



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Generación de organoides desde tejido tumoral o sano de mama, colon y riñón en el Biobanco del Sistema de Salud de Aragón

Generation of organoids from tumour or healthy breast, colon and kidney tissue in the Biobank of Aragon Health System

Autor:

Lorena Cañas Zabala

Directores:

M^a del Mar Encabo Berzosa

Delia Recalde Frisón

Ponente:

Manuel Arruebo Gordo

Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza
2022

Índice

1. Resumen/Abstract	1
1.1. Resumen.....	1
1.2. Abstract.....	1
2. Introducción	1
2.1. El cáncer	1
2.2. Modelo de cultivo en 3D: los organoides	2
2.2.1. Organoides de mama.....	3
2.2.2. Organoides de colon.....	4
2.2.3. Organoides de riñón	4
2.3. Aplicaciones de los organoides.....	4
2.4. Limitaciones de los organoides tumorales	5
2.5. Desarrollo de Biobancos de organoides	6
3. Objetivos	6
4. Materiales y métodos	7
4.1. Materiales.....	7
4.1.1. Obtención de las muestras	7
4.2. Métodos de generación de organoides	7
4.2.1. Procesamiento del tejido primario.....	7
4.3. Mantenimiento de organoides	8
4.3.1. Cambio del medio de cultivo.....	8
4.3.2. Pase de los organoides.....	9
4.3.3. Congelación y descongelación	9
4.4. Métodos de caracterización de organoides	10
4.4.1. Tinción de hematoxilina-eosina	10
4.4.2. Protocolo de Microscopía Confocal	10
4.4.3. Extracción de RNA y detección de genes específicos mediante RT-PCR	12
5. Resultados y Discusión	13
5.1. Establecimiento, crecimiento y diferenciación del cultivo de organoides de mama.....	13
5.2. Caracterización morfológica de organoides tumorales de mama mediante tinción histoquímica	14
5.3. Establecimiento, crecimiento y diferenciación del cultivo de organoides de colon.....	15
5.4. Caracterización morfológica de organoides de colon mediante tinción histoquímica	16
5.5. Caracterización morfológica de organoides de colon mediante microscopía confocal.....	17
5.6. Establecimiento, crecimiento y diferenciación del cultivo de organoides de riñón	18
5.7. Caracterización morfológica de organoides de riñón mediante tinción histoquímica.....	19
5.8. Caracterización morfológica de organoides de riñón mediante microscopía confocal	20
5.9. Caracterización genética de organoides sanos de riñón	21
5.10. Generación de un Biobanco de organoides	21
6. Conclusiones	22

7. Referencias	24
8. Material suplementario	26
8.1. Anexo I	26
8.2. Anexo II	30
8.3. Anexo III.....	31
8.4. Anexo IV.....	31
8.5. Anexo V.....	32

Abreviaturas empleadas

2D: Dos dimensiones

3D: Tres dimensiones

A: Adenina

aSC: Células madre adultas

BSA: Albúmina de Suero Bovino

BSSA: Biobanco del Sistema de Salud de Aragón

CAF: Fibroblastos asociados al cáncer

CCM: Medio completo

CCR: Carcinoma colorrectal

ESC: Células madre embrionarias

IIS: Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón

iPSC: Células madre pluripotenciales inducidas

MAPKs: Mitogen-activated protein kinases

MW24: Placa multiwell de 24 pocillos

N₂: Nitrógeno

OWB: Buffer de lavado de organoides

PBT: PBS-Tween

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa

RBC: Red Blood Cells

RT: Temperatura ambiente

SB: Borato de sodio

T: Timina

TFG: Factor de crecimiento transformante

TFG: Trabajo Fin de Grado

TME: Microambiente tumoral

1. Resumen/Abstract

1.1. Resumen

Los recientes avances en las técnicas de cultivo en 3D han contribuido al desarrollo de organoides, abriendo las puertas a un numeroso campo de aplicaciones. Esta forma de cultivo recoge la heterogeneidad celular, estructural y funcional de los tejidos *in vivo*, solventando las limitaciones de los cultivos en monocapa (2D). Ya se ha conseguido el desarrollo de organoides desde numerosos tejidos como cerebro, pulmón o retina, tanto desde células iPSC como de células aSC. La realización de este trabajo ha permitido la obtención de organoides de mama, colon y riñón partiendo de tejido sano o tumoral extraído de pacientes. Se han logrado optimizar diferentes parámetros para la generación eficiente de estos cultivos y se han realizado diversas técnicas de caracterización como inmunohistoquímica, inmunofluorescencia o RT-PCR, que han logrado confirmar la capacidad que presentan las células aSC para generar estructuras similares morfológica y funcionalmente a las del tejido de origen, recreando con mayor fidelidad sus condiciones *in vivo*. Esta técnica abre las puertas a nuevos modelos de cultivos celulares que permitirán estudios a nivel molecular de distintas enfermedades, ensayos de eficacia y toxicología de fármacos, etc., todo ello con el objetivo de mejorar los ensayos realizados en investigaciones biomédicas, así como de alcanzar más rápidamente una medicina más personalizada.

1.2. Abstract

Recent advances in 3D culture techniques have led to an increase in the development of organoids, opening the door to a wide range of applications. This form of culture captures the cellular, structural and functional heterogeneity of a tissue *in vivo*, thus overcoming the limitations of monolayer (2D) cultures. The development of organoids from numerous tissues such as brain, lung or retina has already been achieved, both from iPSC and aSC cells. This work has made it possible to obtain breast, colon and kidney organoids from healthy or tumour extracted from patients. Different parameters have been optimised for the efficient generation of these cultures and several characterisation techniques such as immunohistochemistry, immunofluorescence or RT-PCR have been carried out, which have confirmed the capacity of aSC cells to generate structures that are morphologically and functionally similar to their tissue of origin, thus being able to recreate the *in vivo* conditions more faithfully. This technique opens the door to new cell culture models that will allow studies at the molecular level of different diseases, drug efficacy and toxicology studies, etc., all with the aim of improving the tests carried out in biomedical research, as well as moving ever closer to a more personalised medicine.

2. Introducción

2.1. El cáncer

El cáncer es una enfermedad originada por el crecimiento descontrolado de las células en un tejido. Cuando la proliferación desregularizada de las células afecta a otros tejidos, ocurre un proceso de metástasis, en el que el tumor se expande por todo el organismo(1).

Por otro lado, el cáncer es una de las patologías con mayor tasa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La “International Agency for Research on Cancer” estimó que en el año 2020 se diagnosticaron, aproximadamente 18,1 millones de nuevos casos en el mundo (Figura 1). Además, la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 ha influido negativamente en su diagnóstico y detección, así como en el tratamiento de muchos pacientes, por lo que la cifra estimada es probablemente menor que el valor real(2).

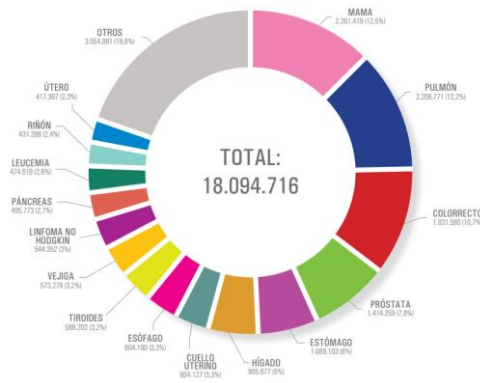


Figura 1. Estimación del diagnóstico de nuevos casos de cáncer en el mundo en el año 2020 Fuente: Global Cancer Observatory from International Agency for Research on Cancer (<http://gco.iarc.fr/>)

En el caso de España, se estima que el número de casos diagnosticados en 2022 alcanzará los 280.100, según la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). Los tipos de cáncer con mayor prevalencia serán los de colon y recto (43.370 nuevos casos), seguidos de mama (34.750) y pulmón (30.948). Con menor incidencia encontramos el cáncer de páncreas (9.252) o el de riñón (8.078)(2).

Como se ha mencionado anteriormente, el cáncer es una de las enfermedades con mayor tasa de mortalidad. Durante el año 2020 ocasionó cerca de 10 millones de muertes en todo el mundo, y las previsiones muestran un aumento, llegando a 16,3 millones en el año 2040. Solo en España el número de muertes en 2020 por causas relacionadas con dicha enfermedad ascendió a 113.000 casos(2).

2.2. Modelo de cultivo en 3D: los organoides

Los cultivos celulares son una herramienta indispensable para investigación que se lleva utilizando desde hace décadas. Hasta ahora, los cultivos convencionales en monocapa (2D) han sido los más utilizados. Sin embargo, estos carecen de la arquitectura y complejidad necesarias para el estudio de procesos biológicos *in vivo*(3).

Los modelos animales solucionaron parcialmente las limitaciones de los cultivos celulares. Este tipo de modelos incluyen estroma, vascularización y componentes inmunitarios que recrean unas condiciones más similares a las que ocurren en el cuerpo humano. Sin embargo, el uso de estos modelos requiere mucho tiempo y recursos tanto para su desarrollo como para su mantenimiento, obteniéndose en muchos casos resultados que no son extrapolables a los resultados esperados en humanos(4). Además, se busca el cumplimiento de las 3R propuesto por Russell y Burch: i) Reemplazar de forma parcial o total el uso de animales, ii) Reducir el número de animales por experimento, iii) Refinar los procedimientos durante la cría, experimentación y eutanasia(5).

Las técnicas de generación de modelos tridimensionales como los organoides, ha supuesto un importante avance en la investigación biomédica. Tanto es así que fue elegida método del año por la revista científica *Nature Methods* en el año 2017(6). Esta nueva forma de cultivo *in vitro* permite recrear la estructura, funcionalidad y heterogeneidad celular de un tejido primario ofreciendo a los investigadores un amplio campo de aplicaciones, desde ensayos de eficacia y toxicidad de fármacos pasando por medicina regenerativa y de precisión hasta el desarrollo de estudios de biomarcadores, tal y como se detalla más en los siguientes apartados(3).

Diversos estudios(7,8) han demostrado que los organoides derivados de tumores representan fielmente las características fenotípicas y genotípicas de los tumores primarios y, su composición no se ve alterada tras diversos pases de los mismos, es decir, son genéticamente estables(3).

Antes de abordar en profundidad la complejidad de la generación de estos agregados celulares debemos definir que es un organoide. Una de las últimas definiciones propuestas define los organoides como conjuntos de células que crecen en un entorno tridimensional (3D) definido, formando “mini-grupos de células” que se autoorganizan y se diferencian en células funcionales que recapitulan, la estructura y función de un órgano *in vivo*, pudiendo denominarse “mini-órganos”(3).

Los organoides se pueden clasificar en función del tipo celular del que derivan. De esta forma, encontramos organoides generados a partir de células madre embrionarias (ESC) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC), y organoides derivados de células madre adultas (aSC) presentes en tejidos postnatales o adultos. Son estos últimos en los que se centrará el desarrollo de este TFG(3,9).

Los organoides derivados de aSC se desarrollan en un entorno semejante al nicho en el que se encuentran las células *in vivo*, para ello las células del tejido de origen se cultivan en presencia de un cóctel de factores de crecimiento, hormonas y moléculas reguladoras que favorecen la autorrenovación de las aSC(3,9). De manera general, los factores básicos necesarios para el desarrollo de organoides son Wnt3 (activador de la vía Wnt implicada en la autorrenovación de las células madre), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-10), el inhibidor A83-01 (inhibidor de Alk4, 5 y 7), la vitamina Nicotinamida (necesaria para la supervivencia y diferenciación celular) y el inhibidor de p38 (SB202190)(10). Además, la mayoría de los medios necesitan R-spondin (actúa como agonista de Wnt siendo el ligando para Lgr5+), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (induce la proliferación intestinal) y Noggin.

Además, con el objetivo de prevenir la adhesión de las células al fondo de la placa y favorecer el crecimiento 3D del cultivo, se utiliza un sistema de andamiaje a partir de matrices orgánicas constituidas por una mezcla heterogénea de proteínas como colágeno, laminina y proteoglicanos de sulfato de heparina que imitan el entorno extracelular *in vivo* y facilitan la formación de estructuras tridimensionales. Esto ofrece a las células apoyo estructural y de señalización, favoreciendo la comunicación intercelular, clave para la formación de organoides(3).

2.2.1. Organoides de mama

El cáncer de mama es el segundo cáncer más diagnosticado y el que presenta mayor mortalidad en mujeres(2). Se clasifica en más de 20 subtipos con variaciones en la morfología, la genética y la clínica(7). Esta heterogeneidad tanto histológica como funcional hace que el diagnóstico y la clínica sean más complicados.

Los organoides derivados de tumores de pacientes suponen una herramienta emergente en el estudio de este tipo de tumor. El trabajo realizado por Sachs et al. estableció más de 100 líneas de organoides a partir de tumores de mama primarios y metastáticos. La optimización del protocolo de cultivo a largo plazo ha permitido realizar caracterizaciones histopatológicas y genómicas, en las que se ha secuenciado el DNA para el estudio de mutaciones presentes en el tejido tumoral(7).

El origen de la muestra es uno de los factores limitantes en el cultivo. Como demuestran en el ensayo realizado por Mazzucchelli et al., la cantidad de células viables obtenidas tras la digestión condiciona la siembra del cultivo en 3D. Además, se ha visto que la tasa de éxito en muestras de

tejido sano es de aproximadamente el 20,83% frente al 87,5% obtenida a partir de tejido tumoral(11). Esto podría deberse al alto contenido en tejido adiposo y la baja celularidad de este tipo de tejido.

2.2.2. Organoides de colon

El carcinoma colorrectal (CCR) es el tipo de cáncer con más incidencia en la población española y el segundo que más muertes ocasiona(2). Se trata de un tumor heterogéneo cuya clínica y pronóstico varía entre los pacientes.

El uso de organoides ha permitido realizar un análisis de dicha diversidad. Fujii et al. generaron 55 líneas celulares de diferentes subtipos de CCR en diferentes estadios, incluyendo aquellos que son menos frecuentes. Tras el estudio de las diferentes mutaciones que desencadenan el crecimiento descontrolado de las células, se ha llegado a la conclusión de que la mayoría de genes mutados afectan a 5 vías de señalización: WNT, RAS/mitogen-activated protein kinases (MAPKs), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), factor de crecimiento transformante (TFG) y las señales de p53. Todas estas vías son esenciales para regular la autorrenovación de las células madre intestinales(12).

El sistema de cultivo de organoides de colon se basa en la fisiología de las criptas intestinales. Este epitelio sufre una continua autorrenovación en cortos periodos de tiempo, debido a la presencia de células madre Lgr5+ en el fondo de las criptas intestinales. Utilizando los factores de crecimiento adecuados se puede simular el microambiente natural obteniendo como resultado “mini criptas intestinales” que permitirán el estudio morfo genético.

2.2.3. Organoides de riñón

El cáncer de riñón no tiene tanta incidencia ni mortalidad como los mencionados anteriormente, sin embargo, cerca de 1,4 millones de personas padecen enfermedades renales que pueden ser estudiadas basándose en el cultivo de organoides.

Los organoides derivados de riñón suelen presentar una morfología muy característica e invariable en forma de estructuras epiteliales quísticas altamente polarizadas que reciben el nombre de “tubuloides”(13). Sin embargo, no son los únicos que se pueden encontrar, dependiendo del tejido de origen, su morfología puede variar mostrando una estructura más compacta en el caso de los organoides derivados de tejido glomerular.

Grassi et al. estudiaron los niveles de expresión de genes específicos de nefrona para determinar la diferenciación de los organoides renales derivados de tejido sano. La tasa de éxito obtenida en el desarrollo de organoides derivados de tumores renales es inferior a la de los organoides derivados de tejido renal sano. Los organoides renales se han utilizado en la identificación de nuevos biomarcadores, así como en la secuenciación del genoma o en la detección de fármacos para realizar una medicina más personalizada(14).

2.3. Aplicaciones de los organoides

El cultivo de los organoides aún se encuentra en una etapa temprana y necesita un mayor desarrollo. A pesar de ello, ha abierto una nueva ventana con múltiples aplicaciones en diversos campos (Figura 2).

Dada su similitud a las condiciones *in vivo* han servido para el estudio de enfermedades infecciosas, sobre todo de aquellos patógenos que están restringidos al ser humano. Un ejemplo

es el proyecto realizado por Bartfeld et al. en el que estudiaron la infección de *Helicobacter pylori* en organoides de estómago humanos(15). Otra de sus aplicaciones aborda el campo de enfermedades hereditarias, facilitando el estudio de los principales mecanismos moleculares implicados en la aparición de la enfermedad(9).

Por otro lado, los organoides permiten la identificación de biomarcadores, así como de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de estudios personalizados de toxicología y eficiencia de diferentes tratamientos, lo que supone un acercamiento a la medicina personalizada(16).

En el caso de las enfermedades oncológicas, la tecnología de los organoides brinda la oportunidad de realizar estudios más precisos del tumor de cada paciente, permitiendo analizar desde su morfología hasta la expresión de diferentes genes, así como la eficacia y toxicidad de diferentes fármacos.

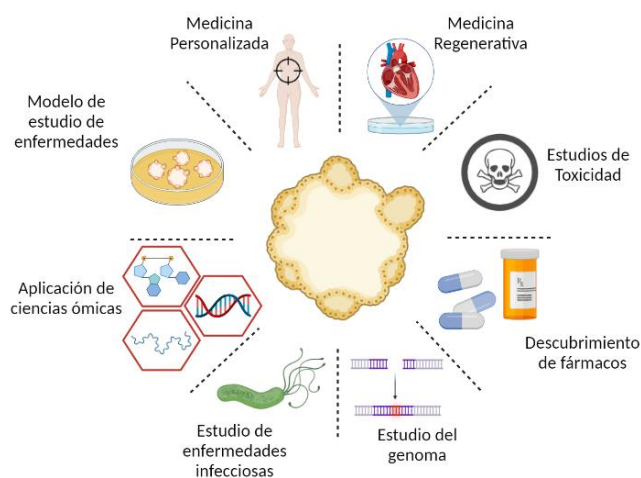


Figura 2. Esquema de las posibles aplicaciones de cultivo de organoides. Ilustración realizada con el programa BioRender.

2.4. Limitaciones de los organoides tumorales

Aunque se ha visto que los organoides son un método de cultivo novedoso y con múltiples aplicaciones, todavía presentan ciertas limitaciones. La ausencia de componentes del estroma, incluyendo las células del sistema inmunitario, los fibroblastos circundantes y las células endoteliales, compromete la veracidad de los resultados en pruebas como las de inmunoterapia(3). La solución a este problema pasa en parte, por el co-cultivo de organoides con fibroblastos asociados con el cáncer (CAF), lo que permite mantener las características moleculares clave de los tumores(17). El trabajo con muestras obtenidas de pacientes contiene tanto aSC como CAF.

Por otro lado, la ausencia de vascularización en dichas estructuras podría suponer una limitación en la distribución de nutrientes o fármacos. Este problema se podría solventar con el uso de biorreactores en agitación que facilitasen el transporte de las sustancias deseadas o bien con el co-cultivo de células endoteliales que generasen redes vasculares(4).

Por último, mencionar que no solo existen limitaciones a nivel científico, sino que se deben tener en cuenta también a nivel económico. Se necesita un gran desembolso para disponer de todos los factores necesarios para cada medio de cultivo, así como para todo el material empleado durante su cultivo y almacenamiento.

2.5. Desarrollo de Biobancos de organoides

El desarrollo de organoides a partir de muestras de pacientes abre las puertas a la generación de Biobancos especializados en su cultivo, caracterización y distribución. Actualmente, existen varias iniciativas cuyo objetivo se basa en la formación de dichas estructuras. Entre ellas destaca el HUB Organoids, un Biobanco de organoides fundado por el Instituto Hubrecht, el centro médico universitario de Utrecht y la Real Academia de Artes y Ciencias de los Países Bajos (KNAW)(18) donde se pueden encontrar más de 1000 modelos de organoides tumorales y sanos de distintos tejidos.

En España, los Biobancos se rigen según la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre. Los Biobancos se definen como establecimientos públicos o privados, sin ánimo de lucro, que acogen una o varias colecciones de muestras biológicas con fines diagnósticos o de investigación biomédica, organizados como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino(19). La función principal de los Biobancos es poner a disposición de la comunidad científica una gran cantidad de muestras biológicas y datos asociados recogidos bajo estrictos controles éticos y de calidad. De esta manera, los Biobancos ejercen de intermediarios entre los donantes, los médicos y los investigadores, garantizando los derechos del donante con respecto a sus muestras y datos(20)(21).

Actualmente, el Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (BSSA) alberga 17 colecciones de muestras de distintas patologías (COVID-19, Dislipemias Primarias, Oncología, Enfermedades Neurodegenerativas, etc.) y una colección de donantes sanos. Las colecciones están formadas por muestras de distintos tipos (sangre, suero, plasma, orina, saliva, tejido sano y tejido tumoral). Durante 2021 el Biobanco cedió 8.149 muestras, que se emplearon en 41 proyectos de investigación impulsados por 17 instituciones y empresas biotecnológicas. Como ya ocurrió en 2020, buena parte de las cesiones (5.100 muestras) sirvieron para facilitar el desarrollo de proyectos relacionados con el virus SARS-CoV-2.

El futuro de los Biobancos pasa por ofertar muestras más complejas que se adecúen al avance científico. Por ello, la capacidad de establecimiento de cultivos de organoides a largo plazo a partir de muestras de tejido de pacientes ha impulsado la aparición de Biobancos de organoides(3). En este entorno, surge la Plataforma de Biobancos y Biomodelos, impulsada por el Instituto de Salud Carlos III en 2020, de la cual el BSSA forma parte, y que tiene un Hub específicamente dedicado a organoides. El aumento de la oferta de colecciones de organoides a través de los Biobancos, está suponiendo y supondrá un aumento de recursos para distintas aplicaciones biomédicas(9), desde el avance en diagnóstico o tratamiento de diversas patologías hasta mejora de los análisis ómicos, estudios del cáncer o el descubrimiento de nuevos fármacos(22). Además, contribuirá al desarrollo de la medicina personalizada.

Es por ello que el BSSA tiene el objetivo de crear colecciones de organoides representativas de distintos tejidos, procedentes de pacientes, y ponerlas a disposición de la comunidad científica.

3. Objetivos

El presente trabajo se enmarca en la fase inicial del proyecto de creación de colecciones de organoides en el BSSA y tiene los siguientes objetivos:

1. Optimizar la generación, cultivo y almacenamiento en condiciones de viabilidad de cultivos de organoides a partir de tejido normal y tumoral.

2. Realizar la caracterización tanto morfológica como genética de los organoides generados y sus tejidos de procedencia.
3. Comenzar la generación de una colección de organoides tanto tumorales como sanos para su posterior aplicación en diversas investigaciones biomédicas.

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

4.1.1. Obtención de las muestras

Las muestras se obtuvieron en fresco a través del BSSA, procedentes de material excedente de diagnóstico, sin formol y de reciente extracción, en colaboración con los servicios hospitalarios de Cirugía y Anatomía Patológica. Los pacientes fueron previamente informados y otorgaron su consentimiento escrito expreso para la incorporación de sus muestras y datos al BSSA. Para ello firmaron el Consentimiento Informado utilizado habitualmente en el BSSA (Anexo V). Además, este trabajo de puesta a punto se enmarcó dentro de un proyecto de investigación realizado en colaboración con investigadores del IIS Aragón (interesados en la aplicación de los organoides generados) y que habían sido evaluados favorablemente por los Comités Ético y Científico del Biobanco y por su Directora Científica, y para el que finalmente se había establecido un acuerdo de cesión de muestras.

Las muestras de tejido se recogieron inmediatamente en un Falcon estéril de 15 mL, que contenía medio Advanced DMEM F-12 suplementado con HEPES, Glutamina, Gentamicina, Penicilina, Streptomycin y Anfotericina B (Medio Basal) a 4°C. En primer lugar, las muestras se registraron en la aplicación informática empleada por el BSSA (Bioebank), con el objetivo de garantizar la trazabilidad durante todo el proceso. El procesamiento del tejido y el posterior manejo de los organoides se llevó a cabo en una cabina de Seguridad Biológica Clase II Tipo B2 y en todo momento se utilizó material estéril, con el objetivo de evitar posibles contaminaciones. De manera general, el tamaño de las muestras fue entre 2-3 cm³, si bien varió entre los distintos donantes.

Preferentemente, el tejido se procesó el mismo día de su extracción. Sin embargo, en algún caso se mantuvo sumergido en Medio Basal hasta 72 horas. En todos los casos, el primer paso fue la digestión de la muestra. Para la generación de organoides se utilizaron medios específicos, que se detallarán en los siguientes apartados y en el Anexo I.

4.2. Métodos de generación de organoides

En este apartado se detalla el procedimiento general empleado para la obtención de cultivos de organoides. Como se ha mencionado anteriormente, cada tejido requiere unos factores concretos para su desarrollo, por ello se especifican las condiciones empleadas en cada tejido en el apartado Resultados.

4.2.1. Procesamiento del tejido primario

En primer lugar, se llevó a cabo una disgregación mecánica del tejido mediante cortes con bisturí o con tijeras. Para ello, se transfirió la muestra tumoral o sana a una Placa de Petri de 150 mm y se disgregó en fragmentos con un tamaño máximo de 2 mm³. A continuación, se recuperó todo el material posible en un Falcon de 15 mL y se añadieron entre 5-10 mL de Medio Basal frío sobre los fragmentos. Se resuspendieron varias veces, dejando que precipitasen tras cada resuspensión.

Tras repetir este paso varias veces, se realizó la disgregación enzimática. Para ello, se retiró el Medio Basal y se añadió el medio de digestión preincubado a 37°C. Salvo excepciones, el medio de digestión consistió en colagenasa IV (1mg/mL) disuelta en Medio Basal. Las variaciones de este medio se recogen en la Tabla 6 del Anexo I. Adicionalmente, se añadieron 10 µL de Y-27632 (*ROCK inhibitor*) (10µM) para evitar la muerte por anoikis de las células epiteliales(23).

La muestra se incubó con el medio de digestión durante 1 hora a 37°C en un baño termostático inmóvil, realizando revisiones cada 10 minutos en las se favoreció la disgregación mecánica mediante pipeteos reiterados y se comprobó el estado de la muestra en el microscopio óptico. La digestión se detuvo cuando el número de células individuales observadas en el medio era alto. Para ello, se añadió Medio Basal frío. El tejido disgregado se filtró a través de un strainer estéril de 100 µm y se recolectaron las células en un nuevo tubo Falcon de 50 mL.

A continuación, el filtrado se centrifugó a 350 g durante 5 minutos a 8°C. Tras retirar el sobrenadante, se añadieron 5-10 mL de Medio Basal frío y se resuspendió el pellet con una pipeta serológica de 10 mL. El producto resultante se transfirió a un Falcon de 15 mL y se volvió a centrifugar a 350 g durante 5 minutos a 8°C.

La presencia de coloración roja en el pellet evidenció la existencia de glóbulos rojos en la muestra. Para su eliminación, el pellet se resuspendió en 1 mL de buffer RBC lysis, y se incubó 4-5 minutos a RT. Transcurrido este tiempo se añadieron 5-10 mL de Medio Basal y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriormente mencionadas. Una vez eliminados los eritrocitos de la muestra, se procedió a la siembra de las células.

A partir de este punto se trabajó en frío en todo momento. En función de la densidad celular obtenida en el pellet, se sembró un mayor o menor número de pocillos.

Esta densidad se determinó utilizando la cámara de Neubauer como herramienta de cuantificación. Para ello, se mezcló una alícuota de la muestra con el colorante Azul Tripán, en una proporción 1:1.

$$Densidad\ celular = \frac{n^{\circ}\ de\ células\ totales}{n^{\circ}\ de\ cuadrantes} \times 10^4 \times Factor\ de\ dilución$$

Finalmente, se sembraron las células mezcladas con BME-2 en placas MW24 preincubadas a 37°C. En cada pocillo se depositó una gota de 40 µL de muestra, a una concentración de entre 3·10⁴ y 5·10⁴ células/ pocillo. Se sembraron de 4 a 6 pocillos de muestra por cada tejido de origen.

Seguidamente, se invirtió la placa y se mantuvo en el incubador a 37°C bajo una atmósfera del 5% de CO₂ durante un tiempo mínimo de 30 minutos, hasta la solidificación de la matriz. Pasado este tiempo, la placa se colocó en su posición normal y se añadieron 500 µL de medio de cultivo específico para cada tipo de tejido. Durante los primeros días de cultivo y tras cada pase o descongelación se suplementó el medio con Y-27632 (10 µM) para evitar la muerte celular por anoikis.

4.3. Mantenimiento de organoides

4.3.1. Cambio del medio de cultivo

Para evitar que los factores de crecimiento se agotasen y limitasen el crecimiento de los organoides, el medio de cultivo se cambió cada 2-3 días. En primer lugar, se retiró el medio con una pipeta Pasteur estéril unida a una bomba de vacío teniendo la precaución de no tocar la matriz.

Posteriormente se añadieron 500 μ L del medio previamente atemperado a RT y se devolvió la placa al incubador.

4.3.2. Pase de los organoides

Una vez los organoides alcanzaron un diámetro de más de 300 μ m o la confluencia superó el 80% se procedió a la disgregación y expansión(24). Con el objetivo de disolver la matriz que embebía a los organoides, se añadieron 5 μ L de dispasa II (0,1 mg/mL) a cada uno de los pocillos. Tras una hora de incubación a 37°C, se recogieron en un Falcon de 15 mL todos los pocillos sembrados y se centrifugaron a 350 g durante 5 minutos a 8°C.

Tras la centrifugación se retiró el sobrenadante y se añadió sobre el pellet 1 mL de TrypLE Express Enzyme previamente incubado a 37°C para favorecer la disgregación de los organoides en células individuales. Se incubaron junto al TrypLE a 37°C entre 1-10 minutos y se observaron en el microscopio invertido tras cada minuto de incubación. Una vez los organoides redujeron su tamaño y la mayoría de las células eran células individuales o pequeños agregados se detuvo la digestión mediante la adición de Medio Basal.

La mezcla neutralizada se centrifugó a 350 g durante 5 minutos a 8°C. El pellet de células obtenido se resuspendió en la cantidad correspondiente de BME-2 para formar la nueva matriz donde quedaron embebidos los organoides. En este punto, la eliminación de todo el sobrenadante era necesaria para evitar la disolución del porcentaje de BME-2 y asegurar la correcta formación de una “gota” compacta de matriz en cada pocillo de la placa MW24. Como se ha mencionado anteriormente, el BME-2 se mantuvo en hielo hasta el momento de su utilización, con el objetivo de evitar la solidificación que se produce por encima de los 10°C. A continuación, se depositaron 40 μ L de células resuspendidas en BME-2 por pocillo. Seguidamente, se invirtió la placa y se mantuvo en el incubador a 37°C bajo una atmósfera del 5% de CO₂ durante un tiempo mínimo de 30 minutos, hasta la solidificación completa de la matriz. Pasado este tiempo, la placa se colocó en su posición normal y se añadieron 500 μ L de medio de cultivo específico para cada tipo de tejido. Durante los primeros días de cultivo y tras cada pase o descongelación se suplementó el medio con Y-27632 (10 μ M) para evitar la muerte celular por anoikis.

En los sucesivos cambios de medio no fue necesario la adición del inhibidor *ROCK*, debido a la aparición de interacciones entre las células del pocillo para la formación de los organoides y la ausencia de muerte por anoikis.

4.3.3. Congelación y descongelación

Para la conservación de las distintas muestras de organoides se procedió a su congelación en criotubos, así como a su posterior descongelación para el estudiar la viabilidad de los organoides tras verse sometidos a un proceso de estrés térmico. La congelación se realizó 2-3 días después de llevar a cabo el pase, cuando el tamaño de los organoides había alcanzado aproximadamente la mitad de su tamaño máximo.

Como se ha mencionado anteriormente, en primer lugar, se procedió a la liberación de los organoides de la matriz, añadiendo dispasa II (0,1mg/mL) en cada uno de los pocillos e incubando la placa durante 1 hora a 37°C.

Posteriormente, los organoides se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugaron a 350 g durante 5 minutos a 8°C. El sobrenadante fue desechado y el pellet resuspendido en Recovery Cell Culture Freezing Medium. En cada criotubo se recolectaron 2-3 pocillos en un volumen final de 500 μ L y se congelaron en primer lugar a -80°C en el recipiente CoolCell, para

una congelación progresiva de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y tras 2-3 días se pasaron a N_2 líquido (-196°C) para su conservación a largo plazo.

Para comprobar que el protocolo de congelación era efectivo y no se producía muerte celular en los organoides, se llevó a cabo la descongelación de diversas muestras.

Para la descongelación, las muestras se trasladaron al congelador de -80°C o directamente al laboratorio de cultivos. A continuación, el contenido total del criovial se descongeló completamente en un baño termostático a 37°C y se transfirió a un Falcon de 15 mL con Medio Basal. La muestra descongelada se centrifugó a 350 g durante 5 minutos a 8°C y el pellet resultante se resuspendió en BME-2 siguiendo el protocolo expuesto anteriormente.

4.4. Métodos de caracterización de organoides

4.4.1. Tinción de hematoxilina-eosina

Para llevar a cabo la tinción de hematoxilina-eosina fue necesario liberar los organoides de 1-2 pocillos de la matriz de BME-2. Para ello, se añadieron 5 μL de dispasa II (0,1mg/mL) en los pocillos a caracterizar y se incubaron durante 1 hora a 37°C . Posteriormente, se tomaron las muestras de los pocillos y se transfirieron a un Eppendorf de 5 mL, el cual fue sometido a una centrifugación a 350 g durante 5 minutos, RT.

A continuación, se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con PBS, añadiendo el PBS por la pared del Eppendorf sin llegar a resuspender el pellet. Tras el último lavado, se llevó a cabo la fijación con formalina al 10% a RT durante 10 minutos. Una vez finalizado el tiempo de fijación se lavó de nuevo el pellet con PBS dos veces sin resuspender, y se añadieron 50-75 μL de hematoxilina cubriendo el pellet con el objetivo de visualizarlo mejor. Transcurridos 5-10 minutos el pellet se lavó de nuevo con PBS y se transfirió a un cassette histológico que fue procesado por el Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud según sus protocolos habituales de trabajo hasta la obtención de un bloque de parafina y la posterior tinción de un corte con Hematoxilina-Eosina.

4.4.2. Protocolo de Microscopía Confocal

Para la obtención de imágenes de alta resolución en 3D de los organoides se recurrió a la tinción con fluorocromos, para ello se siguió el protocolo desarrollado en el artículo por Dekkers JF et al.(25), con algunas modificaciones.

En primer lugar, se prepararon los reactivos que se utilizaron en el protocolo: PBS-Tween (PBT), buffer de lavado de los organoides (OWB) y PBS-Albúmina de Suero Bovino (BSA). El PBT 0,1% (vol/vol) se obtuvo de la mezcla de 50 μL de Tween-20 con 50 mL de PBS. Para la preparación del buffer de lavado se añadieron 50 μL de TritonX-100 y 0,1 g de BSA a 50 mL de PBS. Por último, el PBS-BSA 1% (wt/vol) se obtuvo de la mezcla de 0,5 g de BSA con 50 mL de PBS.

A continuación, se obtuvieron los organoides de 1-2 pocillos liberándolos de la matriz de BME-2. Para ello, se siguió el protocolo descrito anteriormente. Tras ello, se transfirieron los organoides a un tubo Falcon de 15 mL. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de PBS-BSA frío sobre el pellet y se centrifugó a 70 g durante 3 minutos a 4°C . El resultado fue un pellet visible de organoides liberados de la matriz.

Para el proceso de fijación, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de formol. La muestra se incubó durante 45 minutos, realizando un leve volteado de esta cada 15 minutos. Pasado este tiempo, se rellenó el tubo con PBT (0,1% (vol/vol)) frío (4°C) hasta alcanzar los 10 mL, y se incubó a 4°C durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 70 g a 4°C.

El siguiente paso fue el bloqueo de la muestra. Para ello, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en OWB a 4°C. Seguidamente, la muestra fue transferida a una placa MW24 de baja adherencia. La placa se mantuvo durante 15 minutos a 4°C y pasado este tiempo se procedió a realizar el inmunomarcaje.

En este caso, la tinción se basó en el uso de dos fluorocromos, faloidina-488 y DAPI. La faloidina es una molécula orgánica capaz de unirse específicamente a los filamentos de actina que constituyen el citoesqueleto de las células(26). DAPI es un marcador fluorescente que se une a las regiones ricas en adenina y timina del DNA nuclear.

Durante todo el proceso de marcaje se mantuvo un volumen final en el pocillo de 200 µL. Como referencia, se añadieron 200 µL de OWB en un pocillo vacío. Tras cada paso, los organoides se encontraban en el fondo del pocillo, por ello, en cada una de las etapas se retiró con cuidado el excedente de OWB hasta dejar un volumen final de 200 µL. A continuación, se añadió la faloidina.

Se preparó un Eppendorf con 200 µL de OWB y 4 µL de faloidina, de forma que la concentración final del marcador en el pocillo fuese de 1/100. Para que la tinción se realizase de manera correcta se incubaron las muestras con la faloidina 24 horas a 60 rpm en agitación horizontal a 4°C.

Pasado este tiempo se añadió 1 mL de OWB y tras esperar 3 minutos para que los organoides sedimentaran al fondo del pocillo, se retiró el volumen añadido. A modo de lavado, se volvió a añadir 1 mL de OWB y se dejó en agitación durante 2 horas. Este proceso se repitió 3 veces.

Una vez finalizado el proceso de lavado, se retiró 1 mL de los pocillos y se añadieron 200 µL de OWB con el segundo marcador. En este caso se utilizó DAPI, a la misma concentración que la empleada para la faloidina, 1/100.

La incubación con DAPI fue de 24 horas a 60 rpm en agitación horizontal a 4°C. Transcurrido este tiempo se procedió a lavar la muestra un total de 3 veces. Tras los lavados, se recuperaron los organoides marcados. Una vez todos los pocillos fueron transferidos a un Eppendorf, se centrifugó a 70 g durante 2 minutos a 4°C.

Finalmente, se añadieron 100 µL del medio de montaje sobre el pellet, evitando la formación de burbujas y se incubó durante 20 minutos a RT. Finalizado este tiempo, se transfirió parte de la muestra a un portaobjetos con un círculo dibujado con un rotulador hidrófobo (PAP pen) para evitar que la muestra se esparciera por toda la superficie.

Por último, se puso un cubreobjetos y se observó la muestra en el microscopio confocal Zeiss LSM 880 con Airyscan y Fast Airyscan empleando el láser de diodo de 405nm y el láser de argón multilínea de 488nm. La obtención de las imágenes se realizó con ayuda del Servicio de Microscopía e Imagen del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud.

4.4.3. Extracción de RNA y detección de genes específicos mediante RT-PCR

El estudio de la expresión de genes específicos se llevó a cabo en los organoides de riñón mediante RT-PCR. En primer lugar, se llevó a cabo la extracción del RNA total de los organoides en cultivo.

Como se ha indicado previamente, el primer paso fue la liberación de los organoides de la matriz orgánica de BME-2 siguiendo el protocolo descrito en apartados anteriores. Una vez obtenido, el pellet resultante se resuspendió en 200 μ L de Trizol. El Trizol es un disolvente orgánico que destruye las células y libera el RNA de su interior. Las muestras se conservaron a -80°C hasta la extracción del RNA.

El proceso de extracción del RNA, así como la generación del cDNA y la detección de la expresión génica mediante RT-PCR se realizó en colaboración con el grupo de investigación Fisiopatología Renal y Cardiovascular (FISIOPREN) siguiendo sus protocolos optimizados.

La extracción del RNA se llevó a cabo mediante el método fenol-cloroformo. Para ello, una vez las muestras estuvieron descongeladas se mezclaron con 40 μ L de cloroformo con ayuda de un vortex. Tras 3 minutos de incubación a RT se centrifugaron a 12000 g a 4°C durante 15 minutos. Tras la centrifugación, aparecieron 3 fases bien diferenciadas: una fase orgánica inferior correspondiente al rojo fenol y al cloroformo, una interfase que contenía el DNA y una fase acuosa superior que contenía el RNA.

La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 5 μ g de glucógeno libre de RNasa y 100 μ L de isopropanol. El glucógeno se une al RNA favoreciendo su precipitación. La solución final se mezcló con ayuda de un vortex y, se incubó durante 10 minutos a RT. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 10 minutos.

Tras la centrifugación, el RNA precipitó formando un pequeño pellet en el fondo de los tubos. El sobrenadante se desechó mediante decantación y los pellets se resuspendieron en 200 μ L de etanol al 75%. De nuevo, se utilizó un vortex para asegurar la mezcla de los componentes. A continuación, se centrifugaron los tubos a 7500 g a 4°C durante 5 minutos. Como resultado, se obtuvo un pellet blanquecino en el fondo de cada uno de los tubos. De nuevo, se desechó el sobrenadante por decantación y el posible volumen residual se retiró con ayuda de una micropipeta. Se dejaron los tubos abiertos durante 5-10 minutos para favorecer la evaporación del etanol, manteniendo las precauciones necesarias para evitar la degradación del RNA por las RNasas ambientales. Finalmente, se añadieron 6 μ L de agua DEPC en los que se resuspendieron los pellets y se incubaron en un termobloque a 60°C durante 10 minutos. Para comprobar que la extracción se realizó con éxito, se cuantificó la cantidad de RNA en cada una de las muestras con ayuda del espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Thermo Fisher).

Para la generación del cDNA, se partió de 500 ng de RNA y se siguió el protocolo indicado en el kit (Prime Script™ RT Master Mix (Perfect Real Time)) (Takara). Cada uno de los cDNAs fue añadido a los masters mix elaborados y optimizados por el grupo de investigación FISIOPREN y se realizaron las distintas RT-PCR. Las condiciones de la PCR se encuentran en el Anexo IV.

Los resultados se cargaron en geles de agarosa al 2% y se corrieron durante 30 minutos a 200V. El tampón utilizado para realizar la electroforesis es una solución SB (Sodium Borate) 1X constituida por hidróxido de sodio y ácido bórico con un pH de en torno a 8,0-8,2.

5. Resultados y Discusión

Para la realización de este Trabajo Fin de Grado, se emplearon muestras de riñón, mama y colon tumoral y sano. La optimización de los protocolos de cultivo y mantenimiento se realizó de manera específica para cada tipo de tejido. Las condiciones de procesamiento y cultivo de cada tipo de tejido se realizaron según lo indicado en el apartado 4, pero en cada tejido se requirió de algunas condiciones específicas (definidas en la bibliografía), que se exponen a continuación.

5.1. Establecimiento, crecimiento y diferenciación del cultivo de organoides de mama

Para la generación del cultivo óptimo de organoides tumorales derivados de tejido mamario se partió del protocolo descrito por Dekkers et al.(27) con algunas modificaciones.

La digestión del tejido mamario se realizó como se indica en apartado 4. Como se ha indicado anteriormente, para la generación de organoides característicos de un tejido concreto se requieren medios suplementados con factores específicos que imitan el microambiente del tejido *in vivo*. Para el cultivo de organoides de mama se utilizaron dos tipos diferentes de medio, cuya composición puede encontrarse en el Anexo I. Las principales diferencias se basan en la ausencia de los factores Wnt-3a, hidrocortisona, β -estradiol y forskolina en el medio 1. De acuerdo con lo observado por Dekkers et al., en este trabajo no se observaron diferencias significativas en la generación de organoides tumorales entre ambos medios. Ellos proponen una mejora sustancial en la generación de organoides sanos, sin embargo, no se pudo comprobar dada la limitación del tamaño de la muestra de tejido sano cuya composición mayoritaria resultó ser grasa y tejido necrótico.

Entre los factores que han demostrado influir en el crecimiento de los organoides encontramos la densidad celular, el tiempo de cultivo, el número y ratio de los pases y el grado de disgregación celular cuando se realiza el pase (Figura 3).

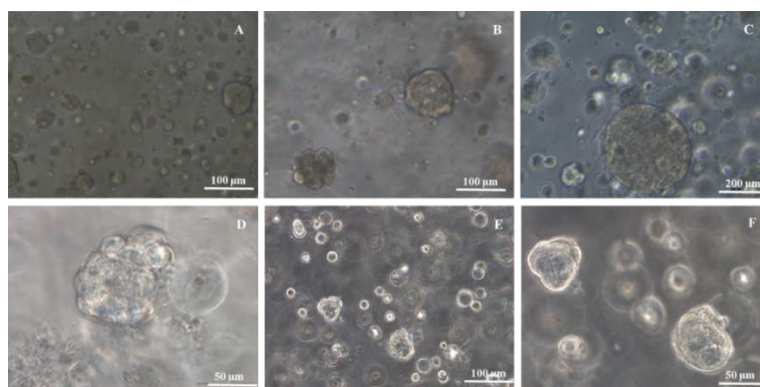


Figura 3. Crecimiento organoides tumorales de mama en distintos pases y días de crecimiento. A) Pase 0 día 2; B) Pase 0 día 6; C) Pase 1 día 5; D) Pase 1 día 10; E) Pase 2 día 6; F) Pase 2 día 6.

La Figura 3 muestra los cambios de tamaño y morfología en los organoides generados desde tejido tumoral de mama a distintos pases y tiempos de cultivo. Como puede observarse en las imágenes, tanto el pase como el tiempo de cultivo influyen en el tamaño y en el grado de diferenciación celular. La comparativa entre las imágenes mostradas revela una notable diferencia entre la imagen A y la imagen F. La imagen A (pase 0, día 2) muestra numerosas células individuales que todavía no han formado organoides. En cambio, en la imagen B (pase 0, día 6) aparece un número mucho menor de células individuales y organoides de mayor tamaño. La imagen F (pase 2, día 6) muestra estructuras compactas formadas que se corresponden a los organoides tumorales de

mama formados, además, no se observan células individuales en el cultivo, sino organoides de mayor o menor tamaño.

Dekkers et al.(27) proponen una clasificación en cuatro tipos de organoides basada en la morfología de los mismos: organoides sólidos, organoides en racimo, organoides mixtos y organoides císticos. Tres de los cuatro tipos de organoides están representados en la muestra, siendo los organoides sólidos (imagen F) los más abundantes, seguidos por los organoides en racimo (imagen B) y los organoides mixtos (imagen D). No se encontraron organoides císticos en el cultivo.

La caracterización expuesta a continuación permitió completar la información de los organoides.

5.2. Caracterización morfológica de organoides tumorales de mama mediante tinción histoquímica

Para la correcta caracterización morfológica de los organoides tumorales de mama se puso a punto la técnica de inclusión en parafina y posterior tinción con Hematoxilina/Eosina. Puesto que los pellets obtenidos eran de un tamaño muy reducido se utilizaron Eppendorf de 5 mL con el objetivo de obtener pellets más compactos. El paso del pellet al cassette histológico fue uno de los puntos críticos. En ocasiones hubo pérdida de muestra en el proceso de inclusión del pellet en el bloque de parafina. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 4.

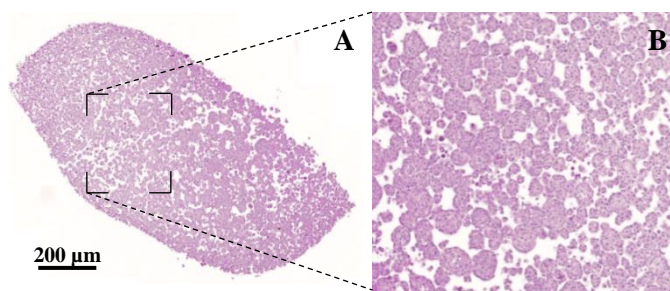


Figura 4. Tinción de Hematoxilina- Eosina de los organoides de mama tumorales pase 0 día 4. A) Tinción del pellet completo en el que observan todos los organoides; B) Imagen ampliada de la izquierda.

En la Figura 4 se pueden observar con claridad las distintas agrupaciones de células que conforman cada uno de los organoides presentes en la muestra. El análisis de las imágenes permite una aproximación al diagnóstico clínico(7). La conformación de los organoides tumorales de mama resultó ser circular y compacta, propia de carcinomas ductales(7). Esto hace suponer que la paciente de la que se ha obtenido la muestra presenta dicha patología, lo cual pudo comprobarse en los datos clínicos asociados a la muestra, puesto que el informe anatomopatológico de la muestra de origen concluyó que el diagnóstico era carcinoma ductal infiltrante.

Paralelamente, se llevó a cabo el cultivo de la línea celular SBDKR-3, una línea celular establecida de cáncer de mama. A partir de ella, se generaron esferoides (agregaciones celulares para la generación de estructuras 3D) que se sometieron a la misma caracterización. Como se puede ver en la Figura 5, los esferoides tienen una morfología muy similar a los organoides, lo que reitera la correcta formación de estos.

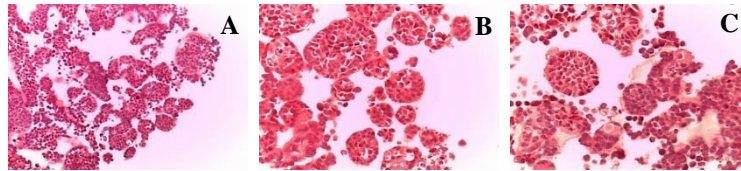


Figura 5. Esferoides derivados de la línea SBDKR-3 caracterizados mediante tinción de Hematoxilina-Eosina. La imagen A fue tomada con el objetivo de 10X y las imágenes B y C con el objetivo 20X.

5.3. Establecimiento, crecimiento y diferenciación del cultivo de organoides de colon

Para el establecimiento de organoides de colon, se partió de dos protocolos de referencia, ambos muy similares, el propuesto por Sato et al.(28) y el elaborado por Fujii et al.(12). En primer lugar, se realizó una combinación de ambos con pequeñas modificaciones en los tiempos de digestión y otros parámetros hasta obtener organoides sanos y tumorales con un crecimiento y desarrollo adecuados.

Al igual que se observó en los cultivos de organoides tumorales de mama, los factores limitantes se repitieron en este tipo de tisular, siendo los principales la correcta densidad celular y el tiempo en cultivo. Además, el medio de cultivo específico para los organoides de colon sano requería la adición de un factor más, el Wnt-3, factor implicado en la autorrenovación de las células madre localizadas en el fondo de las criptas intestinales aisladas.

La Figura 6 muestra la variación de tamaño en un cultivo de organoides tumorales de colon en función del pase y del día de crecimiento en el que se encontraban.

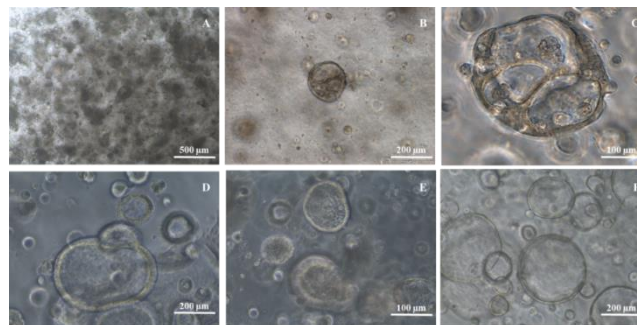


Figura 6. Crecimiento organoides tumorales de colon en varios pases y días. A) Pase 0 día 7; B) Pase 1 día 1; C) Pase 2 día 1; D) Pase 3 día 4; E) Pase 3 día 7; F) Pase 5 día 8.

Como puede observarse en la Figura 6, existe una notable diferencia entre la imagen A (pase 0, día 7) y la imagen F (pase 5, día 8). En el pase 0, día 7 se observa que el cultivo inicial contenía restos de la muestra de tejido y organoides de pequeño tamaño, que comenzaron a formarse en torno al día 7 de cultivo. En cuanto al proceso de derivación de organoides, se observó un patrón similar en la mayor parte de estos. Durante los primeros estadios podían apreciarse organoides con pequeños tabiques (imagen C) que acababan fusionándose para dar lugar a organoides císticos con un lumen claramente visible (imagen F). Las células individuales presentes en el cultivo disminuyeron a lo largo del proceso de manera paralela al crecimiento de los organoides.

Por su parte, la Figura 7 recoge el crecimiento de los organoides formados a partir de tejido sano de colon.

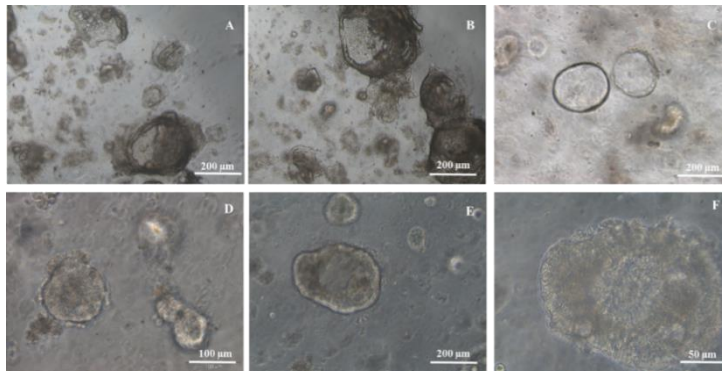


Figura 7. Crecimiento organoides sanos de colon. A) Pase 0 día 11; B) Pase 0 día 11; C) Pase 1 día 1; D) Pase 1 día 1; E) Pase 1 día 2; F) Pase 1 día 2.

Como se puede observar en las imágenes, la morfología de los organoides sanos de colon resultó ser muy distinta de la de los organoides tumorales. En este caso, si bien podían observarse algunos organoides con morfología cística, la mayoría presentaban una forma compacta al inicio de la siembra que fue derivando hacia estructuras similares al epitelio de colon a lo largo del tiempo cultivo. La formación de este tipo de epitelio es la esperada, puesto que el desarrollo de organoides sanos se realiza desde las criptas intestinales aisladas del tejido de colon.

En este tipo de muestra de partida, el número de organoides y el número de pases fue mayor en el caso de los organoides tumorales, lo que permitió caracterizarlos con mayor detalle.

5.4. Caracterización morfológica de organoides de colon mediante tinción histoquímica

Con el objetivo de realizar un estudio más detallado de los organoides generados se procedió a realizar varias tinciones de Hematoxilina-Eosina tanto en organoides sanos como en tumorales.

La Figura 8 recoge los resultados para los organoides tumorales obtenidos en las tinciones de Hematoxilina/Eosina en los distintos pases.

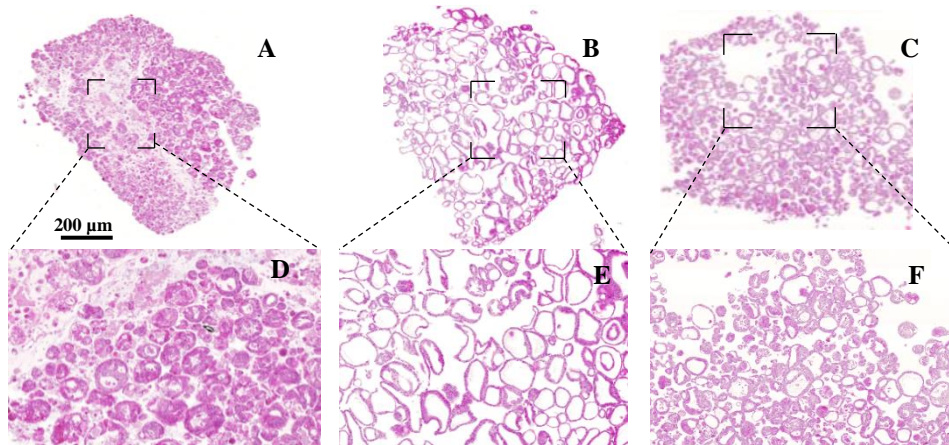


Figura 8. Tinción de Hematoxilina- Eosina de los organoides tumorales de colon. A) Pase 0 día 8; B) Pase 3 día 5; C) Pase 4 día 5; D) Imagen ampliada de la muestra A; E) Imagen ampliada de la muestra B; F) Imagen ampliada de la muestra C. Escala: 200 µm.

Los resultados de la tinción confirman la morfología observada en los organoides en cultivo. Los organoides en pase 0 (imagen A y D) tenían una morfología compacta y densa, que evolucionaba hacia una forma cística en los siguientes pases (B, C, E, F).

Si se comparan los resultados obtenidos con los de otros trabajos, como el realizado por van de Wetering et al.(8) puede concluirse que los organoides obtenidos son similares, apareciendo en la

mayoría lúmenes similares a la estructura tubular de los tumores primarios colorrectales estudiados. La estructura observada en los organoides es típica de los adenocarcinomas diferenciados, lo que de nuevo resultó estar en línea con el diagnóstico anatomopatológico del paciente, que resultó ser adenocarcinoma de colon.

Por otro lado, como puede observarse en la Figura 9, la tinción de Hematoxilina/Eosina de los organoides derivados de colon sano revelaron estructuras similares al epitelio intestinal. En las diferentes imágenes que componen la figura se puede apreciar la distribución de las células en forma de epitelio simple rectangular propia de células intestinales (29). Esta técnica nos permitió confirmar que el uso de medios con factores específicos permite la generación de organoides a partir de células adultas.

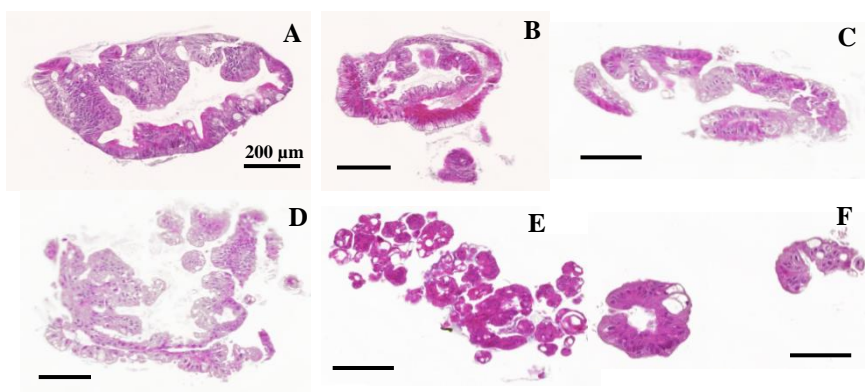


Figura 9. Tinción de Hematoxilina-Eosina de los organoides sanos de colon. A) Pase 0 día 11; B) Pase 0 día 11; C) Pase 2 día 11; D) Pase 2 día 11; E) Pase 3 día 9; F.) Pase 3 día 9. Escala: 200 μm .

Las imágenes observadas en la figura presentan una morfología muy similar a su tejido de origen, quedando demostrado la capacidad de los organoides para recrear en miniatura los órganos de origen.

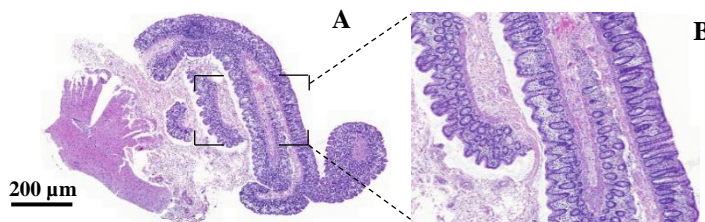


Figura 10. Tinción de Hematoxilina-Eosina del tejido de colon sano.

5.5. Caracterización morfológica de organoides de colon mediante microscopía confocal

Con la finalidad de llevar a cabo el análisis de la estructura tridimensional de los organoides, se recurrió al método de tinción con fluorocromos para su visualización por microscopía confocal. Como se detalla en el apartado Materiales y Métodos, se seleccionaron como marcadores la faloidina (unión a las fibras de actinas del citoesqueleto) y el DAPI (marcador con afinidad por las regiones ricas en A y T del DNA nuclear).

La tinción y posterior visualización se realizó en los organoides de colon tumoral (Figura 11) y en los de riñón sanos.

Las imágenes mostradas en la Figura 11 guardan cierta similitud con las encontradas en la Figura 2 del artículo de Fujii et al.(12) compartiendo una estructura 3D muy similar.

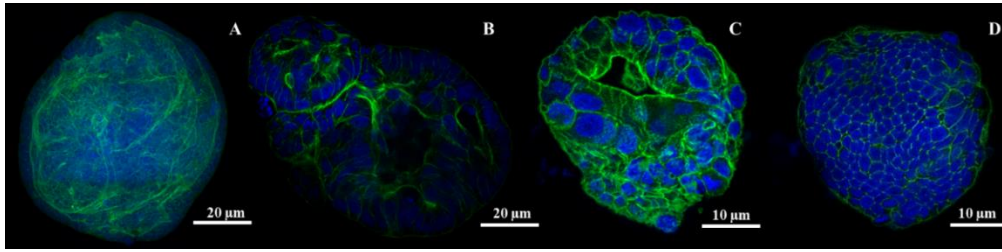


Figura 11. Imágenes de microscopía confocal de organoides tumorales de colon (Proyección máxima). Núcleos (DAPI (azul)) y actina citoplasmática (faloidina (verde)). A, B, C, D) Pase 1 día 6.

5.6. Establecimiento, crecimiento y diferenciación del cultivo de organoides de riñón

A diferencia de los dos casos anteriores, el crecimiento y desarrollo de los organoides tumorales de riñón resultó ser más lento que el de los organoides sanos, obteniéndose pocos organoides y de un tamaño menor. Este resultado es coincidente con lo ya publicado, como se mencionó en el apartado 2.2.3 y podría deberse a la presencia de abundantes divisiones mitóticas erróneas que impiden la progresión del crecimiento celular(12). Además, el número de células en la muestra de partida no fue muy alto, lo que podría condicionar las interacciones célula-célula y con ello inhibir la formación de organoides(14) (Figura 12).

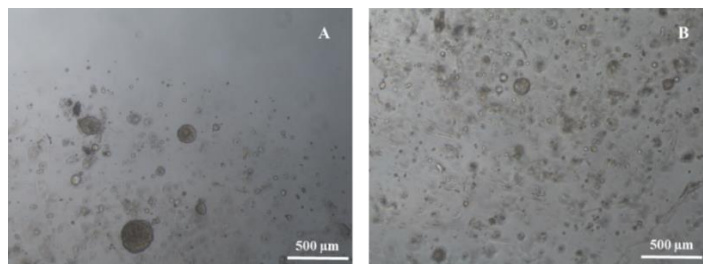


Figura 12. Crecimiento organoides tumorales de riñón. A y B) Pase 2 día 4.

Como se observa en la Figura 12, la presencia de células individuales era elevada, de manera inversa a la formación de organoides. Por el contrario, se obtuvo un elevado número de organoides sanos de riñón, con tamaño y morfología definida sobre los que pudieron aplicarse diferentes técnicas de caracterización. Además, se consiguió mantener el cultivo durante un tiempo prolongado, llegando a alcanzar el sexto pase en algunas de las muestras, en las cuales los organoides se mantuvieron hasta 4-5 semanas en cultivo. La Figura 13 recoge los resultados obtenidos.

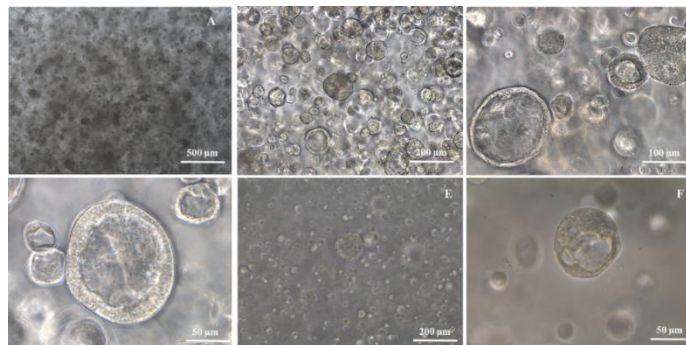


Figura 13. Crecimiento organoides sanos de riñón. A) Pase 0 día 7; B) Pase 2 día 6; C) Pase 2 día 6; D) Pase 2 día 6; E) Pase 3 día 1(muestra descongelada); F) Pase 3 día 1 (muestra descongelada).

Los organoides obtenidos resultaron ser un grupo heterogéneo con dos morfologías claramente diferenciadas, una más sólida, formada por un conjunto compacto de células y otra con distribución cística, organizándose las células en forma de aro.

Esta diferencia conformacional se puede explicar a través de la diversidad estructural del riñón. Aquellos organoides que tienen una forma más cística se denominan “tubuloides” y se asocian habitualmente a regiones del túbulo proximal, así como al asa de Henle. Por otro lado, las conformaciones más compactas se asocian a zonas de la cápsula de Bowman y al glomérulo(13).

Para comprobar la variabilidad de los organoides tras la congelación se descongelaron y cultivaron organoides tumorales de riñón. Como se observa en imágenes E y F de la Figura 13 la congelación no afectó a la morfología de los organoides, que se mantuvieron en cultivo durante varios pases tras la congelación y volvieron a congelarse de nuevo. Este punto resulta crítico en el desarrollo de Biobancos de organoides.

5.7. Caracterización morfológica de organoides de riñón mediante tinción histoquímica

En el caso de los organoides de riñón, las tinciones de Hematoxilina/Eosina solo se llevaron a cabo en los organoides sanos. Los resultados de la caracterización mediante esta técnica se recogen en la Figura 14.

Los resultados obtenidos se pueden comparar con el tejido del órgano de origen para observar su semejanza (Figura 15).

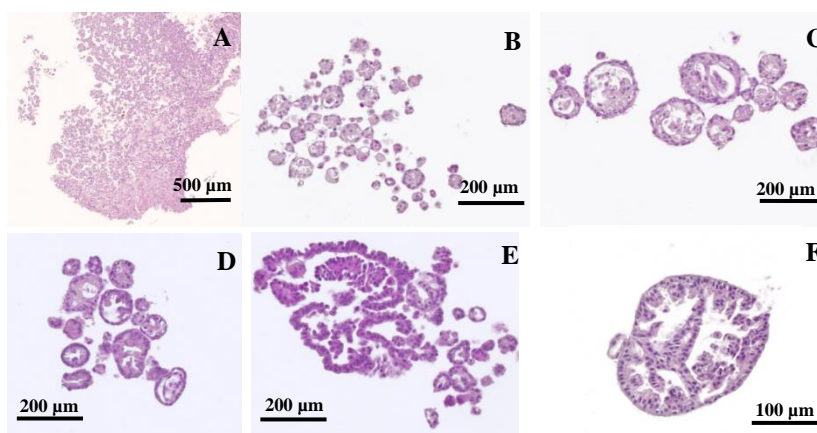


Figura 14. Tinción de Hematoxilina- Eosina de los organoides de riñón sano del paciente 1. A) Pase 0 día 7; B) Pase 1 día 3; C) Pase 1 día 3; D) Pase 1 día 7; E) Pase 1 día 7; F) Pase 2 día 7.

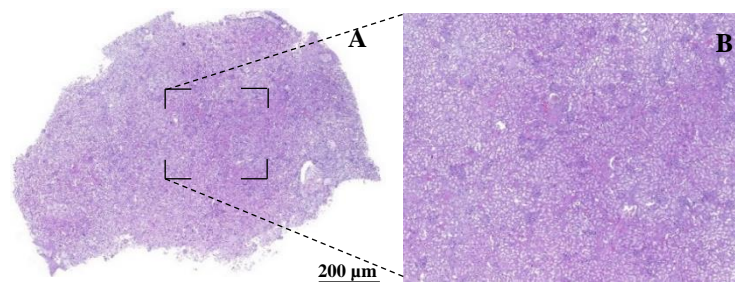


Figura 15. Tinción de Hematoxilina-Eosina de tejido de riñón sano.

El rendimiento de la derivación de organoides desde tejido renal fue alto, ya que se consiguieron organoides de dos pacientes distintos y pudieron mantenerse en cultivo hasta pase 6, conservándose muestras congeladas de cada uno de los pases.

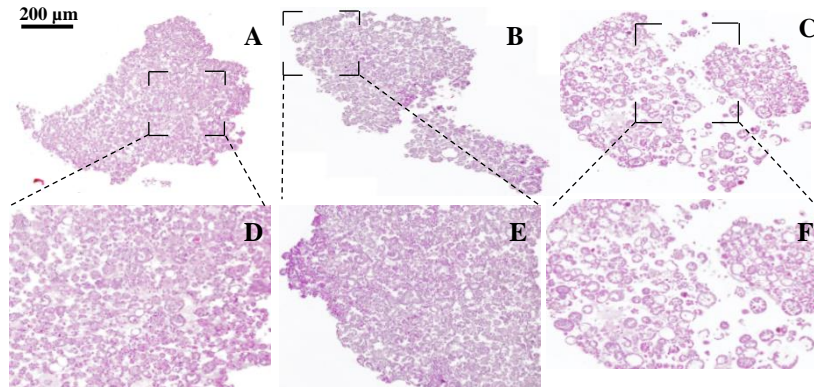


Figura 16. Tinción de Hematoxilina- Eosina de los organoides de riñón sano del paciente 2. A) Pase 0 día 5; B) Pase 0 día 5; C) Pase 3 día 7; D) Pase 3 día 7; E) Pase 6 día 7; F) Pase 6 día 7. Escala: 200 μm .

En ambos pacientes se observaron organoides con distinta morfología, siendo algunos de ellos totalmente císticos, con células dispuestas en forma de epitelio simple plano. Sin embargo, en otros organoides aparecen protuberancias hacia interior del lumen. Publicaciones anteriores han demostrado que, una morfología totalmente cística corresponde a organoides derivados de la rama descendente delgada del asa del Henle, mientras que los que muestran protuberancias hacia el interior se asocian al túbulo proximal y al conducto colector(13).

5.8. Caracterización morfológica de organoides de riñón mediante microscopía confocal

Con el objetivo de observar con más detalle la estructura tridimensional de este tipo de organoides, se siguió el protocolo de tinción con DAPI y faloidina anteriormente mencionado. La muestra para llevar a cabo el ensayo fueron organoides en pase 3 y cultivados 10 días después del pase. De esta forma se aseguró el tiempo suficiente de cultivo para que los organoides adquirieran estructuras definidas y representativas del tipo tisular. El resultado demostró de nuevo la heterogeneidad de los organoides resultantes (Figura 17).

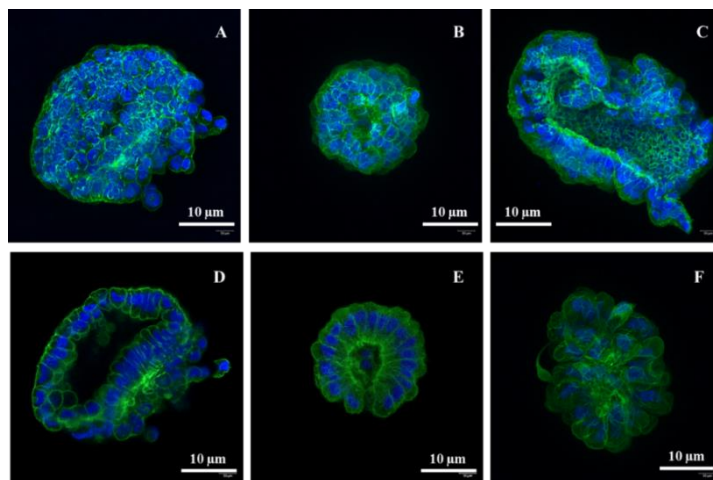


Figura 17. Imágenes de microscopía confocal de organoides derivados de tejido renal sano (pase 3, día 10). Núcleos en azul (DAPI) y actina citoplasmática en verde (faloidina-488).

En función de la morfología observada puede atribuirse a cada organoide un origen dentro de la estructura renal. Según indican Grassi et al.(14), los organoides C y F podrían considerarse organoides maduros bien estructurados, mientras que los organoides de la imagen D mostrarían la conformación cística característica de los “tubuloides”. Por su parte, las imágenes A y B ejemplificarían organoides compactos. De nuevo, este tipo de caracterización ha permitido confirmar la capacidad de los organoides para recrear “tejidos en miniatura” a partir de células adultas.

5.9. Caracterización genética de organoides sanos de riñón

El análisis de expresión de genes específicos del tejido de origen es importante para confirmar que los organoides formados son realmente estructuras derivadas del tejido de partida. En este caso, dada la diversidad morfológica observada, se analizaron varios genes específicos de las distintas partes de la nefrona.

Se tomaron muestras de cada uno de los pases cultivados con el objetivo de estudiar la evolución de la expresión génica. La Tabla 1, se recoge los genes seleccionados para el estudio, su función y si su expresión fue detectada o no en la RT-PCR realizada.

La ausencia de expresión del gen específico del túbulo colector (AQP2) en todas las muestras, nos permitió concluir que esta parte de la nefrona no estaba presente en los organoides cultivados.

En la mayoría de los genes estudiados no se encontraron diferencias entre la expresión en tejido primario y los organoides, a excepción de los genes THP, NPHS1 y WT1, los cuales estaban expresados en estadios tempranos (pase 0 y pase 1), mientras que su expresión desaparecía en el resto de los pases. THP codifica una glucoproteína del asa de Henle. El gen NPHS1 es un marcador propio del glomérulo. Por último, el gen WT1 es un marcador de células progenitoras y, su pérdida de expresión podría estar justificada con la diferenciación celular que se va produciendo durante el cultivo(30–32).

Se encontró expresión de genes propios del túbulo contorneado proximal y del túbulo contorneado distal (Megalina, DPP4, SGLT2, APN, GGT1, NCC). Por otro lado, la única diferencia encontrada en la expresión en organoides renales sanos frente a organoides tumorales fue la ausencia de expresión del gen NKCC2 en los organoides tumorales.

5.10. Generación de un Biobanco de organoides

La realización de este trabajo ha posibilitado el inicio de la generación de una biblioteca de organoides tanto sanos como tumorales de tejido de mama, colon y riñón dentro del BSSA.

La aparición de estos Biobancos de organoides es de gran interés para la investigación biomédica, ya que este modelo de cultivo en 3D posee un amplio abanico de aplicaciones, a la vez que solventa alguna de las limitaciones del cultivo en 2D y permite un acercamiento cada vez más real a la situación *in vivo*.

Actualmente, el BSSA dispone de 14 muestras de organoides sanos de riñón de dos pacientes, 6 muestras de organoides tumorales de riñón de un donante, 11 muestras de organoides tumorales de colon de un donante y 3 muestras de organoides tumorales de mama de tres pacientes. Uno de los principales objetivos del BSSA es ampliar el número de organoides disponibles, así como aumentar los tejidos de procedencia.

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden extraer una serie de conclusiones:

- Las condiciones utilizadas para la siembra y generación de organoides fueron óptimas en la mayoría de los casos, obteniéndose buenos resultados en los cultivos.
- Los organoides de tejido sano presentan homología morfológica con los tejidos de origen.
- Los organoides tumorales también presentan homología morfológica siendo coincidentes con el diagnóstico realizado por un anatomopatólogo.
- Los organoides de riñón presentan un patrón de expresión génica muy similar al obtenido de tejido renal.
- La criopreservación de organoides de pequeño tamaño en Recovery Cell Culture Freezing Medium en N₂ líquido (-196 °C) conserva su viabilidad celular, permitiendo de esta forma su almacenaje.

Conclusions

From the results obtained in the present work, a series of conclusions can be extracted:

- The conditions used for the seeding and generation of organoids were optimal in most cases, obtaining good results from the cultures.
- The organoids from healthy tissue show morphological homology with the tissues of origin.
- The tumour organoids also show morphological homology, coinciding with the diagnostic made by an anatomopathologist.
- In the case of kidney organoids, a gene expression pattern very similar to that obtained from healthy tissue could be observed.
- Cryopreservation of small organoids in Recovery Cell Culture Freezing Medium in liquid N₂ (-196 °C) preserves their cell viability, allowing them to be stored.

Tabla 1. Genes analizados en diferentes cultivos de organoides sanos de riñón mediante RT-PCR.

Gen	Función	Muestras									
		TU22002N					TU22012N				
		P5 d8	P5 d10	P6 d9	P7 d4	P7 d7	P0 d7	P1 d6	P3 d7	P4 d5	TU22012T P2 d7
Megalina	Glucoproteína transmembrana del túbulo contorneado proximal	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
KSP- Cadherina	Proteínas estructurales específicas de riñón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DPP4	Receptor de glicoproteína de superficie celular expresado en el túbulo proximal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
THP	Glucoproteína del asa de Henle	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
aSMA	Proteína contráctil en miofibroblastos (desdiferenciación)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SGLT2	Transportador de glucosa dependiente de sodio de los tubulos proximales	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
APN	Receptor de péptidos NGR del túbulo proximal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAPDH	Enzima catalizadora del primer paso de la glucólisis (control endógeno)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GGT1	γ -glutamyltransferasa de tipo I presente en túbulo proximal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AQP2	Canal específico para el agua de las membranas plasmáticas del conducto colector renal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NKCC2	Cotransportador renal de iones de Na ⁺ , K ⁺ y Cl ⁻ que media la reabsorción transepitelial de NaCl en la rama ascendente gruesa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
NCC	Cotransportador sodio-cloro (NCC) en el túbulo distal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NGAL	Proteína de tráfico de hierro involucrada en el desarrollo renal (marcador de daño)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Ki67	Marcador de proliferación	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
KIM1	Proteína tubular transmembrana marcador de daño	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
PAX8	Proteína nuclear implicada en el desarrollo de genes específicos (marcador de pluripotencia)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PROM1	Glicoproteína transmembrana expresada en células madre adultas para inhibir la diferenciación (marcador de pluripotencia)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PODXL	Participa en la formación de la luz apical durante la tubulogénesis renal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NPHS1	Proteína con función en la barrera de filtración glomerular renal y regula la permeabilidad vascular glomerular	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
SOX9	Controla la ramificación epitelial durante el desarrollo renal (marcador de pluripotencia)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WT1	Papel esencial para el desarrollo del sistema urogenital (marcador de progenitoras)	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

7. Referencias

1. Romero Romero L, Patiño González VE. Qué es el cáncer? Ra Rió Guendaruyubi. 2021;5(13):6–22.
2. Las cifras del cáncer en España. 2022 [Internet]. 2022. 1–38 p. Available from: https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.pdf
3. Corró C, Novellasdemunt L, Li XVSW. Making Cell Culture More Physiological A brief history of organoids. 2022;
4. Kaushik G, Ponnusamy MP, Batra SK. Concise Review: Current Status of Three-Dimensional Organoids as Preclinical Models. *Stem Cells*. 2018;36(9):1329–40.
5. Experimentación DELA, Animales CON. Artículo de Revisión. 2016;33(2):288–99.
6. Method of the Year 2017: Organoids. *Nat Methods*. 2018;15(1):1.
7. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* [Internet]. 2018;172(1–2):373–386.e10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010>
8. Wetering M Van De, Francies HE, Garnett MJ, Wetering M Van De, Francies HE, Francis JM, et al. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients Resource Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell* [Internet]. 2015;161(4):933–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.053>
9. Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* [Internet]. 2016;165(7):1586–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>
10. Sato T, Clevers H. SnapShot: Growing Organoids from Stem Cells. *Cell* [Internet]. 2015;161(7):1700–1700.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.028>
11. Mazzucchelli S, Piccotti F, Allevi R, Truffi M, Sorrentino L, Russo L, et al. Establishment and Morphological Characterization of Patient-Derived Organoids from Breast Cancer. *Biol Proced Online*. 2019;21(1):1–13.
12. Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Nanki K, et al. Resource A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis Resource A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Stem Cell* [Internet]. 2016;18(6):827–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.003>
13. Schutgens F, Rookmaaker MB, Margaritis T, Rios A, Ammerlaan C, Jansen J, et al. urine for personalized disease modeling. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2019;37(March). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41587-019-0048-8>
14. Grassi L, Alfonsi R, Francescangeli F, Signore M, Angelis ML De, Addario A, et al. Organoids as a new model for improving regenerative medicine and cancer personalized therapy in renal diseases. 2019;
15. Bartfeld S, Bayram T, van de Wetering M, Huch M, Begthel H, Kujala P, et al. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology*. 2015 Jan;148(1):126–136.e6.
16. Huch M, Knoblich JA, Lutolf MP, Martinez-Arias A. The hope and the hype of organoid research. *Dev*. 2017;144(6):938–41.
17. Luo X, Fong ELS, Zhu C, Lin QXX, Xiong M, Li A, et al. Hydrogel-based colorectal

- cancer organoid co-culture models. *Acta Biomater.* 2021;132:461–72.
18. Tuveson D, Clevers H. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science* (80-). 2019;364(6444):952–5.
 19. Controlada NO. Política de calidad. 2008;
 20. Red Nacional de Biobancos. p. <https://www.isciiibiobanksbiomodels.es/>.
 21. Biobanco del Sistema de Salud de Aragón. p. <https://www.iacs.es/servicios/biobanco/>.
 22. Herpers B, Eppink B, James MI, Cortina C, Cañellas-Socias A, Boj SF, et al. Functional patient-derived organoid screenings identify MCLA-158 as a therapeutic EGFR × LGR5 bispecific antibody with efficacy in epithelial tumors. *Nat cancer.* 2022 Apr;3(4):418–36.
 23. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007;25(6):681–6.
 24. Cattaneo CM, Dijkstra KK, Fanchi LF, Kelderman S, Kaing S, van Rooij N, et al. Tumor organoid–T-cell coculture systems. *Nat Protoc [Internet].* 2020;15(1):15–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-019-0232-9>
 25. Dekkers JF, Alieva M, Wellens LM, Ariese HCR, Jamieson PR, Vonk AM, et al. High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids. *Nat Protoc [Internet].* 2019;14(6):1756–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-019-0160-8>
 26. Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol.* 1987;105(4):1473–8.
 27. Dekkers JF, van Vliet EJ, Sachs N, Rosenbluth JM, Kopper O, Rebel HG, et al. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids. *Nat Protoc [Internet].* 2021;16(4):1936–65. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00474-1>
 28. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van Den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett’s epithelium. *Gastroenterology.* 2011;141(5):1762–72.
 29. Welsch U, Sobotta J. *Histología.* 2008.
 30. El-Achkar TM, Wu XR, Rauchman M, McCracken R, Kiefer S, Dagher PC. Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2008;295(2):534–44.
 31. NPHS1. p. <https://www.uniprot.org/uniprot/O60500>.
 32. WT1. p. <https://www.uniprot.org/uniprot/P19544>.
 33. Fujii M, Matano M, Nanki K, Sato T. Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using electroporation. *Nat Protoc [Internet].* 2015;10(10):1474–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.088>