



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Hacia una medicina de precisión en adenocarcinoma de
páncreas: biopsia líquida y establecimiento de organoides

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Ruiz Morell, Alexandre

Tutor/a: Jantus Lewintre, Eloisa

Cotutor/a externo: TARAZONA LLAVERO, NOELIA

Director/a Experimental: CASTILLO ALIAGA, JOSEFA

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

HACIA UNA MEDICINA DE PRECISIÓN EN ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS:

BIOPSIA LÍQUIDA Y ESTABLECIMIENTO DE ORGANOIDES

Autor: Alexandre Ruiz Morell

Tutor Académico: Prof. Dra Eloisa Jantus-Lewintre

Cotutores: Prof. Dra. Josefa Castillo Aliaga / Dra. Noelia Tarazona Llaveró

Grado en Biotecnología – Curso 2021-2022.

Trabajo de Fin de Grado

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (ETSIAMN)

Valencia, 12 de septiembre de 2022

TÍTULO: Hacia una medicina de precisión en adenocarcinoma de páncreas: biopsia líquida y establecimiento de organoides

TITLE: Towards precision medicine in pancreatic adenocarcinoma: liquid biopsy and organoid establishment.

Resumen:

El adenocarcinoma de páncreas es uno de los cánceres con peor pronóstico ya que la gran mayoría de casos se presentan en estadios avanzados, por lo que la esperanza de vida en el momento del diagnóstico no llega a los cinco meses y apenas el 7% de los pacientes sobreviven a los cinco años. Esta escasa supervivencia se atribuye principalmente a la ausencia de métodos de cribado eficaces, al diagnóstico tardío debido a síntomas inespecíficos, a la falta de biomarcadores sensibles o específicos para el diagnóstico precoz y a la propensión a la diseminación metastásica temprana.

Recientemente, el DNA circulante tumoral (ctDNA) se ha descrito como un prometedor biomarcador sanguíneo de obtención no invasiva para el tratamiento del cáncer, porque refleja la composición genética y epigenética del tumor del que procede. Este trabajo se ha centrado en el estudio molecular del ctDNA aislado de biopsias líquidas en 10 pacientes con cáncer de páncreas en distintos estadios de la enfermedad diagnosticados y tratados en el Hospital Clínico de Valencia. De esta forma, se han caracterizado los perfiles de mutación específicos de cada tumor y se ha medido la variación en su detección en respuesta a quimioterapia.

Además, se estableció un modelo de organoides a partir de una biopsia de tejido tumoral para realizar estudios preclínicos *ex vivo*. El uso de tejido primario en cultivos 3D para la generación de organoides permite recrear el componente epitelial del tumor de manera paciente-específica, de forma que posibilita evaluar la idoneidad de los diferentes tratamientos de forma individualizada.

Este trabajo ha consistido en la evaluación de la utilidad de la biopsia líquida, como herramienta para la monitorización de la enfermedad y la toma de decisiones terapéuticas; y el uso de organoides, como modelo preclínico para establecer la sensibilidad y resistencia a fármacos dirigidos, contribuyendo al desarrollo de una medicina de precisión en adenocarcinoma de páncreas.

Abstract:

Pancreatic adenocarcinoma is one of the cancers with the worst prognosis since the vast majority of cases present in advanced stages, so that life expectancy at the time of diagnosis is less than five months and only 7% of patients survive to five years. This poor survival is mainly attributed to the absence of effective screening methods, late diagnosis due to non-specific symptoms, the lack of sensitive or specific biomarkers for early diagnosis and the propensity for early metastatic spread.

Recently, circulating tumor DNA (ctDNA) has been described as a promising blood biomarker for non-invasive collection for cancer treatment, because it reflects the genetic and epigenetic composition of the tumor from which it originates. This work has focused on the molecular study of ctDNA isolated from liquid biopsies in 10 patients with pancreatic cancer at different stages of the disease diagnosed and treated at the Hospital Clínico de Valencia. In this way, tumor-specific mutation profiles have been characterized and the variation in their detection in response to chemotherapy has been measured.

In addition, an organoid model was established from a biopsy of tumor tissue to perform ex vivo preclinical studies. The use of primary tissue in 3D cultures for the generation of organoids allows recreating the epithelial component of the tumor in a patient-specific manner, thus making it possible to evaluate the suitability of different treatments on an individualized basis.

This work has consisted in the evaluation of the usefulness of liquid biopsy as a tool for disease monitoring and therapeutic decision making; and the use of organoids as a preclinical model to establish sensitivity and resistance to targeted drugs, contributing to the development of precision medicine in pancreatic adenocarcinoma.

Palabras clave: adenocarcinoma de páncreas, medicina de precisión, biopsia líquida, DNA circulante tumoral, organoides, ensayo de fármacos

Keywords: pancreatic adenocarcinoma, precision medicine, liquid biopsy, tumor circulating DNA, organoids, drug testing

Autor: Alexandre Ruiz Morell

Localidad: Valencia, septiembre de 2022

Tutor Académico: Prof. Dra Eloisa Jantus-Lewintre

Cotutores: Prof. Dra. Josefa Castillo Aliaga / Dra. Noelia Tarazona Llaveró

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutoras, Pepa y Noelia, por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto. Sin duda, mi estancia en INCLIVA me ha permitido conocer el mundo de la investigación por dentro a la vez que he aprendido sobre el campo de estudio.

Quiero agradecer a Blanca, Vero y Elena, por ser mis guías en el laboratorio, por haberme acompañado día a día durante estos meses. No os puedo agradecer lo suficiente por vuestro tiempo y el esfuerzo de enseñarme tanto sobre el laboratorio. También, a Paco y a Laura por vuestra dedicación y atención en resolver mis dudas.

A mis amigos, por haberme acompañado siempre, en mis mejores momentos y en los más duros. Con este trabajo no solo pongo fin a una etapa de aprendizaje, sino también de mucho desarrollo personal.

Finalmente, a mi familia, por haberme animado siempre a hacer lo que me gustaba y a pesar de las complicaciones, no haber dejado de apoyarme.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. VISION GENERAL SOBRE EL ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÁTICO.....	1
1.1.1. Tratamiento.....	1
1.2. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PARA MONITORIZAR LA RESPUESTA NEOADYUVANTE	3
1.2.1. DNA tumoral circulante.....	3
1.2.1.1. Uso como herramienta de pronóstico.....	4
1.2.1.2. Uso como indicador de la reseabilidad del tumor	4
1.3. MODELOS PRECLÍNICOS EN LA INVESTIGACIÓN CONTRA EL CÁNCER.....	5
1.3.1. Organoides	6
1.3.1.1. Definición de organoides	6
1.3.1.2. Aplicaciones en la investigación contra el cáncer.....	7
1.3.1.3. Limitaciones de los organoides.....	8
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. OBTENCIÓN Y EXTRACCIÓN DE CTDNA A PARTIR DE PLASMA	10
3.1.1. Procesamiento del plasma.....	10
3.1.2. Purificación de cfDNA.....	10
3.1.3. Determinación de la concentración y calidad del cfDNA purificado	11
3.1.4. Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR).....	11
3.2. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE ORGANOIDES.....	13
3.2.1. Selección de pacientes y recogida de muestras	13
3.2.2. Establecimiento de organoides	14
3.2.3. Composición de los medios de cultivo	15
3.2.4. Nomenclatura de organoides	15
3.2.5. Seguimiento y monitorización de organoides	15
3.2.6. Pase y ampliación del cultivo de organoides.....	15
3.2.7. Criopreservación de organoides y descongelación	16
3.2.8. Caracterización morfológica de los organoides	16
3.2.9. Ensayos de sensibilidad de fármacos en organoides.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. <u>OBJETIVO 1</u> : OBTENCIÓN DE BIOPSIAS LÍQUIDAS Y EXTRACCIÓN DEL cfDNA DEL PLASMA DE PACIENTES CON CÁNCER DE PÁNCREAS.....	18
4.2. <u>OBJETIVO 2</u> : MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL PLASMA DE LOS PACIENTES A TRAVÉS DE PCR DIGITAL.....	20
4.2.1. Respuesta al tratamiento neoadyuvante.....	22
4.2.2 Progresión al tratamiento neoadyuvante	24
4.3. <u>OBJETIVO 3</u> : ESTABLECIMIENTO, SEGUIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE ORGANOIDES DERIVADO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PÁNCREAS.	26
4.4. <u>OBJETIVO 4</u> : CRIBADO DE LOS EFECTOS DE LOS FÁRMACOS EN ORGANOIDES A PARTIR DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES DETECTADAS.....	29
4.4.1. Tratamiento de PTO 9 con quimioterápicos.....	31
4.4.2. Tratamiento de PTO con inhibidores de diana específicas	32
5. CONCLUSIONES.....	33
6. BIBLIOGRAFÍA.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de muertes por cáncer estimadas en 2020 mundialmente.

Figura 2. Potenciales aplicaciones de la evaluación del DNA libre tumoral en el tratamiento del cáncer.

Figura 3. Principales aplicaciones de los organoides derivados de tumores en la investigación contra el cáncer.

Figura 4. Esquema simplificado de la purificación de DNA libre tumoral a partir de biopsia líquida.

Figura 5. Representación bidimensional de los resultados de la ddPCR para los controles positivos de KRAS G12/G13.

Figura 6. Esquema del procedimiento seguido para el establecimiento de organoides derivados de tejido de páncreas normal y tumoral.

Figura 7. Resultados del análisis de calidad de DNA libre circulante por 4200 TapeStation System de algunas de las muestras.

Figura 8. Representación del número total de gotas analizadas (eventos) por muestra de plasma en la ddPCR.

Figura 9. Representación bidimensional de los resultados de la ddPCR para la detección de KRAS en las muestras de biopsia líquida.

Figura 10. Evolución del porcentaje de abundancia fraccional de KRAS y el nivel sérico de CA 19.9 durante el tratamiento neoadyuvante.

Figura 11. Evolución del porcentaje de abundancia fraccional de KRAS y el nivel sérico de CA 19.9 durante el tratamiento neoadyuvante.

Figura 12. Pieza de páncreas unida al bazo (izquierda). Fragmento de 1-2 cm del tumor situado en el páncreas recogido por el servicio de Anatomía Patológica (derecha).

Figura 13. Organoides de páncreas (PTO 18) vistos al microscopio óptico a 10X.

Figura 14. Organoides de páncreas (PTO 9) vistos al microscopio óptico a 10X.

Figura 15. Tinción con H&E del PTO 9.

Figura 16. Estado de los organoides de PTO 9 tras la exposición a 5FU.

Figura 17. Representación de los resultados de los ensayos de los fármacos 5FU, oxaliplatino y su combinación sobre PTO 9.

Figura 18. Representación de los resultados de los ensayos de los fármacos Ceralasertib y Trametinib sobre PTO 9.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamiento y pronóstico general según estadio del cáncer de páncreas.

Tabla 2. Comparación de los modelos preclínicos tumorales de estudio.

Tabla 3. Reactivos del ddPCR™ KRAS G12/G13 Screening Kit (BIO-RAD) y volumen necesario para realizar la ddPCR.

Tabla 4. Esquema del programa de PCR para la detección de eventos poco frecuentes.

Tabla 5. Fechas de las extracciones de biopsia líquida a los pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal que respondieron al tratamiento neoadyuvante.

Tabla 6. Fechas de las extracciones de biopsia líquida a los pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal que no respondieron al tratamiento neoadyuvante.

Tabla 7. Concentración de DNA libre circulante extraído de muestras de plasma detectado por fluorimetría y estimación de su calidad por 4200 TapeStation System.

Tabla 8. Características de los pacientes seleccionados con cáncer de páncreas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Visión general sobre el adenocarcinoma ductal pancreático

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es una de las neoplasias más agresivas. Aunque no es muy frecuente, tiene una incidencia creciente siendo la séptima causa de muerte relacionada con cáncer tanto en hombres como en mujeres a nivel mundial y, se prevé que se convierta en la segunda para el año 2030 (Rahib et al., 2014). A nivel mundial, en 2020 se registraron 495.773 nuevos casos y 466.003 muertes por cáncer de páncreas (The International Agency for Research on Cancer (IARC), 2020).

La tasa de supervivencia global a 5 años es del 9%, y la mediana de supervivencia sigue siendo inferior a 6 meses, la más baja entre todos los tipos de cáncer (Huerta et al., 2021).

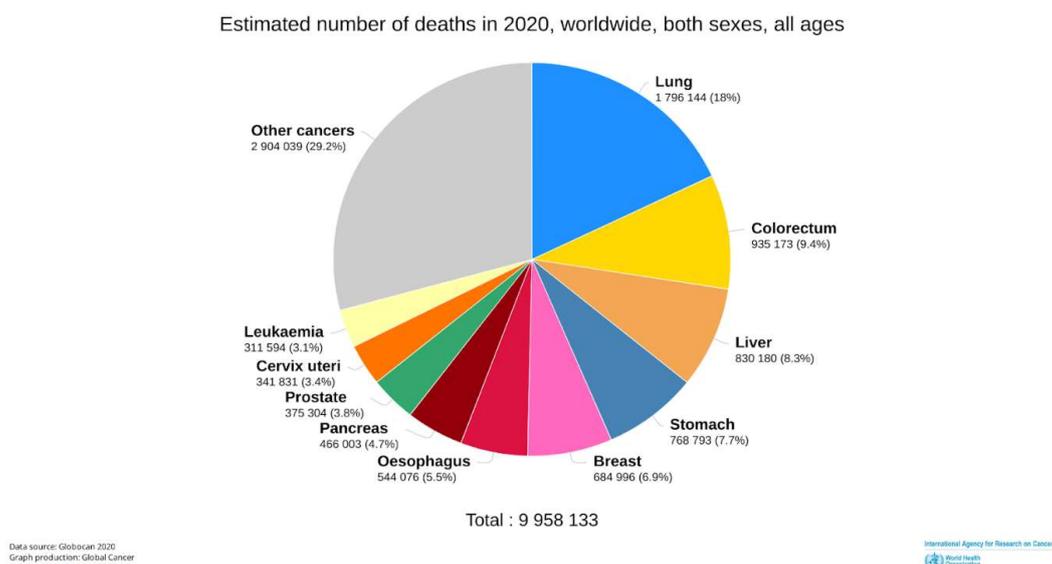


Figura 1. Número de muertes por cáncer estimadas en 2020 mundialmente (The International Agency for Research on Cancer (IARC), 2020)

Esta escasa supervivencia se atribuye principalmente a la ausencia de métodos de cribado eficaces, al diagnóstico tardío debido a síntomas inespecíficos, a la falta de biomarcadores sensibles o específicos para el diagnóstico precoz y a la propensión a la diseminación metastásica temprana (Huerta et al., 2021). A pesar de las opciones terapéuticas de primera línea, este cáncer suele ser propenso a la quimiorresistencia intrínseca y adquirida (Kamyabi et al., 2019).

El inicio de los síntomas y el diagnóstico del PDAC suele ser tardío, en un estadio avanzado, en el que la mayoría de los pacientes presentan enfermedad localmente avanzada (irreseccable) o metastásica (Huerta et al., 2021).

• 1.1.1. Tratamiento

La resección quirúrgica es el único tratamiento potencialmente curativo del cáncer de páncreas. Los tumores localizados se determinan como "reseccables" o "irreseccables (localmente avanzados)" según la afectación de los vasos locales. Sólo entre el 15 y el 20% de los pacientes se consideran candidatos a la resección quirúrgica, y muchos de estos pacientes tienen márgenes microscópicos positivos en el momento de la cirugía (Tabla 1.). Una detección más temprana está limitada por cuestiones relacionadas con el propio tumor y la tecnología disponible para el diagnóstico (Park et al., 2021; Ryan et al., 2014).

La elevada tasa de ganglios linfáticos y de márgenes quirúrgicos positivos en el momento de la resección ha llevado a evaluar el papel de la terapia **adyuvante** como un reductor del riesgo de metástasis (Ryan et al., 2014). Aunque se ha demostrado que el tratamiento adyuvante aporta un beneficio en cuanto a la supervivencia, entre el 71% y el 76% de los pacientes siguen recayendo a los dos años. Además, debido a las complicaciones asociadas a la cirugía, hasta el 40% de los pacientes no son aptos para pasar a la terapia adyuvante. Estas cifras, junto con el éxito del tratamiento **neoadyuvante** en otros tipos de cáncer, como el rectal, el de esófago y el gástrico, han llevado a explorar el impacto del tratamiento neoadyuvante en el cáncer de páncreas (McGuigan et al., 2018).

Tabla 1. Tratamiento y pronóstico general según estadio del cáncer de páncreas (Park et al., 2021).

Disease extent	Localized		Advanced	
Major vasculature involvement ^a	Uninvolved or abutted	Uninvolved or abutted	Encased	Distant metastasis, irrespective of the major vascular involvement
Clinical stage	Resectable	Borderline resectable	Locally advanced	Metastatic
Prevalence of pancreatic cancer among patients newly diagnosed with PDAC, %	10-15	30-35	30-35	50-55
American Joint Committee on Cancer tumor, node, and metastasis stage	I-II	II-III	II-III	IV
Treatment intent	Curative	Curative	Supportive and palliative	Supportive and palliative
Treatment	Surgery plus adjuvant systemic therapy	Neoadjuvant systemic therapy; surgery for resectable patients from favorable response; radiation for unresectable patients without distant metastasis	Neoadjuvant systemic therapy; surgery for resectable patients from favorable response; radiation for unresectable patients without distant metastasis	Systemic therapy ^a
5-y survival rate, %	35-45	10-15	10-15	<5

Abbreviation: PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma.

^a The degree of contact between the tumor and local blood vessels (ie, the superior mesenteric and portal veins as well as the celiac, hepatic, and superior mesenteric arteries) is categorized as either uninvolved, abutted, or encased. Abutment implies that the tumor has 180° or less of blood vessel involvement and encasement implies greater than 180° of circumferential tumor-vessel involvement.

Algunas ventajas del tratamiento neoadyuvante son la reducción de la tasa de desarrollo de las lesiones tumorales, el aumento de la tasa de resección R0 (margen quirúrgico negativo), la eliminación de las micrometástasis y la reducción del tumor primario; factores que se asocian a una menor incidencia de recidiva tumoral (McGuigan et al., 2018; Park et al., 2021).

Actualmente se utiliza FOLFIRINOX como primera línea de tratamiento neoadyuvante, una combinación de fluorouracilo, irinotecan, oxaliplatino y leucovorina cuya función se ha demostrado en pacientes con enfermedad metastásica (Ryan et al., 2014). A raíz de esto, se ha planteado evaluar los efectos de este fármaco en pacientes con enfermedad localmente avanzada (LAPC). Tras recibir el tratamiento, los últimos estudios demuestran que estos pacientes tienen más probabilidad de poder someterse a una resección quirúrgica como resultado de la reducción del estadio del tumor (Z. Chen et al., 2021).

Sin embargo, algunos pacientes que reciben tratamiento neoadyuvante pueden desarrollar complicaciones que retrasen o impidan la progresión a la cirugía y los tumores pueden no responder a la quimiorradioterapia, lo que conduce a la progresión de la enfermedad y a la formación temprana de micrometástasis. Por ello, para monitorizar la respuesta local al tratamiento conviene tener una técnica más sensible que las técnicas de imagen (Ferrone et al., 2015). Así, el descubrimiento de nuevos biomarcadores puede contribuir a la toma de decisiones durante el tratamiento de cada paciente (Juiz et al., 2019; McGuigan et al., 2018).

1.2. Búsqueda de biomarcadores para monitorizar la respuesta neoadyuvante

Para la elaboración de perfiles moleculares de un tumor el 'gold standard' consiste en la evaluación de tumores resecados o biopsiados (Kilgour et al., 2020). Para el cáncer de páncreas puede implicar una aspiración con aguja fina guiada por EUS o una biopsia con aguja gruesa (Kamyabi et al., 2019). El principal problema de este método es que no siempre es posible tomar muestras de tejido y aún es menos factible una vez empezado el tratamiento. A todo esto, se le suman otros retos como la accesibilidad al tumor y la cantidad, calidad y falta de heterogeneidad tumoral de la muestra (Grunvald et al., 2020; Kilgour et al., 2020).

La rápida progresión que presentan estos pacientes al tratamiento quimioterápico estándar hace que la monitorización de la respuesta a la terapia sea crítica para la detección de mecanismos de resistencia y su adelanto a la recaída radiológica (Kilgour et al., 2020). Por ello, actualmente se utilizan marcadores tumorales proteicos presentes en la sangre periférica, como es el caso del antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9) (Sefrioui et al., 2017).

A pesar de que aportan información útil sobre la enfermedad, no son marcadores específicos y por ello no siempre son del todo fiables. En el caso del CA 19.9, también se detecta en varias condiciones benignas y malignas, incluyendo pancreatitis, colestasis, cáncer gástrico, etc (Hou et al., 2021). Por consiguiente, sería conveniente la combinación de este marcador con nuevas herramientas como la biopsia líquida que nos permitiera monitorizar la respuesta durante el tratamiento neoadyuvante o evidenciar enfermedad mínima residual y detectar a los pacientes con alto riesgo de recaída tras la cirugía.

1.2.1. DNA tumoral circulante

El estudio de los componentes de la biopsia líquida ha llevado a su evaluación como biomarcadores, siendo el DNA tumoral circulante (ctDNA) uno de los más prometedores. Este componente genético se encuentra en el plasma y pertenece al DNA libre circulante (cfDNA) que se libera a la circulación sanguínea durante la muerte de células malignas. Permite realizar un seguimiento de la dinámica tumoral ya que refleja la composición genética y epigenética del tumor del que procede (Grunvald et al., 2020; Huerta et al., 2021).

La biopsia líquida puede detectar con precisión la presencia de enfermedad metastásica y de enfermedad mínima residual en muchos tumores sólidos con una relación de umbral de 10.000:1 entre el cfDNA normal y el alelo mutante. Este nivel de sensibilidad, la facilidad de acceso desde la sangre periférica en comparación con cualquier otro tipo de muestra tumoral y su corta vida media (2h), lo hacen un marcador ideal (Lee et al., 2019).

Aunque hacen falta ensayos más exhaustivos de su aplicación en el LAPC, en general, el ctDNA ha demostrado ser beneficioso para la detección precoz, la estimación del pronóstico, la selección del tratamiento, la monitorización de la evolución tumoral, la detección de la enfermedad mínima residual y la recaída del tumor durante el seguimiento (Figura 2.).

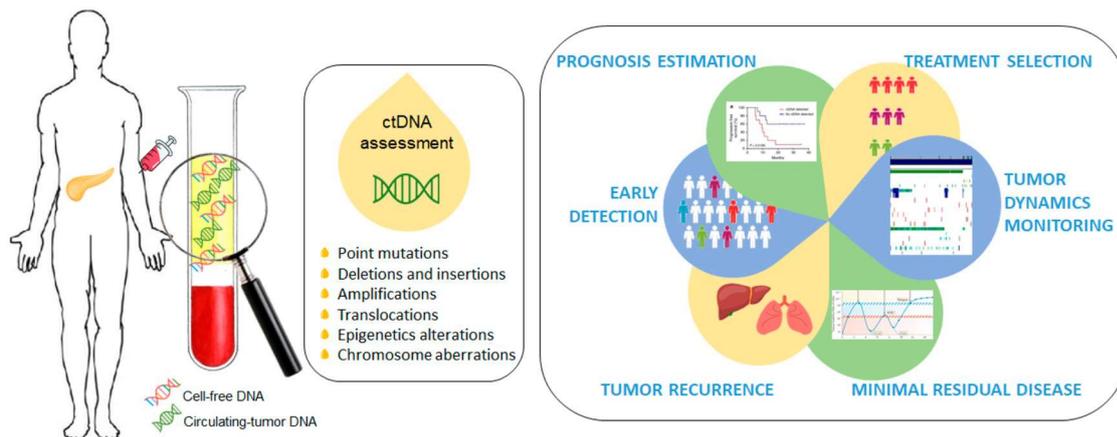


Figura 2. Principales aplicaciones de la evaluación del DNA libre tumoral (ctDNA) en el tratamiento del cáncer. La evaluación se basa en la identificación de diversas alteraciones genéticas o epigenéticas específicas del tumor en muestras de DNA libre circulante (Huerta et al., 2021).

1.2.1.1. Uso como herramienta de pronóstico

En el caso de los tumores de PDAC, la presencia de ctDNA en sangre está asociada a una menor supervivencia global (SG). Así, un estudio concluyó que un valor superior al 0,6% de ctDNA predecía una SG de 6,3 meses, mientras que un valor menor predecía una SG de 11,7 meses.

La presencia de mutaciones en el gen KRAS, hecho que se da en más del 90% de PDAC, también ha demostrado una peor SG, siendo de 3 meses frente a 11 en algunos estudios (Grunvald et al., 2020). La detección de mutaciones en este gen a través de biopsia líquida podría utilizarse para identificar a los pacientes con más probabilidades de beneficiarse de la intensificación del tratamiento pre y/o postoperatorio (Lee et al., 2019).

1.2.1.2. Uso como indicador de la resecabilidad del tumor

Por otra parte, la alta incidencia de metástasis a distancia tras la resección R0 en PDAC evidencia que ninguna prueba contemporánea detecta adecuadamente la enfermedad sistémica en el periodo preoperatorio (Grunvald et al., 2020). A razón de esto, se ha investigado que la discordancia entre las técnicas convencionales con las mutaciones KRAS detectadas en el ctDNA, pueda indicar la presencia de metástasis radiográficamente ocultas.

Un estudio concluyó que los pacientes que se habían sometido a quimioterapia neoadyuvante y tenían ctDNA negativo tenían un 80% de posibilidades de una resección R0, con ganglios negativos, en comparación con los que tenían ctDNA positivo, que sólo tenían un 38% de posibilidades de una operación R0, con ganglios negativos (McDuff et al., 2018). Sin embargo, cabe mencionar que, aunque estos datos parecen señalar la detección de niveles altos de ctDNA como un indicador de inutilidad quirúrgica, se requiere más investigación al respecto.

1.3. Modelos preclínicos en la investigación contra el cáncer

Uno de los mayores retos para entender el cáncer de páncreas es su alta heterogeneidad, que complica el estudio de la evolución de la enfermedad y el desarrollo de tratamientos personalizados (Cros et al., 2018). Las técnicas de secuenciación permiten elaborar perfiles moleculares tumorales a partir de biopsias de tejido o líquidas, pero no aportan suficientes herramientas para predecir la respuesta a un tratamiento dirigido (Hedayat & Valeri, 2020).

Por ello, la investigación se ha centrado en el desarrollo de modelos preclínicos que puedan recapitular las características genéticas y fisiológicas de un tumor concreto. La finalidad, en definitiva, sería poder evaluar en el menor tiempo posible diferentes tratamientos para determinar el más favorable. De esta forma se evitaría perder tiempo en terapias inefectivas.

Realizando un repaso de los modelos que han sido empleados en cáncer, se puede concluir que todos tienen ciertas características que los hacen más útiles según las condiciones de la aplicación buscada (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de los modelos preclínicos tumorales de estudio (H. Chen et al., 2021).

Características	2D	PDX	GEMM	Organoides
Coste de tiempo	+++	-	-	++
Coste económico	+++	-	-	++
Facilidad de mantenimiento	+++	-	-	++
Tasa de éxito del establecimiento	+++	-	-	++
Estructura 3D	*	+++	+++	++
Estabilidad genética	-	++	+++	++
Heterogeneidad intratumoral	-	+++	++	++
Sistema inmunitario	*	*	+++	*
Microambiente tumoral	*	++	++	*
Cribado de fármacos de alto rendimiento	+++	*	*	++
Modelización de cada estadio del cáncer	*	-	+++	++

+++ bueno ; ++ favorable; - desfavorable ; * inexistente

Durante muchos años se han empleado líneas celulares tumorales inmortalizadas, sencillas de establecer pero que no representan bien al tumor al carecer de complejidad tisular (Corrò et al., 2020). Además, las 15 líneas celulares de PDAC que habitualmente se utilizan no representan todas las mutaciones encontradas en los tumores de páncreas (H. Chen et al., 2021).

En cambio, los modelos animales modificados genéticamente (ej. GEMMs) son más realistas porque sufren de manera espontánea el desarrollo completo del tumor, pero presentan algunas limitaciones en cuanto a mantenimiento y cribado de fármacos, ya que los tumores necesitan entre 2 y 10 meses para alcanzar un tamaño adecuado para ser tratados (Hedayat & Valeri, 2020). Tampoco representan la heterogeneidad de tumores de páncreas humanos, ya que se les inducen mutaciones claramente conocidas y específicas y no dejan de ser tumores de origen animal (H. Chen et al., 2021).

Posteriormente, se han desarrollado xenotransplantes derivados de pacientes (PDX) para modelar mejor la arquitectura y la heterogeneidad del tejido tumoral humano in vivo. Sin embargo, a pesar de haberse probado su potencial como modelo preclínico, los PDX son muy costosos y requieren mucho tiempo para su establecimiento (Corrò et al., 2020). Esto supone un problema en pacientes con PDAC, los cuales tienen una mediana de supervivencia después del diagnóstico de 6 a 9 meses, por lo que no es factible seleccionar un plan de tratamiento eficaz a través del modelo PDX para la mayoría de ellos (H. Chen et al., 2021).

- **1.3.1. Organoides**

Los organoides son una tecnología reciente con potencial de simular las características de los tumores de páncreas de manera paciente-específica, recapitulando la arquitectura 3D y las funciones celulares de los tejidos de origen. Además, son fáciles de cultivar y presentan una alta estabilidad a lo largo de varios pases por lo que suponen un modelo fisiológico fácil de establecer y en el que evaluar la respuesta a fármacos. Se trata de un modelo con amplias aplicaciones en la investigación contra el cáncer (Figura 3.).

- **1.3.1.1. Definición de organoides**

Los organoides son un cultivo celular que crece en un entorno tridimensional definido in vitro para formar conglomerados de células que se autoorganizan y diferencian en células funcionales. Pueden derivarse de células madre adultas (ASC) a partir de una muestra de tejido normal o tumoral, dentro de un medio de cultivo que contiene factores de crecimiento específicos que recapitulan el control de la señalización en la homeostasis tisular. Básicamente, se inhiben o activan las vías de señalización que regulan los patrones de desarrollo para establecer las características regionales correctas durante la diferenciación de las ASCs (H. Chen et al., 2021; Corró et al., 2020).

Para conseguir ese entorno se emplean andamios como el Matrigel, una mezcla proteica heterogénea y gelatinosa secretada por las células de sarcoma de ratón de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). El Matrigel está compuesto principalmente de proteínas adhesivas como el colágeno, la entactina, la laminina y los proteoglicanos de sulfato de heparina, que se asemejan al entorno extracelular para proporcionar soporte estructural y señales de la matriz extracelular a las células (Corró et al., 2020).



Figura 3. Principales aplicaciones de los organoides derivados de tumores en la investigación contra el cáncer. Figura adaptada de “Application of Tumor Organoid”, por BioRender.com (2022). Extraída de: <https://app.biorender.com/biorender-templates>

- 1.3.1.2. Aplicaciones en la investigación contra el cáncer

Generación de biobancos

La capacidad de expansión a largo plazo de los organoides y su estabilidad genética tras varios pases ha permitido que se establezcan biobancos a partir de tejidos tumorales de PDAC. Estos biobancos pueden servir para conocer mejor la biología del tumor al realizar análisis genéticos y transcriptómicos, pero también pueden tener aplicaciones clínicas directas. El análisis ómico de los biobancos de organoides es una gran herramienta para identificar nuevas “mutaciones *driver*” de un tumor o para relacionar mutaciones específicas y cambios epigenéticos con respuestas farmacológicas alteradas (Low et al., 2021).

Uno de los retos principales para el futuro consistiría en la clasificación del PDAC por subtipos moleculares, a partir de estudios multitudinarios en organoides, lo que facilitaría la estratificación de los pacientes para los tratamientos adecuados.

Estudio de nuevos tratamientos

En estudios recientes se han demostrado analogías significativas de los datos clínicos con la respuesta a quimioterapia o quimiorradioterapia en organoides, entre ellos de páncreas. Por lo que se plantea la posibilidad de poder tomar decisiones a partir de resultados farmacológicos obtenidos sobre organoides, a las pocas semanas de la muestra de biopsia de tejido de la que se generaron (Low et al., 2021; Vlachogiannis et al., 2018). Asimismo, estos resultados pueden servir de uso para correlacionar la efectividad de los fármacos con un perfil genético y para desarrollar nuevas terapias dirigidas a alteraciones moleculares específicas.

Por otra parte, se pueden estudiar mecanismos de resistencia a fármacos a partir del análisis genómico de organoides derivados de biopsias de tejido antes y después del tratamiento. Estos análisis pueden indicar cambios genéticos que ayuden a establecer nuevos agentes dirigidos eficaces gracias a los nuevos sistemas de cribado de alto rendimiento. Los resultados pueden dar lugar a la identificación de combinaciones óptimas de fármacos que benefician al paciente (H. Chen et al., 2021; Kondo & Inoue, 2019).

Además, permiten evaluar la toxicidad de los fármacos, ya que cultivando organoides normales y tumorales procedentes del mismo paciente se puede llegar a determinar las dosis óptimas y efectivas que eliminarían las células tumorales suponiendo un daño mínimo para el tejido normal (Corrò et al., 2020).

Edición génica

Los organoides son accesibles a las modificaciones genéticas *in vitro*, por lo que es posible introducir mutaciones “*driver*” específicas en organoides de tipo salvaje a través de herramientas de edición de genes como la transferencia de genes, CRISPR-Cas9, o métodos de interferencia de ARN. De esta forma se puede recrear *in vitro* las mutaciones que dan origen a la carcinogénesis en el páncreas.

Estas herramientas de edición también se pueden combinar con el cribado de fármacos con el objetivo de estudiar las interacciones del fármaco con los genes *drivers* de PDAC frecuentemente mutados (Hirt et al., 2022).

- 1.3.1.3. Limitaciones de los organoides

La mayor limitación de este modelo es que no recapitula adecuadamente el microambiente tumoral (TME), ya que carece de células estromales circundantes en el cultivo. El TME está compuesto por fibroblastos, células endoteliales circundantes, células inmunitarias y proteínas de la matriz extracelular. Por tanto, los fármacos de inmunoterapia no pueden ser testados en este modelo. Actualmente se está trabajando en nuevos métodos que puedan retener otros tipos celulares del TME, lo que podría dar lugar a cocultivos estables más representativos (Corrò et al., 2020).

Por otro lado, la principal razón por la que los organoides aún no se han implementado en la práctica clínica se debe al coste de expansión y la dificultad que supone conseguir que crezcan para realizar ensayos de fármacos a tiempo. Sin embargo, este aspecto se está optimizando, y en un último estudio se ha conseguido realizar ensayos multitudinarios con una mediana de 48 días después del establecimiento (Seppälä et al., 2020).

Con el fin de potenciar su utilidad clínica, también se están desarrollando estrategias de cribado y lectura de fármacos que puedan predecir de forma fiable el resultado del tratamiento del paciente en la clínica (Corrò et al., 2020).

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto de investigación fue evaluar la utilidad de la biopsia líquida, como herramienta para la monitorización del tratamiento del adenocarcinoma de páncreas y la toma de decisiones terapéuticas; y el uso de organoides, como modelo preclínico para establecer la sensibilidad y resistencia a fármacos dirigidos. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1.** Obtención de biopsias líquidas y extracción del ctDNA del plasma de pacientes con cáncer de páncreas.
- 2.** Monitorización de la respuesta al tratamiento neoadyuvante en el plasma de los pacientes a través de PCR digital.
- 3.** Establecimiento, seguimiento y caracterización de un modelo de organoides derivado de pacientes con cáncer de páncreas.
- 4.** Cribado de los efectos de los fármacos en organoides a partir de las alteraciones moleculares detectadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención y extracción de ctDNA a partir de plasma

Para la extracción de ctDNA se seleccionaron 10 pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas localmente avanzado. Se tomó una primera muestra de biopsia líquida al diagnóstico y entre una y tres muestras más posteriores, dependiendo del paciente.

La nomenclatura seguida para etiquetar las muestras consistió en el número de biopsia líquida (LB) por orden de extracción al paciente y su número de historia. En este trabajo se ha evitado aportar este dato por lo que se ha sustituido por el nombre de la enfermedad y un número del 1 al 10 (p. ej. LB2 PDAC1 corresponde a la segunda muestra de plasma obtenida del paciente 1 de PDAC).

3.1.1. Procesamiento del plasma

Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos EDTA, procesadas y almacenadas por el Biobanco del Instituto de Investigación INCLIVA. Para evitar la degradación del cfDNA, la lisis de las células sanguíneas y la contaminación de las muestras con DNA de tipo salvaje, éstas fueron procesadas en un tiempo inferior a 2 horas. Las muestras de sangre se centrifugaron con el fin de aislar el plasma y congelarlo en alícuotas de 500 μ l a -80°C hasta su utilización.

3.1.2. Purificación de cfDNA

Para la purificación de cfDNA a partir de plasma extraído (Figura 4.), se dejó descongelar el plasma con antelación y se prepararon los reactivos incluidos en el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, 55114), descrito en la literatura como uno de los kits comerciales de mayor rendimiento (Diefenbach et al., 2018). Primero, a cada 4 mL de plasma se le añadieron 400 μ L de Proteinasa K con el fin de degradar las proteínas presentes en la muestra, como nucleasas. Seguidamente se añadió un tampón de lisis y se dejó actuar media hora a 60°C con el fin de liberar los ácidos nucleicos del resto de componentes de las células. A este tampón también se le añadió 1 μ g de carrier RNA, que incrementa el rendimiento del DNA/RNA extraído de muestras analíticas.

A continuación, se añadió el tampón de unión ACB y se transfirió a una columna QIAamp Mini, donde la presión de vacío impulsó la transferencia del lisado por la columna, quedando los ácidos nucleicos circulantes unidos a la membrana de sílice de la columna. Las condiciones de sal y de pH del tampón garantizaron que las proteínas y otros contaminantes, que puedan inhibir la PCR y otras reacciones enzimáticas posteriores, no quedasen retenidos en la membrana QIAamp Mini. Para conseguir la presión de vacío se empleó un colector de vacío (QIAvac 24 Plus con el sistema de conexión QIAvac) y una bomba de vacío capaz de producir un vacío de -800 a -900 mbar (QIAGEN Pump).

Posteriormente se aseguró una completa eliminación de inhibidores de PCR, como cationes divalentes y proteínas, en 3 pasos de lavado (Tampón ACW1, Tampón ACW2, Etanol 96-100%). Tras los lavados, los ácidos nucleicos puros de la membrana de la columna se diluyeron en 75 μ L de tampón de elución AVE.

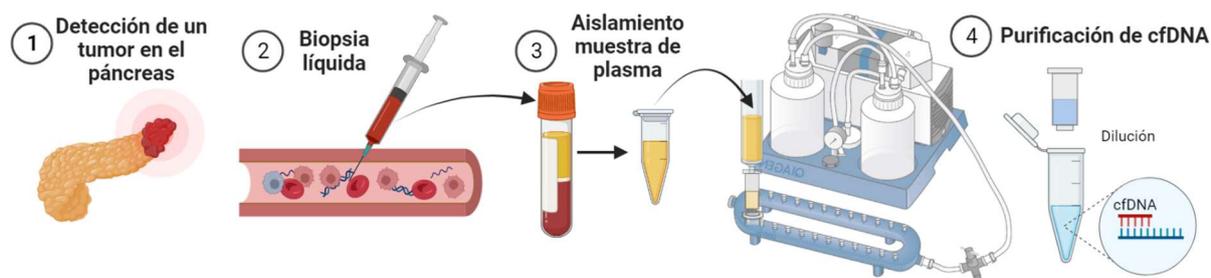


Figura 4. Esquema simplificado de la purificación de cfDNA a partir de biopsia líquida. Creación propia con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

3.1.3. Determinación de la concentración y calidad del cfDNA purificado

La determinación de la concentración y calidad de la extracción fue llevada a cabo por la Unidad de Medicina de Precisión (UMP) de INCLIVA. La concentración de DNA se midió en el fluorómetro Qubit™ dsDNA HS Assay Kit de ThermoFisher, que mide los fluoróforos que se intercalan específicamente entre las bases nitrogenadas de DNA.

También, se determinó la calidad del cfDNA extraído mediante el 4200 TapeStation System de Agilent con el Cell-free DNA ScreenTape Analysis Kit. Es capaz de analizar fragmentos de DNA de entre 50 bp y 800 bp con una sensibilidad de 20 pg/μL, y proporciona una evaluación digital de la concentración, el tamaño y la calidad del cfDNA. La detección de DNA libre de células se comprobó por la presencia en la lectura de un pico sobre 170 pb.

3.1.4. Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)

El cfDNA extraído de las muestras de plasma se analizó mediante la técnica de ddPCR, empleando el QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System de BioRad. Primero, se organizó una plantilla de las muestras a tratar por columnas, incluyendo un control positivo (mutado en KRAS G12/G13) y negativo (agua). Los pasos previos a la PCR se realizaron en condiciones de esterilidad, dentro de una cabina de flujo laminar.

La sensibilidad de esta técnica está muy determinada por la cantidad de DNA de las muestras a amplificar, por lo que para muestras de plasma en las que la concentración de cfDNA es mínima, se opta por añadir indistintamente 8 μL ya que el objetivo final es la detección. El único requisito en este caso fue asegurar una concentración mayor a 0.1 ng/μL y un porcentaje de cfDNA superior al 70%, ya que a niveles inferiores es improbable la detección de mutaciones específicas de baja frecuencia.

Por tanto, para la preparación de la emulsión se mezclaron 8 μL de cada muestra o control con 13 μL de los reactivos en una placa de 96 pocillos de ddPCR. La composición del mix de reactivos se encuentra en la Tabla 3, incluyendo una sonda multiplex de las mutaciones G12/G13 de KRAS, las más comunes en cáncer de páncreas (90%). De esta forma, más tarde, tras la adición del aceite para sondas (9 μL) en la formación de gotas, el volumen para la PCR posterior es de 30 μL totales.

A continuación, se dió un pulso de centrifuga a la placa para terminar de bajar el contenido al fondo del pocillo y se selló a 180°C con una película de termosellado (*Piercable Foil - Heat Seal* [BioRad, 1814040]) por medio del PX1 PCR plate sealer (BioRad, 1814000).

Tabla 3. Reactivos del ddPCR™ KRAS G12/G13 Screening Kit (BIO-RAD) y volumen necesario para realizar la reacción en cadena de la polimerasa digital (ddPCR).

Reactivo	Volumen (1 muestra) → 13 µL
ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)	10 µL
Specific ddPCR probes (Sonda KRAS G12/G13)	2 µL
Agua Ultrapura (Gibco)	1 µL

El equipo empleado fue el QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System de BioRad, utilizando aceite para sondas (BioRad, 1864110) y tantas DG32 Automated Droplet Generator Cartridges (BioRad, 1864108) como columnas a emplear, el doble de columnas de Pipet Tips for the AutoDG™ System (BioRad, 1864120) y la placa con las mezclas de reacción en sus correspondientes secciones.

Tras finalizar el procedimiento, se selló con cuidado la placa de 96 con las emulsiones generadas, situada en un bloque frío, y se llevó a cabo la PCR con el programa para detección de eventos poco frecuentes (Rare Event Detection – RED) (Tabla 4.).

Tabla 4. Esquema del programa de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de eventos poco frecuentes.

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Rampa
1x	95°C	10 min	2°C/s
40x	94°C	30 seg	2°C/s
	55°C	2 min	2°C/s
1x	98°C	10 min	2°C/s
1x	4°C	∞	1°C/s

Una vez finalizado el programa, se colocaron las muestras en el lector de gotas *QX200 reader*, que junto a su software (*QuantaSoft™*) analiza cada gota individualmente utilizando un sistema de detección de dos colores (configurado para detectar FAM y HEX), lo que permite el análisis de diferentes dianas en la misma muestra.

El programa permite determinar manualmente el umbral de detección de mutaciones, por lo que se tomó el control positivo para establecer en qué puntos se podía considerar que una mutación había sido detectada o no. También se comprobó que en los controles negativos no apareciesen falsos positivos.

En la Figura 5 se observan los resultados para el control positivo de la mutación, pudiendo diferenciar claramente las gotas en bloques a partir de dos ejes, el eje x corresponde a la intensidad de tinción de hexaclorofluoresceína (HEX) y el eje y corresponde la intensidad de tinción de 6-carboxifluoresceína (FAM). Por tanto, en azul (FAM) se muestran las gotas que tienen cfDNA alterado por lo que son positivas para KRAS G12/G13; en verde (HEX) las que tienen cfDNA pero sin la mutación; en naranja (HEX+FAM) las que tienen ambos fluoróforos por tener una molécula de cada cfDNA en su interior; y en gris (sin fluoróforo) las que no presentan cfDNA en su interior.

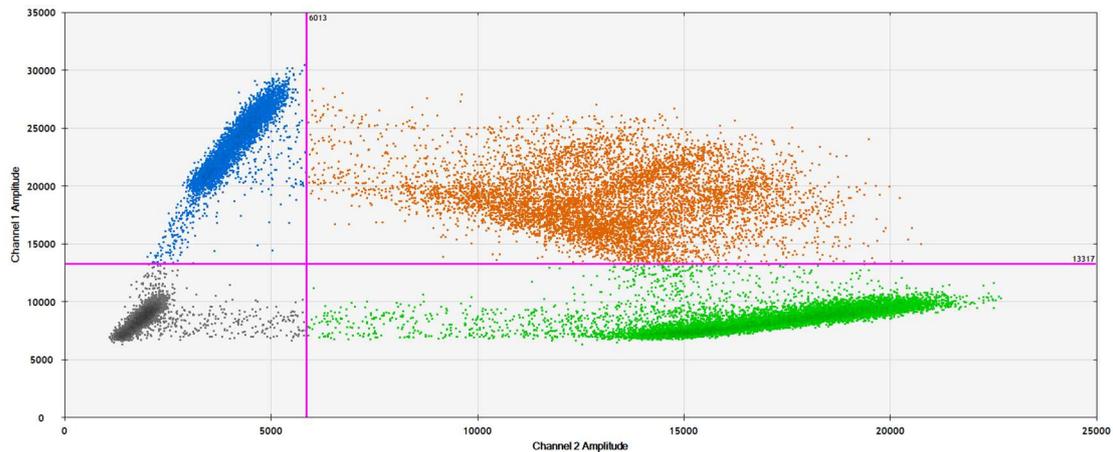


Figura 5. Representación bidimensional de los resultados de la ddPCR para los controles positivos de KRAS G12/G13.

3.2. Establecimiento de un modelo de organoides

3.2.1. Selección de pacientes y recogida de muestras

Para el establecimiento de un modelo de organoides de páncreas, se seleccionaron pacientes diagnosticados con adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV), atendidos por oncólogos del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA.

Los pacientes seleccionados firmaron un documento de consentimiento informado de biobanco que permitió la recogida y procesamiento de muestras biológicas. Así, tras la cirugía, la pieza fue llevada al servicio de Anatomía Patológica, que recogió un pequeño fragmento de 1-2 cm del tumor y otro de la región normal adyacente en tubos de PBS frío.

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

3.2.2. Establecimiento de organoides

Las muestras llegaron al laboratorio, se realizaron lavados con PBS frío y se incubaron 20 min en PBS con antibióticos 2X (Penicilina-Estreptomicina 2%, Primocina 200 µg/mL) a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS estéril, dejando aproximadamente 2 mL tras el último lavado. Los siguientes pasos se realizaron en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar.

Los fragmentos se colocaron en una placa Petri con los 2 ml de PBS restantes del paso anterior y se cortó la muestra con un bisturí para recoger 3 fragmentos en un criotubo y guardar a -80°C. El resto se cortó en fragmentos más pequeños para digerir por disgregación mecánica y digestión enzimática, incubando la muestra con liberasa a una concentración final de 0.3 U/ml (Roche, 05401020001) y DNasa (Sigma, D5025) durante 1 hora a 37°C con pipeteo vigoroso cada 15 min en condiciones de esterilidad.

Tras la disgregación del tejido, se filtró la muestra por un filtro de 70 µm, asegurando una recogida completa con 1 mL de PBS. El filtrado se centrifugó a 500g y a 4°C durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en un volumen de entre 200 - 1000 µL medio basal (MB) en función de su tamaño. Se contó el número de células en una cámara de Neubauer y se sembraron a una densidad de 250 000 células por gota, en 40 µL de BME (R&D, 3533-010-002) al 50% en placas antiadherentes de 24 pocillos (P24W, CellStar, 662102) (Figura 6.).

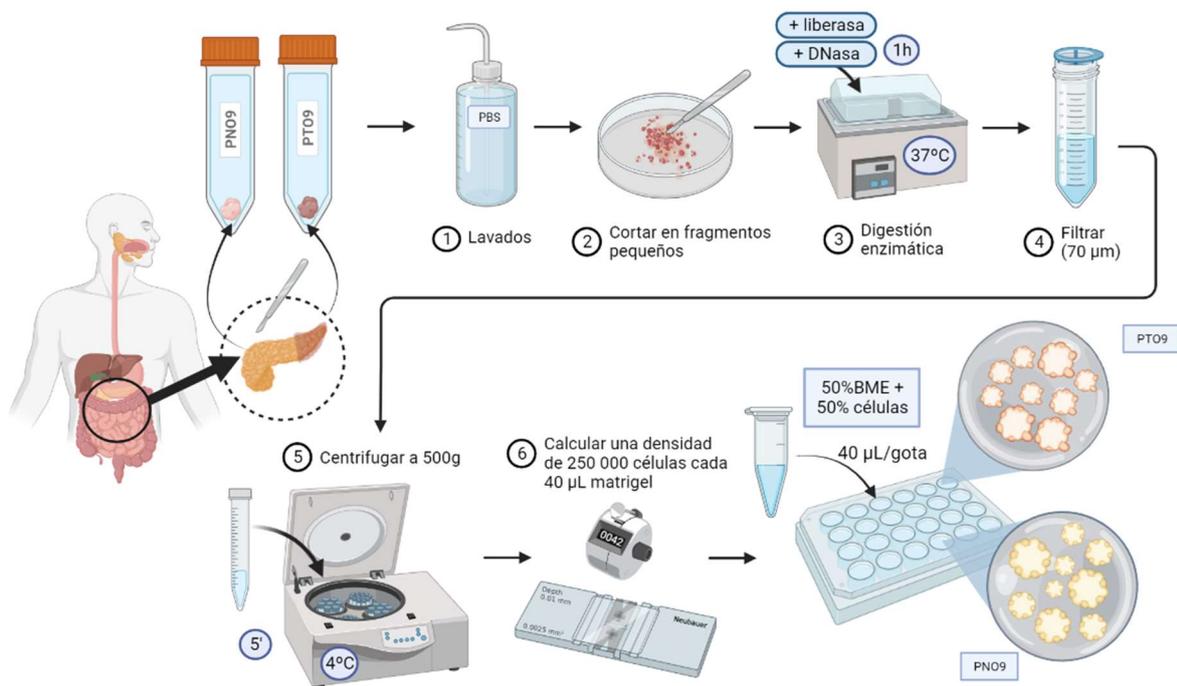


Figura 6. Esquema del procedimiento seguido para el establecimiento de organoides derivados de tejido de páncreas normal y tumoral. Creación propia con [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Las gotas se incubaron durante 25 minutos a 37°C para conseguir su solidificación y se añadieron 500 µL de Medio Completo (MC) para organoides tumorales o 500 µL de medio comercial ST (Intesticult™ Organoid Growth Medium Human, StemCell Technologies, 06010) para los organoides derivados de tejido normal. Con el objetivo de evitar que se produjese la anoikis, una forma de muerte celular programada que ocurre en células epiteliales cuando se desprenden de la matriz extracelular circundante, se suplementó el medio con factor Y-27632 (TOCRIS 1254), un inhibidor de ROCK, a una concentración final de 10 µM. Finalmente, las placas se mantuvieron en un incubador, a 37°C y 5% de CO₂.

3.2.3. Composición de los medios de cultivo

- **Medio Basal (MB):** DMEM/F12 [StemCell, 36254], HEPES 10 mM [Biowest, L0180-100], L-glutamina 2 mM [Biowest, X0551-100], Penicilina-Estreptomicina 1.50% [Biowest, L0018-100], Primocina 150 µg/mL [InvivoGen, ant-pm-1], N2 1X [StemCell, 07152] y B27 1X [Gibco™ 17504044].
- **Medio Completo (MC):** MB suplementado con N-acetyl-L-cysteine (1 mM) [SIGMA A9165-25G], Nicotinamida (10 mM) [SIGMA N0636-500G], EGF (50 ng/mL) [StemCell 78006], Noggin (100 ng/mL) [StemCell 78060], A-8301 (0,5 µM) [TOCRIS 2939], SB202190 (10 µM) [TOCRIS 1264], gastrin (10 nM) [TOCRIS 3006], R-Spondin1 (500 ng/mL) [StemCell 78213.1], FGF-10 (10 ng/mL) [StemCell 78037.2] and PGE2 (10 nM) [TOCRIS 2296].
- **Medio StemCell (ST):** Intesticult™ Organoid Growth Medium Human [StemCell Technologies 06010] suplementado con Penicilina-Estreptomicina 1.50% [Biowest, L0018-100] y Primocina 150 µg/mL [InvivoGen, ant-pm-1].

3.2.4. Nomenclatura de organoides

Los organoides derivados de tumores de cáncer de páncreas reciben el nombre de PTO (*Pancreas Tumor Organoid*) y los que derivan de tumores metastásicos mPTO (*metastatic Pancreas Tumor Organoid*). En cambio, los que proceden de una muestra de páncreas no tumoral se denominan PNO (*Pancreas Normal Organoid*). Según el orden de llegada, para cada paciente se le asigna un número al final.

3.2.5. Seguimiento y monitorización de organoides

Una vez establecidos los organoides, se realizó el seguimiento cada 2-3 días al microscopio óptico, en el que se decidió según su evolución si cambiar el medio o realizar un pase. Esta decisión fue tomada en base al aspecto de la gota y de la morfología de los organoides, la densidad, la supervivencia y posibles signos de contaminación.

3.2.6. Pase y ampliación del cultivo de organoides

El pase de un organoide se realizó generalmente cuando la densidad de los organoides era muy alta en la gota y estos empezaban a presentar signos de muerte celular. Para ello, se quitó el medio, se deshizo la gota con PBS frío y se recogió en un tubo aparte. Se llevó a cabo una centrifugación a 500g durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante para añadir 200 µL de tripsina (TrypLE™ Express Enzyme (1X)) y se dejó actuar durante 5-6 minutos.

La tripsina fue inactivada con 1 mL de medio basal frío (MB) para parar la digestión enzimática y se centrifugó a 500g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se plaquearon las células con MB y BME al 50% en placas P24W, siguiendo los mismos pasos del protocolo de establecimiento de organoides.

3.2.7. Criopreservación de organoides y descongelación

Para congelar organoides se siguió un procedimiento sencillo que consistió en retirar el medio del pocillo y deshacer la gota con PBS frío para centrifugarla en un tubo aparte a 500g durante 5 minutos a 4°C. Después de descartar el sobrenadante se añadieron entre 500 y 1000 µL de medio de congelación Bambanker (Nippon Genetics Europe BB02) según la densidad de organoides en el pocillo y se transfirió a un criotubo. Los criotubos fueron almacenados en un CoolCell (-1°C/min) durante 24 h en un congelador de -80°C. Pasado ese tiempo las muestras se trasladaron a un tanque de nitrógeno en el Biobanco de INCLIVA.

Para recuperar un organoide ya criopreservado, se descongeló el criotubo parcialmente a 37°C y su contenido se transfirió a un tubo con 3 mL de Medio Basal (MB) frío. Tras mezclar por inversión, se centrifugó a 500g y a 4°C durante 5 minutos, y se plaqueó siguiendo el mismo procedimiento que en el establecimiento de organoides, mezclando el mismo volumen de células con MB que BME.

3.2.8. Caracterización morfológica de los organoides

Inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina

Cuando se observó que los organoides presentaban un buen tamaño, se les retiró el medio, se recogió el domo de Matrigel con 500 µL de PBS y se reservaron en un falcon de 50mL. Se centrifugaron a 500g y a 4°C durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió formaldehído 4% a 4°C durante 45 minutos. Una vez pasado el tiempo se volvió a centrifugar para retirar el sobrenadante y se resuspendió con 4-5 gotas de histogel [Thermo Scientific, HG-4000-012] precalentado en un termobloque para que estuviese líquido.

Tras otra centrifugación y descartar el sobrenadante, se colocó el bloque con el sedimento de organoides con forma de cono del fondo del falcon en un cassette de histología. El cassette fue introducido en formol y el servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina lo introdujo en un procesador de tejidos automático (LEICA ASP6025), que deshidrató la muestra tratándola en el siguiente orden: formol, alcohol 50°, alcohol 70°, alcohol 90°, 2x alcohol 100°, xilol (que enjuaga el alcohol) y parafina (toda la noche).

Al día siguiente el servicio de Anatomía Patológica cortó los bloques de parafina con un microtomo a un grosor de 3 µm y los montó en un portaobjetos que se dejó secar a 37°C durante toda la noche para poder teñir al día siguiente. La desparafinación y tinción H&E (Hematoxilina: Dako, CS700; Eosina: Dako, CS701), se realizó de forma automática en el equipo PT Link (Dako, PT10126) por el mismo servicio.

3.2.9. Ensayos de sensibilidad de fármacos en organoides

Se estimó un número aproximado de pocillos de la placa P24W necesarios para tener suficientes células y poder así plaquear un ensayo de sensibilidad a fármacos completo (entre 2 y 3 pocillos de organoides a elevada densidad). Se retiró el medio y se deshizo la gota con PBS frío para luego recoger y centrifugar a 500g durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, se añadieron 300 µL de tripsina y se dejó actuar hasta llegar a célula única, durante 12 minutos. La tripsina fue inactivada con 1 mL de medio basal frío (MB) y se centrifugó a 500g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en MB frío.

A continuación, se contó el número de células en una cámara de Neubauer y se calculó el volumen necesario para plaquear 3000 células por pocillo. Se sembraron gotas de 5 µL de BME 50% en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (P96W) de fondo cóncavo anti-adherente (SARSTEDT, 83.3925500). Tras 10 minutos de incubación a 37°C para solidificar el BME, se añadieron 100 µL de medio de cultivo atemperado suplementado con Y-27632.

La placa permaneció durante 48 horas en incubación (37°C, 5% CO₂), hasta comprobar que se formaban organoides. Entonces, se retiró el medio y se añadieron 100 µL de medio de cultivo atemperado suplementado con el fármaco de estudio a 5 concentraciones diferentes y por triplicado (réplicas técnicas). Simultáneamente se realizaron al menos tres controles negativos por placa, tratándolos con medio MC suplementado o no con DMSO (en base al diluyente de los fármacos del ensayo).

Al cabo de 120 horas con el fármaco, se finalizó el ensayo y se evaluó la viabilidad con el kit de CellTiterGlo 3D (Promega, G7570) que cuantifica el ATP presente, un indicador de las células metabólicamente activas. La adición y mezcla del reactivo con el cultivo da lugar a la lisis celular y a la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La placa se mantuvo 30 minutos en oscuridad y se midió la señal utilizando el equipo Fluoroskan Ascent FL (ThermoScientific).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. **OBJETIVO 1: Obtención de biopsias líquidas y extracción del cfDNA del plasma de pacientes con cáncer de páncreas.**

Las muestras de sangre de 10 pacientes con PDAC localmente avanzado fueron recogidas, procesadas y almacenadas por el Biobanco del Instituto de Investigación INCLIVA. Se obtuvieron muestras al diagnóstico de la enfermedad y en los meses posteriores: durante y después del tratamiento neoadyuvante con FOLFIRINOX.

En el caso de los pacientes que respondieron al tratamiento y se operaron del tumor, se realizaron extracciones en el primer TAC, antes de la cirugía y semanas después. En cambio, para los pacientes que progresaron, las muestras se corresponden a los diferentes TACs que se realizaron durante y después del tratamiento. En total se obtuvieron 38 muestras, cuyas fechas de extracción aparecen indicadas en la Tabla 5 para los pacientes que se sometieron a una cirugía con intención curativa y en la Tabla 6 para los que no.

Tabla 5. Fechas de las extracciones de biopsia líquida (LB) a los pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) que respondieron al tratamiento neoadyuvante. El orden de las fechas corresponde al diagnóstico, al primer TAC (tomografía axial computarizada) durante el tratamiento, al momento previo a la cirugía (PreQx) y a la post-cirugía (PostQx).

		PDAC 1	PDAC 2	PDAC 3	PDAC 4	PDAC 5
LB1	Diagnóstico	5/12/2017	28/5/2018	8/3/2019	20/5/2019	5/7/2019
LB2	Primer TAC	26/2/2018	16/7/2018	24/4/2019	19/8/2019	16/9/2019
LB3	PreQx	24/4/2018	11/12/2018	4/7/2019	14/1/2020	20/12/2019
LB4	PostQx	18/6/2018	11/2/2019	7/8/2019	14/2/2020	24/1/2020

Tabla 6. Fechas de las extracciones de biopsia líquida (LB) a los pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) que no respondieron al tratamiento neoadyuvante. El orden de las fechas corresponde al diagnóstico y a las tomas posteriores coincidentes con otras pruebas de imagen como TACs (tomografía axial computarizada).

		PDAC 6	PDAC 7	PDAC 8	PDAC 9	PDAC 10
LB1	Diagnóstico	2/5/2017	24/11/2017	4/3/2019	24/7/2019	12/6/2020
LB2	Primer TAC	26/6/2017	20/3/2018	27/5/2019	17/9/2019	10/8/2020
	Recaída		-	-	-	-
LB3	Tercer TAC	-	31/5/2018	-	-	-
	Recaída	-	-	12/8/2020	12/6/2020	10/2/2021

Para la extracción de cfDNA se emplearon 4 mL de cada muestra de plasma y se siguió el procedimiento de purificación descrito en el apartado de *Materiales y Métodos*. Una vez purificadas, las muestras de cfDNA se reservaron a -20°C para posteriormente ser llevadas a la UMP para valorar la calidad de la extracción.

En la UMP se midió un promedio de 0.93 ng/μL por muestra, basado en concentraciones de entre 0.21 y 3.53 ng/μL, demostrando una correcta extracción ya que el cfDNA se suele encontrar a concentraciones muy bajas (Tabla 7).

En cuanto a la calidad de las muestras, se obtuvo un porcentaje medio de cfDNA (%cfDNA) de un 88.7%, de entre 80.76% y 95.93%. Este valor refleja el porcentaje de subcomponentes de cfDNA, que están presentes en la región preestablecida entre 50 y 700 pb, en relación con el DNA total de la muestra. Dentro de estos límites quedan excluidos los fragmentos de DNA genómico de bajo o alto peso molecular que puedan contaminar la muestra. Por tanto, al tener una calidad mayor del 80% se consideró que todas las extracciones habían sido realizadas correctamente.

En la figura generada por el Software del 4200 TapeStation System (Agilent) para una de las muestras se observa un pico a una longitud de alrededor de 170 pb, que representa los fragmentos de DNA mononucleosomal (Figura 7.). Los fragmentos de DNA menos abundantes son multímeros de nucleosomas, de mayor tamaño.

Tabla 7. Concentración de DNA libre circulante (cfDNA) extraído de muestras de plasma detectado por fluorimetría y estimación de su calidad por 4200 TapeStation System. Las muestras están nombradas según el orden de extracción de biopsia líquida (LB) al paciente con adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) y el número asignado al paciente en cuestión (del 1 al 10).

Muestras	Concentración cfDNA (ng/μL)	Calidad (%)	Muestras	Concentración cfDNA (ng/μL)	Calidad (%)	Muestras	Concentración cfDNA (ng/μL)	Calidad (%)
LB1 PDAC 1	1,75	92,71	LB1 PDAC 4	0,71	80,76	LB3 PDAC 7	0,35	90,69
LB2 PDAC 1	1,89	95,45	LB2 PDAC 4	1,71	90,95	LB1 PDAC 8	0,24	85,21
LB3 PDAC 1	1,48	93,09	LB3 PDAC 4	1,47	95,93	LB2 PDAC 8	1,14	88,94
LB4 PDAC 1	0,44	86,87	LB4 PDAC 4	0,77	92,83	LB3 PDAC 8	0,34	81,8
LB1 PDAC 2	0,45	90,07	LB1 PDAC 5	1,22	92,08	LB1 PDAC 9	0,19	80,9
LB2 PDAC 2	0,39	87	LB2 PDAC 5	0,84	86,42	LB2 PDAC 9	0,27	87,86
LB3 PDAC 2	0,67	89,49	LB3 PDAC 5	0,56	86,89	LB3 PDAC 9	0,21	85,47
LB4 PDAC 2	0,88	87,72	LB4 PDAC 5	0,50	89,13	LB1 PDAC 10	0,58	85,78
LB1 PDAC 3	0,36	84,31	LB1 PDAC 6	2,53	95,26	LB2 PDAC 10	1,89	94,05
LB2 PDAC 3	0,78	91,51	LB2 PDAC 6	3,53	93,44	LB3 PDAC 10	1,27	89,3
LB3 PDAC 3	0,74	85,96	LB1 PDAC 7	0,30	83,76			
LB4 PDAC 3	0,48	83,74	LB2 PDAC 7	0,64	90,02			

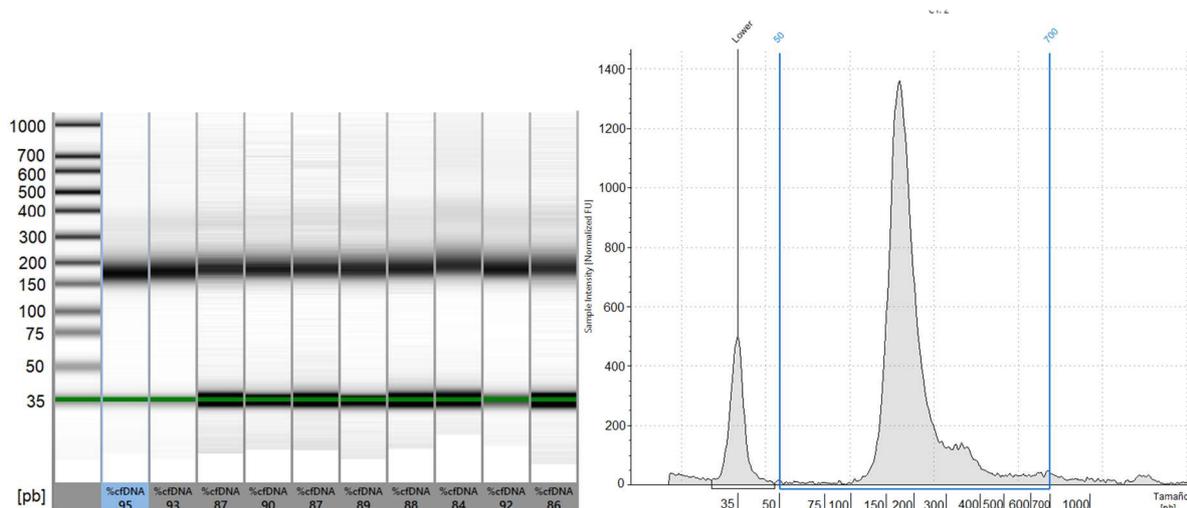


Figura 7. Resultados del análisis de calidad de DNA libre circulante (cfDNA) por 4200 TapeStation System de algunas de las muestras. A la derecha se muestra como ejemplo el electroferograma de una de las muestras, dónde la región marcada entre 50 y 700 pb incluye los fragmentos que componen el cfDNA. El pico observado entre 150 y 200 pb representa los fragmentos de DNA mononucleosomal.

4.2. OBJETIVO 2: Monitorización de la respuesta al tratamiento neoadyuvante en el plasma de los pacientes a través de PCR digital.

Los pacientes con PDAC seleccionados para el estudio de monitorización de respuesta al tratamiento neoadyuvante recibieron FOLFIRINOX bisemanal. Los diez pacientes estudiados que fueron diagnosticados entre mayo de 2017 y junio de 2020 recibieron el tratamiento en el Hospital Clínico Universitario de Valencia y solo la mitad de ellos pudieron ser sometidos a cirugía con intención curativa. En la Tabla 8 están descritas las características de los pacientes al diagnóstico y el porcentaje de recidiva.

Tabla 8. Características de los pacientes seleccionados con cáncer de páncreas.

Edad media en el diagnóstico		55,4 años (rango entre 39 y 72)
Sexo		Masculino (60%) y femenino (40%)
Localización del tumor en el páncreas		Cabeza (70%) y cuerpo (30%)
Estadío clínico en el diagnóstico		IIA (30%), IIB (50%) y III (20%)
cTNM	Tamaño del tumor (0-4)	3 (80%) y 4 (20%)
	Afectación ganglios linfáticos regionales	No se puede determinar (50%), no presenta (40%) y presenta (10%)
	Metástasis distante	No se ha diseminado (100%)
Respuesta al tratamiento		No progresaron (50%) y progresaron (50%)

El ctDNA fue aislado del plasma de los pacientes y tras verificar que se cumplían los requisitos de calidad y concentración se pudo realizar la ddPCR. Se obtuvo una media de 18 044 eventos totales de gotas por muestra, en concordancia con la cantidad aproximada de 20 000 gotas que se debería esperar según el fabricante. Asimismo, Bio-Rad especifica un mínimo de 10 000 gotas para que el ensayo pueda aceptarse, por lo que ninguna muestra fue descartada y los resultados se graficaron con el Software QuantaSoft™ de BioRad (Figura 8.).

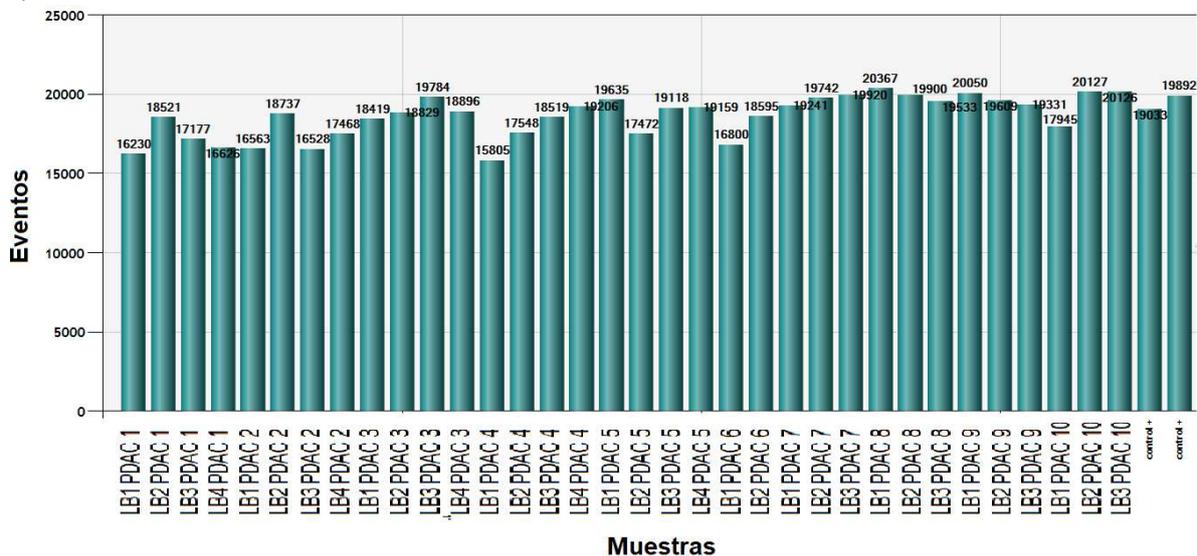


Figura 8. Representación del número total de gotas analizadas (eventos) por muestra de plasma en la *digital droplet Polymerase Chain Reaction* (ddPCR). Las muestras están nombradas según el orden de extracción de biopsia líquida (LB) al paciente con adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) y el número asignado al paciente en cuestión (del 1 al 10).

En base al umbral determinado a partir de los controles positivos, se representaron los resultados del estado mutacional de KRAS en el plasma de los pacientes (Figura 9.).

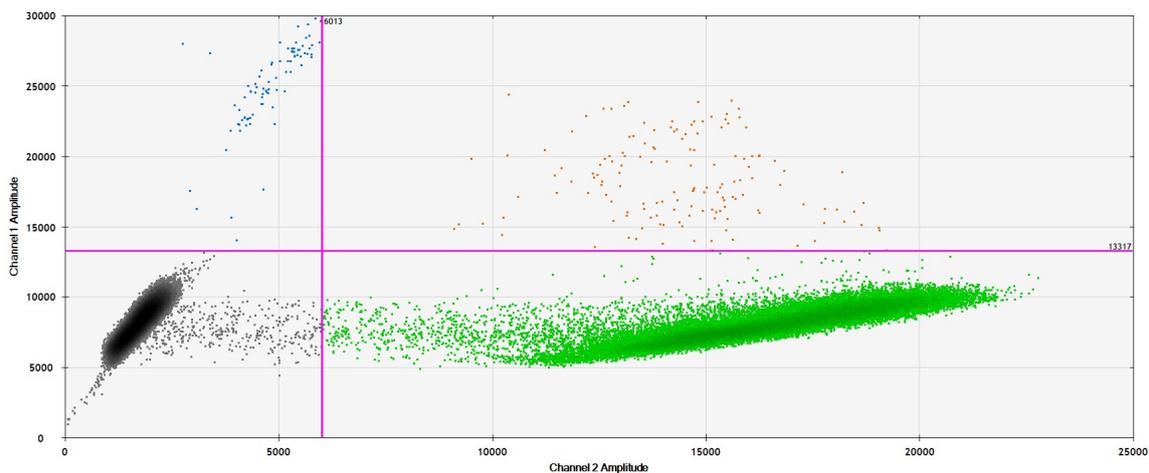


Figura 9. Representación bidimensional de los resultados de la ddPCR para la detección de KRAS en las muestras de biopsia líquida. Cada eje corresponde a la intensidad de tinción de cada fluoróforo, el eje y a FAM y el eje x a HEX. Por tanto, se representa en azul (FAM) las gotas que tienen cfDNA alterado; en verde (HEX) las que tienen cfDNA sin la mutación; en naranja (HEX+FAM) las que tienen ambos fluoróforos; y en gris (sin fluoróforo) las que no presentan cfDNA.

Con el objetivo de estudiar la utilidad de la detección de KRAS mutado en plasma y su asociación con el marcador tumoral CA 19.9 en la monitorización de la enfermedad, se estudió la evolución de los niveles de ambos durante el tratamiento neoadyuvante (Hussung et al., 2021). Por un lado, los datos obtenidos del estado mutacional de KRAS se representaron mediante la abundancia fraccional, es decir, la frecuencia porcentual del cfDNA mutante sobre el total de cfDNA, mutante y salvaje. En cuanto a los valores de CA 19.9, se consideró un valor sérico ≥ 37 U/mL como elevado, valor de referencia establecido por otros estudios al no ser un marcador tumoral específico (Ortiz Higuera et al., 2011).

4.2.1. Respuesta al tratamiento neoadyuvante

En la figura 10 aparecen representados los pacientes en los que no se objetivó progresión radiológica, y que, por tanto, se sometieron a cirugía con intención curativa. En ellos se observa una disminución progresiva de la abundancia fraccional de KRAS mutado y del nivel de CA 19.9 durante el tratamiento relacionado con la respuesta al tratamiento neoadyuvante. Hay que concretar que en el *paciente 4* no se monitorizó el nivel de CA 19.9 porque se le detectó antígeno de Lewis en sangre. Se sabe que éste influye en los niveles del marcador, haciéndolo inefectivo para el seguimiento de la enfermedad (Ortiz Higuera et al., 2011; Prieto de Paula et al., 2013).

Tras la cirugía no se detectó KRAS mutado y los niveles de CA 19.9 permanecieron normales para los *pacientes 1, 2, 4 y 5*. Sin embargo, sólo los *pacientes 1 y 2* continúan en seguimiento sin recaída de la enfermedad. Contrastando con los *pacientes 4 y 5* que recayeron, donde probablemente la carga tumoral era baja tras la cirugía y no se pudo detectar KRAS mutado. En consecuencia, se debe resaltar la importancia de la monitorización del ctDNA tras cirugía para la detección de enfermedad mínima residual (EMR) y la realización de un muestreo seriado de plasma durante el seguimiento o tratamiento adyuvante de los pacientes.

Por otro lado, en el caso del *paciente 3* se observa que, a pesar de la disminución de los niveles séricos de CA 19.9, se da una relevante elevación de la mutación en KRAS tras la cirugía siendo indicativo de EMR. Resaltar que el *paciente 3* recae a los 6 meses de la cirugía a pesar de recibir tratamiento adyuvante. Este efecto observado en la bibliografía informa que el análisis del ctDNA se adelanta a la recaída radiológica con una mediana de 9 meses (Henriksen et al., 2022). Esto genera nuevas hipótesis como la de suspender el tratamiento y hacer un cambio de terapia sólo con progresión del ctDNA sin evidenciar progresión radiológica.

Asimismo, cabe resaltar que en los *pacientes 2, 3, 4 y 5* no se detecta KRAS mutado al diagnóstico y sí en la 2ª toma durante el tratamiento. Una posible explicación podría ser que haya habido un enriquecimiento de células tumorales resistentes por presión selectiva del tratamiento. Sin embargo, dado que un 90% de los pacientes con PDAC presentan mutaciones en KRAS, su ausencia en el diagnóstico parece ser un indicativo de falso negativo probablemente debido a la dilución del ctDNA. Por ello, no se deben olvidar las limitaciones actuales de la biopsia líquida que requiere de una mayor sensibilidad para su implementación en la práctica clínica.

Haciendo una comparativa de los dos marcadores tumorales evaluados, se puede decir que su combinación aporta información complementaria sobre el tumor y resulta más útil que su estudio individual. Salvo en el caso del *paciente 4* en el que no se pudo monitorizar CA 19.9, en el resto de los pacientes se detectaron niveles elevados de este marcador al diagnóstico y se vieron disminuidos después del tratamiento. No obstante, en el caso de los *pacientes 3* y *5*, su disminución no está relacionada con una respuesta al tratamiento, hecho que expone falta de precisión en el límite establecido como elevado (≥ 37 U/mL).

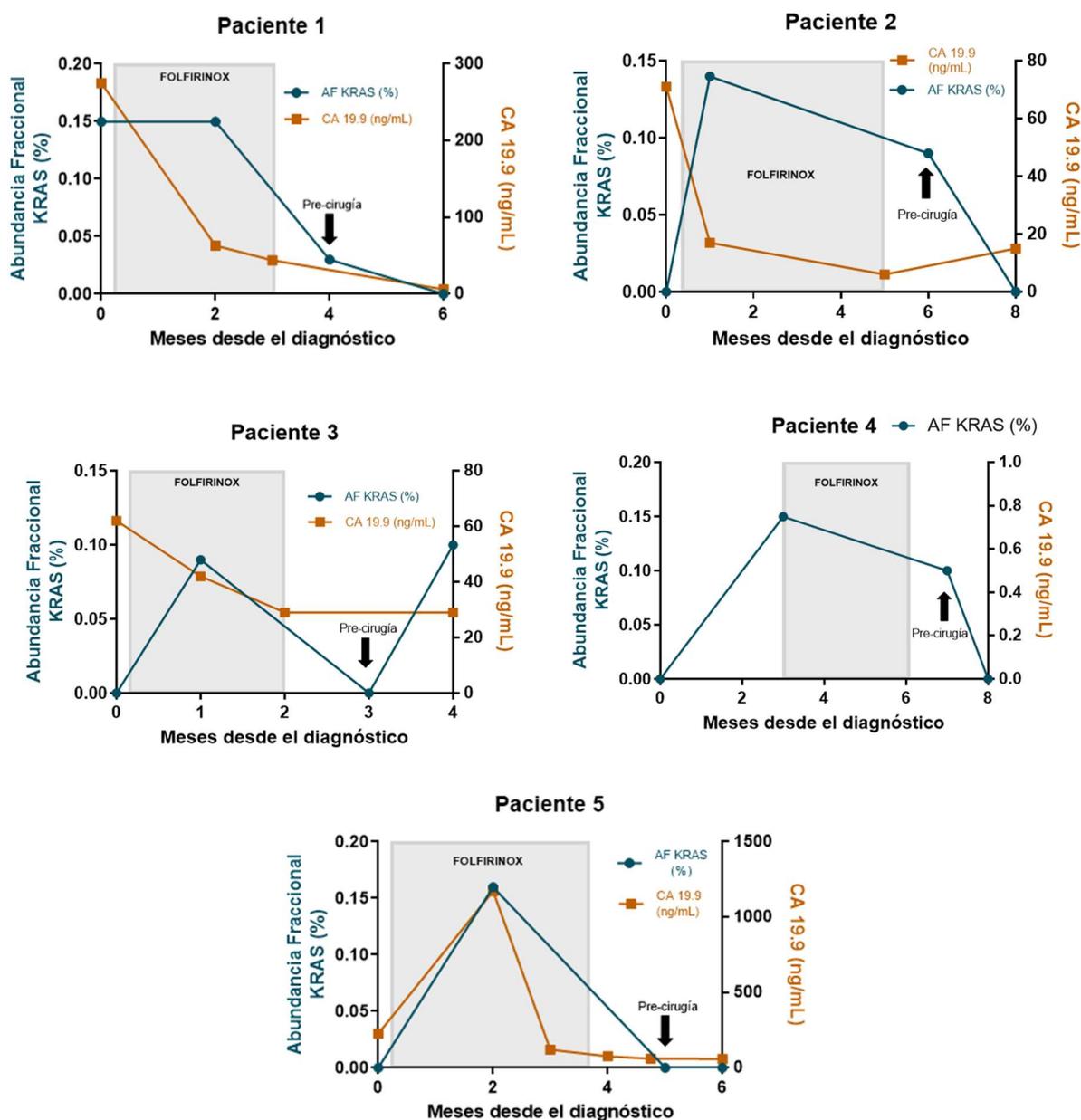


Figura 10. Evolución del porcentaje de abundancia fraccional de KRAS (azul) y el nivel sérico de CA 19.9 (naranja) en pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal después del diagnóstico. Todos los pacientes recibieron tratamiento neoadyuvante con FOLFIRINOX. Los niveles séricos de CA 19.9 se miden según su concentración en sangre periférica (ng/mL) y la abundancia fraccional es la frecuencia porcentual del cfDNA mutante sobre el total de cfDNA, mutante y salvaje.

4.2.2. Progresión al tratamiento neoadyuvante

En la Figura 11 se han representado los otros 5 pacientes de estudio, los cuales progresaron al tratamiento neoadyuvante. A excepción del *paciente 10*, en todos ellos se objetivó un aumento progresivo de KRAS en el ctDNA durante el tratamiento, siendo indicativo de progresión de enfermedad. Se confirmó con progresión radiológica y los pacientes no pudieron someterse a cirugía.

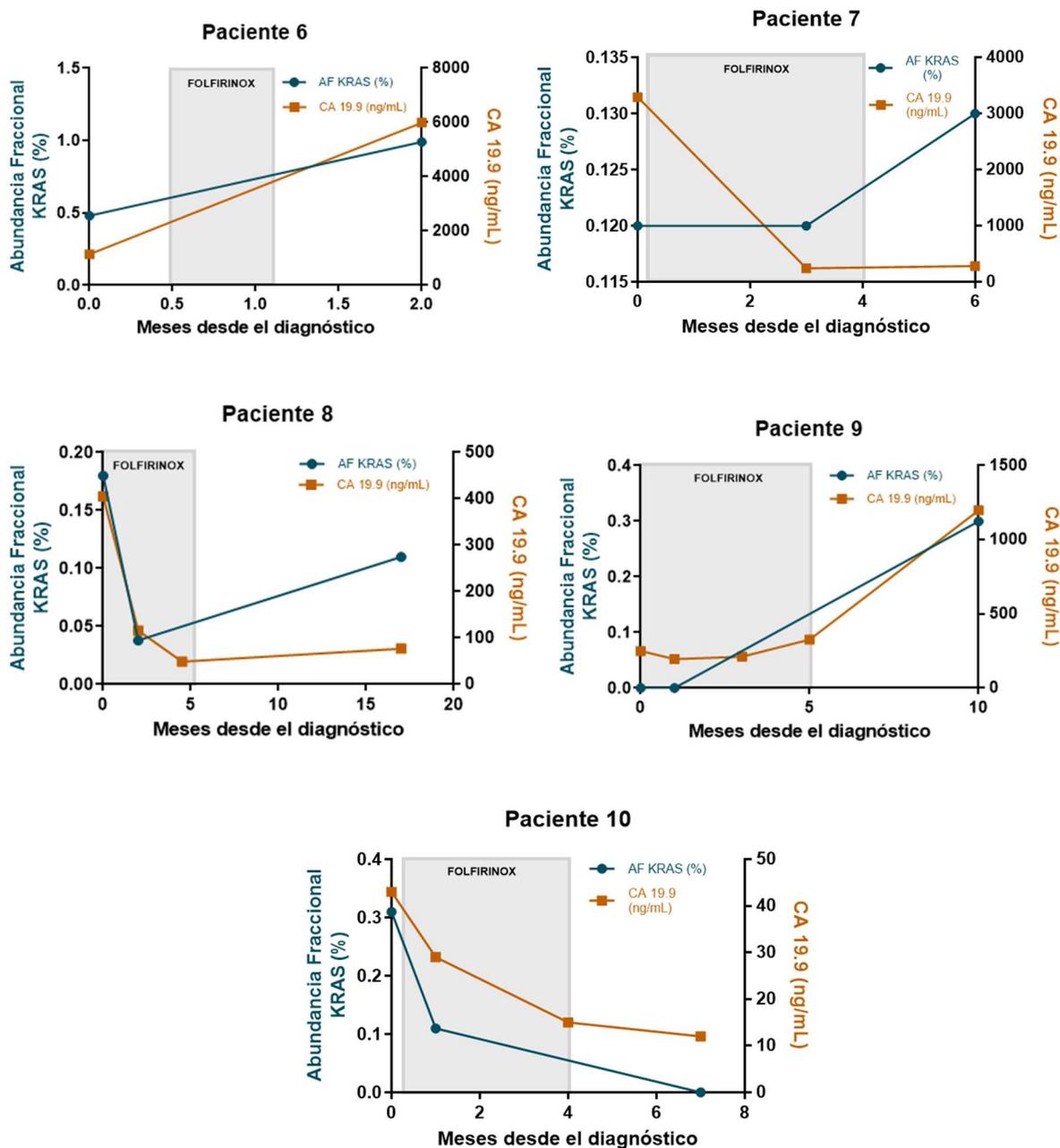


Figura 11. Evolución del porcentaje de abundancia fraccional de KRAS (azul) y el nivel sérico de CA 19.9 (naranja) en pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal después del diagnóstico. Todos los pacientes recibieron tratamiento neoadyuvante con FOLFIRINOX. Los niveles séricos de CA 19.9 se miden según su concentración en sangre periférica (ng/mL) y la abundancia fraccional es la frecuencia porcentual del ctDNA mutante sobre el total de ctDNA, mutante y salvaje.

En los pacientes de estudio, se observa cierta discordancia en los niveles de CA 19.9. Concretamente, en los *pacientes 7 y 8*, en los que se evidencia progresión durante el tratamiento, se observa un aumento progresivo de KRAS y una disminución de los niveles CA 19.9. Esto justifica la necesidad de un nuevo biomarcador, como es el análisis del ctDNA para mejorar la sensibilidad del estándar en el seguimiento de la enfermedad.

Asimismo, el paciente 10, que progresa a nivel radiológico durante el tratamiento, presenta una disminución tanto de KRAS como de los niveles CA 19.9 durante la terapia. Una vez más poniendo en evidencia, por un lado, al marcador CA 19.9 para monitorizar la enfermedad y, por otro, las limitaciones de la biopsia líquida a pesar del concepto altamente atractivo.

En resumen, los datos presentados de estos 10 pacientes diagnosticados de PDAC (los 5 que progresaron y los 5 que no) muestran que la monitorización de KRAS en el plasma podría ayudar a evaluar la respuesta al tratamiento seleccionando aquellos pacientes que responden a FOLFIRINOX. Sin embargo, quedan en evidencia las limitaciones con *falsos negativos*, por lo que se necesitan técnicas y ensayos más sensibles para mejorar su aplicación y traslación a la clínica.

Por otro lado, los niveles del CA 19.9, considerado el *gold* estándar en estos pacientes, no parecen discernir con precisión los pacientes respondedores planteando la necesidad de nuevos biomarcadores en este contexto.

4.3. **OBJETIVO 3:** Establecimiento, seguimiento y caracterización de un modelo de organoides derivado de pacientes con cáncer de páncreas.

El modelo de organoides que se estableció fue a partir de un paciente con un tumor de páncreas resecable al que se le practicó una pancreatectomía parcial y se le extrajo la parte ductal del páncreas junto con el bazo (Figura 12). El paciente firmó el documento de consentimiento informado, por lo que el Servicio de Anatomía Patológica del HCUV tomó una muestra de tejido tumoral para ser llevada inmediatamente al laboratorio.

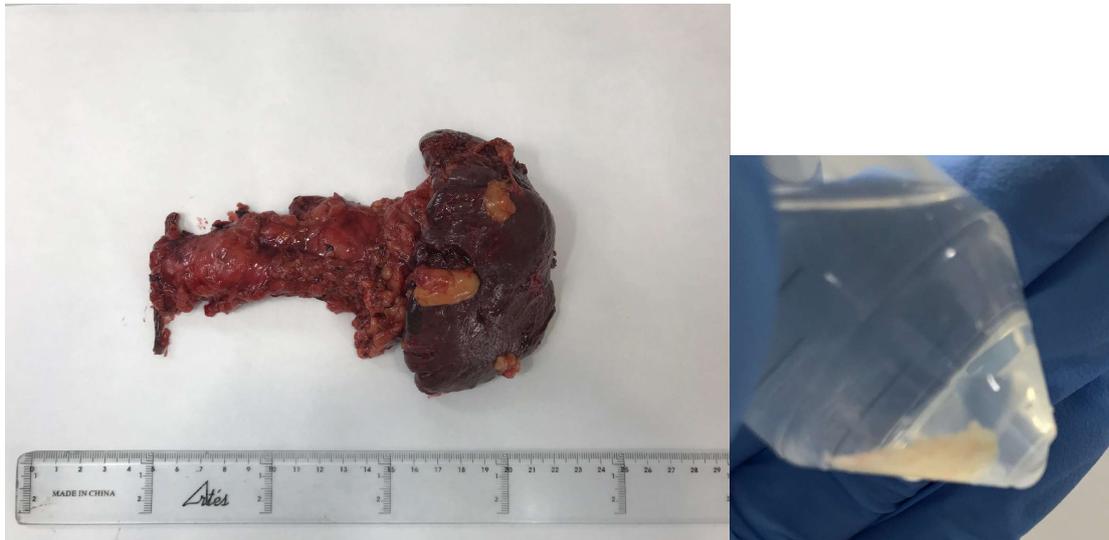


Figura 12. Pieza de páncreas unida al bazo (izquierda). Fragmento de 1-2 cm del tumor situado en el páncreas recogido por el servicio de Anatomía Patológica (derecha).

En el laboratorio se realizó el establecimiento de los organoides a partir de la muestra mediante el protocolo descrito en *Materiales y Métodos*. Siguiendo la nomenclatura descrita, se generó la línea de organoides tumorales derivados de páncreas PTO 18.

El medio de cultivo empleado fue MC, que contiene los factores necesarios para favorecer la proliferación de los organoides al estimular vías de crecimiento de tumores. Este medio fue diseñado por el grupo de investigación y su composición está descrita en el apartado de *Materiales y métodos*.

En la Figura 13 se observa el estado de los organoides en los pases 0 y 1. Pocos días después del establecimiento se observaba mucha debris pero se empezaron a distinguir algunas esferas pequeñas que podían dar lugar a organoides. El seguimiento de su evolución se realizó cada 3 días y se les cambió el medio hasta que se decidió hacer un pase para eliminar las células muertas y que los organoides tuvieran más espacio para seguir creciendo. Con cada pase que se realizó se fue ampliando el número de pocillos y, por tanto, la reserva de organoides para realizar experimentos de secuenciación o cribado de fármacos.

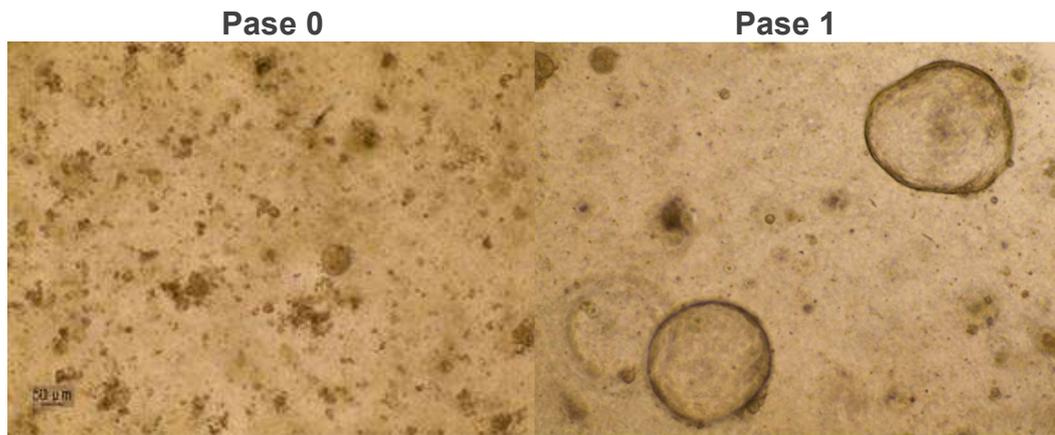


Figura 13. Organoides de páncreas (PTO 18) vistos al microscopio óptico (EVOS XL, AMEX1200) a 10X. A la izquierda se muestran los organoides seis días después de su establecimiento, en pase 0. A la derecha se muestran los organoides al mes siguiente, en pase 1. Barra de escala: 50 µm.

En este proyecto también se llevó a cabo el seguimiento de otra línea derivada de una muestra tumoral de páncreas establecida anteriormente por otro investigador, el PTO 9 (16/10/2020). Esta línea de organoides provenía de un pequeño tumor en el cuerpo del páncreas de un paciente y que fue resecado pasado el mes y medio del diagnóstico.

Esta línea llevaba varios pases y presentaba una buena tasa de crecimiento desde el principio, por lo que se pudo someter a varios ensayos de fármacos. Al igual que con la otra línea, se hizo un seguimiento rutinario de su evolución cada tres días. En la Figura 14 se puede observar el crecimiento de los organoides tras realizar el pase número 11, hay un notable aumento en la densidad y un pequeño incremento en tamaño de los más grandes.

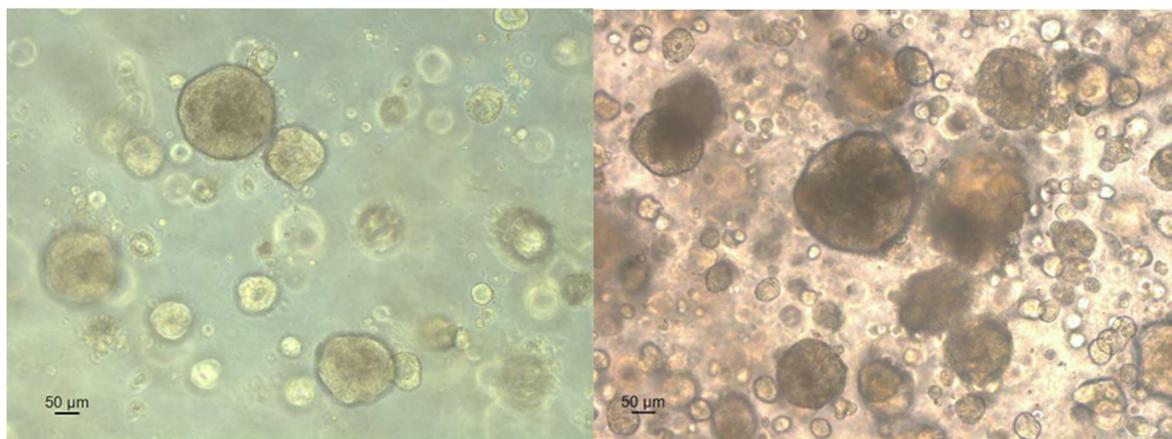


Figura 14. Organoides de páncreas (PTO 9) vistos al microscopio óptico (Leica, DMI1) a 10X. A la izquierda se muestra una captura del PTO 9 dos días después de realizar el pase 11. En la captura de la derecha se observan los mismos organoides 7 días después del pase, es decir, habiendo cambiado el medio dos veces (cada 2 días).

Caracterización morfológica

Con el fin de analizar la estructura de los organoides tumorales, se caracterizó morfológicamente la línea de PTO 9 mediante H&E (Figura 15.). Esta tinción hace posible la observación de la estructura de los organoides ya que la hematoxilina tiñe el núcleo de azul y la eosina tiñe el citoplasma de rosa. Algunos presentan una estructura quística con un lumen central grande rodeado de una capa fina de células epiteliales cuboidales. Otros, presentan un aspecto más denso al sobreponerse varias capas de células epiteliales rodeando un lumen más pequeño.

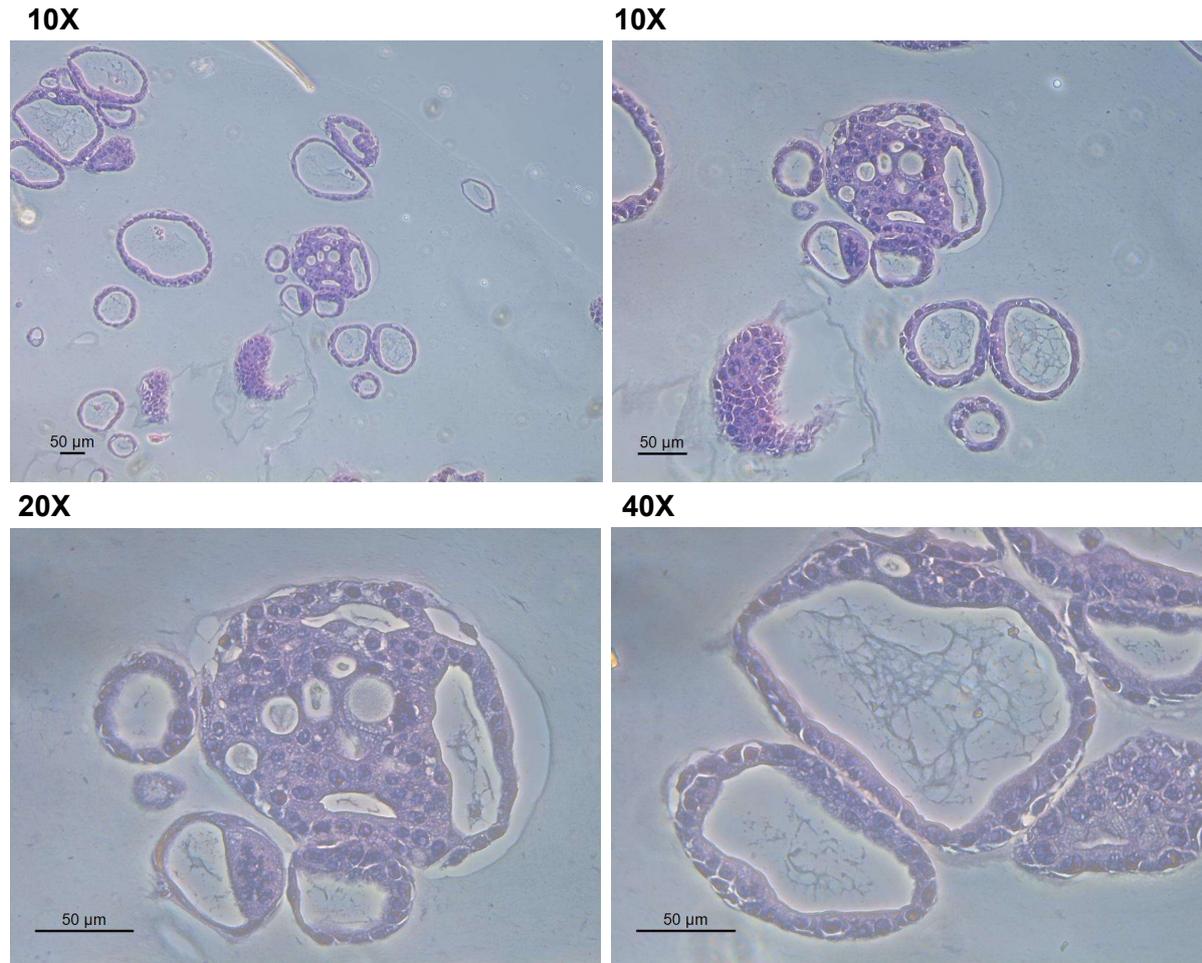


Figura 15. Tinción con H&E del PTO 9. Imágenes tomadas en el microscopio óptico (Leica, DMD108) a 10, 20 y 40 aumentos. Barra de escala: 50 μm.

4.4. **OBJETIVO 4: Cribado de los efectos de los fármacos en organoides a partir de las alteraciones moleculares detectadas.**

Como ya se ha comentado anteriormente, los organoides se presentan como un modelo preclínico en cáncer con un amplio potencial para predecir la respuesta de un paciente concreto a diferentes tratamientos farmacológicos. Por ello, en este proyecto se realizaron ensayos de fármacos sobre el PTO 9, una línea que presentaba una buena tasa de crecimiento y cuyas alteraciones moleculares ya habían sido descritas previamente.

Esta línea se estableció a partir de una muestra de páncreas de un paciente que recibió quimioterapia adyuvante después de la cirugía, por lo que resulta interesante estudiar cómo habría podido responder a otros fármacos. Cabe resaltar que estos resultados no son extrapolables si no se demuestra antes que exista una similitud entre el modelo y el paciente, por lo que se requiere la secuenciación del exoma (WES) en ambos para comprobar las mutaciones oncogénicas que comparten. En el caso del PTO 9, ya se había realizado un WES con anterioridad, por lo que se habían comparado las mutaciones.

En primer lugar, se testaron fármacos estándar en el tratamiento de PDAC como son fluorouracilo (5FU) y oxaliplatino, fármacos quimioterápicos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos (Tabla 9.). Como ya se ha explicado antes, se administran habitualmente en el tratamiento del PDAC en combinación con otros fármacos, bajo el nombre de FOLFIRINOX. Por esta misma razón, también se estudió la combinación de ambos fármacos (FOLFOX).

Por otra parte, dado que se conocían diferentes alteraciones moleculares características del tumor que estaban presentes en el organoide (KRAS y ATR), se estudió el efecto de dos fármacos dirigidos, Trametinib y Ceralasertib. El primero es un inhibidor de MEK, una proteína que se encuentra downstream en la vía de KRAS y que está activada intrínsecamente en células tumorales que presentan mutaciones en KRAS. El segundo es un inhibidor directo de ATR, una proteína que permite la supervivencia de tumores al compensar sus defectos en la reparación del DNA. En la Tabla 9 están indicadas las concentraciones que se testaron.

Tabla 9. Fármacos empleados y sus concentraciones.

Fármacos			Concentraciones finales
<i>Quimioterapéuticos</i>	5FU (fluorouracilo)	Antimetabolito inhibidor de la síntesis de DNA y ARN a través de la disminución de timina	50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM y 1 µM
	Oxaliplatino	Inhibidor de la síntesis de ARN, DNA y proteínas en las células	
	Folfox	Combinación de 5FU y oxaliplatino	
<i>Dirigidos</i>	Trametinib	Inhibidor de proteína quinasa MEK	10 µM, 5 µM, 1 µM y 0.1 µM
	Ceralasertib	Inhibidor de la quinasa relacionada con el rad3 (ATR)	

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de *Materiales y Métodos*, cuando se observó una densidad elevada de organoides, se realizó un pase a una placa de 96 pocillos y se dejaron crecer los organoides durante un par de días hasta el tratamiento. Posteriormente, se trataron durante 5 días a cinco concentraciones de cada uno de los fármacos. Para su preparación, los fármacos de quimioterapia se diluyeron en MC, ya que estaban disueltos en solución salina, y los fármacos dirigidos en MC y dimetilsulfóxido (DMSO) → máximo de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de medio MC), porque estaban disueltos en este último.

Al cabo de 5 días se observó al microscopio óptico (Leica, DMi1) si los organoides habían presentado sensibilidad al fármaco, comparando el aspecto de los organoides tratados respecto al control. En el ejemplo de la Figura 16, se observa que a mayor concentración de un fármaco concreto había menos organoides tumorales.

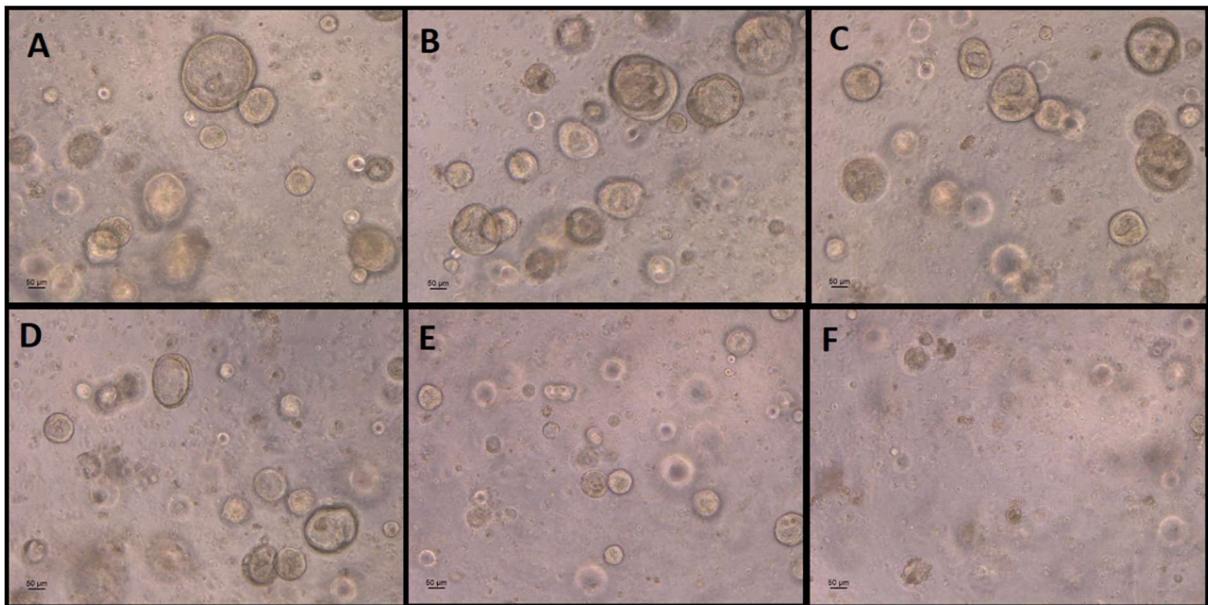


Figura 16. Estado de los organoides de PTO 9 tras la exposición a 5FU. Las concentraciones son las siguientes: control negativo (A), 1 μM (B), 5 μM (C), 10 μM (D), 25 μM (E) y 50 μM (F). Imágenes tomadas con el microscopio óptico a 10 aumentos (Leica, DMi1). Barra de escala: 50 μm .

A continuación, se midió la viabilidad total de los organoides por fluorimetría, según se ha descrito en el apartado de *Materiales y métodos*. Para poder comparar los resultados, se normalizaron los valores obtenidos mediante la división de la media de las 3 réplicas biológicas que se realizaron para cada concentración de fármaco, entre la media del control positivo (máxima viabilidad).

Asimismo, con el fin de asegurar la reproducibilidad del experimento, se realizaron experimentos independientes para cada fármaco, repitiendo el procedimiento en dos ocasiones diferentes para los fármacos dirigidos y en tres para los quimioterápicos.

• 4.4.1. Tratamiento de PTO 9 con quimioterápicos

En la Figura 17 están representados los efectos sobre la viabilidad de los organoides de PTO 9 respecto a diferentes concentraciones de los fármacos quimioterápicos aplicados, 5-FU, oxaliplatino y la combinación de ambos (FOLFOX). Pese a realizar 3 experimentos independientes, uno de ellos no fue representado porque se obtuvieron desviaciones estándar muy altas, posiblemente debido a un error técnico en cuanto a la distribución uniforme de organoides por pocillos.

En los ensayos se observó un descenso de la viabilidad respecto al control conforme incrementa la concentración de fármacos quimioterápicos, indicando que los organoides son sensibles a estos fármacos disminuyendo su viabilidad. Resaltar que a altas concentraciones de 5FU la respuesta parece estabilizarse, pero debido a que existe bastante disparidad entre ambas réplicas sería conveniente repetir el ensayo para discutir la efectividad del fármaco a altas concentraciones.

En los ensayos que se hicieron para oxaliplatino solo y su combinación con 5FU, se observa mayor uniformidad entre réplicas. En el ensayo con oxaliplatino se observa que a pequeñas concentraciones de fármaco el efecto es mínimo, por lo que se necesitan concentraciones mayores para producir un descenso en la viabilidad celular. Por otro lado, cuando se combinan ambos fármacos se da un descenso muy grande de la viabilidad, lo que sugiere que la combinación es el tratamiento más efectivo.

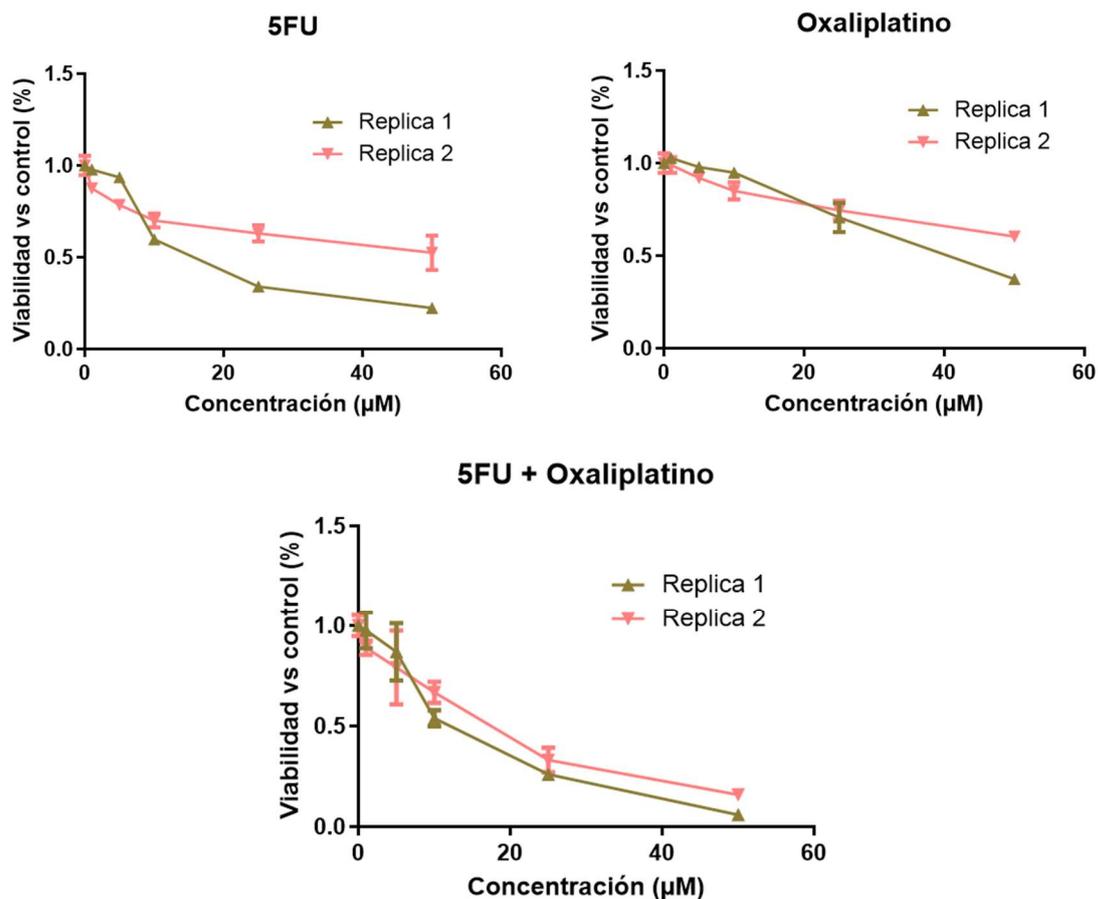


Figura 17. Representación de los resultados de los ensayos de los fármacos 5FU, oxaliplatino y su combinación sobre PTO 9. El eje x representa las concentraciones de fármaco y el eje y representa la viabilidad media de los organoides tratados con el fármaco respecto a la media de los controles. Se probaron 5 dosis diferentes por fármaco y la media de la viabilidad se realizó sobre las 3 réplicas biológicas.

Los resultados obtenidos parecen demostrar que los organoides en cultivo responden a los fármacos quimioterápicos estudiados y que su sensibilidad aumenta cuando se combinan. No obstante, se necesitarían más ensayos que corroborasen los resultados para poder extraer conclusiones claras.

Además, hubiese sido interesante comparar el efecto de los fármacos en organoides derivados de tejido normal, de esta forma se podría determinar la toxicidad de los mismos a altas concentraciones.

- **4.4.2. Tratamiento de PTO con inhibidores de diana específicas**

En la figura 18 están representados los efectos sobre la viabilidad de los organoides de PTO 9 respecto a diferentes concentraciones de los fármacos dirigidos aplicados, Ceralasertib y Trametinib. Se pudieron realizar dos réplicas por cada fármaco, cuyos resultados fueron similares.

Para ambos fármacos se observó un descenso de la viabilidad respecto al control conforme incrementa la concentración de fármacos dirigidos, indicando que los organoides son sensibles a estos fármacos al verse disminuida su viabilidad. Se observa un mayor efecto del fármaco Trametinib, cuyo resultado en la viabilidad señala que el organoide es más sensible incluso a pequeñas concentraciones y podría considerarse como un fármaco dirigido apropiado para el tumor. Aunque las réplicas no presenten casi variabilidad entre ellas, sería conveniente realizar más para confirmar estos resultados.

En cuanto a Ceralasertib, existe más variabilidad entre las réplicas, pero ambas siguen una misma tendencia en cuanto a su efecto sobre los organoides. El descenso progresivo en la viabilidad parece indicar que se necesita una mayor concentración del fármaco para un efecto notable. No obstante, se necesitarían más ensayos para valorar el impacto de este fármaco dirigido sobre la viabilidad de los organoides tumorales.

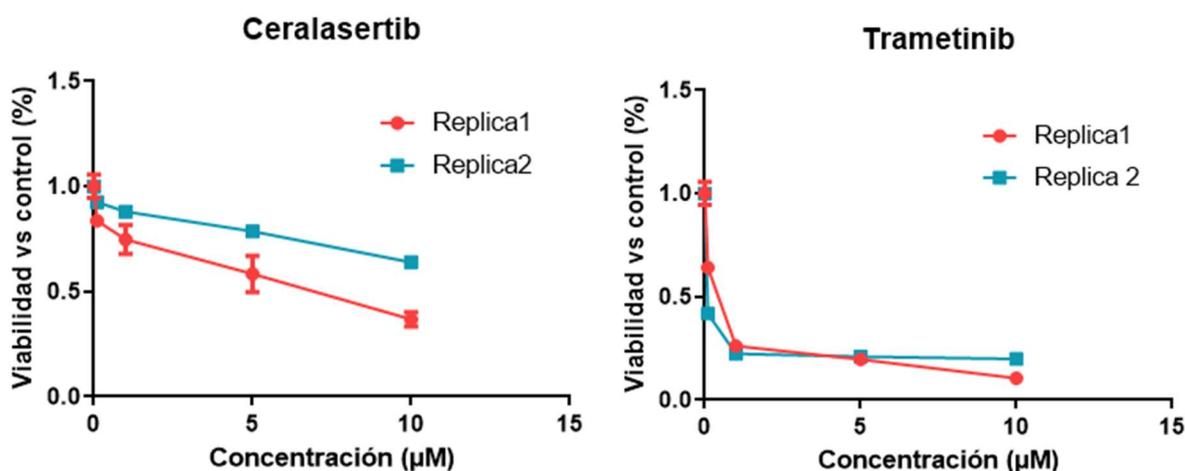


Figura 18. Representación de los resultados de los ensayos de los fármacos Ceralasertib y Trametinib sobre PTO 9. El eje x representa las concentraciones de fármaco y el eje y representa la viabilidad media de los organoides tratados con el fármaco respecto a la media de los controles. Se probaron 4 dosis diferentes por fármaco y la media de la viabilidad se realizó sobre las 3 réplicas biológicas.

5. CONCLUSIONES

- La extracción del cfDNA del plasma de pacientes con cáncer de páncreas se puede conseguir con un alto grado de calidad y a concentraciones suficientes de manera muy accesible.
- Para la monitorización de la respuesta al tratamiento neoadyuvante del adenocarcinoma de páncreas sería conveniente la combinación de marcadores tumorales como el antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9) junto con marcadores más específicos.
- Aunque aún se necesitan técnicas y ensayos sensibles para su aplicación clínica, la monitorización de KRAS en plasma podría contribuir a la evaluación de la respuesta al tratamiento seleccionando aquellos pacientes que responden a FOLFIRINOX.
- Los organoides a partir de tumores de páncreas son un modelo fácil de establecer y mantener, ya que presentan una alta estabilidad a lo largo de varios pases.
- Los ensayos de fármacos basados en organoides son relativamente sencillos y factibles en cuanto a tiempo de realización, lo que puede permitir generar plataformas de predicción de respuesta contribuyendo a una medicina de precisión.

6. Bibliografía

- Chen, H., Zhuo, Q., Ye, Z., Xu, X., & Ji, S. (2021). Organoid model: A new hope for pancreatic cancer treatment? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1875*(1), 188466. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188466>
- Chen, Z., Lv, Y., Li, H., Diao, R., Zhou, J., & Yu, T. (2021). Meta-analysis of FOLFIRINOX-based neoadjuvant therapy for locally advanced pancreatic cancer. *Medicine*, *100*(3), e24068. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000024068>
- Corrò, C., Novellademunt, L., & Li, V. S. W. (2020). A brief history of organoids. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *319*(1), C151–C165. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>
- Cros, J., Raffenne, J., Couvelard, A., & Poté, N. (2018). Tumor Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma. *Pathobiology*, *85*(1–2), 64–71. <https://doi.org/10.1159/000477773>
- Diefenbach, R. J., Lee, J. H., Kefford, R. F., & Rizos, H. (2018). Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA. *Cancer Genetics*, *228–229*, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.cancer-gen.2018.08.005>
- Ferrone, C. R., Marchegiani, G., Hong, T. S., Ryan, D. P., Deshpande, V., McDonnell, E. I., Sabbatino, F., Santos, D. D., Allen, J. N., Blaszkowsky, L. S., Clark, J. W., Faris, J. E., Goyal, L., Kwak, E. L., Murphy, J. E., Ting, D. T., Wo, J. Y., Zhu, A. X., Warshaw, A. L., ... Castillo, C. F. (2015). Radiological and Surgical Implications of Neoadjuvant Treatment With FOLFIRINOX for Locally Advanced and Borderline Resectable Pancreatic Cancer. *Annals of Surgery*, *261*(1), 12–17. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000867>
- Grunvald, M. W., Jacobson, R. A., Kuzel, T. M., Pappas, S. G., & Masood, A. (2020). Current Status of Circulating Tumor DNA Liquid Biopsy in Pancreatic Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(20), 7651. <https://doi.org/10.3390/ijms21207651>
- Hedayat, S., & Valeri, N. (2020). Patient-Derived Organoids: Promises, Hurdles and Potential Clinical Applications. *Clinical Oncology*, *32*(4), 213–216. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2019.12.009>
- Henriksen, T. V., Tarazona, N., Frydendahl, A., Reinert, T., Gimeno-Valiente, F., Carbonell-Asins, J. A., Sharma, S., Renner, D., Hafez, D., Roda, D., Huerta, M., Roselló, S., Madsen, A. H., Løve, U. S., Andersen, P. V., Thorlacius-Ussing, O., Iversen, L. H., Gotschalck, K. A., Sethi, H., ... Andersen, C. L. (2022). Circulating Tumor DNA in Stage III Colorectal Cancer, beyond Minimal Residual Disease Detection, toward Assessment of Adjuvant Therapy Efficacy and Clinical Behavior of Recurrences. *Clinical Cancer Research*, *28*(3), 507–517. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2404>
- Hirt, C. K., Booi, T. H., Grob, L., Simmler, P., Toussaint, N. C., Keller, D., Taube, D., Ludwig, V., Goryachkin, A., Pauli, C., Lenggenhager, D., Stekhoven, D. J., Stirnimann, C. U., Endhardt, K., Ringnalda, F., Villiger, L., Siebenhüner, A., Karkampouna, S., de Menna, M., ... Schwank, G. (2022). Drug screening and genome editing in human pancreatic cancer organoids identifies drug-gene interactions and candidates for off-label therapy. *Cell Genomics*, *2*(2), 100095. <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100095>

- Hou, J., Li, X., & Xie, K.-P. (2021). Coupled liquid biopsy and bioinformatics for pancreatic cancer early detection and precision prognostication. *Molecular Cancer*, 20(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01309-7>
- Huerta, M., Roselló, S., Sabater, L., Ferrer, A., Tarazona, N., Roda, D., Gambardella, V., Alfaro-Cervelló, C., Garcés-Albir, M., Cervantes, A., & Ibarrola-Villava, M. (2021). Circulating Tumor DNA Detection by Digital-Droplet PCR in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Systematic Review. *Cancers*, 13(5), 994. <https://doi.org/10.3390/cancers13050994>
- Hussung, S., Akhoundova, D., Hipp, J., Follo, M., Klar, R. F. U., Philipp, U., Scherer, F., von Bubnoff, N., Duyster, J., Boerries, M., Wittel, U., & Fritsch, R. M. (2021). Longitudinal analysis of cell-free mutated KRAS and CA 19–9 predicts survival following curative resection of pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 21(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07736-x>
- Juiz, N. A., Iovanna, J., & Dusetti, N. (2019). Pancreatic Cancer Heterogeneity Can Be Explained Beyond the Genome. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00246>
- Kamyabi, N., Bernard, V., & Maitra, A. (2019). Liquid biopsies in pancreatic cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 19(10), 869–878. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1670063>
- Kilgour, E., Rothwell, D. G., Brady, G., & Dive, C. (2020). Liquid Biopsy-Based Biomarkers of Treatment Response and Resistance. *Cancer Cell*, 37(4), 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.012>
- Kondo, J., & Inoue, M. (2019). Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy. *Cells*, 8(5), 470. <https://doi.org/10.3390/cells8050470>
- Lee, B., Lipton, L., Cohen, J., Tie, J., Javed, A. A., Li, L., Goldstein, D., Burge, M., Cooray, P., Nagrial, A., Tebbutt, N. C., Thomson, B., Nikfarjam, M., Harris, M., Haydon, A., Lawrence, B., Tai, D. W. M., Simons, K., Lennon, A. M., ... Gibbs, P. (2019). Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Annals of Oncology*, 30(9), 1472–1478. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz200>
- Low, R. R. J., Lim, W. W., Nguyen, P. M., Lee, B., Christie, M., Burgess, A. W., Gibbs, P., Grimmond, S. M., Hollande, F., & Putoczki, T. L. (2021). The Diverse Applications of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Organoids. *Cancers*, 13(19), 4979. <https://doi.org/10.3390/cancers13194979>
- McDuff, S., Parikh, A. R., Hazar-Rethinam, M., Zheng, H., van Seventer, E., Nadres, B., Ryan, D. P., Weekes, C. D., Clark, J. W., Fernandez-del Castillo, C., Ferrone, C., Lillemoe, K. D., Murphy, J. E., Goyal, L., Zhu, A. X., Wo, J. Y.-L., Blaszkowsky, L. S., Allen, J. N., Corcoran, R. B., & Hong, T. S. (2018). Using circulating tumor DNA (ctDNA) to predict surgical outcome after neoadjuvant chemoradiation for locally advanced pancreatic cancer (LAPC). *Journal of Clinical Oncology*, 36(4_suppl), 272–272. https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.4_suppl.272
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, 24(43), 4846–4861. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>

- Ortiz Higareda, V., Chapa Azuela, O., Hernández Mejía, B. I., Aguilera Salgado, A. F., & Cruz Martínez, Rodrigo. (2011). *Sensitivity and specificity of CA 19-9 for the diagnosis of pancreaticobiliary neoplasms in patients with obstructive jaundice*. *Cirujano General*, 33(1), 14-20.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-00992011000100003&lng=es&tlng=es
- Park, W., Chawla, A., & O'Reilly, E. M. (2021). Pancreatic Cancer. *JAMA*, 326(9), 851.
<https://doi.org/10.1001/jama.2021.13027>
- Prieto de Paula, J. M., Mayor Toranzo, E., Sanmamed Salgado, N., & Franco Hidalgo, S. (2013). CA 19.9 elevation in the absence of pancreatic tumor. *Gastroenterology and Hepatology*, 36(7), 495–496. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2013.02.010>
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research*, 74(11), 2913–2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Ryan, D. P., Hong, T. S., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, 371(11), 1039–1049.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1404198>
- Sefrioui, D., Blanchard, F., Toure, E., Basile, P., Beaussire, L., Dolfus, C., Perdrix, A., Paresy, M., Antonietti, M., Iwanicki-Caron, I., Alhameedi, R., Lecleire, S., Gangloff, A., Schwarz, L., Clatot, F., Tuech, J.-J., Frébourg, T., Jardin, F., Sabourin, J.-C., ... di Fiore, F. (2017). Diagnostic value of CA19.9, circulating tumour DNA and circulating tumour cells in patients with solid pancreatic tumours. *British Journal of Cancer*, 117(7), 1017–1025. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.250>
- Seppälä, T. T., Zimmerman, J. W., Sereni, E., Plenker, D., Suri, R., Rozich, N., Blair, A., Thomas, D. L., Teinor, J., Javed, A., Patel, H., Cameron, J. L., Burns, W. R., He, J., Tuveson, D. A., Jaffee, E. M., Eshleman, J., Szabolcs, A., Ryan, D. P., ... Burkhart, R. A. (2020). Patient-derived Organoid Pharmacotyping is a Clinically Tractable Strategy for Precision Medicine in Pancreatic Cancer. *Annals of Surgery*, 272(3), 427–435. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000004200>
- The International Agency for Research on Cancer (IARC). (2020). Global Cancer Observatory. Retrieved September 9, 2022, from <https://gco.iarc.fr/>
- Vlachogiannis, G., Hedayat, S., Vatsiou, A., Jamin, Y., Fernández-Mateos, J., Khan, K., Lampis, A., Eason, K., Huntingford, I., Burke, R., Rata, M., Koh, D.-M., Tunariu, N., Collins, D., Hulkki-Wilson, S., Ragulan, C., Spiteri, I., Moorcraft, S. Y., Chau, I., ... Valeri, N. (2018). Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 359(6378), 920–926.
<https://doi.org/10.1126/science.aao2774>