



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

Desarrollo de organoides tumorales de última generación
derivados de pacientes con cáncer de pulmón no
microcítico.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Adam Girbés, Ángela

Tutor/a: Jantus Lewintre, Eloisa

Cotutor/a externo: Munera Maravilla, Ester

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**Desarrollo de organoides tumorales de última
generación derivados de pacientes con cáncer de
pulmón no microcítico**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Àngela Adam Girbés

TUTOR/A UPV: Dra. Eloisa Jantus-Lewintre

TUTOR/A INSTITUCIÓN: Dra. Ester Munera Maravilla

Curso académico: 2023/2024

Valencia, Julio 2024

TÍTULO

Desarrollo de organoides tumorales de última generación derivados de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El cáncer constituye la principal causa de mortalidad en países desarrollados. A pesar de los avances en los últimos años en investigación, el cáncer de pulmón sigue siendo el cáncer con la mayor tasa de mortalidad a nivel mundial. En este contexto, los organoides tumorales derivados de pacientes (PDTOs) se proponen como un potencial modelo *in vitro* para el estudio de la carcinogénesis, desarrollo, evolución y mecanismos de resistencia a fármacos en este tipo de cáncer.

OBJETIVO: El principal objetivo del presente estudio es establecer PDTOs a partir de tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) para su validación como modelo preclínico de estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se han incluido 12 muestras de tejido tumoral resecado de pacientes diagnosticados con CPNM recogidas por el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV). Se ha evaluado el crecimiento de los organoides en distintos medios de cultivo, la expresión de marcadores mediante inmunofluorescencia y la detección de mutaciones mediante *Next Generation Sequencing* (NGS). Adicionalmente, se ha estudiado el efecto del Cisplatino, un quimioterápico, sobre un cultivo de PDTO. Por último, se han testado matrices sintéticas para el desarrollo de organoides como alternativa al Matrigel.

RESULTADOS: El 41 % de las muestras recogidas lograron establecerse como PDTOs. La caracterización por inmunofluorescencia reveló que los PDTOs conservan los marcadores histológicos del tumor del que provienen. Sin embargo, mediante secuenciación se observan cambios en las alteraciones génicas entre el tumor y su correspondiente PDTO a lo largo de las generaciones. La viabilidad del cultivo de PDTO testado con Cisplatino no se vio afectada en ninguna de las concentraciones evaluadas. Por último, ninguna de las matrices sintéticas logró mantener el cultivo de organoides a lo largo del tiempo.

CONCLUSIONES: Este estudio ha demostrado la importancia de la optimización del cultivo (medio de cultivo, matriz extracelular) para el desarrollo y mantenimiento de PDTOs a partir de tejido tumoral de pacientes con CPNM. No obstante, futuros estudios son requeridos para ratificar los PDTOs como plataforma de estudio preclínica.

PALABRAS CLAVE

Cáncer de pulmón no microcítico, cultivo, organoides tumorales derivados de paciente, matriz, modelo *in vitro*.

TITLE

Development of next-generation tumor organoids derived from non-small cell lung cancer patients.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cancer is the leading cause of mortality in developed countries. Despite recent advances in research, lung cancer remains the cancer with the highest mortality rate worldwide. In this context, patient-derived tumor organoids (PDTOs) are proposed as a potential *in vitro* model for studying carcinogenesis, development, progression, and drug resistance mechanisms in this type of cancer.

OBJECTIVE: The main objective of this study is to establish PDTOs from tumor tissue of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) to validate them as a preclinical study model.

MATERIALS AND METHODS: 12 samples of resected tumor tissue from patients diagnosed with NSCLC were collected by Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV). The growth of the organoids in different culture media, the expression of markers by immunofluorescence, and the detection of mutations by Next Generation Sequencing (NGS) were evaluated. Additionally, the effect of Cisplatin, a chemotherapeutic agent, on a PDO culture was studied. Finally, synthetic matrices were tested for organoid development as an alternative to Matrigel.

RESULTS: 41 % of the collected samples were successfully established as PDTOs. Characterization by immunofluorescence revealed that the PDTOs retained the histological markers of the original tumor. However, sequencing showed changes in gene alterations between the tumor and its corresponding PDO over generations. The viability of the PDO culture tested with Cisplatin was not affected at any of the evaluated concentrations. Lastly, none of the synthetic matrices was able to maintain the organoid culture over time.

CONCLUSIONS: This study has demonstrated the importance of optimizing the culture conditions (culture medium, extracellular matrix) for the development and maintenance of PDTOs from patient tumor tissue with NSCLC. However, further studies are required to confirm PDTOs as a preclinical study platform.

KEYWORDS

Non-small cell lung cancer, culture, patient-derived tumor organoids, matrix, *in vitro* model.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Eloisa Jantus-Lewintre por darme la oportunidad de realizar el Trabajo de Fin de Grado en su laboratorio. En general, gracias a todas las personas que forman parte de su equipo por enseñarme todo lo que he aprendido en esta etapa y hacerme sentir como una más desde el primer día que entré al laboratorio.

A la Dra. Ester Munera por guiarme en estos últimos meses de mi etapa, aconsejándome y ayudándome siempre que lo necesitaba. Gracias por tu paciencia y tus palabras de ánimo.

A mis padres, mi hermana y mi abuela por confiar en mí cuando ni yo lo hacía y soportar mis (muchos) días de agobio. Gracias por darlo todo por mí.

A mi abuelo que, aunque no pueda leer estas palabras, está siempre presente y me acompaña en este camino. Por fin puedo decirte que lo he conseguido.

A mi mejor amiga Ainoa por estar siempre a mi lado y creer en mí, tanto en lo académico como en lo personal.

A todos mis amigos de la carrera por acompañarme estos años, por todos los buenos momentos compartidos y echarme una mano siempre que lo he necesitado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CÁNCER DE PULMÓN	1
1.1.1. Epidemiología y factores de riesgo	1
1.1.2. Subtipos histológicos y moleculares	2
1.1.3. Diagnóstico y manejo clínico	2
1.2. MODELOS 3D <i>IN VITRO</i>	3
1.2.1. Organoides Tumorales Derivados de Pacientes	3
1.2.1.1. Matrices extracelulares tridimensionales	4
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1. MUESTRAS	7
3.2. ESTABLECIMIENTO DE PDTOS	7
3.2.1. Composición de los medios de organoides	7
3.3. MANTENIMIENTO Y CRIOPRESERVACIÓN DE LOS PDTOS	8
3.4. MATRICES SINTÉTICAS	8
3.4.1. Evaluación de la viabilidad celular	9
3.4.2. Disgregación de las matrices sintéticas	9
3.5. CARACTERIZACIÓN DEL TUMOR PRIMARIO	9
3.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS ORGANOIDES	9
3.6.1. Inmunofluorescencia	9
3.6.2. <i>Next Generation Sequencing</i>	10
3.6.2.1. Extracción de ADN	10
3.6.2.2. Preparación de librerías y secuenciación	10
3.6.2.3. Análisis de datos	11
3.7. CRIBADO FARMACOLÓGICO	11
3.7.1. Ensayo de viabilidad celular	12
4. RESULTADOS	13
4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES	13
4.2. ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LOS PDTOS	13
4.3. DESARROLLO DE ORGANOIDES EN LAS MATRICES SINTÉTICAS	17
4.4. RECAPITULACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL TUMOR PARENTAL	23
4.4.1. Estudio de los marcadores histológicos	23

4.4.2. Estudio de las alteraciones genéticas	26
4.5. CRIBADO FARMACOLÓGICO.....	31
5. DISCUSIÓN	33
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA.....	38
ANEXOS.....	42
ANEXO 1. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030.	42
ANEXO 2. DOCUMENTO INFORMADO AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO.....	43
ANEXO 3. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA ORGANOIDES: (A) CLÁSICO (B) AO COMPLETO (C) AO CONDICIONADO. AO: <i>Airway Organoid</i>	48
ANEXO 4. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LA COHORTE Y SUS CORRESPONDIENTES BIOMARCADORES EN LAS MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL. ND: no disponible; VAF%: valor porcentual de la frecuencia de la variante alélica... 50	50
ANEXO 5. RECIBO DE TURNITIN	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de mortalidad de los principales tipos de cáncer en todo el mundo en hombres y mujeres por 100.000 habitantes en el año 2022 (GLOBOCAN, 2022). En el eje Y se representan los tipos tumorales y en el eje X el número de casos por 100.000 habitantes/año mundialmente. ASR: Age-Standardized Rate.....	1
Figura 2. Características que recapitulan los organoides tumorales derivados de pacientes (Bae et al., 2022).	4
Figura 3. Diseño experimental para evaluar la citotoxicidad de cisplatino en PDTOs del paciente con ID 609. DMF: Dimetilformamida; DMSO: Dimetilsulfóxido; DOXO: Doxorubicina; CIS: Cisplatino.....	12
Figura 4. Representación gráfica del porcentaje de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón no microcítico incluidos en el presente estudio según la (A) Histología pulmonar y el (B) Hábito tabáquico.....	13
Figura 5. Seguimiento a lo largo del cultivo celular del PDTO del paciente con ID 554 en distintos medios de cultivo. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; AO: airway organoid; P: número de pase. Escala de medida: 200 µm.....	14
Figura 6. Seguimiento a lo largo del cultivo celular del PDTO del paciente con ID 571 en distintos medios de cultivo. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; AO: airway organoid; P: número de pase. Escala de medida: 200 µm.....	15
Figura 7. Seguimiento a lo largo del cultivo celular del PDTO del paciente con ID 609 en distintos medios de cultivo. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; AO: airway organoid; P: número de pase. Escala de medida: 200 µm.....	16
Figura 8. Seguimiento a lo largo del cultivo celular del PDTO del paciente con ID 626 en distintos medios de cultivo. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; AO: airway organoid; P: número de pase. Escala de medida: 200 µm.....	17
Figura 9. Imágenes de microscopía en campo claro a lo largo del crecimiento del cultivo primario del paciente con ID 435 en las distintas matrices, a las 48 horas, 7 días y 14 días. Escala de medida: 200 µm.	18
Figura 10. Imágenes de microscopía confocal de la tinción Calceína/PI para evaluar la viabilidad del cultivo primario derivado del paciente con ID 435 en las distintas matrices, a las 48 horas, 7 días y 14 días. Tinción con Calceína (verde) y PI (rojo). Escala de medida: 200 µm.....	18
Figura 11. Imágenes del proceso de disgregación de las matrices sintéticas. Imágenes de microscopía de los organoides establecidos a partir del cultivo primario derivado del paciente con ID 435 antes de la disgregación y fotografías de la matriz remanente observada después de la disgregación de las matrices sintéticas con heparinasa. (A) Bulk; (B) Bulk + RGD; (C) IOPAL80.	19
Figura 12. Imágenes de microscopía del crecimiento del cultivo primario del paciente con ID 435 en las distintas matrices tras resembrar los organoides obtenidos por la disgregación con heparinasa (imágenes tomadas a día 2 y día 13 post disgregación). (A) Bulk; (B) Bulk + RGD; (C) IOPAL80. Escala de medida: 200 µm.	20
Figura 13. Imágenes de microscopía del cultivo de los PDTOs del paciente con ID 626 en las distintas matrices, 24 horas después de sembrar las células. Escala de medida: 200 µm.....	21
Figura 14. Evaluación de la viabilidad de los PDTOs para el paciente ID 626 en Matrigel® y en matrices PEG a los 5 días de cultivo. Tinción con Calceína (verde) y Yoduro de propidio (rojo) en las matrices: (A) Matrigel®; (B) Bulk; (C) Bulk + RGD; (D) IOPAL80; (E) IOPAL80 + RGD. Escala de medida: 100 µm.	22

Figura 15. Imágenes de microscopía del cultivo de PDT0 del paciente con ID 626 en las matrices sintéticas tras la disgregación con heparinasa. (A) Bulk; (B) Bulk + RGD; (C) IOPAL80; (D) IOPAL80 + RGD. Fotos tomadas a 20X.	22
Figura 16. Imágenes de microscopía del cultivo de PDT0 del paciente con ID 626 en las matrices sintéticas tras la disgregación con Cell Recovery Solution. (A) Bulk; (B) Bulk + RGD; (C) IOPAL80; (D) IOPAL80 + RGD. Fotos tomadas a 20X.	23
Figura 17. Caracterización histológica de los tumores primarios de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Inmunohistoquímica para la detección de P40 (marcados de histología escamosa) y TTF1 (marcador de adenocarcinoma) en las muestras ID 554, ID571 e ID 609. Fotos tomadas a 20X utilizando el microscopio Olympus BX53.	24
Figura 18. Caracterización por inmunofluorescencia de los organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Tinción con DAPI (tinción nuclear), P40, TTF1, Vimentina y Pan CK. (A) PDT0 del paciente con ID 554 pase 9; (B) PDT0 del paciente con ID 609 pase 3; (C) PDT0 del paciente con ID 626 pase 4. PDT0: organoide tumoral derivado de paciente. P: número de pase; CK: Citoqueratina. Escala de medida: 100 µm.	25
Figura 19. Análisis de los parámetros de calidad llevados a cabo por el Ion Suite Software. (A) Análisis de la densidad de las partículas ISP empleadas para la secuenciación; (B) Lecturas útiles totales de la secuenciación y análisis de las lecturas eliminadas; (C) Longitud media de las lecturas (pb); (D) Porcentaje del número de bases alineadas de todas las lecturas. ISP: Ion Spheres Particles; pb: pares de bases.	26
Figura 20. Análisis de las alteraciones génicas del paciente con ID 554 presentes en el tejido tumoral, en el PDT0 P0 y PDT0 P6. A) Mapa de calor de la agrupación de las muestras según las variantes detectadas y el impacto biológico de las mismas. (B) Descripción de las variantes detectas y el porcentaje de frecuencia de la variante alélica en los PDT0s establecidos y su tumor parental. PDT0: organoide tumoral derivado de paciente; P: número de pase, VAF: Frecuencia de la variante alélica.....	27
Figura 21. Análisis de las alteraciones génicas del paciente con ID 571 presentes en el tejido tumoral y en el PDT0 P0. (A) Mapa de calor de la agrupación de las muestras según las variantes detectadas y el impacto biológico de las mismas. (B) Descripción de las variantes detectas y el porcentaje de frecuencia de la variante alélica en los PDT0s establecidos y su tumor parental. PDT0: organoide tumoral derivado de paciente; P: número de pase. VAF: Frecuencia de la variante alélica.	28
Figura 22. Análisis de las alteraciones génicas del paciente con ID 609 presentes en el tejido tumoral, en el PDT0 P0 y PDT0 P4. (A) Mapa de calor de la agrupación de las muestras según las variantes detectadas y el impacto biológico de las mismas. (B) Descripción de las variantes detectas y el porcentaje de frecuencia de la variante alélica en los PDT0s establecidos y su tumor parental. PDT0: organoide tumoral derivado de paciente; P: número de pase. VAF: Frecuencia de la variante alélica.....	29
Figura 23. Análisis de las alteraciones génicas del paciente con ID 626 presentes en el tejido tumoral, en el PDT0 P0 y PDT0 P5. (A) Mapa de calor de la agrupación de las muestras según las variantes detectadas y el impacto biológico de las mismas. (B) Descripción de las variantes detectas y el porcentaje de frecuencia de la variante alélica en los PDT0s establecidos y su tumor parental. PDT0: organoide tumoral derivado de paciente; P: número de pase. VAF: Frecuencia de la variante alélica.....	30
Figura 24. Imágenes de microscopía de los PDT0s del paciente con ID 609 a las 72 horas y a los 6 días posteriores al tratamiento con los antineoplásicos. (A) Tratamiento con Doxorrubucina; (B) Tratamiento con Cisplatino. Escala de medida: 200 µm.	31

Figura 25. Representación gráfica de los porcentajes de viabilidad celular del PDT0 del paciente con ID 609 frente a las concentraciones de los antineoplásicos. (A) Tratamiento con Cisplatino; (B) Tratamiento con Doxorrubicina. Hechas en GraphPad.....	32
Figura 26. Recapitulación de los resultados obtenidos en el presente trabajo. PDT0: organoide tumoral derivado de paciente; P: número de pase; CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico. Hecha en Biorender.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos empleados para la inmunofluorescencia. (A) Anticuerpos primarios; (B) Anticuerpos secundarios.....	10
Tabla 2. Muestras de PDTOs y de tejido tumoral del cual derivan secuenciadas utilizando Oncomine Comprehensive Assay Plus. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente.....	26

RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030.

El presente trabajo está altamente relacionado con el ODS 3: Salud y bienestar, y el ODS 17: Alianzas para lograr los objetivos. Además, el trabajo está relacionado, aunque en menor medida, con el ODS 9: Industria, innovación e infraestructura (Anexo 1).



ABREVIATURAS:

ADC: Adenocarcinoma

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AO: *Airway organoid*

ASR: tasa estandarizada por edad (del inglés *Age-Standardized Rate*)

CAF: Fibroblastos asociados con el cáncer (del inglés *Cancer-associated fibroblast*)

CAM-DR: Resistencia a fármacos mediada por adhesión celular (del inglés *Cell Adhesion Mediated Drug Resistance*)

CCE: Carcinoma de células escamosas

CK: Citoqueratina

CNV: Alteración en el número de copias (del inglés *Copy number variation*)

CP: Cultivo primario

CPCNP: Cáncer de pulmón de células no pequeñas

CPCP: Cáncer de pulmón de células pequeñas

CPM: Cáncer de pulmón microcítico

CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico

CHGUV: Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECM: Matriz extracelular (del inglés *Extracellular Matrix*)

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés *Epidermal growth factor receptor*)

EHS: Engelbreth-Holm-Swarm

FBS: suero bovino fetal (del inglés *Fetal Bovine Serum*)

IC50: Valor de concentración inhibitoria media

IHQ: Inmunohistoquímica

KRAS: oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten (del inglés *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*)

MBM: *Minimum Basal Medium*

NGS: *Next Generation Sequencing*

pb: pares de bases

PBS: solución salina tamponada con fosfatos (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)

PDTO: Organoide tumoral derivado de paciente (del inglés *Patient-derived tumor organoid*)

PEG: Polietilenglicol

PI: Yoduro de propidio (del inglés *Propidium iodide*)

PIC: Poliisocianopéptidos

PIK3CA: subunidad alfa catalítica de la fosfatidilinositol-3-quinasa (del inglés *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*)

PTEN: homólogo de fosfatasa y tensina (del inglés *Phosphatase and tensin homolog*)

RGD: Arginina-Glicina-Ácido aspártico

SNP: Polimorfismo de nucleótido único (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*)

TME: Microambiente tumoral (del inglés *Tumor Microenvironment*)

TP53: proteína tumoral p53

TTF-1: factor de transcripción tiroideo 1 (del inglés *Thyroid Transcription Factor 1*)

VAF: Frecuencia de la variante alélica (del inglés *Variant Allele Frequency*)

WES: Secuenciación del exoma entero (del inglés *Whole Exome Sequencing*)

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER DE PULMÓN

1.1.1. Epidemiología y factores de riesgo

El cáncer de pulmón se encuentra entre los cuatro tipos de cáncer más prevalentes en la sociedad actual. En el año 2022, fue el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia con una incidencia del 12,4 % (2.480.675) y una mortalidad del 18,7 % (1.817.469) para ambos sexos (Bray et al., 2024), representando la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda en mujeres (Figura 1).

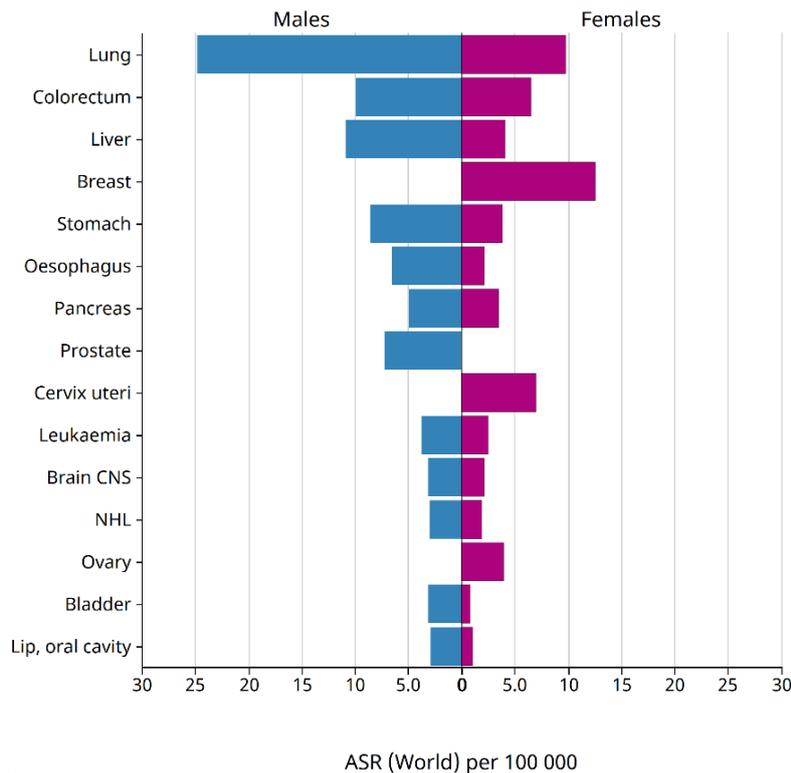


Figura 1. Tasa de mortalidad de los principales tipos de cáncer en todo el mundo en hombres y mujeres por 100.000 habitantes en el año 2022 (GLOBOCAN, 2022). En el eje Y se representan los tipos tumorales y en el eje X el número de casos por 100.000 habitantes/año mundialmente. ASR: Age-Standardized Rate.

La principal causa de desarrollo de cáncer de pulmón es el tabaquismo. El exceso de riesgo entre los fumadores continuos en relación con el de los que nunca han fumado es del orden de 20 a 50 veces. Aunque el riesgo relativo disminuye en los exfumadores y el efecto favorable de dejar de fumar es evidente, es probable que el exceso de riesgo a lo largo de la vida persista en aquellas personas que han dejado de fumar hace mucho tiempo (Malhotra et al., 2016). Distintos estudios han demostrado que mutaciones en el codón 12 del gen *KRAS* conducen al desarrollo de la enfermedad en fumadores (Akhtar & Bansal, 2017). En cambio, las mutaciones de *EGFR* (como Ex19del y Leu858Arg) se asociaron con el cáncer de pulmón frecuentemente en no fumadores (Kuśnierczyk, 2023).

Por otro lado, un historial familiar positivo en cáncer de pulmón aumenta 1,7 veces el riesgo de aparición de la enfermedad. Si los antecedentes se encuentran entre familiares de primer grado, el riesgo aumenta de 2 a 4 veces, incluso cuando se controla el historial de tabaquismo (Thandra et al., 2021). Estudios genéticos centrados en la identificación de mutaciones y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) mostraron que las variaciones en 5p15.33, 6p21.33 y 15q25.1 influyen en el riesgo de cáncer en las poblaciones europeas, en 22q12 y el locus 15q15.2 se han asociado altamente con un mayor riesgo de cáncer de pulmón y la variación 9p21.3 es un determinante

de riesgo importante en el cáncer de pulmón de células escamosas (Akhtar & Bansal, 2017). También se ha visto que el riesgo de cáncer de pulmón aumenta en el marco del síndrome de Li-Fraumeni, caracterizado por una mutación germinal en el gen supresor de tumores *TP53* (Malhotra et al., 2016).

1.1.2. Subtipos histológicos y moleculares

Desde el punto de vista histológico, el cáncer de pulmón se divide principalmente en dos grandes grupos, el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) también conocido como cáncer de pulmón microcítico (CPM) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) o cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) (Nooreldeen & Bach, 2021).

El CPCP es un cáncer agresivo de origen neuroendocrino fuertemente asociado con el tabaquismo e identificado en el 25% de los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón. Se caracteriza por un tiempo de duplicación rápido y metástasis temprana. En consecuencia, el 60-70% de los pacientes presentan enfermedad en estadio avanzado en el momento del diagnóstico (Thirusangu & Vigneshwaran, 2020).

El 85% restante de los pacientes son diagnosticados como CPNM siendo el 75% diagnosticado en etapas avanzadas, cuando la cirugía no es posible (Herrerros-Pomares et al., 2019). A su vez, el CPNM se divide en adenocarcinoma (ADC), carcinoma de células escamosas (CCE), y carcinoma de células grandes. El adenocarcinoma es el tipo más común de CPNM y representa aproximadamente el 40% de los cánceres de pulmón (Duma et al., 2019).

Además de la clasificación histológica, el cáncer de pulmón también se ha clasificado según subtipos moleculares. Los subtipos moleculares principales incluyen mutaciones en el gen o en la vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), así como en los genes *KRAS* y *ALK*. Los subtipos secundarios incluyen sobreexpresión o mutaciones en *c-MET*, deleciones o metilaciones en *PTEN*, sobreexpresión de *VEGFR*, traslocación en *ROS1*, alteraciones epigenéticas y alteraciones del *IGF* (Akhtar & Bansal, 2017), sobreexpresión de *HER2*, mutaciones en *NTRK* y amplificación y alteraciones en *PIK3CA* (Grodzka et al., 2023; West et al. 2012).

1.1.3. Diagnóstico y manejo clínico

Históricamente, las únicas pruebas diagnósticas disponibles para detectar el cáncer de pulmón en sus primeras etapas eran la radiografía de tórax y la citología del esputo. Sin embargo, los resultados de estos dos métodos fracasaron en los ensayos clínicos y no pudieron demostrar su eficacia como herramientas de detección masiva (Nooreldeen & Bach, 2021). Actualmente, la biopsia se ha vuelto indispensable para el diagnóstico del cáncer de pulmón mediante la confirmación de la presencia de células cancerosas de pulmón, así como para la selección del tratamiento adecuado mediante pruebas genéticas moleculares (Park et al., 2020).

La evaluación inicial generalmente se realiza con una radiografía de tórax, una tomografía computarizada y/o una tomografía por emisión de positrones. La identificación precisa de subtipos histológicos específicos debe realizarse en muestras de tejido recolectadas de diversas maneras, como broncoscopia, aspiración con aguja transbronquial, aspiración transtorácica con aguja fina o biopsia central entre otras. La diferenciación general entre los subtipos se basa en las características morfológicas de las muestras tumorales teñidas con hematoxilina y eosina (Šutić et al., 2021). Los CPNM con formación de glándulas (esto incluye características histológicas relacionadas, como crecimiento papilar o lepidico) en la tinción de rutina y/o producción de mucina (que incluye la mucina identificada con tinciones de mucina en tumores de patrón sólido) se clasifican como ADC. Los CPNM con queratinización y/o puentes intercelulares en la tinción de rutina se clasifican como CCE (Cagle et al., 2016).

Además del tejido tumoral, la biopsia líquida se ha convertido en una valiosa fuente de material con fines diagnósticos en cáncer, pues tiene un mayor potencial para la detección temprana del cáncer que las biopsias de tejido y promover la terapia individualizada, así como para analizar biomarcadores predictivos (Wang et al., 2024). Es una forma mínimamente invasiva de obtener fácilmente muestras de fluido biológico de los pacientes, como es la sangre, orina, ascitis, líquido pleural..., por lo que se presenta como un tipo de muestra alternativa cuando la muestra de tejido tumoral no está disponible, es inapropiada o es difícil de obtener (Ilié & Hofman, 2016). Es una potencial herramienta para sortear la heterogeneidad del tumor e identificar pacientes candidatos que puedan responder a la terapia, monitorizar dinámicamente el efecto del tratamiento y revelar mecanismos de resistencia (Li et al., 2022).

1.2. MODELOS 3D *IN VITRO*

Convencionalmente, los sistemas de cultivos celulares 2D han proporcionado una herramienta para investigar las bases moleculares de la biología tumoral y promover el desarrollo preclínico de muchos fármacos contra el cáncer a lo largo de los años (Fontana et al., 2021). Sin embargo, los cultivos de células cancerosas en monocapa exhiben una morfología celular anormal, que difiere de las células *in vivo*, influyendo en muchos procesos celulares, incluida la proliferación, diferenciación, apoptosis y expresión de genes y proteínas (Edmondson et al., 2014). Más importante aún, los cultivos 2D carecen de aspectos fisiológicos clave del microambiente tumoral (TME), como son las interacciones célula-célula y célula-matriz, la migración e invasión celular y los gradientes de oxígeno, nutrientes y estímulos externos (Xin et al., 2019).

Por todo ello, es crucial el desarrollo de modelos 3D en la investigación del cáncer, capaces de imitar el complejo microambiente de los tumores *in vivo*, incluida la morfología y topografía del tumor, la regulación positiva de proteínas proangiogénicas, la dispersión de factores biológicos y químicos, las interacciones célula-célula y célula-matriz, gradientes de oxígeno y nutrientes, y una composición de matriz extracelular (ECM) más realista (Abuwatfa et al., 2024).

Entre los modelos 3D, los esferoides y organoides representan los modelos más versátiles y prometedores debido a que son capaces de recapitular la heterogeneidad y fisiopatología de los cánceres humanos (Zanoni et al., 2020).

Los esferoides son agregados de células que se cultivan en condiciones no adherentes y forman una estructura tridimensional, pero carecen de organización compleja y especialización funcional y, a menudo, tienen una población celular homogénea. En cambio, los organoides son estructuras tridimensionales de células que pueden autoorganizarse asemejándose a órganos específicos utilizando hidrogeles como andamios para apoyar el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (Kaur et al., 2021). Estos modelos tridimensionales exhiben una organización celular compleja, una orientación espacial y una función similar a la del tejido *in vivo*, compuesto por múltiples tipos de células, y pueden usarse para estudiar el desarrollo de órganos, el modelado de enfermedades y el cribado de fármacos (Silva-Pedrosa et al., 2023).

1.2.1. Organoides Tumorales Derivados de Pacientes

En cuanto a los organoides, destacan los organoides tumorales derivados de paciente (PDTOs). Son cultivos derivados de tejido de pacientes obtenidos a través de muestras resecadas quirúrgicamente, biopsias de tejidos o células tumorales circulantes que pueden crecer hasta convertirse en organoides tumorales después de su inclusión en una matriz extracelular en 3D (Foo et al., 2022). Se han convertido en un modelo favorable para predecir el tratamiento contra el cáncer, puesto que mantienen mejor las características genéticas y fenotípicas clave de su tumor parental (Grönholm et al., 2021) entre otras, tal y como se muestra en la Figura 2.

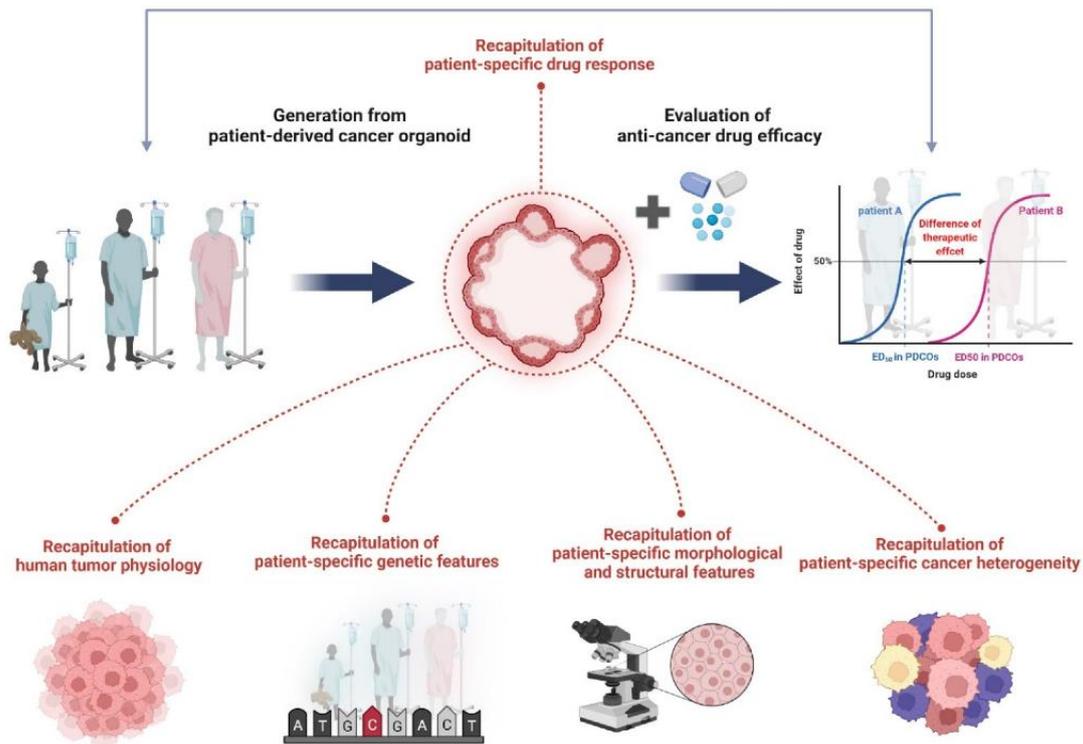


Figura 2. Características que recapitulan los organoides tumorales derivados de pacientes (Bae et al., 2022).

Varios estudios prominentes han mostrado que los PDTOs son capaces de predecir la respuesta de los medicamentos en pacientes, impulsando el uso de estos como una herramienta de medicina de precisión. No obstante, es importante tener en cuenta la variabilidad del organoide intra e interpaciente, incluidas las diferencias de tamaño, las heterogeneidades celulares y la dinámica de respuesta temporal para el cribado de fármacos. Por ello, actualmente surgen enfoques basados en imágenes para desenredar las complejidades que influyen en la respuesta a los medicamentos. La imagen de células vivas mediante microscopía confocal junto con técnicas de análisis de datos puede capturar una amplia gama de parámetros que se pueden utilizar para determinar el comportamiento celular y la eficacia de los medicamentos en PDTOs (Wang et al., 2021).

Sin embargo, una de las limitaciones que destaca en el establecimiento y aplicación de PDTOs es que generalmente no son capaces de preservar las células no cancerosas presentes en el TME. Las células estromales, como los fibroblastos asociados con el cáncer (CAFs), también son un componente crucial del TME y generalmente se pierden al cultivar PDTOs a largo plazo. Para superar esta limitación, se han desarrollado diferentes estrategias de cocultivo para incorporar estos componentes del TME en los PDTOs. Estas estrategias se pueden agrupar en métodos holísticos y métodos de reconstitución (Podaza et al., 2022). En el enfoque holístico, se cultiva una suspensión de células tumorales en una interfase aire-líquido que incluye todos los tipos de células tumorales, células inmunes endógenas y fibroblastos (Yang et al., 2021). En cambio, el método de reconstitución se basa en establecer los cultivos de cada componente por separado y luego combinarlos para ensayos posteriores (Podaza et al., 2022).

1.2.1.1. Matrices extracelulares tridimensionales

El Matrigel® es reconocido como el biomaterial por excelencia para la expansión de organoides. Es un extracto de membrana basal, purificado del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) (Heo et al., 2022) compuesto principalmente de laminina y colágeno IV (Kaur et al., 2021). Sin embargo, el uso de Matrigel® u otro extracto de matriz de origen animal

compuestos por factores de crecimiento indefinidos resultan en una variabilidad en sus propiedades bioquímicas indeseable entre diferentes lotes. Como consecuencia, se ve reflejada la falta de reproducibilidad en experimentos de cultivo celular (Kaur et al., 2021) así como una carencia en la uniformidad de los organoides, lo que convierte los PDTOs en una plataforma inadecuada para la detección de fármacos a gran escala o la evaluación de alto rendimiento (Shariati et al., 2021).

En consecuencia, se han realizado esfuerzos para desarrollar matrices sintéticas o semisintéticas en las que todos los componentes estén bien definidos y puedan afinarse para lograr propiedades deseables, como los andamios de hidrogel a base de polietilenglicol (PEG) (Podaza et al., 2022), y sus derivados, como ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), poli-L-lactida (PLLA), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poliacrilamida (PAM), ácido poliacrílico (PAA), poli(metacrilato de 2-hidroxiethyl) (PHEMA) y poliuretano (PU) (Kaur et al., 2021). Estos hidrogeles a base de PEG poseen interesantes propiedades fisicoquímicas, como su rigidez ajustable, que puede variar en seis órdenes de magnitud. Son biológicamente inertes debido a su carácter hidrófilo, que evita la unión inespecífica a las proteínas, pero han demostrado que encapsulan con éxito células manteniendo la viabilidad celular (Pérez del Río et al., 2020). Además, pueden combinarse con proteínas de señalización, como pequeñas moléculas de unión a integrinas o péptidos bioactivos mediante reticulación química/enzimática para promover el crecimiento de células madre y organoides (Kaur et al., 2021).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el campo actual de la investigación en cáncer de pulmón, los organoides derivados de pacientes se han propuesto como una potencial herramienta para el estudio del cáncer. Por tanto, el desarrollo y la optimización de nuevos modelos tridimensionales de pacientes derivados de tumores (PDTOs) que recapitulen la biología del tumor lograrán: (i) servir como una herramienta innovadora que pueda transferirse a otro tipo de tumores, (ii) permitir la creación de un extenso repositorio de 3D-PDTOs para estudios preclínicos y (iii) ayudar a impulsar la traslación a la clínica de enfoques terapéuticos más personalizados.

El objetivo principal del presente estudio es optimizar el establecimiento de organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico como plataforma preclínica de estudio. Para ello, los objetivos secundarios propuestos son:

1. Evaluar diferentes medios de cultivo para optimizar el establecimiento de PDTOs de larga duración.
2. Evaluar y optimizar el uso de matrices extracelulares sintéticas para el desarrollo de PDTOs.
3. Caracterizar los organoides establecidos y comprobar si recapitulan adecuadamente las características moleculares del tumor parental, mediante técnicas de inmunofluorescencia y secuenciación masiva.
4. Evaluar el uso de PDTOs como plataformas preclínicas de cribado farmacológico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS

En este trabajo se han incluido muestras de tejido tumoral resecado de pacientes del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) con diagnóstico clínico e histológico de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) en estadios I-IV (8vo TNM, ISALC) que no hayan recibido tratamiento previo. En todos los casos, el patólogo es responsable de la selección de las porciones tumorales utilizadas con fines de investigación. Las muestras incluidas en el estudio cuentan con datos clínicos asociados. Todas las muestras cuentan con el consentimiento informado correspondiente aprobado por el comité ético institucional (Anexo 2). Nuestro trabajo sigue rigurosamente los principios éticos establecidos por la Normativa de Helsinki en investigación médica, garantizando el respeto absoluto a los derechos y la seguridad de los participantes.

Las muestras quirúrgicas de CPNM se reciben en el laboratorio con una frecuencia media de 1,5 muestras por semana. La muestra se recoge en Advanced DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 1 % de antibiótico (penicilina y estreptomina) (Thermo Fisher Scientific) y se transporta en hielo hasta el laboratorio. El tejido tumoral se corta con ayuda de un bisturí en piezas de 1 mm² aproximadamente y es criopreservado en suero bovino fetal (FBS) (Thermo Fisher Scientific) al 10 % de DMSO (Merck) hasta su posterior procesado.

3.2. ESTABLECIMIENTO DE PDTOS

El tejido criopreservado (en FBS y DMSO al 10 %) se descongela y recoge con la ayuda de una pipeta, y se incuba a 37 °C durante 2 horas en medio de disgregación compuesto por Advanced DMEM/F12 suplementado con 1 mg/mL de colagenasa (Thermo Fisher Scientific), 1 mg/mL de dispasa (Thermo Fisher Scientific), DNAsa al 0,001 % (Merck), penicilina/estreptomina al 1% e inhibidor de ROCK (Selleckchem) a una concentración final de 10 µM. La incubación se mantiene en agitación intermitente para conseguir individualizar las células de la muestra tumoral. A continuación, se filtra el medio con las células disgregadas a través de un filtro de 70 µm que retiene los trozos de tejido y se neutralizan las enzimas de disgregación con medio libre de suero. Posteriormente se centrifuga 5 minutos a 1.000 rpm y se evalúa la viabilidad con azul de tripano (Thermo Fisher Scientific).

Las células disgregadas fueron sembradas en Matrigel® (Corning) en 12 pocillos de una placa de 96 pocillos de superficie de ultra baja adherencia y de fondo redondo (Thermo Fischer Scientific). Se sembró una densidad de 50.000 células/pocillo con una relación 1:3 de medio:Matrigel®. Posteriormente, se incubó la placa durante 30 minutos a 37 °C para que tenga lugar la gelificación del Matrigel® y, una vez gelificado, se añadieron 200 µL de medio de organoides a cada pocillo y se mantuvo el cultivo celular a 37 °C y 5 % de CO₂ a lo largo del estudio.

3.2.1. Composición de los medios de organoides

Las células disgregadas fueron sembradas en Matrigel® bajo las mismas condiciones en tres medios distintos denominados en este trabajo como Clásico, AO Condicionado y AO Completo, para la formación de organoides. Los tres medios tienen como medio de cultivo base el Advanced DMEM/F12 suplementado con 1% de penicilina/estreptomina y 1% de L-Glutamina (Thermo Fisher Scientific).

En función del medio de cultivo a emplear, este medio base es complementado con diferentes factores tal y como se detalla en el Anexo 3. La composición de los medios AO Completo y AO Condicionado es idéntica, con la excepción de la concentración de Noggin y R-spondin1. En el medio AO Completo se adicionan Noggin y R-spondina purificadas y adquiridas comercialmente mientras que, en el medio AO Condicionado dichas proteínas se obtienen a partir de células

modificadas genéticamente que producen estas proteínas y las liberan al medio de cultivo (HEK293-mNoggin-Fc; 293T-RSPOMCherry, cedidas amablemente por el laboratorio del Dr. Hans Clevers y el Dr. Luis Paz-Ares, respectivamente). El medio de cultivo en el que están presentes dichas proteínas es utilizado para suplementar el medio de cultivo de organoides AO condicionado.

3.3. MANTENIMIENTO Y CRIOPRESERVACIÓN DE LOS PDTOS

Una vez generado el cultivo tridimensional, se debe cambiar el medio 2 veces por semana quitando 100 μ L de medio y añadiendo 100 μ L de medio fresco de organoides. El indicador de pH nos puede orientar acerca de cuándo se necesita realizar el cambio de medio, ya que el color rojo vira a amarillento a causa de la acidificación del medio por acción del metabolismo celular. A su vez, cada día hay que observar al microscopio cada pocillo y comprobar que los organoides están creciendo correctamente y que no hay ningún tipo de contaminación.

- **Mantenimiento:** Los PDTOs establecidos se han mantenido mediante pases de cultivo celular a lo largo del tiempo. Para ello, se elimina el medio de los pocillos, se añaden 100 μ L/pocillo de Cell Recovery Solution (Corning) y se recoge todo en un mismo tubo. Se incuba en hielo durante 30 minutos y, posteriormente, se añade medio Advanced DMEM/F12 y se centrifuga a 0,6 G durante 5 minutos. A continuación, se resuspende el pellet en 300 μ L de TrypLE™ Express 1x (Thermo Fisher Scientific) y se incuba a 37 °C durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se neutraliza la acción del TrypLE™ Express 1X con 700 μ L de medio de cultivo, se centrifuga a 0,4 G durante 5 minutos y se resuspenden las células con el medio de organoides y el Matrigel® con una relación 1:3 de medio:Matrigel®. Por último, se deposita una gota de 20 μ L de Matrigel® con las células en el fondo del pocillo de la placa de ultra baja adherencia de fondo redondo y, después de incubar la placa durante 30 minutos a 37 °C, se añaden 200 μ L de medio de organoides y se mantiene el cultivo celular a 37 °C y 5 % de CO₂.
- **Criopreservación:** Con el fin de tener un reservorio o colección privada de PDTOs establecidos, estos han sido criopreservados a lo largo de los diferentes pases de cultivo. Los organoides se disgregan y se congelan en célula única. Los pasos a seguir son idénticos a los descritos previamente para realizar el pase de organoides hasta la neutralización del TrypLE™ Express 1X. Una vez neutralizado, se recogen las células y se realiza un conteo celular con la cámara de Neubauer. Posteriormente, se centrifugan a 0,4 G durante 5 minutos y se congelan en 1 mL de FBS (Thermo Fisher Scientific) con DMSO al 10 % (Merck) por vial. Son almacenados en el congelador a -80 °C y pasadas 24 horas, los viales se transfieren a un tanque de Nitrógeno Líquido.

3.4. MATRICES SINTÉTICAS

En el presente trabajo se han desarrollado matrices sintéticas compuestas por PEG y heparina (Bulk, IOPAL80) en colaboración con el ICMA B (IP: Dra. Judith Guasch). Además, con el objetivo de incrementar la adhesión celular, se añadió el péptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) a cada matriz, obteniendo como resultado otras dos matrices denominadas Bulk + RGD, IOPAL80 + RGD.

Se ha evaluado la capacidad de formación de organoides en estas matrices utilizando un cultivo primario derivado de paciente con CPNM (CP435) y un organoide derivado de paciente (PDTO 626). En el caso del cultivo primario, se sembraron 10.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de ultra baja adherencia de fondo plano que contenía las matrices sintéticas. Por lo que respecta al PDTO, los organoides en Matrigel® fueron disgregados tal y como se describió en el punto 3.3., y las células fueron sembradas a una densidad de 7.500 células/pocillo.

Posteriormente, en ambos casos se incubó la placa durante 30 minutos a 37 °C con el objetivo de que las células penetren por los poros de las matrices y, posteriormente, se añadieron 100 µL de medio de organoides a cada pocillo y se mantuvo el cultivo celular a 37 °C y 5 % de CO₂ a lo largo del estudio.

3.4.1. Evaluación de la viabilidad celular

Con el fin de evaluar la viabilidad de los organoides en las matrices sintéticas, se realizó un marcaje con Calceína y Yoduro de Propidio (Calceína/PI). Para llevarlo a cabo, se retira el medio del pocillo y se añade Calceína (Abcam) a 2 µM y Yoduro de Propidio (Abcam) a 4 µM en PBS 1X. Se deja incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se observa la fluorescencia bajo el microscopio confocal.

Para el cultivo primario, este ensayo se llevó a cabo a las 48 horas, 7 días y 14 días posteriores a la siembra de las células en las matrices. En cambio, para la evaluación de la viabilidad del cultivo del PDT0, este ensayo se realizó pasados los 5 días de cultivo.

3.4.2. Disgregación de las matrices sintéticas

La disgregación de las matrices sintéticas, tanto para el cultivo primario como para el PDT0, se llevó a cabo con heparinasa (Iduron). Para ello, se retira el medio de los pocillos, se añade heparinasa a una concentración de 0,025 UI en PBS 1X para disgregar las matrices de Bulk y Bulk + RGD y se deja incubar a 37 °C durante 30 minutos en agitación constante a 300 rpm. Para disgregar las matrices IOPAL80 y IOPAL80 + RGD, se añade heparinasa a una concentración de 0,05 UI en PBS 1X y se incuba durante 45 minutos bajo las mismas condiciones mencionadas previamente.

Por otro lado, en el caso del experimento realizado con el PDT0 626, se evaluó la disgregación mediante la adición de Cell Recovery Solution. Para ello se retira el medio de los pocillos y se añaden 100 µL por pocillo de Cell Recovery Solution, se deja incubar en frío y se estudia cómo se degrada la matriz en el tiempo a través de su observación al microscopio. Cada cierto tiempo, se lleva a cabo una disgregación mecánica mediante pipeteo para incrementar el rendimiento del proceso.

3.5. CARACTERIZACIÓN DEL TUMOR PRIMARIO

La descripción histológica y caracterización inmunohistoquímica de las biopsias de los tumores primarios, obtenidas a partir de resección quirúrgica, fueron realizadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Valencia (HGUV), utilizando el microscopio Olympus BX53.

3.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS ORGANOIDES

3.6.1. Inmunofluorescencia

El primer paso es fijar los organoides con PFA al 4 % (Thermo Fisher Scientific) en PBS 1X, a pH 7,4 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se lava 3 veces con PBS 1X y se trata con TritonX-100 al 0,5 % (Thermo Fisher Scientific) en PBS 1X durante 10 minutos, con el objetivo de permeabilizar los organoides y permitir la entrada de los anticuerpos al citoplasma. Volver a lavar 3 veces con PBS 1X e incubar con la solución de bloqueo que contiene FBS al 1 % en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Una vez transcurrido el tiempo, se añaden los anticuerpos primarios expuestos en la Tabla 1A y se deja incubar toda la noche a 4 °C en cámara húmeda.

Al día siguiente, se centrifuga a 0,5 G durante 5 minutos y se lava con PBS 1X. Seguidamente se añaden los anticuerpos secundarios que se muestran en la Tabla 1B, en solución de bloqueo y se

incuban 1 hora a temperatura ambiente. Es importante realizar este paso y todos los siguientes en oscuridad, ya que los anticuerpos secundarios son sensibles a la luz. A continuación, se añade DAPI (Thermo Fisher Scientific) a una dilución 1:1000 de DAPI:PBS 1X y se deja incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar y centrifugar, los organoides se resuspenden en 50 μ L de medio de montaje y se agrega una gota sobre el portaobjetos. Se coloca el cubreobjetos boca abajo con cuidado sobre el medio de montaje. Una vez seco, se procede a la observación de la muestra al microscopio.

Tabla 1. Anticuerpos empleados para la inmunofluorescencia. (A) Anticuerpos primarios; (B) Anticuerpos secundarios.

A. Anticuerpos primarios					
Epítipo	Clon	Proveedor	Referencia	Huésped	Dilución
TTF1	D2E8	CELL SIGNALING	#12373	Conejo	1:50
Pan-Citoqueratina	AE1/AE3	ABCAM	ab80826	Ratón	1:50
P40	EPR17863-47	ABCAM	ab203826	Conejo	1:100
Vimentina	EPR3776	ABCAM	ab92547	Ratón	1:250
B. Anticuerpos secundarios					
Epítipo	Conjugado	Proveedor	Referencia	Huésped	Dilución
IgG de Conejo	Alexa Fluor 488	THERMO FISHER	A-11034	Cabra	1:200
IgG de Ratón	Alexa Fluor 647	THERMO FISHER	A-31571	Burro	1:200

3.6.2. Next Generation Sequencing

3.6.2.1. Extracción de ADN

Se extrajo el ADN del tejido tumoral conservado a -80 °C con RNA later y de sus correspondientes PDTOs establecidos tempranamente (pase 0, P0) así como en pases más tardíos (P4, P5, P6), siguiendo el protocolo del fabricante del kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN). Brevemente, en el caso del tejido primario, para lisar la muestra, el tejido se disgrega mecánicamente con ULTRA-TURRAX (Thermo Fisher Scientific) y 80 μ L de PBS. Posteriormente se añaden 100 μ L de ATL (tampón de lisis usado en la purificación de ADN) y 20 μ L de Proteinasa K. La muestra se deja a 56 °C en el termobloque hasta conseguir la disgregación del tejido (aproximadamente 2 horas). Una vez el tejido ha sido disgregado, se añaden otros 200 μ L de AL y se vuelve a llevar al termobloque a 70 °C durante 10 minutos. En el caso de los PDTOs, se le añaden 200 μ L de PBS, 20 μ L de proteasa y 200 μ L de AL (un tampón de lisis) y se dejan en el termobloque a 56 °C durante 10 minutos para conseguir la disgregación de las células del organoide. A partir de este punto, el procedimiento para ambos es el mismo. Se añaden las muestras a las columnas, se centrifuga y se descarta el tubo colector. Se realizan lavados con Buffer AW1 y AW2. Se centrifuga y se descarta el tubo colector. Finalmente, para eluir las muestras, se utilizará agua libre de nucleasas, empleando 50 μ L para eluir el ADN proveniente del tejido tumoral y 25 μ L para eluir el ADN proveniente de los cultivos celulares. La cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante Qubit dsDNA BR assay (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit.

3.6.2.2. Preparación de librerías y secuenciación

Una vez extraído el ADN, se procede a la preparación de las librerías para cada una de las muestras. Para ello se hace uso del panel de secuenciación Oncomine Comprehensive Assay Plus (Thermo Fisher), siguiendo el protocolo del fabricante descrito en Oncomine Comprehensive Assay Plus User Guide. Brevemente, para la preparación de las librerías se amplifican por PCR las regiones diana diseñadas en el panel seleccionado y los fragmentos resultantes se preparan para ser secuenciados. En primer lugar, se hace una digestión parcial del ADN y se ligan los

adaptadores o barcodes para poder diferenciar de qué muestra proviene cada secuencia. Una vez amplificadas y purificadas, se cuantifica la concentración de cada una de las librerías mediante RT-qPCR (LightcyclerR 480 II (Roche)). Seguidamente se prepara el “pool” de librerías que incluye todas las muestras a secuenciar en una carrera. Se procede a colocar los reactivos necesarios en el Ion Chef™ Instrument (Thermo Fisher Scientific). Se instalan los chips correspondientes en el secuenciador y se añaden las librerías diluidas y ya combinadas en el tubo de muestras de librerías. La secuenciación se lleva a cabo mediante la plataforma de secuenciación Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific). Esta tecnología se basa en un chip semiconductor capaz de detectar iones H⁺ cada vez que se incorpore un nucleótido en el ADN molde.

3.6.2.3. Análisis de datos

Para el análisis de resultados de las muestras procesadas en NGS, se utilizan dos softwares proporcionados por la propia plataforma de secuenciación. En primer lugar, el análisis primario se realiza automáticamente mediante el uso del software Torrent Suite™ (ThermoFisher Scientific). Este incluye la llamada de bases, la alineación de lecturas, el filtrado y recorte de lecturas, y el mapeo al genoma de referencia hg19-GRCh37. Se revisó la calidad de las carreras, considerándose como satisfactoria cuando se obtuvieron más del 60% de lecturas útiles y la media de longitud de lectura fuera ≥ 60 pares de bases (pb).

Posteriormente, se ha llevado a cabo una comparación de las frecuencias de las variantes alélicas (VAF) de las variantes detectadas entre el tejido tumoral y los correspondientes PDTOs establecidos. Para ello, se descargan los resultados de los análisis en un archivo TSV. Con ayuda del Excel, se filtraron las variantes, en este caso se seleccionaron las variantes de un solo nucleótido (SNVs), y se compararon los porcentajes de las frecuencias de las variantes alélicas (VAF) obtenidas para cada uno de los genes, tanto en la secuenciación del tejido tumoral como en pases tempranos (P0) y tardíos (P4, P5, P6) de los PDTOs. Además, se ha realizado un análisis de impacto de variantes mediante el uso del software Ion Reporter™, el cual proporciona una representación visual del impacto que tienen las variantes detectadas en la secuencia de los genes, así como en la secuencia, estructura y función de las proteínas afectadas. Los datos se han representado en forma de mapa de calor.

3.7. CRIBADO FARMACOLÓGICO

Para la realización del cribado farmacológico, los PDTOs establecidos en Matrigel® fueron disgregados y se sembraron y embebieron de nuevo en Matrigel® a una densidad de 7.500 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de ultra baja adherencia y de fondo redondo, tal y como se describió en el apartado 3.3. A los 7 días post-siembra, se añadieron los distintos antineoplásicos. Como controles experimentales se han usado células tratadas con el vehículo DMF (Merck) y células tratadas con Doxorrubicina (Merck) como control interno de toxicidad a concentraciones crecientes de 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M y 10 μ M, con su vehículo DMSO (Merck). El compuesto seleccionado a testar fue el Cisplatino (Selleckchem) y se evaluó a concentraciones crecientes de 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M. Se realizaron quintuplicados técnicos. Transcurridas las 72 horas, se realizó el ensayo de viabilidad celular. En paralelo, se realizó el mismo experimento, a diferencia de que en este caso los PDTOs recibieron una redosis a las 72 horas después de haber sido tratados por primera vez, y se evaluó su viabilidad transcurridos 6 días desde la primera dosis.

	1	2	3	4	5	6
A	ID 609 7500 cells DOXO 0.1µM	ID 609 7500 cells DOXO 0.5µM	ID 609 7500 cells DOXO 0.5µM			
B	ID 609 7500 cells CIS 1µM	ID 609 7500 cells CIS 5µM	ID 609 7500 cells CIS 10µM	ID 609 7500 cells CIS 20µM	ID 609 7500 cells DOXO 0.5µM	ID 609 7500 cells DOXO 0.5µM
C	ID 609 7500 cells CIS 1µM	ID 609 7500 cells CIS 5µM	ID 609 7500 cells CIS 10µM	ID 609 7500 cells CIS 20µM	ID 609 7500 cells DOXO 1µM	ID 609 7500 cells DOXO 1µM
D	ID 609 7500 cells CIS 1µM	ID 609 7500 cells CIS 5µM	ID 609 7500 cells CIS 10µM	ID 609 7500 cells CIS 20µM	ID 609 7500 cells DOXO 1µM	ID 609 7500 cells DOXO 1µM
E	ID 609 7500 cells CIS 1µM	ID 609 7500 cells CIS 5µM	ID 609 7500 cells CIS 10µM	ID 609 7500 cells CIS 20µM	ID 609 7500 cells DOXO 10µM	ID 609 7500 cells DOXO 10µM
F	ID 609 7500 cells CIS 1µM	ID 609 7500 cells CIS 5µM	ID 609 7500 cells CIS 10µM	ID 609 7500 cells CIS 20µM	ID 609 7500 cells DOXO 10µM	ID 609 7500 cells DOXO 10µM
G	ID 609 DMF 0.1%	ID 609 DMF 0.1%	ID 609 DMF 0.1%	ID 609 DMSO 0.1%	ID 609 DMSO 0.1%	ID 609 DMSO 0.1%
H	ID 609 SOLO CELLS	ID 609 SOLO CELLS	ID 609 SOLO CELLS	MEDIO	MEDIO	MEDIO
PDTO 609						

Figura 3. Diseño experimental para evaluar la citotoxicidad de cisplatino en PDTOs del paciente con ID 609. DMF: Dimetilformamida; DMSO: Dimetilsulfóxido; DOXO: Doxorubicina; CIS: Cisplatino.

3.7.1. Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular de los PDTOs se analizó pasadas las 72 horas y 6 días de exposición a los compuestos seleccionados, mediante CellTiter-Glo 3D (Promega). Este ensayo determina la cantidad de células viables en cultivo cuantificando ATP, lo que indica la presencia de células metabólicamente activas. Para ello, se induce la lisis celular y se genera una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. De esta manera, la cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Este ensayo de viabilidad celular se lleva a cabo siguiendo el protocolo descrito por el fabricante de CellTiter-Glo® 3D Viability Assay Protocol. Brevemente, consiste en eliminar 100 µL de medio de cada pocillo, añadir 100 µL del reactivo y traspasar el sobrenadante a una placa multipocillo de paredes opacas y fondo plano (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente se incuba durante 5 minutos a 22 °C en agitación a 300 rpm para inducir la lisis celular, seguido de otros 25 minutos a temperatura ambiente para que se establezca la señal de luminiscencia. La lectura de la placa tratada se lleva a cabo por triplicado y se hace la media de las lecturas obtenidas para cada uno de los pocillos.

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular en cada pocillo, se realiza el cociente entre el valor de luminiscencia obtenido para cada pocillo que ha sido tratado (X) y el valor obtenido por el vehículo del fármaco ($X_{vehículo}$) (DMF en el caso de Cisplatino y DMSO en el caso de Doxorubicina), restándole a cada uno de ellos el valor de luminiscencia obtenido del medio sin células (X_{medio}) (Ecuación 1). Los resultados obtenidos se han representado mediante un gráfico de barras elaborado con GraphPad Prism v10.2.3.

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{(X - X_{medio})}{(X_{vehículo} - X_{medio})} * 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

Para el presente trabajo se han procesado 12 muestras de tejido tumoral de pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón no microcítico. Las características clínico-patológicas de los pacientes y las características moleculares de su respectivo tejido tumoral quedan recogidas en el Anexo 4. Todos los pacientes diagnosticados de CPNM se encuentran en un rango de edad de entre 60 y 74 años, siendo la mayoría de ellos hombres.

De las 12 muestras recogidas, 2 fueron excluidas por presentar origen histológico urotelial e intestinal (ID 540, ID 633). Las 10 muestras restantes fueron procesadas para el establecimiento del cultivo celular de organoides. No obstante, se observó contaminación por bacterias en el 50 % de las muestras, por lo que fueron retiradas del presente estudio.

Finalmente fueron incluidas y se establecieron en organoides 5 de las 12 muestras recogidas (ID 554, 571, 609, 626 y 615). Sin embargo, los resultados para el paciente con ID 615 son todavía preliminares y no se detallarán en el presente trabajo. El 60 % de las muestras establecidas presentaban histología de adenocarcinoma pulmonar (Figura 4A), y provenían en su mayoría de pacientes fumadores (Figura 4B).

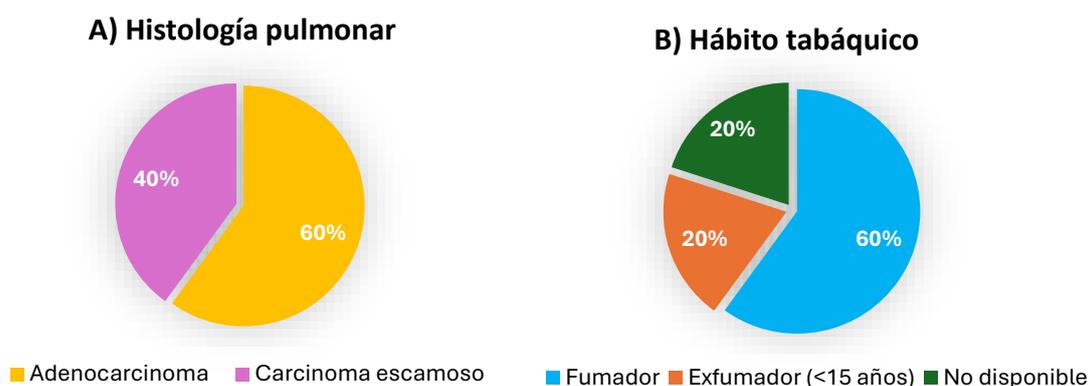


Figura 4. Representación gráfica del porcentaje de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón no microcítico incluidos en el presente estudio según la (A) Histología pulmonar y el (B) Hábito tabáquico.

4.2. ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LOS PDTOS

El principal objetivo de este trabajo es optimizar el establecimiento de los organoides derivados de pacientes de cáncer de pulmón no microcítico. Para ello, se evaluó el establecimiento y crecimiento de organoides a largo plazo en tres medios de cultivos distintos, denominados clásico, AO completo y AO condicionado.

En primer lugar, el PDTO del paciente 554 muestra un crecimiento similar en los pases más tempranos (P0 y P3) en los tres medios de cultivo. Sin embargo, en el pase 4 (P4) se observa una menor densidad celular en el medio clásico y en el medio AO completo, con respecto al medio AO condicionado. En los siguientes pases, hay una parada de crecimiento de los organoides en los medios clásico y AO completo. En cambio, el medio AO condicionado es capaz de mantener el cultivo de PDTOs hasta el pase 9 (último hasta el momento). Los organoides presentan una morfología esférica y logran alcanzar las 200 μm , indicando una gran eficacia de mantenimiento de los PDTOs.

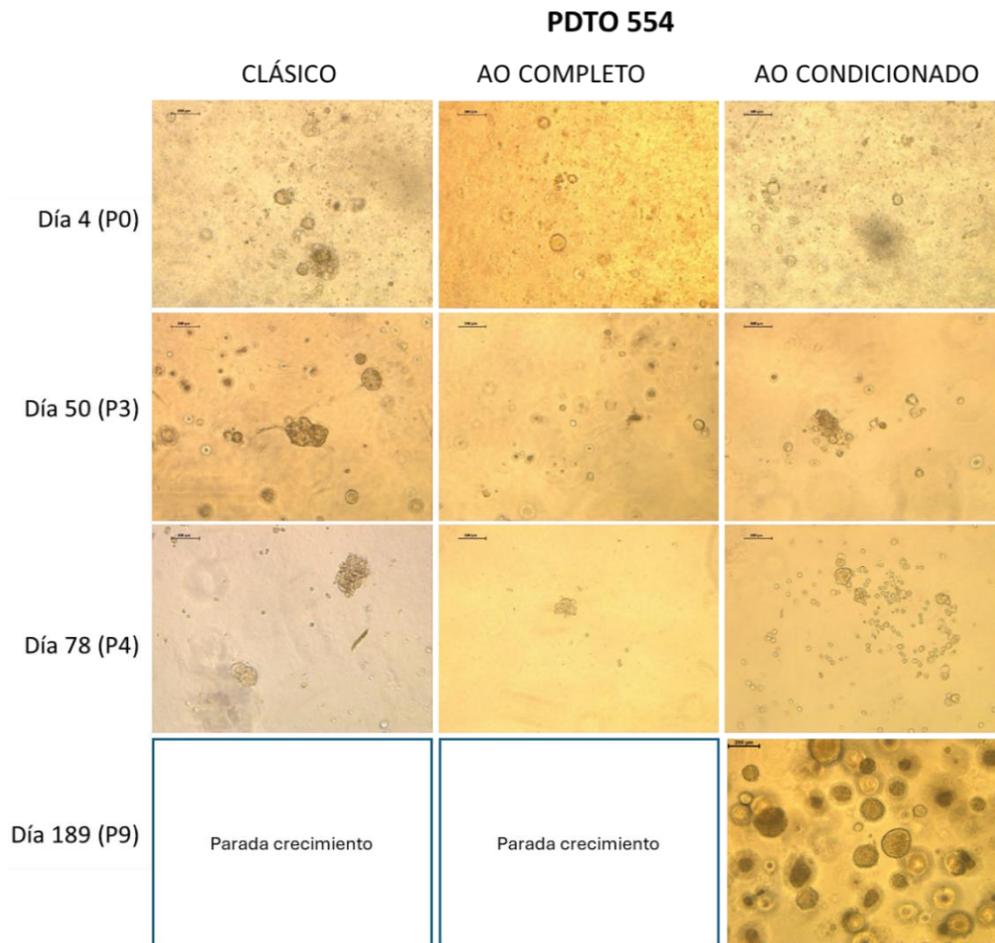


Figura 5. Seguimiento a lo largo del cultivo celular del PDTO del paciente con ID 554 en distintos medios de cultivo. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; AO: *airway organoid*; P: número de pase. Escala de medida: 200 μm .

Resultados similares se observan en los primeros pases del cultivo del paciente 571 observándose un menor número de organoides en la condición de medio clásico a partir del cuarto pase. Solo los medios de cultivos AO completo y condicionado son capaces de mantener los organoides a lo largo del tiempo.

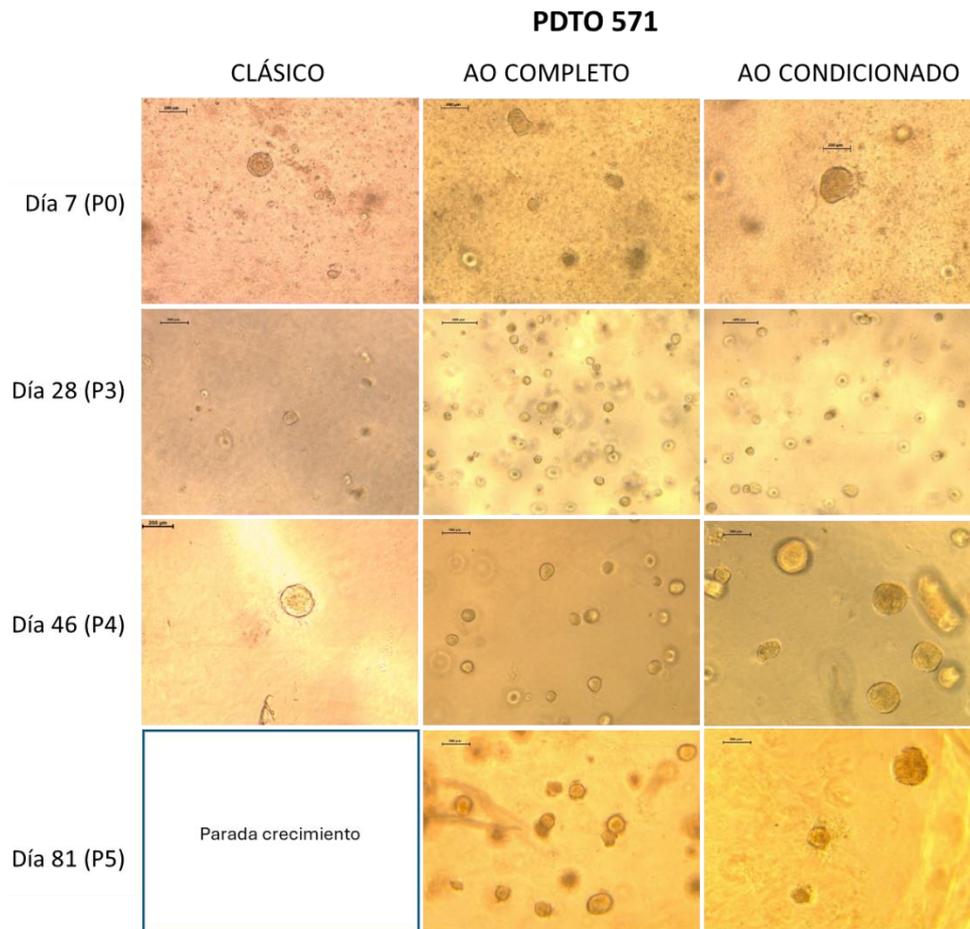


Figura 6. Seguimiento a lo largo del cultivo celular del PDTO del paciente con ID 571 en distintos medios de cultivo. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; AO: *airway organoid*; P: número de pase. Escala de medida: 200 μ m.

Con respecto al PDTO 609, al igual que hemos observado en los otros PDTOs, tiene una tasa de crecimiento similar en el pase 0 en los tres medios de cultivo. No obstante, ya en el pase 2 (P2) el medio clásico no permitió el avance del PDTO. En el pase 3 (P3), los organoides en medio AO completo también cesaron su crecimiento, dejando al medio AO condicionado como el único capaz de formar organoides en pases más tardíos, con una morfología esférica y con una gran densidad celular.

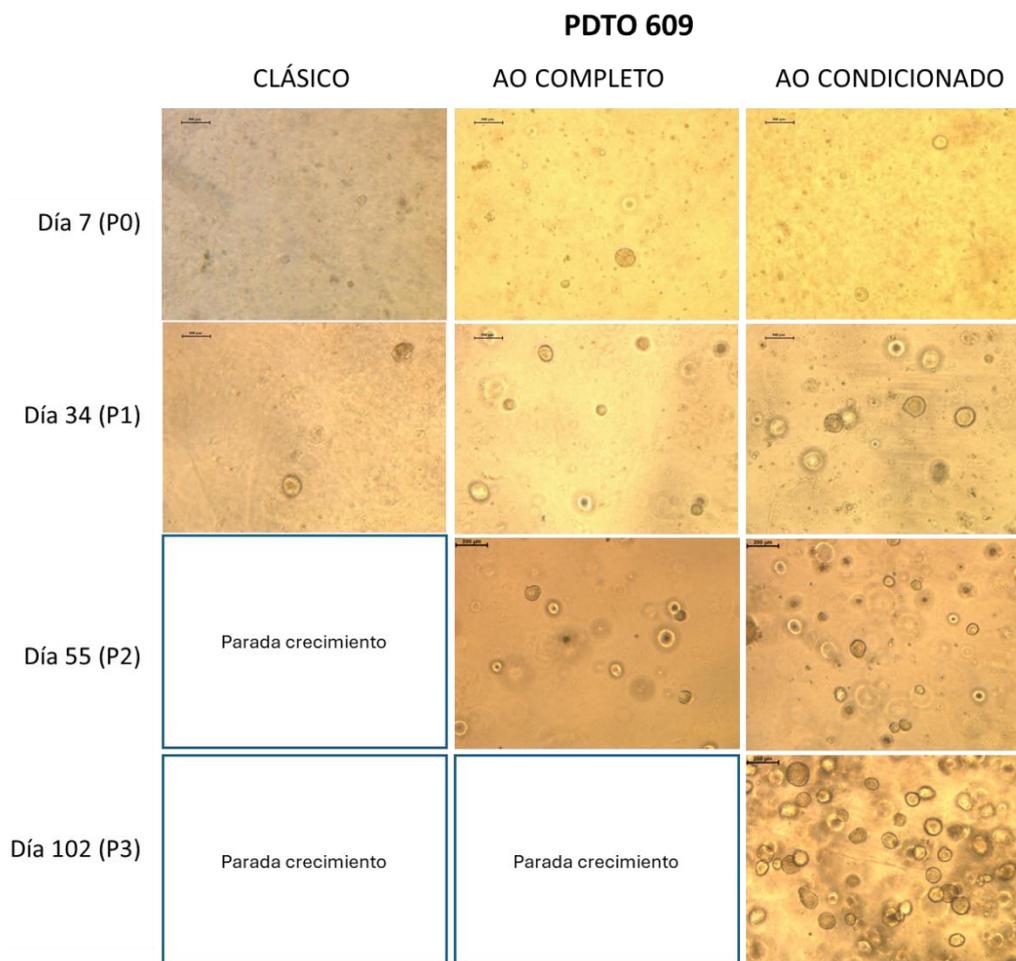


Figura 7. Seguimiento a lo largo del cultivo celular del PDTO del paciente con ID 609 en distintos medios de cultivo. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; AO: *airway organoid*; P: número de pase. Escala de medida: 200 μm .

Por último, el paciente 626 tiene un comportamiento muy similar al paciente 609. En los pases tempranos (P0 y P1) los organoides crecieron en los tres medios sin apenas ninguna diferencia, ni en cuanto a morfología ni en cuanto a número de organoides. Sin embargo, en el pase 1 se observó una diferencia de crecimiento notable entre la densidad de organoides de los medios AO completo y el AO condicionado con respecto al clásico, que fue incapaz de hacer crecer los PDTOs más allá del segundo pase (P2). Finalmente, solo el medio AO condicionado permitió el crecimiento de los organoides en pases tardíos, observándose muy buena densidad celular.

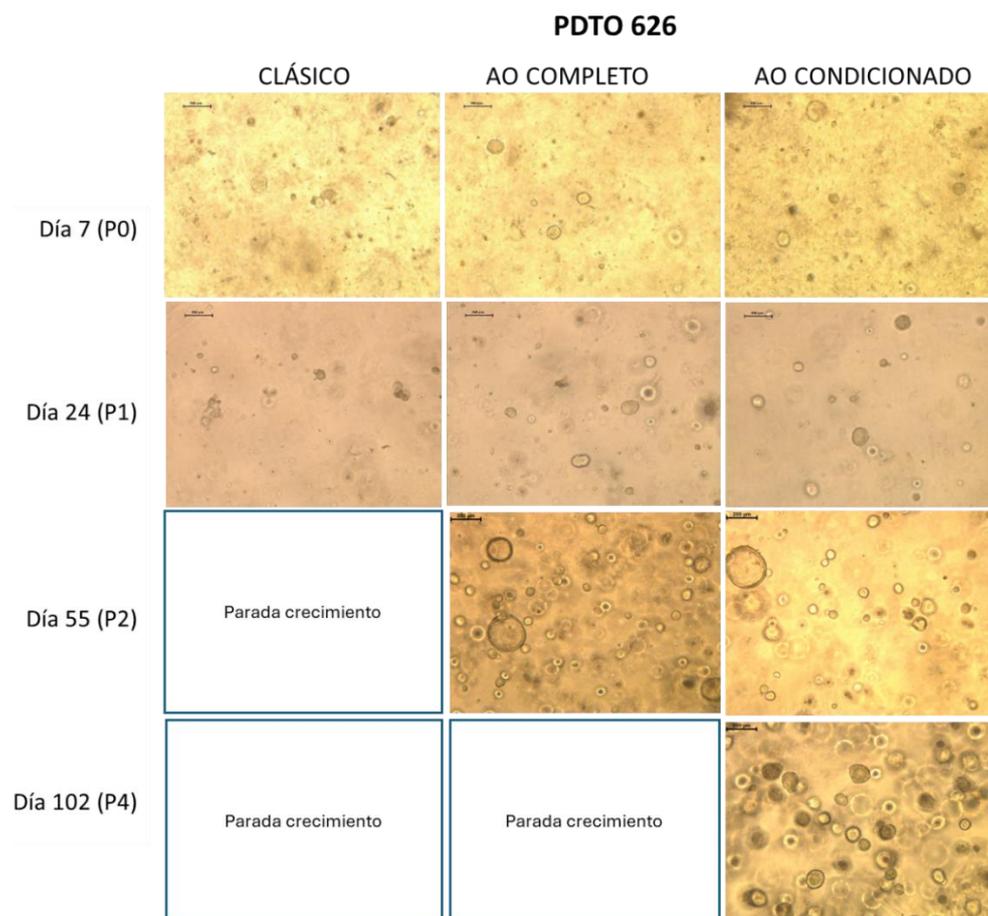


Figura 8. Seguimiento a lo largo del cultivo celular del PDTO del paciente con ID 626 en distintos medios de cultivo. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; AO: *airway organoid*; P: número de pase. Escala de medida: 200 μm .

4.3. DESARROLLO DE ORGANOIDES EN LAS MATRICES SINTÉTICAS

Uno de los objetivos específicos de este estudio es evaluar y optimizar el uso de matrices extracelulares sintéticas para el desarrollo de PDTOs. Estas matrices sintéticas se proponen como una alternativa al Matrigel® para el desarrollo de organoides en el estudio del cáncer.

En primer lugar, y con el objetivo de optimizar y estandarizar el uso de las matrices sintéticas, se decidió evaluar la capacidad de formación de organoides de un cultivo primario establecido a partir de tejido tumoral de un paciente con CPNM (CP435). Se evaluó la capacidad de formar organoides, su crecimiento y viabilidad en las diferentes matrices sintéticas (descritas en 3. *Materiales y métodos*) en comparación con Matrigel®.

Como se observa en la Figura 9, el CP435 es capaz de crecer en todas las matrices, dando lugar a la formación de organoides esféricos y de aproximadamente 100 μm de tamaño a los 7 días. Destaca también el mayor tamaño y elevado número de organoides a los 14 días en las matrices de BULK y IOPAL80 (sin y con RGD) en comparación con el cultivo en Matrigel®.

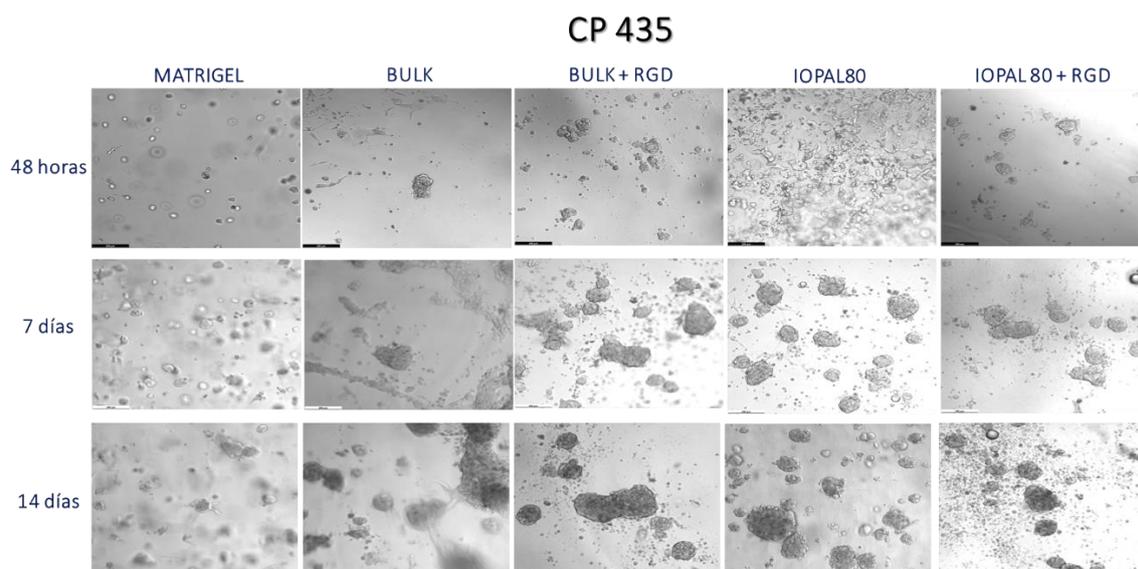


Figura 9. Imágenes de microscopía en campo claro a lo largo del crecimiento del cultivo primario del paciente con ID 435 en las distintas matrices, a las 48 horas, 7 días y 14 días. Escala de medida: 200 μ m.

Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante tinción con Calceína y Yoduro de propidio. Se observó una elevada viabilidad celular independientemente de la matriz en la que se cultivó el CP435 (Figura 10). Resalta también, tal y como se ha comentado previamente, el crecimiento exponencial que sufren las células en el proceso de formación de organoides, tanto en tamaño como en cantidad, que se ve reflejado sobre todo en la matriz de IOPAL80 (sin y con RGD). En el cultivo en Matrigel®, los organoides presentan una morfología regular, uniforme y esférica y con un tamaño menor en comparación con las matrices sintéticas de Bulk y Bulk + RGD en las cuales se presentan con estructura redondeadas que tienden a agregarse tal y como se refleja a los 14 días del cultivo. En el caso de IOPAL80 y IOPAL80 + RGD, los organoides parecen mantener un mayor grado de separación entre ellos y presentan una apariencia más esférica en comparación con Bulk.

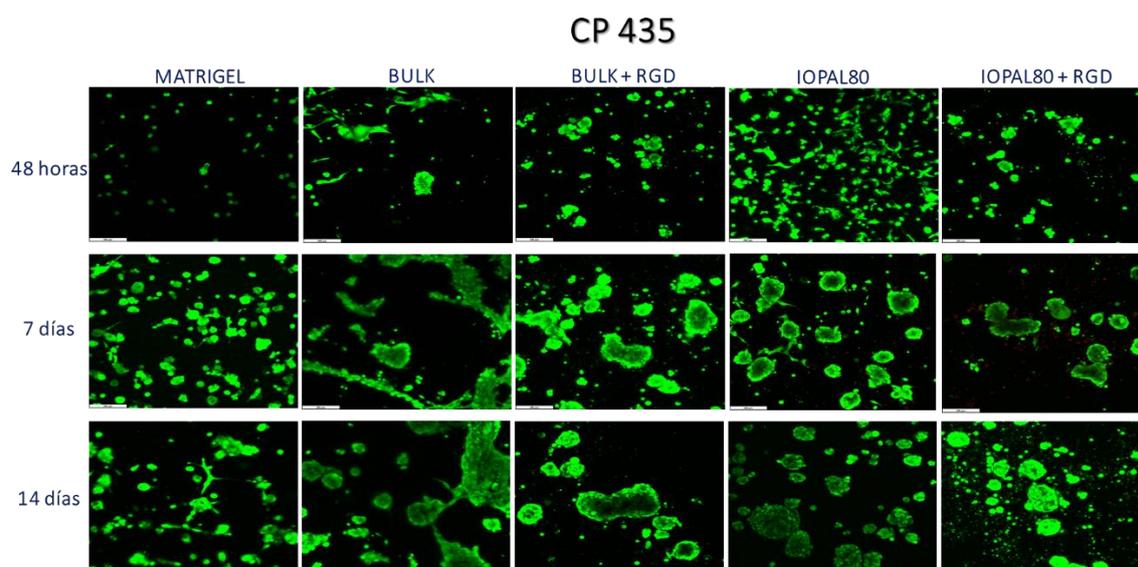


Figura 10. Imágenes de microscopía confocal de la tinción Calceína/PI para evaluar la viabilidad del cultivo primario derivado del paciente con ID 435 en las distintas matrices, a las 48 horas, 7 días y 14 días. Tinción con Calceína (verde) y PI (rojo). Escala de medida: 200 μ m.

Una vez evaluada la capacidad de formación de organoides de un cultivo primario en las matrices sintéticas, el siguiente paso es mantener el cultivo en el tiempo y por tanto realizar pases de los organoides establecidos. Para conseguirlo, debemos ser capaces de disgregar la matriz y recuperar los organoides para resembrarlos. Para ello, se evaluó la efectividad de la enzima heparinasa para disgregar la matriz.

La disgregación con heparinasa de las matrices sintéticas del cultivo de organoides a partir del CP435 resultó ser efectiva para las matrices de Bulk quedando los organoides libres de matriz (Figura 11A). Por el contrario, en el caso de IOPAL80 y Bulk + RGD se observaron restos de matriz después de la disgregación (Figura 11B y 11C).

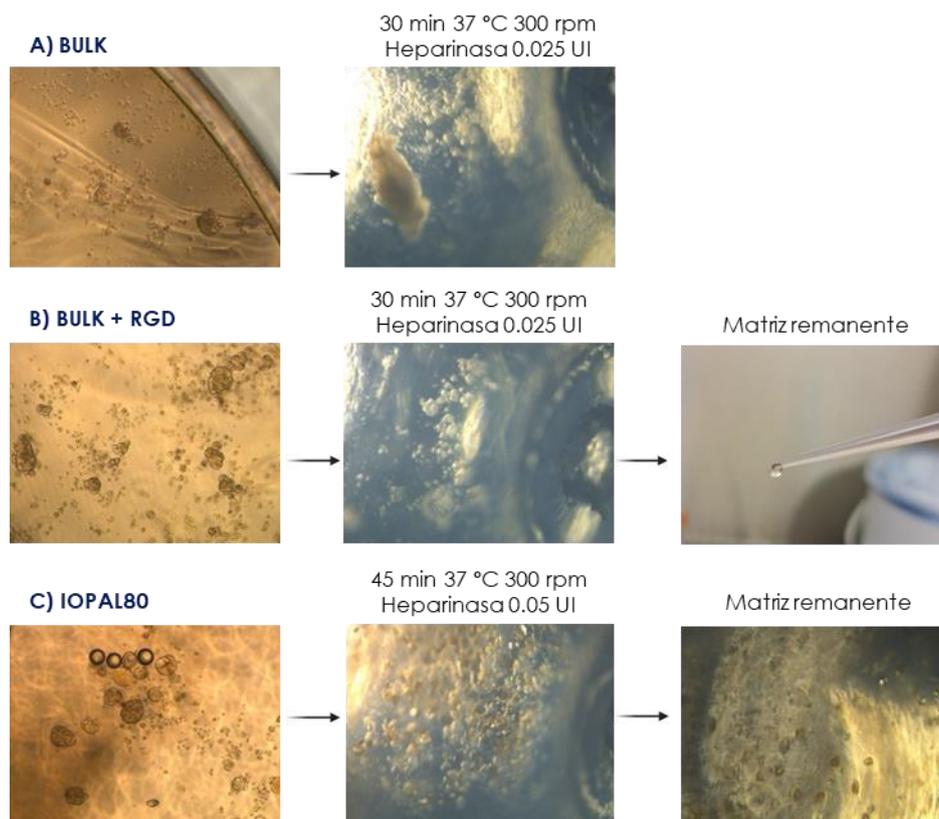


Figura 11. Imágenes del proceso de disgregación de las matrices sintéticas. Imágenes de microscopía de los organoides establecidos a partir del cultivo primario derivado del paciente con ID 435 antes de la disgregación y fotografías de la matriz remanente observada después de la disgregación de las matrices sintéticas con heparinasa. (A) Bulk; (B) Bulk + RGD; (C) IOPAL80.

A continuación, se decidió sembrar los organoides recuperados de las matrices disgregadas en nuevas matrices para evaluar su crecimiento tras realizar un pase del cultivo. Tal y como se observa en la Figura 21, los organoides resembrados continuaron su crecimiento y expansión en las matrices de Bulk y Bulk + RGD. Se observa a los 13 días un mayor tamaño de los organoides con respecto al día 2 de cultivo (Figura 12A, B). Por otro lado, se observan crecimiento en los organoides sembrados en las matrices de IOPAL 80 (Figura 12C).

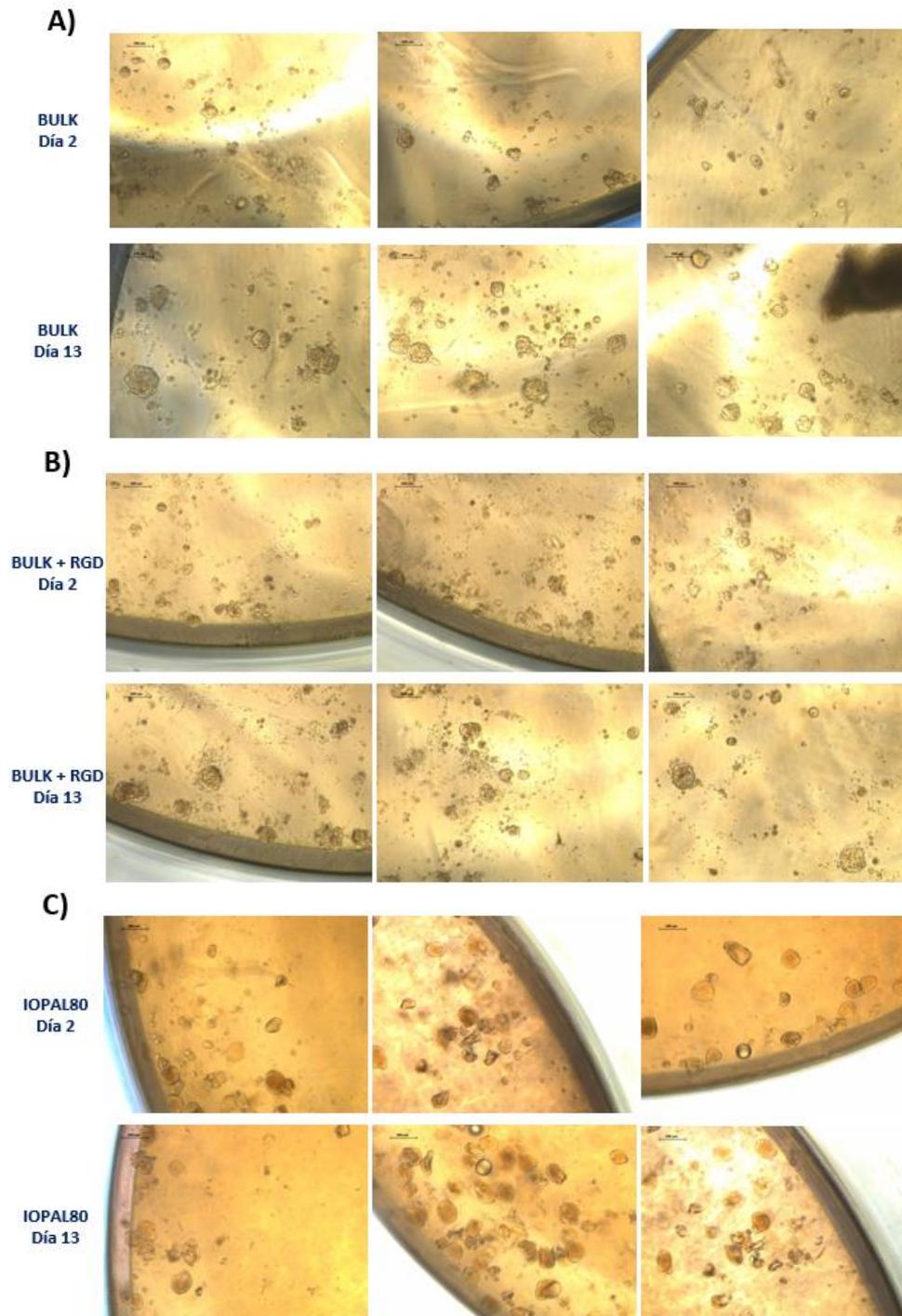


Figura 12. Imágenes de microscopía del crecimiento del cultivo primario del paciente con ID 435 en las distintas matrices tras resembrar los organoides obtenidos por la disagregación con heparinasa (imágenes tomadas a día 2 y día 13 post disagregación). (A) Bulk; (B) Bulk + RGD; (C) IOPAL80. Escala de medida: 200 μ m.

Una vez evaluada la capacidad de formación de organoides de un cultivo primario, se decidió evaluar la viabilidad, crecimiento y mantenimiento en las matrices sintéticas de un PDTO establecido previamente en Matrigel® (PDTO 626). Para ello, el PDTO pase 6 del paciente con ID 626 establecido en Matrigel® y descrito anteriormente en el presente trabajo, se sembró en las diferentes matrices sintéticas y paralelamente en Matrigel®. Como se observa en la Figura 13, el crecimiento de los PDTOs resultó ser ligeramente mayor en cuanto a tamaño de organoides en todas las matrices sintéticas en comparación con los organoides crecidos en Matrigel®. No

obstante, los organoides se muestran con una morfología más amorfa y desestructurada en comparación con el Matrigel® donde su estructura se presenta con una forma esférica y con un aspecto mucho más compacto.

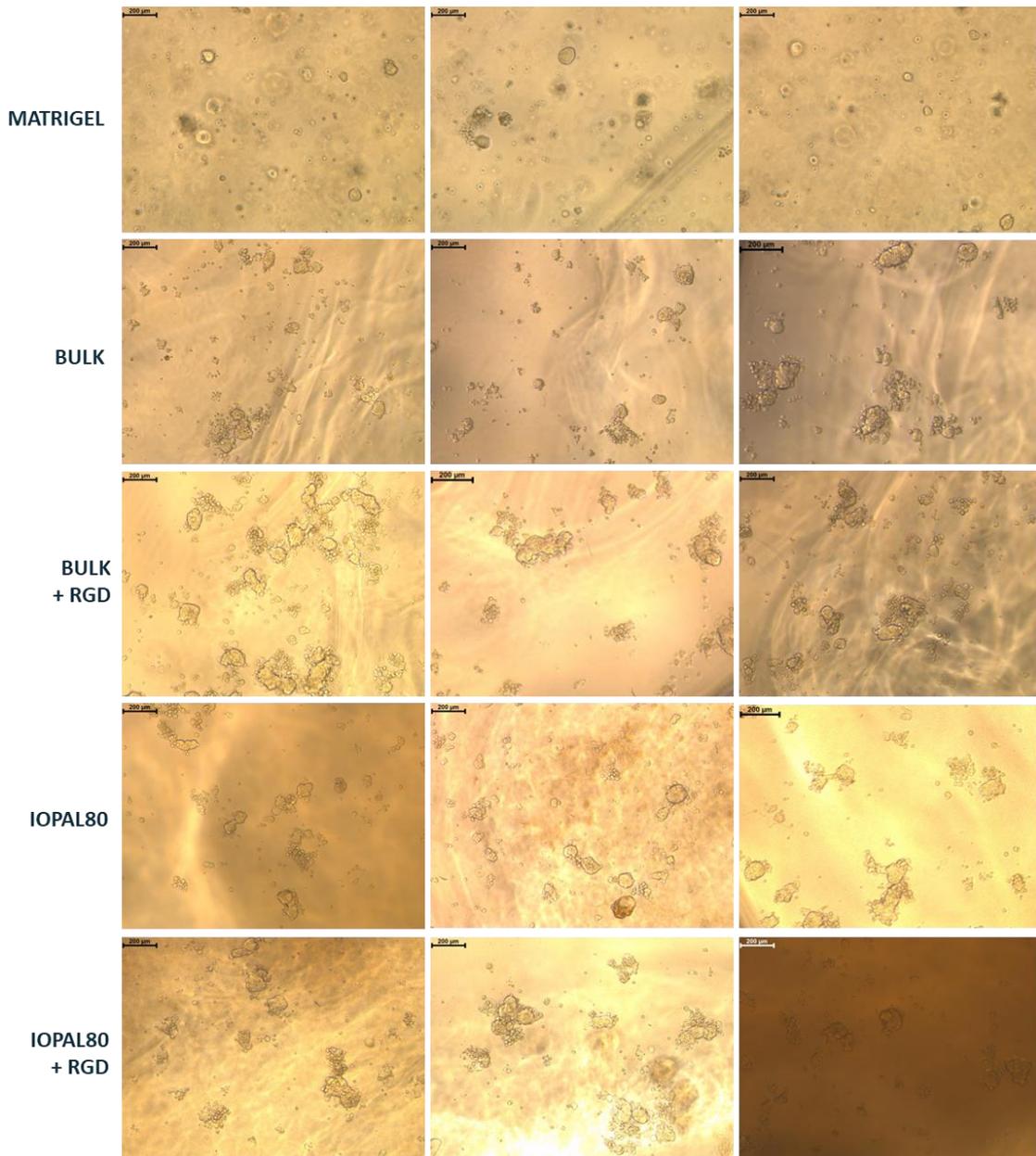


Figura 13. Imágenes de microscopía del cultivo de los PDTOs del paciente con ID 626 en las distintas matrices, 24 horas después de sembrar las células. Escala de medida: 200 µm.

Además de la morfología y el crecimiento, se evaluó también la viabilidad celular de los PDTOs en estas matrices. Tal y como se observa en la Figura 14A, el marcaje es totalmente verde para el Matrigel®, lo que indica que esta matriz es capaz de mantener las células vivas y permitir el crecimiento de los PDTOs a lo largo del tiempo. En cambio, a los 5 días de cultivo observamos en las matrices a base de PEG que las células se tiñen de rojo, indicando muerte celular (Figura 14B, C, D, E). La tinción de color rojo aparece en la mayoría de los casos, en el mismo sitio donde hay tinción verde, lo que indica que en un mismo organoide hay tanto células vivas como células muertas.

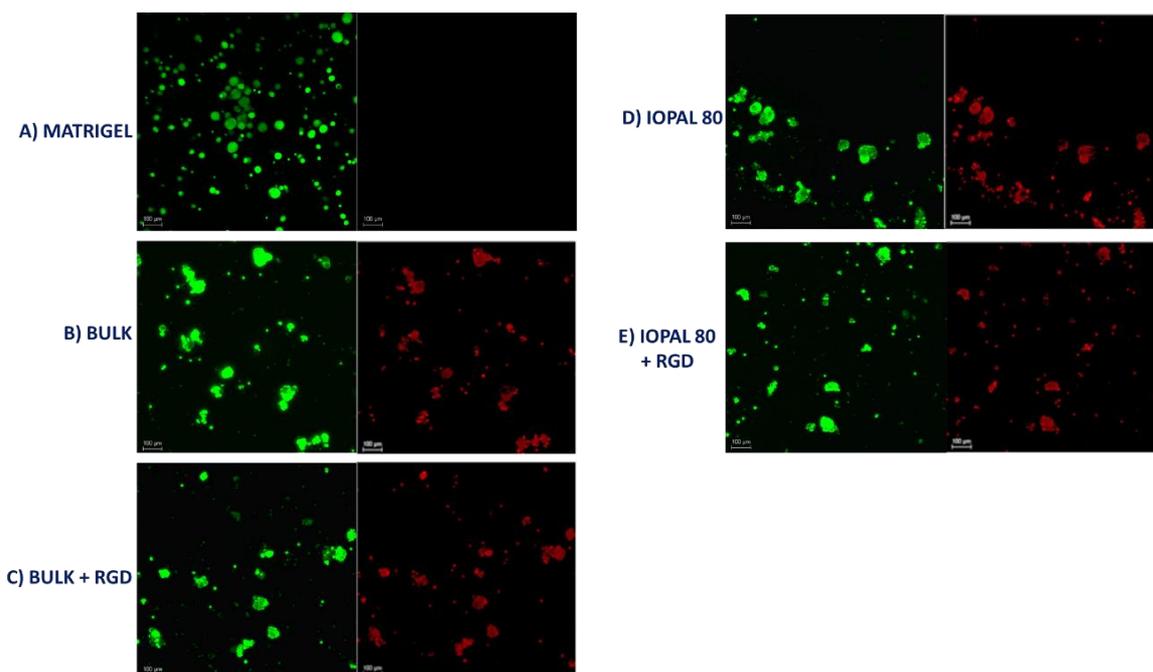


Figura 14. Evaluación de la viabilidad de los PDTOs para el paciente ID 626 en Matrigel® y en matrices PEG a los 5 días de cultivo. Tinción con Calceína (verde) y Yoduro de propidio (rojo) en las matrices: (A) Matrigel®; (B) Bulk; (C) Bulk + RGD; (D) IOPAL80; (E) IOPAL80 + RGD. Escala de medida: 100 µm.

Una vez crecido el cultivo de PDTOs en estas matrices sintéticas, aun observando una elevada muerte celular en comparación con el Matrigel®, se decidió evaluar la eficacia de disgregación de las matrices mediante heparinasa en estos cultivos. Transcurridas 3 horas de incubación con heparinasa, se observa la disgregación de la matriz en los pocillos de BULK±RGD (Figura 15A, B), lo cual no sucede en los pocillo de IOPAL80±RGD (Figura 15C, D).

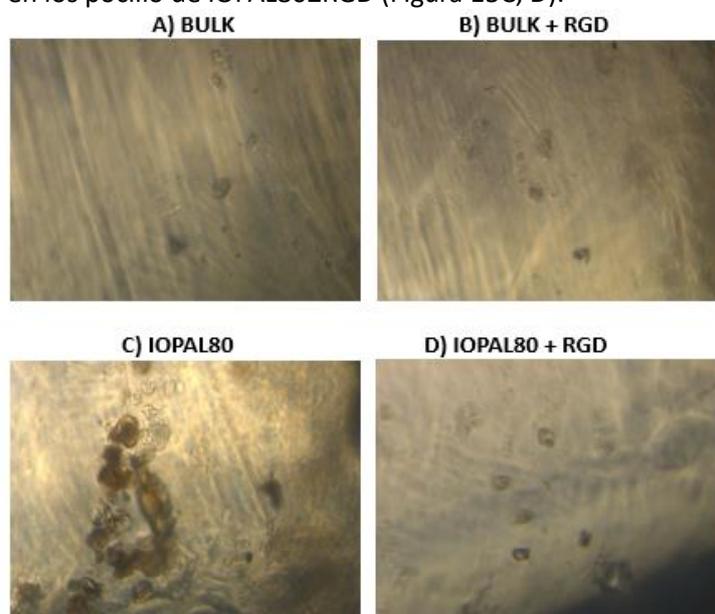


Figura 15. Imágenes de microscopía del cultivo de PDTO del paciente con ID 626 en las matrices sintéticas tras la disgregación con heparinasa. (A) Bulk; (B) Bulk + RGD; (C) IOPAL80; (D) IOPAL80 + RGD. Fotos tomadas a 20X.

En cuanto a la disgregación de las matrices con Cell Recovery Solution, se pueden observar organoides libres sin matriz, aunque en un número muy reducido (Figura 16A, B) en las matrices de Bulk y Bulk + RGD. De igual manera, esta no se mostró efectiva en IOPAL80 y IOPAL80 + RGD,

ya que la matriz sigue presente en gran medida y envolviendo los organoides una vez han transcurrido 5 horas de incubación en hielo (Figura 16C, D).

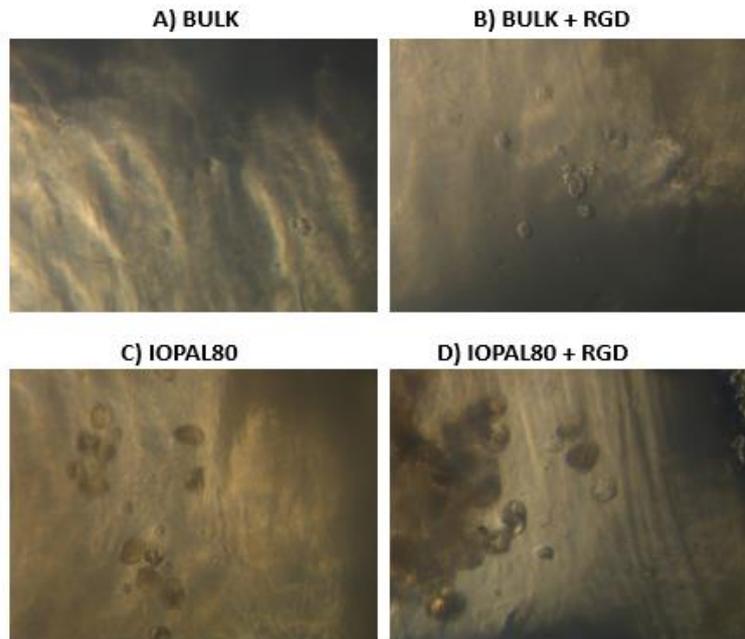


Figura 16. Imágenes de microscopía del cultivo de PDTO del paciente con ID 626 en las matrices sintéticas tras la disgregación con Cell Recovery Solution. (A) Bulk; (B) Bulk + RGD; (C) IOPAL80; (D) IOPAL80 + RGD. Fotos tomadas a 20X.

4.4. RECAPITULACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL TUMOR PARENTAL

Un factor crucial para el éxito de los organoides como modelo de estudio *in vitro* es su capacidad para replicar fielmente el tumor primario en términos histológicos, proteómicos, epigenéticos y genéticos. Para comparar los PDTOs establecidos con el tumor parental, se ha analizado la expresión de varios marcadores histológicos mediante inmunofluorescencia y se han identificado alteraciones genéticas mediante secuenciación masiva.

4.4.1. Estudio de los marcadores histológicos

La histología del tumor desempeña un papel esencial para un buen diagnóstico. Entre los marcadores más utilizados se encuentran P40 para carcinoma escamoso y TTF1 para adenocarcinoma. Tal y como se observa en la Figura 17, los tumores incluidos en el presente trabajo con histología de adenocarcinoma presentaron expresión positiva de TTF1 mientras que los tumores con histología escamosa (ID 554, ID 609) presentaron positividad para el marcador P40. En los casos ID 571 e ID 626 no se dispone de datos de los marcadores de subtipo histológico.

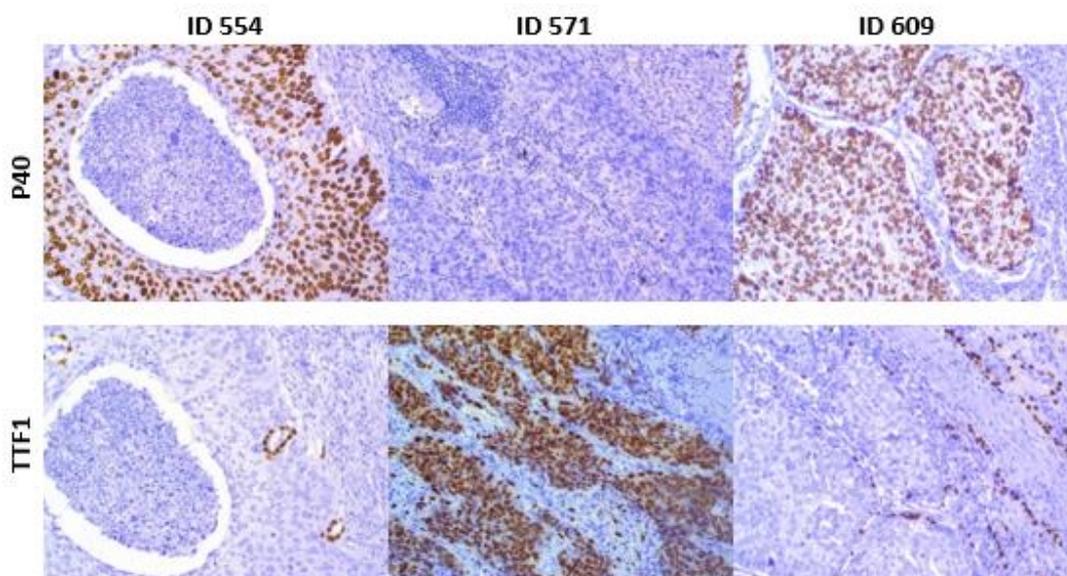


Figura 17. Caracterización histológica de los tumores primarios de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Inmunohistoquímica para la detección de P40 (marcador de histología escamosa) y TTF1 (marcador de adenocarcinoma) en las muestras ID 554, ID571 e ID 609. Fotos tomadas a 20X utilizando el microscopio Olympus BX53.

Para evaluar que los PDTOs son un potencial modelo *in vitro* capaz de recapitular los rasgos histológicos del tumor parental del que provienen, se analizó la expresión de los marcadores histológicos P40 y TTF1 mediante inmunofluorescencia y se corroboraron los resultados junto con los obtenidos mediante inmunohistoquímica por el Servicio de Anatomía Patológica del CHGUV. Cabe destacar que los organoides establecidos del paciente con ID 571 cesaron su crecimiento en el pase 5 y no se obtuvo cantidad suficiente de organoides para realizar las correspondientes inmunofluorescencias.

Tal y como se observa en la Figura 18, los PDTOs que provenían de tejido tumoral con histología escamosa resultaron positivos para P40 y negativos para TTF1 (ID 554 e ID 609), en concordancia con los resultados observados en el tejido tumoral. En el caso del PDTO para el paciente con ID 626, diagnosticado como adenocarcinoma en tejido, se observó una clara positividad para P40 y una ligera tinción para TTF1, indicando probablemente un origen adenoescamoso.

También se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión de los marcadores Vimentina y Pan Citoqueratina (Pan CK) en los PDTOs, que indican un origen mesenquimal y epitelial, respectivamente. Los PDTOs de todos los pacientes (ID 554, ID 609 e ID 626) presentaron positividad para Pan CK, resaltando la composición de células epiteliales en el cultivo celular. Además, el paciente con ID 626 fue el único en mostrar también una ligera positividad para Vimentina en la superficie de los organoides, indicando la presencia de células mesenquimales.

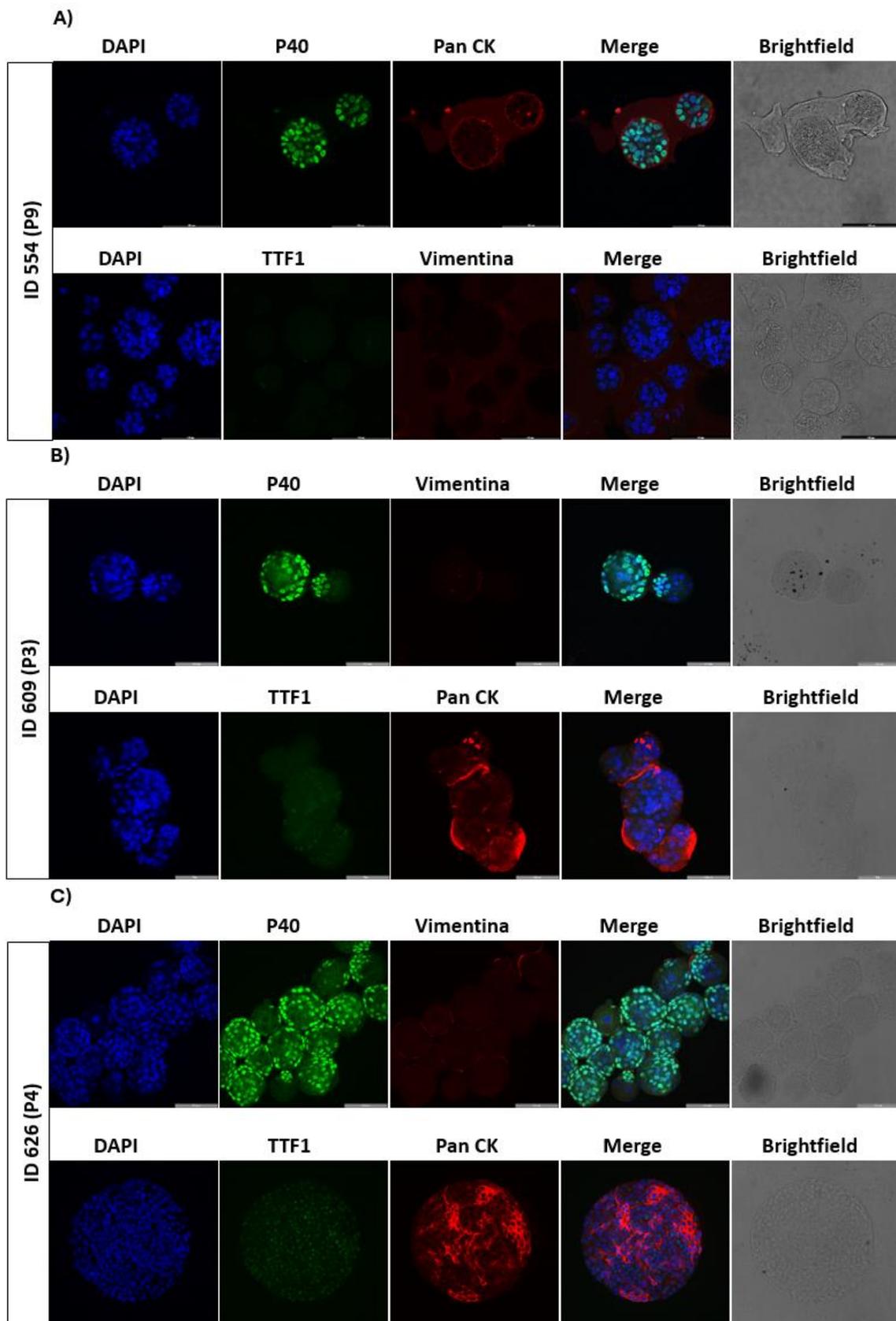


Figura 18. Caracterización por inmunofluorescencia de los organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Tinción con DAPI (tinción nuclear), P40, TTF1, Vimentina y Pan CK. (A) PDT0 del paciente con ID 554 pase 9; (B) PDT0 del paciente con ID 609 pase 3; (C) PDT0 del paciente con ID 626 pase 4. PDT0: organoide tumoral derivado de paciente. P: número de pase; CK: Citoqueratina. Escala de medida: 100 μ m.

4.4.2. Estudio de las alteraciones genéticas

Para que los organoides puedan presentarse como una potente herramienta en la medicina de precisión, es de vital importancia que recapitulen las características del tumor primario del cual provienen (tumor parental). Para ello, se han identificado las alteraciones génicas presentes en los organoides establecidos en pases tempranos (< P4), pases más avanzados (\geq P4) y su tejido tumoral de origen (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras de PDTOs y de tejido tumoral del cual derivan secuenciadas utilizando OncoPrint Comprehensive Assay Plus. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente.

Identificación del Paciente				
	554	571	609	626
Muestra	Tumor primario	Tumor primario	Tumor primario	Tumor primario
	PDTO Pase 0	PDTO Pase 0	PDTO Pase 0	PDTO Pase 0
	PDTO Pase 6	-	PDTO Pase 4	PDTO Pase 5

En primer lugar, se analizaron los parámetros de calidad de la secuenciación. Se observó una distribución uniforme de las *Ion Spheres Particles* (ISP) en el chip, con una densidad del 90 % (Figura 19A). Además, todas las carreras de secuenciación obtuvieron más del 74 % de lecturas útiles (Figura 19B), lo cual es imprescindible para un buen rendimiento de la secuenciación. Por último, las lecturas tienen un tamaño medio de 128 pares de bases (pb) (Figura 19C), con un 99 % de bases alineadas (Figura 19D).

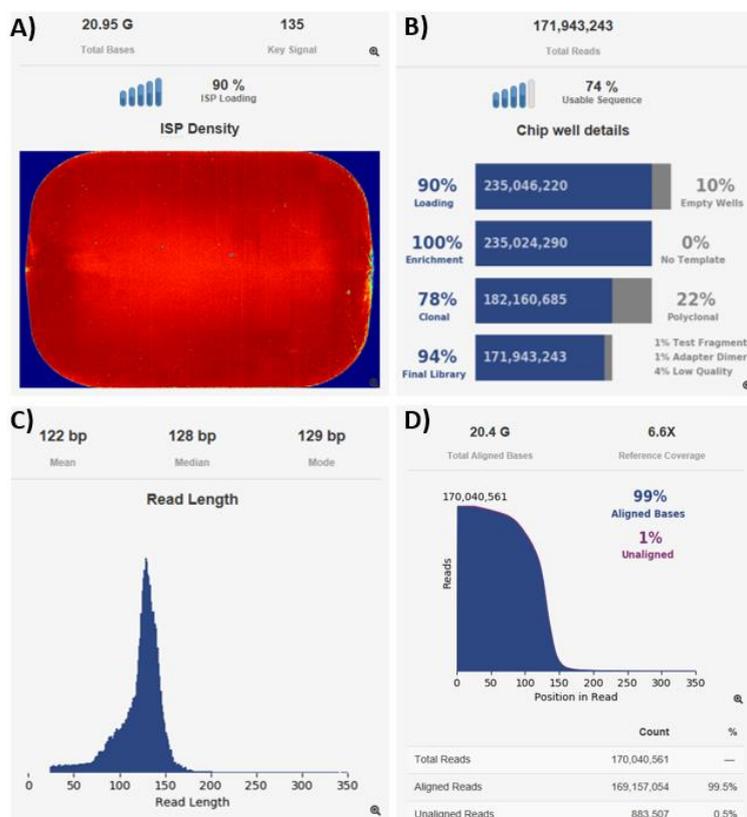


Figura 19. Análisis de los parámetros de calidad llevados a cabo por el Ion Suite Software. (A) Análisis de la densidad de las partículas ISP empleadas para la secuenciación; (B) Lecturas útiles totales de la secuenciación y análisis de las lecturas eliminadas; (C) Longitud media de las lecturas (pb); (D) Porcentaje del número de bases alineadas de todas las lecturas. ISP: *Ion Spheres Particles*; pb: pares de bases.

Los resultados obtenidos se analizaron por paciente con el objetivo de evaluar si los organoides establecidos son capaces de recapitular las alteraciones genéticas de los tumores primarios. Para ello, se comparó la similitud entre las muestras según las variantes halladas y su impacto biológico mediante un mapa de calor. Además, se comparó el porcentaje de las frecuencias de las variantes alélicas obtenidas entre las diferentes condiciones.

Para el paciente 554 se observa que las mutaciones presentes en el tumor primario se mantienen al establecer el PDT0. Sin embargo, en el pase 6 algunas de estas mutaciones se pierden, como es el caso del gen de la tiopurina metiltransferasa (*TPMT*) (Figura 20A). Este gen codifica para una enzima capaz de metabolizar fármacos de tipo tiopurinas cuya acción se basa en inhibir el sistema inmunológico. Se pierde también la mutación en el gen *MSH3* que codifica para una proteína que participa en el sistema de reparación de emparejamientos erróneos del ADN. Además, en algunas variantes encontradas en genes como *PIK3CA*, *PTEN*, *TP53* cabe destacar la variación en el porcentaje de VAF a lo largo del cultivo celular (Figura 20B).

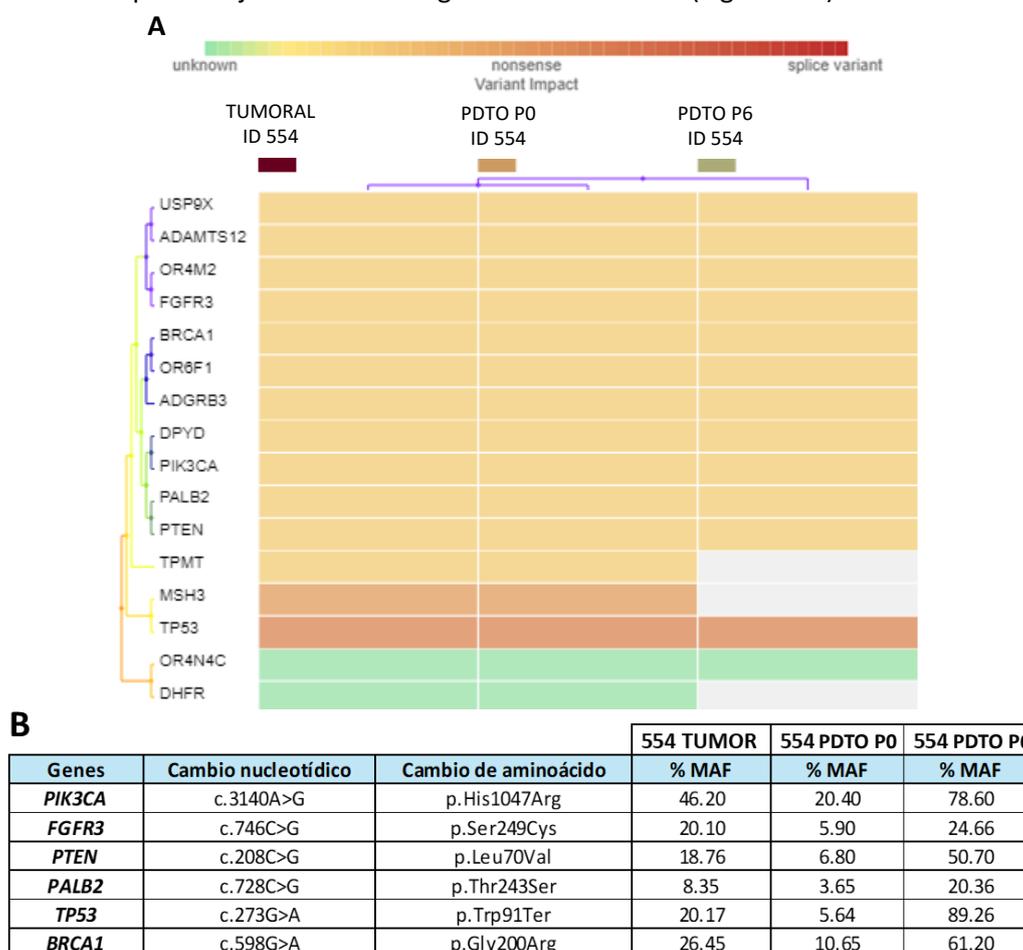


Figura 20. Análisis de las alteraciones genéticas del paciente con ID 554 presentes en el tejido tumoral, en el PDT0 P0 y PDT0 P6. A) Mapa de calor de la agrupación de las muestras según las variantes detectadas y el impacto biológico de las mismas. (B) Descripción de las variantes detectadas y el porcentaje de frecuencia de la variante alélica en los PDT0s establecidos y su tumor parental. PDT0: organoide tumoral derivado de paciente; P: número de pase, VAF: Frecuencia de la variante alélica.

Como se puede observar en el paciente 571 con histología de adenocarcinoma la secuenciación del tejido tumoral detecta mutaciones en distintos genes que no se encuentran posteriormente en el pase 0 del PDT0, como son *TP53*, *FANCI*, *ATM*, *RB1*, *SOX9* y *EP300*. Sin embargo, otras mutaciones fueron adquiridas al establecer el PDT0, como es la de los genes *MAP3K4*, *FAM135B* y *NF2* (Figura 21A y B). El gen *MAP3K4* codifica para una proteína quinasa que actúa en las vías de señalización celular de procesos clave (proliferación celular, respuesta al estrés...).

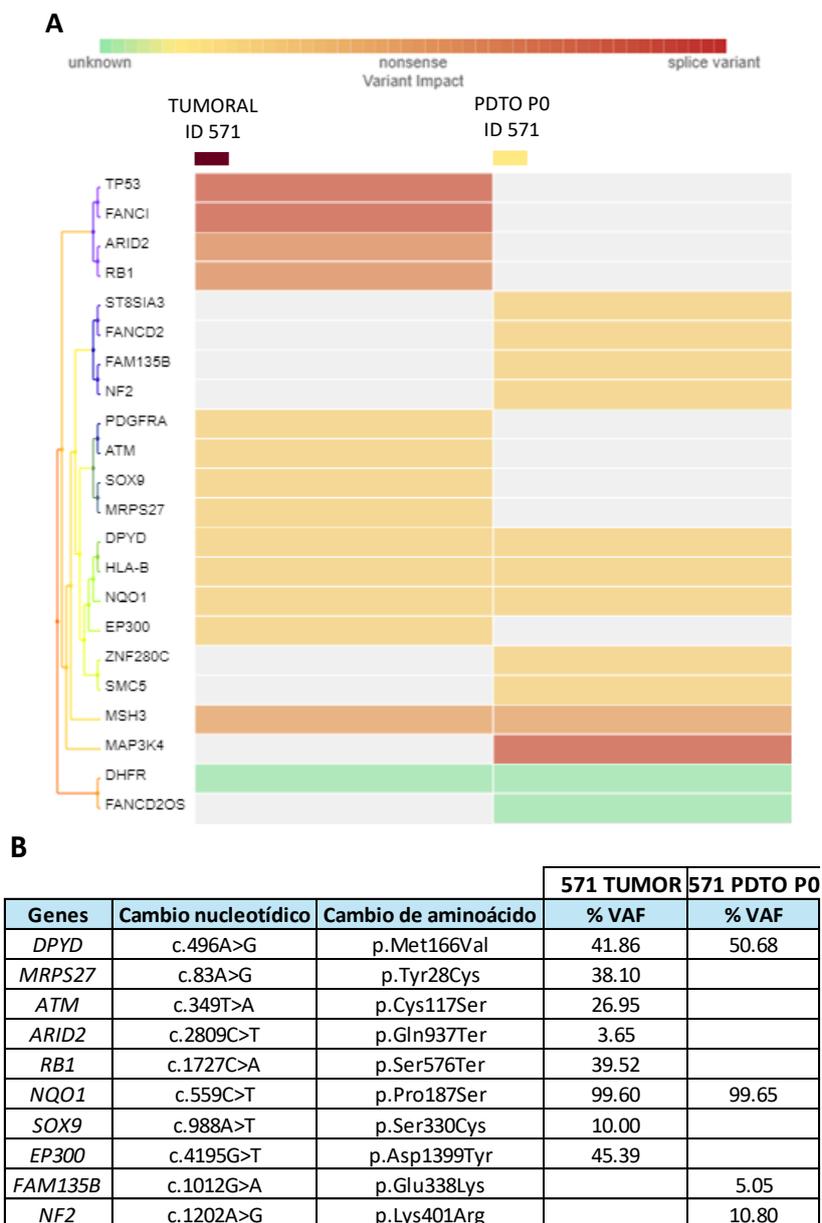


Figura 21. Análisis de las alteraciones génicas del paciente con ID 571 presentes en el tejido tumoral y en el PDTO P0. (A) Mapa de calor de la agrupación de las muestras según las variantes detectadas y el impacto biológico de las mismas. (B) Descripción de las variantes detectadas y el porcentaje de frecuencia de la variante alélica en los PDTOs establecidos y su tumor parental. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; P: número de pase. VAF: Frecuencia de la variante alélica.

El paciente ID 609 diagnosticado de carcinoma escamoso mantiene todas las mutaciones al establecer el PDTO (P0), sin embargo, pierde la gran mayoría de estas en el pase 4. Por otro lado, se adquieren mutaciones al establecer el PDTO (P0) como la del gen *NOTCH1*, o en pases más tardíos (P4) como la del gen *KDR* (Figura 22A y B).

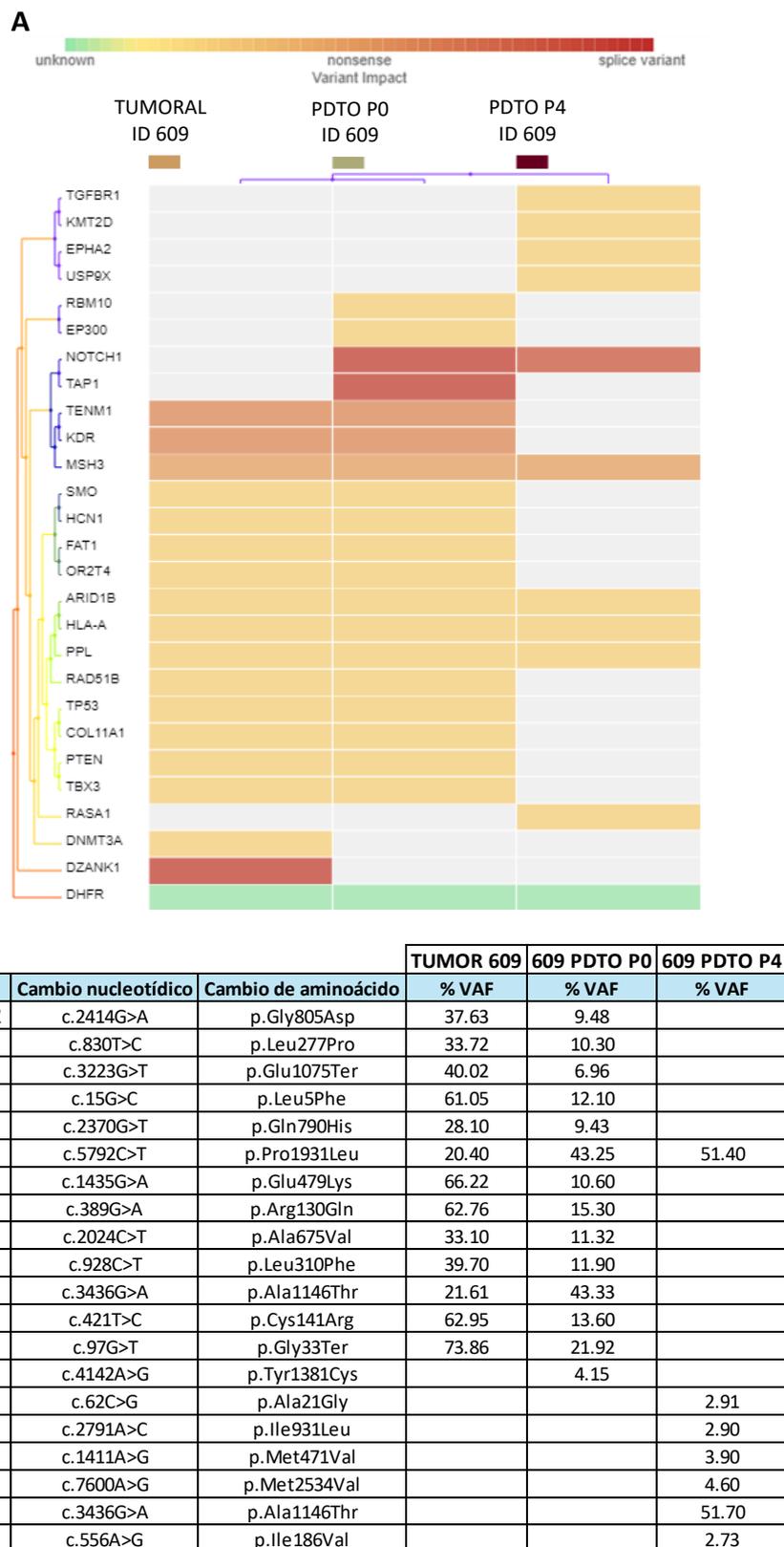


Figura 22. Análisis de las alteraciones génicas del paciente con ID 609 presentes en el tejido tumoral, en el PDTO P0 y PDTO P4. (A) Mapa de calor de la agrupación de las muestras según las variantes detectadas y el impacto biológico de las mismas. (B) Descripción de las variantes detectadas y el porcentaje de frecuencia de la variante alélica en los PDTOs establecidos y su tumor parental. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; P: número de pase. VAF: Frecuencia de la variante alélica.

Por último, en la secuenciación del tumor primario del paciente con ID 626 se detectó una mutación en el gen *KRAS* y *PBRM1* que no se conservaron una vez se estableció el PDT0 (P0). El gen *KRAS* codifica para una GTPasa de membrana que participa en la regulación de vías de señalización relacionadas con el crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis de células tumorales. Aquellas alteraciones que se pierden en el pase 0 del PDT0 se encontraban en un bajo porcentaje de VAF en el tumor primario. Sin embargo, las mutaciones que tenían un alto porcentaje en el tumor primario, como son en los genes *CYP2D6*, *TBX22*, *NQO1* y *TPMT*, sí que se mantuvieron a lo largo del cultivo del PDT0 (Figura 23A y B).

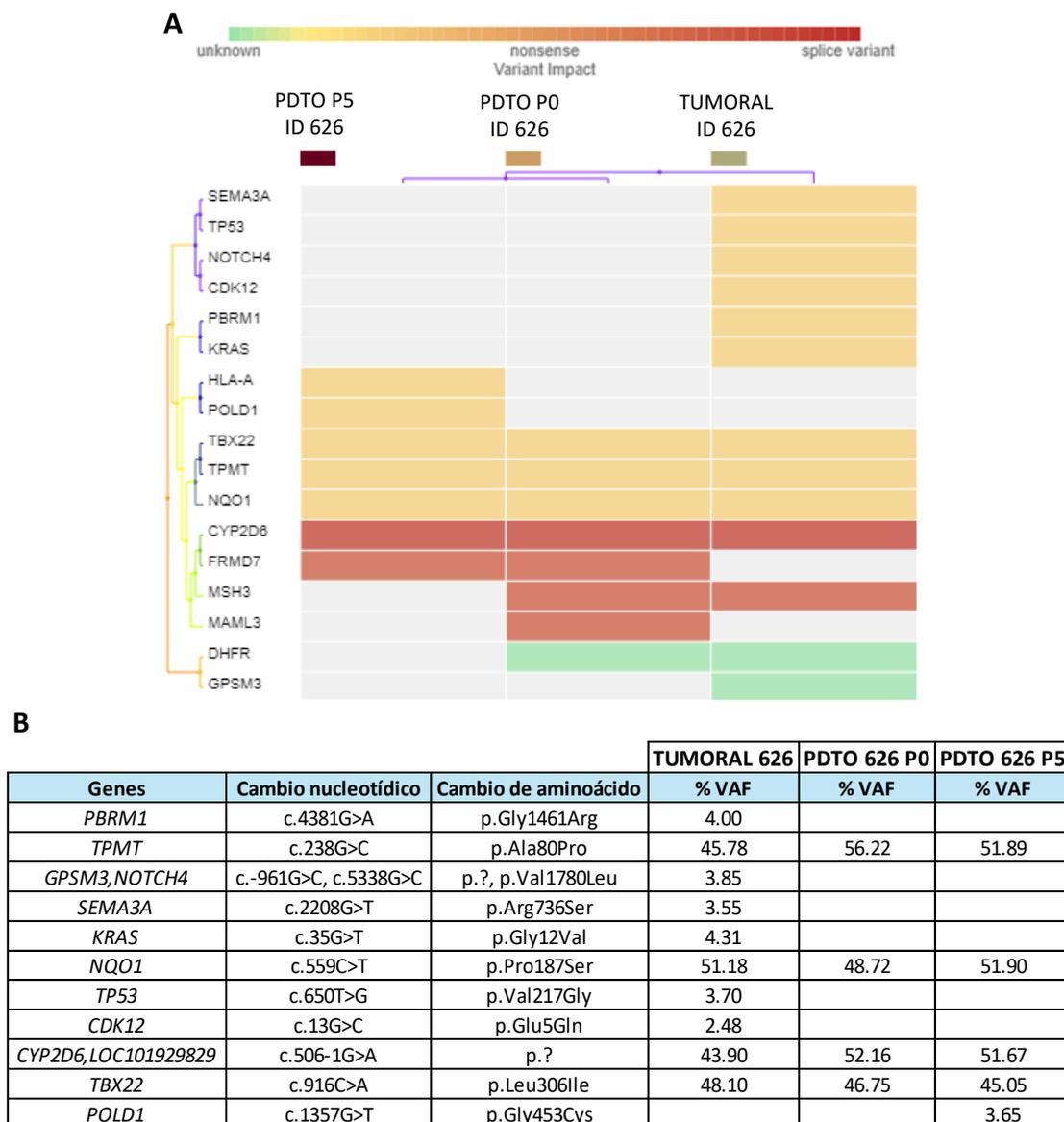


Figura 23. Análisis de las alteraciones génicas del paciente con ID 626 presentes en el tejido tumoral, en el PDT0 P0 y PDT0 P5. (A) Mapa de calor de la agrupación de las muestras según las variantes detectadas y el impacto biológico de las mismas. (B) Descripción de las variantes detectadas y el porcentaje de frecuencia de la variante alélica en los PDT0 establecidos y su tumor parental. PDT0: organoide tumoral derivado de paciente; P: número de pase. VAF: Frecuencia de la variante alélica.

4.5. CRIBADO FARMACOLÓGICO

Los PDTOs se han descrito como potenciales modelos *in vitro* para el estudio del cribado de fármacos, por lo que surge como una herramienta prometedora para evaluar la citotoxicidad de nuevos compuestos, así como para el desarrollo de tratamientos personalizados.

En el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad del Cisplatino en los organoides tumorales derivados del paciente 609. A las 72 horas y 6 días posteriores al tratamiento se tomaron imágenes de microscopía para evaluar cambios en la morfología de los PDTOs (Figura 24).

Se observa que no hay cambios reseñables en los pocillos tratados con Doxorubicina (control interno) a concentraciones de 0,1 μM , 0,5 μM y 1 μM . No obstante, en una concentración elevada de 10 μM de Doxorubicina, se pierde la integridad estructural disipándose la forma regular y los límites del organoide, además de mostrar una menor refringencia (Figura 24A).

Por lo que respecta al Cisplatino, no se observa afectación de la estructura del organoide en ninguna de las concentraciones evaluadas. Sin embargo, al tratar las células por segunda vez con Cisplatino a una concentración de 20 μM , se observa que algunos organoides empiezan a verse afectados por la acción del compuesto citotóxico, perdiendo integridad en la superficie del organoide (Figura 24B).

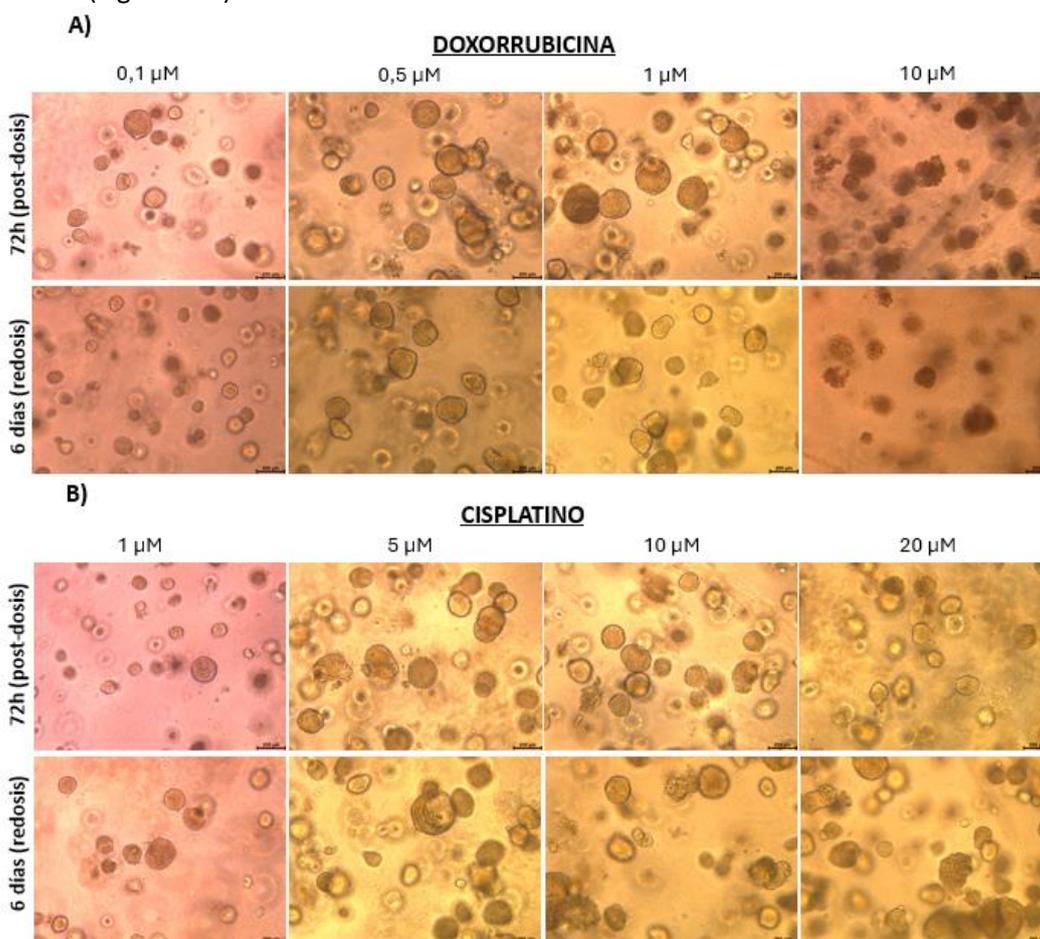


Figura 24. Imágenes de microscopía de los PDTOs del paciente con ID 609 a las 72 horas y a los 6 días posteriores al tratamiento con los antineoplásicos. (A) Tratamiento con Doxorubicina; (B) Tratamiento con Cisplatino. Escala de medida: 200 μm .

El porcentaje de viabilidad celular observada se ha cuantificado mediante CellTiter-Glo 3D assay. Los PDTOs tratados con Cisplatino presentan un 100 % de viabilidad en todas las concentraciones testadas (Figura 25A). En el caso del control interno positivo (Doxorubicina) se observa una

pérdida de la viabilidad celular a elevadas concentraciones de 20 μM (Figura 25B). Los resultados obtenidos de los pocillos testados a concentraciones 0,1 μM y 0,5 μM no fueron valorables.

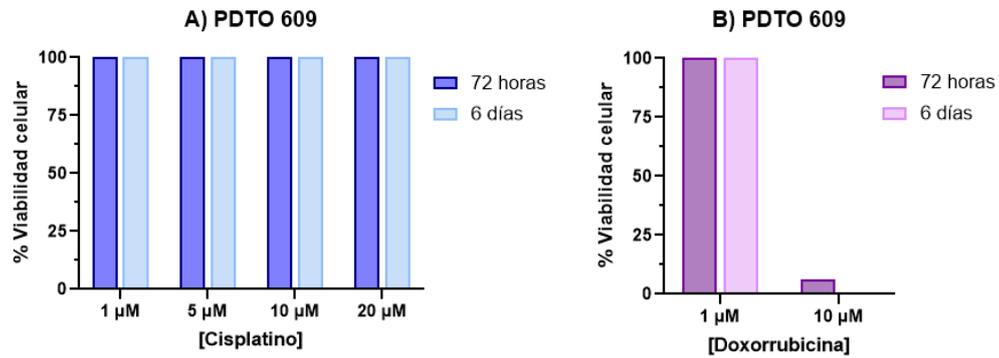


Figura 25. Representación gráfica de los porcentajes de viabilidad celular del PDTO del paciente con ID 609 frente a las concentraciones de los antineoplásicos. (A) Tratamiento con Cisplatino; (B) Tratamiento con Doxorubicina. Hechas en GraphPad.

5. DISCUSIÓN

La optimización del establecimiento de organoides derivados de pacientes es un importante reto en el desarrollo de estos modelos *in vitro* para el estudio del cáncer de pulmón. El ratio de éxito del cultivo de PDTOs depende, en gran medida, de las condiciones de cultivo entre las que se encuentra la composición del medio de cultivo. En 2019, Kim y colaboradores desarrollaron un medio de cultivo para establecer PDTOs de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón, que recibió el nombre de Minimum Basal Medium (MBM), denominado clásico en el presente trabajo. Aunque este medio contenía menos reactivos y factores de crecimiento en comparación con otros medios para el desarrollo de organoides, lograron la expansión de los PDTOs durante 6 meses sin cambios en su morfología. Además, resultó ser exitoso tanto para muestras que provenían de tejidos resecados de cáncer de pulmón como para pequeñas biopsias de tejido (Kim et al., 2019).

Ese mismo año, el laboratorio de Clevers propone un medio de cultivo de organoides alternativo que recibe el nombre de *airway organoid* (AO) (Sachs et al., 2019). Este medio de cultivo, a diferencia del MBM, contiene factores de crecimiento de fibroblastos (FGF7 y FGF10) el inhibidor de proteínas morfogénicas óseas Noggin, que aumenta el número de células madre y bloquea su diferenciación, así como la R-spondin1 que activa la señalización WNT (Lee et al., 2021). Bajo las condiciones óptimas, los organoides se formaron en unos días con una tasa de éxito del 94 % (Sachs et al., 2019). En el presente estudio se ha demostrado que la tasa de éxito de establecimiento de organoides a largo plazo es mayor en el medio AO que en el Clásico (MBM). En concordancia con nuestros resultados, otros investigadores exponen que, utilizando el medio AO desarrollado por el laboratorio de Hans Clevers, lograron generar 3 líneas tumorales de pulmón para cultivo a largo plazo (> 13 meses) a partir de 41 casos de cáncer de pulmón (primario o metastásico) (Yokota et al., 2021).

Otro de los aspectos revisados en el presente trabajo es la importancia de la matriz extracelular en el establecimiento de PDTOs. Para un buen crecimiento y mantenimiento de los organoides, es crucial que la matriz empleada para el cultivo 3D sea capaz de recrear el microambiente tumoral y replicar las interacciones célula-célula y célula-matriz, así como proporcionar soporte estructural a las células. Pese a que el Matrigel® ha sido y sigue siendo el estándar en el desarrollo de organoides, sus limitaciones están impulsando el desarrollo de nuevas matrices sintéticas. Estas matrices destacan por su composición tanto química como física conocida y libre de componentes animales que les permite convertirse en una herramienta más segura y reproducible. En estas matrices, el PEG proporciona las propiedades estructurales y mecánicas necesarias, mientras que la heparina se utiliza para anclar electrostáticamente biomoléculas cargadas positivamente. En nuestro caso, probamos 2 tipos de hidrogeles PEG que difieren del Matrigel® pues se forma el hidrogel previamente a la siembra celular. Todos los hidrogeles de PEG se pueden ajustar para modular sus propiedades biomecánicas (es decir, rigidez, porosidad) para parecerse a la ECM y las características clave de los diferentes modelos de cáncer. Adicionalmente, estas propiedades biomecánicas tienen un papel clave, no solo para permitir el crecimiento de los organoides, sino también en el momento de disgregar la matriz sin afectar a la viabilidad de los organoides. Tanto los hidrogeles a base de PEG como de fibrina deben reticular química o enzimáticamente para lograr la gelificación, lo que complica la recuperación de organoides del hidrogel (Ye et al., 2020), tal y como se ha visto reflejado en el presente estudio, y puede ser una desventaja para ciertas aplicaciones. Según nuestros resultados, el mismo método de disgregación fue mucho más efectivo para las matrices con el cultivo CP435, que para el PDT0 626. Aunque no hay evidencias científicas que lo respalden, se plantea la hipótesis de que la gran densidad celular presente en el CP435 crecido en las matrices pueda fomentar el proceso de disgregación. Se considera que las células son capaces de secretar heparinasa a lo largo del cultivo y por tanto consumir la matriz a lo largo de los días. La baja

densidad y viabilidad celular observada en el cultivo del PDT0 626 habría conllevado a los resultados negativos en la disgregación de la matriz.

Por otro lado, la presencia de péptidos RGD aumenta la adhesión celular a la matriz, aumenta la interacción entre la biomolécula y las matrices y reduce la apoptosis celular, además de disminuir la rigidez y mejorar las propiedades elásticas de cualquier matriz de hidrogel con el objetivo de promover el crecimiento de organoides (Poudel et al., 2022). Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en el establecimiento de PDT0s en las matrices sin RGD en comparación con las matrices con RGD en el presente estudio.

Cabe destacar que, el cultivo de PDT0s en matrices sintéticas se encuentra aún en etapas incipientes por lo que hay una escasez de estudios que comparen el uso de estas matrices como sustitución del Matrigel® en este contexto. Pese a ello, algunos estudios sí se han centrado en el desarrollo de otras matrices sintéticas en la investigación contra el cáncer. Según lo reportado por Prince y colaboradores, consiguieron iniciar el cultivo de PDT0 de cáncer de mama además de la realización de pases en un hidrogel preparado mediante la reacción entre nanocristales de celulosa modificados químicamente y gelatina (Prince et al., 2022). Otros investigadores desarrollaron hidrogeles basados en poliisocianopéptidos (PIC), para la expansión y diferenciación de organoides hepáticos humanos. Sin embargo, las imágenes de microscopía de los organoides a los 7 días después de la siembra de células únicas mostraron que no había proliferación de los organoides (Ye et al., 2020). Estos resultados, que concuerdan con los del presente trabajo, muestran que dichas matrices no resultaron viables para el cultivo de PDT0s.

Se necesita por tanto ampliar los estudios con matrices sintéticas para confirmar nuestros resultados y estandarizar un protocolo optimizado de establecimiento de PDT0s que permita el crecimiento y mantenimiento a lo largo del tiempo de organoides tumorales derivados de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón.

Para que los PDT0s constituyan una plataforma de estudio del cáncer prometedora, deben ser capaces de conservar los marcadores histológicos y alteraciones génicas del tumor parenteral del que provienen. La inmunohistoquímica del tejido tumoral primario junto con la inmunofluorescencia de los PDT0s demostró que estos son capaces de retener las características histopatológicas del tejido tumoral original. En concordancia con otros estudios, los PDT0s de pacientes con ADC desarrollados en el presente trabajo expresan marcadores como TTF-1, citoqueratina 7 (CK7) y napsina-A, mientras que los pacientes con CCE muestran expresión de P40, p63 y CK5/6 (Kim et al., 2019 ; Wang et al., 2023).

Por otro lado, con el objetivo de estudiar y entender cómo las mutaciones afectan al transcurso de la enfermedad, se analizan los perfiles genéticos del tumor y de los organoides que hemos logrado establecer y mantener en el tiempo.

En este sentido, varios grupos han correlacionado los perfiles de expresión génica de los PDT0s establecidos con los del tumor parental. Kim *et al.* investigaron si sus organoides de cáncer de pulmón son capaces de mantener las alteraciones genéticas de los tejidos que provienen durante la expansión de PDT0s a largo plazo. Para comprobarlo secuenciaron el exoma completo (WES) en PDT0s a pases tempranos (< P4) y pases avanzados (> P10). Observaron que las mutaciones y las alteraciones del número de copias (CNV) detectadas en los tejidos y los organoides de pase temprano se mantuvieron durante el cultivo a largo plazo. Además vieron que el número de mutaciones aumentó en pases posteriores, lo que puede sugerir una expansión subclonal (Kim et al., 2019). Otros laboratorios, como es el caso de Chen *et al.*, compararon también las características genómicas de los tejidos tumorales originales y los PDT0s mediante WES y obtuvieron como resultado que, centrándose en los 20 genes relacionados con el cáncer de pulmón con mayor prevalencia, se mantenía una consistencia superior al 80 % entre tumor y organoide en la mayoría de los casos (Chen et al., 2020). Estos resultados están en concordancia

con algunos de los pacientes estudiados en el presente trabajo (ID 554 e ID 615) que mantienen las mutaciones a lo largo de los pases. No obstante, en algunos casos, se pierden o aparecen nuevas mutaciones en genes, lo cual podría deberse a una selección clonal en la que algunas subpoblaciones celulares tumorales con unas determinadas características genéticas proliferan en mayor medida que otras.

Es de gran importancia destacar la pérdida de la mutación del gen *KRAS* al establecer el PDTO del paciente con ID 626. Las mutaciones en *KRAS* se asocian con antecedentes de tabaquismo y, más concretamente, la mutación *KRAS* G12V ocurre en aproximadamente el 21% de los pacientes con CPNM mutado en *KRAS* (Gao & Shen, 2022). Esta alteración presentaba un bajo porcentaje de VAF en la muestra tumoral que podría deberse a la heterogeneidad intratumoral. Puesto que para el establecimiento del cultivo de organoides se parte de una pequeña fracción del tumor, este podría presentar una representación minoritaria de la población celular mutada en *KRAS*. Esto puede deberse a la presencia de un subclon celular con dicha mutación que acaba perdiéndose por un proceso de selección que permite el crecimiento de otros clones.

Los PDTOs son un modelo avanzado de estudio *in vitro* capaz de recrear las condiciones del tumor *in vivo* y, como consecuencia, se obtiene una representación de los resultados más precisa en comparación con los cultivos tradicionales. Se proponen por tanto como una potente herramienta de estudio para el testado de fármacos, así como para predecir la respuesta del paciente al tratamiento, la toxicidad y el desarrollo de resistencias.

La literatura científica refleja que las células cultivadas en 3D muestran una resistencia notablemente mayor a la terapia de irradiación y a fármacos quimioterápicos que los cultivos 2D (Koch et al., 2021). En las últimas décadas, la quimioterapia adyuvante basada en Cisplatino se ha establecido como un tratamiento eficaz en el CPNM resecaado (Rotolo et al., 2014). No obstante, nuestros estudios no han mostrado el efecto esperado del Cisplatino en los PDTOs, puesto que no se refleja una acción citotóxica contra los organoides en cultivo. De la misma manera, no se observa efecto de la Doxorubicina hasta una concentración de 10 μM . En este caso no podemos afirmar que la Doxorubicina actúa sobre los PDTOs a partir de esta concentración debido a que el rango entre concentraciones testadas (1 μM y 10 μM) es amplio, por lo que se deben evaluar concentraciones intermedias en los próximos experimentos.

En línea con nuestros resultados Chitcholtan y colaboradores observaron que el Cisplatino no inducía apoptosis o necrosis en el modelo 3D de esferoides (Chitcholtan et al., 2012). De igual manera, Ono *et al.* mostraron que el valor de concentración inhibitoria media (IC50) para el tratamiento con Cisplatino y Paclitaxel en líneas celulares de cáncer de ovario cultivadas en 3D en Matrigel eran significativamente mayores que los de células cultivadas en 2D (Ono et al., 2022). Siguiendo el mismo patrón, Sogawa *et al.* observaron que el Cisplatino redujo la viabilidad celular en cultivos 2D, mientras que en cultivos 3D promovía el crecimiento tumoral de las células metastásicas del cáncer colorrectal (Sogawa et al., 2021). Por tanto, con los resultados obtenidos en el presente trabajo junto con otros estudios, se deduce que la resistencia a antineoplásicos se ve incrementada en estudios de modelos tridimensionales en comparación con células en monocapa. Se han derivado numerosas explicaciones al respecto, que la estructura tridimensional se encuentre en estado quiescente, teniendo como consecuencia un menor efecto de rotura del ADN por efecto del quimioterápico (Chitcholtan et al., 2012). De la misma manera, la expresión de componentes de la ECM puede inducir resistencia a fármacos mediada por adhesión celular (CAM-DR) formando una barrera física que disuelve o retrasa la administración del fármaco (Nowacka et al., 2021), así como la hipoxia tumoral que conduce a la activación de genes implicados en la supervivencia celular y la sensibilidad a los fármacos (Edmondson et al., 2014). No obstante, se requieren estudios futuros para determinar el mecanismo por el cual los organoides presentan una alta resistencia a fármacos.

En resumen, nuestros resultados mostraron que el medio de cultivo es un componente esencial para el éxito del cultivo de PDTOs, siendo el AO condicionado el único medio que permitió el crecimiento de todos los organoides a lo largo del tiempo (Figura 26A). El uso de matrices sintéticas como alternativa al Matrigel® para el establecimiento de PDTOs en CPNM sigue siendo un desafío, por lo que se requieren investigaciones futuras adicionales para optimizar su aplicación (Figura 26B). Se ha comprobado que los PDTOs conservan los marcadores histológicos del tumor parental, aunque no las alteraciones génicas (Figura 26C). Por último, el cribado farmacológico con Cisplatino no tuvo efecto citotóxico sobre los PDTOs (Figura 26D).

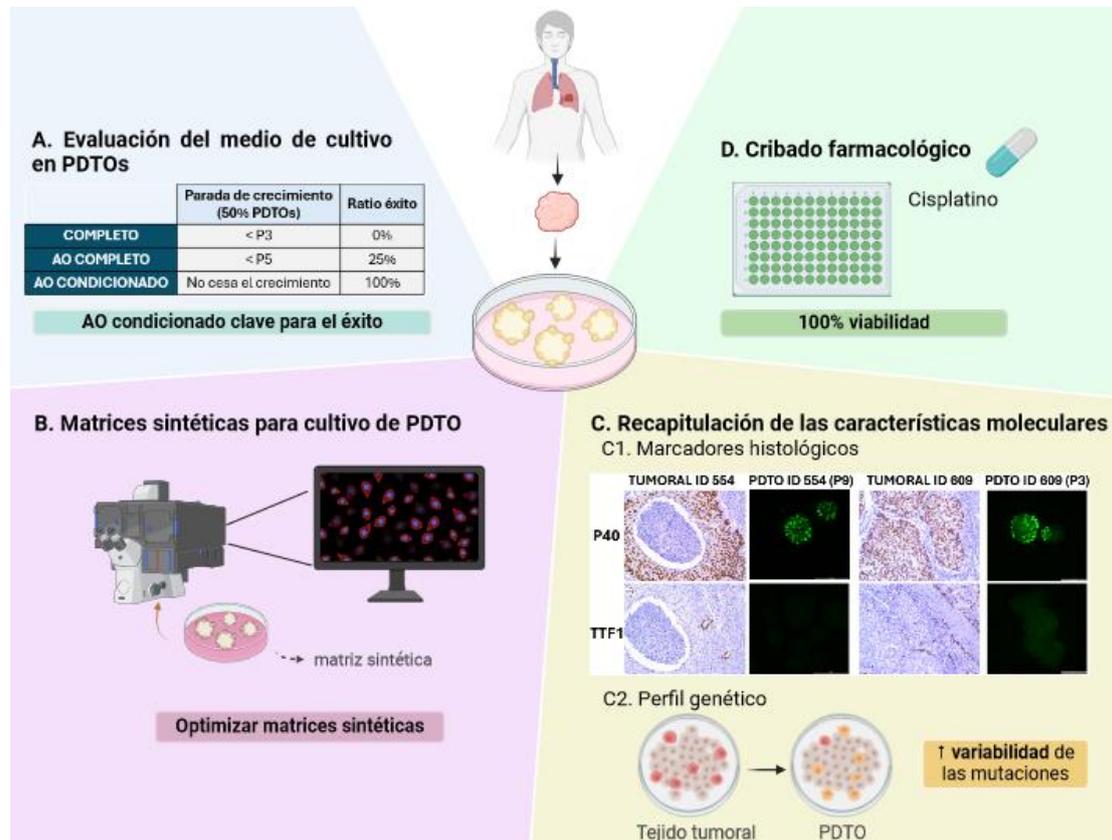


Figura 26. Recapitulación de los resultados obtenidos en el presente trabajo. PDTO: organoide tumoral derivado de paciente; P: número de pase; CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico. Hecha en Biorender.

El desarrollo de organoides tumorales derivados de pacientes se presenta como una aproximación emergente para el estudio oncológico, tal y como se ha detallado en el presente estudio. El uso de PDTOs permite entender la biología y progresión del tumor, además de predecir el tratamiento óptimo para el paciente y las resistencias a fármacos. Cabe destacar que la investigación de PDTOs ha avanzado rápidamente en los últimos años. Aun así, es de vital importancia el desarrollo de futuros estudios para estandarizar el cultivo de organoides y maximizar el potencial de PDTOs en la investigación contra el cáncer de pulmón no microcítico.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado que el medio de cultivo de organoides es clave para el éxito de establecimiento y mantenimiento de PDTOs, siendo el medio AO condicionado el que posee una mayor tasa de éxito.
2. No se ha conseguido mantener el cultivo de PDTO de CPNM en las matrices extracelulares sintéticas.
3. Se ha demostrado que los PDTOs recapitulan la histología del tumor parental del que provienen. Sin embargo, se han detectado cambios en algunas alteraciones genéticas al establecer los PDTOs con respecto a las alteraciones del tumor primario.
4. El uso de PDTOs como plataforma para el cribado de fármacos requiere de una mejora en el protocolo establecido.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abuwatfa, W. H., Pitt, W. G., & Hussein, G. A. (2024). Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. *Journal of Biomedical Science*, *31*(1), 1–39. <https://doi.org/10.1186/S12929-024-00994-Y>
- Akhtar, N., & Bansal, J. G. (2017). Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Current Problems in Cancer*, *41*(5), 328–339. <https://doi.org/10.1016/J.CURRPROBLCANCER.2017.07.002>
- Bae, J., Choi, Y. S., Cho, G., & Jang, S. J. (2022). The Patient-Derived Cancer Organoids: Promises and Challenges as Platforms for Cancer Discovery. *Cancers*, *14*(9), 2144. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14092144>
- 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>
- Cagle, P. T., Allen, T. C., Bernicker, E. H., Ge, Y., Haque, A., & Barrios, R. (2016). Impact of Recent Developments in Lung Cancer on the Practice of Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *140*(4), 322–325. <https://doi.org/10.5858/ARPA.2015-0535-SA>
- Chen, J. H., Chu, X. P., Zhang, J. T., Nie, Q., Tang, W. F., Su, J., Yan, H. H., Zheng, H. P., Chen, Z. X., Chen, X., Song, M. M., Yi, X., Li, P. S., Guan, Y. F., Li, G., Deng, C. X., Rosell, R., Wu, Y. L., & Zhong, W. Z. (2020). Genomic characteristics and drug screening among organoids derived from non-small cell lung cancer patients. *Thoracic Cancer*, *11*(8), 2279–2290. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13542>
- Chitcholtan, K., Sykes, P. H., & Evans, J. J. (2012). The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *Journal of Translational Medicine*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-38/FIGURES/8>
- Duma, N., Santana-Davila, R., & Molina, J. R. (2019). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, *94*(8), 1623–1640. <https://doi.org/10.1016/J.MAYOCP.2019.01.013>
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, *12*(4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/ADT.2014.573>
- Fontana, F., Marzagalli, M., Sommariva, M., Gagliano, N., & Limonta, P. (2021). In Vitro 3D Cultures to Model the Tumor Microenvironment. *Cancers*, *13*(12), 2970. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13122970>
- Foo, M. A., You, M., Chan, S. L., Sethi, G., Bonney, G. K., Yong, W. P., Chow, E. K. H., Fong, E. L. S., Wang, L., & Goh, B. C. (2022). Clinical translation of patient-derived tumour organoids-bottlenecks and strategies. *Biomarker Research*, *10*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S40364-022-00356-6>
- Gao, L., & Shen, W. (2022). Light at the end of the tunnel: Clinical features and therapeutic prospects of KRAS mutant subtypes in non-small-cell lung cancer. *Frontiers in Genetics*, *13*, 890247. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2022.890247>
- Grodzka, A., Knopik-Skrocka, A., Kowalska, K., Kurzawa, P., Krzyzaniak, M., Stencel, K., & Bryl, M. (2023). Molecular alterations of driver genes in non-small cell lung cancer: from diagnostics to targeted therapy. *EXCLI journal*, *22*, 415–432. <https://doi.org/10.17179/excli2023-6122>

- Grönholm, M., Feodoroff, M., Antignani, G., Martins, B., Hamdan, F., & Cerullo, V. (2021). Patient-Derived Organoids for Precision Cancer Immunotherapy. *Cancer Research*, *81*(12), 3149–3155. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-4026>
- Heo, J. H., Kang, D., Seo, S. J., & Jin, Y. (2022). Engineering the Extracellular Matrix for Organoid Culture. *International Journal of Stem Cells*, *15*(1), 60. <https://doi.org/10.15283/IJSC21190>
- Herreros-Pomares, A., de-Maya-Girones, J. D., Calabuig-Fariñas, S., Lucas, R., Martínez, A., Pardo-Sánchez, J. M., Alonso, S., Blasco, A., Guijarro, R., Martorell, M., Escorihuela, E., Chiara, M. D., Duréndez, E., Gandía, C., Forteza, J., Sirera, R., Jantus-Lewintre, E., Farràs, R., & Camps, C. (2019). Lung tumorspheres reveal cancer stem cell-like properties and a score with prognostic impact in resected non-small-cell lung cancer. *Cell Death & Disease*, *10*(9), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1898-1>
- Ilié, M., & Hofman, P. (2016). Pros: Can tissue biopsy be replaced by liquid biopsy? *Translational Lung Cancer Research*, *5*(4), 420–423. <https://doi.org/10.21037/TLCR.2016.08.06>
- Kaur, S., Kaur, I., Rawal, P., Tripathi, D. M., & Vasudevan, A. (2021). Non-matrigel scaffolds for organoid cultures. *Cancer Letters*, *504*, 58–66. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2021.01.025>
- Kim, M., Mun, H., Sung, C. O., Cho, E. J., Jeon, H. J., Chun, S. M., Jung, D. J., Shin, T. H., Jeong, G. S., Kim, D. K., Choi, E. K., Jeong, S. Y., Taylor, A. M., Jain, S., Meyerson, M., & Jang, S. J. (2019). Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nature Communications*, *10*(1), 3991. <https://doi.org/10.1038/S41467-019-11867-6>
- Koch, J., Mönch, D., Maaß, A., Gromoll, C., Hehr, T., Leibold, T., Schlitt, H. J., Dahlke, M. H., & Renner, P. (2021). Three dimensional cultivation increases chemo- and radioresistance of colorectal cancer cell lines. *PLoS ONE*, *16*(1), e0244513. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0244513>
- Kuśnierczyk, P. (2023). Genetic differences between smokers and never-smokers with lung cancer. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1063716. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1063716>
- Lee, D., Kim, Y., & Chung, C. (2021). Scientific Validation and Clinical Application of Lung Cancer Organoids. *Cells*, *10*(11), 3012. <https://doi.org/10.3390/CELLS10113012>
- Li, W., Liu, J., Bin, Hou, L. K., Yu, F., Zhang, J., Wu, W., Tang, X. M., Sun, F., Lu, H. M., Deng, J., Bai, J., Li, J., Wu, C. Y., Lin, Q. L., Lv, Z. W., Wang, G. R., Jiang, G. X., Ma, Y. S., & Fu, D. (2022). Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Molecular Cancer*, *21*(1), 25. <https://doi.org/10.1186/S12943-022-01505-Z>
- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., & Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *The European Respiratory Journal*, *48*(3), 889–902. <https://doi.org/10.1183/13993003.00359-2016>
- Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8661. <https://doi.org/10.3390/IJMS22168661>
- Nowacka, M., Sterzynska, K., Andrzejewska, M., Nowicki, M., & Januchowski, R. (2021). Drug resistance evaluation in novel 3D in vitro model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *138*, 111536. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111536>
- Ono, K., Sato, K., Nakamura, T., Yoshida, Y., Murata, S., Yoshida, K., Kanemoto, H., Umemori, K., Kawai, H., Obata, K., Ryumon, S., Hasegawa, K., Kunisada, Y., Okui, T., Ibaragi, S., Nagatsuka, H., & Sasaki, A. (2022). Reproduction of the Antitumor Effect of Cisplatin and Cetuximab

- Using a Three-dimensional Spheroid Model in Oral Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 19(8), 1320. <https://doi.org/10.7150/IJMS.74109>
- Park, H. J., Lee, S. H., & Chang, Y. S. (2020). Recent advances in diagnostic technologies in lung cancer. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 35(2), 257–268. <https://doi.org/10.3904/KJIM.2020.030>
- Pérez del Río, E., Santos, F., Rodríguez Rodríguez, X., Martínez-Miguel, M., Roca-Pinilla, R., Arís, A., Garcia-Fruitós, E., Veciana, J., Spatz, J. P., Ratera, I., & Guasch, J. (2020). CCL21-loaded 3D hydrogels for T cell expansion and differentiation. *Biomaterials*, 259, 120313. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.120313>
- Podaza, E., Kuo, H. H., Nguyen, J., Elemento, O., & Martin, M. L. (2022). Next generation patient derived tumor organoids. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 250, 84–97. <https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2022.08.003>
- Poudel, H., Sanford, K., Szwedlo, P. K., Pathak, R., & Ghosh, A. (2022). Synthetic Matrices for Intestinal Organoid Culture: Implications for Better Performance. *ACS Omega*, 7(1), 38. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.1C05136>
- Prince, E., Cruickshank, J., Ba-Alawi, W., Hodgson, K., Haight, J., Tobin, C., Wakeman, A., Avoulov, A., Topolskaia, V., Elliott, M. J., McGuigan, A. P., Berman, H. K., Haibe-Kains, B., Cescon, D. W., & Kumacheva, E. (2022). Biomimetic hydrogel supports initiation and growth of patient-derived breast tumor organoids. *Nature Communications*, 13(1), 1466. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28788-6>
- Rotolo, F., Dunant, A., Le Chevalier, T., Pignon, J. P., & Arriagada, R. (2014). Adjuvant cisplatin-based chemotherapy in nonsmall-cell lung cancer: new insights into the effect on failure type via a multistate approach. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 25(11), 2162–2166. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDU442>
- Sachs, N., Papaspyropoulos, A., Ommen, D. D. Z., Heo, I., Böttlinger, L., Klay, D., Weeber, F., Huelsz-Prince, G., Jakobachvili, N., Amatngalim, G. D., Ligt, J. de, Hoeck, A. van, Proost, N., Viveen, M. C., Lyubimova, A., Teeven, L., Derakhshan, S., Korving, J., Begthel, H., ... Clevers, H. (2019). Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *The EMBO Journal*, 38(4), e100300. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2018100300>
- Shariati, L., Esmaeili, Y., Haghjooy Javanmard, S., Bidram, E., & Amini, A. (2021). Organoid technology: Current standing and future perspectives. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 39(12), 1625–1649. <https://doi.org/10.1002/STEM.3379>
- Silva-Pedrosa, R., Salgado, A. J., & Ferreira, P. E. (2023). Revolutionizing Disease Modeling: The Emergence of Organoids in Cellular Systems. *Cells*, 12(6), 930. <https://doi.org/10.3390/CELLS12060930>
- Sogawa, C., Eguchi, T., Namba, Y., Okusha, Y., Aoyama, E., Ohyama, K., & Okamoto, K. (2021). Gel-Free 3D Tumoroids with Stem Cell Properties Modeling Drug Resistance to Cisplatin and Imatinib in Metastatic Colorectal Cancer. *Cells*, 10(2), 344. <https://doi.org/10.3390/CELLS10020344>
- Šutić, M., Vukić, A., Baranašić, J., Försti, A., Džubur, F., Samaržija, M., Jakopović, M., Brčić, L., & Knežević, J. (2021). Diagnostic, Predictive, and Prognostic Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Management. *Journal of Personalized Medicine*, 11(11), 1102. <https://doi.org/10.3390/JPM11111102>
- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. *Contemporary Oncology*, 25(1), 45. <https://doi.org/10.5114/WO.2021.103829>

- Thirusangu, P., & Vigneshwaran, V. (2020). Lung Cancer: Pathophysiology and Current Advancements in Therapeutics. *Chronic Lung Diseases: Pathophysiology and Therapeutics*, 129–141. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3734-9_6/TABLES/4
- Wang, H., Brown, P. C., Chow, E. C. Y., Ewart, L., Ferguson, S. S., Fitzpatrick, S., Freedman, B. S., Guo, G. L., Hedrich, W., Heyward, S., Hickman, J., Isoherranen, N., Li, A. P., Liu, Q., Mumenthaler, S. M., Polli, J., Proctor, W. R., Ribeiro, A., Wang, J. Y., Wang, R. L., Huang, S. M. (2021). 3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration. *Clinical and Translational Science*, 14(5), 1659–1680. <https://doi.org/10.1111/CTS.13066>
- Wang, H., Zhang, Y., Zhang, H., Cao, H., Mao, J., Chen, X., Wang, L., Zhang, N., Luo, P., Xue, J., Qi, X., Dong, X., Liu, G., & Cheng, Q. (2024). Liquid biopsy for human cancer: cancer screening, monitoring, and treatment. *MedComm*, 5(6), e564. <https://doi.org/10.1002/MCO2.564>
- Wang, H.-M., Zhang, C.-Y., Peng, K.-C., Chen, H.-J., Wu, Y.-L., Yang, J.-J., Chen, Z.-X., Su, J.-W., Li, Y.-F., Li, W.-F., Gao, Q.-Y., Zhang, S.-L., Chen, Y.-Q., Zhou, Q., Xu, C., Xu, C.-R., Wang, Z., Su, J., Yan, H.-H., & Zhang, X.-C. (2023). Using patient-derived organoids to predict locally advanced or metastatic lung cancer tumor response: A real-world study. *Cell Reports Medicine*, 4(2), 100911. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100911>
- West, L., Vidwans, S. J., Campbell, N. P., Shrager, J., Simon, G. R., Bueno, R., Dennis, P. A., Otterson, G. A., & Salgia, R. (2012). A novel classification of lung cancer into molecular subtypes. *PloS one*, 7(2), e31906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031906>
- Xin, X., Yang, H., Zhang, F., & Yang, S. T. (2019). 3D cell coculture tumor model: A promising approach for future cancer drug discovery. *Process Biochemistry*, 78, 148–160. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2018.12.028>
- Yang, H., Wang, Y., Wang, P., Zhang, N., & Wang, P. (2021). Tumor organoids for cancer research and personalized medicine. *Cancer Biology & Medicine*, 19(3), 319–332. <https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2021.0335>
- Ye, S., Boeter, J. W. B., Mihajlovic, M., van Steenbeek, F. G., van Wolferen, M. E., Oosterhoff, L. A., Marsee, A., Caiazzo, M., van der Laan, L. J. W., Penning, L. C., Vermonden, T., Spee, B., & Schneeberger, K. (2020). A Chemically Defined Hydrogel for Human Liver Organoid Culture. *Advanced Functional Materials*, 30(48), 2000893. <https://doi.org/10.1002/ADFM.202000893>
- Yokota, E., Iwai, M., Yukawa, T., Yoshida, M., Naomoto, Y., Haisa, M., Monobe, Y., Takigawa, N., Guo, M., Maeda, Y., Fukazawa, T., & Yamatsuji, T. (2021). Clinical application of a lung cancer organoid (tumoroid) culture system. *NPI Precision Oncology*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41698-021-00166-3>
- Zanoni, M., Cortesi, M., Zamagni, A., Arienti, C., Pignatta, S., & Tesei, A. (2020). Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00931-0>

ANEXOS

ANEXO 1. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030.

- Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

	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			

- Descripción breve de la alineación del TFG con los ODS, marcados en la tabla anterior, con un grado alto.

El presente trabajo se encuentra estrechamente relacionado con el ODS 3: Salud y bienestar. Su objetivo principal es garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades. Concretamente, este trabajo se relaciona con el objetivo 3.4 que plantea para el año 2030 reducir en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles mediante la prevención y el tratamiento y promover la salud mental y el bienestar, pues el cáncer de pulmón no microcítico es una enfermedad no transmisible con la mayor tasa de incidencia y mortalidad en la población por cáncer.

Por otro lado, el trabajo se relaciona también con el ODS 17: Alianzas para lograr objetivos. Para la realización de este trabajo se ha colaborado con servicios del Hospital General Universitario de Valencia, como son Anatomía Patológica, Oncología y Cirugía Torácica. Además, se ha colaborado con el laboratorio de la Dr. Judith Guasch (CSIC-ICMAB, Barcelona), el cual ha diseñado y proporcionado las matrices extracelulares sintéticas empleadas dentro del objetivo 2 del presente trabajo. Por último, se ha colaborado con laboratorios externos (Dr. Luis Paz-Arez y el Dr. Hans Clevers) para la obtención de las líneas celulares productoras de los factores R-spondina 1 y Noggin, empleados para el desarrollo de PDTOS.

ANEXO 2. DOCUMENTO INFORMADO AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS PACIENTES DEL ESTUDIO



DOCUMENTO DE INFORMACION AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

DONANTE: _____

ACERCA DE LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS, TERAPÉUTICOS O DIAGNÓSTICOS.

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	Oncología Molecular
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Dr. Carlos Camps
TLF CONTACTO (despacho)	963131800 Ext: 437461
EMAIL	Camps_car@gva.es
CENTRO	Servicio de Oncología Médica (SOM) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) y Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV)
EQUIPO INVESTIGADOR	Facultativos del SOM, personal de la Unidad de Investigación Clínica del SOM, y del laboratorio de Oncología Molecular, miembros de los servicios quirúrgicos involucrados (Cirugía Torácica, Cirugía General), facultativos del servicio de Anatomía Patológica.

1. DESCRIPCIÓN GENERAL: La línea de investigación de “**Oncología Molecular**” centra sus esfuerzos en la comprensión de la patogénesis de los eventos genéticos y moleculares implicados en el origen y la progresión del cáncer. Uno de los aspectos de mayor interés en esta línea de investigación es la búsqueda de biomarcadores que puedan ser usados en la clínica y ayuden a la individualización del tratamiento del cáncer.

PROPÓSITO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Analizar en diferentes tipos de muestras, factores que puedan ser importantes en el diagnóstico, pronóstico y en la respuesta del cáncer a los tratamientos empleados, así como en la aparición de efectos tóxicos asociados a dichos tratamientos. Si bien la constitución genética de los seres humanos es muy similar, existen pequeñas diferencias entre las personas que, en algunos casos podrían asociarse con el desarrollo o evolución de diferentes enfermedades. Por otra parte, los tumores también presentan diferencias a nivel genético que necesitan seguir siendo estudiadas. Por lo tanto, para poder llevar a cabo esta línea de investigación, es necesario disponer de muestras biológicas para poder realizar estos estudios genéticos. También es necesario recoger datos sobre su historial médico para obtener información que pudiera tener relevancia para nuestros estudios.

2. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO: Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido en las instalaciones del CHGUV se tomarán muestras de sus tejidos y/o sangre. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente una parte de la muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a una colección de muestras que se usará con fines de investigación biomédica, sin que esto suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. También es posible que le recojamos muestras biológicas que no requieran un procedimiento invasivo, como orina, heces, saliva etc. o que el procedimiento de obtención sea mínimamente invasivo como una extracción de sangre. Las muestras que done se almacenarán en una colección de muestras que corresponden a una Línea de Investigación sobre Oncología Molecular, que se encuentra en las instalaciones de la FIHGUV y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras solo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente y que hayan sido evaluados y aprobados por el CEIC, en los que participen miembros del equipo investigador que forma parte de esta línea de investigación.

3. OBJETIVO: El Centro Sanitario en el que usted está siendo atendido/tratado, dispone de investigadores que desean recoger y almacenar sus muestras biológicas para poder realizar proyectos de investigación biomédica en el área de la Oncología. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico, pronóstico y tratamientos.



4. BENEFICIOS ESPERADOS: Por su participación no percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Sin embargo, si las intervenciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

5. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN: Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información con la que contamos relacionada con su enfermedad.

Es posible, que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de los datos obtenidos en la investigación. A estos efectos se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que y se adjunta al presente documento.

6. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO. La decisión de donar muestras biológicas es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se han llevado a cabo una vez haya revocado su consentimiento.

7. RIESGOS. El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestras sobrantes de la intervención, muestras invasivas obtenidas durante los procedimientos de diagnóstico, o muestras de sangre extra que se han obtenido para ser utilizadas en investigación. En este último caso, la extracción de sangre, apenas tiene efectos secundarios, lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días. En el caso de las muestras que requieren procedimientos más complejos o invasivos, estos sólo se realizarán si forman parte del procedimiento habitual que debe realizarse para su correcto diagnóstico o tratamiento de su enfermedad.

8. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD. Sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos de la que es responsable el Investigador del Proyecto, que debe estar inscrita en un registro nacional dependiente del Instituto de Salud Carlos III y que debe cumplir con todos los requisitos legales. Sólo el INVESTIGADOR RESPONSABLE podrá relacionar estos datos con usted, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento y de garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación. La información será procesada durante el análisis de los datos obtenidos y aparecerá en los informes y/o memorias de los proyectos derivados de la Línea de Investigación, aunque en ningún caso será posible identificarle, asegurando en todo momento el cumplimiento de la **Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales.**

La cesión de muestras así como de la información contenida en las bases de datos vinculadas a las mismas, solo se realizará si forman parte de la línea de investigación en la cual participan miembros del equipo investigador, realizándose un procedimiento de codificación previo, que consiste en desligar la información que le identifica sustituyéndola por un código.

Asimismo, el titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras, y ejercer los derechos de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que figura en el apartado 11) en los términos previstos en la normativa aplicable, dirigiendo al titular del centro el escrito correspondiente firmado por Ud. y copia de un documento acreditativo de su identidad.



9. DESTINO DE LAS MUESTRAS TRAS FINALIZACION DE LA LÍNEA DE INVESTIGACION. En el supuesto de finalización de la línea de investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones: a) la destrucción de la muestra sobrante, b) su utilización en otros proyectos de investigación biomédica, para lo cual, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al Biobanco del CHGUV (en el siguiente apartado le explicamos de manera resumida en que consiste un Biobanco y cuáles son sus objetivos). En este caso, deberá marcar esta opción en el consentimiento incluido en este documento. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.

10. BIOBANCO. DEFINICIÓN Y OBJETIVOS. El Biobanco del CHGUV es un establecimiento público, sin ánimo de lucro, que acoge una colección organizada de muestras biológicas. Estas muestras almacenadas en el Biobanco, tienen por finalidad ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica que hayan sido aprobados por los comités ético y científico a los que esté adscrito el Biobanco. Los resultados de las investigaciones realizadas con estas muestras pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades o en nuevas formas de tratamientos de las mismas. Sus muestras seguirán almacenadas en el Biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.



11. DECLARACIONES Y FIRMAS.

Declaración del donante:

D./Dña _____, de _____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ y nº de SIP _____

D./Dña _____, de _____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente _____, con DNI _____ y nº de SIP _____

DECLARO

Que he sido informado por el profesional de salud abajo firmante:

- Sobre las ventajas e inconvenientes del procedimiento
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán tratados de acuerdo a la legislación vigente.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación o anonimización de todos mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas. Esta eliminación no se extendería a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo
- Que en cualquier momento, yo, mi representante legal, o tutor, de conformidad con lo establecido en el artículo 4, punto 5 de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, puedo solicitar información sobre los datos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas

CONSIENTO

- Que el CHGUV y la FIHGUV, a través de los miembros del equipo investigador de la Línea de Investigación: "Oncología Molecular", utilicen mis datos y las muestras, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones biomédicas dentro del marco de la línea de investigación antes mencionada, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos.
- Libre y voluntariamente en la donación voluntaria de: (márquese con una cruz lo que proceda)
 - Mis tejidos excedentes
 - Muestra de heces, orina o saliva
 - Muestra de sangre
 - Muestras obtenidas en procedimientos que sean necesario para el diagnóstico)
- Yo, mi representante legal o tutor, accedo (márquese sí o no) a que los miembros del equipo investigador puedan contactarme en el futuro en el caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.
 - Si
 - No
- Que en el supuesto de finalización de la línea de investigación, mis muestras sean (márquese con una cruz lo que proceda)
 - destruidas
 - cedidas al Biobanco del CHGUV y anonimizadas
 - cedidas al Biobanco del CHGUV codificada, junto a los datos clínicos asociados.

D. Dña : _____ FIRMA: _____

En _____, a _____ de _____ de 20____

DECLARACIÓN DEL PROFESIONAL DE SALUD:

He informado debidamente al donante:

Nombre facultativo: _____ DNI _____ Colegiado Nº _____

FIRMA : _____

En _____, a _____ de _____ de 20____



12. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.

Yo, D./Dña _____, con DNI _____ revoco el consentimiento prestado en fecha _____ de _____ de 20____ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: _____

En _____, a _____ de _____ de 20____

Yo, D./Dña _____, con DNI _____ como representante legal de D./ Dña _____, con DNI _____ revoco el consentimiento prestado en fecha _____ de _____ de 20____ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: _____

En _____, a _____ de _____ de 20____

ANEXO 3. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA ORGANOIDES: (A) CLÁSICO (B) AO COMPLETO (C) AO CONDICIONADO. AO: Airway Organoid.

A) CLÁSICO	Proveedor	Concentración Stock	Concentración final
N-2	Thermo Fisher Scientific	100X	1X
B-27	Thermo Fisher Scientific	50X	1X
bFGF	Thermo Fisher Scientific	20 µg/ml	20 ng/mL
EGF	Thermo Fisher Scientific	50 µg/ml	50 ng/mL
Inhibidor Rock	Selleckchem	10 mM	10 µM

B) AO COMPLETO	Vía de señalización	Proveedor	Concentración Stock	Concentración final
Noggin	Bloquea TGF-β	Peprtech	100 µg/ml	100 ng/ml
R-Spondina	Activación vía Wnt/β-catenina	Peprtech	500 µg/ml	500 ng/ml
B-27	Activa insulina	Thermo Fisher Scientific	50X	1X
Nicotinamida	Precursor de coenzimas	Merck	1M	10 mM
N-Acetilcisteína	Antioxidante	Merck	1M	1.25 mM
FGF-7	Activa FGFR2b	Peprtech	10 µg/ml	6.25 ng/ml
FGF-10	Activa FGFR2b	Peprtech	50 µg/ml	25 ng/ml
A83-01	Bloquea TGF-β	Tocris	500 µM	500 nM
SB202190	Bloquea p38 MAPK	Biogen	1 mM	1 µM
Inhibidor Rock	Bloquea RhoA/ROCK	Selleckchem	10 mM	5 µM

C) AO CONDICIONADO	Vía de señalización	Proveedor	Concentración Stock	Concentración final
Noggin	Bloquea TGF- β	Peprotech	8 ng/ml	10%
R-Spondina	Activación vía Wnt/ β -catenina	Peprotech	500 μ g/ml	10%
B-27	Activa insulina	Thermo Fisher Scientific	50X	1X
Nicotinamida	Precursor de coenzimas	Merck	1M	10 mM
N-Acetilcisteína	Antioxidante	Merck	1M	1.25 mM
FGF-7	Activa FGFR2b	Peprotech	10 μ g/ml	6.25 ng/ml
FGF-10	Activa FGFR2b	Peprotech	50 μ g/ml	25 ng/ml
A83-01	Bloquea TGF- β	Tocris	500 μ M	500 nM
SB202190	Bloquea p38 MAPK	Biogen	1 mM	1 μ M
Inhibidor Rock	Bloquea RhoA/ROCK	Selleckchem	10 M	5 μ M

ANEXO 4. CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE LA COHORTE Y SUS CORRESPONDIENTES BIOMARCADORES EN LAS MUESTRAS DE TEJIDO TUMORAL. ND: no disponible; VAF%: valor porcentual de la frecuencia de la variante alélica; IHQ: Inmunohistoquímica.

ID paciente	Sexo	Edad	Hábito tabáquico	Histología	Estadio	Estudio inmunohistoquímico	Alteraciones moleculares en tejido tumoral
540	Hombre	74	Fumador hasta 2019, >40 paquetes/año	Urotelial	ND	CK7+, P40+, CK20-, GATA3-, PD-L1- (<1%)	No secuenciado
554	Mujer	62	Fumadora 1 paquete/día	Carcinoma Escamoso	IA	P40+, PD-L1+ (70%), Cromogranina-, Sinaptofisina-, TTF1-	No secuenciado
570	Mujer	69	Fumadora 5 cigarrillos/día	Adenocarcinoma	IIB	TTF-1+, P40-, PD-L1- (<1%)	No se detectan mutaciones
571	Hombre	70	Fumador 9 cigarrillos/día desde hace más de 50 años	Adenocarcinoma con patrón sólido	IB	TTF-1+, P16+, CKA1/A3+, PD-L1+ (90%), Cromogranina-, Sinaptofisina-, CD56-, P40-, CK5/6-	<i>GNAS</i> p.(Arg201His) (c.602G>A) (NM_000516.6), VAF%: 4,4%,
592	Mujer	64	Ex fumador desde hace 15 años	Adenocarcinoma (predominante papilar (60%), con áreas micropapilares (30%) y acinares (10%))	IIB	CK7+, TTF-1+, PD-L1+ (60%), P40-, CK20-	<i>KRAS</i> p.(Gly12Val) (c.35G>T) (NM_033360.4), VAF%: 34,5% <i>ALK</i> p.(Arg1212Ser) (c.3634C>A) (NM_004304.5), VAF%: 29,8%.
599	Hombre	64	Ex fumador desde hace 3 semanas de 20 cigarrillos/día	Adenocarcinoma (predominantemente acinar (80%) (con patrón cribiforme y comedonecrosis) y papilar 20%)	IIIA	TTF1+, P40-, PD-L1- (<1%)	No se detectan mutaciones

ID paciente	Sexo	Edad	Hábito tabáquico	Histología	Estadio	Estudio inmunohistoquímico	Alteraciones moleculares en tejido tumoral
609	Hombre	62	Fumador de 1 caja de cigarrillos/día desde los 14 años	Carcinoma Escamoso	IIIB	PD-L1+ (20%)	<i>PTEN</i> p.(Arg130Gln) (c.389G>A) (NM_000314.8), VAF%: 44,6% <i>TP53</i> p.(Cys141Arg) (c.421T>C) (NM_000546.5), VAF%: 44,0%.
612	Mujer	71	ND	Adenocarcinoma (mucinoso invasivo predominantemente papilar 90% con 10% micropapilar)	IB	TTF-1+, CK7+, CK20+, CDX2-, estrógenos-, progesterona-, P40-, GATA3-, PD-L1- (<1%)	<i>KRAS</i> p.(Gly12Val) (c.35G>T) (NM_033360.4), VAF%: 29,2%. Fusión <i>ALK</i> .
615	Hombre	62	ND	Adenocarcinoma (predominantemente acinar (50%), sólido (25%), lepidico (20%), papilar (5%).)	IA	TTF-1+, PD-L1+ (30%), P40-	<i>KRAS</i> p.(Gly12Asp) (c.35G>A) (NM_033360.4), VAF%: 26,7% <i>TP53</i> p.(Arg248Leu) (c.743G>T) (NM_000546.5), VAF%: 20,73%.
616	Hombre	70	Ex fumador desde hace 3 años	Adenocarcinoma predominantemente acinar	IVA	TTF-1+, CKAE1/AE3+, PD-L1+ (30%), P40-, PAX-8-, S-100-, GATA3-, CD56-, cromogranina-, sinaptofisina-, LCA-	<i>TP53</i> p.(Arg181Pro) (c.542G>C) (NM_000546.5), VAF%: 41,7%.
622	Hombre	63	ND	Adenocarcinoma intestinal con áreas mucinosas	IB	CDX2+, CK20+, TTF1- y P40-, CK7-	<i>KRAS</i> p.(Gly12Asp) (c.35G>A) (NM_033360.4), VAF%: 11,6% <i>PIK3CA</i> p.(Glu545Lys) (c.1633G>A) (NM_006218.4), VAF%: 4,6%.
626	Mujer	60	ND	Adenocarcinoma	IVA	ND	ND

ANEXO 5. RECIBO DE TURNITIN



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Ángela Adam Girbés
Título del ejercicio: Curso 24_25 GENERAR INFORME TURNITIN TFGTFM ETSEAMN
Título de la entrega: 20868395:TFG_Àngela_030724.pdf
Nombre del archivo: nments_efcf3482-a794-4d3e-be1a-e47e9355beca_TFG_ngela...
Tamaño del archivo: 2.74M
Total páginas: 53
Total de palabras: 17,881
Total de caracteres: 97,463
Fecha de entrega: 03-jul.-2024 02:55p. m. (UTC+0200)
Identificador de la entre... 2412040993

