**, *539*, 560–564, doi:10.1038/nature20168.
140. Grabinger, T.; Luks, L.; Kostadinova, F.; Zimmerlin, C.; Medema, J.P.; Leist, M.; Brunner, T. 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.* **2014**, *5*, e1228-10, doi:10.1038/cddis.2014.183.
141. Ootani, A.; Li, X.; Sangiorgi, E.; Ho, Q.T.; Ueno, H.; Toda, S.; Sugihara, H.; Fujimoto, K.; Weissman, I.L.; Capecchi, M.R.; et al. Sustained in Vitro Intestinal Epithelial Culture within a Wnt-Dependent Stem Cell Niche. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 701–706, doi:10.1038/nm.1951.
142. Li, Y.; Chen, M.; Hu, J.; Sheng, R.; Lin, Q.; He, X.; Guo, M. Volumetric Compression Induces Intracellular Crowding to Control Intestinal Organoid Growth via Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cell Stem Cell* **2021**, *28*, 63-78.e7, doi:10.1016/j.stem.2020.09.012.
143. Xu, H.; Lyu, X.; Yi, M.; Zhao, W.; Song, Y.; Wu, K. Organoid Technology and Applications in Cancer Research. *J. Hematol. Oncol.* **2018**, *11*, 1–15, doi:10.1186/s13045-018-0662-9.
144. Driehuis, E. ORGANOID AS A TOOL FOR FUNDAMENTAL AND TRANSLATIONAL ONCOLOGY RESEARCH Can Organoids Guide Clinical Decision Making?, Utrecht University, 2019.
145. Pastuła, A.; Janssen, K.-P.; Schmid, R.M. Organoids as a Model to Study the Cellular Microenvironment and as a Potential Tool for Personalized Cancer Medicine. **2016**.
146. Schmidt, S.; Gay, D.; Uthe, F.W.; Denk, S.; Paauwe, M.; Matthes, N.; Diefenbacher, M.E.; Bryson, S.; Warrander, F.C.; Erhard, F.; et al. A MYC–GCN2–EIF2 α Negative Feedback Loop Limits Protein Synthesis to Prevent MYC-Dependent Apoptosis in Colorectal Cancer. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 1413–1424, doi:10.1038/s41556-019-0408-0.

147. Lugli, A.; Zlobec, I.; Baker, K.; Minoo, P.; Tornillo, L.; Terracciano, L.; Jass, J.R. Prognostic Significance of Mucins in Colorectal Cancer with Different DNA Mismatch-repair Status. *J. Clin. Pathol.* **2007**, *60*, 534, doi:10.1136/JCP.2006.039552.
148. Buzzelli, J.N.; Ouaret, D.; Brown, G.; Allen, P.D.; Muschel, R.J. Colorectal Cancer Liver Metastases Organoids Retain Characteristics of Original Tumor and Acquire Chemotherapy Resistance. *Stem Cell Res.* **2018**, *27*, 109–120, doi:10.1016/j.scr.2018.01.016.
149. Asgari-Karchekani, S.; Karimian, M.; Mazoochi, T.; Taheri, M.; Khomehchian, T. CDX2 Protein Expression in Colorectal Cancer and Its Correlation with Clinical and Pathological Characteristics, Prognosis, and Survival Rate of Patients. *J. Gastrointest. Cancer* **2020**, *51*, 844–849, doi:10.1007/S12029-019-00314-W.
150. Tarazona, N.; Gimeno-Valiente, F.; Gambardella, V.; Huerta, M.; Roselló, S.; Zuniga, S.; Calon, A.; Carbonell-Asins, J.A.; Fontana, E.; Martinez-Ciarpaglini, C.; et al. Detection of Postoperative Plasma Circulating Tumour DNA and Lack of CDX2 Expression as Markers of Recurrence in Patients with Localised Colon Cancer. *ESMO open* **2020**, *5*, doi:10.1136/ESMOOPEN-2020-000847.
151. Yu, J.; Liu, D.; Sun, X.; Yang, K.; Yao, J.; Cheng, C.; Wang, C.; Zheng, J. CDX2 Inhibits the Proliferation and Tumor Formation of Colon Cancer Cells by Suppressing Wnt/ β -Catenin Signaling via Transactivation of GSK-3 β and Axin2 Expression. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, doi:10.1038/S41419-018-1263-9.
152. Nagasaka, M.; Li, Y.; Sukari, A.; Ou, S.H.I.; Al-Hallak, M.N.; Azmi, A.S. KRAS G12C Game of Thrones, Which Direct KRAS Inhibitor Will Claim the Iron Throne? *Cancer Treat. Rev.* **2020**, *84*, 1–21, doi:10.1016/j.ctrv.2020.101974.
153. Cook, J.H.; Melloni, G.E.M.; Gulhan, D.C.; Park, P.J.; Haigis, K.M. The Origins and Genetic Interactions of KRAS Mutations Are Allele- and Tissue-Specific. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1–14, doi:10.1038/s41467-021-22125-z.
154. Zhang, L.; Shay, J.W. Multiple Roles of APC and Its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, *109*, doi:10.1093/JNCI/DJW332.
155. Cathomas, G. PIK3CA in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **2014**, *4*, doi:10.3389/FONC.2014.00035.
156. Nisa, L.; Häfliger, P.; Poliaková, M.; Giger, R.; Francica, P.; Aebersold, D.M.; Charles, R.-P.; Zimmer, Y.; Medová, M. PIK3CA Hotspot Mutations Differentially Impact Responses to MET Targeting in MET-Driven and Non-Driven Preclinical Cancer Models. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, doi:10.1186/S12943-017-0660-5.
157. Shima, K.; Nosho, K.; Baba, Y.; Cantor, M.; Meyerhardt, J.A.; Giovannucci, E.L.; Fuchs, C.S.; Ogino, S. Prognostic Significance of CDKN2A (P16) Promoter Methylation and Loss of Expression in 902 Colorectal Cancers: Cohort Study and Literature Review. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 1080–1094, doi:10.1002/ijc.25432.
158. AbdRaboh, N.; Shehata, H.; Ahmed, M.; Bayoumi, F. HER1 R497K and HER2 I655V Polymorphisms Are Linked to Development of Breast Cancer. *Dis. Markers* **2013**, *34*,

- 407–417, doi:10.3233/DMA-130989.
159. Krishna, B.M.; Chaudhary, S.; Panda, A.K.; Mishra, D.R.; Mishra, S.K. Her2 Ile655Val Polymorphism and Its Association with Breast Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Sci. Reports 2018 81* **2018**, *8*, 1–19, doi:10.1038/s41598-018-25769-y.
 160. Wang, H.; Liang, L.; Fang, J.Y.; Xu, J. Somatic Gene Copy Number Alterations in Colorectal Cancer: New Quest for Cancer Drivers and Biomarkers. *Oncogene* **2016**, *35*, 2011–2019, doi:10.1038/onc.2015.304.
 161. Motoyama, K.; Tanaka, F.; Kosaka, Y.; Mimori, K.; Uetake, H.; Inoue, H.; Sugihara, K.; Mori, M. Clinical Significance of BMP7 in Human Colorectal Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2008**, *15*, 1530–1537, doi:10.1245/S10434-007-9746-4.
 162. Raza, A.; Pandey, M.; Jin, Q.; Mulder, K. Km23-1/DYNLRB1 Regulation of MEK/ERK Signaling and R-Ras in Invasive Human Colorectal Cancer Cells. *Cell Biol. Int.* **2020**, *44*, 155–165, doi:10.1002/CBIN.11215.
 163. Poturnajova, M.; Furielova, T.; Balintova, S.; Schmidtova, S.; Kucerova, L.; Matuskova, M. Molecular Features and Gene Expression Signature of Metastatic Colorectal Cancer (Review). *Oncol. Rep.* **2021**, *45*, 2021, doi:10.3892/or.2021.7961.
 164. Lee, H.; Flaherty, P.; Ji, H. Systematic Genomic Identification of Colorectal Cancer Genes Delineating Advanced from Early Clinical Stage and Metastasis. *BMC Med. Genomics* **2013**, *6*, doi:10.1186/1755-8794-6-54.
 165. Flora, M.; Piana, S.; Bassano, C.; Bisagni, A.; De Marco, L.; Ciarrocchi, A.; Tagliavini, E.; Gardini, G.; Tamagnini, I.; Banzi, C.; et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Gene Copy Number in Colorectal Adenoma-Carcinoma Progression. *Cancer Genet.* **2012**, *205*, 630–635, doi:10.1016/j.cancergen.2012.10.005.
 166. Yau, T.O.; Tang, C.M.; Harriss, E.K.; Dickins, B.; Polyarchou, C. Faecal MicroRNAs as a Non-Invasive Tool in the Diagnosis of Colonic Adenomas and Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–13, doi:10.1038/s41598-019-45570-9.
 167. Tan, Y.; Lin, J.J.; Yang, X.F.; Gou, D.M.; Fu, L.W.; Li, F.R.; Yu, X.F. A Panel of Three Plasma MicroRNAs for Colorectal Cancer Diagnosis. *Cancer Epidemiol.* **2019**, *60*, 67–76, doi:10.1016/j.canep.2019.01.015.
 168. Chen, M.; Lin, M.; Wang, X. Overexpression of MiR-19a Inhibits Colorectal Cancer Angiogenesis by Suppressing KRAS Expression. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 619–626, doi:10.3892/or.2017.6110.
 169. Moreno, E.C.; Pascual, A.; Prieto-Cuadra, D.; Laza, V.F.; Molina-Cerrillo, J.; Ramos-Muñoz, M.E.; Rodríguez-Serrano, E.M.; Soto, J.L.; Carrato, A.; García-Bermejo, M.L.; et al. Novel Molecular Characterization of Colorectal Primary Tumors Based on Mirnas. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11030346.
 170. Tapial, S.; García, J.L.; Corchete, L.; Holowatyj, A.N.; Pérez, J.; Rueda, D.; Urioste, M.; González-Sarmiento, R.; Perea, J. Copy Neutral Loss of Heterozygosity (CnLOH) Patterns

- in Synchronous Colorectal Cancer. *Eur. J. Hum. Genet.* 2020 294 **2020**, 29, 709–713, doi:10.1038/s41431-020-00774-w.
171. Lin, C.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Bai, Y.; Zhang, Y. Long Noncoding RNA LINC01234 Promotes Serine Hydroxymethyltransferase 2 Expression and Proliferation by Competitively Binding MiR-642a-5p in Colon Cancer. *Cell Death Dis.* 2019 102 **2019**, 10, 1–16, doi:10.1038/s41419-019-1352-4.
 172. Kingsbury, T.J.; Kim, M.J.; Civin, C.I. *Regulation of Cancer Stem Cell Properties by SIX1, a Member of the PAX-SIX-EYA-DACH Network*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2019; Vol. 141; ISBN 9780128149942.
 173. Sosa, M.S.; Parikh, F.; Maia, A.G.; Estrada, Y.; Bosch, A.; Bragado, P.; Ekpin, E.; George, A.; Zheng, Y.; Lam, H.-M.; et al. NR2F1 Controls Tumour Cell Dormancy via SOX9- and RAR β -Driven Quiescence Programmes. *Nat. Commun.* 2015 61 **2015**, 6, 1–14, doi:10.1038/ncomms7170.
 174. Li, X.-L.; Subramanian, M.; Jones, M.F.; Chaudhary, R.; Singh, D.K.; Zong, X.; Gryder, B.; Sindri, S.; Mo, M.; Schetter, A.; et al. Long Noncoding RNA PURPL Suppresses Basal P53 Levels and Promotes Tumorigenicity in Colorectal Cancer. *Cell Rep.* **2017**, 20, 2408, doi:10.1016/J.CELREP.2017.08.041.
 175. He, Q.; Long, J.; Yin, Y.; Li, Y.; Lei, X.; Li, Z.; Zhu, W. Emerging Roles of LncRNAs in the Formation and Progression of Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **2020**, 9, 1542, doi:10.3389/FONC.2019.01542.
 176. Li, D.; Fan, S.; Yu, F.; Zhu, X.; Song, Y.; Ye, M.; Fan, L.; Lv, Z. FOXD1 Promotes Cell Growth and Metastasis by Activation of Vimentin in NSCLC. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, 51, 2716–2731, doi:10.1159/000495962.
 177. Pan, F.; Li, M.; Chen, W. FOXD1 Predicts Prognosis of Colorectal Cancer Patients and Promotes Colorectal Cancer Progression via the ERK 1/2 Pathway. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, 10, 1522.
 178. Han, T.; Lin, J.; Wang, Y.; Fan, Q.; Sun, H.; Tao, Y.; Sun, C. Forkhead Box D1 Promotes Proliferation and Suppresses Apoptosis via Regulating Polo-like Kinase 2 in Colorectal Cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, 103, 1369–1375, doi:10.1016/J.BIOPHA.2018.04.190.
 179. Shi, X.; Cui, Z.; Liu, X.; Wu, S.; Wu, Y.; Fang, F.; Zhao, H. LncRNA FIRRE Is Activated by MYC and Promotes the Development of Diffuse Large B-Cell Lymphoma via Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 510, 594–600, doi:10.1016/J.BBRC.2019.01.105.
 180. Yan, S.; Cheng, M.; Duan, Q.; Wang, Z.; Gao, W.; Ren, B.; Xu, D. MiR-6803-5p Promotes Cancer Cell Proliferation and Invasion via PTPRO/NF- κ B Axis in Colorectal Cancer. *Mediators Inflamm.* **2019**, 2019, doi:10.1155/2019/8128501.
 181. Li, Y.; Wang, H.; Huang, H. Long Non-Coding RNA MIR205HG Function as a CeRNA to Accelerate Tumor Growth and Progression via Sponging MiR-122-5p in Cervical Cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 514, 78–85, doi:10.1016/J.BBRC.2019.04.102.

182. Chang, Y.; Xue, X.; Li, C.; Zhao, W.; Ma, Y.; Xu, F.; Wu, Z.; Dai, Y.; Li, Y.; Liu, Y.; et al. MIR205HG Facilitates Carcinogenesis of Lung Squamous Cell Carcinoma in Vitro Revealed by Long Noncoding RNA Profiling. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2020**, *52*, 371–381, doi:10.1093/ABBS/GMAA006.
183. Bellefeuille, S.D.; Molle, C.M.; Gendron, F.-P. Reviewing the Role of P2Y Receptors in Specific Gastrointestinal Cancers. *Purinergic Signal*. **2019**, *15*, 451, doi:10.1007/S11302-019-09678-X.
184. Kobori, T.; Tameishi, M.; Tanaka, C.; Urashima, Y.; Obata, T. Subcellular Distribution of Ezrin/Radixin/Moesin and Their Roles in the Cell Surface Localization and Transport Function of P-Glycoprotein in Human Colon Adenocarcinoma LS180 Cells. *PLoS One* **2021**, *16*, e0250889, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0250889.
185. Son, H.J.; Choi, E.J.; Yoo, N.J.; Lee, S.H. Mutation and Expression of a Candidate Tumor Suppressor Gene EPB41L3 in Gastric and Colorectal Cancers. *Pathol. Oncol. Res.* **2020**, *26*, 2003–2005, doi:10.1007/S12253-019-00787-X.
186. Entrez UGT1A1 UDP Glucuronosyltransferase Family 1 Member A1 Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54658> (accessed on 3 November 2021).
187. J, P.; K, H.; K, M.; Z, D.; HI, H.; A, K.; C, Z.; N, T.; S, S.; F, J.; et al. IBD-Associated Colon Cancers Differ in DNA Methylation and Gene Expression Profiles Compared with Sporadic Colon Cancers. *J. Crohn's Colitis* **2019**, *13*, 884–893, doi:10.1093/ecco-jcc/jjz014.
188. Wang, Y.; Yang, W.; Liu, T.; Bai, G.; Liu, M.; Wang, W. Over-Expression of SOX8 Predicts Poor Prognosis in Colorectal Cancer: A Retrospective Study. *Medicine (Baltimore)*. **2019**, *98*, e16237, doi:10.1097/MD.00000000000016237.
189. Urzainqui, A.; Serrador, J.M.; Viedma, F.; Yáñez-Mó, M.; Rodríguez, A.; Corbí, A.L.; Alonso-Lebrero, J.L.; Luque, A.; Deckert, M.; Vázquez, J.; et al. ITAM-Based Interaction of ERM Proteins with Syk Mediates Signaling by the Leukocyte Adhesion Receptor PSGL-1. *Immunity* **2002**, *17*, 401–412, doi:10.1016/S1074-7613(02)00420-X.
190. Yu, Q.; Zhang, T.; Xie, C.; Qiu, H.; Liu, B.; Huang, L.; Peng, P.; Feng, J.; Chen, J.; Zang, A.; et al. UGT1A Polymorphisms Associated with Worse Outcome in Colorectal Cancer Patients Treated with Irinotecan-Based Chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2018**, *82*, 87–98, doi:10.1007/S00280-018-3595-7.
191. Audet-Delage, Y.; Rouleau, M.; Rouleau, M.; Roberge, J.; Miard, S.; Picard, F.; Têtu, B.; Guillemette, C. Cross-Talk between Alternatively Spliced UGT1A Isoforms and Colon Cancer Cell Metabolism. *Mol. Pharmacol.* **2017**, *91*, 167–177, doi:10.1124/MOL.116.106161.
192. Lévesque, E.; Labriet, A.; Hovington, H.; Allain, É.P.; Melo-Garcia, L.; Rouleau, M.; Brisson, H.; Turcotte, V.; Caron, P.; Villeneuve, L.; et al. Alternative Promoters Control UGT2B17-Dependent Androgen Catabolism in Prostate Cancer and Its Influence on Progression. *Br. J. Cancer* **2020**, *122*, 1068–1076, doi:10.1038/S41416-020-0749-2.
193. Johansson, H.; Aristarco, V.; Gandini, S.; Gjerde, J.; Macis, D.; Guerrieri-Gonzaga, A.;

- Serrano, D.; Lazzeroni, M.; Rajasekaran, A.; Williard, C. V.; et al. Prognostic Impact of Genetic Variants of CYP19A1 and UGT2B17 in a Randomized Trial for Endocrine-Responsive Postmenopausal Breast Cancer. *Pharmacogenomics J.* **2020**, *20*, 19–26, doi:10.1038/S41397-019-0087-Z.
194. Lee, N.H.; Park, S.R.; Lee, J.W.; Lim, S.; Lee, S.H.; Nam, S.; Kim, D.Y.; Hah, S.Y.; Hong, I.S.; Lee, H.Y. SERPINB2 Is a Novel Indicator of Cancer Stem Cell Tumorigenicity in Multiple Cancer Types. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, doi:10.3390/CANCERS11040499.
195. Sossey-Alaoui, K.; Pluskota, E.; Szpak, D.; Plow, E. The Kindlin2-P53-SerpinB2 Signaling Axis Is Required for Cellular Senescence in Breast Cancer. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, doi:10.1038/S41419-019-1774-Z.
196. Harris, N.L.E.; Vennin, C.; Conway, J.R.W.; Vine, K.L.; Pinese, M.; Cowley, M.J.; Shearer, R.F.; Lucas, M.C.; Herrmann, D.; Allam, A.H.; et al. SerpinB2 Regulates Stromal Remodelling and Local Invasion in Pancreatic Cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 4288–4298, doi:10.1038/ONC.2017.63.
197. Lee, Y.J.; Lee, E.Y.; Choi, B.H.; Jang, H.; Myung, J.K.; You, H.J. The Role of Nuclear Receptor Subfamily 1 Group H Member 4 (NR1H4) in Colon Cancer Cell Survival through the Regulation of c-Myc Stability. *Mol. Cells* **2020**, *43*, 459–468, doi:10.14348/MOLCELLS.2020.0041.
198. Li, H.B.; Zhou, J.; Zhao, F.; Yu, J.; Xu, L. Prognostic Impact of DHRS9 Overexpression in Pancreatic Cancer. *Cancer Manag. Res.* **2020**, *12*, 5997–6006, doi:10.2147/CMAR.S251897.
199. Hu, L.; Chen, H.Y.; Han, T.; Yang, G.Z.; Feng, D.; Qi, C.Y.; Gong, H.; Zhai, Y.X.; Cai, Q.P.; Gao, C.F. Downregulation of DHRS9 Expression in Colorectal Cancer Tissues and Its Prognostic Significance. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 837–845, doi:10.1007/S13277-015-3880-6.
200. Xia, Z.; Huang, M.; Zhu, Q.; Li, Y.; Ma, Q.; Wang, Y.; Chen, X.; Li, J.; Qiu, L.; Zhang, J.; et al. Cadherin Related Family Member 2 Acts as a Tumor Suppressor by Inactivating Akt in Human Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer* **2019**, *10*, 864–873, doi:10.7150/jca.27663.
201. Gan, G.L.; Liu, J.; Chen, W.J.; Ye, Q.Q.; Xu, Y.; Wu, H.T.; Li, W. The Diverse Roles of the Mucin Gene Cluster Located on Chromosome 11p15.5 in Colorectal Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 1–11, doi:10.3389/fcell.2020.00514.
202. Li, X.; Francies, H.E.; Secrier, M.; Perner, J.; Miremadi, A.; Galeano-Dalmau, N.; Barendt, W.J.; Letchford, L.; Leyden, G.M.; Goffin, E.K.; et al. Organoid Cultures Recapitulate Esophageal Adenocarcinoma Heterogeneity Providing a Model for Clonality Studies and Precision Therapeutics. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–13, doi:10.1038/s41467-018-05190-9.
203. Adam, R.S.; van Neerven, S.M.; Pleguezuelos-Manzano, C.; Simmini, S.; Léveillé, N.; de Groot, N.E.; Holding, A.N.; Markowitz, F.; Vermeulen, L. Intestinal Region-Specific Wnt Signalling Profiles Reveal Interrelation between Cell Identity and Oncogenic Pathway

- Activity in Cancer Development. *Cancer Cell Int.* **2020**, *20*, 1–15, doi:10.1186/s12935-020-01661-6.
204. Vedeld, H.M.; Andresen, K.; Eilertsen, I.A.; Nesbakken, A.; Seruca, R.; Gladhaug, I.P.; Thiis-Evensen, E.; Rognum, T.O.; Boberg, K.M.; Lind, G.E. The Novel Colorectal Cancer Biomarkers CDO1, ZSCAN18 and ZNF331 Are Frequently Methylated across Gastrointestinal Cancers. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 844–853, doi:10.1002/ijc.29039.
205. Morris, M.; Ricketts, C.; Gentle, D.; McDonald, F.; Carli, N.; Khalili, H.; Brown, M.; Kishida, T.; Yao, M.; Banks, R.; et al. Genome-Wide Methylation Analysis Identifies Epigenetically Inactivated Candidate Tumour Suppressor Genes in Renal Cell Carcinoma. *Oncogene* **2011**, *30*, 1390–1401, doi:10.1038/ONC.2010.525.
206. Chalbatani, G.M.; Gharagouzloo, E.; Memari, F.; Dana, H.; Hadloo, M.H.M.; Zainalinea, N.; Sanati, M.H.; Rohollah Miri, S.; Mahmoodzadeh, H. Integrative and In-Vitro Analysis Reveal Hsa_circ_001787 Can Act as a Diagnostic Biomarker for Colorectal Cancer. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28*, 6230–6238, doi:10.1016/J.SJBS.2021.06.071.
207. Jerónimo, C.; Henrique, R.; Oliveira, J.; Lobo, F.; Pais, I.; Teixeira, M.R.; Lopes, C. Aberrant Cellular Retinol Binding Protein 1 (CRBP1) Gene Expression and Promoter Methylation in Prostate Cancer. *J. Clin. Pathol.* **2004**, *57*, 872–876, doi:10.1136/jcp.2003.014555.
208. Mendoza-Rodriguez, M.; Arreola, H.; Valdivia, A.; Peralta, R.; Serna, H.; Villegas, V.; Romero, P.; Alvarado-Hernández, B.; Paniagua, L.; Marrero-Rodríguez, D.; et al. Cellular Retinol Binding Protein 1 Could Be a Tumor Suppressor Gene in Cervical Cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2013**, *6*, 1817–1825.
209. Honda, K.; Katzke, V.A.; Hüsing, A.; Okaya, S.; Shoji, H.; Onidani, K.; Olsen, A.; Tjønneland, A.; Overvad, K.; Weiderpass, E.; et al. CA19-9 and Apolipoprotein-A2 Isoforms as Detection Markers for Pancreatic Cancer: A Prospective Evaluation. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 1877–1887, doi:10.1002/IJC.31900.
210. Hirvonen-Santti, S.J.; Rannikko, A.; Santti, H.; Savolainen, S.; Nyberg, M.; Jänne, O.A.; Palvimo, J.J.; Culig, Z. Down-Regulation of Estrogen Receptor Beta and Transcriptional Coregulator SNURF/RNF4 in Testicular Germ Cell Cancer. *Eur. Urol.* **2003**, *44*, 742–747, doi:10.1016/S0302-2838(03)00382-8.
211. Zhang, C.; Liu, H.; Xu, P.; Tan, Y.; Xu, Y.; Wang, L.; Liu, B.; Chen, Q.; Tian, D. Identification and Validation of a Five-LncRNA Prognostic Signature Related to Glioma Using Bioinformatics Analysis. *BMC Cancer* **2021**, *21*, doi:10.1186/S12885-021-07972-9.
212. Huang, S.; Li, Y.; Hu, J.; Li, L.; Liu, Z.; Guo, H.; Jiang, B.; Chen, J.; Li, J.; Xiang, X.; et al. LncRNA PWAR6 Regulates Proliferation and Migration by Epigenetically Silencing YAP1 in Tumorigenesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Cell. Mol. Med.* **2021**, *25*, 4275–4286, doi:10.1111/JCMM.16480.
213. Sankhe, R.; Pai, S.R.K.; Kishore, A. Tumour Suppression through Modulation of Nephilysin Signaling: A Comprehensive Review. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *891*, doi:10.1016/J.EJP.2020.173727.

214. Peng, Y.; Dong, S.; Yang, Z.; Song, Y.; Ding, J.; Hou, D.; Wang, L.; Zhang, Z.; Li, N.; Wang, H. Identification of Docetaxel-Related Biomarkers for Prostate Cancer. *Andrologia* **2021**, *53*, doi:10.1111/AND.14079.
215. Ji, J.; Xu, M.X.; Qian, T.Y.; Zhu, S.Z.; Jiang, F.; Liu, Z.X.; Xu, W.S.; Zhou, J.; Xiao, M.B. The AKR1B1 Inhibitor Epalrestat Suppresses the Progression of Cervical Cancer. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 6091–6103, doi:10.1007/S11033-020-05685-Z.
216. Khayami, R.; Hashemi, S.R.; Kerachian, M.A. Role of Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B1 (AKR1B1) in the Cancer Process and Its Therapeutic Potential. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 8890–8902, doi:10.1111/JCMM.15581.
217. Zhang, Y.; Zou, X.; Qian, W.; Weng, X.; Zhang, L.; Zhang, L.; Wang, S.; Cao, X.; Ma, L.; Wei, G.; et al. Enhanced PAPSS2/VCAN Sulfation Axis Is Essential for Snail-Mediated Breast Cancer Cell Migration and Metastasis. *Cell Death Differ.* **2019**, *26*, 565–579, doi:10.1038/S41418-018-0147-Y.
218. Li, W.; Han, F.; Fu, M.; Wang, Z. High Expression of VCAN Is an Independent Predictor of Poor Prognosis in Gastric Cancer. *J. Int. Med. Res.* **2020**, *48*, doi:10.1177/0300060519891271.
219. Chao, F.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Liu, H.; Yang, C.; Wang, J.; Guo, Y.; Wen, X.; Zhang, K.; Huang, B.; et al. Embigin, Regulated by HOXC8, Plays a Suppressive Role in Breast Tumorigenesis. *Oncotarget* **2015**, *6*, 23496, doi:10.18632/ONCOTARGET.4360.
220. Ruma, I.M.W.; Kinoshita, R.; Tomonobu, N.; Inoue, Y.; Kondo, E.; Yamauchi, A.; Sato, H.; Sumardika, I.W.; Chen, Y.; Yamamoto, K.-I.; et al. Embigin Promotes Prostate Cancer Progression by S100A4-Dependent and-Independent Mechanisms. *Cancers (Basel)*. **2018**, *10*, 239, doi:10.3390/CANCERS10070239.
221. Xu, M.; Xu, X.; Pan, B.; Chen, X.; Lin, K.; Zeng, K.; Liu, X.; Xu, T.; Sun, L.; Qin, J.; et al. LncRNA SATB2-AS1 Inhibits Tumor Metastasis and Affects the Tumor Immune Cell Microenvironment in Colorectal Cancer by Regulating SATB2. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, doi:10.1186/S12943-019-1063-6.
222. Ying, T.; Dong, J. ling; Yuan, C.; Li, P.; Guo, Q. The LncRNAs RP1-261G23.7, RP11-69E11.4 and SATB2-AS1 Are a Novel Clinical Signature for Predicting Recurrent Osteosarcoma. *Biosci. Rep.* **2020**, *40*, doi:10.1042/BSR20191251.
223. Aji, G.; Li, F.; Chen, J.; Leng, F.; Hu, K.; Cheng, Z.; Luo, Y.; Xu, X.; Zhang, J.; Lu, Z. Upregulation of PCP4 in Human Aldosterone-Producing Adenomas Fosters Human Adrenocortical Tumor Cell Growth via AKT and AMPK Pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2018**, *11*, 1197–1207.
224. Eneh, S.; Heikkinen, S.; Hartikainen, J.M.; Kuopio, T.; Mecklin, J.P.; Kosma, V.M.; Mannermaa, A. MicroRNAs Associated with Biological Pathways of Left- And Right-Sided Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* **2020**, *40*, 3713–3722, doi:10.21873/ANTICANRES.14360.
225. Xu, M.; Chen, X.; Lin, K.; Zeng, K.; Liu, X.; Xu, X.; Pan, B.; Xu, T.; Sun, L.; He, B.; et al. LncRNA SNHG6 Regulates EZH2 Expression by Sponging MiR-26a/b and MiR-214 in

- Colorectal Cancer. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, doi:10.1186/S13045-018-0690-5.
226. Morais, M.; Dias, F.; Nogueira, I.; Leão, A.; Gonçalves, N.; Araújo, L.; Granja, S.; Baltazar, F.; Teixeira, A.L.; Medeiros, R. Cancer Cells' Metabolism Dynamics in Renal Cell Carcinoma Patients' Outcome: Influence of GLUT-1-Related Hsa-MiR-144 and Hsa-MiR-186. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, doi:10.3390/CANCERS13071733.
227. Gelibter, A.J.; Caponnetto, S.; Urbano, F.; Emiliani, A.; Scagnoli, S.; Sirgiovanni, G.; Napoli, V.M.; Cortesi, E. Adjuvant Chemotherapy in Resected Colon Cancer: When, How and How Long? *Surg. Oncol.* **2019**, *30*, 100–107, doi:10.1016/J.SURONC.2019.06.003.
228. Lepre, M.G.; Omar, S.I.; Grasso, G.; Morbiducci, U.; Deriu, M.A.; Tuszynski, J.A. Insights into the Effect of the G245S Single Point Mutation on the Structure of P53 and the Binding of the Protein to DNA. *Mol. A J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **2017**, *22*, doi:10.3390/MOLECULES22081358.
229. Brulé, S.Y.; Jonker, D.J.; Karapetis, C.S.; O'Callaghan, C.J.; Moore, M.J.; Wong, R.; Tebbutt, N.C.; Underhill, C.; Yip, D.; Zalcborg, J.R.; et al. Location of Colon Cancer (Right-Sided versus Left-Sided) as a Prognostic Factor and a Predictor of Benefit from Cetuximab in NCIC CO.17. *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 1405–1414, doi:10.1016/j.ejca.2015.03.015.
230. Mullangi, R.; Ahlawat, P.; Srinivas, N.R. Irinotecan and Its Active Metabolite, SN-38: Review of Bioanalytical Methods and Recent Update from Clinical Pharmacology Perspectives. *Biomed. Chromatogr.* **2010**, *24*, 104–123, doi:10.1002/BMC.1345.
231. Planchard, D.; Smit, E.F.; Groen, H.J.M.; Mazieres, J.; Besse, B.; Helland, Å.; Giannone, V.; D'Amelio, A.M.; Zhang, P.; Mookerjee, B.; et al. Dabrafenib plus Trametinib in Patients with Previously Untreated BRAF V600E-Mutant Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: An Open-Label, Phase 2 Trial. *Lancet. Oncol.* **2017**, *18*, 1307–1316, doi:10.1016/S1470-2045(17)30679-4.
232. Chopra, N.; Nathan, P.D. Trametinib in Metastatic Melanoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2015**, *15*, 749–760, doi:10.1586/14737140.2015.1060127.
233. Korean Cancer Study Group *Alpelisib and Capecitabine in Patients With PIK3CA Mutant MCRC Patients*;
234. Vanhaesebroeck, B.; Perry, M.W.D.; Brown, J.R.; André, F.; Okkenhaug, K. PI3K Inhibitors Are Finally Coming of Age. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 741–769, doi:10.1038/s41573-021-00209-1.
235. André, F.; Ciruelos, E.; Rubovszky, G.; Campone, M.; Loibl, S.; Rugo, H.S.; Iwata, H.; Conte, P.; Mayer, I.A.; Kaufman, B.; et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 1929–1940, doi:10.1056/NEJMOA1813904.
236. Saalfeld, F.C.; Wenzel, C.; Aust, D.E.; Wermke, M. Targeted Therapy in BRAF p.K601E-Driven NSCLC: Case Report and Literature Review. <https://doi.org/10.1200/PO.20.00187> **2020**, 1163–1166, doi:10.1200/PO.20.00187.

237. Fujita, K.I.; Kubota, Y.; Ishida, H.; Sasaki, Y. Irinotecan, a Key Chemotherapeutic Drug for Metastatic Colorectal Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 12234–12248, doi:10.3748/wjg.v21.i43.12234.
238. Hassan, N.Z.A.; Mokhtar, N.M.; Sin, T.K.; Rose, I.M.; Sagap, I.; Harun, R.; Jamal, R. Integrated Analysis of Copy Number Variation and Genome-Wide Expression Profiling in Colorectal Cancer Tissues. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0092553.
239. Zhao, B.; Wang, L.; Qiu, H.; Zhang, M.; Sun, L.; Peng, P.; Yu, Q.; Yuan, X. Mechanisms of Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 3980, doi:10.18632/ONCOTARGET.14012.

ANEXOS

Anexo 1. Detalles clínico-patológicos de los pacientes de los cuales se han derivado los 27 CTOs incluidos en el biobanco de organoides. Se indica el estado de los microsatélites: MSS = estables, MSI=inestables. El sitio del tumor primario se indica como D (derecho) e I (izquierdo). Sexo: M = masculino; F= femenino. Estado del paciente: ADF = Libre de enfermedad; APD = Progresión de enfermedad.

No. Paciente	MSI/MSS	Sitio tumor	Localización tumor	Estadío	Edad	Sexo	Histología	Grado Histológico	Adyuvancia	Tratamiento	Estado del paciente
1	MSS	D	cecum	I	12	M	Adenocarcinoma	alto	no	NA	ADF
4	MSS	I	sigma	III	63	M	Adenocarcinoma	bajo	si	Capecitabine-oxaliplatin	APD
22	MSS	I	sigma	I	79	M	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	ADF
23	MSS	I	sigma	II	74	F	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	
25	MSS	I	c.descendente	II	83	M	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	ADF
27	MSS	I	sigma	III	66	M	Adenocarcinoma	bajo			
29	NA	D	c.ascendente	Adenoma	71	M	Adenoma	na	no	NA	
33	MSS	D	c.ascendente	III	55	M	Adenocarcinoma	alto			
34	MSS	D	c.ascendente	I	78	M	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	ADF
36	MSS	D	cecum	I	80	F	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	ADF
37	MSS	D	c.ascendente	III	63	M	Adenocarcinoma	bajo	si	Capecitabine-oxaliplatin	ADF
41	MSI	D	c.ascendente	IV	58	M	Adenocarcinoma	alto			
44	MSS	I	sigma	II	70	M	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	
49	MSS	D	cecum	II	67	F	Adenocarcinoma	bajo	si	Capecitabine	ADF
51	MSS	I	c.descendente	II	84	M	Adenocarcinoma	alto	no	NA	Muerte otra causa
59	MSS	I	recto	I	75	M	Adenocarcinoma	alto	no	NA	
60	MSI	D	c.ascendente	III	84	F	Adenocarcinoma	alto			
62	MSS	I	sigma	II	69	F	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	ADF
58	MSS	D	c.ascendente	IV	66	M	Adenocarcinoma	bajo			
65	MSS	D	c.transverso	III	71	F	Adenocarcinoma	alto	si	Capecitabine	ADF
68	NA	I	c.descendente	II	82	F	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	ADF

70	MSS	D	c.ascendente	III	72	F	Adenocarcinoma	bajo	si	Capecitabine	ADF
71	MSS	D	cecum	III	71	M	Adenocarcinoma	bajo	si	Capecitabine	ADF
74	MSI	I	sigma	III	74	F	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	ADF
75	MSS	I	sigma	III	70	F	Adenocarcinoma	bajo			
77	MSS	I	sigma	II	59	F	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	ADF
84	MSS	I	c.descendente	I	68	M	Adenocarcinoma	bajo	no	NA	ADF

Anexo 2. Tabla de las ganancias y pérdidas reportadas en los organoides tumorales, resultantes del análisis del perfil de número de copias cromosomales. Un valor positivo de Mean Log2Ratio indica la presencia de una ganancia, mientras que un valor negativo, indica pérdida. CN = Número de Copias.

Organoide	CN	Alteración	Cromosoma	Inicio	Fin	Localización	Mean Log2Ratio	Tamaño (kpb)	No. de genes
CTO36_P1	1	Pérdida	5	q14.3	q23.3	chr5:85428168-128739460	-0.608837526	43311.293	195
CTO36_P1	3	Ganancia	13	q11	q34	chr13:18862147-114342258	0.337327662	95480.112	630
CTO36_P1	3	Ganancia	20	p13	q13.33	chr20:80928-64284202	0.348046743	64203.275	780
CTO36_P2	1	Pérdida	5	q14.3	q23.3	chr5:85420696-128739460	-0.550356123	43318.765	195
CTO36_P2	3	Ganancia	13	q11	q34	chr13:18862147-114342258	0.295836575	95480.112	630
CTO36_P2	3	Ganancia	20	p13	q13.33	chr20:80928-64284202	0.304622282	64203.275	780
CTO37_P01	4	Ganancia	1	q21.1	q44	chr1:143459799-248930485	0.702258321	105470.687	1340
CTO37_P01	3	Ganancia	2	p25.3	q37.3	chr2:12771-241841232	0.265375792	241828.462	1809
CTO37_P01	2	Pérdida	5	q11.2	q35.3	chr5:57383265-181292789	-0.045890703	123909.525	1000
CTO37_P01	3	Ganancia	6	p25.3	q27	chr6:156975-170610394	0.242100728	170453.42	1451
CTO37_P01	3	Ganancia	7	p22.3	q36.3	chr7:43361-159327017	0.278417677	159283.657	1345
CTO37_P01	3	Ganancia	8	p23.3	p23.3	chr8:208049-465320	0.328495536	257.272	4
CTO37_P01	3	Ganancia	8	p23.3	q24.3	chr8:465566-145070385	0.276075981	144604.82	1025
CTO37_P01	4	Ganancia	13	q11	q34	chr13:18862147-114342258	0.629061429	95480.112	630
CTO37_P01	3	Ganancia	16	q22.2	q22.2	chr16:70821286-71168881	0.342978311	347.596	1
CTO37_P01	2	Pérdida	18	q12.2	q12.3	chr18:37718620-40210357	-0.054285798	2491.738	6
CTO37_P01	4	Ganancia	20	p13	q13.33	chr20:80928-64284202	0.51201442	64203.275	780
CTO51_P01	3	Ganancia	1	q21.1	q44	chr1:144355453-248930485	0.250456892	104575.033	1334
CTO51_P01	1	Pérdida	2	q24.2	q24.2	chr2:158991945-159303688	-0.46042295	311.744	3

CTO51_P01	1	Pérdida	2	q22.1	q22.1	chr2:137937009-138568713	-0.44551651	631.705	3
CTO51_P01	1	Pérdida	3	q26.31	q26.31	chr3:174636079-174748785	-0.516414199	112.707	0
CTO51_P01	3	Ganancia	5	q35.2	q35.3	chr5:177048195-177278770	0.242504118	230.576	3
CTO51_P01	1	Pérdida	5	q12.1	q12.1	chr5:59848189-60155192	-0.461069009	307.004	1
CTO51_P01	1	Pérdida	6	q21	q21	chr6:105251987-105715194	-0.468435938	463.208	1
CTO51_P01	4	Ganancia	7	p22.3	p11.2	chr7:43361-57660309	0.441133963	57616.949	462
CTO51_P01	3	Ganancia	7	q11.21	q36.3	chr7:62977012-159327017	0.253217424	96350.006	885
CTO51_P01	1	Pérdida	9	p24.3	p21.2	chr9:230227-26060398	-0.480347096	25830.172	120
CTO51_P01	3	Ganancia	10	q22.2	q22.2	chr10:75767040-75875956	0.251426794	108.917	1
CTO51_P01	1	Pérdida	10	q11.23	q21.1	chr10:51090433-51223929	-0.47246133	133.497	1
CTO51_P01	3	Ganancia	11	p15.5	p11.2	chr11:230616-47132180	0.246399315	46901.565	537
CTO51_P01	4	Ganancia	12	p13.33	p13.2	chr12:64621-10943224	0.443806008	10878.604	221
CTO51_P01	3	Ganancia	12	p13.2	q24.31	chr12:11039642-120531446	0.239420489	109491.805	1004
CTO51_P01	4	Ganancia	13	q11	q34	chr13:18862147-114342258	0.431745442	95480.112	630
CTO51_P01	1	Pérdida	14	q24.2	q24.2	chr14:71442970-71651479	-0.435571299	208.51	2
CTO51_P01	1	Pérdida	17	q21.1	q21.2	chr17:40101451-40310339	-0.395670917	208.889	8
CTO51_P01	3	Ganancia	18	q21.1	q21.1	chr18:48048131-48167728	0.322575245	119.598	1
CTO51_P01	1	Pérdida	18	p11.32	p11.21	chr18:136227-12677041	-0.468972113	12540.815	94
CTO51_P01	3	Ganancia	19	p12	p11	chr19:21171010-24324339	0.254043457	3153.33	39
CTO51_P01	3	Ganancia	19	p13.3	p13.13	chr19:5765858-13770515	0.222829603	8004.658	274
CTO51_P01	3	Ganancia	19	q11	q13.43	chr19:27780199-58445521	0.248579595	30665.323	1051
CTO51_P01	4	Ganancia	20	p12.1	p11.23	chr20:16055478-19253687	0.475911551	3198.21	30
CTO51_P01	3	Ganancia	20	p11.23	p11.1	chr20:19254519-26119753	0.281620682	6865.235	67

CTO51_P01	4	Ganancia		20	q11.1	q13.33	chr20:30298637-64284202	0.458903698	33985.566	508
CTO51_P01	3	Ganancia		22	q13.2	q13.2	chr22:42274959-42419443	0.326998076	144.485	3
CTO51_P01	2	Ganancia	X		p22.33	q28	chrX:253255-156004066	0.024239302	155750.812	1155
CTO51_P01	2	Ganancia	Y		p11.2	p11.2	chrY:2782100-9318720	0.013788946	6536.621	33
CTO51_P02	3	Ganancia		1	q21.1	q44	chr1:143459799-248930485	0.318322039	105470.687	1340
CTO51_P02	1	Pérdida		2	q24.2	q24.2	chr2:158989851-159300019	-0.600454628	310.169	3
CTO51_P02	1	Pérdida		3	q26.31	q26.31	chr3:174611527-174756739	-0.586729438	145.213	0
CTO51_P02	3	Ganancia		5	q35.2	q35.3	chr5:177069477-177247955	0.29982065	178.479	3
CTO51_P02	3	Ganancia		5	p13.1	p13.1	chr5:40161926-40808344	0.335674994	646.419	3
CTO51_P02	1	Pérdida		5	q12.1	q12.1	chr5:60054777-60444310	-0.595395472	389.534	1
CTO51_P02	1	Pérdida		6	q21	q21	chr6:105240769-105715194	-0.571439356	474.426	1
CTO51_P02	4	Ganancia		7	p22.3	p11.2	chr7:43361-57485654	0.569372568	57442.294	462
CTO51_P02	3	Ganancia		7	p11.2	q36.3	chr7:57497825-159327017	0.336692781	101829.193	885
CTO51_P02	3	Ganancia		10	q22.2	q22.2	chr10:75767040-75883108	0.321024271	116.069	1
CTO51_P02	1	Pérdida		10	q11.23	q21.1	chr10:51085447-51228880	-0.621825634	143.434	1
CTO51_P02	3	Ganancia		11	p15.5	p11.2	chr11:230616-46643068	0.312380675	46412.453	528
CTO51_P02	4	Ganancia		12	p13.33	p13.2	chr12:64621-11740421	0.557871869	11675.801	237
CTO51_P02	3	Ganancia		12	p13.2	q24.31	chr12:11743143-120547599	0.31342999	108804.457	991
CTO51_P02	4	Ganancia		13	q11	q34	chr13:18862147-114342258	0.555905191	95480.112	630
CTO51_P02	1	Pérdida		14	q24.2	q24.2	chr14:71442970-71651479	-0.575074388	208.51	2
CTO51_P02	1	Pérdida		17	q21.1	q21.2	chr17:40091756-40311726	-0.560141638	219.971	10
CTO51_P02	3	Ganancia		18	q21.1	q21.1	chr18:48019707-48201049	0.265714657	181.343	1
CTO51_P02	1	Pérdida		18	p11.32	p11.21	chr18:136227-12697651	-0.592942143	12561.425	94

CTO51_P02	3	Ganancia		19	p12	p12	chr19:21007867-24108813	0.363546688	3100.947	40
CTO51_P02	3	Ganancia		19	p13.3	p13.12	chr19:5642225-13832262	0.339736117	8190.038	281
CTO51_P02	3	Ganancia		19	q11	q13.43	chr19:27791273-58445521	0.349177033	30654.249	1051
CTO51_P02	4	Ganancia		20	p12.1	p11.23	chr20:15951915-19207783	0.608282329	3255.869	30
CTO51_P02	3	Ganancia		20	p11.23	p11.1	chr20:19216786-26324930	0.358061132	7108.145	69
CTO51_P02	4	Ganancia		20	q11.1	q13.33	chr20:30185663-64284202	0.58520683	34098.54	509
CTO51_P02	3	Ganancia		22	q13.2	q13.2	chr22:42274959-42423577	0.347509191	148.619	3
CTO51_P02	2	Ganancia	X		p22.33	q28	chrX:285997-156001062	0.014433495	155715.066	1155
CTO65_P02	3	Ganancia		1	q44	q44	chr1:243894664-244165428	0.347386029	270.765	2
CTO65_P02	1	Pérdida		1	p36.33	p12	chr1:914087-119981089	-0.484354996	119067.003	1448
CTO65_P02	1.83	Pérdida		3	p26.3	p11.1	chr3:20214-89956222	-0.201554123	89936.009	710
CTO65_P02	1.56	Pérdida		4	p16.3	q35.2	chr4:656917-190036318	-0.206588064	189379.402	1076
CTO65_P02	1.55	Pérdida		5	p15.33	q35.3	chr5:256318-181292789	-0.208736157	181036.472	1305
CTO65_P02	3	Ganancia		6	p21.1	q16.1	chr6:41160234-94784211	0.346706532	53623.978	328
CTO65_P02	1	Pérdida		6	q16.1	q16.3	chr6:94786687-103781019	-0.538326111	8994.333	28
CTO65_P02	3	Ganancia		7	p22.3	q36.3	chr7:43361-159327017	0.322534949	159283.657	1345
CTO65_P02	2.3	Ganancia		8	q12.3	q24.3	chr8:63194096-145070385	0.188585473	81876.29	563
CTO65_P02	2	Pérdida		9	p24.3	q34.3	chr9:203862-138125937	0.014241782	137922.076	1097
CTO65_P02	3	Ganancia		12	p13.33	p11.23	chr12:64621-27267686	0.338813071	27203.066	342
CTO65_P02	3	Ganancia		13	q11	q21.1	chr13:18862147-56732917	0.298534196	37870.771	327
CTO65_P02	3	Ganancia		13	q21.1	q34	chr13:58694518-114342258	0.299308268	55647.741	295
CTO65_P02	1.58	Pérdida		14	q12	q32.33	chr14:26599958-106877229	-0.212475814	80277.272	761
CTO65_P02	3	Ganancia		16	q11.2	q12.1	chr16:46807509-50386234	0.280379099	3578.726	26

CTO65_P02	3	Ganancia		16	p13.3	p13.3	chr16:35881-5275698	0.333924217	5239.818	246
CTO65_P02	3	Ganancia		16	q22.2	q24.3	chr16:72113287-90088654	0.293696608	17975.368	204
CTO65_P02	3	Ganancia		16	p13.3	p11.2	chr16:6408597-34963218	0.318082988	28554.622	381
CTO65_P02	2	Pérdida		16	q12.1	q22.2	chr16:50388726-72112767	0.00162151	21724.042	272
CTO65_P02	1	Pérdida		17	p13.3	p11.1	chr17:159684-22762465	-0.477850021	22602.782	465
CTO65_P02	1	Pérdida		18	q21.2	q23	chr18:50833393-80256240	-0.553090867	29422.848	148
CTO65_P02	1.6	Pérdida		19	p13.3	q13.43	chr19:260912-58445521	-0.172057317	58184.61	1769
CTO65_P02	3	Ganancia		20	q13.2	q13.2	chr20:52171183-53324003	0.425300115	1152.821	3
CTO65_P02	4	Ganancia		20	q12	q13.2	chr20:42295689-52168896	0.723208936	9873.208	155
CTO65_P02	4	Ganancia		20	q13.2	q13.33	chr20:53328122-64284202	0.739923207	10956.081	177
CTO65_P02	3	Ganancia		20	p12.1	q12	chr20:15318833-42295466	0.355353576	26976.634	284
CTO65_P02	1	Pérdida		20	p13	p12.1	chr20:80928-15313818	-0.524499887	15232.891	165
CTO65_P02	1.52	Pérdida		21	q11.2	q22.3	chr21:13757057-46677460	-0.224416135	32920.404	365
CTO65_P02	4	Ganancia	X		p22.33	p11.1	chrX:251880-58500475	0.541162844	58248.596	450
CTO65_P02	1.61	Pérdida	X		q11.1	q28	chrX:62786346-156004066	-0.187620844	93217.721	705
CTO71_P01	1	Pérdida		2	q22.1	q22.1	chr2:141020296-141241558	-0.627890786	221.263	1
CTO71_P01	2	Pérdida		3	p26.3	p12.3	chr3:20214-79759019	-0.018849044	79738.806	688
CTO71_P01	1	Pérdida		4	q34.3	q34.3	chr4:180941711-181144794	-0.446732983	203.084	1
CTO71_P01	3	Ganancia		6	q26	q26	chr6:161673642-162285105	0.337312341	611.464	1
CTO71_P01	3	Ganancia		6	p21.1	p21.1	chr6:41559126-43052703	0.400641637	1493.578	38
CTO71_P01	2	Pérdida		7	q11.21	q11.21	chr7:62977012-67419551	0.09539241	4442.54	56
CTO71_P01	4	Pérdida		7	q11.21	q21.11	chr7:67422859-79062769	0.509924338	11639.911	112
CTO71_P01	3	Pérdida		7	q21.11	q21.2	chr7:79074851-91589635	0.30843528	12514.785	48

CTO71_P01	4	Pérdida	7	q21.2	q22.1	chr7:91595708-100568806	0.708884848	8973.099	132
CTO71_P01	1	Pérdida	7	p22.3	p11.2	chr7:43361-57966167	0.034164331	57922.807	462
CTO71_P01	2	Pérdida	7	q22.1	q36.3	chr7:100579617-159327017	0.033188916	58747.401	538
CTO71_P01	3	Ganancia	8	q11.1	q24.3	chr8:46362632-145070385	0.305338717	98707.754	642
CTO71_P01	1	Pérdida	8	p23.3	p11.1	chr8:208049-43967071	-0.528708224	43759.023	386
CTO71_P01	1	Pérdida	10	q26.13	q26.13	chr10:121789693-122251358	-0.394999928	461.666	4
CTO71_P01	1	Pérdida	10	q26.12	q26.13	chr10:120976218-121562648	-0.389708463	586.431	1
CTO71_P01	4	Pérdida	10	q22.1	q22.1	chr10:70598821-71407481	0.798902565	808.661	10
CTO71_P01	1	Pérdida	10	q23.1	q23.1	chr10:82030074-84799810	-0.514968555	2769.737	12
CTO71_P01	4	Pérdida	10	q22.1	q23.1	chr10:72419430-82029686	0.934074367	9610.257	95
CTO71_P01	4	Ganancia	12	p13.33	p13.32	chr12:2372633-4822693	0.655741684	2450.061	32
CTO71_P01	3	Ganancia	12	p13.32	p13.31	chr12:4822941-8714481	0.309949394	3891.541	93
CTO71_P01	1	Pérdida	12	p13.33	p13.33	chr12:64621-2372574	-0.498986963	2307.954	29
CTO71_P01	4	Ganancia	13	q11	q34	chr13:18862147-114342258	0.463702045	95480.112	630
CTO71_P01	2	Pérdida	16	p13.3	p11.1	chr16:63639-36048843	-0.072563857	35985.205	631
CTO71_P01	2	Pérdida	16	q11.2	q24.3	chr16:46429761-90088654	0.055389653	43658.894	507
CTO71_P01	1	Pérdida	17	q22	q22	chr17:53107018-53273042	-0.512689671	166.025	0
CTO71_P01	1	Pérdida	17	q21.33	q21.33	chr17:51867503-51982772	-0.466371848	115.27	1
CTO71_P01	1	Pérdida	17	q12	q12	chr17:37442784-37924262	-0.417743698	481.479	7
CTO71_P01	1	Pérdida	17	q24.3	q24.3	chr17:69580339-70624259	-0.42302812	1043.921	6
CTO71_P01	1	Pérdida	17	q21.2	q21.2	chr17:40387970-41660467	-0.410462777	1272.498	72
CTO71_P01	1	Pérdida	17	p13.3	p11.1	chr17:150733-22762465	-0.506468025	22611.733	465
CTO71_P01	3	Ganancia	19	p13.3	p13.2	chr19:1741273-9427737	0.258110741	7686.465	239

CTO71_P01	1	Pérdida		19	p13.3	p13.3	chr19:260912-1600585	-0.424073502	1339.674	67
CTO71_P01	3	Ganancia		20	q11.1	q13.33	chr20:30185663-64284202	0.420323488	34098.54	509
CTO71_P01	2	Pérdida		20	p11.22	p11.1	chr20:22246466-26324930	-0.140011118	4078.465	51
CTO71_P01	1	Pérdida		20	p13	p11.22	chr20:80928-22235127	-0.433307709	22154.2	212
CTO71_P01	2	Ganancia	X		q22.3	q28	chrX:105183980-155967663	0.027330389	50783.684	467
CTO77_P01	1	Pérdida		1	q21.3	q21.3	chr1:152541856-153800515	-0.562992013	1258.66	62
CTO77_P01	2	Pérdida		1	p31.1	p31.1	chr1:72235170-74379500	0.002585589	2144.331	7
CTO77_P01	2	Pérdida		1	q25.1	q25.1	chr1:173415339-175174446	-0.008904613	1759.108	33
CTO77_P01	1	Pérdida		1	q32.1	q32.2	chr1:206898060-209608998	-0.604635808	2710.939	27
CTO77_P01	1	Pérdida		1	q42.3	q43	chr1:235452994-238998067	-0.57863504	3545.074	19
CTO77_P01	2	Pérdida		1	p33	p32.3	chr1:49110659-53947301	-0.003594846	4836.643	52
CTO77_P01	1	Pérdida		1	p36.32	p35.3	chr1:2785065-27784309	-0.541760334	24999.245	432
CTO77_P01	1	Pérdida		2	q37.1	q37.1	chr2:231035480-231213945	-0.586333671	178.466	4
CTO77_P01	1	Pérdida		2	q37.1	q37.1	chr2:232392274-233631160	-0.553065255	1238.887	24
CTO77_P01	1	Pérdida		3	q25.2	q25.2	chr3:152403326-152711158	-0.589574086	307.833	1
CTO77_P01	1	Pérdida		3	q27.2	q27.2	chr3:184994371-185253272	-0.569399311	258.902	5
CTO77_P01	1	Pérdida		4	q31.21	q31.21	chr4:143012787-143311161	-0.543428745	298.375	2
CTO77_P01	1	Pérdida		4	q34.3	q34.3	chr4:181967844-182216604	-0.609387466	248.761	2
CTO77_P01	1	Pérdida		4	q35.1	q35.1	chr4:184031365-184611425	-0.672195596	580.061	6
CTO77_P01	1	Pérdida		4	q34.2	q34.3	chr4:176072648-180206344	-0.568388921	4133.697	10
CTO77_P01	1	Pérdida		4	q31.3	q32.3	chr4:152331636-168233671	-0.577451124	15902.036	77
CTO77_P01	1	Pérdida		4	q12	q28.2	chr4:51934717-129235086	-0.565940654	77300.37	461
CTO77_P01	1	Pérdida		5	p15.1	p15.1	chr5:18225677-18334829	-0.559649458	109.153	0

CTO77_P01	1	Pérdida	5	p15.33	p15.33	chr5:993715-1227236	-0.458717876	233.522	7
CTO77_P01	1	Pérdida	5	p13.2	p13.2	chr5:35794629-36122415	-0.554963753	327.787	7
CTO77_P01	1	Pérdida	5	p12	p11	chr5:45650130-46389237	-0.522923767	739.108	1
CTO77_P01	1	Pérdida	5	p13.2	p13.2	chr5:37400465-38062959	-0.560402499	662.495	5
CTO77_P01	1	Pérdida	5	p15.2	p15.2	chr5:13104852-13740495	-0.59394336	635.644	1
CTO77_P01	1	Pérdida	5	q34	q35.1	chr5:167586495-169005368	-0.597172478	1418.874	12
CTO77_P01	2	Pérdida	5	q21.1	q21.2	chr5:100857757-103985107	0.030332937	3127.351	11
CTO77_P01	1	Pérdida	5	q11.1	q13.2	chr5:50134435-69551239	-0.591485458	19416.805	120
CTO77_P01	2	Pérdida	6	p25.3	p11.2	chr6:156975-58432737	-0.012332736	58275.763	824
CTO77_P01	2	Pérdida	6	q11.1	q27	chr6:60380801-170610394	-0.009344888	110229.594	627
CTO77_P01	1	Pérdida	7	q31.32	q31.33	chr7:123229890-124648505	-0.559914197	1418.616	17
CTO77_P01	1	Pérdida	7	q11.22	q11.23	chr7:70706173-73369870	-0.489812646	2663.698	31
CTO77_P01	1	Pérdida	8	q23.3	q23.3	chr8:114868051-115101054	-0.434330748	233.004	0
CTO77_P01	1	Pérdida	8	p12	p12	chr8:29245832-29684830	-0.62722543	438.999	2
CTO77_P01	1	Pérdida	8	p11.21	p11.21	chr8:41267642-41718473	-0.597399251	450.832	11
CTO77_P01	1	Pérdida	8	p11.21	p11.21	chr8:40084659-40550960	-0.608729951	466.302	3
CTO77_P01	1	Pérdida	8	q11.21	q11.21	chr8:49557595-50489430	-0.550154128	931.836	1
CTO77_P01	1	Pérdida	9	p21.3	p21.3	chr9:21367082-22340160	-0.572839394	973.079	12
CTO77_P01	0	Pérdida	10	q23.2	q23.31	chr10:87502824-88653215	-1.92137552	1150.392	9
CTO77_P01	2	Pérdida	10	p15.3	p11.1	chr10:54087-38621517	-0.026923782	38567.431	279
CTO77_P01	2	Pérdida	10	q23.31	q26.3	chr10:88673022-133613639	-0.013369763	44940.618	451
CTO77_P01	2	Pérdida	10	q11.21	q23.2	chr10:42330614-87486024	-0.015944531	45155.411	369
CTO77_P01	1	Pérdida	12	q13.12	q13.12	chr12:49674306-49841983	-0.523786842	167.678	5

CTO77_P01	1	Pérdida	12	p12.3	p12.3	chr12:17005524-17331235	-0.569806658	325.712	0
CTO77_P01	1	Pérdida	12	q12	q12	chr12:42518335-42863544	-0.627962869	345.21	4
CTO77_P01	2	Pérdida	13	q21.1	q21.1	chr13:54766970-57384170	0.017613543	2617.201	6
CTO77_P01	1	Pérdida	14	q31.3	q31.3	chr14:84719792-84946747	-0.425046296	226.956	0
CTO77_P01	1	Pérdida	14	q31.3	q31.3	chr14:86202235-86850899	-0.575986737	648.665	0
CTO77_P01	1	Pérdida	14	q21.1	q21.2	chr14:41684935-44868499	-0.400987429	3183.565	4
CTO77_P01	1	Pérdida	15	q13.2	q13.3	chr15:30842686-31100683	-0.630415188	257.998	4
CTO77_P01	1	Pérdida	15	q14	q21.3	chr15:35171064-55298580	-0.583341496	20127.517	222
CTO77_P01	1	Pérdida	16	p11.2	p11.2	chr16:30115092-30365311	-0.417793572	250.22	18
CTO77_P01	1	Pérdida	16	p11.2	p11.1	chr16:35014203-36048843	-0.581735034	1034.641	7
CTO77_P01	1	Pérdida	17	p13.1	p13.1	chr17:6962693-7680814	-0.480624547	718.122	63
CTO77_P01	1	Pérdida	17	p13.1	p13.1	chr17:8667924-9441066	-0.619795269	773.143	8
CTO77_P01	2	Pérdida	17	q21.2	q25.3	chr17:41419373-83084062	0.001417354	41664.69	777
CTO77_P01	1	Pérdida	18	q21.2	q21.2	chr18:51152585-51493382	-0.597025575	340.798	2
CTO77_P01	1	Pérdida	18	q21.1	q21.1	chr18:49764387-50471299	-0.60232696	706.913	9
CTO77_P01	0	Pérdida	18	q21.1	q21.2	chr18:50473429-51150755	-2.098068745	677.327	5
CTO77_P01	1	Pérdida	18	q11.2	q11.2	chr18:24059368-26502849	-0.574985619	2443.482	15
CTO77_P01	1	Pérdida	18	p11.31	p11.31	chr18:3566281-6395558	-0.580957139	2829.278	19
CTO77_P01	1	Pérdida	18	q21.33	q23	chr18:63523036-80256240	-0.563955016	16733.205	81
CTO77_P01	1	Pérdida	19	q13.33	q13.33	chr19:50347277-50829982	-0.481975775	482.706	25
CTO77_P01	3	Ganancia	20	p13	p12.3	chr20:80928-5131130	0.338150584	5050.203	107
CTO77_P01	3	Ganancia	20	p12.3	p12.1	chr20:6092887-13766514	0.363791916	7673.628	39
CTO77_P01	3	Ganancia	20	p12.1	p11.1	chr20:16205733-26324930	0.367482811	10119.198	97

CTO77_P01	3	Ganancia	20	q13.12	q13.33	chr20:47653238-64284202	0.344452957	16630.965	231
CTO77_P01	3	Ganancia	20	q11.1	q13.12	chr20:30185663-47175945	0.316095359	16990.283	274
CTO77_P01	1	Pérdida	20	q13.12	q13.12	chr20:47180806-47653132	-0.588551028	472.327	6
CTO77_P01	1	Pérdida	20	p12.3	p12.3	chr20:5131131-6092846	-0.639976282	961.716	15
CTO77_P01	1	Pérdida	20	p12.1	p12.1	chr20:13766545-16205654	-0.580101121	2439.11	8
CTO77_P01	1	Pérdida	21	q21.1	q21.1	chr21:18937532-19236140	-0.524730746	298.609	0
CTO77_P01	1	Pérdida	21	q21.1	q21.1	chr21:21479822-21951350	-0.587988018	471.529	3
CTO77_P01	1	Pérdida	21	q22.11	q22.13	chr21:34266632-37045397	-0.596521626	2778.766	31
CTO77_P01	1	Pérdida	22	q13.31	q13.33	chr22:45710437-50592320	-0.50208212	4881.884	71
CTO77_P01	1	Pérdida	22	q11.1	q11.23	chr22:16408174-24387989	-0.510484293	7979.816	182
CTO84_P02	2	Pérdida	2	q22.1	q23.3	chr2:140889265-153084451	-0.017369656	12195.187	40
CTO84_P02	2	Pérdida	3	q26.33	q27.3	chr3:179455832-186731808	-0.008422633	7275.977	96
CTO84_P02	1.82	Pérdida	3	p26.3	p14.2	chr3:20214-61130336	-0.209501529	61110.123	608
CTO84_P02	1.53	Pérdida	4	p16.3	p11	chr4:68454-49091771	-0.208871579	49023.318	333
CTO84_P02	1.53	Pérdida	4	q12	q35.2	chr4:51819520-190036318	-0.222413545	138216.799	754
CTO84_P02	1.62	Pérdida	5	p15.33	q35.3	chr5:113462-181292789	-0.167503214	181179.328	1308
CTO84_P02	1.7	Pérdida	6	p25.3	q27	chr6:156975-170610394	-0.131167802	170453.42	1451
CTO84_P02	1	Pérdida	7	p22.3	p22.2	chr7:43361-3902111	-0.492923122	3858.751	58
CTO84_P02	1	Pérdida	7	q11.21	q11.22	chr7:63011444-70040330	-0.377161483	7028.887	59
CTO84_P02	1.55	Pérdida	10	p15.3	q26.3	chr10:54087-133613639	-0.205853192	133559.553	1109
CTO84_P02	1.6	Pérdida	11	q11	q25	chr11:55558585-135068576	-0.181590567	79509.992	1083
CTO84_P02	1.54	Pérdida	12	p13.33	q24.33	chr12:64621-133201316	-0.213749236	133136.696	1388
CTO84_P02	2.49	Ganancia	13	q12.11	q34	chr13:18955418-114245691	0.177707893	95290.274	624

CTO84_P02	1	Pérdida	14	q11.2	q32.33	chr14:20043514-106877229	-0.519330842	86833.716	919
CTO84_P02	1.4	Pérdida	15	q11.2	q26.3	chr15:22581911-101888910	-0.285734027	79307	966
CTO84_P02	1.54	Pérdida	17	q11.1	q11.2	chr17:27116350-31083674	-0.190887601	3967.325	87
CTO84_P02	2	Pérdida	17	q23.2	q24.1	chr17:60219120-64808013	-0.032749752	4588.894	68
CTO84_P02	1	Pérdida	17	p13.3	p13.1	chr17:1726588-7009788	-0.214037883	5283.201	136
CTO84_P02	1.52	Pérdida	17	q21.33	q23.2	chr17:50679395-60213074	-0.217200925	9533.68	97
CTO84_P02	1	Pérdida	17	p13.1	p11.1	chr17:7011021-22762465	-0.504571151	15751.445	297
CTO84_P02	1.56	Pérdida	17	q24.1	q25.3	chr17:64816281-83084062	-0.198572913	18267.782	333
CTO84_P02	2	Pérdida	17	q11.2	q21.33	chr17:31086488-50677233	-0.03636612	19590.746	527
CTO84_P02	1	Pérdida	18	p11.32	p11.21	chr18:136227-15198991	-0.530732854	15062.765	116
CTO84_P02	1	Pérdida	18	q11.1	q23	chr18:20941324-80256240	-0.543801942	59314.917	312
CTO84_P02	3	Ganancia	19	p12	p12	chr19:22855132-23687139	0.292692054	832.008	10
CTO84_P02	3	Ganancia	19	q13.11	q13.11	chr19:32653416-34787519	0.251845246	2134.104	31
CTO84_P02	1.57	Pérdida	19	p13.3	p12	chr19:260912-22679149	-0.194489377	22418.238	701
CTO84_P02	2.58	Ganancia	20	p13	p11.1	chr20:80928-25891269	0.208974088	25810.342	257
CTO84_P02	4	Ganancia	20	q11.1	q13.33	chr20:30275344-64284202	0.610393875	34008.859	509
CTO84_P02	1.44	Pérdida	21	q11.2	q22.3	chr21:13757057-46677460	-0.263467148	32920.404	365
CTO84_P02	1.61	Pérdida	22	q11.1	q13.33	chr22:16528174-50759411	-0.175048861	34231.238	634

Anexo 3. Términos GO enriquecidos para los genes diferencialmente expresados en organoides tumorales con respecto a organoides normales. El punto de corte para incluir los términos fue p-valor < 0.05. Términos GO: MF = Funciones Moleculares; CC: Componentes Celulares.

Descripción	GO	Gene-Ratio	Bg-Ratio	p-valor	p-val. Aj.	q-valor	No. Genes en término GO
cell-substrate junction	CC	112/2902	423/19316	5.10E-10	3.65E-07	3.09E-07	112
focal adhesion	CC	109/2902	416/19316	1.65E-09	5.91E-07	5.01E-07	109
microvillus membrane	CC	17/2902	26/19316	7.75E-09	1.85E-06	1.57E-06	17
microvillus	CC	36/2902	91/19316	1.05E-08	1.87E-06	1.58E-06	36
membrane raft	CC	82/2902	323/19316	6.95E-07	8.29E-05	7.02E-05	82
membrane microdomain	CC	82/2902	323/19316	6.95E-07	8.29E-05	7.02E-05	82
actin-based cell projection	CC	60/2902	216/19316	9.38E-07	9.60E-05	8.13E-05	60
basement membrane	CC	33/2902	94/19316	1.11E-06	9.91E-05	8.39E-05	33
apical part of cell	CC	98/2902	414/19316	1.90E-06	0.000151	0.000128	98
brush border	CC	34/2902	101/19316	2.29E-06	0.000164	0.000139	34
basal part of cell	CC	67/2902	258/19316	3.06E-06	0.000199	0.000168	67
lysosomal membrane	CC	89/2902	376/19316	5.54E-06	0.000305	0.000259	89
lytic vacuole membrane	CC	89/2902	376/19316	5.54E-06	0.000305	0.000259	89
cell leading edge	CC	94/2902	411/19316	1.37E-05	0.000698	0.000591	94
cell cortex	CC	73/2902	301/19316	1.56E-05	0.000734	0.000622	73
vacuolar membrane	CC	97/2902	429/19316	1.64E-05	0.000734	0.000622	97
cell-cell junction	CC	107/2902	485/19316	1.90E-05	0.000799	0.000677	107
secretory granule membrane	CC	73/2902	304/19316	2.23E-05	0.000887	0.000751	73
collagen-containing extracellular matrix	CC	95/2902	422/19316	2.40E-05	0.000903	0.000765	95
endoplasmic reticulum lumen	CC	73/2902	306/19316	2.82E-05	0.001009	0.000854	73
basal plasma membrane	CC	60/2902	240/19316	3.35E-05	0.00113	0.000957	60
actin filament	CC	34/2902	113/19316	3.47E-05	0.00113	0.000957	34

apical plasma membrane	CC	80/2902	351/19316	6.55E-05	0.002039	0.001727	80
cell projection membrane	CC	77/2902	337/19316	8.16E-05	0.002434	0.002061	77
cytosolic ribosome	CC	31/2902	104/19316	9.17E-05	0.002626	0.002224	31
cortical actin cytoskeleton	CC	25/2902	78/19316	0.000119	0.003287	0.002784	25
lateral plasma membrane	CC	21/2902	62/19316	0.000172	0.004542	0.003847	21
cluster of actin-based cell projections	CC	41/2902	156/19316	0.000178	0.004542	0.003847	41
hippocampal mossy fiber to CA3 synapse	CC	13/2902	30/19316	0.000186	0.004598	0.003893	13
recycling endosome	CC	47/2902	189/19316	0.000258	0.006149	0.005207	47
small ribosomal subunit	CC	23/2902	73/19316	0.000292	0.006528	0.005528	23
actin filament bundle	CC	23/2902	73/19316	0.000292	0.006528	0.005528	23
ribosome	CC	55/2902	232/19316	0.000305	0.006617	0.005604	55
actomyosin	CC	23/2902	74/19316	0.000364	0.007619	0.006452	23
podosome	CC	Dec-02	28/19316	0.000372	0.007619	0.006452	12
phospholipid binding	MF	116/2850	451/18168	1.9479E-08	1.4222E-05	1.2669E-05	116
actin binding	MF	113/2850	438/18168	2.4841E-08	1.4222E-05	1.2669E-05	113
modified amino acid binding	MF	36/2850	92/18168	4.5851E-08	1.75E-05	1.5589E-05	36
laminin binding	MF	17/2850	29/18168	1.5603E-07	4.4663E-05	3.9787E-05	17
phosphatidylserine binding	MF	25/2850	60/18168	1.2914E-06	0.00029574	0.00026345	25
extracellular matrix binding	MF	23/2850	55/18168	3.1605E-06	0.00058066	0.00051727	23
integrin binding	MF	44/2850	142/18168	3.5499E-06	0.00058066	0.00051727	44
structural constituent of ribosome	MF	49/2850	169/18168	8.193E-06	0.00117262	0.0010446	49
transferase activity, transferring glycosyl groups	MF	70/2850	273/18168	1.3561E-05	0.00172529	0.00153694	70
transferase activity, transferring hexosyl groups	MF	54/2850	200/18168	2.7737E-05	0.0031759	0.00282919	54
steroid binding	MF	32/2850	100/18168	3.5736E-05	0.00371976	0.00331367	32

growth factor binding	MF	40/2850	137/18168	4.4826E-05	0.00427712	0.00381019	40
lipase activity	MF	38/2850	130/18168	6.6802E-05	0.00588372	0.00524139	38
actin filament binding	MF	54/2850	208/18168	8.761E-05	0.00716528	0.00638304	54
phospholipase activity	MF	32/2850	105/18168	0.00010274	0.00784262	0.00698644	32
oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor	MF	35/2850	120/18168	0.00013334	0.0095421	0.00850039	35

Anexo 4. Términos GO enriquecidos para los genes diferencialmente expresados en CTOs derechos, en comparación con CTOs izquierdos. El punto de corte para incluir los términos fue p -valor < 0.05 . Términos GO: BP = Procesos Biológicos

Descripción	GO	Gene-Ratio	Bg-Ratio	p-valor	p-val. Aj.	q-valor	No. Genes en término GO
cell-substrate adhesion	BP	28/531	358/18696	1.43E-06	0.00130771	0.00116938	28
response to virus	BP	28/531	359/18696	1.51E-06	0.00130771	0.00116938	28
defense response to virus	BP	24/531	260/18696	4.38E-07	0.00094586	0.0008458	24
defense response to symbiont	BP	24/531	260/18696	4.38E-07	0.00094586	0.0008458	24
morphogenesis of a branching structure	BP	17/531	186/18696	2.38E-05	0.00933026	0.00834324	17
response to type I interferon	BP	14/531	101/18696	9.97E-07	0.00130771	0.00116938	14
type I interferon signaling pathway	BP	13/531	95/18696	2.81E-06	0.00170986	0.00152897	13
cellular response to type I interferon	BP	13/531	96/18696	3.17E-06	0.00170986	0.00152897	13
negative regulation of viral process	BP	12/531	89/18696	7.91E-06	0.00379597	0.00339441	12
negative regulation of viral genome replication	BP	10/531	54/18696	2.44E-06	0.00170986	0.00152897	10
response to interferon-alpha	BP	6/531	21/18696	1.92E-05	0.0083134	0.00743395	6

Anexo 5. Términos GO enriquecidos para los genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados en CTOs derechos, en comparación con CTOs izquierdos. El punto de corte para incluir los términos fue p -valor < 0.05 . Términos GO: BP = Procesos Biológicos; MF = Funciones Moleculares; KEGG = Kyoto Encyclopedia of Genomes and Genes.

Descripción	GO	Gene-Ratio	Bg-Ratio	p-valor	p-val. Aj.	q-valor	No. Genes en término GO
positive regulation of cell population proliferation	BP	32/70	434/2771	1.59E-09	4.63E-06	3.13E-06	32
positive regulation of phosphorus metabolic process	BP	29/70	384/2771	8.32E-09	8.07E-06	5.46E-06	29
positive regulation of phosphate metabolic process	BP	29/70	384/2771	8.32E-09	8.07E-06	5.46E-06	29
positive regulation of protein phosphorylation	BP	26/70	321/2771	1.63E-08	1.19E-05	8.03E-06	26
positive regulation of phosphorylation	BP	27/70	356/2771	3.25E-08	1.89E-05	1.28E-05	27
regulation of striated muscle cell differentiation	BP	10/70	42/2771	4.25E-08	2.06E-05	1.40E-05	10
negative regulation of cell death	BP	30/70	446/2771	6.48E-08	2.69E-05	1.82E-05	30
immune system development	BP	27/70	370/2771	7.53E-08	2.74E-05	1.86E-05	27
positive regulation of catalytic activity	BP	29/70	430/2771	1.16E-07	3.56E-05	2.41E-05	29
hematopoietic or lymphoid organ development	BP	26/70	353/2771	1.22E-07	3.56E-05	2.41E-05	26
phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	MF	18/68	251/2770	1.86E-05	0.00241968	0.00191028	18
transferase activity	MF	26/68	479/2770	2.61E-05	0.00241968	0.00191028	26
kinase activity	MF	18/68	259/2770	2.87E-05	0.00241968	0.00191028	18
protein kinase activity	MF	17/68	238/2770	3.56E-05	0.00241968	0.00191028	17
transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	MF	18/68	277/2770	7.16E-05	0.0033014	0.00260637	18
phosphatase binding	MF	9/68	76/2770	7.28E-05	0.0033014	0.00260637	9

protein phosphatase binding	MF	8/68	62/2770	0.0001023	0.00397512	0.00313825	8
kinase binding	MF	19/68	316/2770	0.00012493	0.00424759	0.00335336	19
Pancreatic cancer	KEGG	14/52	76/8113	1.52E-17	1.70E-15	5.88E-16	14
Endocrine resistance	KEGG	15/52	98/8113	1.75E-17	1.70E-15	5.88E-16	15
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	KEGG	14/52	79/8113	2.72E-17	1.77E-15	6.12E-16	14
Proteoglycans in cancer	KEGG	18/52	205/8113	1.67E-16	8.16E-15	2.82E-15	18
Prostate cancer	KEGG	14/52	97/8113	5.65E-16	2.20E-14	7.62E-15	14
HIF-1 signaling pathway	KEGG	14/52	109/8113	3.07E-15	9.99E-14	3.45E-14	14
Breast cancer	KEGG	15/52	147/8113	9.13E-15	2.54E-13	8.79E-14	15
Gastric cancer	KEGG	15/52	149/8113	1.12E-14	2.73E-13	9.43E-14	15
MicroRNAs in cancer	KEGG	19/52	310/8113	1.62E-14	3.52E-13	1.22E-13	19
Colorectal cancer	KEGG	12/52	86/8113	1.34E-13	2.60E-12	8.99E-13	12
PI3K-Akt signaling pathway	KEGG	19/52	354/8113	1.82E-13	3.23E-12	1.11E-12	19

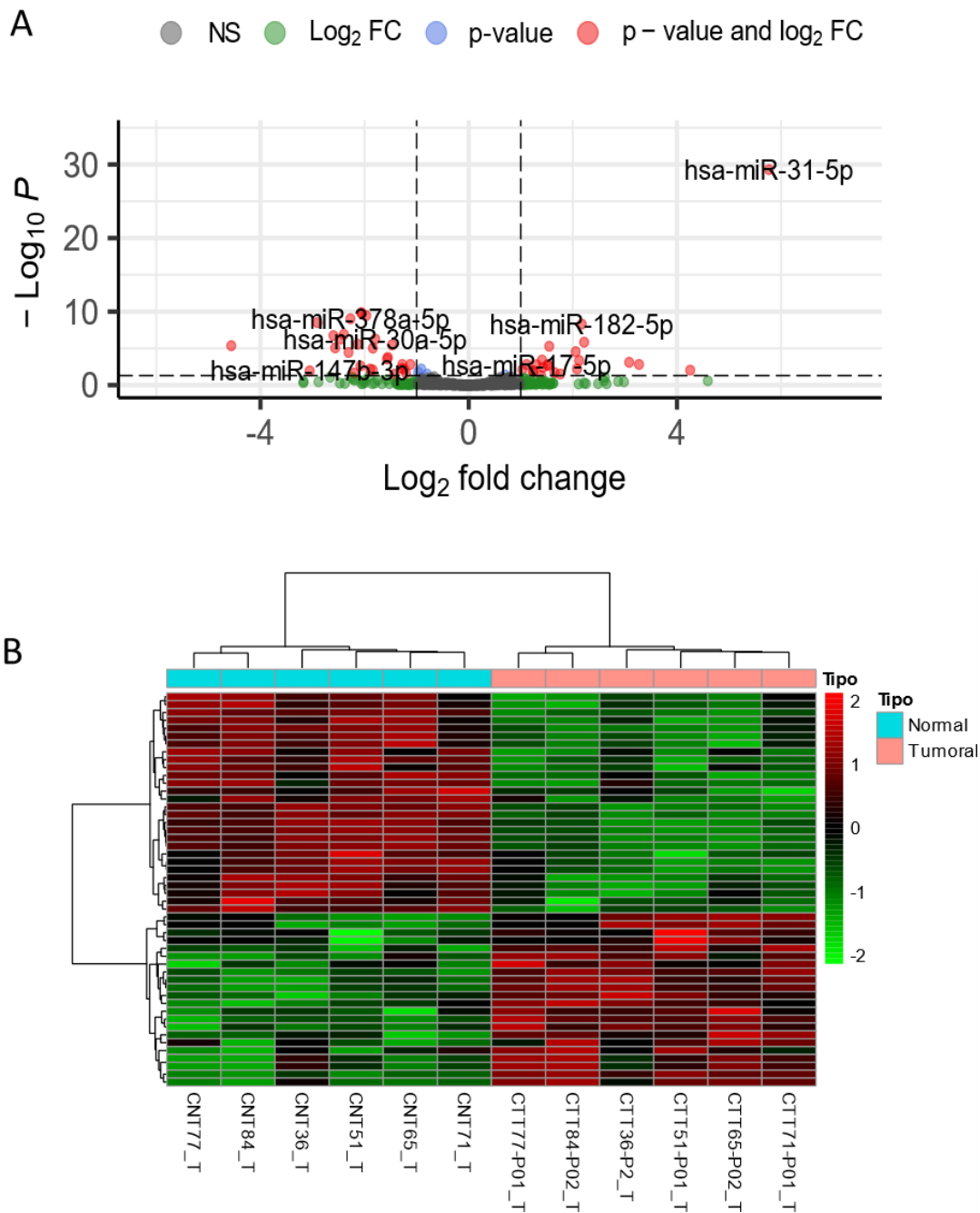
Anexo 6. Términos GO enriquecidos para los genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados en tejidos tumorales derechos, en comparación con tejidos tumorales izquierdos. El punto de corte para incluir los términos fue p-valor < 0.05. Términos GO: BP = Procesos Biológicos; MF = Funciones Moleculares.

Descripción	GO	Gene-Ratio	Bg-Ratio	p-valor	p-val. Aj.	q-valor	No. Genes en término GO
biological adhesion	BP	103/366	491/2771	7.07E-08	4.29E-05	3.10E-05	103
cell adhesion	BP	102/366	488/2771	1.03E-07	4.70E-05	3.40E-05	102
negative regulation of cell death	BP	99/366	446/2771	5.91E-09	1.08E-05	7.79E-06	99
cellular response to oxygen-containing compound	BP	99/366	495/2771	1.72E-06	0.00020859	0.00015097	99
circulatory system development	BP	97/366	500/2771	9.80E-06	0.00079289	0.00057385	97
regulation of locomotion	BP	93/366	441/2771	3.07E-07	8.60E-05	6.22E-05	93
tube development	BP	93/366	496/2771	6.95E-05	0.00280787	0.00203217	93
regulation of cellular component movement	BP	91/366	451/2771	3.58E-06	0.00035226	0.00025495	91
regulation of response to stress	BP	91/366	465/2771	1.42E-05	0.00091529	0.00066243	91
anatomical structure formation involved in morphogenesis	BP	91/366	481/2771	5.95E-05	0.00254732	0.00184359	91
DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific	MF	48/364	193/2770	3.36E-06	0.00081069	0.00070044	48
protein kinase binding	MF	65/364	292/2770	3.61E-06	0.00081069	0.00070044	65
DNA-binding transcription activator activity	MF	48/364	196/2770	5.38E-06	0.00081069	0.00070044	48
kinase binding	MF	68/364	316/2770	7.38E-06	0.00083404	0.00072061	68
transcription coregulator binding	MF	18/364	47/2770	1.09E-05	0.00084928	0.00073377	18
histone acetyltransferase binding	MF	10/364	17/2770	1.13E-05	0.00084928	0.00073377	10
transcription factor binding	MF	59/364	270/2770	2.04E-05	0.00131884	0.00113947	59
enzyme regulator activity	MF	63/364	307/2770	8.24E-05	0.00465768	0.00402421	63
core promoter sequence-specific DNA binding	MF	10/364	21/2770	0.000125	0.00627787	0.00542406	10
molecular function regulator	MF	89/364	486/2770	0.00021483	0.00907388	0.0078398	89
protein-containing complex binding	MF	75/364	394/2770	0.00022082	0.00907388	0.0078398	75

Anexo 7. Detalle de los miRNAs diferencialmente expresados en los tejidos tumorales derechos de CCR. Un valor positivo de log2FC indica sobreexpresión, mientras que un valor negativo de log2FC indica subexpresión.

miRNA	log2FC	p-valor	p-val.aj.
hsa-miR-214-3p	2.47	0.00206773	0.04696709
hsa-miR-145-5p	2.17	5.58E-05	0.00221804
hsa-let-7c-5p	2.13	0.00194151	0.04696709
hsa-miR-10b-5p	1.66	0.00288379	0.04955083
hsa-miR-7-5p	-1.43	0.00342804	0.04955083
hsa-miR-31-5p	-1.95	0.0030236	0.04955083
hsa-miR-486-5p	-2.57	1.47E-05	0.00077759
hsa-miR-486-3p	-2.59	0.00015183	0.00482833
hsa-miR-451a	-3.12	1.06E-06	8.43E-05
hsa-miR-144-5p	-3.59	1.02E-07	1.62E-05

Anexo 8. Análisis de expresión diferencial de miRNAs en tejido tumoral vs tejido normal proveniente de pacientes con CCR. **A.** En total se encontraron 50 miRNAs diferencialmente expresados en tejido tumoral derecho ($\log_2FC_{abs} > 1$, $p\text{-val}_{adj} < 0.05$). En el volcano-plot, los miRNAs DE se representan con círculos rojos. Los círculos verdes indican miRNAs que poseen solo un $\log_2FC_{abs} > 1$; los círculos azules indican miRNAs solo con un $p\text{-val}_{adj} < 0.05$. Los círculos grises indican miRNAs que no pasaron estos filtros y por tanto no son significativos (NS). **B.** El análisis de agrupamiento sin supervisión mostró que los tejidos forman dos grupos: tumorales y normales. La barra lateral indica el valor del \log_2FC .



Anexo 9. Ensayo de sensibilidad de los CTOs a 5-FU, Oxaliplatino y a la combinación de ambos. Se incluyen los valores del IC50, AUC, error estándar y coeficiente de correlación de Pearson (R^2) entre las réplicas experimentales, calculados mediante el software de análisis estadístico GraphPad.

CTO	Fármaco	IC50	Unidad	logIC50	AUC	StdErr	R ²
CTO36-P1	5FU	1.977	μM	0.29601	675.3	40.81	0.9854
CTO36-P1	Oxaliplatino	8.436	μM	0.92614	885.7	26.07	0.9854
CTO36-P1	5FU + Oxaliplatino	1.551	μM	0.19061	500.5	26.88	0.9854
CTO36-P2	5FU	1.426	μM	0.15412	403.5	30.83	0.9391
CTO36-P2	Oxaliplatino	8.475	μM	0.92814	969	88.46	0.9391
CTO36-P2	5FU + Oxaliplatino	1.21	μM	0.08279	304.9	24.4	0.9391
CTO65-P02	5FU	1.925	μM	0.28443	1101	70.31	0.8524
CTO65-P02	Oxaliplatino	6.364	μM	0.80373	1386	67.77	0.8524
CTO65-P02	5FU + Oxaliplatino	1.795	μM	0.25406	935.1	56.32	0.8524
CTO71-P01	5FU	2.031	μM	0.30771	966.8	33.29	0.9063
CTO71-P01	Oxaliplatino	4.113	μM	0.61416	1299	42.68	0.9063
CTO71-P01	5FU + Oxaliplatino	2.797	μM	0.44669	901.6	30.65	0.9063
CTO77-P01	5FU	1.665	μM	0.22141	560	31.66	0.9241
CTO77-P01	Oxaliplatino	2.555	μM	0.40739	780.9	37.67	0.9241
CTO77-P01	5FU + Oxaliplatino	0.9205	μM	-0.03598	449.5	15.9	0.9241
CTO84-P02	5FU	1.238	μM	0.09272	825.4	38.16	0.9193
CTO84-P02	Oxaliplatino	7.608	μM	0.88127	1461	49.18	0.9193
CTO84-P02	5FU + Oxaliplatino	1.51	μM	0.17898	815.1	22.44	0.9193
CTO51-P01	5FU	0.9471	μM	-0.0236	426.6	69.12	0.9554
CTO51-P01	Oxaliplatino	8.672	μM	0.93812	972.2	61.41	0.9554
CTO51-P01	5FU + Oxaliplatino	0.7931	μM	-0.10067	326.2	66.63	0.9554