

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



ESTABLECIMIENTO DE ORGANOIDES DE TUMORES GÁSTRICOS A PARTIR DE BIOPSIAS ENDOSCÓPICAS DE ESTÓMAGO Y PIEZAS DE GASTRECTOMÍA PARA EL ESTUDIO DE CÁNCER GÁSTRICO

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: MARTA BELDA MOSCARDÓ
TUTORA EXTERNA: JOSEFA CASTILLO ALIAGA
COTUTORA EXTERNA: LORENA PEIRÓ CHOVA
TUTORA UPV: ANA VALLES LLUCH

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, JULIO 2019

Agradecimientos

Quisiera dar las gracias a mis tutoras de Trabajo Fin de Máster, la Dra. Josefa Castillo y Dra. Ana Valles, por su dedicación y su tiempo, por haber estado disponibles siempre que lo he necesitado y por la ayuda y apoyo prestado durante la realización de este trabajo.

Además, he de agradecer especialmente a Pepa por acogerme en su laboratorio, por contribuir a mi formación profesional, por la revisión crítica de este trabajo y por la confianza depositada en mí. Gracias también al resto de compañeros del laboratorio por toda la ayuda y apoyo prestados durante la realización del trabajo.

También quiero dar las gracias a mi cotutora externa, la Dra. Lorena Peiró, coordinadora del Biobanco Incliva, por facilitarme la oportunidad de compaginar el trabajo con la realización de del TFM, por apoyarme y animarme siempre a alcanzar nuevos retos, por ser un referente en mi día a día.

Gracias también, a mis compañeras del trabajo Olga y Àngela, por apoyarme siempre en mis decisiones, por sus consejos, por animarme en momentos difíciles y por estar siempre a mi lado. Sois las mejores.

A mis compañeros del máster, por todo el tiempo compartido, por todo lo que hemos aprendido juntos y porque ha sido un auténtico placer compartir este tiempo a su lado. Gracias a mis amigas, por todo el ánimo y confianza que me transmiten.

Y terminaré dando las gracias a mi familia, por ser el pilar fundamental de mi vida. Gracias por el inmenso cariño que recibo de vosotros cada día, por apoyarme en mis decisiones, alentarme cada vez que lo he necesitado y llenarme de felicidad. Gracias por todo.

Principales abreviaturas utilizadas

EpCAM: *Epithelial Cell Adhesion Molecule*

CAF: *Cancer-associated Fibroblast*

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CG: Cáncer Gástrico

CK: Citoqueratina

FMO: *Fluorescence Minus One*

GHO: *Gastric Healthy Organoid*

GNO: *Gastric Normal Organoid*

GTO: *Gastric Tumor Organoid*

GTT: *Gastric Tumor Tissue*

GNT: *Gastric Normal Tissue*

HE: Hematoxilina-Eosina

HCUV: Hospital Clínico Universitario de Valencia

IIS: Instituto de Investigación Sanitaria

ISC: *Intestinal Stem Cell*

MEC: Matriz Extracelular

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDX: *Patient-derived xenograft*

P/E: Penicilina- Estreptomina

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

UCIM: Unidad Central de Investigación Médica

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

Índice

1	Resumen/Resum/Abstract	1
1.1	Resumen.....	1
1.2	Resum	2
1.3	Abstract.....	3
2	Introducción	4
2.1	Cáncer Gástrico	4
2.2	Sistemas modelos para el estudio de cáncer.....	6
2.2.1	Modelos <i>in vitro</i>	7
2.2.1.1	Líneas celulares	7
2.2.2	Modelos <i>in vivo</i>	7
2.2.2.1	Modelos <i>xenografts</i> de líneas celulares	7
2.2.2.2	Modelos de ratón singénicos	7
2.2.2.3	<i>Patient-derived xenografts</i>	8
2.2.3	Organoides: Nuevo horizonte en el estudio del cáncer.....	8
2.2.3.1	Definición	9
2.2.3.2	Antecedentes	9
2.2.3.3	Organoides como sistema modelo de cáncer.....	9
2.2.3.4	Generación de organoides tumorales.....	9
2.2.3.5	Características de organoides tumorales	10
2.2.3.6	Aplicaciones del cultivo de organoides	10
2.2.3.7	Limitaciones de organoides tumorales	11
2.2.3.8	Microambiente tumoral	12
2.3	Organoides como modelo de estudio para cáncer gástrico.....	12
3	Objetivos	14
4	Materiales y Métodos	15
4.1	Materiales	15
4.1.1	Muestras	15
4.1.1.1	Diseño y tamaño muestral.....	15
4.1.1.2	Población	15
4.2	Métodos.....	16
4.2.1	Establecimiento de organoides	16
4.2.1.1	Procesamiento del tejido primario fuera de la cabina de seguridad biológica.....	16
4.2.1.2	Procesamiento del tejido primario dentro de la cabina de seguridad biológica.....	16
4.2.2	Cambio de medio de cultivo	17

4.2.3	Pase de organoides.....	17
4.2.4	Criopreservación de organoides	18
4.2.5	Descongelación de organoides	18
4.2.6	Extracción de ADN a partir tejido gástrico tumoral congelado	18
4.2.7	Extracción de ADN a partir de organoides	19
4.2.8	Secuenciación de ADN	19
4.2.9	Inclusión en parafina y tinción Hematoxilina-Eosina.....	19
4.2.10	Citometría de flujo.....	20
5	Resultados y discusión	22
5.1	Establecimiento de organoides de cáncer gástrico	22
5.1.1	Tiempo óptimo de digestión enzimática	22
5.1.2	Densidad celular y porcentaje de Matrigel óptimos	23
5.1.3	Tratamiento con tampón de lisis eritrocitaria	24
5.2	Crecimiento de los organoides de cáncer gástrico	25
5.3	Establecimiento del protocolo óptimo de congelación-descongelación.....	26
5.4	Organoides establecidos tras la puesta a punto.....	27
5.5	Características morfológicas de los organoides establecidos	28
5.5.1	Fenotipos morfológicos de los organoides establecidos	28
5.5.2	Fenotipo glandular de los organoides establecidos	30
5.6	Esquema de trabajo tras el establecimiento de un organoide.....	30
5.7	Análisis morfológico mediante histoquímica	31
5.8	Análisis genético: Organoide <i>versus</i> Tejido primario	32
5.9	Análisis poblacional del tejido primario por citometría de flujo.....	34
5.10	Creación de una organoidoteca de cáncer gástrico.....	38
6	Conclusiones	39
7	Referencias bibliográficas	40

1 Resumen/Resum/Abstract

1.1 Resumen

El cáncer gástrico (CG) constituye la tercera causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Actualmente, en la práctica clínica la elección del tratamiento en función de las alteraciones genéticas presentes en los pacientes (medicina personalizada) puede no resultar eficaz, debido a que a veces es complicado asociar la respuesta a determinados tratamientos con las alteraciones que presenta el tumor. Con el fin de abordar este hándicap, resulta esencial generar modelos experimentales que sean un reflejo del tumor del propio paciente. Las limitaciones de los sistemas convencionales han dado paso a una nueva tecnología basada en organoides. Esta nueva tecnología permite generar, a partir de la biopsia de un paciente, organoides tanto de tejido tumoral como de normal paciente-específicos. Sabiendo que los organoides resultan un modelo experimental prometedor capaz de mantener el fenotipo, el perfil genético y las funciones propias de los tumores humanos de forma personalizada, resulta clave definir la metodología asociada a su correcta generación, la cual varía según el tipo de tumor. En concreto, para la generación de organoides de tejido gástrico tumoral encontramos en la bibliografía procedimientos muy diversos, por tanto, se requiere establecer una metodología para su correcta y eficiente generación, así como verificar que tanto molecular como morfológicamente son un reflejo del tejido tumoral del paciente. Otro de los puntos de interés es el estudio del microambiente tumoral ya que parece claro que juega un papel clave en la progresión tumoral y en la respuesta a tratamiento. Por ello se ha abordado la puesta a punto del análisis por citometría de los diferentes tipos celulares que componen el tejido tumoral. En el presente trabajo se ha conseguido la puesta a punto del establecimiento eficiente de cultivos de organoides a partir de tejido gástrico tumoral y normal pareados, que era el objetivo principal planteado, con una tasa de éxito del 77%. Se han definido, además, diferentes parámetros como el tiempo de digestión enzimática del tejido, densidad celular óptima a plaquear en el Matrigel y concentración de Matrigel adecuada. Por otro lado, los resultados de secuenciación muestran que los organoides establecidos recapitulan en un 98% el perfil genético del tejido tumoral del cual proceden. Además, se ha puesto a punto el protocolo adecuado para el análisis morfológico de los organoides mediante histoquímica y la caracterización del tejido tumoral mediante citometría de flujo, la cual indica la presencia de diferentes poblaciones celulares (células linfocitarias y macrófagos infiltrados) y marcadores tumorales. Finalmente, todo ello ha permitido crear una organoidoteca de cáncer gástrico de interés para la comunidad científica.

Palabras clave: Cáncer Gástrico, Cultivos 3D, Organoides, Microambiente tumoral

1.2 Resum

El càncer gàstric (CG) constitueix la tercera causa de mort per càncer a tot el món. Actualment, a la pràctica clínica l'elecció del tractament en funció de les alteracions genètiques presents en els pacients (medicina personalitzada) pot no resultar eficaç, a causa que de vegades és complicat associar la resposta a determinats tractaments amb les alteracions que presenta el tumor. Per tal d'abordar aquest hàndicap, resulta essencial generar models experimentals que siguin un reflex del tumor del propi pacient. Les limitacions dels sistemes convencionals han donat pas a una nova tecnologia basada en organoides. Aquesta nova tecnologia permet generar, a partir de la biòpsia d'un pacient, organoides tant de teixit tumoral com de normal pacient-específics. Sabent que els organoides resulten un model experimental prometedor capaç de mantenir el fenotip, el perfil genètic i les funcions pròpies dels tumors humans de forma personalitzada, resulta clau definir la metodologia associada a la seva correcta generació, la qual varia segons el tipus de tumor. En concret, per a la generació d'organoides de teixit gàstric tumoral trobem en la bibliografia procediments molt diversos, per tant es requereix establir una metodologia per a la seva correcta i eficient generació, així com verificar que tant molecular com morfològicament són un reflex del teixit tumoral del pacient. Un altre dels punts d'interès és l'estudi del microambient tumoral ja que sembla clar que juga un paper clau en la progressió tumoral i en la resposta a tractament. Per això s'ha abordat la posada a punt de l'anàlisi per citometria dels diferents tipus cel·lulars que componen el teixit tumoral. En el present treball s'ha aconseguit la posada a punt de l'establiment eficient de cultius d'organoides a partir de teixit gàstric tumoral i normal aïllat, que era l'objectiu principal plantejat, amb una taxa d'èxit del 77%. S'han definit, a més, diferents paràmetres com el temps de digestió enzimàtica del teixit, densitat cel·lular òptima a plaquetjar al Matrigel i concentració de Matrigel adequada. D'altra banda, els resultats de seqüenciació mostren que els organoides establerts recapitulen en un 98% el perfil genètic del teixit tumoral del qual procedeixen. A més, s'ha posat a punt el protocol adequat per a l'anàlisi morfològic dels organoides mitjançant histoquímica i la caracterització del teixit tumoral mitjançant citometria de flux, la qual indica la presència de diferents poblacions cel·lulars (cèl·lules limfocitàries i macròfags infiltrats) i marcadors tumorals. Finalment, tot això ha permès crear una organoidoteca de càncer gàstric d'interès per a la comunitat científica.

Paraules clau: Càncer Gàstric, Cultius 3D, Organoides, Microambient tumoral

1.3 Abstract

Gastric cancer (CG) is the third leading cause of death from cancer worldwide. Currently, in clinical practice the choice of treatment based on genetic alterations present in patients (personalized medicine) may not be effective, because it is sometimes complicated to associate the response to certain treatments with the alterations that the tumor presents. In order to address this handicap, it is essential to generate experimental models that are a reflection of the patient's own tumor. The limitations of conventional systems have given way to a new technology based on organoids. This new technology allows to generate, from the biopsy of a patient, patient-specific organoids of both tumor and normal tissue. Knowing that organoids are a promising experimental model capable of maintaining the phenotype, the genetic profile and the functions of human tumors in a personalized way, it is key to define the methodology associated with its correct generation, which varies according to the type of tumor. Specifically, for the generation of organoids of tumor gastric tissue we find in the literature very diverse procedures, therefore it is necessary to establish a methodology for its correct and efficient generation, as well as to verify that both molecularly and morphologically they are a reflection of the tumor tissue of the patient. Another point of interest is the study of the tumor microenvironment since it seems clear that it plays a key role in tumor progression and response to treatment. Therefore, the development of cytometric analysis of the different cell types that make up the tumor tissue has been addressed. In the present work, the establishment of efficient establishment of organoid cultures from tumoral and normal paired gastric tissue was achieved, which was the main objective, with a success rate of 77%. In addition, different parameters have been defined, such as the enzymatic digestion time of the tissue, optimal cell density to be plated in the Matrigel and adequate Matrigel concentration. On the other hand, the sequencing results show that the established organoids recapitulate in 98% the genetic profile of the tumor tissue from which they come. In addition, the appropriate protocol for the morphological analysis of the organoids has been prepared by histochemistry and the characterization of the tumor tissue by means of flow cytometry, which indicates the presence of different cell populations (lymphocyte cells and infiltrated macrophages) and tumor markers. Finally, all this has allowed the creation of an organoid library of gastric cancer of interest to the scientific community.

Keywords: Gastric cancer, 3D culture, Organoids, Tumor microenvironment

2 Introducción

2.1 Cáncer Gástrico

El cáncer gástrico (CG) es el quinto tumor maligno más frecuente y constituye la tercera causa de muerte por cáncer en ambos sexos en todo el mundo (**Figura 1**), con una tasa de supervivencia a 5 años de solo el 29%. Además, durante el año 2018 el CG ha sido responsable de 783.000 muertes (según la Organización Mundial de Salud, OMS). En España, en el año 2015, se diagnosticaron aproximadamente 8500 casos nuevos, afectando dos veces más a hombres que a mujeres. Adicionalmente, el riesgo de desarrollarlo aumenta a partir de los 50 años y es máximo en la séptima década de la vida (1) (2).

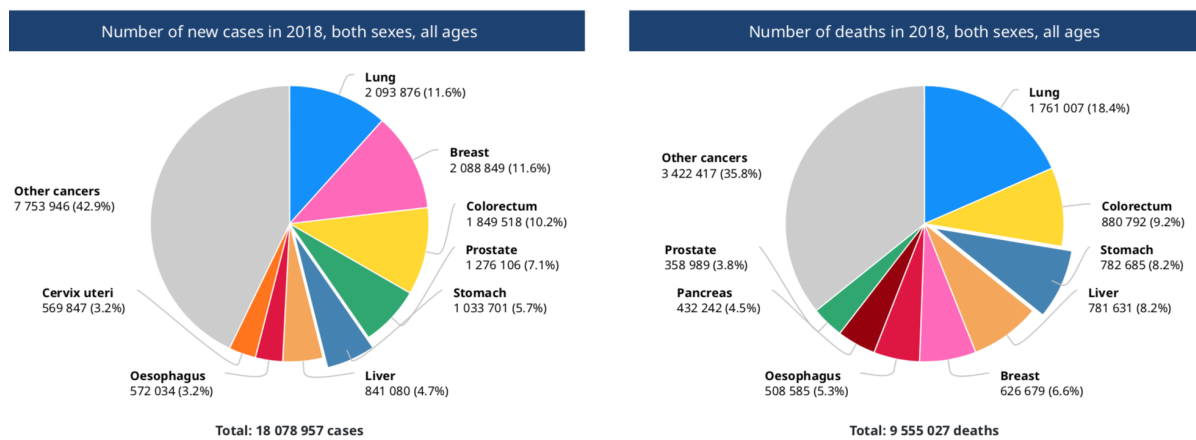


Figura 1. Número de casos y número de muertes en 2018 (ambos sexos, todas las edades).

Existen dos clasificaciones histológicas que son las más aceptadas, la clasificación de Lauren (1965) y la clasificación de la OMS (2010). Por un lado, la OMS establece cuatro tipos diferentes de adenocarcinoma gástrico: tubular, papilar, mucinoso y de células en anillo de sello (3). Por otro lado, la clasificación de Lauren, la más utilizada, diferencia tres tipos: intestinal, difuso y mixto (4).

También existe una clasificación molecular propuesta por el Atlas del Genoma del Cáncer (*The Cancer Genome Atlas*, TCGA) (2014) generada a partir del análisis de 295 tumores gástricos de pacientes no tratados previamente. En ella se clasifica el adenocarcinoma gástrico en cuatro subtipos moleculares diferentes (5):

- I. Subtipo positivo para el virus de Epstein-Barr (**EBV**) con mutaciones frecuentes en el gen *PIK3CA* y silenciamiento en *CDKN2A*.
- II. Subtipo con inestabilidad en microsatélite (**MSI**) asociado a tumores con elevada tasa mutacional.
- III. Subtipo con genoma estable (**GS**) se relaciona con histología difusa y mutaciones en los genes *RHOA* y *CDH1*.
- IV. Subtipo con inestabilidad cromosómica (**CIN**) asociado a histología difusa y mutaciones en *TP53*.

Además del análisis molecular se llevó a cabo una evaluación de las características clínicas e histológicas de cada subtipo molecular con el fin de mejorar la caracterización de cada subtipo, como se puede observar en la **Figura 2** y **Tabla 1** (5).

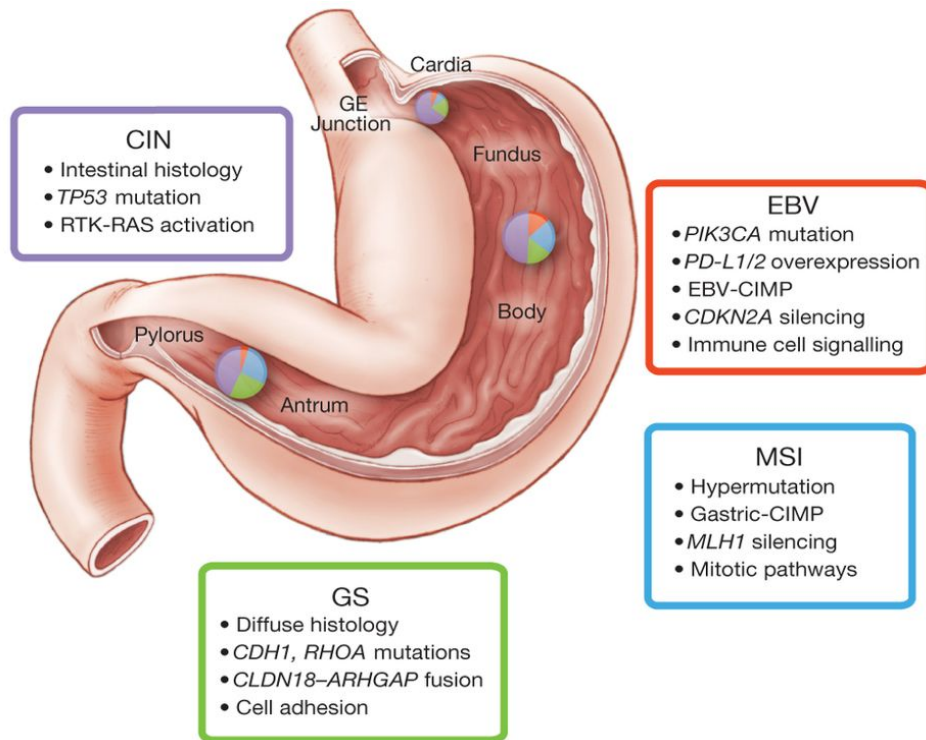


Figura 2. Imagen resumen de la clasificación propuesta por el TCGA.

Tabla 1. Principales características diferenciales entre los subtipos moleculares de Cáncer Gástrico descritos por TCGA.

	EBV	MSI	GS	CIN
Frecuencia	9%	22%	20%	50%
Género/Edad	Hombres	Mujeres Edades avanzadas	Edades tempranas	
Localización	Fundus y cuerpo			Unión gastroesofágica, cardíacas
Tipo Histológico			Difuso	Intestinal

El cáncer gástrico suele diagnosticarse en estadios avanzados de la enfermedad en el 75% de los pacientes debido a la falta de signos clínicos, por lo cual ya presentan un estadio avanzado y no curable de ésta (6).

Entre las estrategias terapéuticas se encuentra la biopsia endoscópica de estómago y la cirugía. La resección endoscópica de la mucosa es la técnica de elección para los adenocarcinomas precoces, no ulcerados y con un diámetro ≤ 2 cm. Por otro lado, la cirugía es la estrategia de elección para los pacientes con cáncer gástrico con tumores de > 2 cm, donde la cirugía ofrece la única probabilidad realista de curar el cáncer de estómago. El objetivo principal de estas intervenciones es la extirpación del cáncer primario y el drenaje linfático, según el tipo y la

etapa del CG. Destacar que los pacientes pueden someterse a una extirpación total (gastrectomía total) o parcial del estómago (gastrectomía parcial) según la localización del tumor y el estadio de la enfermedad (7).

Los tratamientos adyuvantes suelen administrarse antes o después de la operación quirúrgica. El objetivo de las terapias adyuvantes antes de la intervención es reducir el tamaño del tumor y facilitar su extirpación quirúrgica. El objetivo cuando se administran tras la cirugía es eliminar posibles células malignas residentes.

Las terapias adyuvantes convencionales para el cáncer consisten en el uso de fármacos quimioterapéuticos. En cáncer gástrico los más utilizados son las **fluoropirimidinas** (es decir, *5-fluoruracil* (5-FU), *capecitabine*, S-1), **compuestos de platino** (es decir, cisplatino, oxaliplatino), **docetaxel** y **epirubicina** (8). Hay que mencionar que dichos tratamientos quimioterapéuticos han demostrado su eficacia en algunos pacientes, pero no en otros. Por ello surgió la necesidad de encontrar tratamientos individualizados contra el CG, siendo las alteraciones genéticas (características moleculares) las nuevas dianas para los tratamientos (farmacogenómica). De ese modo los pacientes son tratados con terapias dirigidas contra las alteraciones moleculares específicas que impulsan sus tumores.

Por tanto, la medicina de precisión u oncología de precisión tiene como objetivo identificar las alteraciones moleculares específicas del paciente presentes en los tumores para determinar los tratamientos que resulten en un beneficio clínico. Actualmente, las únicas terapias dirigidas empleadas en la práctica clínica para cáncer gástrico son **trastuzumab**, un anticuerpo monoclonal que inhibe la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico HER2 y el anticuerpo **ramucirumab** contra el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (9) (10).

Sin embargo, la elección del tratamiento en función de las alteraciones genéticas presentes en los pacientes puede no resultar eficaz, debido a la heterogeneidad individual e incluso a la heterogeneidad intratumoral (11). Otro factor para tener en cuenta es el microambiente heterogéneo asociado al tumor. Toda esta heterogeneidad afecta a la respuesta al tratamiento y los resultados clínicos. Así pues, algunos tumores que inicialmente responden al tratamiento consiguen evolucionar y adquirir nuevas alteraciones que les permite evadir el tratamiento, y con ello, adquirir resistencia farmacológica. Por todo ello, surge la necesidad de encontrar modelos de laboratorio paciente-específicos que puedan captar esta heterogeneidad individual, intratumoral y microambiental, que permitan además correlacionar genotipo con fenotipo y respuesta a tratamiento.

2.2 Sistemas modelos para el estudio de cáncer

Con el fin de abordar este hándicap, resulta esencial generar modelos experimentales del tumor *in vitro* e *in vivo* derivados del paciente para testar directamente la sensibilidad de las células tumorales del paciente a diversos medicamentos o compuestos. Además, estos modelos pueden ayudar a establecer una asociación entre alteraciones moleculares presentes y la respuesta a un

tratamiento concreto. Con esa finalidad se han propuesto diferentes sistemas modelo de tumores que incluyen: **líneas celulares** de cáncer, **modelos xenografts**, **modelos singénicos**, ratones inmunosuprimidos a los cuales se les trasplantan células tumorales derivadas del paciente (*Patient-derived xenografts*, **PDXs**) y los modelos de tumores en cultivos 3D, conocidos como **organoides tumorales**.

2.2.1 Modelos *in vitro*

2.2.1.1 Líneas celulares

Los cultivos bidimensionales (2D) de células cancerígenas *in vitro* suponen un modelo con gran potencial (alto rendimiento) para el *screening* de fármacos, puesto que son fáciles de cultivar y manipular (12). Además, este modelo de cultivo 2D puede conservarse a largo plazo, generando un reservorio de material biológico disponible para futuros usos. Sin embargo, este sistema presenta algunas limitaciones ya que no representa la arquitectura tisular y la heterogeneidad celular presente en los tumores de origen. Esto se debe a que las células estromales no están presentes, tampoco las interacciones entre las células y la matriz extracelular (MEC) (13). Tampoco están presentes las células del sistema inmune, imposibilitando por tanto el estudio de las interacciones entre las células tumorales y las inmunitarias. Otra característica es su tendencia a adquirir mutaciones, convirtiéndose en un modelo poco estable genéticamente (14).

2.2.2 Modelos *in vivo*

2.2.2.1 Modelos *xenografts* de líneas celulares

Los modelos *xenografts* se generan por inyección vía subcutánea de líneas celulares humanas en un ratón inmunodeficiente. Esta técnica es fácil de realizar y la formación de tumores suele ser rápida. Además, este sistema permite recapitular las alteraciones genómicas del tumor humano. Sin embargo, no mimetiza completamente la heterogeneidad tumoral y las características histológicas. Adicionalmente, el sistema requiere un ratón inmunodeficiente por tanto no se puede estudiar el papel del sistema inmune en el proceso del cáncer. Por otro lado, la inyección de células tumorales en el tejido subcutáneo representa un microentorno muy diferente al de su origen (15).

2.2.2.2 Modelos de ratón singénicos

Los modelos de ratones singénicos son aloinjertos, pues se trasplantan líneas celulares de cáncer de ratón o tumores sólidos en una nueva cepa de ratón inmunocompetente. Dicho trasplante no es rechazado por el sistema inmunitario del ratón huésped porque proceden de la misma especie. Por lo tanto, los ratones singénicos representan valiosos modelos preclínicos para estudios de inmunología oncológica.

Una ventaja notable del modelo singénico es que permite estudiar el papel del microambiente tumoral. Así mismo, muchos modelos singénicos han sido caracterizados genómica e

inmunológicamente. Además, resulta un modelo fácil de manejar y adecuado para estudios de administración de fármacos.

Una desventaja importante es que el tejido de ratón trasplantado no representa la complejidad de los tumores humanos. Muchos modelos singénicos se generan a partir de modelos inducidos por carcinógenos y conllevan alteraciones genéticas que no recapitulan completamente los tumores humanos de la misma histología. Otra limitación es el número relativamente bajo de líneas celulares disponibles; que no representan todos los tipos de tumores. Por ello, no resulta un modelo disponible para todos los tipos de cáncer (15).

2.2.2.3 *Patient-derived xenografts*

Los modelos basados en *Patient-derived xenografts* (PDXs) se generan mediante el trasplante de células tumorales de un paciente a un ratón inmunodeficiente subcutáneamente o de forma ortotópica. Los modelos de PDX pueden recapitular las interacciones de las células tumorales con las células estromales que lo rodean y la MEC, pero no las interacciones con el sistema inmunológico. Esto se debe a la falta del componente inmunitario en este sistema, convirtiéndolo en un modelo inapropiado para estudios de inmunoterapia (16). Por otro lado, existe la limitación en la tasa de éxito del trasplante y generación del modelo. Por ejemplo, en el cáncer de mama hormonosensible, la tasa de éxito del trasplante es muy baja en comparación con el cáncer de mama triple negativo (17). El tiempo es otro factor limitante puesto que la generación de un modelo exitoso requiere de 4 a 8 meses, lo que conlleva un retraso en la búsqueda del tratamiento eficaz para un determinado paciente (16). Además, la mayoría de los PDXs generados derivan de tumores invasivos o metastásicos, puesto que la generación a partir de tumores no metastásicos resulta un fracaso (18). Todo ello, implica un modelo complejo de manipular, lo cual limita su aplicación en estudios de alto rendimiento. Además, la conservación a largo plazo de PDXs no es posible, dificultando la creación de un reservorio para futuros estudios.

Las limitaciones de los sistemas convencionales han dado paso a una nueva tecnología basada en la generación de organoides. Esta técnica de cultivo en 3D permite una amplia gama de posibilidades para la investigación de la enfermedad pues reproduce los distintos tipos celulares presentes en el tumor, así como mimetiza la arquitectura tisular y las interacciones célula-célula y célula-MEC. Son desarrollos tecnológicos interesantes por su relevancia fisiológica, su capacidad de reproducir diferenciación celular, el potencial de escalado como plataforma de alto rendimiento de cribado de fármacos e identificación de perfiles de biomarcadores. Por todo ello, los organoides están generando expectativas en el mundo clínico.

2.2.3 Organoides: Nuevo horizonte en el estudio del cáncer

Los organoides fueron elegidos método del año 2017 en la revista *Nature Methods* por su fascinante potencial como herramienta para investigar la biología y las enfermedades humanas. Además, los organoides representan la única herramienta experimental capaz de generar modelos personalizados de las enfermedades (19).

2.2.3.1 Definición

Actualmente no existe una definición consensuada que defina los organoides. Pero se puede decir que los organoides son cultivos celulares embebidos en matriz extracelular generando estructuras 3D. Se pueden generar en el laboratorio a partir de diversas fuentes: células madre embrionarias (*Embryonic stem cells*, **ESC**), células madre adultas (*Adult stem cells*, **AdSC**), células pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cell*, **iPSC**) y **fragmentos de tejido** (20). Este sistema se asemeja al tejido del cual proceden en cuanto a estructura y función. Presentan tres características principales: se componen de múltiples tipos celulares (i), las células se organizan de forma similar al tejido primario (ii) y mimetizan las funciones que realizan los tejidos de los cuales proceden (iii) (21).

2.2.3.2 Antecedentes

Los primeros experimentos innovadores en el campo del cultivo en 3D se realizaron utilizando células madre Lgr5+ (*Intestinal Stem Cells*, **ISC**), células que expresan el receptor 5 acoplado a proteína G y se localizan en las criptas intestinales (22) (23). Este estudio demostró que las ISC podrían utilizarse para generar epitelios estables, casi fisiológicos, cuando se suministran factores de crecimiento y proteínas similares a las presentes en el nicho de las células madre endógenas. El gran avance incluye Matrigel rico en laminina (reemplaza la matriz extracelular) y medios de cultivo suplementados con factores de crecimiento destinados a favorecer el crecimiento de las criptas intestinales y el mantenimiento de las ISCs. Los principales factores de crecimiento son Noggin, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y R-spondin. Además de estos factores de crecimiento, el inhibidor de Rho-quinasa **Y-27632** es necesario para el cultivo de células individuales, pues inhibe la muerte por anoikis en células disociadas. Con todo ello, este método de cultivo en 3D consiguió reflejar la diversidad celular presente en el tejido intestinal, así como las estructuras de la cripta y las vellosidades propias del epitelio intestinal.

2.2.3.3 Organoides como sistema modelo de cáncer

En concreto los organoides como sistema modelo de cáncer representan una herramienta intermedia entre las líneas celulares de cáncer (*in vitro*) y los *xenografts* (*in vivo*) (24). Una ventaja del uso de esta tecnología es la capacidad de generar organoides derivados del paciente, tanto del tejido tumoral como del normal procedentes de biopsias del paciente, o de células madre pluripotentes (25). Además, los organoides tumorales mantienen el fenotipo, el perfil genético y las funciones propias de los tumores, representando un modelo prometedor para conocer la biología del cáncer (26).

2.2.3.4 Generación de organoides tumorales

Los métodos de generación y mantenimiento de organoides tumorales derivados de paciente varían según el tipo de tumor. Por ello, se precisa desarrollar una técnica estándar y robusta para la generación y cultivo de organoides específica según el tipo. Generalmente el establecimiento y generación de los organoides se inicia con una digestión mecánica y enzimática del tejido tumoral, seguido de la inmersión de las células disgregadas en una matriz 3D biomimética (principalmente Matrigel). Posteriormente se añade el medio de cultivo

suplementado con los factores de crecimiento y las moléculas inhibitoras que simulan el nicho natural de estas células en el tejido *in vivo*, y que son necesarias para su correcta generación.

2.2.3.5 Características de organoides tumorales

En la actualidad se han establecido con éxito organoides para múltiples tipos de cáncer, incluido el cáncer de estómago (27), el cáncer colorrectal (28), el cáncer de hígado (29), el cáncer de páncreas (30), cáncer de próstata (31) y cáncer de mama (32).

Con el tiempo se han desarrollado más estudios relacionados con el cultivo de organoides y actualmente se puede decir que los organoides son capaces de reproducir el tejido canceroso de origen de forma precisa, ya que es capaz de preservar la morfología y la heterogeneidad celular del tumor original. De ese modo, Broutier et al. generó organoides de cáncer de hígado de tres de los subtipos más comunes: carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y la combinación de ambos. Demostró que los organoides conservan la arquitectura histológica, la expresión genética y el perfil genómico del tumor original, lo cual permite la discriminación entre los diferentes tejidos y subtipos tumorales (29).

Otra característica de este modelo es la posibilidad de co-cultivar diferentes tipos de células, tumorales y no tumorales, como células del sistema inmune, para explorar la relación funcional entre ellas. De ese modo, Weeber et al. demostraron que los co-cultivos de organoides tumorales junto linfocitos de sangre periférica permiten la obtención de células T de sangre periférica reactivas a tumor de pacientes con cáncer colorrectal (*mismatch repair-deficient*) y cáncer de pulmón (célula no pequeña) (33). Otro aspecto importante consiste en que los organoides poseen todas las alteraciones genéticas presentes en el tejido tumoral, convirtiéndolos en un modelo genético preciso para el cáncer. Además, los cultivos en 3D inducen la formación de capas concéntricas con diferentes fenotipos, simulando la situación *in vivo*, donde la parte interna del tumor dispone de menor vascularización, y por ello menor acceso a nutrientes. Así pues, los organoides imitan la misma situación que tiene lugar dentro del tumor, donde no tienen acceso las sustancias químicas, convirtiendo a los organoides en un modelo adecuado para estudios de eficacia de fármacos (34).

2.2.3.6 Aplicaciones del cultivo de organoides

La aplicación del cultivo de organoides dentro de la oncología de precisión aún se encuentra en una etapa temprana y se necesitan más optimizaciones y estandarizaciones. Sin embargo, resultan una herramienta prometedora como sistema modelo de cáncer humano debido a las características anteriormente mencionadas (a). Además, esta tecnología tiene un gran potencial en diversas aplicaciones: estudios de perfiles genéticos presentes en los organoides tumorales y los no tumorales, para la identificación de nuevas terapias dirigidas (b); *screening* de fármacos antitumorales incluidas las pruebas de eficacia (c) y los ensayos de toxicidad farmacológica (d). Además, pueden tener gran potencial en el campo de la medicina regenerativa (e). También, pueden ser crioconservados a largo plazo generando una organoidoteca de interés para futuros estudios de medicina básica y medicina traslacional (f) (**Figura 3**) (35).

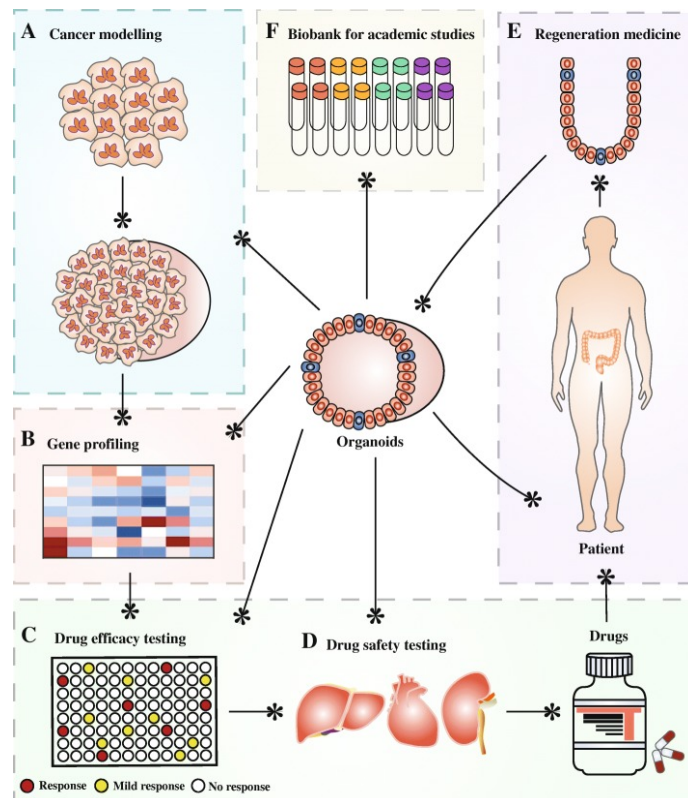


Figura 3. Esquema de las principales aplicaciones de los organoides.

El estudio realizado por Huang et al. aplicó esta herramienta en miniatura para realizar pruebas de eficacia a drogas. En su trabajo, se generaron organoides ductales pancreáticos y les indujeron mutaciones para modelar con éxito el adenocarcinoma ductal pancreático. Luego utilizaron estos organoides para probar la eficacia terapéutica de un inhibidor de la histona metiltransferasa (30).

En cuanto a la generación de organoidotecas podemos mencionar el estudio de Van de Wetering et al. en el cual se establecieron cultivos de organoides tumorales de 20 pacientes con carcinoma colorrectal con representación de la mayoría de los subtipos genéticos de la enfermedad generando un biobanco vivo (36).

En el campo de la medicina regenerativa, los organoides también proporcionan una alternativa para el trasplante de células y órganos completos al proporcionar tejido autólogo. Takasato et al. ya han logrado un trasplante exitoso de organoides renales en ratones adultos, allanando el camino para un futuro prometedor para el trasplante de organoides (37).

2.2.3.7 Limitaciones de organoides tumorales

Una limitación de los organoides es la ausencia de vascularización, que pueden resolverse mediante biorreactores giratorios que proporcionan un mejor intercambio de nutrientes. La vascularización también se puede lograr mediante el cultivo con células endoteliales que pueden generar redes de tipo vascular. Otra limitación para los cultivos de organoides es la presencia limitada de componentes del estroma, incluidos los componentes inmunes. Sin embargo, esto puede superarse mediante co-cultivos de estos organoides con células del sistema inmunitario entre otras (20).

2.2.3.8 Microambiente tumoral

El estudio y la caracterización del microambiente tumoral puede tener una gran relevancia ya que se ha demostrado que determinados tipos celulares que cohabitan en el tumor pueden intervenir en la progresión tumoral y en la respuesta terapéutica (38). Sin embargo, actualmente no existen muchos estudios de microambiente tumoral en los cuales se utilicen organoides. Aunque, hallazgos recientes demuestran que los co-cultivos de organoides con células del microambiente tumoral (fibroblastos, células endoteliales vasculares, células del sistema inmune) proporcionan un nuevo método para caracterizar algunos aspectos de dicho microentorno.

En ese sentido, encontramos los co-cultivos de organoides con fibroblastos asociados a cáncer (*Cancer Associated Fibroblast, CAF*). Este sistema identificó diferentes vías bioquímicas asociadas a los diferentes subtipos de CAFs. Sin embargo, este método de co-cultivo aún se está desarrollando y uno de los desafíos que plantea es determinar si pueden utilizarse para predecir la respuesta terapéutica *ex vivo* (39).

Por otro lado, encontramos el cultivo de organoides con linfocitos de sangre periférica procedente del mismo paciente, con el fin de generar clones de células T CD8+ citotóxicas contra las células neoplásicas presentes en el mismo paciente, para la transferencia celular adoptiva (33).

Uno de los retos planteados en nuestro laboratorio es poner a punto el co-cultivo de organoides derivados de tejido gástrico tumoral con otros tipos celulares presentes en su microambiente (macrófagos, fibroblastos, linfocitos, etc..). Para ello, el primer paso fundamental es poner a punto el establecimiento óptimo de organoides tumorales y, por otro lado, y no menos importante, la caracterización de la composición celular que coexiste en estos tumores.

2.3 Organoides como modelo de estudio para cáncer gástrico

La tecnología organoide en cáncer gástrico ha sido aplicada en diversos estudios con éxito. En el trabajo desarrollado por Seidlitz et al. (40) se establecieron 20 cultivos de organoides de cáncer gástrico primario y se seleccionaron 4 para un análisis más detallado. Los organoides seleccionados fueron capaces de recopilar las principales características de los tumores de los cuales procedían, en cuanto a arquitectura y expresión de marcadores típicos de cáncer gástrico, como el antígeno carcinoembrionario (*carcinoembryonal antigen, CEA*), la cadherina 17 (*cadherin 17, Cdh17*), la citoqueratina 7 (*cytokeratin 7, CK7*) y la reacción ácida periódica de Schiff (*periodic acid Schiff, PAS*). Luego los 4 organoides seleccionados se expusieron a quimioterapia clásica mostrando diferencias en la respuesta. Estas diferencias en la sensibilidad a los fármacos vienen marcadas por el patrón mutacional que presentan. De ese modo, los organoides son modelos para probar el efecto de un determinado fármaco dirigido para un paciente individual.

El estudio diseñado por Steele et al. (41) permitió establecer organoides de cáncer gástrico de tejido tumoral y normal. Se observó una elevada expresión de CK7 y CK20, marcadores de pronóstico de cáncer gástrico, en los organoides tumorales. La citoqueratina es un filamento intermedio que se expresa en las células epiteliales y tiene un papel importante como componente del citoesqueleto en el mantenimiento de la morfología celular. El gen CK (citoqueratina) tiene 20 subtipos, y la expresión de CK depende principalmente del tipo de células epiteliales y del grado de diferenciación. Dichos organoides generados mostraron potencial para predecir las respuestas tumorales *in vivo*. El efecto de las terapias en los organoides se correlacionó con los resultados del tratamiento *in vivo*. Por ello, el estudio sugiere que los organoides derivados del paciente serán útiles para desarrollar terapias individualizadas.

En el estudio realizado por Vlachogiannis G, et al. (27) se establecieron organoides de cáncer gástrico procedentes de pacientes en estadios avanzados (metástasis). En el trabajo los organoides generados permitieron predecir la respuesta de los cánceres metastásicos a la terapia.

Por tanto, **sabiendo que los organoides resultan un modelo experimental prometedor capaz de reproducir las características principales de los tumores humanos de forma personalizada, resulta clave definir la metodología asociada a su correcta generación.** De hecho, los métodos de generación y mantenimiento de organoides tumorales derivados del paciente varían según el tipo de tumor. Por ello, se precisa desarrollar una técnica estándar y robusta para la generación y cultivo de organoides según el tipo tumoral. En este trabajo en concreto, se pretende **generar organoides de cáncer gástrico derivados del paciente, tanto del tejido tumoral como del normal procedentes de biopsias.** En la bibliografía se encuentran procedimientos muy diversos para tejido gástrico, por ello resulta necesario definir en nuestro laboratorio los procedimientos de establecimiento y generación eficiente de cultivos de organoides a partir de tejido en fresco gástrico tumoral y normal pareados.

3 Objetivos

El presente trabajo tiene, por consiguiente, los siguientes objetivos:

1. La puesta a punto de generación eficiente de cultivos de organoides de cáncer gástrico a partir de tejido gástrico en fresco tumoral y normal. Para ello, será necesario:
 - 1.1. Establecer el tiempo óptimo de digestión enzimática.
 - 1.2. Establecer la densidad celular óptima necesaria para el cultivo primario.
 - 1.3. Establecer el porcentaje de Matrigel óptimo para la formación del cultivo 3D.
2. Realizar la caracterización genética de los organoides generados y de los tejidos de los que proceden.
3. Puesta a punto del análisis poblacional por citometría de flujo del tejido tumoral y peritumoral del cual procede cada organoide.
4. Iniciar la generación de una organoidoteca de cáncer gástrico de interés para futuros estudios biomédicos.

4 Materiales y Métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Muestras

4.1.1.1 Diseño y tamaño muestral

Se trata de un estudio prospectivo en el cual se incluyen pacientes procedentes del Hospital Clínico Universitario de Valencia con cáncer gástrico, quienes por práctica clínica habitual son subsidiarios de gastrectomía o biopsia endoscópica como estrategia terapéutica. El establecimiento de organoides se realiza con tejido gástrico en fresco procedente del tumor primario y del tejido normal en el momento de la gastrectomía o de la gastroscopia. El tamaño muestral es de 10 casos: 8 tumorales y 2 normales.

4.1.1.2 Población

Las muestras proceden del Hospital Clínico Universitario de Valencia, HCUV. Los pacientes que participan en el trabajo han sido debidamente informados y cuentan con el debido Consentimiento Informado para la obtención y conservación de las muestras biológicas en un Biobanco hospitalario para que éstas puedan ser utilizadas en futuros estudios biomédicos. El uso de muestras biológicas humanas en investigación biomédica implica el cumplimiento de una serie de requerimientos científicos, técnicos y ético-legales regulados por la Ley de Investigación Biomédica, de 3 de julio, y por el Real Decreto 1716/2011, sobre biobancos. Este trabajo se enmarca dentro del proyecto titulado “Protocolo de puesta a punto de la caracterización del perfil inmune por inmunohistoquímica y crecimiento en organoides de tumores gástricos a partir de piezas de gastrectomía” aprobado por el Comité Científico y por el Comité Ético de investigación Clínica (CEIC) del HCUV.

La obtención de muestras de tejido gástrico en fresco requiere dos circuitos: las gastrectomías a través de los Servicios de Cirugía/Anatomía Patológica, y las gastroscopias a través del Servicio de Endoscopia. Durante la intervención quirúrgica (gastrectomía) se extirpa el tejido en fresco y se envía al servicio de Anatomía Patológica. Una vez recepcionado por el patólogo, este identifica la pieza correspondiente a tejido tumoral (T) (*Gastric Tumoral Tissue, GTT*) y la pieza correspondiente a tejido normal (N) (*Gastric Normal Tissue, GNT*), descartando zonas de necrosis, fibrosis y grasa. Por otro lado, durante la realización de la gastroscopia el endoscopista recoge como mínimo 4 piezas de tejido tumoral y 4 piezas de tejido de la mucosa normal. En ambos casos el personal médico informa al personal del laboratorio para recoger las muestras y empezar a procesarlas. La metodología a continuación incluye la digestión del tejido para la obtención de células disociadas. Estas se destinan tanto a citometría de flujo, como a la generación de organoides mediante la inmersión en una matriz 3D, estableciendo organoides de cáncer gástrico normales y tumorales; **GNO** (*Gastric Normal Organoids*) y **GTO** (*Gastric Tumor Organoids*), respectivamente. Adicionalmente se añade el medio de

cultivo suplementado con factores que recapitulan las condiciones presentes en el nicho del tejido *in vivo* (Figura 4).

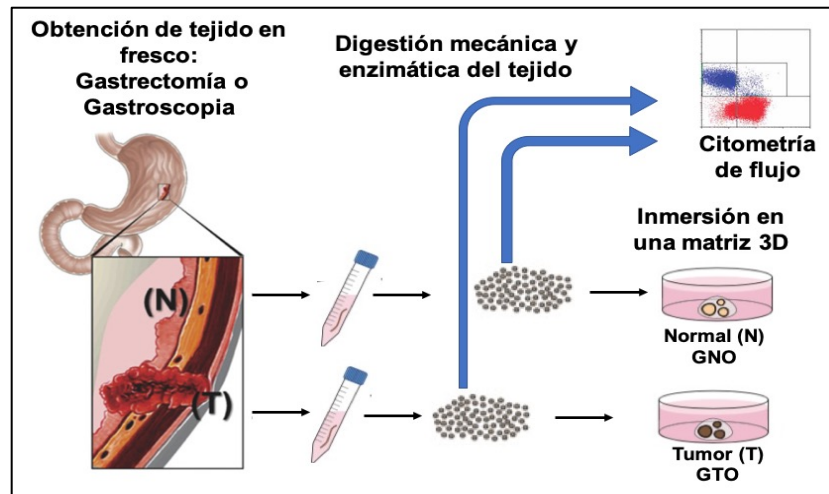


Figura 4. Circuito general de obtención de muestras, generación de organoides y caracterización por citometría de flujo.

4.2 Métodos

4.2.1 Establecimiento de organoides

4.2.1.1 Procesamiento del tejido primario fuera de la cabina de seguridad biológica

Se recoge las muestras en un falcon de 50 mL con 1X de *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Biowest, cat. no. L0615-500) frío. Seguidamente se realizan de 15 a 20 lavados con 1X PBS frío, hasta que el sobrenadante se vea claro. Tras los lavados se añade la muestra en un falcon con PBS suplementado con antibióticos: 2X Penicilina-Estreptomicina, P/E (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 15140122) y 2X Primocina (Invivogen, cat. no. ant-pm-1). Se deja incubar 15 minutos a temperatura ambiente. (Hay que destacar que en este punto la muestra se puede conservar toda la noche en nevera a 4°C y seguir con el protocolo al día siguiente). Una vez pasado el tiempo de incubación del tejido con los antibióticos se procede a realizar 3 lavados con PBS sin antibióticos, dejando en el último lavado aproximadamente 2 mL.

4.2.1.2 Procesamiento del tejido primario dentro de la cabina de seguridad biológica

Se transfiere el tejido a una placa Petri de 60 mm. Se corta con bisturí el tejido en fragmentos y se recupera todo el material en un falcon de 15 mL antiadherente. (Destacar la importancia de realizar los cortes del tejido con la mayor brevedad posible, para no comprometer la viabilidad celular). Rápidamente se añade la enzima *Liberase TL Research Grade* (Roche, cat.no. 05401020001) a una concentración final de 0.3 U/mL para empezar con la digestión del tejido. Adicionalmente, se añade 10 μ M de factor Y-27632, *ROCK inhibitor* (Abmole, cat. no. M1817), que evita la muerte por anoikis de las células epiteliales. Todo ello, se incuba a 37°C durante un período de tiempo de 30 minutos. Durante la incubación se resuspende el contenido cada 15 minutos para facilitar la disgregación mecánica. Tras la digestión enzimática el tejido

disgregado se filtra a través de un filtro estéril de 70 µm (Fisher Scientific, cat. no. 22363548). Se añade 1 mL de 1X PBS para recuperar posibles restos presentes en el filtro. Seguidamente, se centrifuga la muestra filtrada a 500 x g durante 5 minutos a 4°C. Luego se descarta el sobrenadante y se resuspende la muestra en 1 mL de 1X *ACK Lysing Buffer* (Gibco, cat. no. A1049201) para eliminar los eritrocitos presentes en ella, y se deja actuar durante 3-5 minutos. Pasado ese tiempo la muestra se centrifuga a 500 x g durante 5 minutos a 4 °C. Luego se descarta el sobrenadante y se resuspende la muestra en 1 mL de medio de cultivo DMEM/F12 medio con L-glutamina, HEPES y piruvato de sodio (GE Healthcare HyClone, cat. no. SH30261.01). Posteriormente se determina la concentración de células viables empleando el método de exclusión con Azul de Tripán (Sigma-Aldrich, cat. no. T8154) en el cual sólo las células muertas incorporan el colorante ya que está comprometida la integridad de la membrana plasmática. Para realizar el recuento de células vivas se emplea la cámara de Neubauer. Se cogen 5 µL de la resuspensión celular y 45 µL de Azul de Tripán (dilución 1:10) y se cargan 10 µL en la cámara de Neubauer.

Para el conteo: (nº de células totales contadas) / (nº de cuadrantes contados). Esto se corrige por el factor de la cámara de Neubauer, x 10⁴ cels/mL, y por el factor de dilución x 10.

Tras ello, se resuspenden 200 000 células en 50 µL de Matrigel (BD Biosciences, cat. no. 356231) al 50%. Rápidamente, se plaquean 50 µL en cada pocillo formando un domo en la placa P24W de baja adherencia. Tras ello, se transfiere la placa al incubador, donde permanece durante 25 minutos a 37°C y 5% CO₂. Estas condiciones permiten que el Matrigel solidifique. Posteriormente, se añaden 500 µL de medio StemCell junto con 10 µM de factor Y-27632, a 37°C para que el Matrigel permanezca sólido. El medio StemCell se compone de *IntestiCult Organoid Growth Medium* Componente A y Component B (StemCell Technologies, cat. no. 06010), 2X Penicilina-Estreptomicina y 150 µL/mL Primocina.

4.2.2 Cambio de medio de cultivo

Cada 2 días se realiza el cambio de medio de cultivo. En el primer cambio de medio se añade 500 µL de medio StemCell suplementado con 10 µM de factor Y-27632, a 37°C en cada pocillo. La adición del Factor Y-27632 se realiza en el primer cambio de medio para impedir que las células individuales mueran por anoikis. Por otro lado, en cambios de medio de cultivo posteriores se añaden 500 µL de medio StemCell a 37°C sin factor Y-27632, pues las células presentan interacciones intercelulares y con la MEC, que impiden su apoptosis.

4.2.3 Pase de organoides

Para realizar el pase se elimina el medio de cultivo y se añaden 500 µL de 1X *TrypLE Express Enzyme* (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 12605010) junto con 10 µM de factor Y-27632. Se deja en el incubador durante 5 minutos. Se recupera todo el contenido del pocillo en un falcon de 15 mL antiadherente y se añaden aproximadamente 4 mL de Medio Basal frío para inactivar la actividad enzimática de la Tripsina. Este Medio Basal se compone de DMEM/F12, 2mM GlutaMax (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 35050038), 2X Penicilina-Estreptomicina; 150 µL/mL Primocina, 1X N2 *supplement* (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 17502048) y 1X B27

supplement (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 12587010). Luego se centrifuga a 500 x g durante 5 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante y se añade una cantidad variable de Medio Basal frío que va a depender de la cantidad de pocillos necesarios para ampliar el cultivo inicial. Posteriormente se sigue el mismo procedimiento que en la generación de organoides a partir del contaje celular.

4.2.4 Criopreservación de organoides

La conservación de organoides a largo plazo requiere de su congelación. Para ello, se elimina el medio de cultivo y se añaden 500 µL de 1X *TrypLE Express Enzyme* junto con 10 µM de factor Y-27632. Se deja en el incubador durante un período de tiempo de 2 a 5 minutos. Seguidamente, se recupera todo el contenido del pocillo en un falcon de 15 mL antiadherente y se añaden aproximadamente 4 mL de Medio Basal. Luego se centrifuga a 500 x g durante 5 minutos a 4°C, y se elimina el sobrenadante. A continuación, se añade 500 µL de medio de congelación *Bambanker Cell Freezing Media* (NIPPON Genetics Europe, cat. no. BB02), se resuspende la muestra y se recupera en un criotubo estéril. La criopreservación del criotubo con la muestra se realiza en un CoolCell (-1°C/min) durante 24 horas en los ultracongeladores de -80°C. Pasado ese tiempo la muestra se deposita en el tanque de nitrógeno a una temperatura aproximada de -196 °C.

4.2.5 Descongelación de organoides

La descongelación de organoides criopreservados a -196°C requiere de una descongelación parcial de la muestra a 37°C. Inmediatamente, se transfiere la muestra a un falcon de 15 mL con 10 mL de Medio Basal frío, donde se produce la descongelación completa. Una vez descongelados los organoides en el Medio Basal frío se realiza una centrifugación a 500 x g durante 5 minutos, tras la cual se elimina el sobrenadante y se añade una cantidad variable de Medio Basal frío que va a depender de la cantidad de pocillos necesarios para cultivar según la carga de organoides presentes en el vial inicial. Posteriormente se sigue el mismo procedimiento que en la generación de organoides a partir del contaje celular.

4.2.6 Extracción de ADN a partir tejido gástrico tumoral congelado

Para el aislamiento de ADN a partir de tejido congelado se emplea el kit comercial *AllPrep DNA/RNA Mini Kit* (Qiagen, cat. no. 80204). A cada microtubo que contiene el tejido congelado (20-30 mg) se le añade 600 µL de tampón *RLT Plus*, 6 µL de β-mercaptoetanol y una bola de acero inoxidable, *Stainless Steel Beads 5 mm* (Qiagen, cat. no. 69989). A continuación, se inicia la disrupción y homogenización del tejido usando el *TissueLyser LT* (Qiagen, cat. no. 69980) a 50 Hz durante 10 minutos. Seguidamente, se centrifugan los microtubos durante 3 minutos a máxima velocidad (20 000 x g). Luego, se recupera el sobrenadante y se pasa por una columna proporcionada por el kit y se siguen las instrucciones detalladas en el manual del kit. Brevemente, la columna se centrifuga durante 30 segundos a 8.000 x g a temperatura ambiente, se realiza un lavado con 500 µL de tampón AW1 y seguidamente se realiza otro lavado con 500 µL de tampón AW2 mediante centrifugación durante 2 minutos a máxima velocidad (20 000 x g). Finalmente, se eluye el ADN con 80 µL de tampón EB y se deja incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto, tras el cual se realiza

una centrifugación de 8.000 x g durante 1 minuto. El eluido es el ADN, que se almacena a -20°C para su conservación a largo plazo.

4.2.7 Extracción de ADN a partir de organoides

Para el aislamiento de ADN a partir de organoides se emplea el kit comercial *QIAamp DNA Micro Kit* (Qiagen, cat. no. 56304) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a cada microtubo que contiene un sedimento de organoides procedentes de un pocillo de densidad elevada, se le añade 180 µL de tampón *ATL* y 20 µL de proteinasa *K* y se deja actuar la enzima durante 4 horas a 56°C. Luego, se añade 200 µL de tampón *AL* y se mezcla homogéneamente. Posteriormente se añade 200 µL de etanol 100%, se mezcla y se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se transfiere el lisado a la columna *QIAamp MinElute column* (4 °C) y se centrifuga a 6.000 x g durante 1 minuto. Tras ello, se realiza un lavado con 500 µL de tampón AW1 y otro lavado con 500 µL de tampón AW2. Se realiza una última centrifugación a máxima velocidad (20 000 x g) durante 3 minutos para eliminar bien los restos de tampón. Finalmente, el ADN se eluye con 25 µL de agua milliQ estéril, (Gibco, cat. no. 10977035) y se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos, tras los cuales se realiza una centrifugación de máxima velocidad (20 000 x g) durante 1 minuto. El eluido es ADN, que se almacena a -20°C para su conservación a largo plazo.

4.2.8 Secuenciación de ADN

Tras la extracción del ADN aislado de organoides y de tejido se cuantifica la concentración total de ADN de doble cadena mediante fluorometría (QuantiFluor dsDNA, Promega, cat.no. E2670). A continuación, se destinan 100 ng de ADN para la secuenciación mediante la plataforma *MiSeq System* (Illumina, cat. no. SY-410-1003) (Unidad de Medicina de Precisión-Oncología Translacional, IIS INCLIVA) después de enriquecer las muestras con *KAPA HyperPlus Library Preparation Kit* (Roche, cat. no. 07962401001) con un diseño de sondas customizado desarrollado en la propia unidad, siguiendo el protocolo *SeqCap EZ HyperCap Workflow*. Además, esta Unidad de Medicina de Precisión realiza el análisis bioinformático de los datos generados tras la secuenciación.

4.2.9 Inclusión en parafina y tinción Hematoxilina-Eosina

Con la finalidad de mantener la estructura 3D de los organoides, estos se fijan con 4% de paraformaldehído (Thermo Scientific, cat. no. 28908) durante 45 minutos a 4 °C. A continuación, se realizan tres lavados con PBS 1X frío mediante centrifugaciones de 1000 x g durante 5 minutos. Tras el último lavado se obtiene un sedimento, sobre el cual se añaden cuidadosamente 4-5 gotas de HistoGel (Thermo Scientific, cat. no. HG-4000-012) y se deja 5 minutos a -20 °C. Pasado ese tiempo el gel se solidifica y se realiza el montaje en los *cassetes* de inclusión (Thermo Scientific, cat. no. B1000729TN). Luego se incluyen en parafina mediante la procesadora ASP6025 *Automated Vacuum Tissue Processor* (Departamento de Patología, Hospital Clínico Universitario de Valencia, HCUV) según las instrucciones técnicas del proveedor. La procesadora permite la deshidratación de las muestras para su correcta inclusión en parafina. Una vez finalizado el proceso las muestras se incluyen en un bloque para poder ser cortadas en el microtomo en secciones de 5 µm. Seguidamente, los cortes se tiñen

con Hematoxilina-Eosina (HE) mediante el equipo *Dako ConverStainer* (Departamento de Patología, Hospital Clínico Universitario de Valencia, HCUV) según las instrucciones técnicas del proveedor.

4.2.10 Citometría de flujo

Como se ha mencionado anteriormente, tras la digestión del tejido para la obtención de células disociadas **Figura 4**, parte de éstas se destinan al análisis por citometría de flujo. El procedimiento de preparación de muestras para su caracterización mediante citometría requiere de una serie de procedimientos técnicos previos. En primer lugar, se realiza el conteo de células viables mediante incubación con yoduro de propidio, a partir de 50 µL de células. Seguidamente, se dispensan en 5 tubos *ependorfs* 200 000 células/tubo, y se completa hasta un volumen de 100 µL con *Staining Buffer* (BD Horizon, cat. no. 554656). A continuación, se añade 0,5 µL de *Fixable Viability Stain 780* (BD Horizon, cat. no. 565388), se realiza un vortex y se deja incubar en hielo y oscuridad durante 10-15 minutos. Pasado ese tiempo, se realizan dos lavados con 250 µL y 500 µL de *Staining Buffer* respectivamente, mediante centrifugaciones de 500 x g durante 5 minutos. Tras el último lavado con *Staining Buffer* se descarta el sobrenadante, dejando los últimos 100 µL del tubo. Se recogen estos 100 µL de cada uno de los tubos *ependorf* (X5) y se transfieren a tubos de citometría (X5). Detallar que el protocolo de inmunomarcaje se realiza con 4 de ellos. El quinto tubo se destina directamente al procedimiento de fijación. Alternativamente, se dispensan 50 000 células en un tubo de citometría destinado exclusivamente para fijación.

El procedimiento de inmunomarcaje consiste en una primera exposición de las células a 5 µL de 20X FC Block (BD Pharmingen, cat. no. 564220) durante 10-15 minutos en hielo y oscuridad. Seguidamente se añaden los anticuerpos presentes en cada panel, **Tabla 2**:

- **Panel 1.1 (Linfocitos):** 5 µL de **CD127** (Akralab, cat.no. 557938) y **CD25** (Akralab, cat.no. 562660). 2,5 µL de **CD3** (Akralab, cat.no. 566575), **CD16** (Akralab, cat.no. 562293), **CD14** (Akralab, cat.no.563079), **CD8** (Akralab, cat.no. 563677), **CD19** (Akralab, cat.no. 563325) y **CD4** (Akralab, cat.no. 564724).
- **Panel 2 (Macrófagos M1 y M2):** 5 µL de **CD45** (Akralab, cat.no.564105), **CD64** (Akralab, cat.no. 561189) y **CD163** (Akralab, cat.no. 563888). 2,5 µL de **CD14** (Akralab, cat.no. 563079).
- **Panel 3 (Células tumorales):** 5 µL de **CD279** (Akralab, cat.no.564494), **CD274** (Akralab, cat.no. 565188) y **CD326** (Akralab, cat.no.563180). 20 µL de **CD309** (Akralab, cat.no.560494).
- **Panel 4 (Cancer stem cells):** 5 µL de **CD45**, **CD24** (Akralab, cat.no. 562405), **CD326**, **CD133** (Akralab, cat.no. 747643), **CD54** (Akralab, cat.no. 564078) y **CD90** (Akralab, cat.no. 563804). 20 µL de **CD44** (Akralab, cat.no. 559942).

Tabla 2. Anticuerpos conjugados con su correspondiente fluoróforo, población celular identificada por cada anticuerpo, longitudes de onda de excitación y emisión.

Anticuerpos	Población celular identificada	λ Excitación Max	λ Emisión Max
Anti-CD279- BB515	Linfocitos T	490 nm	515 nm
Anti-CD127-PE	Linfocitos T reguladores	496 nm	578 nm
Anti-CD25-BV605	Linfocitos T reguladores	407 nm	602 nm
Anti-CD274-APC-R700	Células tumorales	652 nm	704 nm
Anti-CD3-BB700	Linfocitos T	485 nm	693 nm
Anti-CD16-PE-CF594	<i>Natural Killer</i>	496 nm	612 nm
Anti-CD14-BV510	Monocitos	405 nm	510 nm
Anti-CD8-BV711	Linfocitos T citotóxicos, CD8+	407 nm	711 nm
Anti-CD19-BV786	Linfocitos B	407 nm	786 nm
Anti-CD4-BUV395	Linfocitos T CD4+	348 nm	395 nm
Anti-CD45-PerCP-Cy	Monocitos	482 nm	690 nm
Anti-CD64-APC	Macrófagos	650 nm	660 nm
Anti-CD163-BV650	Macrófagos M2	407 nm	650 nm
Anti-CD309-PE	Células endoteliales	496 nm	578 nm
Anti-CD24-PE-CF594	Linfocito B	496 nm	612 nm
Anti-CD44-APC	Células tumorales	650 nm	660 nm
Anti-CD326-BV421	Células epiteliales	407 nm	421 nm
Anti-CD133-BV605	Células madre tumorales	407 nm	602 nm
Anti-CD54-BV711	Molécula de adhesión intercelular	407 nm	711 nm
Anti-CD90-BUV395	Células tumorales	348 nm	395 nm

Tras la adición de los anticuerpos se vortea el tubo y se incuba en hielo durante 30 minutos en oscuridad. Luego se realiza la fijación. El proceso de fijación se realiza añadiendo 200 μ L de *Fixation Buffer* (BD Cytotfix, cat. no. 554655) en cada uno de los tubos (X6) y se deja incubar durante 20 minutos en hielo. Pasado ese tiempo, se realiza un lavado añadiendo 200 μ L de 1X PBS mediante una centrifugación de 500 x g durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante, se resuspende el sedimento celular con 300 μ L de *Staining Buffer* y se analiza en el citómetro BD LSRFortessa X-20 (Servicio de Citometría de la Universidad de Valencia, UV). El análisis de las diferentes poblaciones celulares se realiza con el software BDFACSDiva versión 8.0.1.

5 Resultados y discusión

5.1 Establecimiento de organoides de cáncer gástrico

En la puesta a punto del cultivo de organoides procedentes de tejido tumoral y no tumoral de pacientes con cáncer gástrico se han establecido una serie de parámetros óptimos en nuestro laboratorio a partir de protocolos previos descritos en la bibliografía (26) (33) (40) (42). En concreto, se han establecido el tiempo óptimo de digestión enzimática, la densidad celular y el porcentaje de Matrigel óptimos. Además, se ha introducido un tratamiento con tampón de lisis de eritrocitos para mejorar la eficiencia del cultivo de organoides. Adicionalmente, se ha optimizado el procedimiento de pases, congelación y descongelación de organoides sin afectar su proliferación y crecimiento.

5.1.1 Tiempo óptimo de digestión enzimática

Se decidió realizar una digestión enzimática del tejido. Para ello, se utilizó la enzima liberasa que consiste en una combinación de enzimas colagenasas y proteasas capaces de disociar tejidos de diversas fuentes. Las enzimas colagenasas son las isoformas I y II. Los sustratos de las enzimas son proteínas de colágeno (actividad colagenolítica) y proteínas no colágenas (actividad proteolítica) que constituyen la matriz extracelular. Para una disociación eficaz el rango de temperatura óptimo para la actividad enzimática es de +35°C a +37°C. Temperaturas inferiores reducen la actividad enzimática. Destacar que el tiempo óptimo de digestión enzimática no se detalla, por lo tanto, previamente a su utilización se requiere optimizar el tiempo de exposición del tejido a las enzimas para que el tejido se disgregue eficazmente sin comprometer la viabilidad celular.

Para ello, se han evaluado diferentes tiempos de exposición enzimática, 30 y 60 minutos, a partir de la misma pieza de tejido gástrico tumoral. Pasado el tiempo de digestión se contaron las células vivas y muertas mediante el método de exclusión con azul de tripán, en el cual las células muertas incorporan el colorante (tienen comprometida la integridad de la membrana plasmática) y se tiñen de azul. Así pues, no se observó pérdida de viabilidad de las muestras en ambas condiciones.

En la **Figura 5** se observan imágenes tomadas de 6 pocillos distintos bajo las mismas condiciones de plaqueo 200.000 células/pocillo incluidas en Matrigel al 50%. En la parte superior de la figura se muestran los cultivos procedentes de 30 minutos de digestión, y en la parte inferior los cultivos procedentes de digestión de 60 minutos. Tras 5 días de plaqueo no se observan diferencias en cuanto a densidad de los organoides establecidos tras un tiempo de digestión de 30 o 60 minutos.

Este resultado ha permitido establecer un tiempo de digestión del tejido con liberasa de 30 minutos, como óptimo y suficiente para la generación de un cultivo de organoides viable.

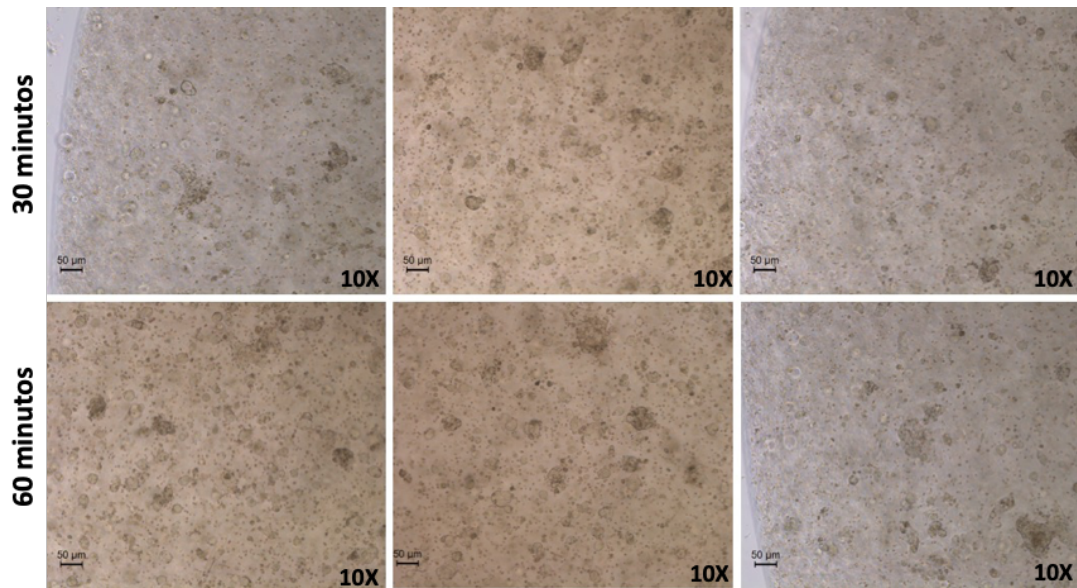


Figura 5. Tiempo de digestión enzimática. 30 minutos (figuras superiores) y 60 minutos (figuras inferiores). Aumento 10X.

5.1.2 Densidad celular y porcentaje de Matrigel óptimos

Los organoides generalmente se cultivan en una matriz 3D que sirve como soporte (*scaffold*) biomimético, y la composición de esta matriz tiene efectos significativos en la arquitectura celular y el comportamiento de los organoides. La matriz más utilizada para los cultivos de organoides son los geles de Matrigel. Esta es una matriz extracelular (MEC) secretada por células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm. Matrigel contiene laminina, entactina, colágeno IV y proteoglicanos (similar a la membrana basal), así como algunos factores de crecimiento, como el TGF- β y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (43). Los componentes de la MEC se acoplan a las integrinas de las células para mantener la identidad y la polarización celular (44). Sin embargo, dada la diversidad de protocolos encontrada en la bibliografía resulta necesario establecer estos parámetros, densidad celular y porcentaje de Matrigel, en nuestro laboratorio.

Así pues, con el objetivo de definir estos parámetros para la correcta generación de organoides derivados de tejido gástrico fresco tumoral y no tumoral, se plaquean (50 μ L/pocillo) en placas de 24 pocillos diferentes condiciones de densidad celular y porcentaje de Matrigel. En la **Figura 6** se muestran imágenes de los organoides obtenidos el día 1 y el día 5 de crecimiento, con las diferentes condiciones de cultivo. Se observa integridad en el Matrigel, así como un crecimiento de los organoides tras el paso de los días de cultivo en la condición A y B. Sin embargo, las condiciones C y D no resultan óptimas para el cultivo de organoides, pues se observa una densidad de organoides reducida en el día 1 y tras 5 días de cultivo muchos de ellos no crecen o incluso no están presentes.

Este resultado ha permitido establecer en el procedimiento de generación de organoides una densidad celular óptima entre 4 000 células y 8 000 células/ μ L de Matrigel. Simultáneamente,

se ha establecido una proporción de Matrigel del 50% como óptima y eficiente para el cultivo de organoides derivados de tejido gástrico.

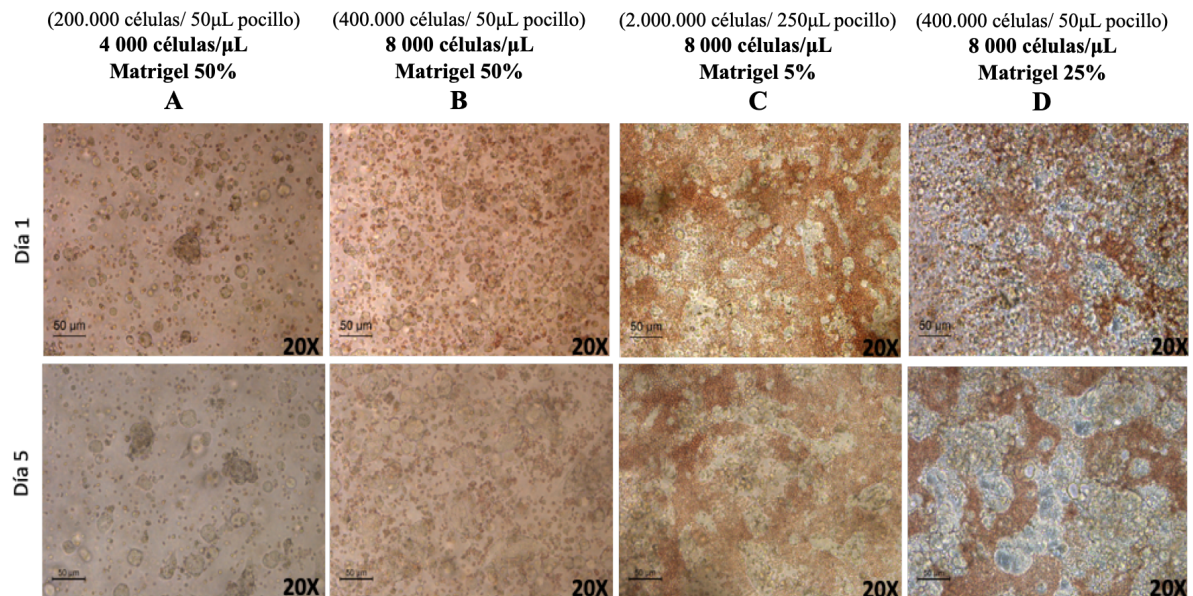


Figura 6. Densidad celular y porcentaje de Matrigel. 4 000 células/ μ L de Matrigel al 50% A); 8 000 células/ μ L de Matrigel al 50% B); 8 000 células/ μ L de Matrigel al 5% C); 8 000 células/ μ L de Matrigel al 25% D). Día 1 de crecimiento (figuras superiores); Día 5 de crecimiento (Figuras inferiores). Aumento 20X.

5.1.3 Tratamiento con tampón de lisis eritrocitaria

En el apartado anterior se demuestra que tras la puesta a punto de una serie de parámetros se ha conseguido el cultivo de organoides a partir de tejido gástrico. Sin embargo, como se puede observar en la **Figura 7**, estos cultivos presentan una gran cantidad de células eritrocitarias que interfieren en el crecimiento y en su visualización a través del microscopio. Por ese motivo, resulta necesario eliminar la presencia de los eritrocitos en el cultivo de organoides.

Con ese fin, el siguiente ensayo permite optimizar la generación de organoides derivados de muestras de gastroscopias y gastrectomías, ambas con elevada carga de eritrocitaria. Para ello, las muestras se someten a un tratamiento de lisis mediante la adición de 1X *ACK Lysing Buffer* durante 5 minutos. El tampón ACK (Amoníaco-Cloruro-Potasio) permite la lisis específica de eritrocitos sin comprometer al resto de células presentes en la muestra.

Para poder evaluar la efectividad del tratamiento del tampón de lisis, a la vez que demostrar que dicho tratamiento no perjudica el rendimiento de generación de organoides, la misma muestra GTO3 se procesó en dos condiciones distintas, con y sin tratamiento ACK, **figura 7**. En la figura se puede observar en el pocillo establecido a partir de muestras no sometidas al tratamiento de lisis eritrocitaria, una alta carga de eritrocitos en el cultivo que dificultan la correcta discriminación de los organoides. En cambio, se puede observar en el pocillo establecido a partir de muestras expuestas al tratamiento de lisis, la escasa presencia de los

eritrocitos en el cultivo de organoides. Además, los organoides que se establecen tras ser sometidos al tampón de lisis muestran viabilidad óptima y un tamaño mayor que los organoides no tratados.

Con todo ello, se ha establecido, que las muestras destinadas a la generación de organoides pueden someterse a un tratamiento con *ACK lysing Buffer* durante 5 minutos sin comprometer la viabilidad y eficiencia del cultivo.

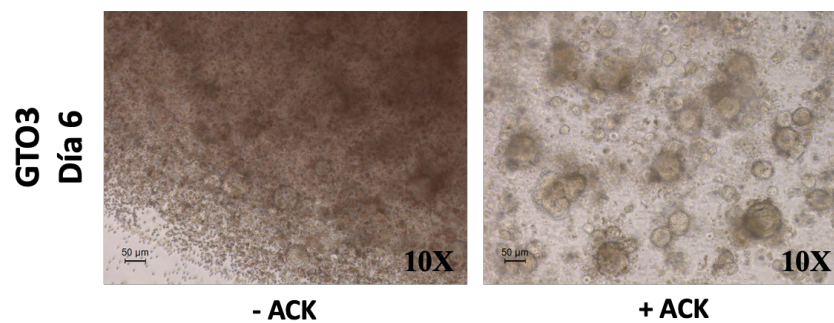


Figura 7. Tratamiento con tampón de lisis eritrocitaria. Sin tratamiento ACK (- ACK). Con tratamiento ACK (+ ACK). Aumento 10X

5.2 Crecimiento de los organoides de cáncer gástrico

En la **Figura 8** se observa un crecimiento gradual de los organoides en cultivo. El primer día tras su generación ya se observan algunos organoides de pequeño tamaño. Después de 6 días de cultivo se pueden apreciar diversos organoides de mayor tamaño si los comparamos con los organoides a día 1. Tras 10 días de cultivo nos encontramos ante una situación de confluencia de organoides, donde podemos observar una alta densidad de organoides de gran tamaño. Este resulta el momento idóneo para la realización de pases, con la finalidad de expandir los organoides. En ese sentido, destacar que se ha establecido un procedimiento óptimo de generación de pases (véase instrucciones en Materiales y Métodos) que ha permitido ampliar el cultivo de organoides de forma eficiente durante más de 30 días desde el establecimiento.

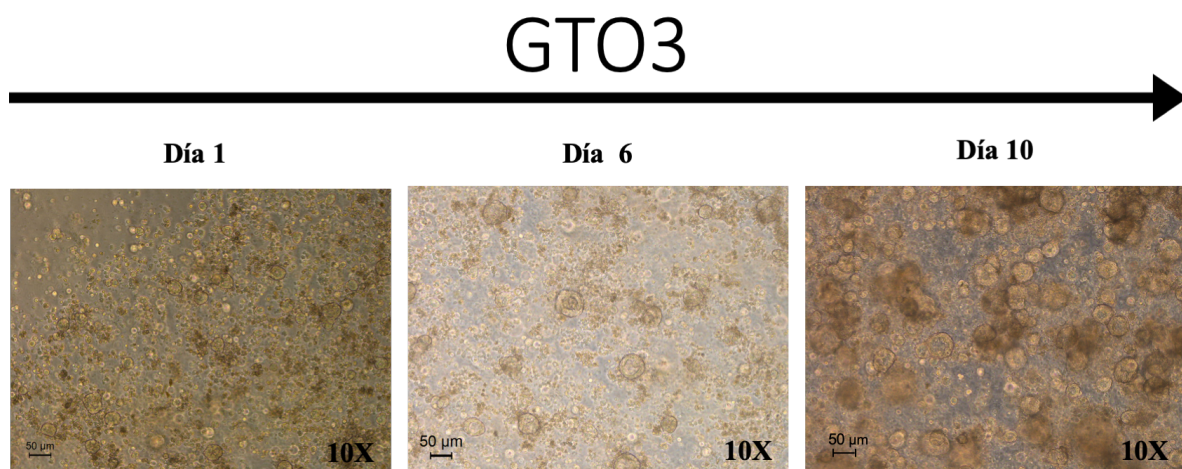


Figura 8. Crecimiento de organoides durante los primeros días tras su establecimiento. Crecimiento día 1, día 6 y día 10. GTO 3= *Gastric Tumor Organoid 3*. Aumento 10X.

Por otro lado, mencionar la importancia del medio de cultivo para el correcto establecimiento y crecimiento de los organoides. En nuestro protocolo se ha empleado un medio de cultivo comercial. Se trata del medio StemCell (*IntestiCult Organoid Growth Medium*) suplementado con 2X de antibióticos, el cual dispone de los componentes necesarios para el crecimiento y proliferación de organoides derivados de tejido gástrico, como se puede observar en la **Figura 8**.

Adicionalmente, es necesario señalar la importancia de la adición del Factor Y-27632 (*Rho kinase inhibitor*) en el medio de cultivo en tres momentos críticos: durante el establecimiento de organoides i) el primer cambio de medio de estos ii) y tras la realización de un pase para amplificar el cultivo iii). Esto se debe a que el Factor Y-27632 impide que las células individuales mueran por anoikis. Puesto que este factor inhibe la muerte celular programada por la pérdida de anclaje de las células tanto a la MEC, como por la falta de uniones célula-célula. Además, esta molécula inhibidora promueve la proliferación de células epiteliales tumorales *in vitro* a largo plazo (21).

Por otro lado, en cambios de medio de cultivo diferentes a los indicados anteriormente, se añade el medio StemCell sin factor Y-27632, puesto que pasados unos días de cultivo las células se anclan a la MEC (Matrigel) y mantienen interacciones intercelulares.

5.3 Establecimiento del protocolo óptimo de congelación-descongelación

En este trabajo se han establecido los procedimientos óptimos de congelación y descongelación de organoides (véase instrucciones en Materiales y Métodos). Ambos procedimientos resultan eficientes tras su aplicabilidad, puesto que no afectan el crecimiento, la proliferación y las características fenotípicas del cultivo de organoides. De ese modo, en la **Figura 9** se puede observar un cultivo de organoides (GTO2) en dos momentos distintos, pre-congelación y descongelación. Se observan organoides que alcanzan un tamaño similar al momento previo a la congelación, indicativo de que el cultivo es viable y capaz de crecer tras el ciclo de descongelación. Además, la morfología no resulta afectada tras el ciclo de congelación-descongelación, pues se conservan las estructuras quísticas.

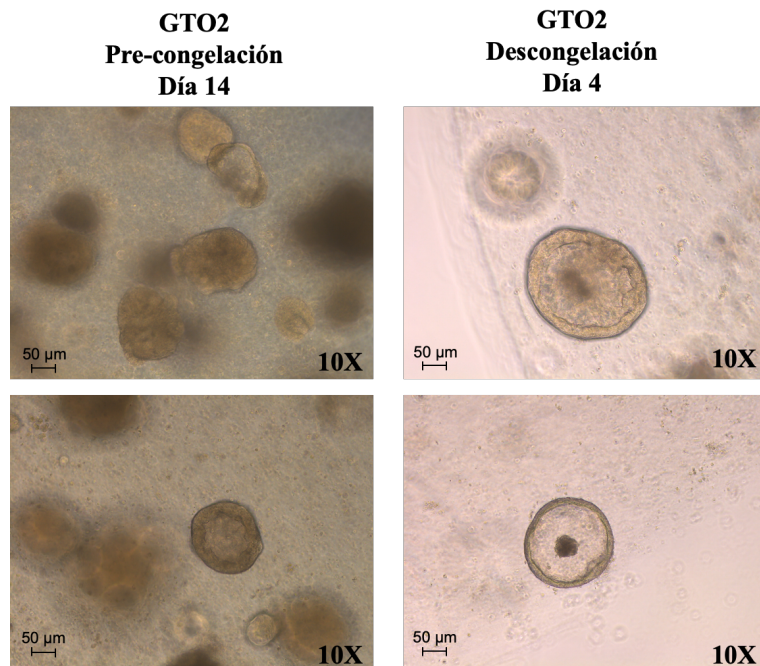


Figura 9. Imágenes microscópicas de los organoides en el momento previo de la congelación y tras la descongelación. Figuras izquierdas: día 14 de cultivo de GTO2 (momento previo a la congelación). Figuras derechas: día 4 de cultivo de GTO2 (tras la descongelación). GTO2= *Gastric Tumor Organoid 2*. Aumento X10.

5.4 Organoides establecidos tras la puesta a punto

La puesta a punto del procedimiento estandarizado y optimizado de establecimiento de organoides (véase instrucciones en Materiales y Métodos) derivados de tejido gástrico se ha realizado en 13 casos, y ha permitido la generación eficiente en 10 de ellos, lo cual indica una tasa de éxito en el establecimiento de organoides del 77%. Así pues, se han generado 10 organoides (ver **Tabla 3**) derivados de tejido gástrico tumoral (*Gastric Tumor Organoids*, **GTO**) o no tumoral (*Gastric Normal Organoids*, **GNO**) a partir del tejido fresco del propio paciente, tanto tumoral (*Gastric Tumor Tissue*, **GTT**) como no tumoral (*Gastric Normal Tissue*, **GNT**). Además, del tejido tumoral procedente de diferentes regiones tumorales (P1 y P2).

Identificación Tejido	Identificación Organoide	Clasif. Lauren	Clasif. TCGA	Procedencia de la muestra
GTT1	GTO1	Mixto	MSI -	Gastrectomía
GTT2	GTO2	Intestinal	MSI -	Gastroscopia
GTT3	GTO3	Intestinal	MSI +	Gastrectomía
GTT7	GTO7	Difuso	MSI -	Gastroscopia
GT8 P1	GTO8 P1	Mixto	MSI -	Gastrectomía
GT8 P2	GTO8 P2	Mixto	MSI -	Gastrectomía
GNT8	GNO8	-	-	Gastrectomía
GTT9 P1	GTO9 P1	Intestinal	HER2 +	Gastrectomía
GTT9 P2	GTO9 P2	Intestinal	HER2 +	Gastrectomía
GNT9	GNO9	-	-	Gastrectomía

Tabla 3. Identificación tejido origen. Identificación de los organoides establecidos. Clasificación según los criterios de Lauren y según TCGA. Fuente de procedencia de la muestra de tejido gástrico. GTO= *Gastric Tumor Organoids*. GNO= *Gastric Tumor Organoids*. GTT= *Gastric Tumor Tissue*. GNT= *Gastric Normal Tissue*. P1= región tumoral 1. P2= región tumoral 2.

Además, interesa señalar los organoides que no llegaron a establecerse i), o bien una vez establecidos no consiguieron progresar, crecer y proliferar ii). Como ejemplo, encontramos GHO5 (*Gastric Healthy Organoid 5*) un organoide que no llegó a establecerse, debido a la naturaleza del tejido fresco de origen. Dichas muestras procedían de un donante sano (no afecto de CG) sometido a una reducción de estómago. En este caso, durante la correcta realización del procedimiento establecido no se obtuvieron células. Esto se debe seguramente a la pieza de origen, la cual era en su mayoría tejido graso. Otro caso, son los organoides GTO6 y GNO6, los cuales no llegaron a establecerse, pues el diagnóstico final del paciente resulto ser un linfoma y no cáncer gástrico, con lo cual se decidió no incluirlo en el trabajo.

Por otro lado, como ejemplo de un organoides que no progresaron encontramos los organoides GTO4, GNO4. En ambos casos, el cultivo de organoides presentaba una contaminación bacteriana que impedía su crecimiento y proliferación.

5.5 Características morfológicas de los organoides establecidos

5.5.1 Fenotipos morfológicos de los organoides establecidos

Los tejidos gástricos tumorales (a partir de los cuales se han generado organoides) son diagnosticados histológicamente en el servicio de anatomía patológica del HCUV. De ese modo, se determina el subtipo histológico de la pieza de tejido a partir de la cual se inicia el procedimiento de establecimiento de organoides.

Una vez optimizados los procedimientos de generación de organoides de cáncer gástrico, como los realizados en este trabajo (véase anteriormente), se ha conseguido establecer cultivos de los diferentes subtipos histológicos: mixto, intestinal y difuso. De ese modo, se muestra una población muy representativa de la enfermedad, puesto que refleja cada uno de los tipos asociados a cáncer gástrico. Observamos en la **Figura 10** que los organoides procedentes de tipo de tumor gástrico mixto, GTO1, forma estructuras muy irregulares y heterogéneas entre sí. El tipo intestinal, GTO2, forma estructuras císticas con un lumen central y una capa epitelial fina. El tipo intestinal con MSI, muestra una morfología compacta sin lumen. El tipo difuso, GTO7, forma estructuras en racimo, donde se puede observar la agrupación no ordenada de diversas células. Además, no se observa un lumen central. Los diversos fenotipos morfológicos se correlacionan con los obtenidos en los estudios realizados por Seidlitz, T. et al. (40) y Yan et al. (42). Todo ello, indica que los organoides se han establecido correctamente y son capaces de adquirir morfologías diversas, las cuales vienen definidas según las alteraciones moleculares que posean. Por lo tanto, las diferencias fenotípicas indican genotipos moleculares distintos.

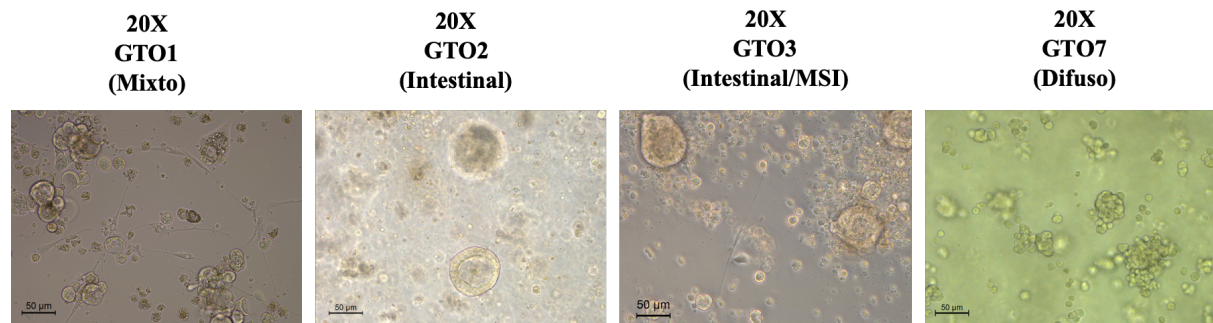


Figura 10. Diferencias morfológicas de los diferentes tipos de GTOs. Imágenes microscópicas representativas de los diferentes tipos de organoides generados a partir de tejido gástrico tumoral de los diferentes subtipos histológicos: Mixto, Intestinal, Intestinal/MSI, Difuso. Aumento 20X. GTO= *Gastric Tumor Organoid*.

Por otro lado, la identificación de organoides vivos la realizamos en base a sus características morfológicas. En la figura se muestran dos organoides con perfiles morfológicos distintos. El organoide A representa un organoide viable, en cambio el organoide B representa un organoide no viable. Un organoide viable lo podemos identificar gracias a la presencia de un borde definido (sistema cerrado) que representa la integridad epitelial, células ordenadas y correctamente empaquetadas formando, según el subtipo, una región luminal, como se muestra en la **Figura 11A**. Por otro lado, podemos identificar un organoide no viable ante la ausencia de un borde definido, células desordenadas más pequeñas, sin formas identificables y regiones oscuras, como se representa en la **Figura 11B**.

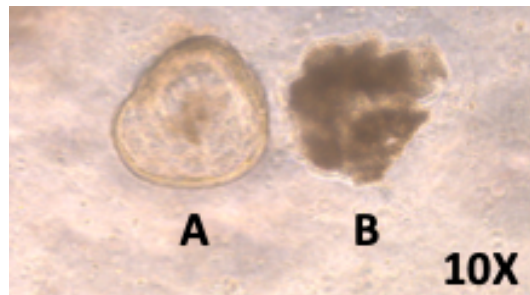


Figura 11. Imagen de un organoide viable (A) versus un organoide no viable (B). Aumento 10X.

5.5.2 Fenotipo glandular de los organoides establecidos

Los fenotipos morfológicos que adquieren los organoides de cáncer gástrico establecidos son similares a los presentes en la estructura histológica de la mucosa gástrica. En la **Figura 12** se observa un lumen central rodeado de ramificaciones. En la base de dichas ramificaciones se localizan las células madre LGR5+ (elevada expresión de Wnt) intercaladas con las células principales y células mucosas. Por ello, los organoides establecidos representan un fenotipo relevante fisiológicamente pues reflejan *in vitro* las características del epitelio *in vivo*. Esto se debe a que las células adquieren una identidad y una polaridad apical-basal, que permite la disposición organizada de las células.

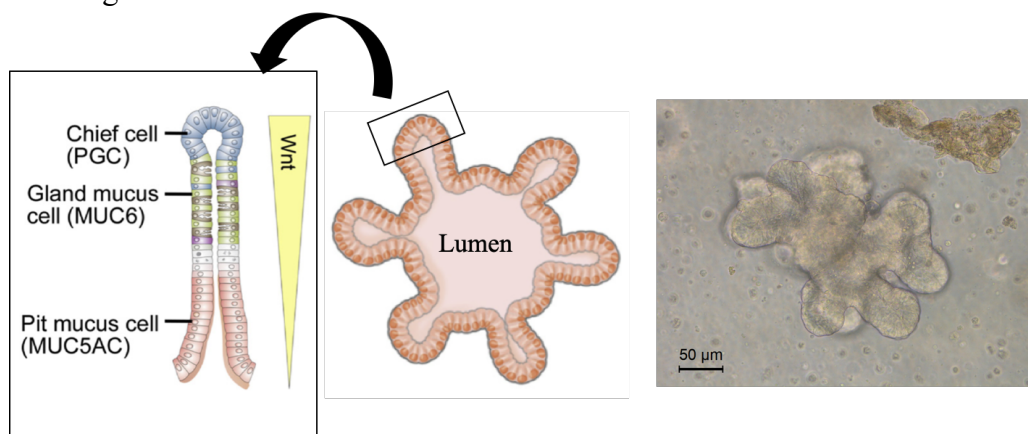


Figura 12. Esquema de una glándula gástrica e imagen de un organoide de cáncer gástrico. Aumento 20X.

5.6 Esquema de trabajo tras el establecimiento de un organoide

Una vez establecidos los organoides tumorales (GTO) y no tumorales (GNO) de cáncer gástrico (**Tabla 3**) se realizan múltiples análisis con el fin de caracterizarlos esquematizados en la **Figura 13**. En concreto, en este trabajo se ha incluido GTO7 en parafina para realizar el estudio morfológico mediante tinción con Hematoxilina-Eosina (HE). Por otro lado, se ha aislado el ADN de GTO1 y GTO7. Se ha secuenciado el ADN de GTO1 para conocer su perfil genético. Este resultado se ha comparado con el dato obtenido de la secuenciación del tejido primario del cual procede, GTT1. Además, se ha aislado ADN de GTT3, GTT8 P1 y GTT8 P2 que está

siendo secuenciado y analizado. Los resultados obtenidos de cada análisis se detallan en los siguientes puntos de resultados. Además, los organoides generados se criopreservan a largo plazo en el biobanco, generando una organoidoteca



Figura 13. Flujo de trabajo realizado a partir del cultivo de organoides: aislamiento de ADN para secuenciación; inclusión de organoides en parafina para estudio morfológico mediante tinción con HE; generación de una organoidoteca en el tanque de nitrógeno. Análisis de los datos para establecer la correlación existente entre los organoides generados y el tejido primario del cual proceden.

5.7 Análisis morfológico mediante histoquímica

Para el correcto estudio morfológico de los organoides mediante Hematoxilina-Eosina, resulta necesario el establecimiento de un procedimiento eficiente de inclusión en parafina de dichos organoides para su posterior tinción. En este sentido, el trabajo ha establecido un procedimiento óptimo (véase en Materiales y Métodos) que permite realizar de forma correcta y eficiente la técnica histológica. Uno de los pasos más relevantes es la utilización de HistoGel, pues se trata de un gel que resulta especialmente útil en muestras de tejido pequeño difíciles de procesar: muestras citológicas, aspirados de médula ósea, etc. De ese modo, ha resultado apropiada su aplicación en muestras de organoides, caracterizadas por una baja cantidad de células en suspensión. El gel favorece la encapsulación y conservación de dichos organoides durante el procesamiento histológico.

En este trabajo se ha realizado el procedimiento histoquímico mediante tinción con HE a partir de GTO7 de tipología histológica difusa. En la **figura 14** se observa la existencia de diversas células (núcleo azul) agrupadas en forma de racimos, al igual que se observa en el microscopio, y correlacionan con el subtipo histológico difuso de CG, diagnosticado previamente por el servicio de Anatomía Patológica. De ese modo, el procedimiento de inclusión en parafina de organoides y posterior tinción con HE, resulta óptimo y correcto.

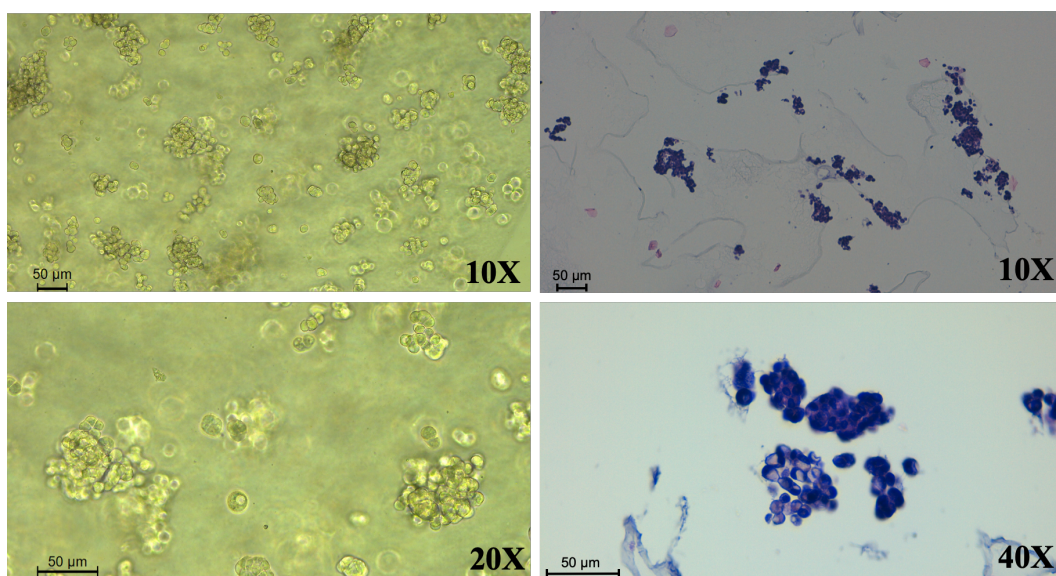


Figura 14. Estudio morfológico mediante HE. Figuras izquierdas: imágenes microscópicas del cultivo de GTO7. Figuras derechas: imágenes histológicas de GTO7. Aumento 10X; 20X y 40X.

5.8 Análisis genético: Organoide *versus* Tejido primario

En este trabajo, se ha extraído el ADN total de muestras de tejido gástrico tumoral congelado (GTT1, GTT3, GTT8 P1, GTT8 P2) utilizando el kit comercial *AllPrep DNA/RNA Mini Kit* a partir de 20-30 mg de tejido. Alternativamente, se extrajo el ADN total del cultivo de organoides GTO1 y GTO7 mediante el kit comercial *QIAamp DNA Micro Kit*. En este caso se ha establecido que la cantidad mínima de organoides de partida para obtener suficiente ADN y de calidad para secuenciación es 1 pocillo de 24w confluyente. Los valores de pureza para cada una de las muestras, así como los valores de concentración del ADN se han analizado con el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington DE, USA), y aparecen detallados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Valores de concentración y relaciones de absorbancias 260nm/280nm–260nm/230nm de cada una de las muestras.

ID muestra	[ADN] (ng/ µl)	A 260/280	A 260/230
GTT1	592,6	1,88	1,99
GTT3	272,6	1,88	2,21
GTT8 P1	70,6	1,85	1,59
GTT8 P2	516,2	1,89	2,22
GTO1	59,1	1,86	2,07
GTO7	319,9	2,00	2,24

ID Muestra= identificación de la muestra; [ADN] = concentración de ADN; GTT= *Gastric Tumor Tissue*; GTO= *Gastric Tumor Organoids*).

Las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230 indican el grado de pureza de las muestras de ADN. Puesto que en una solución de ADN (longitud de absorbancia de 260 nm) podemos encontrar presentes sustancias contaminantes que absorben a longitudes de onda, 280 y 230 nm. Así pues, las proteínas absorben a 280 nm, el fenol a 270 nm. Por otro lado, las sales caotrópicas, el fenol y los hidratos de carbono absorben a 230 nm. Con todo ello, se consideran muestras de alta pureza valores de A260/280 dentro del rango 1,8-2 y valores de A260/230 dentro del rango 2-2,2. De ese modo, nuestras muestras presentan una pureza de ADN óptima y adecuada (sin presencia de contaminantes en la solución de ADN) que interfieran en la realización de técnicas moleculares posteriores.

A continuación, las muestras de ADN procedentes de las muestras GTO1 y GTT1 se enviaron a la Unidad de Medicina de Precisión-Oncología Translacional del IIS INCLIVA, donde se destinan 100 ng totales de ADN de doble cadena para la preparación de librerías, proceso tras el cual se realiza la secuenciación por síntesis empleando el equipo *MiSeq System* de Illumina y posteriormente se realiza el análisis bioinformático. Se realiza la secuenciación de un panel de genes (OncoSpot) que incluye 4 genes completos (PTEN, P53, BRCA1, BRCA2) y 83 genes hotspots de cáncer específicos de tumores sólidos, entre los que se incluyen genes con una elevada frecuencia de mutación en tumores gastrointestinales como son PIK3CA, CDH1, TP53, etc. Además, incluye más de 800 variaciones.

Los datos obtenidos del análisis de secuenciación indican que todos los cambios presentes en el tejido tumoral se mantienen en el organoide. El organoide GTO1 presenta una frecuencia alélica similar o igual a la presente en el tejido del cual procede, GTT1, **Figura 15**. De ese modo, las frecuencias alélicas son las mismas en todas las posiciones exónicas estudiadas. Además, existe una concordancia del 98% entre todas las variantes exónicas, **Figura 16**. Estos resultados indican la estrecha asociación en la secuencia de ADN, entre el organoide y el tejido primario, pues están relacionadas. Por tanto, el organoide consigue recapitular el perfil genético del tumor original, tal y como se indica en el trabajo realizado por Yan et al. (42). En concreto, en el presente trabajo GTO1 consigue reproducir en un 98% el perfil genético de GTT1.

Con todo ello, los organoides generados prometen ser un buen modelo genético para el estudio de la enfermedad, ya que permiten reproducir el perfil genético presente en el tejido tumoral primario del cual proceden. Por ello, los organoides representa una herramienta con alto potencial para la identificación de terapias dirigidas paciente-específicas, a la vez que permite predecir su eficacia.

disgregado. De ese modo, el panel 1 identifica poblaciones linfocitarias, el panel 2 identifica macrófagos, el panel 3 identifica marcadores de células tumorales y el panel 4 células madre/troncales tumorales.

Resulta interesante señalar que previamente a la realización del análisis poblacional mediante citometría de flujo es necesario realizar una puesta a punto de cada uno de los paneles de forma individualizada. Para ello, se ajustan y se establecen diferentes parámetros como la titulación de los anticuerpos, la compensación y los controles FMOs (*Fluorescence Minus One*). La titulación de los anticuerpos permite determinar la concentración de anticuerpo apropiada para emplear la técnica de inmunofenotipación. La compensación permite corregir el solapamiento entre los espectros de emisión de los fluorocromos empleados para evitar resultados erróneos. El control FMO contienen todos los anticuerpos menos 1 (control negativo) para garantizar la correcta identificación del anticuerpo de interés. Por lo tanto, una vez se ha realizado la puesta a punto de cada uno de los paneles de interés, ya se puede realizar de forma correcta y fiable el análisis.

En este trabajo se han puesto a punto todos los paneles. Sin embargo, el análisis poblacional se ha realizado con los paneles que identifican linfocitos, macrófagos y marcadores tumorales, a partir de muestras de tejido gástrico tumoral.

De forma descriptiva, el análisis poblacional del panel de linfocitos determina un 30.8% de células vivas presentes en la muestra de tejido gástrico tumoral determinado mediante marcaje con yoduro de propidio. Dentro de las células vivas el 5.8% son monocitos (CD14+); el 78% son células CD14-, dentro de las cuales un 91.6% son neutrófilos (CD14- CD16+); y el 5.1% son linfocitos T CD14-. A su vez, esta población de linfocitos (CD14-) se compone de linfocitos T CD3+ (CD14- CD3+) en un 26%, dentro de la cual encontramos linfocitos T CD8+ citotóxicos (CD14- CD3+ CD8+ CD4-) en un 25.5%, linfocitos T CD4+ *helper* (CD14- CD3+ CD4+ CD8-) en un 22.7% y linfocitos T reguladores (CD14- CD3+ CD25+ CD127-) en un 19.1%. Además, se determina un 1.2% de linfocitos B (CD14- CD19+ CD3-) y un 15.1% de células *Natural Killer* (CD14- CD3- CD16+).

Por tanto, la puesta a punto del panel de células linfocitarias ha resultado un éxito, pues todos los anticuerpos presentes en el panel se detectan correctamente. Además, tras realizar el análisis se puede decir que en el tejido gástrico tumoral encontramos linfocitos T CD8+, CD4+, linfocitos T reguladores (CD127- CD25+), linfocitos B (CD3- CD19+). Además de contener monocitos (CD14+), *Natural Killer* (CD16+ CD3-) y neutrófilos (CD14- CD16+), **Figura 17.**

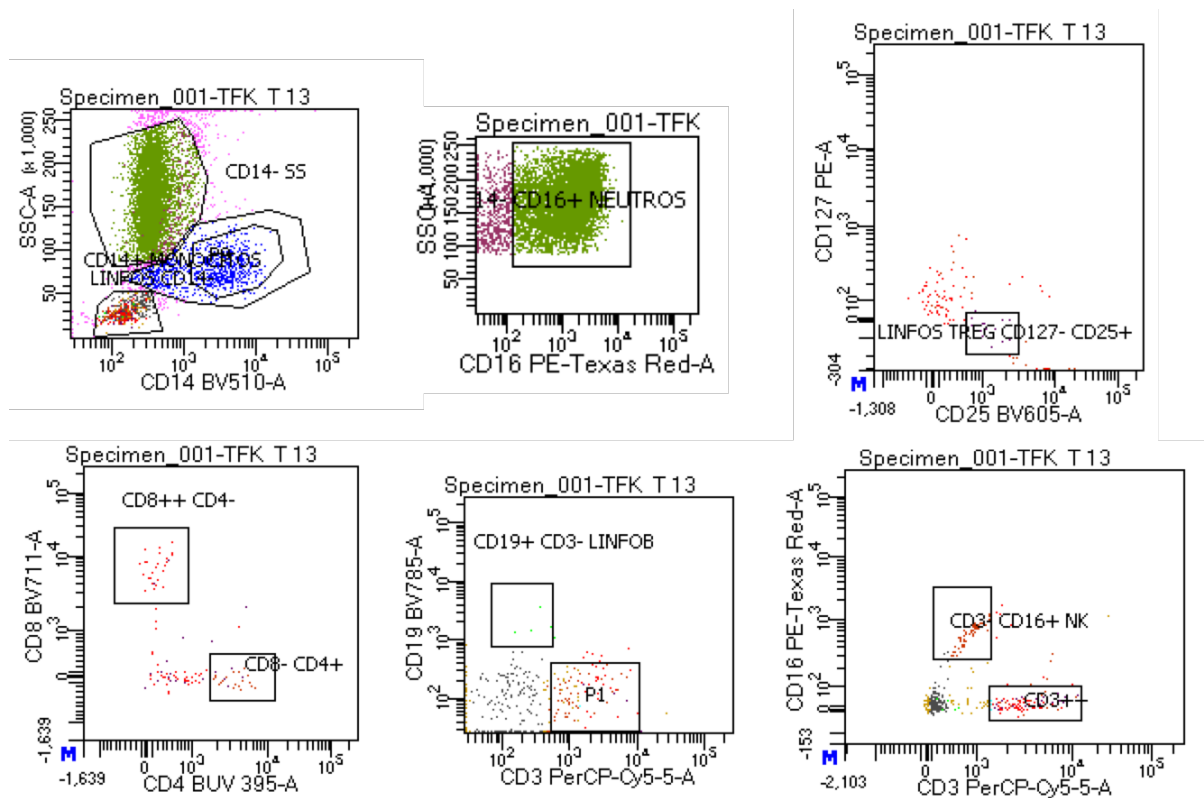


Figura 17. Caracterización de las poblaciones linfocitarias presentes en el tumor. Dot-plots de los diferentes anticuerpos analizados. SSC= *Side Scatter*. NEUTROS= neutrófilos. LINFOS TREG= linfocitos T reguladores. LINFOS B= linfocito B. NK=*Natural Killer*.

El análisis del panel de macrófagos, a partir de una pieza de tejido gástrico tumoral disgregado, ha permitido identificar un 5.6% de monocitos (CD45+ CD14+), dentro de los cuales un 73.7% son macrófagos (CD45+ CD14+ CD64+). A su vez, los macrófagos M2 (CD45+ CD14+ CD64+ CD163+) representan el 83.2% del total de macrófagos. Este subtipo M2 ejerce una respuesta antiinflamatoria, inmunosupresora y protumoral.

Por tanto, la puesta a punto del panel de macrófagos ha resultado un éxito, pues todos los anticuerpos se detectan correctamente en el análisis. Además, tras el análisis se puede decir que la pieza gástrica tumoral presenta macrófagos (CD45+ CD14+ CD64+) y se puede definir el porcentaje específico (83.2%) del subtipo M2 (CD45+ CD14+ CD64+ CD163+) pues dispone de la molécula CD163+ que identifica específicamente macrófagos de tipo M2. Sin embargo, no se pueden identificar los macrófagos M1, puesto que en la actualidad no se dispone de un marcador específico para este subtipo. La caracterización indica que el tejido tumoral contiene monocitos, macrófagos en general y macrófagos de tipo M2 específicamente, **Figura 18**.

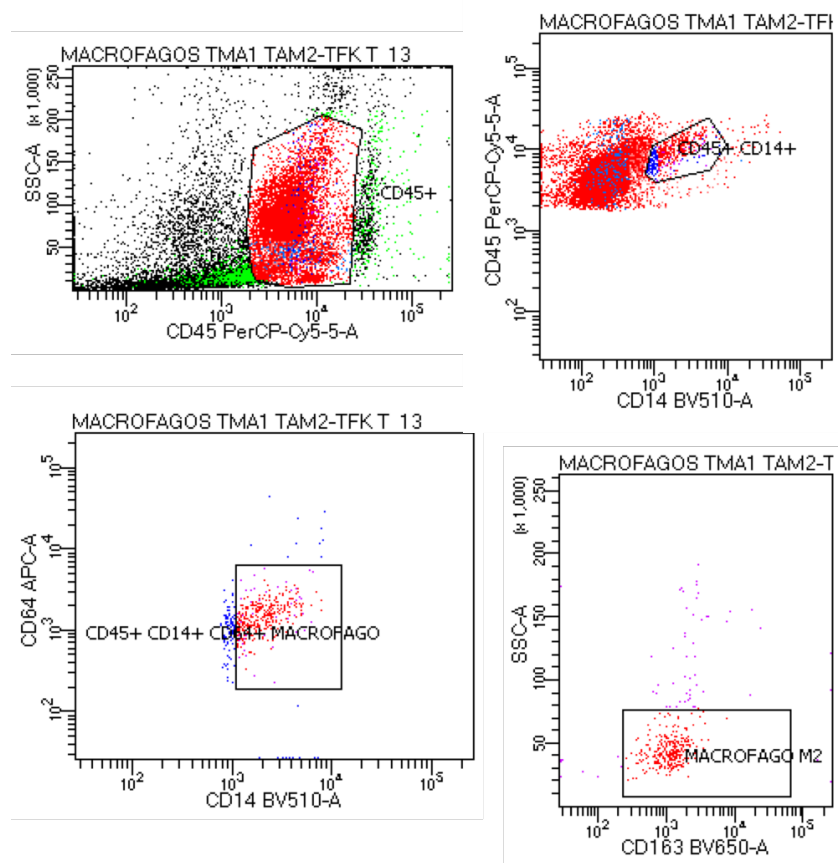


Figura 18. Caracterización de los macrófagos presentes en el tumor. Dot-plots de los diferentes anticuerpos analizados. SSC= *Side Scatter*.

El análisis del panel de marcadores tumorales, a partir de una muestra de tejido gástrico tumoral disociado, ha permitido determinar un 42.3% de células viables presentes en la muestra. Dentro de las células vivas un 65.7% son células CD309+CD326+, un 4.9% son células CD274+ CD326+ y un 12.3% son CD279+ CD326+.

Por tanto, la puesta a punto del panel de marcadores tumorales ha resultado un éxito, pues todos los anticuerpos se detectan correctamente en el análisis. Además, tras el análisis poblacional se puede decir que la biopsia gástrica tumoral presenta células epiteliales (CD326+), células que expresan el receptor inmunosupresor de la respuesta celular T citotóxica CD279+ (PD-1), células que expresan la molécula transmembrana CD274+ (PD-L1) y células endoteliales (CD309), **Figura 19**. El marcador CD274+ (PD-L1), es una molécula transmembrana, sobreexpresada en células tumorales, que reconoce el receptor CD279+ (PD-1), expresado en linfocitos T citotóxico. De esa forma, la célula tumoral inhibe la acción del linfocito citotóxico. Por otro lado, CD326+ también se conoce como EpCAM (*Epithelial Cell Adhesión Molecule*), esta molécula se expresa en epitelios y carcinomas. Además, EpCAM tiene un potencial oncogénico pues participa en la tumorigénesis y metástasis de los carcinomas. El marcador CD309+ o VEGFR2 juega un papel importante en la regulación de la angiogénesis, la vasculogénesis y la permeabilidad vascular. En el tumor, VEGFR2 promueve la angiogénesis tumoral.

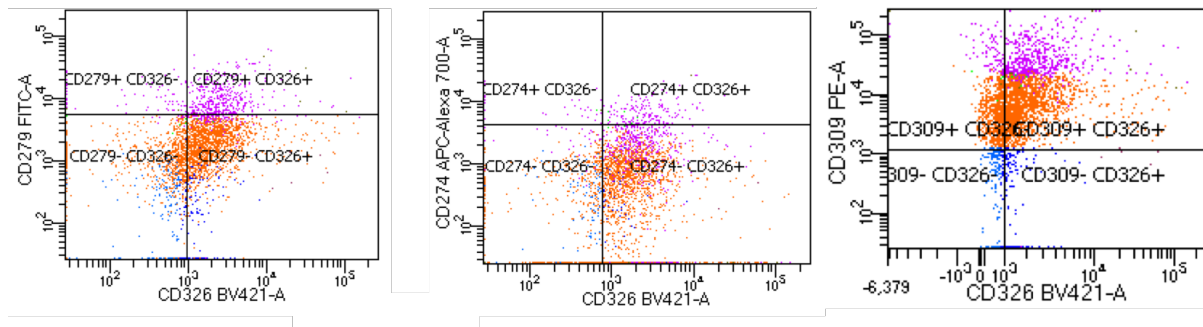


Figura 19. Caracterización de marcadores tumorales presentes en el tumor. Dot-plots de los diferentes anticuerpos analizados.

5.10 Creación de una organoidoteca de cáncer gástrico

En la actualidad, existe una colección de organoides localizada en *Hubrecht Institute* (Países Bajos) fundada por el Dr. Hans Clevers, pionero en el campo. Dicha organización sin ánimo de lucro HUB (www.hub4organoids.eu) dispone de una colección de organoides representativos de diversas enfermedades (intestinales, pulmonares y metabólicas) a disposición de los investigadores. También dispone de cultivos de organoides modelo de cáncer, incluidos los organoides tumorales de cáncer de pulmón, de mama, tumores colorrectales, pancreáticos e intestinales. Sin embargo, en su catálogo de disponibilidad de muestras no se incluyen los organoides de cáncer gástrico, pese a la importancia de éste para la comunidad científica.

En este sentido, la realización de este trabajo ha permitido la generación de una organoidoteca de cáncer gástrico que contiene un amplio repertorio de casos. En concreto incluye 2 cultivos de organoides normales y 8 cultivos de organoides tumorales de cáncer gástrico. La colección resulta de gran interés pues se compone de los diferentes subtipos histológicos conocidos en CG, dispone de diferentes subtipos moleculares y estadios de la enfermedad, así como incluye organoides no tumorales. La organoidoteca resulta única pues dispone de organoides del subtipo MSI+, un caso poco frecuente que se describe en pocos estudios (40). Además, incluye diferentes regiones tumorales procedentes del mismo paciente (P1 y P2), lo cual permitirá estudiar la heterogeneidad intratumoral en el futuro.

Resulta importante señalar que las consideraciones y los aspectos éticos de los organoides no se han explorado en profundidad, puesto que se trata de una técnica muy novedosa. Una revisión, publicada en *Science* (45), resume el estado actual de la investigación en organoides y evalúa algunas de las implicaciones éticas de su utilización en investigación y en la práctica clínica. Los organoides son a todos los efectos muestras biológicas humanas, por lo que se pueden conservar en el biobanco, siempre que se informe convenientemente al donante y este consienta en ello. Por ello, se considera el consentimiento informado de los donantes un punto clave para la correcta utilización de material biológico tan sensible y potencial como los organoides. En ese sentido, se le debe explicar al donante que se van a generar organoides y estos se van a conservar a largo plazo de forma anonimizada, para garantizar la confidencialidad del donante original.

6 Conclusiones

1. El presente trabajo ha permitido establecer los parámetros óptimos de generación eficiente de organoides de cáncer gástrico a partir de tejido en fresco tumoral y normal, entre los cuales definimos:
 - 1.1. Un tiempo de digestión enzimática de 30 minutos resulta óptimo y suficiente para la generación eficiente de un cultivo de organoides.
 - 1.2. Una densidad celular de entre 4.000 células y 8.000 células/ μ L de Matrigel resulta la densidad óptima para el correcto establecimiento de organoides.
 - 1.3. Una concentración de Matrigel del 50% resulta óptima para un establecimiento eficiente de organoides.
2. La caracterización genética indica que los organoides establecidos recapitulan en un alto grado el perfil genético del tejido tumoral del paciente del cual proceden.
3. El análisis poblacional tras la puesta a punto de la citometría de flujo indica que los paneles se han diseñado correctamente y que el protocolo de disgregación enzimática del tejido y el procedimiento de marcaje posterior son óptimos.
4. La realización del presente trabajo ha permitido crear una colección de organoides de cáncer gástrico de interés para la comunidad científica.

7 Referencias bibliográficas

1. WHO, The Global Cancer Observatory. (April 2019): Stomach fact sheet, available: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf>
2. Cáncer gástrico - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019. Seom.org. Retrieved 3 April 2019, from <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/estomago?showall=1>
3. Bosman F, Carneiro F, Hruban R, Theise N. WHO classification of Tumours of the Digestive System. 4th edn Lyon: IARC Press, 2010
4. Laurén, P. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 64(1), 31–49. doi:10.1111/apm.1965.64.1.31
5. Bass, A. J., Thorsson, V., Shmulevich, I., Reynolds, S. M., Miller, M., Bernard, B., ... Shen, H. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517), 202–209. doi:10.1038/nature13480
6. Hunt, R. H., Camilleri, M., Crowe, S. E., El-Omar, E. M., Fox, J. G., Kuipers, E. J., ... Tack, J. (2015). The stomach in health and disease. *Gut*, 64(10), 1650–1668. doi:10.1136/gutjnl-2014-307595
7. García C, C., Benavides C, C., Apablaza P, S., Rubilar O, P., Covacevich R, S., Peñaloza M, P., ... Romero S, C. (2007). Resultados del tratamiento quirúrgico del cáncer gástrico: Análisis de 423 casos. *Revista Médica de Chile*, 135(6).doi:10.4067/s0034-98872007000600001
8. Al-Batran, S.-E., Hofheinz, R. D., Pauligk, C., Kopp, H.-G., Haag, G. M., Luley, K. B., ... Tannapfel, A. (2016). Histopathological regression after neoadjuvant docetaxel, oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus epirubicin, cisplatin, and fluorouracil or capecitabine in patients with resectable gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (FLOT4-AIO): results from the phase 2 part of a multicentre, open-label, randomised phase 2/3 trial. *The Lancet Oncology*, 17(12), 1697–1708. doi:10.1016/s1470-2045(16)30531-9
9. Bang, Y.-J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H. C., Shen, L., Sawaki, A., ... Kang, Y.-K. (2010). Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet*, 376(9742), 687–697. doi:10.1016/s0140-6736(10)61121-x
10. Fuchs, C. S., Tomasek, J., Yong, C. J., Dumitru, F., Passalacqua, R., Goswami, C., ... Taberero, J. (2014). Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 383(9911), 31–39. doi:10.1016/s0140-6736(13)61719-5
11. Friedman, A. A., Letai, A., Fisher, D. E., & Flaherty, K. T. (2015). Precision medicine for cancer with next-generation functional diagnostics. *Nature Reviews Cancer*, 15(12), 747–756. doi:10.1038/nrc4015
12. Goodspeed, A., Heiser, L. M., Gray, J. W., & Costello, J. C. (2015). Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics. *Molecular Cancer Research*, 14(1), 3–13. doi:10.1158/1541-7786.mcr-15-0189
13. McMillin, D. W., Negri, J. M., & Mitsiades, C. S. (2013). The role of tumour–stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(3), 217–228. doi:10.1038/nrd3870
14. Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., ... Fine, H. A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell*, 9(5), 391–403. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.030
15. Ibarrola-Villava, M., Cervantes, A., & Bardelli, A. (2018). Preclinical models for precision oncology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. doi:10.1016/j.bbcan.2018.06.004
16. Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. V., Budinska, E., Byrne, A. T., ... Caldas, C. (2014). Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discovery*, 4(9), 998–1013. doi:10.1158/2159-8290.cd-14-0001
17. Zhang, X., Claerhout, S., Prat, A., Dobrolecki, L. E., Petrovic, I., Lai, Q., ... Lewis, M. T. (2013). A Renewable Tissue Resource of Phenotypically Stable, Biologically and Ethnically Diverse, Patient-Derived Human Breast Cancer Xenograft Models. *Cancer Research*, 73(15), 4885–4897. doi:10.1158/0008-5472.can-12-4081

18. Tetteh, P. W., Kretschmar, K., Begthel, H., van den Born, M., Korving, J., Morsink, F., ... Clevers, H. (2016). Generation of an inducible colon-specific Cre enzyme mouse line for colon cancer research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(42), 11859–11864. doi:10.1073/pnas.1614057113
19. Method of the Year 2017: Organoids. (2018). *Nature Methods*, 15(1), 1–1. doi:10.1038/nmeth.4575
20. Kaushik, G., Ponnusamy, M. P., & Batra, S. K. (2018). Concise Review: Current Status of Three-Dimensional Organoids as Preclinical Models. *STEM CELLS*. doi:10.1002/stem.2852
21. Xu, H., Lyu, X., Yi, M., Zhao, W., Song, Y., & Wu, K. (2018). Organoid technology and applications in cancer research. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1). doi:10.1186/s13045-018-0662-9
22. Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., ... Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 449(7165), 1003–1007. doi:10.1038/nature06196
23. Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... Clevers, H. (2009). Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265. doi:10.1038/nature07935
24. Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, 165(7), 1586–1597. doi:10.1016/j.cell.2016.05.082
25. Spence, J. R., Mayhew, C. N., Rankin, S. A., Kuhar, M. F., Vallance, J. E., Tolle, K., ... Wells, J. M. (2010). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470(7332), 105–109. doi:10.1038/nature09691
26. Gao, M., Lin, M., Rao, M., Thompson, H., Hirai, K., Choi, M., ... Kim, J. (2018). Development of Patient-Derived Gastric Cancer Organoids from Endoscopic Biopsies and Surgical Tissues. *Annals of Surgical Oncology*, 25(9), 2767–2775. doi:10.1245/s10434-018-6662-8
27. Vlachogiannis, G., Hedayat, S., Vatsiou, A., Jamin, Y., Fernández-Mateos, J., Khan, K., ... Valeri, N. (2018). Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 359(6378), 920–926. doi:10.1126/science.aao2774
28. Weeber, F., van de Wetering, M., Hoogstraat, M., Dijkstra, K. K., Krijgsman, O., Kuilman, T., ... Voest, E. E. (2015). Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(43), 13308–13311. doi:10.1073/pnas.1516689112
29. Broutier, L., Mastrogiovanni, G., Verstegen, M. M., Francies, H. E., Gavarró, L. M., Bradshaw, C. R., ... Huch, M. (2017). Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nature Medicine*, 23(12), 1424–1435. doi:10.1038/nm.4438
30. Huang, L., Holtzinger, A., Jagan, I., BeGora, M., Lohse, I., Ngai, N., ... Muthuswamy, S. K. (2015). Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nature Medicine*, 21(11), 1364–1371. doi:10.1038/nm.3973
31. Gao, D., Vela, I., Sboner, A., Iaquina, P. J., Karthaus, W. R., Gopalan, A., ... Chen, Y. (2014). Organoid Cultures Derived from Patients with Advanced Prostate Cancer. *Cell*, 159(1), 176–187. doi:10.1016/j.cell.2014.08.016
32. Sachs, N., de Ligt, J., Kopper, O., Gogola, E., Bounova, G., Weeber, F., ... Clevers, H. (2018). A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*, 172(1-2), 373–386.e10. doi:10.1016/j.cell.2017.11.010
33. Dijkstra, K. K., Cattaneo, C. M., Weeber, F., Chalabi, M., van de Haar, J., Fanchi, L. F., ... Voest, E. E. (2018). Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2018.07.009
34. Rodenhizer, D., Gaude, E., Cojocari, D., Mahadevan, R., Frezza, C., Wouters, B. G., & McGuigan, A. P. (2015). A three-dimensional engineered tumour for spatial snapshot analysis of cell metabolism and phenotype in hypoxic gradients. *Nature Materials*, 15(2), 227–234. doi:10.1038/nmat4482
35. Xu, H., Lyu, X., Yi, M., Zhao, W., Song, Y., & Wu, K. (2018). Organoid technology and applications in cancer research. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1). doi:10.1186/s13045-018-0662-9
36. Van de Wetering, M., Francies, H. E., Francis, J. M., Bounova, G., Iorio, F., Pronk, A., ... Clevers, H. (2015). Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell*, 161(4), 933–945. doi:10.1016/j.cell.2015.03.053
37. Takasato, M., Er, P. X., Becroft, M., Vanslabrouck, J. M., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., & Little, M. H. (2013). Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nature Cell Biology*, 16(1), 118–126. doi:10.1038/ncb2894

38. Kalamohan, K., Rathinam, D., Panneerandian, P., & Ganesan, K. (2017). Coexpressed modular gene expression reveals inverse correlation between immune responsive transcription and aggressiveness in gastric tumours. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(7), 941–954. doi:10.1007/s00262-017-1998-7
39. Biffi, G., Oni, T. E., Spielman, B., Hao, Y., Elyada, E., Park, Y., ... Tuveson, D. A. (2018). IL-1-induced JAK/STAT signaling is antagonized by TGF-beta to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discovery*, CD-18-0710. doi:10.1158/2159-8290.cd-18-0710
40. Seidlitz, T., Merker, S. R., Rothe, A., Zakrzewski, F., von Neubeck, C., Grützmann, K., ... Stange, D. E. (2018). Human gastric cancer modelling using organoids. *Gut*, gutjnl-2017-314549. doi:10.1136/gutjnl-2017-314549
41. Steele, N. G., Chakrabarti, J., Wang, J., Biesiada, J., Holokai, L., Chang, J., ... Zavros, Y. (2018). An Organoid-Based Preclinical Model of Human Gastric Cancer. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 7(1), 161–184. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.09.008
42. Yan, H. H. N., Siu, H. C., Law, S., Ho, S. L., Yue, S. S. K., Tsui, W. Y., ... Leung, S. Y. (2018). A Comprehensive Human Gastric Cancer Organoid Biobank Captures Tumor Subtype Heterogeneity and Enables Therapeutic Screening. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2018.09.016
43. Aboukheyr Es, H., Montazeri, L., Aref, A. R., Vosough, M., & Baharvand, H. (2018). Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends in Biotechnology*, 36(4), 358–371. doi:10.1016/j.tibtech.2017.12.005
44. Vazin, T., & Schaffer, D. V. (2010). Engineering strategies to emulate the stem cell niche. *Trends in Biotechnology*, 28(3), 117–124. doi:10.1016/j.tibtech.2009.11.008.
45. Bredenoord, A. L., Clevers, H., & Knoblich, J. A. (2017). Human tissues in a dish: The research and ethical implications of organoid technology. *Science*, 355(6322), eaaf9414. doi:10.1126/science.aaf9414