



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Manejo de técnicas de biopsia líquida, generación de
organoides y estudio de nuevas terapias en cáncer
colorrectal.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Ferreira Orero, Nerea

Tutor/a: Giraldo Reboloso, Esther

Cotutor/a externo: Tarazona Llaveró, Noelia

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

MANEJO DE TÉCNICAS DE BIOPSIA LÍQUIDA, GENERACIÓN DE ORGANOIDES Y ESTUDIO DE NUEVAS TERAPIAS EN CÁNCER COLORRECTAL

Resumen:

El cáncer colorrectal (CCR) representa una carga significativa para la salud pública, siendo la segunda causa principal de muertes por cáncer a nivel global, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud. Según diversas estadísticas, hay entre un 30 y 40% de pacientes que sufren recaída tras el tratamiento.

En la actualidad, se emplean biomarcadores moleculares como la inestabilidad de microsatélites (MSI), mutaciones en *BRAF/RAS* o amplificaciones en *HER2* para ofrecer opciones adicionales a los pacientes que experimentan recaídas. Se están explorando nuevos biomarcadores con la intención de transformar el pronóstico y facilitar terapias específicas. Entre estos, la biopsia líquida emerge como un método no invasivo en crecimiento, capaz de detectar mutaciones específicas en el ADN circulante tumoral (ADNct).

Focalizando el estudio en un biomarcador concreto, se investiga la expresión del gen *Factor de Transcripción Caudal tipo Homeobox 2 (CDX2)*, que codifica un factor de transcripción que regula la actividad de genes relacionados con el desarrollo y la diferenciación celular intestinal. Este gen es un biomarcador crucial ya que normalmente se expresa en las células del colon. Se ha observado que la pérdida de su expresión se correlaciona con un peor pronóstico en casos específicos de cáncer colorrectal. Esta pérdida compromete su función natural, perturbando la diferenciación celular y promoviendo así la progresión tumoral y la metástasis.

Asimismo, la disminución de *CDX2* se ha asociado con la resistencia a ciertos regímenes de quimioterapia, lo que resulta en un pronóstico menos favorable para los pacientes afectados. Por lo tanto, el uso de *CDX2* como biomarcador podría desempeñar un papel crucial en la individualización del tratamiento, permitiendo una selección más precisa de terapias basadas en las características de cada paciente. Esto incluye la capacidad de anticipar la eficacia de tratamientos como la quimioterapia y determinar si su aplicación sería beneficiosa en pacientes con un alto riesgo de recurrencia. Sin embargo, la clasificación de los pacientes con CCR según la presencia o ausencia del gen *CDX2* se ve dificultada por la variabilidad en su expresión dentro del tumor.

El objetivo principal de este estudio es, en primer lugar, establecer un modelo de organoides desde cero, como modelo de estudio del estado del gen *CDX2* y su reversión de expresión utilizando la tecnología de CRISPR/dCas9, que implica la fusión de dominios catalíticos de TET y DNMT. Posteriormente, se procederá con la validación de la expresión de *CDX2* en todos los modelos (basales y editados) tanto a nivel de ARNm, mediante qPCR, como a nivel de proteína, mediante Western Blot.

Además, se ha llevado a cabo un cribado farmacológico en los organoides de pacientes con presencia y ausencia de *CDX2*, utilizando algunos de los fármacos empleados en la práctica clínica del cáncer de colon, con el fin de observar diferencias en las respuestas.

Los resultados obtenidos en este trabajo reafirman las hipótesis planteadas sobre la relación entre *CDX2* y la resistencia a la quimioterapia, demostrando que una reversión en la expresión de *CDX2* en los organoides modelo implica un cambio en la respuesta a la quimioterapia.

Palabras clave: Cáncer colorrectal, *CDX2*, biopsia líquida, organoides, CRISPR/dCas9, biomarcadores, recaída.

Autora: Nerea Ferreira Orero

Tutora académica: Esther Giraldo Reboloso

Tutora: Noelia Tarazona Llaveró

Valencia, junio de 2024

MANAGEMENT OF LIQUID BIOPSY TECHNIQUES, ORGANOID GENERATION AND STUDY OF NOVEL THERAPIES IN COLORECTAL CANCER

Abstract

Colorectal cancer (CRC) represents a significant public health burden, being the second leading cause of cancer deaths globally, according to the World Health Organization (WHO). Several statistics indicate that between 30 and 40% of patients experience a relapse after treatment.

Currently, molecular biomarkers such as microsatellite instability (MSI), *BRAF/RAS* mutations, or *HER2* amplifications are used to provide additional options for patients experiencing relapses. New biomarkers are being explored with the aim of transforming prognosis and facilitating targeted therapies. Among these, liquid biopsy is emerging as a growing non-invasive method capable of detecting specific mutations in circulating tumor DNA (ctDNA).

Focusing the study on a specific biomarker, it is being investigated the expression of the *Caudal-related Homeobox 2 (CDX2)* gene, which encodes a transcription factor that regulates the activity of genes related to intestinal cell development and differentiation. This gene is a crucial biomarker as it is normally expressed in colon cells. It has been observed that the loss of its expression correlates with a poorer prognosis in specific cases of colorectal cancer. This loss compromises its natural function, disrupting cell differentiation and thus promoting tumour progression and metastasis.

Moreover, the reduction of *CDX2* has been associated with resistance to certain chemotherapy regimens, resulting in a less favourable prognosis for affected patients. Therefore, the use of *CDX2* as a biomarker could play a crucial role in the individualization of treatment, allowing for a more precise selection of therapies based on the characteristics of each patient. This includes the ability to anticipate the efficacy of treatments such as chemotherapy and determine whether its application would be beneficial in patients at high risk of recurrence. However, the classification of CRC patients according to the presence or absence of the *CDX2* gene is complicated by the variability in its expression within the tumour.

The main objective of this study is, first, to establish an organoid model from scratch, as a study model of the *CDX2* gene status and its expression reversion using CRISPR/dCas9 technology, which involves the fusion of catalytic domains of TET and DNMT. Subsequently, *CDX2* expression will be validated in all models (basal and reverted) at both the mRNA level, using qPCR, and at the protein level, using Western Blot.

In addition, a pharmacological screening has been carried out in patient-derived organoids with and without *CDX2*, using some of the drugs employed in clinical practice for colon cancer, to observe differences in responses.

The results obtained in this study reaffirm the hypotheses presented on the relationship between *CDX2* and chemotherapy resistance, demonstrating that a reversal in *CDX2* expression in model organoids also implies a change in the response to chemotherapy.

Keywords: Colorectal cancer, *CDX2*, liquid biopsy, organoids, CRISPR/dCas9, biomarkers, relapse.

Author: Nerea Ferreira Orero

Academic tutor: Esther Giraldo Reboloso

Tutor: Noelia Tarazona Llaveró

Valencia, June de 2024

MANEIG DE TÈCNIQUES DE BIÒPSIA LÍQUIDA, GENERACIÓ DE ORGANOIDES I ESTUDI DE NOVES TERÀPIES EN CÀNCER COLORECTAL

Resum:

El càncer colorectal (CCR) representa una càrrega significativa per a la salut pública, sent la segona causa principal de morts per càncer a nivell global, d'acord amb l'Organització Mundial de la Salut. Segons diverses estadístiques, hi ha entre un 30 i 40% de pacients que pateixen recaiguda després del tractament.

En l'actualitat, s'emprenen biomarcadors moleculars com la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI), mutacions en BRAF/RAS o amplificacions en HER2 per a oferir opcions addicionals als pacients que experimenten recaigudes. S'estan explorant nous biomarcadors amb la intenció de transformar el pronòstic i facilitar teràpies específiques. Entre estos, la biòpsia líquida emergeix com un mètode no invasiu en creixement, capaç de detectar mutacions específiques en l'ADN circulant tumoral (ADNct).

Focalitzant l'estudi en un biomarcador concret, s'investiga l'expressió del gen *Factor de Transcripcin Caudal tipus Homeobox 2 (CDX2)*, que codifica un factor de transcripció que regula l'activitat de gens relacionats amb el desenvolupament i la diferenciació cel·lular intestinal. Este gen és un biomarcador crucial ja que normalment s'expressa en les cèl·lules del còlon. S'ha observat que la pèrdua de la seua expressió es correlaciona amb un pitjor pronòstic en casos específics de càncer colorectal. Esta pèrdua compromet la seua funció natural, pertorbant la diferenciació cel·lular i promovent així la progressió tumoral i la metàstasi.

Així mateix, la disminució de *CDX2* s'ha associat amb la resistència a uns certs règims de quimioteràpia, la qual cosa resulta en un pronòstic menys favorable per als pacients afectats. Per tant, l'ús de *CDX2* com biomarcador podria exercir un paper crucial en la individualització del tractament, permetent una selecció més precisa de teràpies basades en les característiques de cada pacient. Això inclou la capacitat d'anticipar l'eficàcia de tractaments com la quimioteràpia i determinar si la seua aplicació seria beneficiosa en pacients amb un alt risc de recurrència. No obstant això, la classificació dels pacients amb CCR segons la presència o absència del gen *CDX2* es veu dificultada per la variabilitat en la seua expressió dins del tumor.

L'objectiu principal d'aquest estudi és, en primer lloc, establir un model d'organoides des de zero, com a model d'estudi de l'estat del gen *CDX2* i la seua reversió d'expressió utilitzant la tecnologia de CRISPR/dCas9, que implica la fusió de dominis catalítics de TET i DNMT. Posteriorment, es procedirà amb la validació de l'expressió de *CDX2* en tots els models (basals i editats) tant a nivell de ARNm, mitjançant qPCR, com a nivell de proteïna, mitjançant Western Blot.

A més, s'ha dut a terme un cribratge farmacològic en els organoides de pacients amb presència i absència de *CDX2*, utilitzant alguns dels fàrmacs emprats en la pràctica clínica del càncer de còlon, amb la finalitat d'observar diferències en les respostes.

Els resultats obtinguts en este treball reafirmen les hipòtesis plantejades sobre la relació entre *CDX2* i la resistència a la quimioteràpia, demostrant que una reversió en l'expressió de *CDX2* en els organoides model implica un canvi en la resposta a la quimioteràpia.

Paraules clau: Càncer colorectal, *CDX2*, biòpsia líquida, organoides, CRISPR/dCas9, biomarcadors, recaiguda.

Autora: Nerea Ferreira Orero

Tutora acadèmica: Esther Giraldo Reboloso

Tutora: Noelia Tarazona Llaveró

València, Juny de 2024

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres, a mis modelos a seguir, que lo han dado todo por mi y por que consiga todos mis objetivos en la vida.

También quiero agradecer a INCLIVA, concretamente a Andrés Cervantes y Noelia Tarazona por darme la oportunidad de realizar mi trabajo en sus laboratorios. Gracias a todo el grupo del Lab3 por su acogida y ayuda durante toda mi estancia, a Paco por dirigirme durante el proceso y en especial a Elena, que ha estado a mi lado en todo momento, dedicándome más tiempo y paciencia del que debía y ayudándome de corazón para que me llevara algo más que un trabajo de esta experiencia.

Por último, agradecer a todas aquellas personas que me han apoyado mental y emocionalmente durante estos meses. A Laura, Irene y Nuria, por aguantar mis mil dudas y por acompañarme en algunas de las experiencias más bonitas de mi vida. A mi familia de Daimuz, que siempre sabe cómo sacarme una sonrisa en los peores momentos. A Tom, Giorgia y Diana, que a pesar de la distancia me han hecho el camino un poco más fácil. A Ivana, por entenderme día a día a pesar de lo complicado que es. Y a mi compañera de vida, Carla, con la que he compartido estos cuatro años en los que hemos podido crecer juntas.

Gracias a todos aquellos que han aportado su granito de arena para que yo haya llegado hasta aquí.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Contexto del Cáncer Colorrectal	1
1.2 La Medicina de Precisión	3
1.2.1 Organoides	4
1.2.2 Biopsia Líquida	5
1.3 Caso de Estudio: CDX2 en CCR	6
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1 Recogida y Establecimiento de Organoides a Partir de Tejido de Colon	9
3.1.1 Recogida de Muestras	9
3.1.2 Disgregación del Tejido	11
3.1.3 Contaje Celular y Siembra	12
3.1.4 Medios de Cultivo	12
3.2 Seguimiento de los Organoides	13
3.2.1 Pase de los Organoides	14
3.2.2 Congelamiento y Almacenamiento de los Organoides	14
3.3 Ensayos de Drogas	14
3.3.1 Disgregación del Organoides en Célula Única y Plaqueo	14
3.3.2 Adición del Fármaco	16
3.3.3 Revelado	16
3.4 Inclusión de Organoides en Parafina	16
3.5 Edición Génica Mediante CRISPR/dCas9	17
3.6 Validación del CRISPR/dCas9	19
3.6.1 Validación a Nivel de Transcripción: qPCR	19
3.6.2 Validación a Nivel de Traducción: Western Blot	20
3.7 Biopsia Líquida	22
3.7.1 Aislamiento del Plasma	22
3.7.2 Extracción de cfDNA	23
3.7.3 Análisis del cfDNA Obtenido de Biopsia Líquida	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Establecimiento y Mantenimiento de Cultivos de Organoides 3D Derivados de Pacientes con Cáncer Colorrectal	24
4.2 Inclusión en Parafina e Inmunohistoquímica de los Organoides Basales	26
4.3 Ensayo de Sensibilidad a Fármacos de Organoides Basales Derivados de Tumores de Colon	27

4.4 Validación de la Edición Génica Mediante CRISPR/dCas9 en los Organoides	29
4.4.1 Estudio de la Expresión De ARNm por qPCR	29
4.4.2 Estudio de la Traducción de Proteínas por WB	31
4.5 Ensayo de Sensibilidad a Fármacos de Organoides Editados Genéticamente Derivados de Tumores de Colon	32
5. CONCLUSIÓN	34
6. REFERENCIAS	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de incidencia estandarizada por edad a nivel mundial por cada 100,000 habitantes en 2022.....	1
Figura 2. Representación en números absolutos de cáncer en 2022.....	2
Figura 3. Pasos seguidos para el empleo de los organoides en el estudio presente y el análisis de la relación del gen CDX2 con la resistencia a fármacos quimioterapéuticos	10
Figura 4. Organización de la P96W para la realización de un ensayo de fármacos a diferentes concentraciones	15
Figura 5. Composición de los vectores empleados en la edición génica con CRISPR/dCas9	18
Figura 6. Generación y mantenimiento de la línea de organoides CNO219, establecidos a partir de tejido de colon normal del paciente 219	24
Figura 7. Tinción con inmunohistoquímica para el marcaje de proteínas CDX2 en los cortes histológicos	26
Figura 8. Curva de sensibilidad de varias líneas de organoides al tratamiento combinado de 5-Fluorouracilo y oxaliplatino	28
Figura 9. Representación gráfica de la expresión de CDX2 relativa a la β -actina en los distintos organoides frente a sus diferentes condiciones tras la edición génica	30
Figura 10. Western Blot de proteína CDX2 y actina en las diferentes líneas de organoides.....	31
Figura 11. Curvas de sensibilidad de las líneas de organoides ante el tratamiento combinado de 5-Fluorouracilo y oxaliplatino	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.....	IV
Tabla 2. Composición del Medio Basal utilizado en el seguimiento de organoides y formación del Medio Completo	12
<i>Tabla 3. Composición del Medio Comercial para el establecimiento y crecimiento de los organoides</i>	<i>13</i>
Tabla 4. Composición del Medio Completo para el establecimiento y crecimiento de organoides.....	13
Tabla 5. Composición específica de las soluciones A y B para los mixes de edición génica con CRISRP/Cas9 con objeto de metilación o desmetilación	17
Tabla 6. Programa del termociclador para la retrotranscripción	19
Tabla 7. Contenido de los mixes principales para <i>ACTINA</i> o <i>CDX2</i>	20
Tabla 8. Programa del termociclador para qPCR	20

OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE

Tabla 1. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico			X	
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras		X		
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables				X
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Breve Descripción de la Alineación del TFG con los ODS, Marcados en la Tabla Anterior, con un Grado Alto

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) se establecieron el 25 de septiembre de 2015. Se trata de un conjunto de objetivos globales que tienen como objetivo erradicar la pobreza, proteger al planeta y asegurar la prosperidad para todos a través de unas metas específicas con una fecha establecida en 2030 (Gamez, 2022).

Este trabajo se relaciona estrechamente con el ODS 3, que se refiere a la Salud y el Bienestar. La investigación realizada durante estos meses se enfoca en el uso de técnicas de vanguardia, como son los organoides y la biopsia líquida, aplicadas a la medicina de precisión. Estas metodologías ofrecen un avance significativo en la lucha contra el cáncer colorrectal, ya que permiten diagnósticos más tempranos y tratamientos personalizados, ajustados a las necesidades específicas de cada paciente.

La oncología de precisión, además de mejorar los resultados de las terapias a través de la selección de los pacientes más sensibles para ellas, mejora la calidad de vida de todos ellos al evitar los efectos secundarios innecesarios. A pesar de no estar completamente implantadas ya, resultan una revolución en cuanto al diagnóstico y tratamiento del cáncer de cara al futuro, tratando de promover una vida sana y el bienestar para la población. Asimismo, el diagnóstico y tratamiento temprano e individualizado podría llevar a un menor gasto de medicamentos por el estadio tardío de las enfermedades, pruebas de cribado más económicas y accesibles para países en desarrollo, y por tanto una reducción en los costes y en la saturación del sistema sanitario.

NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS

2D Bidimensional

3D Tridimensional

5-FU 5-Fluorouracilo

ADNc ADN Complementario

Alk4/5/7 Quinasa similar al receptor de activina 4/5/7

BME Matrigel

B-ME β -Mercaptoetanol

BMP3 Factor de proteína morfogenética 3

BRAF/RAS Oncogén viral de sarcoma murino v-Raf B1 / Oncogén viral de sarcoma de rata

BSA Albúmina sérica bovina

CCR Cáncer Colorrectal

CDX2 Factor de Transcripción Caudal tipo Homeobox 2

cfDNA ADN libre de células

CNO219 Organoide de Colon Normal 219

CRISPR/Cas9 Repetición palindrómica corta agrupada regularmente con proteína asociada a CRISPR 9

CRISPR/dCas9 Repetición palindrómica corta agrupada regularmente con proteína asociada a CRISPR 9 inactiva

CTCs Células Tumorales Circulantes

ctDNA ADN Tumoral Circulante

CTO122 Organoide de Colon Tumoral 122

CTO65 Organoide de Colon Tumoral 65

CTRL Control

dCas9 Proteína inactiva Cas9

ECM Matriz Extracelular

EDTA Ácido Etilendiaminotetraacético

EGF Factor de crecimiento epidérmico

EMT Transición Epitelio-Mesénquima

FGF Factor de crecimiento de los fibroblastos

GEN Genética

HE Hematoxilina-Eosina

HER2 Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

IHQ Inmunohistoquímica

INCLIVA Instituto de Investigación Sanitaria de Valencia

KRAS Oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten

LB Tampón Laemli

MB Medio Basal

MC Medio Completo

MDR1 Resistencia a múltiples fármacos 1

MRD Enfermedad Residual Mínima

NDRG4 Gen 4 regulado por N-Myc aguas abajo

ODS Objetivos Desarrollo Sostenible

PBS Tampón fosfato salino

PDO Organoide derivado de paciente

PFA Paraformaldehído

PGE2 Prostaglandina E2

qPCR Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RT Retrotranscripción

sgRNA ARN Guía de una sola cadena

ST Medio Comercial

TBS Solución salina tamponada con Tris

TBS-T Solución salina tamponada con Tris y Tween

TCGA Programa Atlas del Genoma del Cáncer

TFG- β Factor de crecimiento transformante beta

WB Western Blot

WNT Integración relacionada con Wingless

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto del Cáncer Colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más comunes en todo el mundo, solo superado por el cáncer de mama y de pulmón, afectando en un 72% de los casos al colon y en un 28% al recto. El CCR tiene un gran impacto sobre la sanidad pública debido a su alta incidencia y mortalidad, siendo la segunda causa de muerte en cuanto a cáncer se refiere, especialmente en países con altos niveles de desarrollo socioeconómico (Bray et al., 2024; Marcellinaro et al., 2023; World Health Organization, 2022). La incidencia de CCR varía considerablemente entre diferentes regiones del mundo, siendo más alta en Europa, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda, y más baja en África y Asia meridional (Fig. 1).

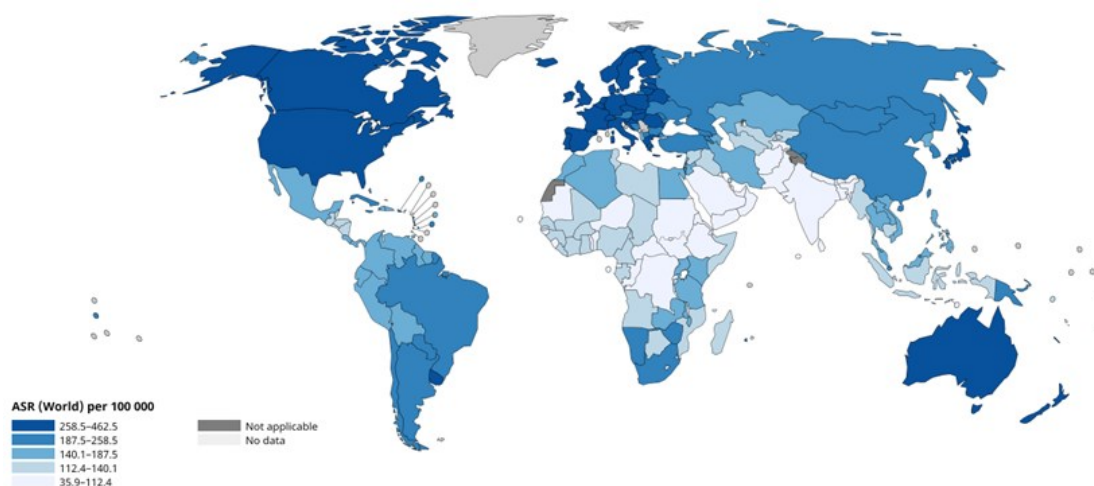


Figura 1. Tasa de incidencia estandarizada por edad a nivel mundial por cada 100,000 habitantes en 2022 (World Health Organization, 2022). La figura muestra la distribución de la incidencia del CCR en las diferentes regiones del mundo. Se observan zonas de mayor incidencia representadas por un azul más oscuro y zonas de menor incidencia representadas por un azul más claro.

Esta creciente incidencia en los países más desarrollados o incluso en desarrollo parece guardar relación con los factores dietéticos y ambientales. Principalmente, se atribuye al elevado consumo de carnes rojas y al aumento de hábitos de vida perjudiciales, como el sedentarismo, el consumo de alcohol o el tabaquismo. Además, en países con un menor desarrollo tecnológico, la detección de la enfermedad resulta más complicada debido a la falta de cribados de la misma. No obstante, la mortalidad asociada ha experimentado una disminución durante los últimos años, aunque esta reducción es cada vez es menos destacada.

En 2020 (Marcellinaro et al., 2023; World Health Organization, 2023), se estimaron más de 1.9 millones de nuevos casos de CCR y más de 930.000 muertes a nivel mundial, posicionándolo como la segunda causa principal de muerte por cáncer. En 2022 (Bray et al., 2024), la cifra se mantuvo similar, con aproximadamente 1.9 millones de casos (Fig. 2, derecha) y más de 903.000 muertes (Fig. 2, izquierda), lo cual muestra una ligera reducción en las muertes.

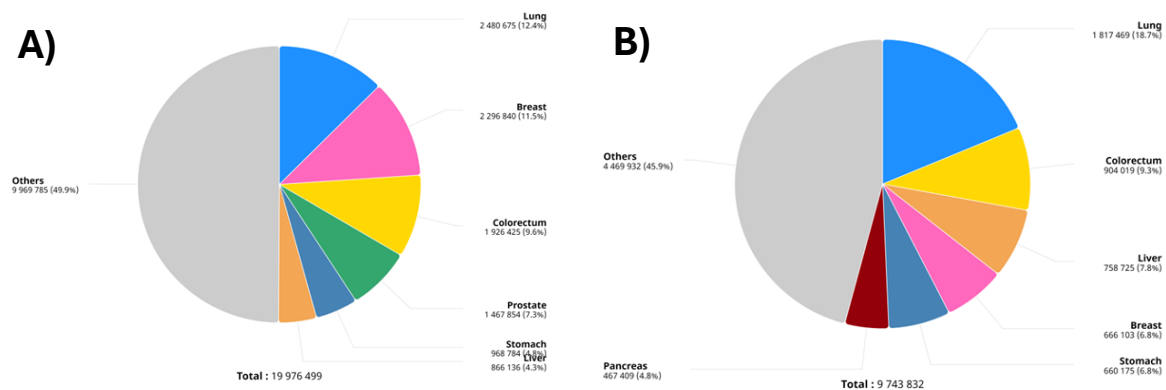


Figura 2. Representación en números absolutos de cáncer en 2022. **A,** La gráfica muestra incidencia de los diferentes cánceres, siendo el colorrectal el tercero más abundante. **B,** La gráfica muestra mortalidad de los diferentes cánceres, siendo el color rectal el segundo más relevante. (World Health Organization, 2022).

En los países desarrollados, la implementación de programas de cribado efectivos ha contribuido a la disminución de las tasas de incidencia y mortalidad del CCR. El pronóstico del paciente con CCR varía según el estado de la enfermedad al momento del diagnóstico. La detección temprana es crucial para mejorar las tasas de supervivencia, alcanzando actualmente un 65% para aquellos diagnosticados en etapas iniciales (Marcellinaro et al., 2023; World Health Organization, 2023).

Sin embargo, muchos países en vías de desarrollo enfrentan mayores dificultades para implementar programas de cribado debido a los altos costos que implican algunas de las pruebas como la colonoscopia. Como consecuencia, se están buscando alternativas de cribado no invasivas, más sencillas y económicas, que no solo pueden ser más accesibles para países con menos recursos, sino que también representarían un avance significativo para los países desarrollados, donde este problema también está presente.

La mortalidad por CCR también muestra disparidades significativas en función del género, la edad y el grupo racial. En general, los hombres tienen tasas de mortalidad un 43% más altas que las mujeres (Marcellinaro et al., 2023). Además, la mortalidad es mayor en pacientes mayores de 65 años, aunque se ha observado un preocupante aumento en la mortalidad entre los jóvenes (Marcellinaro et al., 2023).

Actualmente, existen algunos tratamientos generalizados contra el CCR como la quimioterapia con fármacos como la capecitabina y el oxaliplatino, ya sea en combinación o por separado, así como la radioterapia y la cirugía. Sin embargo, sigue siendo una de las mayores causas de muerte en el mundo, principalmente a causa de la metástasis (Sheng et al., 2018). La dificultad de su cura se debe principalmente a la resistencia intrínseca o adquirida a las diversas terapias.

El cáncer posee una gran heterogeneidad tanto a nivel genético, epigenético como metabólico, lo que hace que los tratamientos no sean efectivos en todos los pacientes (Sheng et al., 2018). De hecho, a pesar de existir terapias dirigidas a rutas concretas, en muchas ocasiones no son completamente exitosas. Esto es, en ocasiones, consecuencia de la enorme variabilidad entre pacientes, que consta de múltiples factores como la coexistencia de otras alteraciones moleculares, la expresión genética, la modificación de proteínas, el microambiente tumoral, la microbiota, la activación de rutas moleculares alternativas y otros mecanismos menos explorados (Papaccio et al.,

2022). Estos factores ocasionan esta diversidad de respuestas ante tratamientos específicos. La variabilidad entre clones dentro de un mismo tumor favorecido por la heterogeneidad intratumoral, promueve la aparición de clones resistentes al tratamiento adyuvante, permitiendo su proliferación y diseminación a otros tejidos generando metástasis.

En consecuencia, se ha visto que en el 30-40% de los pacientes de CCR que han sido intervenidos quirúrgicamente de un tumor primario han sufrido una recaída de la enfermedad (Cañellas-Socias et al., 2022; Purandare et al., 2010). La mayoría de estos casos ocurre en los dos primeros años tras la operación. Esta recaída normalmente se presenta como metástasis distante en hígado o pulmones o como locorregional en la pelvis o peritoneo, además del aumento de riesgo de un tumor secundario en el tracto colorrectal (Duineveld et al., 2016).

Tal y como ocurre en el diagnóstico de tumores primarios, se ha podido afirmar que la detección temprana de la recaída es muy importante para la efectividad de los tratamientos, pues un mayor número de metástasis empeora significativamente el pronóstico del paciente y cuanto antes sea diagnosticado, antes se puede frenar el avance de la enfermedad.

1.2 La Medicina de Precisión

La medicina de precisión representa un enfoque innovador en el tratamiento y prevención de enfermedades, que personaliza estrategias según las características únicas de cada paciente, considerando su genética, ambiente y estilo de vida. Este enfoque se basa en la toma de decisiones informadas por biomarcadores predictivos, indicadores de origen biológico que ofrecen una visión detallada de los mecanismos moleculares contribuyentes al crecimiento tumoral. Estos biomarcadores permiten identificar dianas terapéuticas específicas para cada paciente, adaptándose a su perfil único y mejorando así los resultados del tratamiento (Sheng et al., 2018; Tomasik et al., 2024; Tsimberidou et al., 2020).

En los últimos años se han identificado complejas características biológicas relacionadas con la carcinogénesis, lo que ha permitido optimizar las terapias anticancerígenas de forma individual. Los tratamientos han evolucionado de estar centrados en el tipo de tumor a ser guiados por perfiles genómicos, desplazando la histología del tumor y adaptándose de manera más precisa a las características específicas de cada caso.

En el contexto del CCR, la medicina de precisión ofrece la posibilidad de la caracterización y diagnóstico de la enfermedad mediante la detección de algunos marcadores específicos tales como mutaciones en *Oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten (KRAS)*, metilación aberrante de *Gen 4 regulado por N-Myc aguas abajo (NDRG4)* y metilación anormal en el *factor de proteína morfogenética 3 (BMP3)* (Ogunwobi et al., 2020).

Actualmente, la medicina de precisión emplea diversos modelos preclínicos, como ratones y organoides derivados de pacientes (PDOs), para identificar características genómicas y epigenómicas específicas, con el objetivo de determinar el tratamiento óptimo para cada paciente.

1.2.1 Organoides

La elección adecuada del modelo para estudiar las alteraciones específicas en diversas neoplasias, como el CCR, es crucial. El uso de cultivos *in vitro* permite someter a las células tumorigénicas a una variedad de pruebas y ensayos que proporcionan información esencial para su aplicación clínica en pacientes.

A pesar de que el modelo de cultivo primario celular bidimensional (2D) es simple y económico, presenta varias limitaciones que lo hace inadecuado. En primer lugar, no logra replicar las estructuras naturales de los tejidos o tumores, lo que resulta en una representación inexacta de las interacciones intercelulares y entre las células y el medio extracelular. Estas interconexiones son cruciales para muchos procesos involucrados en el cáncer, como la diferenciación celular, proliferación, viabilidad, expresión génica y proteica, así como el metabolismo de fármacos (Kapałczyńska et al., 2018).

Adicionalmente, el diseño bidimensional no permite a las células mantener su morfología y polaridad naturales, lo que altera la organización interna, secreción y señalización celular. En este modelo, las células tienen acceso ilimitado a nutrientes y oxígeno, a diferencia del entorno heterogéneo de un tumor *in vivo*, que presenta zonas internas más hipóxicas y menos irrigadas y zonas superficiales más nutridas y oxigenadas. Todo ello deriva en el cambio de la expresión génica y comportamiento bioquímico, lo cual conduce a unos resultados experimentales menos fiables (Kapałczyńska et al., 2018).

En respuesta a estas limitaciones, se han desarrollado modelos tridimensionales (3D), como los organoides, los cuales han revolucionado esta situación al lograr una mejor representación de las condiciones *in vivo*. Los organoides son estructuras microscópicas tridimensionales y autoorganizadas cultivadas a partir de células madre *in vitro*. Estos pueden derivarse de tejidos sanos y patológicos de pacientes y pueden ser cultivados durante un largo periodo de tiempo sin necesidad de perder su estabilidad genómica (Papaccio et al., 2022; Tuveson & Clevers, 2019).

En contraste con el cultivo 2D, los PDOs mantienen la morfología y polaridad celular, permitiendo así las interacciones tridimensionales con el entorno local, tal y como sucede en los tejidos naturales. De esta forma, se obtiene una mayor similitud de la expresión génica y del metabolismo. Se ha demostrado el mantenimiento de diversas características en comparación con el tejido original como por ejemplo los marcadores inmunohistoquímicos. Los organoides representan desde una perspectiva genómica, transcriptómica y proteica el perfil tumoral del paciente del que derivan (Papaccio et al., 2023). Asimismo, tienen la capacidad de ser ampliados mediante pases por lo que se pueden utilizar para cribados de fármacos o edición génica para el estudio del cáncer, y en concreto del CCR (Papaccio et al., 2022).

No obstante, el establecimiento y mantenimiento de los PDOs es complejo y requiere más conocimiento sobre las condiciones de cultivo adecuadas. Además, la ausencia del microambiente tumoral impide estudiar las interacciones entre las células epiteliales de los organoides y las células del sistema inmunológico, lo que dificulta la comprensión de los mecanismos inmuno-epiteliales. Asimismo, la falta de protocolos estandarizados y la escasez de artículos comparativos limitan la reproducibilidad y validación de los experimentos.

Los organoides se han empleado en diversos ensayos clínicos, como el estudio "SENSOR" (Ooft et al., 2021), donde se evaluó su viabilidad para asignar tratamientos con 8 medicamentos experimentales. Ganesh et al. (2019) lograron establecer PDOs de CCR, demostrando que mantienen las características histopatológicas y moleculares de los tumores originales. Estos organoides se utilizaron para estudiar la respuesta a la quimioterapia y la radioterapia, mostrando una buena correlación con la respuesta del paciente. Yao et al. (2020) también predijeron la respuesta a tratamientos quimioterápicos y radioterápicos con una precisión del 82,14% y desarrollaron tratamientos combinados para identificar a los pacientes que podrían beneficiarse de terapias personalizadas.

En el estudio de Lv. et al. (2023) se utilizaron organoides para predecir la respuesta a un tratamiento quimioradioterapéutico con irinotecan en pacientes con CCR avanzado. Sus resultados indicaron una asociación entre el uso del irinotecan en los organoides y mejores resultados clínicos, incluyendo una mayor supervivencia sin enfermedad ni metástasis.

Sin embargo, no todos los estudios obtuvieron resultados positivos. Narasimhan et al. (2020) realizaron un ensayo de sensibilidad a fármacos con PDOs de pacientes con metástasis peritoneales colorrectales sin lograr establecer una correlación suficiente entre los resultados obtenidos en los organoides y las respuestas de los pacientes. A partir del estudio se planteó la probabilidad de una resistencia a los tratamientos más compleja y difícil de captar mediante los cultivos de organoides.

La falta de un protocolo estandarizado para el cultivo y manejo de los PDOs y sus ensayos *in vitro* dificulta la comparación confiable entre los resultados. A pesar de estas limitaciones y de aspectos por mejorar, como el microambiente inmune y estromal, los organoides representan una tecnología prometedora en medicina de precisión, marcando el inicio de un nuevo paradigma en la investigación y tratamiento del cáncer.

1.2.2 Biopsia Líquida

La biopsia líquida, una tecnología emergente en la medicina de precisión, está transformando la investigación oncológica al permitir el análisis molecular de fluidos corporales, como sangre, saliva, orina, líquido pleural o cerebrospinal. La biopsia líquida es capaz de aislar diversas moléculas incluyendo los ácidos nucleicos extracelulares circulantes (conocido como ADN libre de células o cell-free DNA (cfDNA)), ADN tumoral circulante (ctDNA), células tumorales circulantes (CTCs), ARN y exosomas (Nikanjam et al., 2022).

A diferencia de las biopsias tumorales tradicionales, que pueden pasar por alto la heterogeneidad tumoral, la biopsia líquida ofrece una visión más completa al detectar el ADN libre de células que se desprende de diversas lesiones tumorales simultáneamente.

En un estudio realizado por el grupo de Parikh et al. (2019), se compararon los resultados del análisis de cfDNA con los de la biopsia tumoral en pacientes con cáncer gastrointestinal y resistencia adquirida a la terapia dirigida. Se encontró que el análisis del cfDNA identificó con mayor frecuencia alteraciones en mecanismos de resistencia clínicamente relevantes, sugiriendo que la resistencia adquirida se debe en gran medida a la heterogeneidad tumoral.

Además de mejorar la sensibilidad y especificidad en la detección de alteraciones genéticas en pacientes con cáncer metastásico, la biopsia líquida también permite la personalización de la terapia adyuvante o consolidadora y el monitoreo no invasivo de la respuesta al tratamiento (Moding et al., 2021). Además, puede detectar enfermedad residual mínima (MRD) en pacientes con tumores sólidos, lo que facilita la predicción de recaídas y permite una intervención temprana para mejorar los resultados del tratamiento.

En un ensayo clínico reciente (Henriksen et al., 2022), se emplearon muestras de tejido y de sangre de pacientes con cáncer colorrectal para realizar una biopsia líquida utilizando un panel de biomarcadores específicos. Este análisis permitió detectar MRD, lo que indicó la necesidad de ajustar el tratamiento. Además, se realizaron monitoreos periódicos para evaluar la respuesta al tratamiento y anticipar la metástasis de manera más temprana que los análisis por imagen, lo que posibilitó una administración de tratamientos más efectiva y oportuna.

1.3 Caso de Estudio: *CDX2* en CCR

Actualmente, se conocen diversos biomarcadores moleculares para prevenir las recaídas de pacientes con CCR y para llevar a cabo terapias dirigidas. Entre estos se incluyen la inestabilidad de microsatélites (MSI), mutaciones en *Oncogén viral de sarcoma murino v-Raf B1 / Oncogén viral de sarcoma de rata (BRAF/RAS)*, o amplificaciones en *Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2)* (Badia-Ramentol et al., 2023).

Recientemente se ha investigado el *Factor de Transcripción Caudal tipo Homeobox 2 (Caudal type homeobox transcription factor 2) (CDX2)*, una proteína homeótica que se expresa en el núcleo de las células epiteliales intestinales. Sus funciones son varias, incluyendo su participación en la formación y diferenciación embrionaria del intestino (Badia-Ramentol et al., 2023; Kawai et al., 2005; Zygulska & Pierzchalski, 2022). Este gen es considerado un gen supresor de tumores y se suele utilizar como marcador inmunológico sensible y específico para el CCR, ya que su expresión es normalmente uniforme y elevada. Sin embargo, en un 5% de los tumores, se observa una pérdida de la expresión de *CDX2* (Badia-Ramentol et al., 2023).

Aunque se han identificado diversas mutaciones poco frecuentes que afectan a este gen, tales como V306Cfs2, Q250X, A239V y N308S, el mecanismo principal de silenciamiento de *CDX2* aún no se comprende completamente. No obstante, varios estudios apuntan a alteraciones epigenéticas que afectan al promotor de *CDX2* como eventos de hipermetilación causantes de su alteración en la expresión (Badia-Ramentol et al., 2023; Ramakrishnan et al., 2021). Kawai et al. (2005) encontraron dos islas CpG en la región promotora del gen (de -1570 a -1200 y de -220 a +880) capaz de reducir la expresión en líneas celulares de cáncer de colon. Estos resultados indicaron que esta metilación era frecuente en CCR, causando a la inactivación de *CDX2*, la cual podía ser revertida al tratar a las líneas celulares de CCR metiladas con inhibidores de la metiltransferasa de ADN.

Los pacientes en los que *CDX2* está infraexpresado suelen tener un peor pronóstico, debido a que deja de realizar su función de supresor tumoral, incrementando la proliferación de las células epiteliales de manera descontrolada. Además, su pérdida provoca la alteración de la ruta de *Integración relacionada con Wingless (WNT)*, aumentando su señalización y conduciendo a una

proliferación anormal y diseminación metastásica en el hígado. Otra ruta afectada por la pérdida de *CDX2* es la *Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β)*, lo que incrementa la transición epitelio-mesénquima (EMT) y también las características migratorias de las células epiteliales en CCR. Asimismo, los pacientes con pérdida de *CDX2* muestran una peor respuesta al tratamiento quimioterapéutico estándar, aunque no hay estudios sólidos todavía que confirmen que la baja expresión de este gen sea la causa directa.

La determinación de *CDX2* en pacientes según los criterios de Dalerba et al. (2016) plantea desafíos en la clasificación, ya que muchos pacientes no pueden ser clasificados como perdidos para *CDX2*. Aunque la pérdida de *CDX2* se ha asociado con un mal pronóstico en los pacientes, su aplicación clínica se ve limitada por la falta de un criterio de clasificación adecuado. Esta problemática subraya la necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección y clasificación para mejorar la precisión en la evaluación del estado de *CDX2* y su relevancia clínica en el cáncer colorrectal.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El proyecto llevado a cabo en el laboratorio de cáncer colorrectal del Instituto de Investigación Sanitaria de Valencia (INCLIVA) se enfocó en el gen *CDX2*. Previamente, el grupo realizó diversos estudios con el fin de crear una puntuación para la clasificación de pacientes *CDX2* positivo o perdido. A partir de ahí, en este estudio se investigó la relación entre la condición de *CDX2* del paciente y la sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos utilizando organoides derivados de pacientes con cáncer colorrectal.

Se postula que la pérdida de *CDX2* está asociada con una mayor resistencia al fármaco combinado de oxaliplatino y 5-Fluorouracilo (5-FU) y, por tanto, la reversión de la expresión de *CDX2* mediante ingeniería epigenética es capaz de revertir la sensibilización a la quimioterapia en pacientes *CDX2* negativos. Para probar esta hipótesis, se utilizaron técnicas de edición génica mediante la tecnología de "Repetición palindrómica corta agrupada regularmente con proteína asociada a CRISPR 9" (CRISPR/Cas9) para modificar la expresión de *CDX2* en los organoides. Concretamente en este ensayo se utilizó la variante CRISPR junto a la proteína inactiva Cas9 (dCas9), capaz de unirse específicamente a secuencias de ADN sin ejercer función de endonucleasa, formando CRISPR/dCas9. Esta tecnología permitió la desmetilación de los PDOs *CDX2* negativos y la metilación de los PDOs *CDX2* positivos. Las ediciones fueron validadas a nivel de transcripción mediante la técnica de "Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa" (qPCR) y a nivel de traducción mediante Western Blot (WB). Por último, se realizaron ensayos de sensibilidad a fármacos para evaluar los efectos de estas modificaciones en la respuesta al tratamiento.

Con el fin de demostrar la hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

1. Establecer una línea de organoides derivados de muestras de tejido de normal procedente de pacientes con CCR.
2. Clasificar los organoides en *CDX2* positivo o perdido en función su expresión proteica analizada por inmunohistoquímica por inclusión en parafina.
3. Estudiar la relación entre la condición de *CDX2* en pacientes con CCR y su sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos, centrándose en el fármaco combinado de oxaliplatino y 5-FU.
4. Revertir la expresión de *CDX2* en los organoides mediante la edición génica con CRISPR/dCas9.
5. Validar la edición génica a nivel de transcripción y traducción mediante qPCR y WB respectivamente.
6. Evaluar la respuesta al tratamiento combinado de oxaliplatino y 5-FU tras la reversión de la expresión de *CDX2* en los organoides.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recogida y Establecimiento de Organoides a Partir de Tejido de Colon

3.1.1 Recogida de Muestras

En el presente estudio, se emplearon organoides derivados de tejidos tumorales y normales de colon de pacientes intervenidos por CCR, concretamente el Organoide de Colon Normal 219 (CNO219), Organoide de Colon Tumoral 122 (CTO122) y Organoide de Colon Tumoral 65 (CTO65). El primero fue empleado para el establecimiento de una nueva línea de organoides, en concreto a partir del tejido normal del paciente enfermo de CCR. Los otros dos se emplearon para todo el análisis de *CDX2*, su expresión, sensibilidad a fármacos y edición génica.

Las muestras fueron obtenidas de pacientes del Hospital Clínico Universitario de Valencia, en colaboración con INCLIVA. Además, todos los participantes, cuyas muestras biológicas fueron recolectadas para los proyectos de investigación, fueron informados adecuadamente sobre la donación de muestras y firmaron un consentimiento informado. Las muestras siguieron un circuito en el que participaron oncólogos, cirujanos, patólogos e investigadores, diseñado conforme a la normativa institucional y ética, con la correspondiente aprobación del comité ético.

A partir de la muestra de tejido proporcionada da comienzo el protocolo de establecimiento de organoides y sus posteriores aplicaciones prácticas seguidas en este trabajo (Fig. 3).

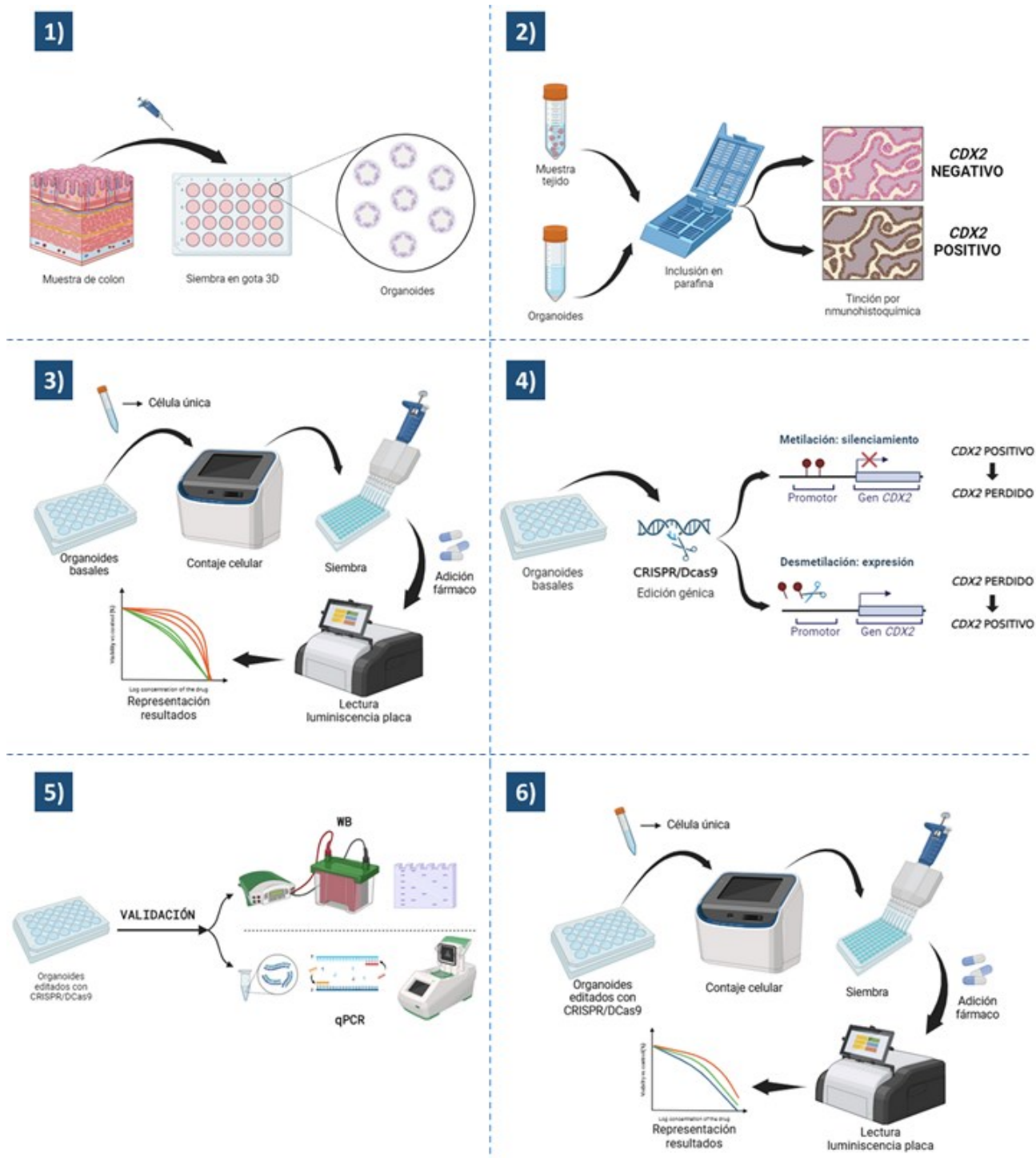


Figura 3. Pasos seguidos para el empleo de los organoides en el estudio presente y el análisis de la relación del gen CDX2 con la resistencia a fármacos quimioterapéuticos. 1. Establecimiento de una nueva línea de organoides a partir del procesamiento de tejido tumoral o normal de paciente con CCR. 2. Clasificación del organoide según el estado de CDX2 (positivo o negativo) mediante inclusión en parafina y tinción inmunohistoquímica. 3. Ensayo de drogas de los organoides basales agrupados en CDX2 positivos y negativos. Se realiza primero una disgregación a célula única y conteo celular con el Automated Cell Counter, una posterior siembra y finalmente adición del fármaco, lectura por luminiscencia de la placa y representación de los resultados. 4. Edición génica de los organoides basales mediante CRISPR/dCas9 conduciendo a la metilación y silenciamiento del gen CDX2 o a la desmetilación y expresión del gen CDX2. 5. Validación de la edición génica realizada con CRISPR/dCas9 a nivel transcriptómico mediante qPCR (la cual conlleva una previa extracción de ARNm de los organoides, una retrotranscripción y una cuantificación) y a nivel proteómico mediante Western Blot (el cual conlleva primero una extracción de proteínas y cuantificación). 6. Ensayo de drogas de los organoides editados genéticamente en sus diferentes condiciones: basal, control y editado. Se realiza primero una disgregación a célula única y conteo celular con el Automated Cell Counter, una posterior siembra y finalmente adición del fármaco, lectura por luminiscencia de la placa y representación de los resultados. (Ilustración generada con BioRender).

3.1.2 Disgregación del Tejido

Previamente al inicio del procesamiento, se precalienta una placa P24W antiadherente (Sarstedt 833922500) en el incubador (PHCbi, MCO-170AIC-PE) (37°C, 5% CO₂) durante al menos 1 hora. La muestra se recoge en un tubo Falcon de 50 mL (Fisher Scientific, 11809650) con 10 mL de tampón fosfato salino (PBS) estéril (BIOWEST, L0615-500) y se coloca en hielo.

Una vez en el laboratorio de cultivos, se procede con cinco lavados con 10 mL de PBS frío fuera de campana. Después, la muestra se transfiere a un Falcon con 10 mL de PBS y antibióticos al 2X (2% penicilina/estreptomina 200 µL y 2% normocina 40 µL) y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se lava 3 veces con 10 mL de PBS sin antibióticos. Finalmente, se decanta el volumen de líquido y se coloca el Falcon con la muestra dentro de la campana de flujo laminar. Estos lavados y tratamientos con antibióticos son cruciales para prevenir cualquier posible contaminación de las muestras, tanto normales como tumorales, las cuales se procesan de manera simultánea.

El siguiente paso consiste en colocar los fragmentos de muestra en una placa Petri de 60 mm (SPL, PLC20060) con 2 mL de PBS, los cuales se utilizan para sacar por decantación la muestra del tubo Falcon a la placa. En primer lugar, se cortan tres trozos de unos 0,3 cm del tejido utilizando un bisturí de un solo uso (Fisher Scientific, 11798343). Estos se introducen en las paredes de un criotubo (Thermo Scientific, 377267) y se congelan a -80 °C. El resto de la muestra se tritura con ayuda del bisturí en fragmentos muy pequeños, que se recuperan con una pipeta y se transfieren a un tubo Falcon antiadherente de 15 mL (Eppendorf, 0030122208). Para recoger la máxima cantidad de muestra posible, se añaden 1-2 mL de PBS a la placa y se transfiere todo al mismo tubo.

Seguidamente, se añaden liberasa a una concentración final de 0,3 U/mL (ROCHE, 5401020001) para digerir enzimáticamente el tejido; DNasa al 1% (MERCK (SIGMA), D5025-15KU) para disgregar el ADN liberado por células muertas; y Factor Y-27632 al 0.1% para prevenir la muerte apoptótica de las células debido a su separación entre ellas y de la membrana basal. La muestra se incuba durante 1 hora en un baño de agua caliente a 37 °C.

Una vez finalizado el tiempo, se tamiza todo el contenido utilizando un filtro de 70 µm (Fisher Scientific, 22-363-548) hacia un tubo Falcon de 50 mL y se lava con 1 mL de PBS recuperando así todo el tejido digerido. Después, se centrifuga el filtrado a 500 g durante 5 minutos a 4°C, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 mL de tampón de lisis ACK (Gibco, A10492-01) para eliminar los eritrocitos. La muestra se incuba 5 minutos a temperatura ambiente dentro de la campana, luego se diluye con 2 mL de PBS y se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones. A continuación, se retira el sobrenadante y se resuspende en medio basal (MB) (Tabla 2) frío, en un volumen de entre 200 y 750 µL según el tamaño del pellet.

3.1.3 Contaje Celular y Siembra

A continuación, se lleva a cabo un recuento de células utilizando el contador automático de células “Automated Cell Counter” (BioRad, 1450102). Para ello, se extraen 10 µL de la muestra y se mezclan con 10 µL de azul de tripano (ThermoFisher, 15250-061) en un tubo Eppendorf de 1,5 mL (Sarstedt, 72.690.001). Posteriormente, se pipetea 10 µL de esta suspensión en un portaobjetos de conteo de doble cámara (BioRad, 1450011) y se introduce en el contador automático de células el cual realiza el recuento celular.

A continuación, se calcula el volumen de muestra necesario para plaquear aproximadamente 200.000 células vivas por pocillo. Este es transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se centrifuga a 500 g, 5 minutos a 4°C. Luego, se retira el sobrenadante y, teniendo en cuenta que el volumen final por gota es de 40 µL, se añade Matrigel (BME) (Biotechne R&D, 3533-005-02) con una concentración final del 50% y rellenando la cantidad restante con MB.

Por último, se siembra una gota de 40 µL por pocillo en la P24W, pipeteando suavemente y formando un domo sin introducir burbujas. De manera inmediata, se incuba la placa en la estufa (37°C, 5% CO₂) durante 30 minutos para permitir que el Matrigel solidifique y, una vez finalizados, se añaden 500 µL del medio correspondiente atemperado a 37°C a cada pocillo dejándolo caer por la pared del pocillo poco a poco para no deformar el Matrigel. Finalmente, se introduce en el incubador (37°C, 5% CO₂).

3.1.4 Medios de Cultivo

Se utiliza un medio completo (MC) (Tabla 4), con MB como base (Tabla 2), para células tumorales y medio comercial (ST) (IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Human)) (Tabla 3) para células normales. Además, cuando trabajamos distinguiendo a pacientes con *CDX2* positivo o perdido, también cambiamos el medio: *CDX2* positivo se cultiva en MC y *CDX2* perdido se cultiva en ST.

Tabla 2. Composición del Medio Basal utilizado en el seguimiento de organoides y formación del Medio Completo

Componente	Stock	Conc Final	Referencia
DMEM/F-12	1X	-	Gibco, 11320-074
HEPES	1M	10 mM	Biowest, L0180-100
L-Glutamina	200 mM	2 mM	Biowest, X0551-100
Penicilina/Estreptomicina	100%	1,50%	Gibco, 15140-122
Primocina	50 mg/mL	150 µg/mL	InvivoGen, ant-pm-1
Suplemento N2	100X	1X	StemCell, 07152
Suplemento Neurocult SM1	50X	1X	StemCell, 05711

Tabla 3. Composición del Medio Comercial para el establecimiento y crecimiento de los organoides.

Componente	Stock	Concentración final	Referencia
Intesticult OGM Human Basal Medium	1 Volumen	1X	StemCell, 06010
Organoid Supplement	1 Volumen	1X	StemCell, 06010
Penicilina/Estreptomicina	100%	1.5%	Gibco, 15140-122
Normocina	50 mg/mL	150 µg/mL	InvivoGen, ant-nr-1
Y-27632*	10 mM	10 µM	TOCRIS, 1254/10

**Se añade al medio al momento de usarlo y solo cuando es la primera siembra o pase.*

Tabla 4. Composición del Medio Completo para el establecimiento y crecimiento de organoides

Componente	Stock	Conc. Final	Referencia
Medio Basal (MB)	-	-	-
N-acetyl L-cystein	0.5 M	1 mM	MERCK (SIGMA), A9165-25G
Nicotinamide	1 M	10 mM	MERCK (SIGMA), N0636-500G
EGF	50 µg/mL	50 ng/mL	StemCell, 78006
Noggin	100 µg/mL	100 ng/mL	StemCell, 78060
A-8301	5 mM	0.5 µM	Stemcell, 72022
SB202190	30 mM	10 µM	Stemcell, 72632
Gastrina	10 µM	10 nM	MERCK, G9145-1MG
R-Spondin1	1 mg/mL	500 ng/mL	StemCell, 78213.1
FGF-10	5 µg/mL	10 ng/mL	Stemcell, 78037.1
PGE2	100 µM	10 nM	TOCRIS, 2296
Y-27632*	10 mM	10 µM	TOCRIS, 1254/10

**Se añade al medio al momento de usarlo y solo cuando es la primera siembra o pase.*

3.2 Seguimiento de los Organoides

Los organoides establecidos a partir del protocolo anterior deben ser supervisados dos veces por semana, concretamente lunes y jueves. Durante este control, se observan al microscopio para determinar si se pueden mantener hasta el próximo seguimiento o si requieren algún procedimiento. Si los organoides aún están en formación, son pequeños o medianos, con una densidad baja o media, solo es necesario cambiarles el medio. Para ello, se retira el medio del pocillo correspondiente inclinando la placa y acercando la punta al borde, sin tocar el Matrigel. Luego, se añaden 500 µL del medio fresco correspondiente, atemperado a 37 °C, en cada pocillo.

Conforme los organoides van alcanzando confluencia y gran tamaño, es necesario realizar pases, recoger pellets o hacer congelos para posteriores análisis y almacenamiento.

3.2.1 Pase de los Organoides

El primer paso es eliminar el medio del pocillo con P1000 sin tocar la gota. Luego, se añaden 500 μ L de PBS frío por pocillo, lo cual disgrega el Matrigel a baja temperatura, y se recupera todo a un Falcon de 15 mL. Se lava el pocillo con 500 μ L más de PBS frío y se recupera al mismo tubo.

A continuación, se procede con una centrifugación a 500 g, 5 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante. Posteriormente, se añaden 200 μ L de Tripsina Tryple-Express Express (Gibco, 12605-010) a 37°C y se resuspende bien el pellet. Se incuba en el baño a 37°C durante 5-8 minutos, en función del tamaño de los organoides, pues se pretende solo fragmentar el organoide para generar nuevos sin llegar a individualizar las células.

Tras finalizar la incubación, se añaden 900 μ L de MB frío y se resuspende debidamente para inactivar la tripsina. Seguidamente se procede con otra centrifugación en las mismas condiciones y se vuelve a eliminar el sobrenadante, dejando unos 30-60 μ L de medio según el tamaño del sedimento. Desde aquí, se realiza el mismo procedimiento que el descrito anteriormente en el apartado de 3.1.3 desde la realización del recuento de células hasta la formación de nuevas gotas.

3.2.2 Congelamiento y Almacenamiento de los Organoides

Tras una buena ampliación de la línea de organoides y el alcance de una densidad adecuada, se debe congelar viales para su almacenamiento y creación de un biobanco.

El procedimiento consiste en recoger y centrifugar los organoides del mismo modo que el descrito en el apartado 3.2.1 de Materiales y Métodos. Seguidamente, se tripsinizan durante 13 minutos para permitir una buena separación de las células y, por tanto, mejor infiltración del medio de congelación. Tras la disgregación, se inhibe con MB y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Posteriormente, se elimina el sobrenadante y se añade el medio de congelación Bambanker (Nippon Genetics, BB02). La muestra se transfiere a un criotubo debidamente etiquetado, que se coloca en un CoolCell (-1°C/min) y se almacena durante 24 horas en un congelador a -80°C. Transcurrido este tiempo, las muestras se trasladan a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

3.3 Ensayos de Drogas

3.3.1 Disgregación del Organoide en Célula Única y Plaqueo

Se realizó un ensayo de drogas en los organoides, tanto basales como editados, utilizando una combinación de 5-Fluorouracilo (stock 10mM) y oxaliplatino (stock 12,6 mM) (esquema FOLFOX).

Este comienza calentando una placa P96W antiadherente de fondo cóncavo (Sarstedt, 833925500) en el incubador. Se recogen los pocillos destinados al ensayo con PBS y se centrifugan a 500 g durante 5 minutos a 4°C. Tras desechar el sobrenadante, se añaden 250 μ L de tripsina y se incuban a 37°C durante 13 minutos para disgregar adecuadamente las células.

Transcurrido este tiempo, se añaden 900 μL de MB frío para inhibir la acción de la tripsina, resuspendiendo la muestra completamente, y se vuelve a centrifugar bajo las mismas condiciones. Finalmente, se descarta el sobrenadante, dejando aproximadamente 30-60 μL de medio, dependiendo del tamaño del sedimento. Posteriormente, se realiza un recuento de células como el descrito en el apartado 3.1.3 de Materiales y Métodos.

Para este ensayo, se requieren 3500 células vivas por pocillo en una placa P96W. Se utilizaron 42 pocillos de la placa (Fig. 4), y en cada uno se formó una gota de 5 μL , por lo que se necesitó un volumen total de 210 μL . Debido al posible error de pipeteo y considerando que no todas las células sobrevivirán, se estimó un total de 150.000 células vivas. El volumen final de la mezcla fue de 250 μL , compuesto por un 50% de Matrigel (125 μL) y el volumen necesario de células vivas, completado con MB hasta alcanzar 125 μL . Por lo tanto, a partir del recuento de células vivas, se calculó el volumen de muestra necesario.

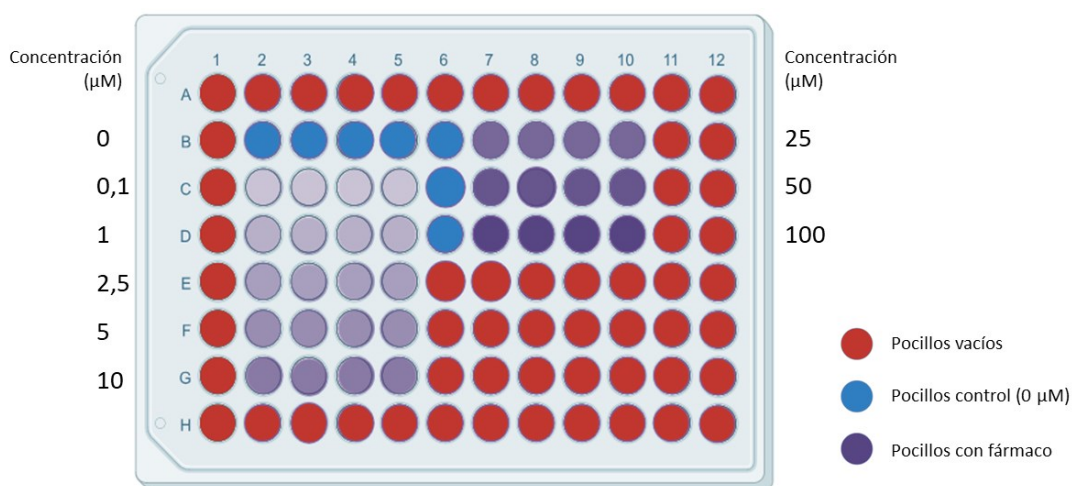


Figura 4. Organización de la P96W para la realización de un ensayo de fármacos a diferentes concentraciones (Ilustración creada con BioRender)

En un tubo Falcon nuevo de 15 mL, se añade el volumen calculado de MB frío, seguido del volumen correspondiente de la muestra, y finalmente, 125 μL de BME. La muestra sobrante se siembra nuevamente en su correspondiente placa P24W como un pase adicional.

A continuación, se retira la placa P96W del incubador y se rotula la tapa de los pocillos donde se va a sembrar, indicando las especificaciones pertinentes. La mezcla se resuspende y, utilizando una pipeta P10, se toman 5 μL para depositarlos en cada uno de los pocillos de la placa, formando un domo sin introducir burbujas. Este procedimiento se repite para todos los pocillos.

La placa se incuba en una estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante 12 minutos para permitir que el Matrigel solidifique. Luego, se añaden 100 μL del medio correspondiente (MC o ST), previamente atemperado a 37 °C, en cada pocillo utilizando una pipeta multicanal y dejándolo caer por la pared del pocillo lentamente para no deformar el Matrigel. Se verifica al microscopio que haya un número similar de células por gota en todas las condiciones. Finalmente, la placa se introduce en el incubador (37°C, 5% CO₂.)

3.3.2 Adición del Fármaco

Se dejan transcurrir 48 horas para permitir que las células crezcan y se formen los organoides. Pasado este tiempo, se procede a la adición de los fármacos para evaluar su efecto en los diferentes modelos de PDOs.

Primero, se realizaron los cálculos necesarios para preparar la cantidad adecuada de fármaco. A cada pocillo, se le retiró el medio y se le añadieron 100 μ L de medio fresco que contenía el fármaco. Se probaron diversas dosis, con cuatro réplicas para cada una en pocillos diferentes. En total, se evaluaron nueve concentraciones distintas (0, 0.1, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 μ M) ajustadas con el medio correspondiente.

Se retira la placa P96W del incubador, se elimina el medio y se añaden 100 μ L de medio con el fármaco correspondiente a cada pocillo. Se recuerda que se realizan 4 réplicas de cada concentración y se incluyen 3 réplicas adicionales para el control (Fig. 4). Se vuelve a colocar la placa en el incubador (37°C, 5% CO₂) durante 120 horas.

3.3.3 Revelado

Tras la incubación, se procede a revelar los resultados utilizando el reactivo de revelado, Cell Titer Glo (Promega, G9682), con el cual se trabaja en oscuridad debido a su sensibilidad a la luz. Se retira la placa del incubador y se añaden 100 μ L de Cell Titer Glo a todos los pocillos a revelar. Luego, la placa se incuba durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Finalmente, el Lector de microplacas (GloMax[®] Discover Microplate Reader, Promega, GM3000) proporciona una cuantificación del crecimiento en cada uno de los pocillos mediante un valor de luminiscencia. Estos datos se procesaron posteriormente en Excel.

3.4 Inclusión de Organoides en Parafina

Para comenzar, se retira la placa P24W del incubador y, dentro de la campana de flujo laminar, se elimina el medio de cultivo de los pocillos necesarios, los cuales se recogen con PBS en un Falcon de 50 mL y se centrifuga a 500 g durante 5 minutos a 4°C. Fuera de la campana, se descarta el sobrenadante, se añaden 500 μ L de paraformaldehído (PFA) (Thermo Fisher, 15670799) y se incuba durante 45 minutos a 4°C en refrigeración.

Mientras, se prepara un cassette (Biosigma, 390571) con un papel de filtro recortado y un recipiente con formol (Labkem, 603-001-00-X). Tras la incubación, se centrifuga nuevamente a 500 g, 5 minutos a 4°C. Luego, se elimina cuidadosamente el sobrenadante debido a la naturaleza difusa del pellet. Se calienta una alícuota de histogel (Thermo Scientific, HG-4000-012) en el termobloque a 95,3°C y se retira cuando la solución esté completamente líquida.

Utilizando una pipeta Pasteur, se añaden cuatro gotas de histogel en la pared de cada tubo de muestra, se homogeneiza suavemente con la misma pipeta y se centrifuga a 500 g, 5 minutos a 4°C, permitiendo que el histogel solidifique. Una vez finalizada la centrifugación, se recoge el histogel

con una espátula y se transfiere al cassette, teniendo especial cuidado con el pico de la punta donde se concentran las células. El cassette se introduce en el recipiente con formol y se transporta a anatomía patológica, donde se realizan los siguientes pasos para la fijación definitiva de la muestra.

Ellos se encargan de transferir el contenido del cassette a una placa de metal con parafina caliente, asegurando que el material queda adherido al fondo. Luego se coloca en frío, se cubre con el cassette y se añade más parafina, dejándola reposar en frío 15 minutos para que se suelte.

Luego, separan el cassette, colocan los bloques de parafina en la placa fría y encienden el microtomo. El bloque se desbasta a 10 micras, y luego se corta a 3 micras. Se extienden los cortes en el baño, se pescan con un portaobjetos rotulado y se dejan secar.

Finalmente, los portaobjetos se llevan a teñir, bien por hematoxilina-eosina (HE), o bien por inmunohistoquímica (IHQ).

3.5 Edición Génica Mediante CRISPR/dCas9

La técnica CRISPR/dCas9 nos brinda la capacidad de realizar ediciones genéticas en nuestras células, ya sea aumentando o inhibiendo la expresión de ciertos genes. En nuestro estudio, llevamos a cabo tres tipos de ediciones epigenéticas. Para las células con pérdida de *CDX2*, podemos revertir la expresión utilizando la herramienta TET1 para desmetilar las islas CpG más importantes en su promotor, aumentando así su expresión. En cuanto a las muestras con *CDX2* positivo, optamos por revertir la expresión utilizando la herramienta DNMT3 para metilar las regiones críticas del promotor, silenciando así la expresión del gen en cuestión.

El procedimiento se lleva a cabo en esterilidad y se inicia colocando una P24W antiadherente en el incubador a 37°C con un 5% de CO₂.

Inicialmente, se parte de organoides bien formados de un tamaño medio-grande. Se recogen las gotas como se ha explicado en el apartado 3.3.1 de Materiales y Métodos, disgregando de igual manera a célula única para hacer el conteo, exceptuando que en este caso se inhibe la tripsina con medio Opti-MEM (Gibco™, 31985062) en lugar de MB. Se utilizan 140.000-150.000 células totales por pocillo de transfección.

Para la generación de los mixes de transfección se preparan las soluciones A y B especificadas en la Tabla 5 por pocillo, según el tipo de edición (protocolo de ABM DNAfectin™ Plus Transfection Reagent, G2500) y se emplean los vectores mostrados en la Fig. 5.

Tabla 5. Composición específica de las soluciones A y B para los mixes de edición génica con CRISPR/Cas9 con objeto de metilación o desmetilación

	SOL A			SOL B		Vol total por pocillo
	Guía sgRNA (sg de guía única)	Herramienta	Opti-MEM	DNAfectin	Opti-MEM	
METILACIÓN (0,5 µg/ µL stock)	0,2 µL T2 + 0,2 µL T3 (0,2 µg)	0,4 µL dCas9-DNMT3	24,2 µL	2 µL/pocillo	23 µL	50 µL
DESMETILACIÓN (0,5 µg/ µL stock)	0,2 µL T1 + 0,2 µL T2 (0.2 µg)	0,4 µL dCas9-TET1	24,2 µL	2 µL/pocillo	23 µL	50 µL

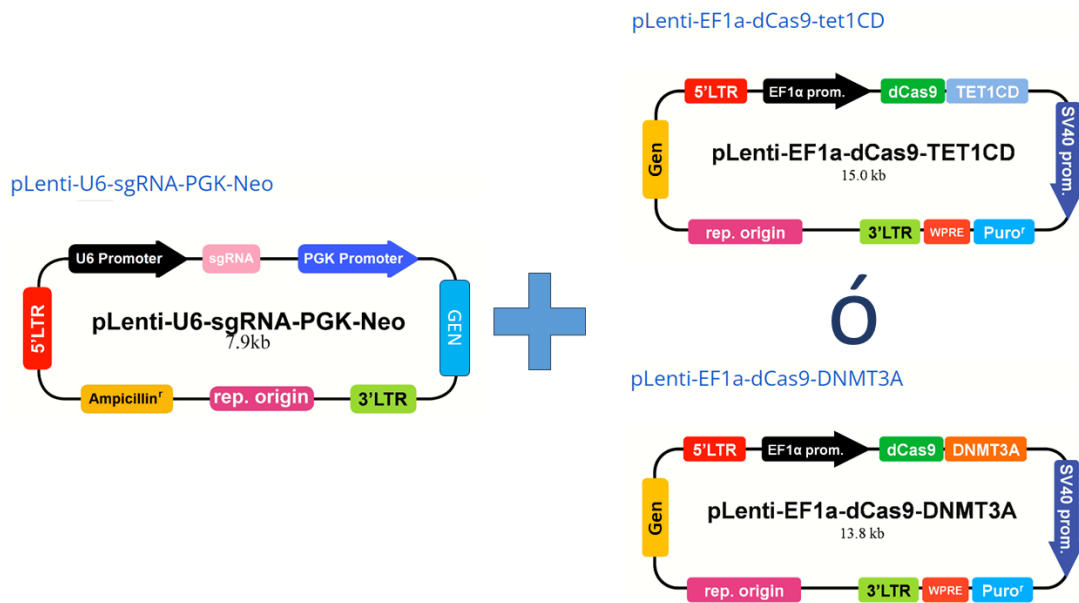


Figura 5. Composición de los vectores empleados en la edición génica con CRISPR/dCas9. A la izquierda se observa el vector pLenti-U6-sgRNA-PGK-Neo (Custom CRISPR sgRNA Lentiviral Vector (CDX2) (for spCas9)) (ABM, C441), el cual contiene la guía a utilizar en cada caso (T1, T2 o T3) en la posición sgRNA (ARN Guía de una sola cadena) y la resistencia al antibiótico genético (GEN). A la derecha se observan los dos vectores correspondientes con las distintas herramientas con las que se puede combinar la guía, en función de si se quiere desmetilar o metilar. Para el primer caso se emplea el vector de arriba, pLenti-EF1a-dCas9-tet1CD (dCas9-TET1CD Lentiviral Vector) (ABM, K096), el cual contiene la herramienta de desmetilación TET1CD y la resistencia al antibiótico genético. Para el segundo caso se emplea el vector de abajo, pLenti-EF1a-dCas9-DNMT3A (dCas9-DNMT3A Lentiviral Vector) (ABM, K091), el cual contiene la herramienta de metilación DNMT3A y la resistencia al antibiótico genético.

Para el Control-dCas9, se prepara un tubo extra con la misma concentración de dCas9 que el utilizado en el pocillo de las guías, pero sin contar con estas últimas.

Las soluciones preparadas se incuban a temperatura ambiente 5 minutos por separado. Después, se mezclan (DNAfectin MIX en adelante) y se incuban 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añade 250 μ L de Opti-MEM al DNAfectin MIX (50 μ L) para un pocillo de P24W. Se añade por tanto un volumen final de 300 μ L de DNAfectin MIX por pocillo, más la cantidad de muestra calculada y se resuspende generosamente para que las células queden bien repartidas en el pocillo.

Tras incubarlo durante 5h en el incubador con agitaciones intermitentes cada hora y media, se recoge todo el volumen del pocillo lavando con PBS y se plaquea el pellet en una gota en un pocillo nuevo. Se incuban 30 minutos en el incubador y se añade el medio correspondiente.

Pasadas 48 horas para que los organoides hayan podido comenzar a formarse, se añade el antibiótico de selección al medio para asegurar que los únicos organoides que crezcan sean aquellos que han sido transfectados. En nuestro caso, se añade genético (ABM, G418), a una concentración de 250 μ g/mL para las ediciones con TET1 o DNMT3. Se deja actuar entre 3 y 5 días dependiendo de la sensibilidad de cada PDO.

Estos organoides se dejarán crecer y se realizarán pases para eliminar los residuos apoptóticos de los que mueren, hasta obtener un cultivo de PDOs transfectados limpio.

3.6 Validación del CRISPR/dCas9

Todos los modelos elaborados mediante la técnica CRISPR/dCas9 fueron validados verificando la correcta edición génica a nivel de transcripción (ARNm) y traducción (proteínas), ya sea producto de una metilación o desmetilación.

3.6.1 Validación a Nivel de Transcripción: qPCR

3.6.1.1 Extracción ARN

Para estudiar la transcripción de ARNm, se realiza una extracción a partir de pellets de organoides utilizando el kit RNeasy Micro Kit (QIAGEN, 74004) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Primero, se lleva a cabo la ruptura celular con tampón de lisis RLT y β -mercaptoetanol (B-ME). A continuación, el lisado se transfiere a una columna QIAshredder y se centrifuga 2 minutos a máxima velocidad. Se añade etanol al 70% al lisado para precipitar los ácidos nucleicos. La muestra se transfiere a otra columna y se realizan varios lavados, descartando siempre el eluido. Se incuba con DNasa durante 15 minutos y se vuelve a realizar varios lavados de la columna.

Finalmente, la columna se seca mediante centrifugación y se añaden agua libre de RNasa para eluir definitivamente el ARN extraído.

3.6.1.2 Cuantificación

El tubo con la extracción final de ARN se mantiene en hielo antes de ser cuantificado utilizando el Nanodrop (Thermo Scientific, ND-2000). El ARN se resuspende adecuadamente con una pipeta, y se colocan 1 μ L en el Nanodrop, asegurándose de que no se formen burbujas. Los resultados son analizados posteriormente.

3.6.1.3 Retrotranscripción

Siguiendo el protocolo del kit "High Capacity RNA-to-cDNA" (Applied Biosystems, 4387406) empleado para la retrotranscripción (RT), se prepara una mezcla con los componentes indicados en el protocolo de acuerdo con el número de muestras disponibles. Se preparan 500 ng de ARN con 11 μ L del mix de tampón, completando el volumen necesario con agua. Una de las muestras será control, sin presencia de muestra para verificar que el agua utilizada no resulte en amplificación. Seguidamente, se programa el termociclador siguiendo las indicaciones de la Tabla 6. Al finalizar, el producto de la reacción de la RT se almacena en el congelador a -20°C .

Tabla 6. Programa del termociclador para la retrotranscripción

Tiempo	Temperatura
60 minutos	37°C
5 minutos	95°C
Infinito	4°C

3.6.1.4 qPCR

El siguiente paso es realizar una qPCR utilizando el Mix SYBR Green qPCR (BioRad, 1725124), que incluye los primers específicos (Metabion) diseñados para los genes de la *actina* y *CDX2* (Tabla 7).

Primero, se prepara un mix principal para cada uno de los genes a analizar (Tabla 7). Este se distribuye en tubos adicionales, asignando 9 μL a cada uno, de acuerdo con el número de muestras totales a analizar.

Tabla 7. Contenido de los mixes principales para *ACTINA* o *CDX2*

Componente	Por unidad (μL)	Secuencia <i>ACTINA</i>	Secuencia <i>CDX2</i>
Sybr Green	5	-	-
Primer F (15 μM)	0.2	AGCCTCGCCTTTGCCGA	GACGTGAGCATGTACCCTAGC
Primer R (15 μM)	0.2	CTGGTGCCTGGGGCG	GCGTAGCCATTCCAGTCCT
H ₂ O	3.6	-	-
TOTAL	9	-	-

En este número se tienen en cuenta las muestras, el control de la RT y el control del agua utilizada en la qPCR. Además, de cada muestra se hacen 3 réplicas y de cada control, 2 réplicas. Por lo tanto, si solo se tiene una muestra, se debe preparar mix para al menos 9 pocillos (7 más dos adicionales).

Una vez preparados los mixes principales, se añaden 9 μL a cada uno de los pocillos correspondientes en la placa y 1 μL de muestra a su pocillo correspondiente. Finalmente, se introduce el programa de qPCR especificado en la Tabla 8.

Tabla 8. Programa del termociclador para qPCR

Tiempo (segundos)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Ciclos
20	95	x40
3	95	
30	62	
+ curva de Melt (por defecto)		

3.6.2 Validación a Nivel de Traducción: Western Blot

El Western Blot es una técnica utilizada para la inmunodetección de proteínas diana de baja abundancia en muestras complejas. En nuestro ensayo, se emplea para detectar la proteína codificada por el gen *CDX2*, mostrando el aumento o disminución de su expresión en los diferentes modelos diseñados mediante edición génica.

3.6.2.1 Extracción y cuantificación de proteínas

Para comenzar, se realiza una extracción de proteínas a partir de los pellets de nuestros organoides conservados a -80°C . Se preparan los extractos con 80-120 μL el reactivo RIPA suplementado con 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de inhibidores de proteasa (MERCK (SIGMA), P8340-1ML) y 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de inhibidores de fosfatasa (Millipore (SIGMA), 524627-1ML). Las muestras se incuban en hielo durante 30 minutos, se sonicán y se centrifugan a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C , manteniendo el sobrenadante.

A continuación, la concentración de proteína es cuantificada con el kit "BCA Protein Assay" (Thermo Scientific, 23225) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se preparan las muestras para cargar 30 μg de la proteína cuantificada con el tampón Laemli (LB 4x) (Stemcell, 1610747) con mercaptoetanol (1/10) (SIGMA, M3148-250ml) en cada carril del gel de agarosa previamente preparado al 10%.

3.6.2.2 Separación de las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE

Antes de cargar las proteínas se calientan a 95°C durante 7 minutos en el termobloque. Luego se carga primero el marcador (BioRad, 1610374) y después las muestras. Se añade el tampón de electroforesis y se lleva a cabo usando el generador (BioRad, 1645052) a 120 V durante 2 horas.

3.6.2.3 Transferencia en húmedo a membrana de nitrocelulosa

Los materiales se colocan en orden en una cubeta llena de tampón de transferencia: esponja, papel Whatman, gel invertido, membrana de nitrocelulosa (BioRad, 1620117), papel Whatman y esponja. Luego, se programa la transferencia en la cubeta llena de tampón de transferencia empleando el generador a 120 V durante una hora y media. Al finalizar, se tiñe la membrana utilizando Rojo Ponceau (SIGMA, 09189-6X1L-F), se fotografía y se lava con agua destilada.

3.6.2.4 Inmunodetección de CDX2

Seguidamente, se rellena con la solución de bloqueo albúmina sérica bovina (BSA) 5X durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Luego, se retira esta solución y se incuba la membrana con el anticuerpo primario de *CDX2* (*CDX2* Rabbit mAb) (Cell Signalling, 12306) (1/1000 en BSA 1X) overnight. Al día siguiente se elimina el anticuerpo y se lava con solución salina tamponada con Tris y Tween (TBS-T) 0.05% en agitación. Posteriormente, se incuba una hora con el anticuerpo secundario de *CDX2* (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Inmunoglobulins HRP) (Agilent, P044801-2) (1/5000 en BSA 1X) a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad. Finalmente, se lava con TBS-T 0.05% y solución salina tamponada con Tris (TBS) 1X, todos en agitación.

3.6.2.5 Revelado

Se prepara 1 mL del reactivo de revelado ECL Plus del kit ECL Pierce™ (Thermo Fisher, 32106) por cada membrana. Se aplica sobre la membrana en oscuridad durante un minuto, se seca y se introduce en el transiluminador digital (GE Healthcare, ImageQuant LAS-4000). Se guardan las fotos resultantes obtenidas.

3.6.2.6 Stripping

Para eliminar todos los anticuerpos de *CDX2* unidos y permitir el revelado de la proteína de la *actina*, es necesario realizar un stripping de la membrana. Primero, se lava con agua Milli-Q en agitación. Posteriormente, se añade la solución de Stripping (GRISP, GB200500) y se agita durante 20 minutos. Por último, se lava de nuevo con TBS-T al 0.05% en agitación.

3.6.2.7 Inmunodetección de actina

Se repite el proceso de inmunodetección de *CDX2*, pero en lugar de emplear los anticuerpos previamente mencionados, se utiliza como anticuerpo primario el Anti- β -*actina* monoclonal antibody produced in mouse (Sigma, A2228) y como anticuerpo secundario el Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins HRP (Agilent, P044701-2). Se lleva a cabo el revelado y se obtienen las imágenes correspondientes de la *actina*.

3.7 Biopsia Líquida

3.7.1 Aislamiento del Plasma

Se reciben las muestras proporcionadas por los diferentes hospitales asociados. Si la muestra proviene de un hospital cercano y se procesa en menos de dos horas, se recibe en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Tubo BD Vacutainer con EDTA K2E de 6ml) y se sigue el protocolo:

Primero, se asigna un código identificativo interno a cada muestra y se registra la hora de llegada e inicio del protocolo. Se inicia con una centrifugación inicial de los tubos a 1600 g durante 10 minutos a deceleración 0 para separar las fases de la sangre. Luego, se separa la fase líquida (plasma) de la fase sólida (componentes celulares), recogiendo aproximadamente 9mL de plasma en total de varios tubos del mismo paciente. Este plasma se transfiere a un nuevo tubo y se centrifuga nuevamente a 3000 g durante 10 minutos para purificarlo. Posteriormente, se alícuota el sobrenadante, que contiene el plasma circulante tumoral, en un rack de congelación, haciendo alícuotas de 500 μ L, y se guarda en congelador a -80°C.

Si la muestra llega de un hospital más lejano o es procesada más tarde de las dos horas posteriores a la extracción, el proceso es diferente:

Los tubos (tubo cell-free DNA BCT 10 ml, Streck, 218962) están diseñados para mantenerse estables hasta por 7 días a temperatura ambiente y en posición vertical, gracias a la presencia de inhibidores de DNasas que preservan la estabilidad del ADN. La primera centrifugación es similar al caso anterior (1600 g durante 10 minutos sin deceleración).

Sin embargo, el plasma se transfiere a nuevos tubos con un diámetro ligeramente mayor (Sarstedt, 62554502), ya que la segunda centrifugación es diferente. Para esta etapa se requiere un rotor especial (Rotor de ángulo fijo de aluminio HIGHconic™ II, 75003620) y se lleva a cabo a 16000 g durante 10 minutos con deceleración.

Esta transferencia se realiza en menos de dos horas ya que, si se excede este tiempo, las células sanguíneas se hemolizan, lo que podría afectar los resultados al enmascarar el ADN circulante.

3.7.2 Extracción de cfDNA

Para este procedimiento se utiliza el kit "QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit" (Qiagen, 55114). Primero, se retira el rack del congelador para permitir que las muestras descongelen y alcancen la temperatura ambiente. A continuación, se siguen las instrucciones del fabricante, procediendo con la adición de buffers y proteinasas, varios filtrados en mini columnas QIAamp que ayudan a lavar y purificar el cfDNA del plasma y su extracción final. Finalmente, los extractos de cfDNA se conservan a -20°C.

3.7.3 Análisis del cfDNA Obtenido de Biopsia Líquida

El análisis comienza con la evaluación de calidad del cfDNA extraído. Para ello, se utiliza el instrumento TapeStation (Agilent, G2991BA), que cuantifica el cfDNA e indica contaminación con ADN genómico.

A continuación, se distingue el ctDNA del cfDNA cuantificado y se secuencia utilizando un panel de 29 genes elaborado en los laboratorios de INCLIVA. Este panel se basa en los "hotspots" de CCR, lo que puede ofrecer datos del estado de la enfermedad del paciente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Establecimiento y Mantenimiento de Cultivos de Organoides 3D Derivados de Pacientes con Cáncer Colorrectal

Los modelos 2D no capturan adecuadamente la complejidad del funcionamiento celular en el cuerpo humano. Por esta razón, en este proyecto se optó por utilizar organoides, ya que ofrecen una representación más fiel y realista de los procesos biológicos que ocurren en el organismo.

Para establecer una línea de organoides a partir de una muestra de colon normal de un paciente con cáncer colorrectal, se procesó la muestra del paciente 219. Los pasos específicos para el establecimiento de estos organoides se detallan en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos, y la evolución del resultado de este proceso puede observarse en la Fig. 6.

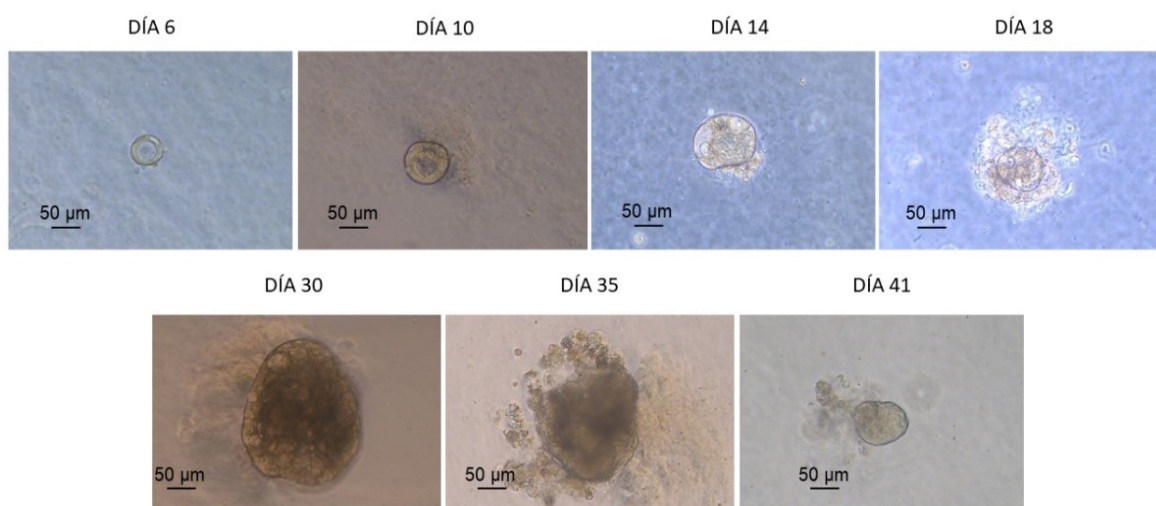


Figura 6. Generación y mantenimiento de la línea de organoides CNO219, establecidos a partir de tejido de colon normal del paciente 219. Las fotos tomadas muestran la evolución del PDO basal durante 41 días. Se encontraban en pase 0 hasta el día 22, en el que se realizó el primer pase. El día 35 se realizó un replaqueo, por lo que se mantuvo en pase 1. Barra de escala a 50 µm.

Inicialmente, la muestra se procesó el día 0, presentando una densidad celular media en el pellet, lo cual permitió la siembra en dos pocillos tras realizar un recuento en el Automatic Cell Counter. Los cultivos se dejaron crecer durante una semana, realizando los cambios de medio correspondientes en cada seguimiento. Como se observa en la Fig.6, al día 6 ya se apreciaba una buena formación de organoides con forma esférica y un centro hipóxico visible en una tonalidad más oscura. Sin embargo, estos eran pocos y estaban aislados. El día 10, se aprecia el incremento de tamaño de los organoides. El día 14, los PDOs continúan su crecimiento. No obstante, la densidad celular siguió siendo baja y algunos comenzaron a entrar en apoptosis, tal y como el que se muestra en la Fig. 6. El día 18 se puede apreciar una mayor apoptosis de los organoides, viendo como los restos celulares se desprenden de la esfera. El día 22 se realizó el primer pase y se dejó crecer hasta

el día 30. Aquí se observó la formación de organoides de gran tamaño, pero aún con una densidad baja y presencia de apoptosis. Desafortunadamente, la gota se rompió, lo que obligó a realizar un replaqueo el día 35, resultando en la pérdida de algunas células y un incremento en la apoptosis, observado en la Fig. 6. Finalmente, el día 41 se observaban aún varios organoides, algunos como el de la figura con cierta apoptosis y una densidad celular baja.

En cuanto a su morfología, los organoides de tejido intestinal renuevan continuamente su capa epitelial y eliminan las células apoptóticas en el lumen central, lo que ofrece el centro más oscuro observado en la Fig. 6 (Xu et al., 2018).

Aunque en algunos estudios combinan diferentes tipos de medio según la fase del establecimiento del organoide (Pleguezuelos-Manzano et al., 2020), en nuestro caso se utilizó inicialmente el medio de cultivo MC. Este medio complementa al Matrigel, un sustituto de la matriz extracelular (ECM), con diversos factores de transcripción. Para los experimentos se incluyeron varios factores de crecimiento previamente empleados en otros ensayos, los cuales demostraron ser eficaces para mantener la supervivencia y morfología de los cultivos en 3D a largo plazo (Sato et al., 2009, 2011; Xu et al., 2018). Los factores empleados se detallan en el apartado 3.1.4 de Materiales y Métodos. Todos ellos aportan diversas características necesarias al medio: la N-acetilcisteína se usa junto a los antibióticos (penicilina y estreptomina) y el MB, sirviendo como base para la mayoría de cultivos de organoides; la gastrina no interfiere con la diferenciación celular; la nicotinamida suprime la actividad de las sirtuinas; el A8301, un inhibidor de la quinasa similar al receptor de activina 4/5/7 (Alk4/5/7), mejora la eficiencia del plating; el SB202190, un inhibidor de la p38, también mejora la eficiencia del plating (Sato et al., 2011; Xu et al., 2018); el factor de crecimiento epidérmico (EGF) está asociado con la proliferación intestinal; el Noggin induce la expansión de las criptas en las células intestinales; el R-spondin y el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) ayudan a la renovación de las células madre; y la prostaglandina E2 (PGE2) influye en la diferenciación y proliferación celular (Sato et al., 2009)

Además, las células intestinales aisladas experimentan anoikis fuera de su tejido normal, por lo que el Factor Y-27632 es necesario para evitar la muerte celular (Sato et al., 2009, 2011).

Sin embargo, tras observar que algunos organoides con ciertas características comunes no proliferaban adecuadamente, se decidió cambiar el medio de cultivo. Se estableció el medio ST, cuya composición se describe en el apartado 3.1.4 de Materiales y Métodos, que ha sido utilizado previamente en otros estudios para el cultivo de organoides derivados de tejidos no tumorales de colon (Co et al., 2023). Este cambio resultó en una mayor eficiencia en la proliferación de los organoides y se utilizó para el ejemplo de la Fig. 6.

A pesar del éxito de establecimiento de PDOs en diferentes ensayos tanto derivados de tejido colorrectal (Pleguezuelos-Manzano et al., 2020; Roper et al., 2017; Sato et al., 2011) como de otros tipos de tejido (Guillen et al., 2022; Hendriks et al., 2021; Li et al., 2022; Shi et al., 2020), la falta de un protocolo estandarizado para el cultivo de organoides de pacientes con CCR sigue siendo un obstáculo para una adecuada comparación de resultados y el establecimiento de parámetros adecuados. Esta limitación es común en la investigación de organoides y puede afectar a la interpretación de los resultados.

4.2 Inclusión en Parafina e Inmunohistoquímica de los Organoides Basales

En el estudio, se seleccionaron dos organoides establecidos correctamente (CTO122 y CTO65) como modelos para la investigación. Por un lado, se incluyó una sección de tejido tumoral de colon extraído por cirugía de cada paciente en bloques de parafina. Por otro lado, los dos organoides correspondientes a esos pacientes, una vez alcanzaron la densidad adecuada, también se incluyeron en bloques de parafina.

La expresión proteica de *CDX2* en todos los bloques se evaluó mediante inmunohistoquímica, un método de clasificación ya utilizado en estudios previos. Este método ha demostrado ser útil para anticipar un mal pronóstico en pacientes con pérdida de *CDX2*, así como para predecir aquellos que podrían beneficiarse de la quimioterapia (Cecchini et al., 2019; Chiesa-Vottero, 2020; Hinoi et al., 2003).

En la Fig.7, se observan los cortes de tejido del paciente a la izquierda y los de los organoides a la derecha, mostrando la detección de las proteínas de *CDX2* mediante un color marrón.

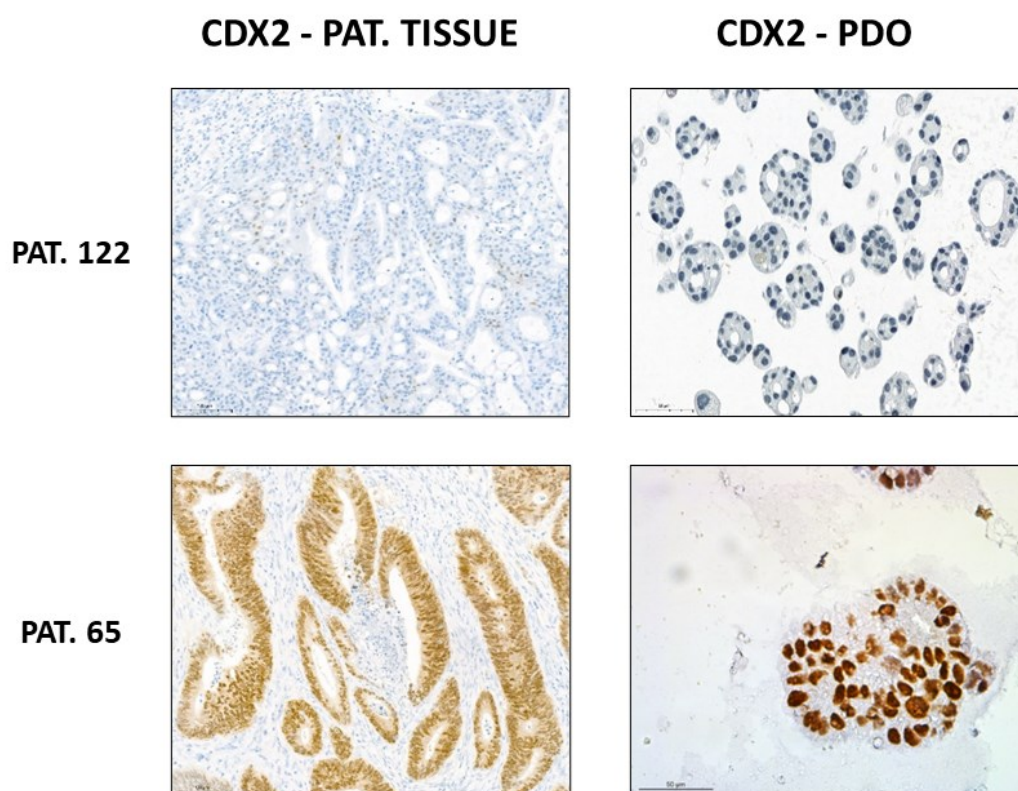


Figura 7. Tinción con inmunohistoquímica para el marcaje de proteínas *CDX2* en los cortes histológicos. En la columna izquierda se muestra el marcaje de *CDX2* en los cortes de tejidos de colon de pacientes con CCR (*CDX2-PAT. TISSUE*), mientras que en la columna derecha se muestra el marcaje de *CDX2* en los cortes de organoides incluidos en parafina derivados de pacientes con CCR (*CDX2-PDO*). En la primera fila se muestran los resultados del paciente 122 (*PAT.122*), mientras que en la segunda fila se muestran los resultados del paciente 65 (*PAT. 65*). Barra de escala a 100µm.

Según los resultados, CTO122 se clasifica como “*CDX2* perdido” debido a la carencia total de expresión de la proteína en el tejido y en los organoides. En contraste, se puede afirmar que CTO65 es “*CDX2* positivo”, ya que presenta una gran expresión de *CDX2* tanto en el tejido como en los organoides que se observa gracias a la tinción marrón.

Existe una carencia significativa de criterios establecidos para la clasificación de la expresión de *CDX2* (Cecchini et al., 2019; Chiesa-Vottero, 2020; Choi et al., 2022). Los diversos estudios publicados han utilizado diferentes enfoques y umbrales para determinar la positividad o negatividad de *CDX2*, lo que dificulta la comparación directa de los resultados.

Esta falta de estandarización impide la adopción de decisiones clínicas sólidas y aprobadas para la administración de terapias personalizadas en pacientes con CCR. Sin un consenso claro sobre cómo definir el estado de *CDX2*, se limita la capacidad de utilizar este biomarcador de manera efectiva en la práctica clínica.

Una vez clasificados los organoides, pueden ser empleados para predecir las respuestas a la quimioterapia en diferentes condiciones de *CDX2*. Esta estrategia ha sido utilizada previamente por otros autores (Hao et al., 2022; Yi et al., 2023) con el objetivo de evaluar la respuesta de los cultivos a diferentes tratamientos y predecir la respuesta similar en pacientes. De esta manera, se puede aplicar el tratamiento más adecuada para cada paciente, basado en la respuesta de sus organoides a la quimioterapia.

4.3 Ensayo de Sensibilidad a Fármacos de Organoides Basales Derivados de Tumores de Colon

Los organoides basales derivados de los pacientes con cáncer colorrectal fueron sometidos a un ensayo de sensibilidad al fármaco compuesto por 5-FU y oxaliplatino, utilizado en el tratamiento estándar de quimioterapia. Esta afección se refleja si una mayor concentración de fármaco se corresponde con un menor crecimiento celular tumoral.

Siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3 de Materiales y Métodos se probaron diferentes concentraciones del fármaco en cultivos de diversos organoides tanto *CDX2* positivos como negativos, incluyendo los mencionados previamente (CTO122 y CTO65). Después de 120 horas, se evaluaron los valores de viabilidad celular respecto a los controles (concentración de fármaco 0), partiendo inicialmente de la misma cantidad de células en todos los casos. Los resultados obtenidos se procesaron mediante una hoja de cálculo y se representaron en la Fig. 8.

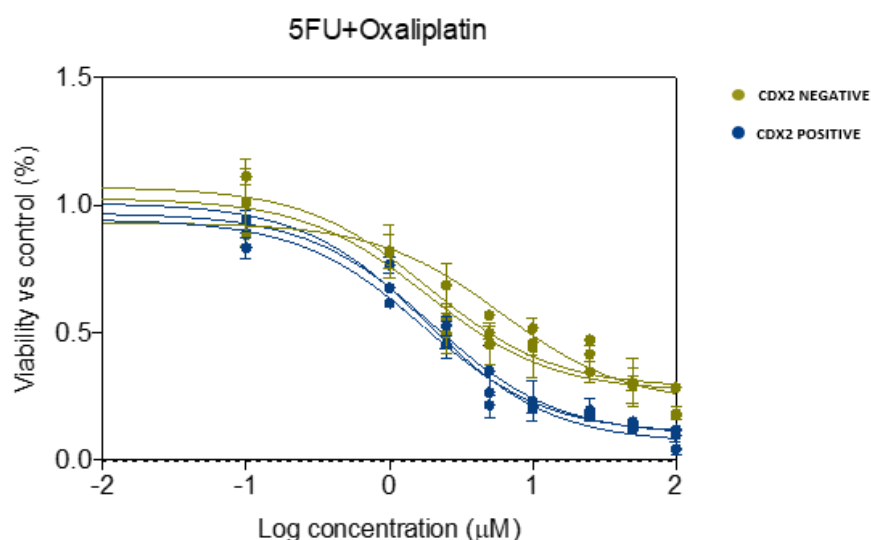


Figura 8. Curva de sensibilidad de varias líneas de organoides al tratamiento combinado de 5-Fluorouracilo y oxaliplatino. Los resultados se agruparon en dos categorías, representadas por colores distintos: los *CDX2* negativos en verde y los *CDX2* positivos en azul. Se representa la viabilidad en porcentaje con respecto a un control sin tratamiento (100%) que normaliza los valores y elimina el efecto del blanco, para las distintas concentraciones ensayadas de los fármacos, expresadas en logaritmo en base 10.

Esta representación visual permite distinguir una gran diferencia entre las tendencias de ambos grupos. Los organoides que han perdido la expresión del gen *CDX2* muestran una mayor viabilidad en comparación con los organoides clasificados como *CDX2* positivos.

A bajas concentraciones de fármaco, la diferencia en viabilidad entre los dos grupos es prácticamente imperceptible. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración del fármaco, ambos grupos experimentan una disminución en viabilidad. Pese a ello, los organoides *CDX2* negativos mantienen una mayor viabilidad en comparación con los *CDX2* positivos. Esta diferencia se vuelve más significativa con el incremento de la concentración de fármaco, confirmando así una menor sensibilidad al tratamiento farmacológico en ausencia del gen *CDX2*.

Los resultados obtenidos en este estudio están en consonancia con otros trabajos recientes que han investigado la respuesta de los organoides de pacientes con CCR a tratamientos quimioterápicos. Por ejemplo, Chen et al. (2022) también evaluaron la sensibilidad de los organoides de pacientes con CCR a la exposición de oxaliplatino y 5-FU, y determinaron la resistencia de pacientes con pérdida de *CDX2*. Este estudio se utilizó para desarrollar un modelo de organoide resistente a oxaliplatino que permitiera investigar dianas terapéuticas potenciales en pacientes con CCR que presentan resistencia a este fármaco.

Otro caso es el de Yi et al. (2023), en el cual se probaron diversos fármacos sobre organoides de pacientes que sufren CCR, entre los cuales se encuentran el oxaliplatino y 5-FU. Ellos demostraron que el 5-FU era el más efectivo a menores concentraciones que los otros fármacos.

Estas conclusiones coinciden con nuestro estudio, que también determinó que los organoides de pacientes con CCR pueden desarrollar resistencia a ciertos tratamientos, como son los fármacos quimioterapéuticos oxaliplatino y 5-FU, lo que resulta muy relevante en el desarrollo de terapias personalizadas a través de una elaborada medicina de precisión.

4.4 Validación de la Edición Génica Mediante CRISPR/dCas9 en los Organoides

La literatura previa ha destacado la importancia de la epigenética en el cáncer, y en particular en el CCR. Tejedor et al. (2023) han demostrado que la hipermetilación de promotores de genes supresores de tumores puede impedir su expresión y función, lo que contribuye al avance del CCR. Aunque se han llevado a cabo experimentos que intentan establecer una relación entre la expresión génica y la epigenética mediante el uso de agentes desmetilantes (Hinoi et al., 2003; Issa et al., 2005), sus resultados no han sido definitivos debido a la inespecificidad de los agentes. Recientemente, se ha comenzado a emplear en algunos ensayos (Tejedor et al., 2023) la tecnología de edición génica mediante CRISPR/dCas9 para estudiar la relación de la epigenómica con el CCR.

De manera novedosa, en este trabajo se abarca la edición génica del gen *CDX2* mediante CRISPR/dCas9 de los dos modelos de organoides: CTO65 y CTO122.

En primer lugar, CTO65, inicialmente positivo para *CDX2*, fue editado genéticamente revirtiendo su expresión mediante la metilación de ciertas islas CpG en el promotor. Estas posiciones específicas altamente funcionales fueron seleccionadas previamente gracias a una revisión bibliográfica, estudio mediante el Programa Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) y análisis de metilación realizada por el grupo de investigación de cáncer colorrectal de INCLIVA. Para la metilación se utilizó la herramienta dCas unida al dominio catalítico DNMT3, lo que resultó en el silenciamiento del gen.

Por otro lado, el CTO122 experimentó una edición opuesta. En este caso, se buscó aumentar la expresión del gen, desmetilando las mismas islas CpG en el promotor mediante la herramienta dCas unida al dominio catalítico TET1, permitiendo así su transcripción.

Todas las ediciones procedieron a ser validadas asegurando el correcto resultado de las mismas tras una selección con antibióticos. Las evaluaciones se realizaron a distintos niveles: ARNm y proteína, del mismo modo que fueron validados los ensayos con CRISPR/Cas9 de otros autores (Deryabin & Borodkina, 2022; Nguyen et al., 2022).

4.4.1 Estudio de la Expresión De ARNm por qPCR

Para verificar la expresión del ARNm en los organoides editados genéticamente mediante CRISPR/dCas9, se realiza una qPCR siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.6.1 de Materiales y Métodos. En este análisis, se utilizan los ARNm extraídos de los organoides estudiados. Estos ARNm son sometidos a una retrotranscripción a ADN complementario (ADNc), a partir del cual se amplifica y cuantifica el gen *CDX2* mediante qPCR. Además, se amplifica el gen de la *actina* en los mismos transcritos para obtener la expresión relativa de *CDX2*. Finalmente, los datos normalizados se representan en las gráficas de la Fig. 9.

A) CDX2: CRISPR DCAS9-DNMT3 (2 transf.) **B) CDX2: CRISPR DCAS9-TET1 (2 transf.)**

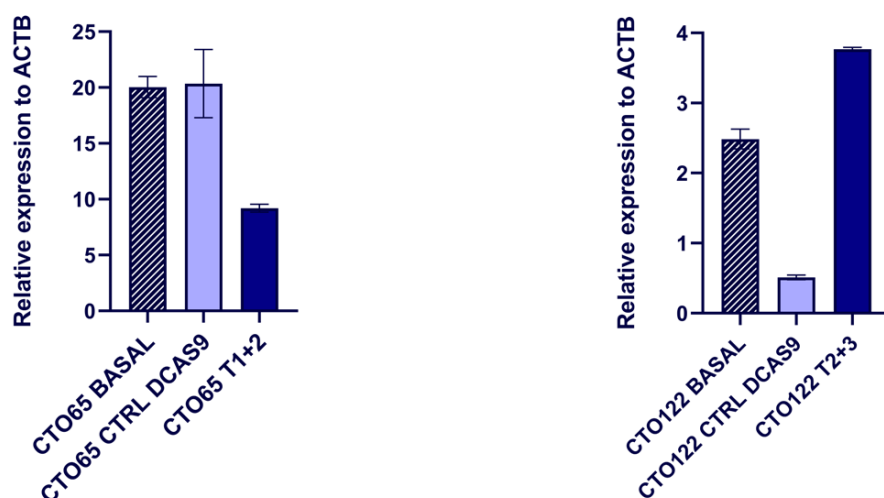


Figura 9. Representación gráfica de la expresión de CDX2 relativa a la β -actina en los distintos organoides frente a sus diferentes condiciones tras la edición génica. En todos los casos se han realizado 2 transfecciones para una mayor eficacia de la edición. **A.** Se muestra la expresión de CDX2 en las diferentes condiciones de CTO65 (CDX2: CRISPR DCAS9-DNMT3 (2 transf.): condición basal (CTO65 BASAL), representada en azul marino rallado; condición control (CTO65 CTRL DCAS9), representado en azul claro; y condición editada genéticamente con las guías T1+2 (CTO65 T1+2), representada en azul oscuro. **B.** Se muestra la expresión de CDX2 en las diferentes condiciones de CTO122 (CDX2: CRISPR DCAS9-TET1 (2 transf.): condición basal (CTO122 BASAL), representada en azul marino rallado; condición control (CTO122 CTRL DCAS9), representado en azul claro; y condición editada genéticamente con las guías T2+3 (CTO122 T2+3), representada en azul oscuro.

Los resultados de la expresión relativa de CTO65 (Fig. 9A) utilizando las guías que resultaron más efectivas para el caso de CDX2 positivo (T1+2), mostraron una disminución de la expresión del gen tras la metilación de las zonas clave del promotor, lo que se evidencia por la diferencia entre los altos valores del basal y del control en comparación con los reducidos valores de expresión del editado por las guías adecuadas.

En el caso de los resultados del CTO122 (Fig. 9B), empleando las guías adecuadas para el caso de CDX2 perdido (T2+3), se muestra el aumento de la expresión del gen tras la desmetilación de las islas CpG más relevantes para la expresión del gen en cuestión en comparación con el basal. Aun así, no se trata de una diferencia demasiado remarcada, probablemente debido a los niveles extremadamente bajos de CDX2 en el organoide basal, que implican una mayor dificultad para aumentar su expresión. Además, el control se encontró incluso más reducido que el basal, posiblemente debido a una pérdida de viabilidad celular causada por la manipulación del organoide.

4.4.2 Estudio de la Traducción de Proteínas por WB

La validación de la traducción proteica mediante Western Blot se realiza porque un aumento en la transcripción del gen a ARNm no implica necesariamente un incremento en la traducción de proteína. Se lleva a cabo el procedimiento descrito en el apartado 3.6.2 de Materiales y Métodos.

En los resultados (Fig. 10) se observa que, en cada uno de los organoides, la *actina* muestra niveles prácticamente iguales, lo cual permite extraer conclusiones seguras sobre la proteína *CDX2*.

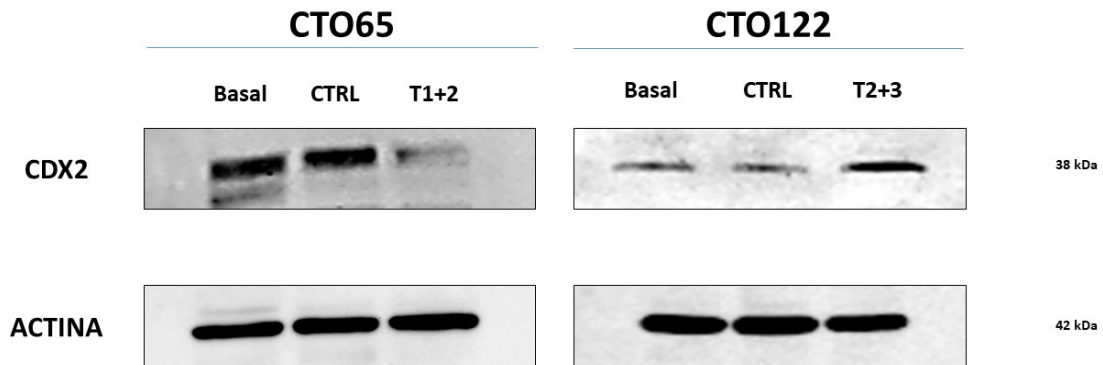


Figura 10. Western Blot de proteína CDX2 y actina en las diferentes líneas de organoides. *Los diferentes niveles de expresión de las proteínas se miden en función de la intensidad de la banda. En la primera fila se muestran las bandas de la proteína CDX2, con un tamaño de 38 kDa. En la segunda fila se presentan las bandas correspondientes a la proteína de la actina, con un tamaño de 42 kDa. La actina, al ser una proteína constitutiva, se expresa de manera uniforme en todas las células, sirviendo como control para asegurar que hay una cantidad igual de muestra en todos los carriles. De este modo, cualquier diferencia en las bandas de CDX2 se debe exclusivamente a variaciones en la traducción de dicha proteína en las células estudiadas. A la izquierda se representan los resultados de expresión proteica de la línea CTO65 en sus tres condiciones de izquierda a derecha: condición basal, condición control (CTRL) y condición editada genéticamente con las guías T1+2. A la derecha se representan los resultados de expresión proteica de la línea CTO122 en sus tres condiciones de izquierda a derecha: condición basal, condición control (CTRL) y condición editada genéticamente con las guías T2+3.*

Para el caso del CTO65 (Fig. 10), se observa una mínima intensidad en los organoides metilados con las guías T1+2 en comparación con el control y el basal, indicando un silenciamiento efectivo por la edición génica. Esto confirma que la metilación de las zonas seleccionadas por las guías conduce a una reducción en la traducción de la proteína *CDX2*, coherente con los resultados de la qPCR.

En cuanto al CTO122 (Fig. 10), aunque las diferencias en la intensidad de las bandas de este organoide son menos notorias, se puede distinguir un aumento en la intensidad en los organoides desmetilados con las guías T2+3 respecto al basal y control. Esto nuevamente confirma la teoría de una mayor traducción de proteínas al desmetilar zonas clave, aunque el efecto es ligeramente más reducido que el CTO65, posiblemente por las mismas causas previamente explicadas en el apartado 4.4.1.

4.5 Ensayo de Sensibilidad a Fármacos de Organoides Editados Genéticamente Derivados de Tumores de Colon

Tras la edición y validación de los organoides modelo del estudio, se llevaron a cabo más ensayos de sensibilidad a fármacos. Para ello, se replicó el ensayo descrito en el apartado 4.3, esta vez utilizando organoides modificados genéticamente.

Se probaron diferentes concentraciones de fármacos en todos los organoides y se realizó un ensayo para cada condición en cada modelo, con tres réplicas por condición para asegurar la fiabilidad de los resultados. Los valores de viabilidad celular, evaluados después de 120 horas de exposición al fármaco, se procesaron y se representan en la Fig. 11.

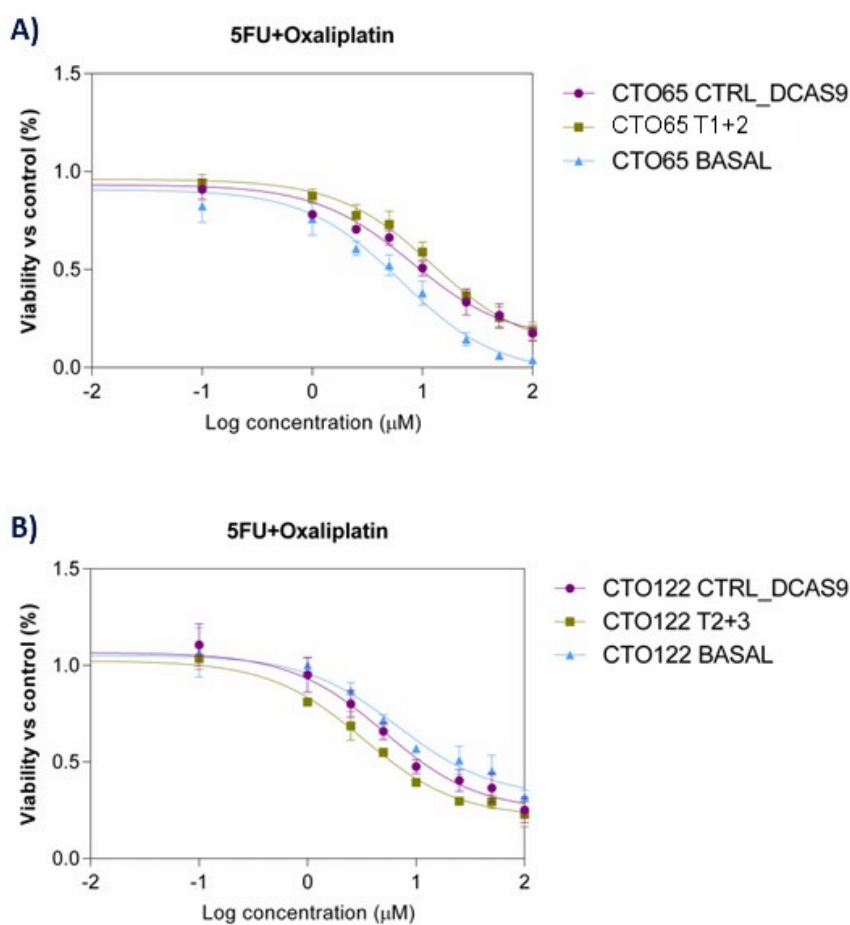


Figura 11. Curvas de sensibilidad de las líneas de organoides ante el tratamiento combinado de 5-Fluorouracilo y oxaliplatino. A. Se representa la viabilidad de las diferentes condiciones de edición génica de la línea de organoides CTO65 en porcentaje con respecto a un control sin tratamiento (100%) que normaliza los valores y elimina el efecto del blanco, para las distintas concentraciones ensayadas de los fármacos, expresadas en logaritmo en base 10. La condición control (CTO65 CTRL_DCAS9 se representa en color morado, la condición de la edición génica con las guías T1+2 (CTO65 T2+3) se representa en color verde y la condición basal (CTO65 BASAL) se representa en color azul. **B.** Se representa la viabilidad de las diferentes condiciones de edición génica de la línea de organoides CTO122 en porcentaje con respecto a un control sin tratamiento (100%) que normaliza los valores y elimina el efecto del blanco, para las distintas concentraciones ensayadas de los fármacos, expresadas en logaritmo en base 10. La condición control (CTO122 CTRL_DCAS9 se representa en color morado, la condición de la edición génica con las guías T2+3 (CTO122 T2+3) se representa en color verde y la condición basal (CTO122 BASAL) se representa en color azul.

Los valores de sensibilidad a fármacos correspondientes al organoide CTO65 (Fig. 11A) muestran que, desde mínimas concentraciones de fármaco, existe diferencia las distintas condiciones y conforme estas aumentan, la diferencia se ve cada vez más pronunciada. Se observa que la condición basal, es decir, con *CDX2* positivo, es más sensible al tratamiento, acabando casi totalmente con la viabilidad de los organoides a altas concentraciones de fármaco. Sin embargo, a pesar de que el control aumenta levemente su resistencia, la condición CTO65 T1+2 que tiene *CDX2* silenciado, ofrece una resistencia y, por tanto, viabilidad mayor al resto de condiciones. La confluencia del CTO65 T2+3 y CTO65 CTRL_DCAS9 al final de la curva es debido al fuerte efecto del fármaco a concentraciones altamente elevadas.

Los valores de sensibilidad a fármacos correspondientes al organoide CTO122 (Fig. 11B) muestran una notoria diferencia de viabilidad entre las distintas condiciones incluso a bajas concentraciones de fármaco. La condición basal, con *CDX2* perdido, muestra una mayor viabilidad celular que los organoides editados genéticamente, lo que se traduce en una mayor resistencia al tratamiento. Además, en este caso, se distingue una variación clara entre el CTO122 CTRL_DCAS9 y el CTO122 editado con las guías T2+3, siendo este último mucho más sensible al fármaco y mostrando un mayor descenso en viabilidad celular. Esto sugiere que las guías T2+3 ofrecen una desmetilación más precisa, cambiando un modelo de expresión perdida a uno de expresión moderada, lo que implica una sensibilización significativa en los organoides editados frente al tratamiento.

Nuevamente, se confirma la hipótesis planteada respecto a la relación entre la epigenética de *CDX2* y la resistencia a fármacos quimioterapéuticos, tal y como se planteaba en el apartado 4.3. Se confirman los resultados previamente contrastados que justificaban también esta relación, demostrando el aumento de resistencia de los organoides en condición de *CDX2* perdido al tratamiento con oxaliplatino y 5-FU (Chen et al., 2022; Yi et al., 2023).

Algunas causas del mal pronóstico provocado por la pérdida de *CDX2* son debido a su función en la diferenciación intestinal, por lo que su ausencia se relaciona con un fenotipo más agresivo y desdiferenciado, que suele ofrecer mayor resistencia a tratamientos. No obstante, también hay estudios (Koh et al., 2016; Takakura et al., 2010) que demuestran una relación directamente proporcional entre la presencia de *CDX2* y la expresión del gen *Resistencia a múltiples fármacos 1 (MDR1)*. *CDX2* es el responsable de la activación de *MDR1*, pues es una de sus dianas como factor de transcripción. En caso de haber una falta de expresión de *CDX2*, el gen *MDR1* reduce también su expresión, lo que lleva a una menor resistencia ante los fármacos quimioterapéuticos. Todo ello sugiere la controversia entre el pronóstico según el estado de *CDX2*, que debería encontrarse en equilibrio para un buen funcionamiento del organismo.

A pesar de ello, lo demostrado en nuestro estudio reitera el aumento de resistencia a ciertos fármacos en ausencia de *CDX2* y, por tanto, tal y como exponen autores como Hansen et al. (2018), un peor pronóstico para esos pacientes.

Estas conclusiones son muy relevantes para la futura investigación clínica, donde *CDX2* se podría convertir en una diana valiosa para nuevos tratamientos personalizados teniendo en cuenta el estado del gen.

5. CONCLUSIÓN

En primer lugar, se logró el establecimiento de una nueva línea de organoides derivado de muestras de tejido normal del paciente 219. No obstante, se demuestra una alta complejidad del proceso debido a muchos factores y variables no controlables actualmente.

Además, también se pudo clasificar correctamente tanto a los pacientes como a sus líneas de organoides CTO65 y CTO122 en *CDX2* positivo y perdido respectivamente, mediante el uso de una tinción de inmunohistoquímica en cortes de parafina.

Por otro lado, a través del ensayo del fármaco combinado de 5-FU y oxaliplatino, se pudo confirmar una relación entre la condición de *CDX2* de los pacientes con CCR y su sensibilidad al tratamiento, estableciendo que aquellos que no expresaban el gen en cuestión resultaban ser más resistentes al fármaco y por tanto derivar en un peor pronóstico.

La reversión de la expresión de *CDX2* en los PDOs mediante la edición con CRISPR/dCas9 fue efectiva, resultando en el crecimiento de los organoides modificados en presencia de los antibióticos selectivos.

Todas las ediciones fueron validadas de manera correcta a nivel transcriptómico mediante qPCR y a nivel proteico mediante WB, obteniendo los resultados esperados de silenciamiento y expresión del gen *CDX2*.

Finalmente, se evaluó con éxito la respuesta al tratamiento combinado de oxaliplatino y 5-FU en los organoides editados tras la reversión de la expresión de *CDX2*, demostrando finalmente la relación clara entre la condición *CDX2* y la resistencia del organoide a los fármacos quimioterapéuticos.

6. REFERENCIAS

- Badia-Ramentol, J., Gimeno-Valiente, F., Duréndez, E., Martínez-Ciarpaglini, C., Linares, J., Iglesias, M., Cervantes, A., Calon, A., & Tarazona, N. (2023). The prognostic potential of CDX2 in colorectal cancer: Harmonizing biology and clinical practice. *Cancer Treatment Reviews*, *121*, 102643. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2023.102643>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *74*(3), 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Cañellas-Socias, A., Cortina, C., Hernando-Momblona, X., Palomo-Ponce, S., Mulholland, E. J., Turon, G., Mateo, L., Conti, S., Roman, O., Sevillano, M., Slebe, F., Stork, D., Caballé-Mestres, A., Berenguer-Llargo, A., Álvarez-Varela, A., Fenderico, N., Novellasdemunt, L., Jiménez-Gracia, L., Sipka, T., ... Batlle, E. (2022). Metastatic recurrence in colorectal cancer arises from residual EMP1+ cells. *Nature*, *611*(7936), 603-613. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05402-9>
- Cecchini, M. J., Walsh, J. C., Parfitt, J., Chakrabarti, S., Correa, R. J., MacKenzie, M. J., & Driman, D. K. (2019). CDX2 and Muc2 immunohistochemistry as prognostic markers in stage II colon cancer. *Human Pathology*, *90*, 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2019.05.005>
- Chen, G., Gong, T., Wang, Z., Wang, Z., Lin, X., Chen, S., Sun, C., Zhao, W., Kong, Y., Ai, H., Yang, H., Liu, Y., Wu, F., Kang, J., Zhao, S., Xiao, X., Sun, J., He, A., & Li, Z. (2022). Colorectal cancer organoid models uncover oxaliplatin-resistant mechanisms at single cell resolution. *Cellular Oncology*, *45*(6), 1155-1167. <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00705-5>
- Chiesa-Vottero, A. (2020). CDX2, SATB2, GATA3, TTF1, and PAX8 Immunohistochemistry in Krukenberg Tumors. *International Journal of Gynecological Pathology*, *39*(2), 170. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000582>
- Choi, H. B., Pyo, J.-S., Son, S., Kim, K., & Kang, G. (2022). Diagnostic and Prognostic Roles of CDX2 Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancers. *Diagnostics*, *12*(3), 757. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12030757>
- Co, J. Y., Klein, J. A., Kang, S., & Homan, K. A. (2023). Suspended hydrogel culture as a method to scale up intestinal organoids. *Scientific Reports*, *13*, 10412. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35657-9>
- Dalerba, P., Sahoo, D., Paik, S., Guo, X., Yothers, G., Song, N., Wilcox-Fogel, N., Forgó, E., Rajendran, P. S., Miranda, S. P., Hisamori, S., Hutchison, J., Kalisky, T., Qian, D., Wolmark, N., Fisher, G. A., van de Rijn, M., & Clarke, M. F. (2016). CDX2 as a Prognostic Biomarker in Stage II and Stage III Colon Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *374*(3), 211-222. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506597>
- Deryabin, P. I., & Borodkina, A. V. (2022). Stromal cell senescence contributes to impaired endometrial decidualization and defective interaction with trophoblast cells. *Human Reproduction*, *37*(7), 1505-1524. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac112>

- Duineveld, L. A. M., van Asselt, K. M., Bemelman, W. A., Smits, A. B., Tanis, P. J., van Weert, H. C. P. M., & Wind, J. (2016). Symptomatic and Asymptomatic Colon Cancer Recurrence: A Multicenter Cohort Study. *Annals of Family Medicine*, 14(3), 215-220. <https://doi.org/10.1370/afm.1919>
- Gamez, M. J. (2022, Mayo). Objetivos y metas de desarrollo sostenible. *Desarrollo Sostenible*. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- Ganesh, K., Wu, C., O'Rourke, K. P., Szeglin, B. C., Zheng, Y., Sauvé, C.-E. G., Adileh, M., Wasserman, I., Marco, M. R., Kim, A. S., Shady, M., Sanchez-Vega, F., Karthaus, W. R., Won, H. H., Choi, S.-H., Pelossof, R., Barlas, A., Ntiamoah, P., Pappou, E., ... Smith, J. J. (2019). A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation. *Nature medicine*, 25(10), 1607-1614. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0584-2>
- Guillen, K. P., Fujita, M., Butterfield, A. J., Scherer, S. D., Bailey, M. H., Chu, Z., DeRose, Y. S., Zhao, L., Cortes-Sanchez, E., Yang, C.-H., Toner, J., Wang, G., Qiao, Y., Huang, X., Greenland, J. A., Vahrenkamp, J. M., Lum, D. H., Factor, R. E., Nelson, E. W., ... Welm, A. L. (2022). A human breast cancer-derived xenograft and organoid platform for drug discovery and precision oncology. *Nature Cancer*, 3(2), 232-250. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00337-6>
- Hansen, T. F., Kjær-Frifeldt, S., Eriksen, A. C., Lindebjerg, J., Jensen, L. H., Sørensen, F. B., & Jakobsen, A. (2018). Prognostic impact of CDX2 in stage II colon cancer: Results from two nationwide cohorts. *British Journal of Cancer*, 119(11), 1367-1373. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0285-5>
- Hao, M., Cao, Z., Wang, Z., Xin, J., Kong, B., Xu, J., Zhang, L., & Chen, P. (2022). Patient-Derived Organoid Model in the Prediction of Chemotherapeutic Drug Response in Colorectal Cancer. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 8(8), 3515-3525. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00354>
- Hendriks, D., Artegiani, B., Hu, H., Chuva de Sousa Lopes, S., & Clevers, H. (2021). Establishment of human fetal hepatocyte organoids and CRISPR–Cas9-based gene knockin and knockout in organoid cultures from human liver. *Nature Protocols*, 16(1), 182-217. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00411-2>
- Henriksen, T. V., Tarazona, N., Frydendahl, A., Reinert, T., Gimeno-Valiente, F., Carbonell-Asins, J. A., Sharma, S., Renner, D., Hafez, D., Roda, D., Huerta, M., Roselló, S., Madsen, A. H., Løve, U. S., Andersen, P. V., Thorlacius-Ussing, O., Iversen, L. H., Gotschalck, K. A., Sethi, H., ... Andersen, C. L. (2022). Circulating Tumor DNA in Stage III Colorectal Cancer, beyond Minimal Residual Disease Detection, toward Assessment of Adjuvant Therapy Efficacy and Clinical Behavior of Recurrences. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 28(3), 507-517. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2404>
- Hinoi, T., Loda, M., & Fearon, E. R. (2003). Silencing of CDX2 Expression in Colon Cancer via a Dominant Repression Pathway *. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44608-44616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307435200>
- Issa, J.-P. J., Kantarjian, H. M., & Kirkpatrick, P. (2005). Azacitidine. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4(4), 275-276. <https://doi.org/10.1038/nrd1698>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures—A comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science: AMS*, 14(4), 910-919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>

- Kawai, H., Tomii, K., Toyooka, S., Yano, M., Murakami, M., Tsukuda, K., & Shimizu, N. (2005). Promoter methylation downregulates CDX2 expression in colorectal carcinomas. *Oncology Reports*, 13(3), 547-551. <https://doi.org/10.3892/or.13.3.547>
- Koh, I., Hinoi, T., Sentani, K., Hirata, E., Nosaka, S., Niitsu, H., Miguchi, M., Adachi, T., Yasui, W., Ohdan, H., & Kudo, Y. (2016). Regulation of multidrug resistance 1 expression by CDX2 in ovarian mucinous adenocarcinoma. *Cancer Medicine*, 5(7), 1546-1555. <https://doi.org/10.1002/cam4.697>
- Li, Z., Xu, H., Yu, L., Wang, J., Meng, Q., Mei, H., Cai, Z., Chen, W., & Huang, W. (2022). Patient-derived renal cell carcinoma organoids for personalized cancer therapy. *Clinical and Translational Medicine*, 12(7), e970. <https://doi.org/10.1002/ctm2.970>
- Lv, T., Shen, L., Xu, X., Yao, Y., Mu, P., Zhang, H., Wan, J., Wang, Y., Guan, R., Li, X., Fu, G., Zhang, L., Wang, Y., Xia, F., Hu, C., Clevers, H., Zhang, Z., & Hua, G. (2023). Patient-derived tumor organoids predict responses to irinotecan-based neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer. *International Journal of Cancer*, 152(3), 524-535. <https://doi.org/10.1002/ijc.34302>
- Marcellinaro, R., Spoletini, D., Grieco, M., Avella, P., Cappuccio, M., Troiano, R., Lisi, G., Garbarino, G. M., & Carlini, M. (2023). Colorectal Cancer: Current Updates and Future Perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, 13(1), 40. <https://doi.org/10.3390/jcm13010040>
- Moding, E. J., Nabet, B. Y., Alizadeh, A. A., & Diehn, M. (2021). Detecting Liquid Remnants of Solid Tumors: Circulating Tumor DNA Minimal Residual Disease. *Cancer Discovery*, 11(12), 2968-2986. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0634>
- Narasimhan, V., Wright, J. A., Churchill, M., Wang, T., Rosati, R., Lannagan, T. R. M., Vrbanac, L., Richardson, A. B., Kobayashi, H., Price, T., Tye, G. X. Y., Marker, J., Hewett, P. J., Flood, M. P., Pereira, S., Whitney, G. A., Michael, M., Tie, J., Mukherjee, S., ... Woods, S. L. (2020). Medium-throughput Drug Screening of Patient-derived Organoids from Colorectal Peritoneal Metastases to Direct Personalized Therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 26(14), 3662-3670. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-0073>
- Nguyen, L. T., Rananaware, S. R., Pizzano, B. L. M., Stone, B. T., & Jain, P. K. (2022). Clinical validation of engineered CRISPR/Cas12a for rapid SARS-CoV-2 detection. *Communications Medicine*, 2, 7. <https://doi.org/10.1038/s43856-021-00066-4>
- Nikanjam, M., Kato, S., & Kurzrock, R. (2022). Liquid biopsy: Current technology and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology*, 15, 131. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>
- Ogunwobi, O. O., Mahmood, F., & Akingboye, A. (2020). Biomarkers in Colorectal Cancer: Current Research and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5311. <https://doi.org/10.3390/ijms21155311>
- 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., Hoes, L. R., Chalabi, M., van der Velden, D., van Leerdam, M., Boot, H., Grootsholten, C., Huitema, A. D. R., Bloemendal, H. J., Cuppen, E., & Voest, E. E. (2021). Prospective experimental treatment of colorectal cancer patients based on organoid drug responses. *ESMO Open*, 6(3), 100103. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100103>

- Papaccio, F., Cabeza-Segura, M., Garcia-Micò, B., Tarazona, N., Roda, D., Castillo, J., & Cervantes, A. (2022). Will Organoids Fill the Gap towards Functional Precision Medicine? *Journal of Personalized Medicine*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/jpm12111939>
- Papaccio, F., García-Mico, B., Gimeno-Valiente, F., Cabeza-Segura, M., Gambardella, V., Gutiérrez-Bravo, M. F., Alfaro-Cervelló, C., Martínez-Ciarpaglini, C., Rentero-Garrido, P., Zúñiga-Trejos, S., Carbonell-Asins, J. A., Fleitas, T., Roselló, S., Huerta, M., Sánchez Del Pino, M. M., Sabater, L., Roda, D., Tarazona, N., Cervantes, A., & Castillo, J. (2023). Proteotranscriptomic analysis of advanced colorectal cancer patient derived organoids for drug sensitivity prediction. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 42(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02591-z>
- Parikh, A. R., Leshchiner, I., Elagina, L., Goyal, L., Levovitz, C., Siravegna, G., Livitz, D., Rhrissorrakrai, K., Martin, E. E., Van Seventer, E. E., Hanna, M., Slowik, K., Utro, F., Pinto, C. J., Wong, A., Danysh, B. P., de la Cruz, F. F., Fetter, I. J., Nadres, B., ... Corcoran, R. B. (2019). Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nature Medicine*, 25(9), 1415-1421. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0561-9>
- Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., van den Brink, S., Geurts, V., Beumer, J., & Clevers, H. (2020). Establishment and Culture of Human Intestinal Organoids Derived from Adult Stem Cells. *Current Protocols in Immunology*, 130(1), e106. <https://doi.org/10.1002/cpim.106>
- Purandare, N. C., Dua, S. G., Arora, A., Shah, S., & Rangarajan, V. (2010). Colorectal cancer – patterns of locoregional recurrence and distant metastases as demonstrated by FDG PET / CT. *The Indian Journal of Radiology & Imaging*, 20(4), 284-288. <https://doi.org/10.4103/0971-3026.73545>
- Ramakrishnan, A.-B., Chen, L., Burby, P. E., & Cadigan, K. M. (2021). Wnt target enhancer regulation by a CDX/TCF transcription factor collective and a novel DNA motif. *Nucleic Acids Research*, 49(15), 8625-8641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab657>
- Roper, J., Tammela, T., Cetinbas, N. M., Akkad, A., Roghanian, A., Rickelt, S., Almqdadi, M., Wu, K., Oberli, M. A., Sánchez-Rivera, F. J., Park, Y. K., Liang, X., Eng, G., Taylor, M. S., Azimi, R., Kedrin, D., Neupane, R., Beyaz, S., Sicinska, E. T., ... Yilmaz, Ö. H. (2017). In vivo genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis. *Nature Biotechnology*, 35(6), 569-576. <https://doi.org/10.1038/nbt.3836>
- Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., Es, J. H. van, Brink, S. van den, Houdt, W. J. van, Pronk, A., Gorp, J. van, Siersema, P. D., & Clevers, H. (2011). Long-term Expansion of Epithelial Organoids From Human Colon, Adenoma, Adenocarcinoma, and Barrett's Epithelium. *Gastroenterology*, 141(5), 1762-1772. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>
- 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., & Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262-265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Sheng, S., Bernardo, M. M., Dzinic, S. H., Chen, K., Heath, E. I., & Sakr, W. A. (2018). Tackling tumor heterogeneity and phenotypic plasticity in cancer precision medicine: Our experience and a literature review. *Cancer metastasis reviews*, 37(4), 655-663. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9767-4>

- Shi, R., Radulovich, N., Ng, C., Liu, N., Notsuda, H., Cabanero, M., Martins-Filho, S. N., Raghavan, V., Li, Q., Mer, A. S., Rosen, J. C., Li, M., Wang, Y.-H., Tamblyn, L., Pham, N.-A., Haibe-Kains, B., Liu, G., Moghal, N., & Tsao, M.-S. (2020). Organoid Cultures as Preclinical Models of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 26(5), 1162-1174. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1376>
- Takakura, Y., Hinoi, T., Oue, N., Sasada, T., Kawaguchi, Y., Okajima, M., Akyol, A., Fearon, E. R., Yasui, W., & Ohdan, H. (2010). CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Research*, 70(17), 6767-6778. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4701>
- Tejedor, J. R., Peñarroya, A., Gancedo-Verdejo, J., Santamarina-Ojeda, P., Pérez, R. F., López-Tamargo, S., Díez-Borge, A., Alba-Linares, J. J., González-del-Rey, N., Urdinguio, R. G., Mangas, C., Roberti, A., López, V., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldán-Arjona, T., Meijón, M., Valledor, L., Cañal, M. J., ... Fraga, M. F. (2023). CRISPR/dCAS9-mediated DNA demethylation screen identifies functional epigenetic determinants of colorectal cancer. *Clinical Epigenetics*, 15, 133. <https://doi.org/10.1186/s13148-023-01546-1>
- Tomasik, B., Garbicz, F., Braun, M., Bieńkowski, M., & Jassem, J. (2024). Heterogeneity in precision oncology. *Cambridge Prisms: Precision Medicine*, 2, e2. <https://doi.org/10.1017/pcm.2023.23>
- Tsimberidou, A. M., Fountzilas, E., Nikanjam, M., & Kurzrock, R. (2020). Review of Precision Cancer Medicine: Evolution of the Treatment Paradigm. *Cancer treatment reviews*, 86, 102019. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102019>
- Tuveson, D., & Clevers, H. (2019). Cancer modeling meets human organoid technology. *Science (New York, N.Y.)*, 364(6444), 952-955. <https://doi.org/10.1126/science.aaw6985>
- World Health Organization. (2022). *Cancer Today*. <https://gco.iarc.who.int/today/>
- World Health Organization. (2023, Julio). *Colorectal cancer*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>
- Xu, H., Lyu, X., Yi, M., Zhao, W., Song, Y., & Wu, K. (2018). Organoid technology and applications in cancer research. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0662-9>
- Yao, Y., Xu, X., Yang, L., Zhu, J., Wan, J., Shen, L., Xia, F., Fu, G., Deng, Y., Pan, M., Guo, Q., Gao, X., Li, Y., Rao, X., Zhou, Y., Liang, L., Wang, Y., Zhang, J., Zhang, H., ... Hua, G. (2020). Patient-Derived Organoids Predict Chemoradiation Responses of Locally Advanced Rectal Cancer. *Cell Stem Cell*, 26(1), 17-26.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.10.010>
- YI, K., PARK, S. H., KIM, D. U., JEON, D. Y., LEE, H. J., SONG, G. A., JO, H. J., BAEK, D. H., HAN, J. H., & LEE, B. C. (2023). Patient-derived Organoid Model for Predicting the Chemoresponse in Patients With Colorectal Cancer. *In Vivo*, 37(4), 1751-1759. <https://doi.org/10.21873/invivo.13263>
- Zygulska, A. L., & Pierzchalski, P. (2022). Novel Diagnostic Biomarkers in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 852. <https://doi.org/10.3390/ijms23020852>