



**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
**FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA**  
Traballo de Fin de Grao en Medicina

**Desarrollo de organoides en el cáncer ginecológico: nuevos  
modelos para  
una medicina personalizada**

Desenvolvemento de organoides no cancro xinecolóxico: novos modelos para  
unha medicina personalizada

Organoids development in gynecological cancer: new models for a personalized  
medicine

**Autora:** Aida Carril Barcia

**Tutor:** Rafael López López

**Cotutor 1:** Miguel Abal Posada

**Cotutor 2:** Laura Muínelo Romay

Departamento de Psiquiatría, Radiología, Salud Pública, Enfermería y Medicina  
Servicio de Oncología Médica. Grupo de Oncología Médica Traslacional  
Curso académico: 2021-2022  
Convocatoria: Junio

## **AGRADECIMIENTOS**

Al doctor López, por confiar en mí y hacer posible esta experiencia.  
A los doctores Abal y Muínelo, por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad, ilusión y apoyo necesarios para realizar este proyecto.  
Al doctor Casas Arozamena, por su paciencia y ayuda durante todo este año.  
A todo el personal técnico e investigador de ONCOMET, por recibirme con los brazos abiertos y ayudarme siempre.  
A mi familia y amigos, por su apoyo incondicional durante esta etapa, sin el cual no habría llegado hasta aquí.

## RESUMEN

**Introducción:** Los tumores endometriales constituyen la neoplasia ginecológica más frecuente en mujeres occidentales, mientras que el cáncer ovárico es la de mayor tasa de mortalidad. El desarrollo de nuevos modelos preclínicos tridimensionales (organoides) que reproduzcan las características específicas del tumor permite llevar a cabo estudios de caracterización molecular y *screening* farmacológico, lo que podría orientar la selección de tratamientos y el pronóstico de las pacientes, de especial importancia en casos de alto riesgo, recidiva o progresión de la enfermedad a varias líneas de tratamiento. El principal objetivo de este trabajo es presentar un procedimiento del desarrollo de organoides a partir de muestras mínimamente invasivas de pacientes de cáncer de endometrio y ovario.

**Materiales y métodos:** Se obtuvieron muestras de pacientes de cáncer endometrial (n=6) y cáncer ovárico (n=1). Se desarrolló un método de procesamiento para obtener una suspensión de célula única epitelial. Se compararon cualitativamente distintos protocolos descritos en la literatura, tanto a nivel de eficiencia de generación y rendimiento de los cultivos (*BME droplet* y *BME bilayer organoid culture*), como de mantenimiento (químico, mecánico y enzimático). Se llevó a cabo una caracterización preliminar de los organoides de tumor ovárico mediante inmunofluorescencia.

**Resultados:** El método desarrollado permitió obtener una suspensión de células tumorales con una viabilidad >75% en todas las muestras. Se identificaron diferentes patrones morfológicos en las estructuras generadas. El método de cultivo *BME droplets* y el mecánico resultaron ser los más eficientes. La caracterización de los organoides de ovario demostró la expresión de PAX8, vimentina y citoqueratinas.

**Conclusiones:** La tasa de éxito en la generación de organoides y el rendimiento sufrieron gran variabilidad, no pudiendo ser esta atribuida a las diferencias de viabilidad de la suspensión celular de partida. Se destaca la necesidad de estandarizar protocolos y desarrollar estudios que avalen su implementación en la clínica.

### **PALABRAS CLAVE:**

Cáncer de endometrio, cáncer de ovario, organoides, modelos preclínicos, medicina personalizada, biopsia líquida, terapias dirigidas

## RESUMO

**Introdución:** Os tumores endometriais constitúen a neoplasia xinecolóxica máis frecuente nas mulleres occidentais, namentres que o cancro ovárico é a de maior taxa de mortalidade. O desenvolvemento de novos modelos preclínicos tridimensionais (organoides) que reproduzan as características específicas do tumor permite levar a cabo estudos de caracterización molecular e cribado farmacolóxico, o que podería orientar a selección de tratamentos e o pronóstico das pacientes, de especial importancia nos casos de alto risco, recidiva ou progresión da enfermidade a varias liñas de tratamento. O principal obxectivo deste traballo é presentar un procedemento da xeración de organoides a partir de mostras minimamente invasivas de pacientes de cancro de endometrio e ovario.

**Materiais e métodos:** Obtivéronse mostras de pacientes de cancro endometrial (n=6) e cancro ovárico (n=1). Desenvolveuse un método de procesamento para obter unha suspensión de célula única epitelial. Comparáronse cualitativamente distintos protocolos descritos na literatura, tanto a nivel de eficiencia de xeración e rendemento dos cultivos (*BME droplet* e *BME bilayer organoid culture*), como de mantemento dos mesmos (químico, mecánico e encimático). Levouse a cabo unha caracterización preliminar dos organoides de tumor ovárico mediante inmunofluorescencia.

**Resultados:** O método desenvolvido permitiu obter unha suspensión de células tumorais cunha viabilidade >75% en todas as mostras. Identificáronse diferentes patróns morfolóxicos nas estruturas xeradas. O método de cultivo de *BME droplets* e o mecánico resultaron ser os de maior eficiencia. A caracterización dos organoides de ovario demostrou a expresión de PAX8, vimentina e citoqueratinas.

**Conclusións:** A taxa de éxito na xeración de organoides e no rendemento do cultivo sufriu unha grande variabilidade, non podendo ser atribuída ás diferenzas de viabilidade da suspensión celular de partida. Destácase a necesidade de estandarizar protocolos e desenvolver estudos que avalen a súa implementación na clínica.

### **PALABRAS CLAVE:**

Cancro de endometrio, cancro de ovario, organoides, modelos preclínicos, medicina personalizada, biopsia líquida, terapias dirixidas

## ABSTRACT

**Background:** Endometrial tumors constitute the most frequent gynecological neoplasia in occidental women, whereas ovarian cancer is the one with the highest mortality rate. New 3D preclinical models (organoids) development that recapitulate specific characteristics of the original tumor allows to drive molecular characterization tests and drug screening, which could lead treatment selection and patient's prognosis, especially important in high-risk cases, relapse or illness progression to several lines of therapy. The main objective of this project is to show a development organoid procedure from minimally invasive samples of endometrial and ovarian cancer patients.

**Methods:** Endometrial cancer (n=6) and ovarian cancer (n=1) samples were obtained. A method for processing samples to achieve an epithelial single-cell suspension was developed. Several protocols described in literature were qualitatively compared, in terms of efficiency of the generation of structures comparing two techniques (BME droplet and BME bilayer organoid culture), and in terms of culture maintenance (chemical, mechanic and enzymatic). A preliminary characterization of ovarian organoids was conducted by immunofluorescence.

**Results:** The developed method allowed to obtain a tumoral single-cell suspension with a viability >75% in all the samples. Different morphological patterns in the generated structures were observed. BME droplets culture and mechanic method showed to be the most efficient ones. Ovarian organoid characterization revealed PAX8, vimentin and cytokeratins expression.

**Conclusions:** The success rate of organoids generation suffered high variability, which could not be attributed to differences in the suspension cell viability. It is highlighted the need of standardized protocols and studies to support clinical implementation.

### **KEY WORDS:**

Endometrial cancer, ovarian cancer, organoids, preclinical models, personalized medicine, liquid biopsy, target therapies

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

bFGF	<i>beta-Fibroblast Growth Factor</i>
BME	<i>Basement Membrane Extract</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAFs	<i>Cancer Associated Fibroblasts</i>
CAR-T	<i>Chimeric Antigen Receptor-T</i>
CCC	<i>Clear Cell Carcinoma</i>
CNVs	<i>Copy Number Variations</i>
CRS	<i>Chemotherapy Response Score</i>
CTCs	<i>Circulating Tumor Cells</i>
DMEM	<i>Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
EEC	<i>Endometrioid Endometrial Cancer</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FIGO	<i>International Federation of Gynaecology and Obstetrics</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HGS	<i>High-grade Serous</i>
IGF1	<i>Insulin growth factor-1</i>
ITS	<i>Insulin-Transferrin-Selenium</i>
MBOC	<i>Matrigel Bilayer Organoid Culture</i>
MMR-DM	<i>Mismatch Repair Deficient</i>
MSI-H	<i>Microsatellite Instability-High</i>
NICO	<i>Nicotinamida</i>
OC	<i>Ovarian cancer</i>
PARPi	<i>Poly-ADP Ribose polymerase Inhibitors</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDOs	<i>Patient-Derived-Organoids</i>
PDTX	<i>Patient-Derived-Tumor-Xenografts</i>
PDXs	<i>Patient-Derived Xenografts</i>
PFA	<i>Paraformaldehido</i>
RBC	<i>Red blood cells</i>
RI	<i>Rock-Inhibitor</i>
SC	<i>Squamous cancer</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
VPH	<i>Virus del papiloma humano</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. CÁNCER DE ENDOMETRIO Y OVARIO: EPIDEMIOLOGÍA .....	1
1.2. CARACTERÍSTICAS, DIAGNÓSTICO, ESTADIFICACIÓN Y TRATAMIENTOS ACTUALES.....	2
1.3. ORGANOIDES COMO MODELO PRECLÍNICO: VENTAJAS, POTENCIALES APLICACIONES Y LIMITACIONES .....	7
1.4. USO DE ORGANOIDES EN LA INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO Y OVARIO.....	13
1.5. JUSTIFICACIÓN .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	16
3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES .....	17
3.3. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y PUESTA EN CULTIVO.....	18
3.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	18
3.4.1. MUESTRAS DE CARCINOMA DE ENDOMETRIO .....	18
3.4.2. MUESTRAS DE CARCINOMA OVÁRICO.....	19
3.5. PUESTA EN CULTIVO DE ORGANOIDES.....	20
3.5.1. MEDIO DE CULTIVO.....	20
3.5.2. PROCEDIMIENTO DE PUESTA EN CULTIVO .....	21
3.6. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO Y SEGUIMIENTO .....	23
3.7. VALORACIÓN CUALITATIVA DE RENDIMIENTO Y EFICIENCIA DE LOS DISTINTOS MÉTODOS.....	23
3.8. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA .....	24
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>25</b>
4.1. MÉTODO DE PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	25
4.2. MÉTODO DE CULTIVO: BME droplets vs. MBOC .....	25
4.3. OBTENCIÓN DE ORGANOIDES Y MANTENIMIENTO .....	26
4.4. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS DE ORGANOIDES.....	32
4.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS ORGANOIDES DE CÁNCER OVÁRICO MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA .....	32
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>33</b>
<b>6. REFERENCIAS</b> .....	<b>34</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA</b> .....	<b>35</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>37</b>

<b>ANEXO 1: PROCESAMIENTO MUESTRA ASPIRADO ENDOMETRIAL .....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO 2: PROCESAMIENTO MUESTRA LÍQUIDO ASCÍTICO .....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO 3: CULTIVO MEDIANTE MÉTODO BME-DROPLETS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO 4: CULTIVO MEDIANTE MÉTODO MARU (MBOC: <i>BME Bilayer Organoid Culture</i>) .....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO 5: PASES ORGANOIDES MÉTODO QUÍMICO (<i>Cell Recovery Solution</i>) .....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO 6: PASES ORGANOIDES MÉTODO MECÁNICO .....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO 7: MARCAJE DE ORGANOIDES MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA ....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXO 8: REACTIVOS EMPLEADOS.....</b>	<b>40</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación del cáncer de endometrio. Modificado de Cattasus et al. (5). EEC: carcinoma endometriode, CCC: carcinoma de células claras, SC: carcinoma escamoso. MI: inestabilidad de microsatélites, LOH: pérdida de heterocigosidad cromosómica. ....	3
Tabla 2: Estadificación FIGO 2009 del cáncer de endometrio. Modificado de Santaballa et al. (1). ....	3
Tabla 3: Grupos de riesgo de ESMO. Adaptado de Santaballa et al. (1) EEC: carcinoma endometriode, NEEC: carcinoma no endometriode, LVSI: invasión linfovascular. ....	3
Tabla 4: Clasificación de la ESGO/ESTRO/ESP del EC en grupos de riesgo para guiar la terapia adyuvante. Adoptado de Alexa et al. (6). ....	4
Tabla 5: Características de los principales subtipos histológicos de cáncer de ovario. Modificado de Hollis et al. (8). ....	6
Tabla 6: Criterios FIGO 2014 de estadificación del cáncer de ovario. Modificado de Redondo et al. (9). ....	6
Tabla 7: Resumen de las ventajas, limitaciones y posibles aplicaciones de los modelos de organoides. Elaboración propia. ....	12
Tabla 8: Comparación de los tres modelos preclínicos descritos. Modificado de Drost et al. (12). (-: limitado, (+-: intermedio), (+: bueno), (+++: muy bueno).....	13
Tabla 9: Características clínico-patológicas de los tumores de las pacientes incluidas. ....	17
Tabla 10: Componentes del medio de cultivo. ....	21
Tabla 11: Comparación cualitativa de métodos de cultivo de organoides. MBOC vs BME droplets. ....	26
Tabla 12: Imágenes seriadas del cultivo. ....	31

## ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1: Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres pertenecientes a países con muy alto HD. Fuente: Globocan 2020 (4). ....	2
Imagen 2: Esquema de la capacidad de los organoides para representar la heterogeneidad tumoral. Adoptado de Lesavage et al. (10). ....	9

Imagen 3: Uso de organoides en desarrollo y selección de terapias farmacológicas. Adoptado de Drost et al. (12).....	10
Imagen 4: Diagrama de trabajo. Creado con Biorender.com.....	16
Imagen 5: Esquema del procedimiento. Creado con Biorender.com.....	18
Imagen 6: Esquema del método BME droplets.....	22
Imagen 7: Esquema del método MBOC .....	22
Imagen 8: Fotografía A (0-33%, +); fotografía B (33-66%, ++), fotografía C (66-100%, +++). .....	24
Imagen 9. Comparación de métodos de cultivo MBOC vs. Método de Gota.....	26
Imagen 10: Inmunofluorescencia de un organoide de cáncer ovárico.....	33

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. CÁNCER DE ENDOMETRIO Y OVARIO: EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de endometrio constituye la neoplasia ginecológica más frecuente en países con un índice de desarrollo humano (HDI) muy alto (Imagen 1), situándose por delante del cáncer de cérvix uterino (debido a la mejor educación sexual, las intervenciones sanitarias de diagnóstico precoz y programas de vacunación frente al VPH). La tasa de incidencia en estos países es de 15.9 casos por cada 100 000 mujeres, con una mortalidad de 2.6/100 000.

Debido a que la mayoría de los tumores endometriales son hormonodependientes, entre sus principales factores de riesgo se encuentran los estados de hiperestrogenismo endógeno o exógeno como la obesidad (y, en esta línea, su relación con malos hábitos dietéticos y una baja actividad física), el síndrome de ovario poliquístico, la diabetes mellitus tipo 2 o el tratamiento con fármacos como el tamoxifeno. Además, se relacionan con una mayor ventana estrogénica (menarquia precoz y menopausia tardía). Por el contrario, las progestinas ejercen un efecto protector y de maduración sobre el endometrio. De esta forma, el embarazo (debido a un equilibrio hormonal a favor de la progesterona) y el uso de anticonceptivos hormonales se ha relacionado con un menor riesgo de cáncer de endometrio.

Algunos casos de cáncer de endometrio pueden encontrarse en el contexto de un síndrome de cáncer familiar llamado “cáncer colorrectal hereditario no polipósico” (HNPCC) o síndrome de Lynch, en el que existe una inestabilidad de microsátélites causada por defectos en genes de “*mismatch repair*”, tales como *MLH1* y *MSH2*. Esto se traduce en una deficiencia del organismo para reparar los daños en el ADN, predisponiendo a la aparición de tumores en distintas localizaciones.

El pronóstico de las pacientes suele ser favorable, excepto en aquellos casos de alto riesgo o con un estadio avanzado en el momento del diagnóstico, en los que las tasas de supervivencia son menores al 50% (1).

Los tumores ováricos se sitúan en la primera posición entre los cánceres ginecológicos en términos de mortalidad, aunque en cuanto a su incidencia (8.3/100 000) están por detrás de las neoplasias de endometrio y cuello de útero. Así, continúan constituyendo la quinta causa de mortalidad por cáncer en la mujer, con una tasa de mortalidad de 4.3/100 000 mujeres en países desarrollados.

El cáncer ovárico de origen epitelial constituye la mayoría de los casos, muy por delante de los tumores de células germinales o del estroma, y es típicamente diagnosticado en estadios avanzados. La edad de aparición oscila entre la tercera y novena década de la vida, aunque la incidencia máxima se sitúa entre los 50-60 años.

Los datos epidemiológicos relacionan el origen del cáncer ovárico epitelial de origen esporádico con la ovulación, por lo que la nuliparidad y los tratamientos inductores de la ovulación se describen como factores de riesgo para desarrollar estos tumores, junto con la obesidad y una dieta inadecuada; mientras que el embarazo y la lactancia, así como la toma de anticonceptivos hormonales orales parecen relacionarse con una menor incidencia de estos (2).

Hasta un 20% de estos tumores son causados por variantes en línea germinal, la mayoría en *BRCA1* o *BRCA2* (responsables del 75% del cáncer de ovario hereditario), aunque también en otros genes asociados a la reparación del DNA como *BARD1*, *CHEK2*, *RAD51*, *PALB2* y *BRIP1*. El síndrome de Lynch previamente mencionado también se relaciona con un riesgo mayor de cáncer de ovario, constituyendo un 10-15% de los casos familiares. El 3% restante se

debe a las pacientes de síndrome de Li-Fraumeni, en el que existe una mutación hereditaria de *TP53* (3).

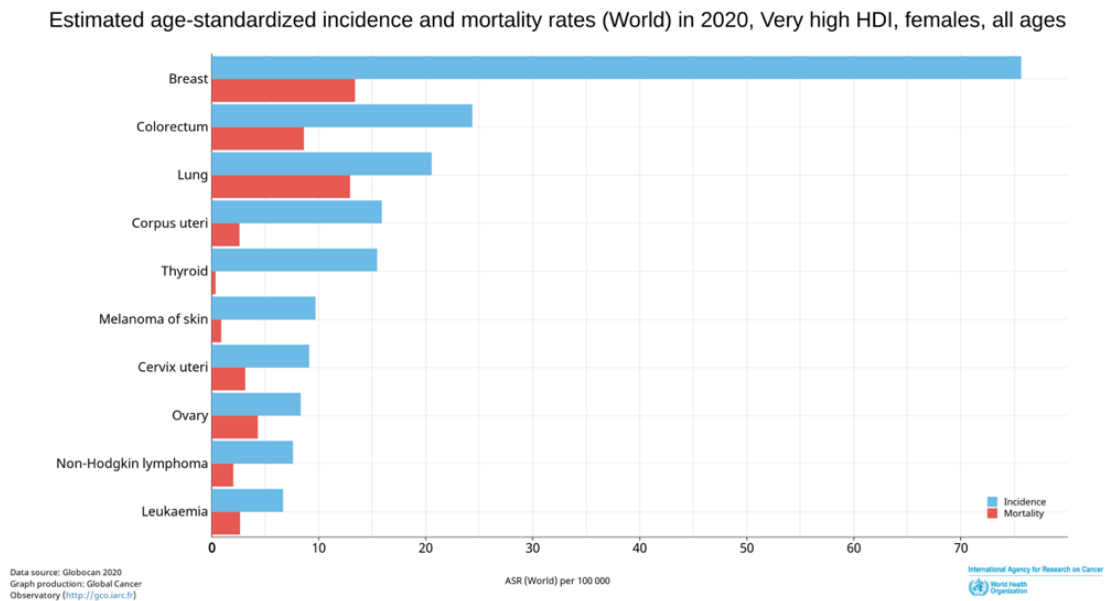


Imagen 1: Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres pertenecientes a países con muy alto HD. Fuente: Globocan 2020 (4).

En la actualidad no se llevan a cabo programas de cribado para la detección precoz de cáncer de endometrio ni ovario en la población general, si bien las pacientes con alto riesgo de cáncer familiar se benefician de una vigilancia activa y cirugías profilácticas.

## 1.2. CARACTERÍSTICAS, DIAGNÓSTICO, ESTADIFICACIÓN Y TRATAMIENTOS ACTUALES

### CÁNCER DE ENDOMETRIO

El síntoma *princeps* del cáncer de endometrio es la metrorragia (sangrados intermenstruales en mujeres pre- y perimenopáusicas o hemorragias en las pacientes ya menopáusicas). La ecografía transvaginal constituye la primera aproximación diagnóstica, si bien el diagnóstico definitivo se establece mediante una biopsia endometrial (2).

Clásicamente, los tumores endometriales se han clasificado en dos grupos que recogen unas características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas comunes, guardando correlación con un perfil mutacional determinado. La gran mayoría de los tumores diagnosticados se engloban dentro del tipo 1 (o carcinomas endometrioides, EECs), de aparición más temprana (mujeres perimenopáusicas) y con una fuerte asociación con la exposición a estrógenos, la que en muchas ocasiones provoca una situación de hiperplasia endometrial que precede al desarrollo del tumor. Se caracterizan además por un bajo grado de malignidad y un menor carácter invasivo. Por el contrario, los tumores no endometrioides o de tipo 2, aparecen en la postmenopáusica sobre un endometrio atrófico, sin relación con la acción estrogénica. Este grupo comprende los tipos histológicos de carcinomas serosos y de células claras, típicamente de un comportamiento más agresivo, de más alto grado y con mayor tendencia a la invasión miometrial (5). Ambos grupos pueden presentarse de forma simultánea en un mismo tumor, otorgándose la denominación de tumor mixto cuando cada componente es mayor del 5%.

	TIPO 1	TIPO 2
Frecuencia	80%	20%
Tipo histológico	EEC	CCC, SC
Edad	Premenopausia, perimenopausia	Postmenopausia
Relación con estrógenos	Presente	Ausente
Grado histológico	Bajo	Alto
Invasión miometrial	Menor	Mayor
Comportamiento	Estable	Progresión
Alteraciones genéticas	MI, PTEN, PIK3CA, KRAS, CTNNB4/β-catenina	p53, LOH, Her2 amplificado, E-cadherina

Tabla 1: Clasificación del cáncer de endometrio. Modificado de Cattasus et al. (5). EEC: carcinoma endometrioide, CCC: carcinoma de células claras, SC: carcinoma escamoso. MI: inestabilidad de microsatélites, LOH: pérdida de heterocigosidad cromosómica.

La estadificación quirúrgica de estos tumores se realiza siguiendo los criterios de la FIGO propuestos en 2009:

Estadio	Descripción
IA	Confinado al útero, sin invasión miometrial o <50%
IB	Confinado al útero, con invasión miometrial >50%
II	Invasión del estroma cervical
IIIA	Invasión de la serosa o anejos
IIIB	Invasión de vagina y/o parametrios
IIIC1	Invasión de ganglios pélvicos
IIIC2	Invasión de ganglios paraaórticos
IVA	Invasión de la vejiga y/o mucosa intestinal
IVB	Metástasis a distancia (metástasis abdominales y/o ganglios inguinales)

Tabla 2: Estadificación FIGO 2009 del cáncer de endometrio. Modificado de Santaballa et al. (1).

A pesar del reciente avance de la investigación molecular de este cáncer, el riesgo de recaída de las pacientes se estima fundamentalmente según la edad, el estadio de la enfermedad, tipo histológico y grado, presencia o ausencia de invasión miometrial y linfovascular. En función de estos parámetros se establecen cuatro grupos de riesgo que orientan la necesidad de tratamientos adyuvantes aun en estadios tempranos (1).

Grupo de riesgo	Descripción
Bajo riesgo	EEC, estadio I G1-2, <50% de invasión miometrial, sin LVSI
Riesgo intermedio	EEC, estadio I, G1-2, >50% de invasión miometrial, sin LVSI
Riesgo alto-intermedio	EEC estadio I, G3, <50% invasión miometrial, con/sin LVSI Estadio I, G1-2 con LVSI, independiente de la invasión miometrial
Alto riesgo	EEC, estadio I G3 >50% invasión miometrial, independiente de LVSI EEC estadio II EEC estadio III con resección óptima NEEC (seroso, células claras, indiferenciado o carcinosarcoma)

Tabla 3: Grupos de riesgo de ESMO. Adaptado de Santaballa et al. (1) EEC: carcinoma endometrioide, NEEC: carcinoma no endometrioide, LVSI: invasión linfovascular.

Recientemente el proyecto del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) ha propuesto una clasificación de los tumores endometriales en subgrupos según su perfil molecular con implicaciones pronósticas que se traducirían en un distinto manejo terapéutico adyuvante en las pacientes. Así, se establecen cuatro grupos de riesgo: POLE ultramutado, mismatch-repair

deficient (MMR-D), p53 wild-type/ bajo número de copias y p53 mutado/alto número de copias (6). Las nuevas guías de 2020 de la ESGO/ESTRO/ESP (7) ya incluyen estos parámetros en su clasificación de grupos de riesgo:

Grupo de riesgo	Caracterización molecular desconocida	Caracterización molecular conocida
<b>Bajo</b>	Endometrioide estadio IA, grado 1-2, LVSÍ negativo o focal	Estadio I-II POLE EDM carcinoma endometrial, sin enfermedad residual
<b>Intermedio</b>	Endometrioide estadio IB, grado 1-2, LVSÍ negativo o focal Endometrioide estadio IA, grado 3, LVSÍ negativo o focal No-endometrioide estadio IA (seroso, células claras, carcinoma indiferenciado, carcinosarcoma, mixto) sin invasión miometrial	Estadio IB MMRd/p53 wt carcinoma endometrioide + bajo grado + LVSÍ negativa o focal Estadio IA MMRd/p53 wt carcinoma endometrioide + alto grado + LVSÍ negativo o focal Estadio IA p53 abn y/o no-endometrioide sin invasión miometrial
<b>Alto-intermedio</b>	Endometrioide estadio I, LVSÍ sustancial, independientemente del grado y profundidad de invasión Endometrioide estadio IB, grado 3, independientemente del estado de LVSÍ Estadio II	Endometrioide estadio I MMRd/p53wt + LVSÍ sustancial independientemente del grado y profundidad de invasión Estadio IB MMRd/p53 wt carcinoma endometrioide de alto grado, independiente del estado de LVSÍ Estadio II MMRd/p53 wt carcinoma endometrioide
<b>Alto</b>	Estadio III-IVA sin enfermedad residual Estadio I-IVA no endometrioide (seroso, células claras, carcinoma indiferenciado, mixto) con invasión miometrial y sin enfermedad residual	Estadio III-IVA MMRd/p53 wt endometrioide sin enfermedad residual Estadio I-IVA p53abn con invasión miometrial, sin enfermedad residual Estadio I-IVA p53 wt/MMRd seroso, indiferenciado, carcinosarcoma con invasión miometrial, sin enfermedad residual
<b>Avanzado</b>	Estadio III-IVA con enfermedad residual	Estadio III-IVA con enfermedad residual de cualquier tipo molecular
<b>Metastásico</b>	Estadio IVB	Estadio IVB de cualquier tipo molecular

Tabla 4: Clasificación de la ESGO/ESTRO/ESP del EC en grupos de riesgo para guiar la terapia adyuvante. Adoptado de Alexa et al. (6).

El tratamiento estándar del cáncer de endometrio consiste en la histerectomía total con salpingooforectomía bilateral, seguida o no de tratamiento adyuvante con radioterapia o un régimen quimioterápico. En los casos de riesgo intermedio y alto, la linfadenectomía está recomendada para conseguir una mejor estadificación quirúrgica y guiar la indicación de

terapias adyuvantes. La radioterapia externa y la braquiterapia intravaginal se utilizan para la prevención de recidivas en casos de alto grado o con invasión de planos profundos (estadio IB).

La quimioterapia adyuvante (combinaciones de carboplatino y paclitaxel) se reserva para pacientes de alto riesgo o con enfermedad en estadios avanzados (III-IV). En situaciones de enfermedad metastática pueden ser útiles la hormonoterapia (en aquellos tumores bien diferenciados que expresen receptores de progesterona), y terapias dirigidas como fármacos antiangiogénicos (bevacizumab) o inhibidores de mTOR (everolimus, temsirolimus). La inmunoterapia mediante inhibidores de PD1/PDL1 (como pembrolizumab y atezolizumab respectivamente) ha demostrado ser particularmente beneficiosa en los casos de inestabilidad de microsatélites (MSI-H) o tumores con una alta concentración de linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) (8).

## **CÁNCER DE OVARIO**

La enfermedad generalmente se presenta como un cuadro paucisintomático e inespecífico hasta etapas avanzadas de la enfermedad, destacando la hinchazón abdominal y cambios en el hábito intestinal como alteraciones frecuentes. La ascitis o el derrame pleural pueden constituir las primeras manifestaciones de esta neoplasia. La aproximación diagnóstica se realiza mediante ecografía y detección serológica de los marcadores tumorales Ca-125 y HE4 (este último más específico). El riesgo de malignidad de una masa anexial puede ser estimado mediante *scores* ecográficos (International Ovarian Tumor Analysis, IOTA) y serológicos (Risk Ovarian Malignancy Algorithm, ROMA).

La WHO clasifica los tumores ováricos de estirpe epitelial en cinco subtipos histológicos con orígenes y escenarios moleculares diferentes: seroso de alto grado (HGS, la gran mayoría de los casos, con una frecuencia que alcanza el 70%), seroso de bajo grado, mucinoso, endometriode y de células claras. Mientras que estos dos últimos están relacionados con la endometriosis, se cree que el seroso de alto grado se origina en el epitelio tubárico distal. Las diferencias inmunohistoquímicas de los diferentes subtipos permiten la caracterización anatomopatológica del tumor, si bien el marcador PAX8 es expresado por todos los grupos (excepto algunos tumores mucinosos) (9).

Los diferentes subtipos de cáncer ovárico epitelial constituyen diferentes escenarios de la enfermedad, con particularidades diferenciales (en base a su quimiosensibilidad intrínseca, comportamiento y estadio al diagnóstico, entre otros) que marcan su pronóstico. Así, pese a la mayor quimiosensibilidad de los tumores de tipo HGS frente a los de bajo grado, el pronóstico suele ser mejor en estos últimos por tener un curso más indolente. A pesar de las diferencias entre los patrones histológicos, dentro de un mismo subtipo de tumor existe una amplia heterogeneidad clínica, lo que se atribuye a un distinto perfil molecular subyacente.

La Tabla 5 resume las principales características de estos tumores:

	HGS	Endometrioides	Células claras	Mucinoso	LGS
<b>Frecuencia</b>	70%	10%	10%	<5%	<5%
<b>Pronóstico</b>	Desfavorable	Favorable	Intermedio	Intermedio	Intermedio
<b>Origen/lesión precursora</b>	Epitelio tubárico distal	Endometriosis	Endometriosis	No definido	Tumor seroso borderline
<b>Quimiosensibilidad</b>	Alta	Alta	Baja	Baja	Baja
<b>Asociación con sdms. hereditarios</b>	BRCA1, BRCA2	Síndrome de Lynch	Síndrome de Lynch	-	-
<b>Estadio frecuente al diagnóstico</b>	80% estadio avanzado	50% estadio precoz	60% estadio precoz	80% estadio precoz	Típicamente estadio avanzado
<b>Anomalías moleculares</b>	Inestabilidad cromosómica, BRCA1/2, TP53, NF1, RB1, CCNE1 amp.	PTEN, PIK3CA, ARID1A, CTNNB1	PTEN, PIK3CA, ARID1A, chr20q13.2 amp.	KRAS, HER2 amp.	KRAS, BRAF

Tabla 5: Características de los principales subtipos histológicos de cáncer de ovario. Modificado de Hollis et al. (8).

Los criterios de estadificación recomendados en la actualidad son los de la FIGO del año 2014:

<b>Estadio I</b>	<b>Tumor confinado a los ovarios o trompa/s de Falopio</b>
<b>IA</b>	Limitado a un ovario (cápsula íntegra) o trompa, sin tumor en la superficie de ovario/trompa ni células malignas en ascitis/lavado peritoneal
<b>IB</b>	Limitado a un ovario (cápsula íntegra) o trompas, sin tumor en la superficie de ovario/trompa ni células malignas en ascitis/lavado peritoneal
<b>IC1 IC2 IC3</b>	Tumor limitado a uno/ambos ovarios o trompas, con diseminación quirúrgica Tumor limitado a uno/ambos ovarios o trompas, con ruptura capsular previa a cirugía o tumor en la superficie de ovario/trompa Tumor limitado a uno/ambos ovarios o trompas, con células malignas en ascitis/lavado peritoneal
<b>Estadio II</b>	<b>Tumor afecta a uno o ambos o trompas ovarios con extensión a órganos o estructuras de la pelvis o cáncer primario peritoneal</b>
<b>IIA</b>	Extensión y/o implantes sobre útero y/o trompas y/o ovarios
<b>IIB</b>	Extensión a otros tejidos pélvicos intraperitoneales
<b>Estadio III</b>	<b>Tumor afecta a uno o ambos ovarios o trompas, o cáncer primario peritoneal, con confirmación citológica o histológica de extensión al peritoneo de fuera de la pelvis y/o metástasis a ganglios linfáticos retroperitoneales</b>
<b>IIIA1</b>	Únicamente ganglios retroperitoneales positivos (demostración citológica o histológica) IIIA1(i) Tamaño de hasta 10mm IIIA1(ii) Tamaño >10mm
<b>IIIA2</b>	Afectación microscópica de peritoneo extrapélvico con/sin positividad de ganglios retroperitoneales
<b>IIB</b>	Metástasis peritoneales macroscópicas fuera de la pelvis de hasta 2cm en su diámetro mayor, con/sin positividad de ganglios retroperitoneales (incluyendo la extensión a cápsula hepática y esplénica sin afectación parenquimatosa de cualquier órgano)
<b>IIIC</b>	Metástasis peritoneales macroscópicas fuera de la pelvis mayores de 2cm en su diámetro mayor, con/sin positividad de ganglios retroperitoneales (incluyendo la extensión a cápsula hepática y esplénica sin afectación parenquimatosa de cualquier órgano)
<b>Estadio IV</b>	<b>Metástasis a distancia (excluyendo peritoneales)</b>
<b>IVA</b>	Derrame pleural con citología positiva
<b>IVB</b>	Metástasis parenquimatosas y de órganos extraabdominales (incluyendo ganglios linfáticos inguinales y ganglios fuera de la cavidad abdominal)

Tabla 6: Criterios FIGO 2014 de estadificación del cáncer de ovario. Modificado de Redondo et al. (9).

La cirugía constituye la base del tratamiento del cáncer de ovario, con intención radical o citorrreductora en aquellos casos de enfermedad avanzada en las que no sea posible una resección R0. Así, la presencia de enfermedad residual >1cm después de la cirugía representa un factor pronóstico fundamental, con un importante impacto negativo en la supervivencia de las pacientes.

Al igual que en el cáncer de endometrio, otros factores pronósticos importantes incluyen la edad, el grado histológico y el estadio FIGO, así como la presencia de ascitis.

El tratamiento quimioterápico de adyuvancia está indicado en los casos de alto riesgo en estadios tempranos y en enfermedad avanzada, con carboplatino y paclitaxel en un ciclo cada tres semanas, hasta un total de seis.

La introducción de los fármacos PARPi (*poly-ADP ribose polymerase inhibitors*), tales como el olaparib y niraparib, ofrece resultados prometedores como tratamiento de mantenimiento tras la adyuvancia con esquemas de platino, especialmente en las pacientes con tumores BRCA-mutados. El uso de bevacizumab (en combinación con la quimioterapia convencional y posteriormente como mantenimiento) ha demostrado aumentar la supervivencia libre de progresión (PFS) frente a la quimioterapia aislada.

## **REDUCIDO ARSENAL TERAPÉUTICO Y DESARROLLO DE RESISTENCIAS: NECESIDAD DE NUEVOS MODELOS**

Si bien el pronóstico del cáncer endometrial varía enormemente en función de las características del tumor, un 15-20% de las pacientes sufren recidivas. Las opciones de tratamiento en estos casos son limitadas, en los que la inmunoterapia juega un papel importante. La limitada batería de fármacos disponibles está condicionada en parte por la falta de modelos adecuados que reproduzcan las características específicas de este tipo de cáncer.

El riesgo de recurrencia en el cáncer de ovario con enfermedad avanzada es alto: se estima que entre un 80-85% de las pacientes sufren recaída en los primeros 10 años. En estos casos, se debe valorar en PS (*performance status*) y las posibilidades de tratamiento. Las resistencias desarrolladas a platino (pacientes en progresión a terapias basadas en platino) o un intervalo libre de enfermedad corto tras tratamiento con platino convierte a estas pacientes en no candidatas a un nuevo régimen con estos agentes quimioterápicos. Su inclusión en ensayos clínicos de otros citostáticos (p.ej. paclitaxel, gemcitabina) parece ser la mejor opción, con resultados modestos en aumento de supervivencia. La necesidad de nuevos modelos que permitan realizar cribado de fármacos y elegir terapias dirigidas e individualizadas en cada paciente se hace evidente.

### **1.3. ORGANOIDES COMO MODELO PRECLÍNICO: VENTAJAS, POTENCIALES APLICACIONES Y LIMITACIONES**

En los últimos años, la investigación biomédica del cáncer ha puesto en el punto de mira en ofrecer al paciente una medicina personalizada. Los avances tecnológicos han permitido tipificar los tumores según sus características moleculares y el desarrollo e implementación de terapias dirigidas adecuadas a las circunstancias de la enfermedad de cada individuo. Este cambio de paradigma condiciona la necesidad de disponer de modelos que recapitulen la heterogeneidad intrínseca intratumoral (diferentes subclones de células tumorales) e intertumoral (diferentes fenotipos entre tumores del mismo subtipo).

Tradicionalmente, la investigación oncológica ha utilizado diversos modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo*: modelos de animales genéticamente modificados, xenoinjertos (PDXs) y líneas celulares en 2D. Los modelos animales, extensamente utilizados, presentan como principal

inconveniente limitaciones éticas y falta de representatividad de la fisiopatología humana. Esto último justifica, en parte, el fracaso de terapias en ensayos clínicos que ofrecían prometedores resultados en fases preclínicas. De manera similar, la utilización de xenoinjertos de tejido tumoral en animales inmunodeprimidos puede no reproducir de manera fidedigna la evolución de la enfermedad en el humano, además de ser poco adecuados para realizar *screening* farmacológico a gran escala.

Los cultivos en 2D de líneas celulares establecidas están ampliamente extendidos por su buena relación coste-eficacia, pero su capacidad para retener las características fenotípicas y genotípicas del tumor inicial es limitada. Frecuentemente estos cultivos sufren procesos de selección clonal y modificaciones a nivel genético. Por otra parte, las condiciones de cultivo de las células distan mucho de la situación fisiológica, estando privadas de las interacciones de éstas con el lecho tumoral. La imposibilidad de obtener líneas celulares que reproduzcan las características del tejido normal como control constituye también una limitación de estos modelos.

Los organoides son cultivos celulares que crecen de forma tridimensional en el seno de una matriz extracelular, representando las propiedades del tumor de una manera más fisiológica y comparable a la situación *in vivo*. Pueden generarse cultivos primarios a partir de células *stem* del órgano sano o de células tumorales.

Las posibles aplicaciones de estos nuevos modelos en 3D son muy amplias. En el ámbito de la investigación básica, los organoides pueden ser utilizados para el estudio de los procesos de tumorigénesis y metástasis. Gracias a la estabilidad genética que poseen los organoides de órgano sano, pueden estudiarse los patrones mutacionales de los tumores en diferentes órganos y los mecanismos subyacentes a la adquisición de mutaciones *driver*.

El uso de técnicas de edición del genoma en estos modelos puede ser clave para estudiar la iniciación y evolución del cáncer en distintos órganos.

La posibilidad de generar organoides clonales de diferentes regiones de un mismo tumor permite el análisis de la heterogeneidad intratumoral a nivel genético, epigenético y transcriptómico. Estos pueden ser útiles en la determinación de la sensibilidad a fármacos y valorar así la posible resistencia intrínseca o adquirida a los mismos.

Por otra parte, los organoides pueden constituir un modelo que facilite el puente entre el laboratorio y la clínica, fundamento de la investigación traslacional. Esto se debe esencialmente a su capacidad para recapitular la diversidad tumoral: reproducen la heterogeneidad epigenética, fenotípica y metabólica de los diferentes subclones tumorales, la respuesta terapéutica específica del paciente, y características morfoestructurales propias del subtipo tumoral (10).

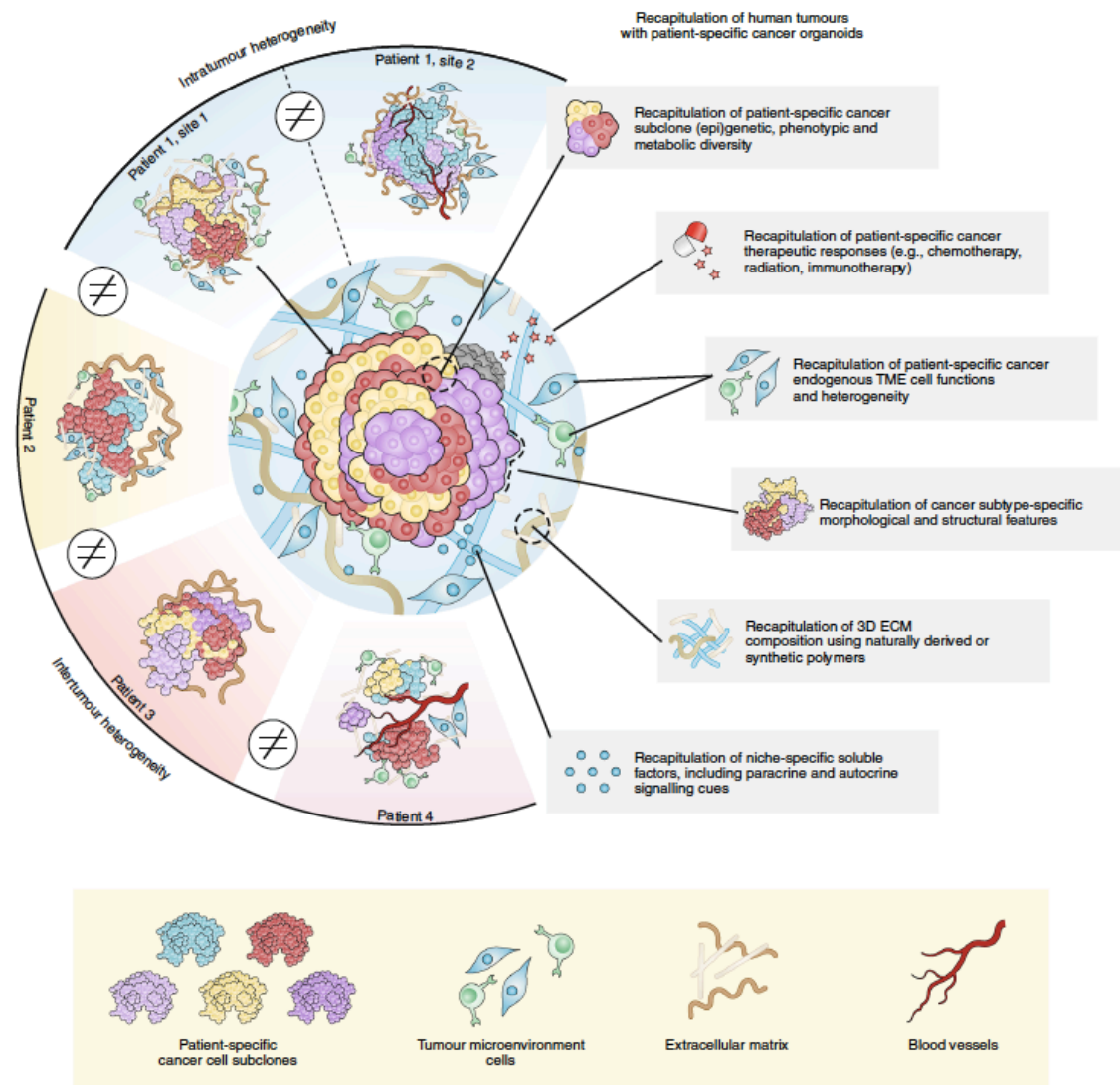


Imagen 2: Esquema de la capacidad de los organoides para representar la heterogeneidad tumoral. Adoptado de Lesavage et al. (10).

Estos modelos tridimensionales también hacen posible el estudio del microambiente tumoral (TME) y las interacciones autocrinas y paracrinas de las células tumorales con él. Para ello, pueden desarrollarse cultivos holísticos compuestos de poblaciones epiteliales tumorales y células inmunitarias; o reconstituir el TME mediante el cocultivo con poblaciones inmunitarias purificadas o fibroblastos asociados a tumor (CAFs). Las aplicaciones de estos sistemas abarcan desde el desarrollo de fármacos inmunoterápicos e identificación de biomarcadores predictores de respuestas terapéuticas hasta la generación de células T reactivas contra el tumor (fundamento de las novedosas terapias CAR-T). Además, permiten el *screening* y valoración de la respuesta a diferentes combinaciones de tratamiento para un paciente determinado (11).

En este sentido, los organoides ofrecen grandes ventajas en la búsqueda de una medicina personalizada: permiten correlacionar el perfil molecular del tumor con su potencial respuesta farmacológica, mediante la realización de estudios de caracterización molecular y *screening* de fármacos. Además, facilitan la elección de terapias más selectivas con un menor perfil de

toxicidad. Esto se consigue mediante el establecimiento de cultivos de organoides de tejido tumoral y sano del órgano en cuestión y organoides de tejido hepático sano de un mismo paciente. Así, el fármaco óptimo será aquel que logre atacar las células tumorales sin afectar a las células del órgano sano con una menor hepatotoxicidad (12).

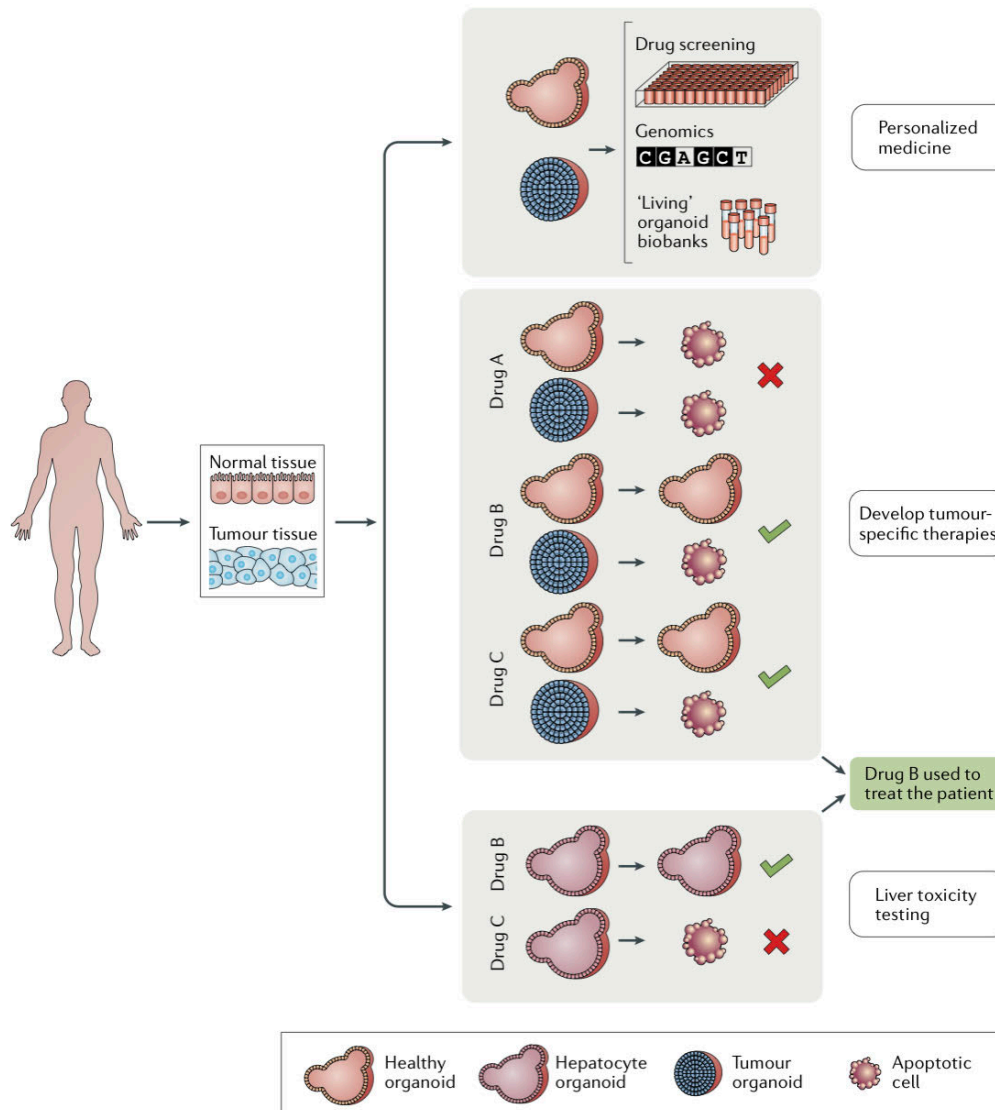


Imagen 3: Uso de organoides en desarrollo y selección de terapias farmacológicas. Adoptado de Drost et al. (12).

La estabilidad genotípica y fenotípica que poseen estos modelos vanguardistas posibilita su criopreservación y el establecimiento de biobancos de organoides. Diferentes estudios han constatado esta posibilidad en cáncer de esófago, estómago, hígado, páncreas, vejiga, cerebro, endometrio, ovario y mama. Los organoides generados parecen mantener las características histopatológicas y genéticas distintivas del tumor original, así como predecir los resultados del uso de distintos fármacos (10).

A pesar de los prometedores resultados que ofrecen estos modelos tridimensionales, los organoides desarrollados a partir de tumores no están exentos de limitaciones. El principal

inconveniente de la técnica viene marcado por la eficiencia, debido al rendimiento tan variable que existe entre los pacientes. El mantenimiento del cultivo requiere de la disponibilidad de reactivos de un coste no despreciable, en especial los factores de crecimiento *R-spondin* y agonistas de Wnt (*noggin*). El tiempo juega también un rol crucial para su aplicabilidad clínica, siendo necesario llevar a cabo los estudios de caracterización y ensayos de fármacos en un intervalo de tiempo adecuado para la actividad asistencial.

La dificultad para mantener cocultivos de organoides con otras células del microambiente tumoral a largo plazo es todavía un desafío en este campo.

Por el momento, la utilización de estos modelos se ha encontrado restringida al estudio de tumores de estirpe epitelial, a excepción de algunos estudios realizados en glioblastoma y tumor rabdoide (12).

La falta de protocolos estandarizados en la obtención de las muestras, procesamiento y puesta en cultivo constituye una importante fuente de variabilidad técnica, lo que se traduce en una falta de reproductibilidad.

La obtención del material tumoral puede llevarse a cabo mediante muestras de biopsia sólida (del tumor primario o de una zona de metástasis) o biopsia líquida (células cancerosas obtenidas de derrame pleural o líquido ascítico; así como células tumorales circulantes, CTCs en sangre periférica).

Si bien la toma de biopsias no está exenta de riesgos, el uso de técnicas mínimamente invasivas para la obtención de muestras resulta muy interesante. En el contexto del cáncer de endometrio, la biopsia endometrial aspirativa, realizada de forma ambulatoria en la consulta ginecológica mediante cánulas de Cornier se hace adecuada para la generación de organoides.

Por su parte, la obtención de líquido ascítico mediante paracentesis en los casos que existe ascitis maligna es aplicable en los casos de cáncer ovárico. Estos abordajes no suponen someter al paciente a procedimientos sobreañadidos, lo que los hace muy atractivos por la facilidad de integrarlos en la actividad asistencial.

El ulterior procesamiento del material obtenido es determinante para la viabilidad celular y el rendimiento del proceso. Los fragmentos tumorales obtenidos por biopsia sólida pueden ser sometidos a procesos de disociación para obtener una suspensión de célula única (*single cell*) o seccionarse en fracciones de menor tamaño para la creación de los organoides. Las suspensiones de célula única permiten realizar técnicas de selección celular y crear así organoides de un subclón tumoral determinado.

Para conseguir un cultivo de organoides tumorales estable, es necesario partir de una muestra de tejido tumoral sin componente de órgano sano o seleccionar las estructuras tumorales durante el cultivo. El mayor desarrollo y sobrecrecimiento de los organoides de tejido sano con respecto a los tumorales puede constituir una limitación de la técnica. Este paradójico fenómeno puede explicarse por la mayor tasa de fracaso de mitosis y consecuente muerte celular que sufren las células tumorales, lo que condicionaría un crecimiento más lento (10). Las ventajas, limitaciones y posibles aplicaciones de los modelos de organoides se resumen en la Tabla 7:

<b>Ventajas</b>	<b>Limitaciones</b>	<b>Aplicaciones</b>
<p>Mantenimiento de las características del tumor original</p> <p>Reproducción de la variabilidad intra- e intertumoral</p> <p>Gran versatilidad</p> <p>Más rápidos y baratos que PDXs, no requiere uso de animales</p> <p>Posibilidad de estudio del TME, cocultivos con células inmunitarias</p> <p>Posibilidad de generar cultivos a largo plazo y biobancos</p> <p>Mayor tasa de éxito, estabilidad genética, epigenética y fenotípica que las líneas celulares</p> <p>Posibilidad de comparación con PDOs de tejido normal y pre- vs. post-tratamiento</p> <p>Correlación entre la sensibilidad farmacológica de los PDOs y respuesta terapéutica del paciente</p>	<p>Casi exclusivo de tumores epiteliales</p> <p>Costes y variabilidad en tasa de éxito en su generación</p> <p>Tiempo para establecer el cultivo puede ser elevado</p> <p>Falta de inclusión del TME en la mayoría de modelos (vascularización, células inmunitarias)</p> <p>Falta de estandarización en procesamiento de muestras y medios de cultivo</p> <p>Falta de estudios longitudinales para validación clínica</p>	<p><b>Investigación básica:</b></p> <p>Estudio de carcinogénesis</p> <p>Estudio de metástasis</p> <p>Caracterización molecular</p> <p>Desarrollo de fármacos</p> <p>Inmunoterapia</p> <p>CAR-T</p> <p>CRISPR</p> <p>Implicación del microbioma en la mutagénesis</p> <p><b>Implementación clínica:</b></p> <p><i>Screening</i> farmacológico</p> <p>Elección de terapias con menor toxicidad</p> <p>Caracterización molecular para terapias dirigidas e información pronóstica</p>

*Tabla 7: Resumen de las ventajas, limitaciones y posibles aplicaciones de los modelos de organoides. Elaboración propia.*

La Tabla 8 ilustra las diferencias de los principales modelos preclínicos más utilizados:

	Líneas celulares	PDTX	PDO
Tasa de éxito de formación	+-	++	+++
Facilidad de mantenimiento	+++	+-	++
Consumo de recursos	Bajo	Alto	Medio
Expansión	+++	+	++
Características fenotípicas in vitro	-	+++	++
Características genéticas in vitro	+-	++	++
Interacciones tumor-estroma	-	+	-
Representación del espectro del cáncer	+	++	++
Posibilidad de modificación genética	+++	-	+++
Incorporación de sistema inmune	-	-	+-
Screening de fármacos de <i>high-throughput</i>	+++	-	++

Tabla 8: Comparación de los tres modelos preclínicos descritos. Modificado de Drost et al. (12). (-: limitado, (+: intermedio), (+: bueno), (+++: muy bueno).

Se debe destacar que la falta de estandarización en los métodos de cultivo de organoides constituye un gran obstáculo en el momento actual. El desarrollo de protocolos de obtención y procesamiento de las muestras y composición de la matriz y medio de cultivo específico para cada tipo tumoral resultan de vital importancia para asegurar la reproductibilidad y permitir la comparación de resultados.

Los estudios disponibles hasta el momento apoyan la correlación entre las características del tumor original y los organoides derivados de este para cada paciente. Sin embargo, se necesitan estudios longitudinales de mayor tamaño muestral para considerar la implementación de organoides en la práctica clínica. El desarrollo de estudios estandarizados, introduciendo puntos de corte predefinidos para valorar la respuesta farmacológica, resultan imprescindibles para validar el método y utilizarlo en la toma de decisiones terapéuticas (13).

#### 1.4. USO DE ORGANOIDES EN LA INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO Y OVARIO

##### CÁNCER DE ENDOMETRIO

Los pioneros en el desarrollo de organoides endometriales fueron Boretto *et al.* (14), y Turco *et al.* (15). Ambos grupos sentaron las bases para el posterior estudio de estos modelos en tejido endometrial sano y enfermo (endometriosis, hiperplasia endometrial y cáncer de endometrio). La eficiencia en la generación de estas estructuras resultó ser menor en el caso de los organoides tumorales (20%), con dificultades para mantener el cultivo a largo plazo. El sobrecrecimiento de células no cancerosas sobre los organoides tumorales puede dar lugar a discrepancias en la correlación de las características genotípicas e histopatológicas. Boretto *et al.*, proponen añadir IGF1, HGF y lípidos al medio de cultivo, así como disminuir la concentración de p38i para obtener mejores tasas de eficiencia y propagación del cultivo. En su trabajo exponen la heterogeneidad morfológica demostrada en las diferentes líneas de

organoides generadas. Así, los organoides de tumores de bajo grado tienden a presentar una arquitectura glandular que recuerda al tejido original, con la formación de lúmenes; mientras que aquellos de alto grado o estadio suelen formar estructuras más densas y compactadas. Además, la caracterización histológica de los organoides permitió discernir entre cánceres de tipo 1 (con alta expresión de receptores de estrógenos) de los de tipo 2 (característicamente estrógeno-independientes). Los organoides demostraron retener las características genótípicas del tumor original aun tras la expansión del cultivo a largo plazo. El fenotipo *in vivo* fue valorado mediante el xenoinjerto ortotópico de los organoides en ratones. Los organoides de alto grado tendían a la invasión local y la diseminación peritoneal, mientras que los de bajo grado sufrían una menor proliferación sin tendencia a generar metástasis. También se demostró que los organoides reproducían respuestas farmacológicas específicas de cada paciente con el testado de quimioterápicos (carboplatino, paclitaxel, doxorubicina y 5-fluorouracilo) y everolimus (inhibidor de mTOR).

Los estudios de Maru *et al.* (16) constatan estos resultados, proponiendo un método de cultivo diferente para solventar el inconveniente de la limitada eficiencia del proceso. El método de cultivo MBOC (Matrix Bilayer Organoid Culture) permite eliminar las células muertas o de baja viabilidad que podrían afectar a la integridad de la matriz o de las células viables, manteniendo solamente aquellas con características *stem* o *progenitor-like*.

En la línea de los anteriores, el estudio de Berg *et al.* reporta el establecimiento de organoides y PDXs a partir de tejido tumoral de 21 pacientes con cáncer endometrial, destacando la similitud de la citoarquitectura y perfil genético entre las estructuras generadas y el tumor original. La identificación de una “firma genética” con implicaciones pronósticas validadas en la cohorte del TCGA para el cáncer endometrial avala las posibilidades que ofrecen estos modelos. La respuesta terapéutica de los organoides se correlacionaba con los resultados obtenidos *in vivo* (17).

## CÁNCER DE OVARIO

Hasta el momento, se han llevado a cabo varios estudios que demuestran las ventajas del uso de organoides en el estudio de este cáncer. Kopper *et al.* (18) estudiaron la correlación entre las características histológicas, genéticas y el perfil de respuesta al tratamiento con carboplatino-paclitaxel en 56 líneas de organoides de 32 pacientes portadoras de diferentes subtipos tumorales de cáncer de ovario. Como resultado, demostraron la posibilidad del mantenimiento a largo plazo estos cultivos (15-30 pases) y criopreservación sin afectar a la viabilidad de las células. También llevaron a cabo una caracterización histológica mediante H&E y el análisis con marcadores de OC como PAX8 y p53, que demostró la similitud con el tumor original. El análisis WGS reveló la correlación en el patrón de CNVs entre el tumor original y los organoides generados, manteniéndose estable a lo largo de los pases; lo que confirma que los organoides reflejaban las características genéticas del tumor a partir del cual habían sido generados. La sensibilidad farmacológica *in vivo* se valoró mediante el xenotrasplante ortotópico en ratones inmunodeprimidos de organoides que habían resultado ser sensibles a gemcitabina *in vitro*. El desarrollo del tumor en los ratones tratados con gemcitabina (n=7) se detuvo o incluso involucionó, en contraste con el crecimiento progresivo del tumor en los ratones que recibieron vehículo (n=9).

De igual modo, Maenhoudt *et al.* (19) constataron estos resultados en 27 pacientes de OC, aunque obtuvieron una eficiencia menor (33%) en la generación de organoides, con un mantenimiento del cultivo limitado a 1-2 pases. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre la generación de organoides a partir de muestras en fresco con respecto a aquellas previamente criopreservadas, lo que señala la posibilidad del almacenamiento de estas

previa a la puesta en cultivo. La velocidad de desarrollo de las estructuras fue variable entre las distintas pacientes, alrededor de 2-4 semanas. Posteriores ajustes en la composición del medio de cultivo permitieron aumentar la eficiencia y conseguir un mantenimiento de cultivo a largo plazo (>4 pases). Este trabajo describe diferentes perfiles morfológicos entre las estructuras generadas: un fenotipo denso, con lúmenes pequeños o ausentes; un fenotipo cístico compuesto por una capa de células creando un lumen amplio; y un tercer fenotipo de organoides poco cohesivos.

De manera similar a los resultados propuestos por Kopper *et al.*, se demuestra la correlación entre el perfil mutacional de los organoides y el tumor original del que derivan. Encontraron mutaciones *frameshift* y no-sinónimas en genes supresores de tumores (*CHEK2*, *CREBBP*, *FOXO1*, *PRKARIA*). El estudio de agentes quimioterápicos *in vitro* incluyó carboplatino, paclitaxel, doxorubicina y gemcitabina. Los resultados mostraron diferentes patrones de sensibilidad en función del paciente y en distintas líneas de organoides pertenecientes al mismo tumor, lo que señala la variabilidad de respuestas intra e intertumoraes.

El grupo de de Witte *et al.* (20) demuestra que la respuesta farmacológica de organoides de PDOs de cáncer de ovario reflejan la sensibilidad clínica del paciente a la quimioterapia de primera línea (carboplatino-paclitaxel). El estudio llevado a cabo en 7 organoides de 5 pacientes correlacionó el patrón de sensibilidad *in vitro* con la respuesta clínica medida mediante criterios bioquímicos (negativización del marcador CA-125), radiológicos (RECIST) e histopatológicos (score de respuesta a quimioterapia, CRS).

## 1.5. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de endometrio es la neoplasia ginecológica más frecuente entre las mujeres occidentales, mientras que el cáncer de ovario es la de mayor mortalidad. El cambio de paradigma en el tratamiento del cáncer hacia una medicina personalizada exige disponer de modelos preclínicos que reproduzcan de una manera fidedigna las características del tumor. De este modo, se abre la posibilidad al ensayo de terapias más eficaces a la par de menos tóxicas y el testado de fármacos diana en función de su perfil fenotípico y genotípico. En este contexto, el desarrollo de los organoides (cultivos tridimensionales de células tumorales embebidas en una matriz) constituye un acercamiento prometedor a este propósito. Estos modelos permiten también el estudio de los procesos de carcinogénesis y metástasis, con su potencial utilización en la investigación básica del cáncer.

Por este motivo, resulta de vital importancia desarrollar procedimientos que permitan implementar estos modelos en la práctica y avalen sus posibles aplicaciones.

## 2. OBJETIVOS

Los principales objetivos de este proyecto son:

1. Presentar un procedimiento de desarrollo de organoides a partir de muestras mínimamente invasivas de pacientes de cáncer de endometrio y ovario.
2. Realizar una caracterización preliminar de las estructuras generadas mediante técnicas de inmunofluorescencia para determinar su similitud con el tumor original.

Como objetivos secundarios se proponen:

1. Valorar el mejor método procedimental para conseguir aislar las células tumorales a partir de muestras de aspirado endometrial y líquido ascítico, así como para el mantenimiento de estas estructuras en cultivo.
2. Exponer las principales limitaciones de la técnica, la puesta a punto y mantenimiento.
3. Exponer las posibles aplicaciones clínicas como predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. DIAGRAMA DE TRABAJO

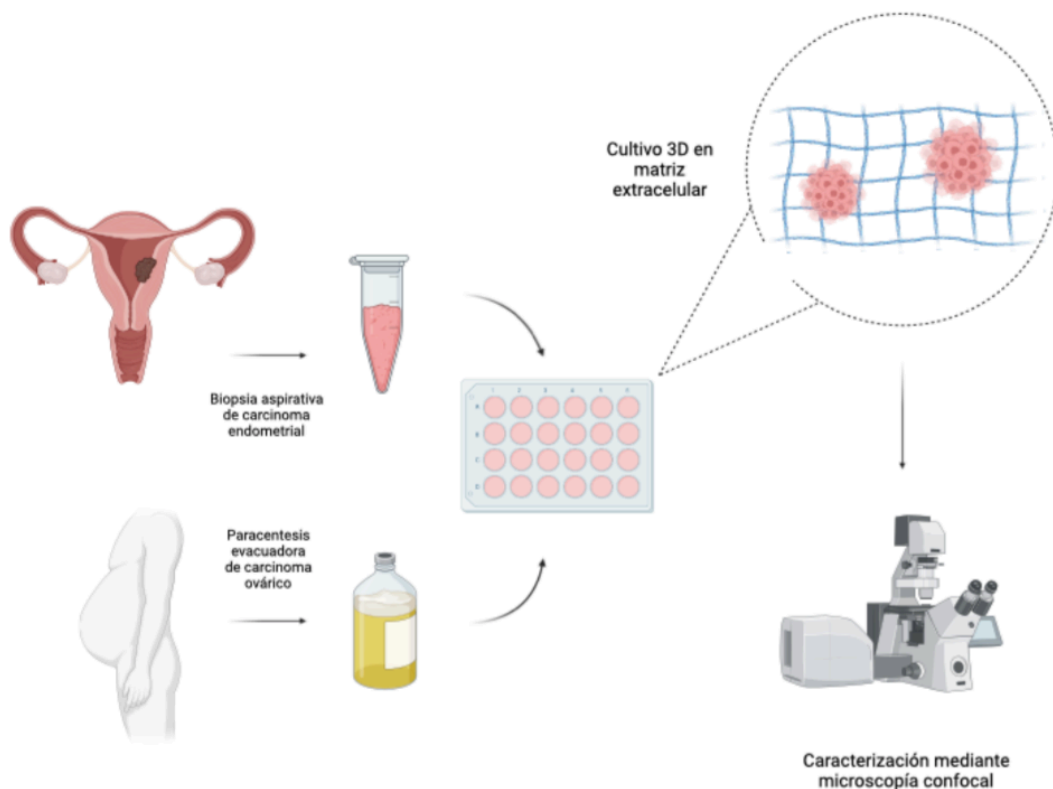


Imagen 4: Diagrama de trabajo. Creado con Biorender.com

### 3.2. SELECCIÓN DE PACIENTES

Este estudio ha sido aprobado por el *Galician Research Ethics Committee* (reference number 2017/430).

Las muestras tumorales fueron obtenidas de pacientes de cáncer de endometrio, tres de ellas de alto riesgo y tres de bajo riesgo de recurrencia (n=6); y cáncer de ovario (n=1) mediante consentimiento informado. Las muestras fueron recogidas en el momento de la cirugía (en el caso de tumor endometrial) o a partir de una paracentesis evacuadora (tumor ovárico) en el Hospital Universitario de Santiago de Compostela (CHUS). Las características clínico-patológicas de las pacientes incluidas en el estudio se recogen en la Tabla 9.

MUESTRA	ÓRGANO	RIESGO RECURRENCIA	FIGO	GRADO	TNM	DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO
EM1	Endometrio	Alto	IB	3	1-0-0	Endometrioide
EM2	Endometrio	Alto	IIIC2	3	3-2-0	Endometrioide
EM3	Endometrio	Alto	IA	2	1-0-0	Seroso
EM4	Endometrio	Intermedio	IA	3	1-0-0	Endometrioide
EM5	Endometrio	Bajo	IA	2	1-0-0	Endometrioide
EM6	Endometrio	Bajo	IA	1	1-0-0	Endometrioide
OV1	Ovario	Alto	IIIC	-	-	Seroso

Tabla 9: Características clínico-patológicas de los tumores de las pacientes incluidas.

### 3.3. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO: PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y PUESTA EN CULTIVO

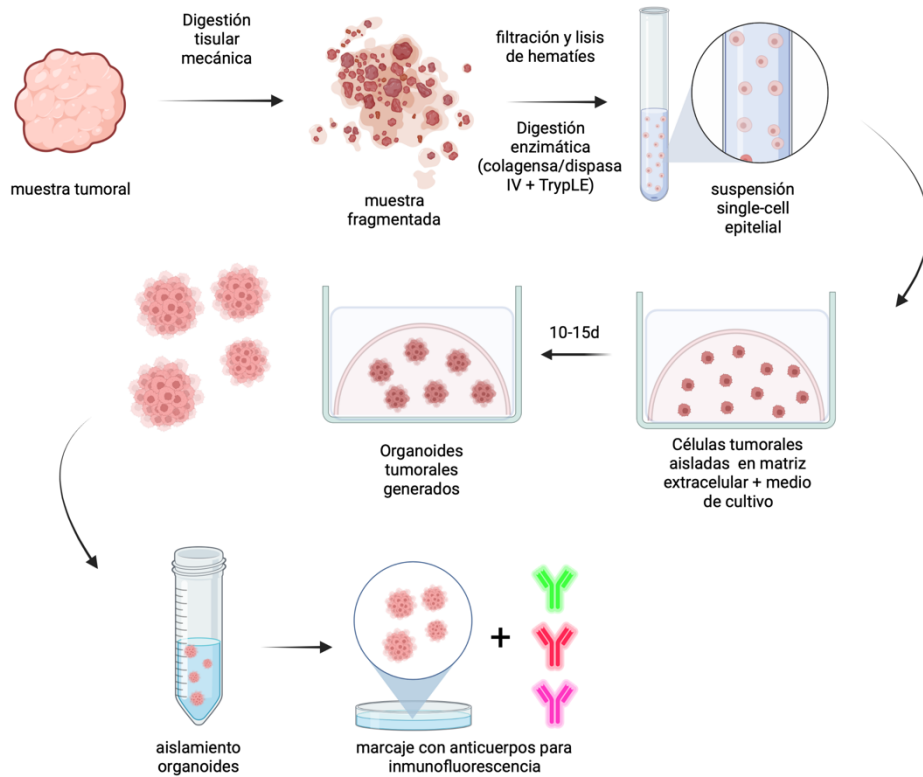


Imagen 5: Esquema del procedimiento. Creado con Biorender.com

### 3.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

#### 3.4.1. MUESTRAS DE CARCINOMA DE ENDOMETRIO

Las muestras de tejido neoplásico endometrial se obtuvieron en el momento de la cirugía, a partir de la pieza quirúrgica de histerectomía, mediante cánulas de biopsia aspirativa. Este método reproduce el material obtenido en las biopsias por aspiración ambulatorias rutinarias, en las que se consigue una muestra heterogénea del endometrio desprendido. Si bien en un alto porcentaje los tumores endometriales son propensos a descamar células tumorales, algunas formas atróficas podrían no ser detectadas por este procedimiento, lo que constituye una limitación de esta técnica.

El material obtenido por este método es heterogéneo, de tejido sano y neoplásico con cantidad de restos hemáticos y mucosos que dificultan su manejo.

El protocolo de procesamiento de la muestra ha sido diseñado y optimizado con el objetivo de conseguir el máximo rendimiento, para la obtención del mayor número de células epiteliales viables con la menor cantidad de eritrocitos y mucina. Para ello, es necesario un proceso de purificación (en la que se logre separar el material tisular de los restos de sangre y moco) y digestión tisular (disgregación del tejido endometrial en pequeños agregados celulares y célula única).

La purificación de la muestra se consigue mediante ciclos sucesivos de centrifugaciones y lavados con PBS. El filtrado del material permite retener los agregados de moco.

La hemólisis se consigue mediante un *buffer* hipertónico que provoca la ruptura de la membrana de los hematíes. La digestión tisular se realiza mediante un método mixto, mecánico y enzimático. En primer lugar, se realiza una ruptura grosera de los restos tisulares con tijeras iris, lo que, al aumentar la superficie de contacto del tejido con el reactivo, potencia la eficacia del medio de digestión enzimática (DMEM-F12, 1.25U/mL Dispasa II, 0.4mg/mL Colagenasa IV). Tras la incubación en agitación a 37°C 400xg durante 40`-1 hora con el medio de digestión, se realiza una incubación con TrypLE™, un sustitutivo de tripsina comercial. Una vez obtenida una suspensión de célula única, las muestras deben ser refrigeradas inmediatamente para no comprometer la viabilidad celular.

Tras el procesamiento de la muestra, se realiza el conteo de la suspensión celular obtenida valorando su viabilidad. El conteo celular puede realizarse mediante contadores automatizados o mediante un método manual mediante microscopía óptica con cámara de Neubauer. La adición del colorante azul tripán permite discriminar la viabilidad celular, penetrando en el citoplasma de las células muertas, por lo que estas se verán azules al microscopio. En función de la concentración celular obtenida, se resuspende la muestra en el medio de congelación (FBS/10%DMSO) necesario para obtener una concentración celular de 10<sup>6</sup> céls/mL. El DMSO impide la formación de cristales de hielo en el interior celular, lo que provocaría su destrucción. La congelación celular debe ser paulatina, por lo que los crioviales se introducen en el congelador a una temperatura de -80°C dentro de un recipiente de congelación (Mr. Frosty™), el cual permite reducir la temperatura de las muestras a la velocidad recomendada de 1°C/min. Para un almacenamiento a largo plazo (meses-años), las células se mantienen en el tanque de nitrógeno líquido (-196°C).

El protocolo del procedimiento se recoge en el anexo 1.

### 3.4.2. MUESTRAS DE CARCINOMA OVÁRICO

Si bien el líquido ascítico normal es paucicelular (recuento leucocitario <250 céls/mm<sup>3</sup>), la ascitis neoplásica o maligna contiene un mayor número de células inflamatorias y cancerosas descamadas de la masa tumoral ovárica. El aislamiento de estas es más sencillo en comparación con las muestras de tejido endometrial, ya que las células neoplásicas se encuentran ya libres o formando pequeños agregados en una solución de agua y proteínas. El líquido ascítico se mantiene refrigerado en una cubeta con hielo desde el momento de la paracentesis hasta su procesado. Mediante centrifugación se obtiene un *pellet* celular sobre el que se realizará un lavado con PBS. Si el *pellet* tiene aspecto hemático, se realizará lisis osmótica de eritrocitos con *buffer* hipotónico. El conteo células con cámara de Neubauer y valoración de viabilidad celular con azul tripán se realiza de igual forma que en las muestras de endometrio. Sendos procesos de refrigeración y congelación se realizan de forma análoga, con la misma concentración celular (10<sup>6</sup> céls/mL). El protocolo diseñado se detalla en el anexo 2.

### 3.5. PUESTA EN CULTIVO DE ORGANOIDES

La generación de organoides se consigue a partir de un cultivo celular en 3D. Para ello, se cultiva una suspensión celular embebida en una matriz de membrana basal (BME). La matriz polimeriza formando unas gotas tridimensionales semiesféricas de consistencia gelatinosa, que sirven de soporte estructural a las células contenidas en su interior. Posteriormente, estas gotas se cubren de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con nutrientes y factores de crecimiento específicos para optimizar el desarrollo de células neoplásicas endometriales y ováricas.

Para establecer la concentración celular de partida en cada gota debe tenerse en cuenta el balance entre el rendimiento de estructuras desarrolladas y el nivel de detritus que se produce mediante necrosis de células no viables y proliferación de fibroblastos. Las células necróticas pueden comprometer el desarrollo de las células viables.

La relación entre el medio de cultivo y la matriz ha de ser óptima para permitir un buen desarrollo de las estructuras que permita la manipulación y el posterior aislamiento de los organoides. En este estudio se han ensayado diferentes proporciones de BME (50-50, 40-60, 30-70). A medida que disminuye la cantidad de matriz, disminuye la consistencia de las gotas y la velocidad de desarrollo de los organoides. Sin embargo, se facilita la despolimerización de las gotas para el aislamiento de las estructuras sin requerir métodos demasiado agresivos que pudieran afectar a la viabilidad celular.

#### 3.5.1. MEDIO DE CULTIVO

Como medio de cultivo se ha usado DMEM-F12 enriquecido con nutrientes y factores de crecimiento específicos para el tipo celular a estudio. Las gotas de BME son cubiertas con 500 $\mu$ L de medio por pocillo. Los cambios de medio se realizan de forma sistemática cada 48h (el viraje de color del colorante rojo fenol que incluye el medio es indicativo de la acidificación de este). La alícuota de medio de cultivo debe ser atemperada a 37°C previamente al contacto con el cultivo celular. En cada cambio se mantienen 50 $\mu$ L de medio antiguo, ya que es rico en factores secretados por las propias células que favorecen el crecimiento celular. La relación de los distintos suplementos del medio de cultivo y su concentración se recogen en la Tabla 10.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN FINAL	FUNCIÓN
DMEM-F12	-	Medio basal
B27	2%	Promueve el crecimiento y mantenimiento de las células sin diferenciación
ANTIBIÓTICO/ANTIFÚNGICO	1%	Antibiótico y antifúngico: 10.000 unidades/ml de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B
N2	1%	Suplemento sin suero que permite el crecimiento y mantenimiento de las células.
GLUTAMAX	1%	Dipéptido L-alanina-L-glutamina, suplemento estable de L-glutamina, fuente energética para células de rápido crecimiento
ITS	1%	Insulina, transferrina y ácido selénico. Estimula la proliferación celular bajo condiciones reducidas de suero
N-ACETYL-CYST	1.25nM	Antioxidante y mucolítico
h-NOGGIN	2.17nM	Inhibidor de BMP
h-RSPO1	7.5nM	Agonista de Wnt
SB 2021190	10uM	Inhibidor de p38, aumenta proliferación, disminuye diferenciación
NICO	2mM	Supresor de la actividad de sirtuinas, aumenta proliferación, disminuye diferenciación
B-ESTRADIOL	1nM	Agonista de receptores estrogénicos
EGF	8nM	Activador de la señalización dependiente de receptores tirosín-kinasa, aumenta proliferación en células epiteliales.
b-FGF	0.1nM	Promueve el crecimiento celular activando al receptor de membrana FGFR.
A83-01	0.6µM	Inhibidor de receptores de TFG-beta (Alk4/5/7). Evita la diferenciación de las células.

Tabla 10: Componentes del medio de cultivo.

### 3.5.2. PROCEDIMIENTO DE PUESTA EN CULTIVO

En este trabajo se han incluido dos técnicas de puesta en cultivo: el método descrito de BME-droplets (gotas de matriz cubiertas por medio de cultivo) y el método de bicapa de matriz descrito por Maru y colaboradores (MBOC: *BME bilayer organoid culture*) (16). El método de bicapa permite eliminar células muertas y detritus no integrados en la primera capa de BME, las cuales podrían repercutir negativamente en la viabilidad de las células vivas y en la integridad de la matriz. De esta forma, se obtiene una mayor tasa de desarrollo de estructuras. La principal limitación de la técnica es la gran cantidad de matriz necesaria para cada pocillo, lo que la hace menos eficiente y dificultosa a la hora de aislar los organoides.

#### A) BME droplets

Para la puesta en cultivo en gotas de BME, las células previamente sometidas a una descongelación rápida son resuspendidas en 25µL (para una relación 1:1) de medio de cultivo

por cada pocillo a sembrar. Las alícuotas de BME deben descongelarse a a 4°C para impedir su polimerización a temperatura ambiente. La manipulación de estas durante el procedimiento debe ser realizada en frío. Se recomienda utilizar puntas *low binding* o realizar un *coating* de la punta con BSA para minimizar la adherencia de la matriz a la misma. Posteriormente, la suspensión de células es integrada a una cantidad equivalente de matriz. Sobre una placa p24 atemperada en el incubador a 37° durante 30 minutos se siembran gotas de 40 µL en el centro de cada pocillo. La placa se incuba a 37° durante 20 minutos para facilitar la polimerización de la matriz, de forma invertida (por gravedad se separan las células en diferentes planos permitiendo un crecimiento tridimensional más adecuado). Posteriormente, se añaden 500 µL de medio de cultivo atemperado a cada pocillo. Este debe ser suplementado con *rock-inhibitor* (RI) durante la primera semana, en vistas a prevenir el fenómeno de anoikis mientras gran parte del cultivo se encuentre en forma de célula única. El protocolo del procedimiento se recoge en el anexo 3.

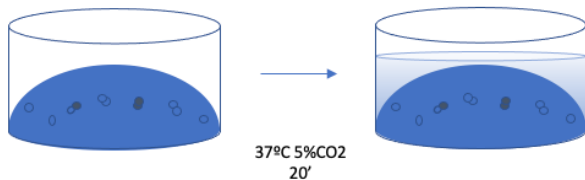


Imagen 6: Esquema del método BME droplets

### B) Método MBOC (*BME Bilayer Organoid Culture*)

En esta técnica, se dispone una capa de BME de 65µL en cada pocillo a sembrar de una placa p24. Una vez polimerizada la matriz, se añaden 800 µL/pocillo de una suspensión de las células tumorales en medio de cultivo suplementado atemperado a 37°C. La placa se incuba *overnight* a 37°C. Las células viables se integran y adhieren a la capa de BME, mientras que las células muertas o con limitada viabilidad quedarán suspendidas en el medio de cultivo. A la mañana siguiente, el medio de cultivo se descarta y se añade otra capa de BME de 70µL. Tras 20-30 minutos de incubación de la placa a 37°C, se añaden 500µL de medio de cultivo fresco en cada pocillo. Al igual que en el método anterior, es necesario que el medio incluya RI para así disminuir la muerte celular por anoikis.

El protocolo del procedimiento se recoge en el anexo 4.

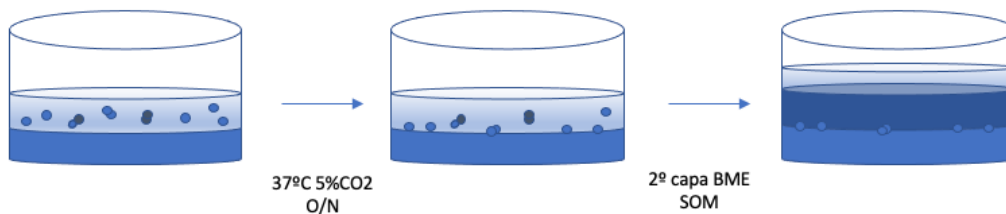


Imagen 7: Esquema del método MBOC

### 3.6. MANTENIMIENTO DEL CULTIVO Y SEGUIMIENTO

Una vez generados los cultivos a partir de la muestra tumoral de cada paciente, el mantenimiento consiste en realizar cambios de medio de cultivo cada 48h. La frecuencia del cambio de medio debe ser adaptada a los requerimientos de nutrientes de cada cultivo, en función de la tasa de crecimiento y la concentración celular de partida. El indicador de pH rojo fenol incluido en el DMEM-F12 cambia de color hacia tonalidades más amarillentas (consecuencia de la acidificación del medio por el metabolismo celular), orienta la necesidad de cambio. Los cambios morfológicos consecuencia del desarrollo de organoides fueron evaluados mediante micrografías seriadas tomadas con un microscopio invertido.

#### PASES Y MANTENIMIENTO DEL CULTIVO EN EL TIEMPO

Con el objetivo de mantener en el tiempo una línea de organoides en cultivo de los tumores de cada una de las pacientes, fueron realizados pases a dilución 1:2. El momento del pase se determina en función del crecimiento celular, aproximadamente cuando se alcanza una densidad del 80% en cada pocillo, alrededor del día 15 del cultivo.

Para ello, las estructuras deben ser liberadas de la matriz. La disgregación puede ser llevada a cabo mediante técnicas mecánicas, químicas o ambas en combinación. En este proyecto se describen ambos procedimientos, con el fin de determinar el método menos lesivo para los organoides. Si se desea una disgregación intercelular de las estructuras para obtener un nuevo cultivo a partir de célula única, puede realizarse una incubación con TrypLE durante 5min a 37°C. Posteriormente, la enzima debe ser inactivada con DMEM-F12.

##### a) Método químico: *Cell Recovery Solution* (Corning®)

En este procedimiento, el medio de cultivo de la placa es aspirado y se añade 1mL/pocillo de *Cell Recovery Solution*, un compuesto no enzimático que despolimeriza el BME. Se realizan dos lavados de los pocillos con PBS para recuperar los posibles organoides que quedasen adherido a las paredes de la placa. El material obtenido es recogido en tubos de 1.5mL y se dejan en agitación durante 30 minutos a 4°C. La agitación ayuda a la liberación de las estructuras retenidas en el BME.

##### b) Método mecánico: sin *Cell Recovery Solution*

La disgregación se realiza con ayuda de una punta de pipeta serológica de 2.5mL sin retirar el medio de cultivo. Una vez conseguida una mezcla de consistencia homogénea, se pipetea 10 veces con pipeta serológica y posteriormente con micropipeta P1000. Los pipeteos seriados facilitan la disgregación de los organoides a la matriz. De manera análoga al método anterior, se realizan dos lavados de cada pocillo con PBS. Si macroscópicamente quedan restos de matriz la base del pocillo, podrán levantarse con la ayuda de un *scraper*.

La centrifugación en este caso debe ser más intensa (800xg) puesto que el BME polimerizado dificulta la obtención del pellet.

### 3.7. VALORACIÓN CUALITATIVA DE RENDIMIENTO Y EFICIENCIA DE LOS DISTINTOS MÉTODOS

Para llevar a cabo la valoración del rendimiento de los distintos métodos de manera cualitativa, se seleccionó una imagen representativa de las diferentes densidades del cultivo obtenidas. La evaluación de la eficiencia de los métodos de cultivos se realizó comparando una

imagen de este frente a la imagen de referencia. Se asignó un valor (+) para un rendimiento del 0-33%, (++) para el intervalo 33-66% y (+++) para un rendimiento del 66-100%.

La Imagen 8 expone las microfotografías representativas utilizadas para la valoración:

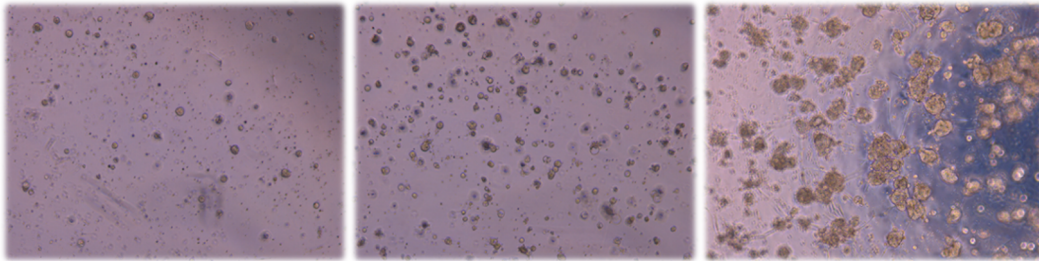


Imagen 8: Fotografía A (0-33%, +); fotografía B (33-66%, ++), fotografía C (66-100%, +++).

### 3.8. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

Los organoides generados a partir de la muestra de líquido ascítico, fueron caracterizados mediante inmunofluorescencia para poner de manifiesto su origen epitelial ovárico. Para ello, se realizó un marcaje mediante anticuerpos dirigidos contra diferentes proteínas citoplasmáticas y nucleares: PAX8 (factor de transcripción cuya expresión está aumentada en el cáncer ovárico no mucinoso), pan-Citoqueratinas (combinado de diferentes citoqueratinas, expresadas por células epiteliales), vimentina (marcador de estirpe mesenquimal). Los núcleos fueron marcados con NucBlue™, molécula fluorescente que se une a las secuencias de DNA ricas en timina y adenina.

En primer lugar, las gotas de BME que contienen los organoides se fijan con PFA al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente en una placa petri. El formaldehído disolverá parcialmente la matriz. Los organoides liberados se separan por decantación en un tubo de 50mL. La solución fijadora se aspira y se realizan varios lavados con PBS, agitando el tubo para intentar liberar los organoides retenidos en la matriz. Es importante no pipetear las estructuras para conservar su integridad. Una vez fijados, los organoides pueden ser almacenados en una solución de PBS a 4°C durante un mes.

Los organoides fijados deben ser permeabilizados para favorecer la entrada de los anticuerpos al citoplasma y núcleo celular. Para ello, se centrifuga la solución que contiene las estructuras y se añade 1mL de Tritón X-100. La mezcla se incuba sobre balancín durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incuba en balancín con solución de bloqueo (BSA al 5%) durante 2-4 horas a temperatura ambiente, para disminuir la unión inespecífica de los anticuerpos.

La mix de anticuerpos se prepara en solución de bloqueo (BSA al 5%), atendiendo a las concentraciones recomendadas por el fabricante para cada anticuerpo: PAX8 (1:100), Pan-CK PE (1:50) y Vimentina AF647 (1:200). La incubación se realiza *overnight* a 4°C.

Los anticuerpos utilizados anti-vimentina y pan-citoqueratinas son conjugados. Para PAX8 se ha utilizado un anticuerpo primario de conejo, por lo que es necesario una segunda incubación con un anticuerpo conjugado anti-*rabbit* (anti-Rb AF488 1:500) durante 1 hora, junto con la incubación con DAPI. Tras 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno, las muestras están listas para visualizarse con microscopía confocal.

El protocolo de inmunofluorescencia se detalla en el anexo 7.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. MÉTODO DE PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

El procedimiento descrito para procesar las muestras de aspirado endometrial y líquido ascítico resultó ser adecuado, consiguiendo en todos los casos una suspensión de células epiteliales aisladas con una viabilidad de >75% (umbral preestablecido para introducir la muestra en el estudio o desestimarla).

La heterogeneidad del material de partida en las muestras de endometrio condiciona el proceso, ya que la presencia de material mucoide dificulta la disgregación del tejido epitelial y la acción de las enzimas proteolíticas. En ocasiones fue necesario ajustar los ciclos de centrifugación a las características de la muestra. El contenido hemático de las muestras procesadas también fue variable y requirió 2-3 incubaciones sucesivas con buffer de lisis de eritrocitos.

El método de procesamiento desarrollado para la muestra de líquido ascítico es una variante simplificada del utilizado para las muestras de endometrio, debido a la composición de este. La escasez de restos hemáticos o moco facilita la manipulación de la muestra. En contraposición con las muestras de aspirado endometrial, la concentración de células en líquido ascítico es mucho menor, pero no supone una limitación debido al gran volumen de líquido obtenido en cada paracentesis.

No se observaron diferencias en el rendimiento de los cultivos generados a partir de las células en fresco (inmediatamente después del procesamiento de la muestra) frente a las alícuotas congeladas de las mismas pacientes.

### **4.2. MÉTODO DE CULTIVO: BME droplets vs. MBOC**

En este estudio comparamos de forma cualitativa el método tradicional de cultivo de organoides, ampliamente extendido, frente al propuesto por Maru *et al.* (MBOC) en muestras de la misma paciente, puestas en cultivo en el mismo día. En todas las muestras del método de siembra tradicional en gota, se sembraron 12 pocillos de una p24 por cada paciente, con 50 000 células por pocillo, con una razón BME-medio de 1:1. En las muestras sembradas con el método MBOC, se sembraron 250 000 células en una monocapa de matriz; tras 24 horas las células se lavaron manteniendo así sólo la fracción viable, esta se recubre de nuevo con una segunda capa de matriz.

La aparición de estructuras multicelulares fue evidente el día 3-4, mientras que con el método tradicional la identificación de los primeros organoides se retrasó al día 7. Durante la segunda semana el cultivo en gota parecía igualarse al de MBOC. El método MBOC puede conseguir mayor rendimiento de cultivo gracias al mayor ratio de células viables debido al desecho de células muertas o con menor viabilidad que interfieren negativamente con el desarrollo de estas. Sin embargo, es importante destacar que, aunque el cultivo con el método MBOC permite una generación más rápida de organoides en tiempos más cortos, este método de cultivo conlleva un gasto significativamente más alto que el método tradicional, al requerir una cantidad de matriz 7 veces superior.

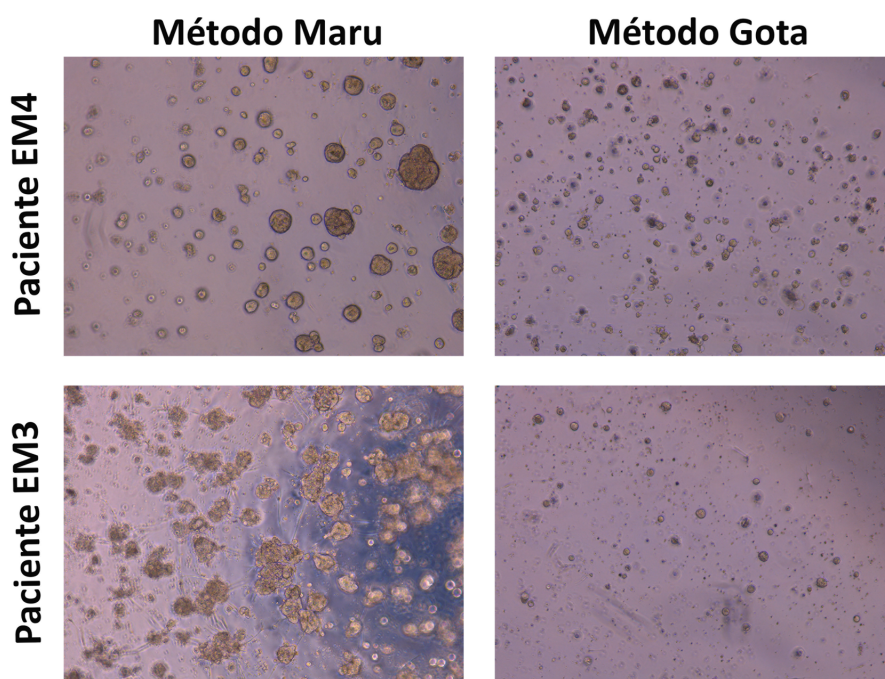


Imagen 9. Comparación de métodos de cultivo MBOC vs. Método de Gota.

La siguiente tabla recoge una comparación cualitativa de ambos métodos de cultivo:

	MBOC	BME droplets
Necesidades de BME	+++	+
Momento aparición de organoides	Día 3-4	Día 7
Momento 1º pase de cultivo	Día 15	Día 15
Manipulación/aislamiento organoides	Difícil, pérdida de estructuras en la manipulación	Más sencilla
Rendimiento	++	+
Eficiencia	+	+++

Tabla 11: Comparación cualitativa de métodos de cultivo de organoides. MBOC vs BME droplets.

### 4.3. OBTENCIÓN DE ORGANOIDES Y MANTENIMIENTO

El rendimiento de los cultivos generados presentó gran variabilidad entre pacientes, no pudiendo ser atribuido a la viabilidad de la suspensión celular de partida, ya que esta fue de aproximadamente 90%, similar en todas las muestras. Esta heterogeneidad en la tasa de éxito de los cultivos se describe en la literatura y constituye una de las limitaciones de estos modelos en la actualidad.

El tiempo necesario para visualizar las primeras estructuras multicelulares compatibles con organoides fue en promedio de 6 días. Los cambios de medio de cultivo se realizaron a días alternos, coincidiendo con la acidificación del medio de cultivo.

La morfología de los organoides también sufrió una acusada heterogeneidad entre pacientes, pudiendo describir dos patrones característicos: uno de células densamente agregadas y otro de células dispuestas de manera excéntrica con la formación de un lumen en su interior. En las pacientes estudiadas, aquellas de alto riesgo (EM1, EM2, EM3) se asociaban

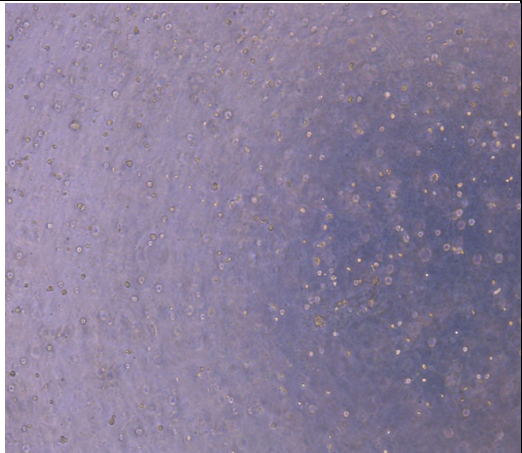
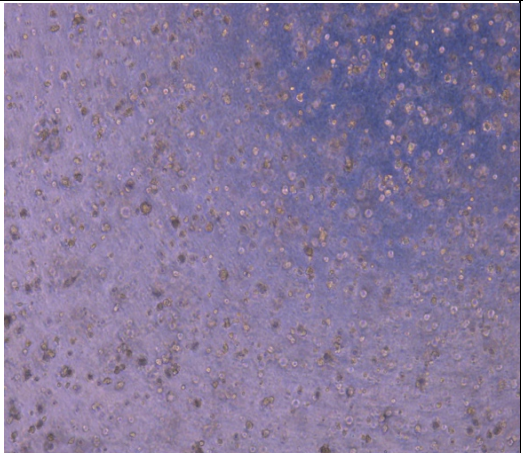
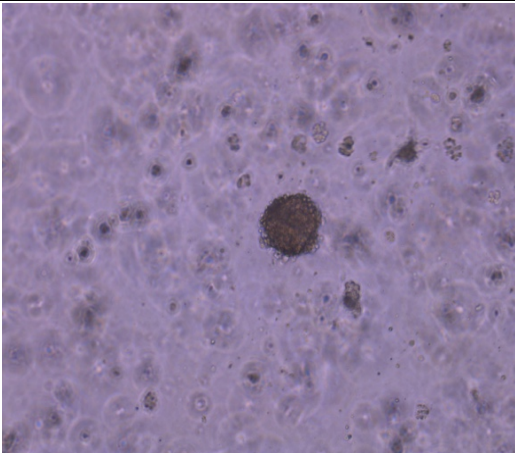
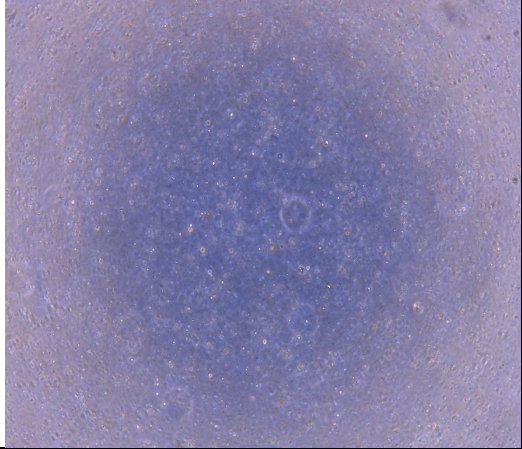
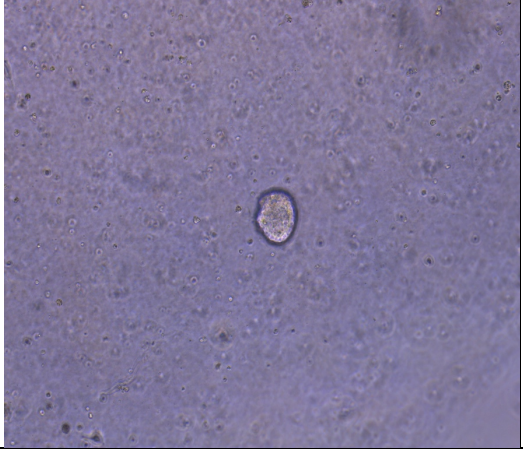
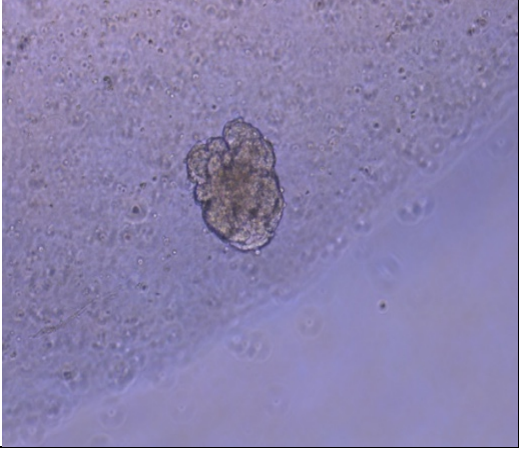
con organoides de morfología más densa, mientras que las de bajo riesgo (EM5, EM6) tendían a formar estructuras quísticas (Tabla 12, imágenes días 12-14). Esta diversidad morfológica ya fue descrita en la literatura, en los trabajos de Boretto *et al.* (14) y Berg *et al.* (17)

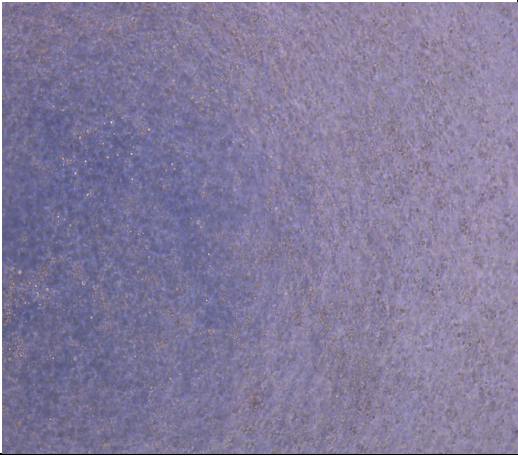
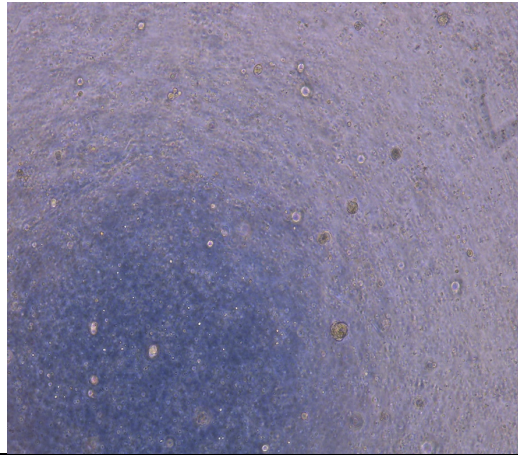
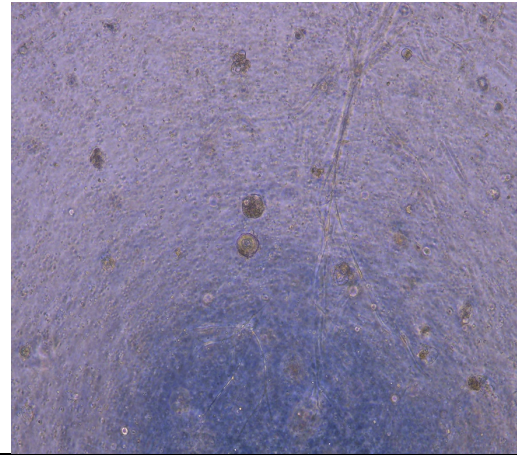
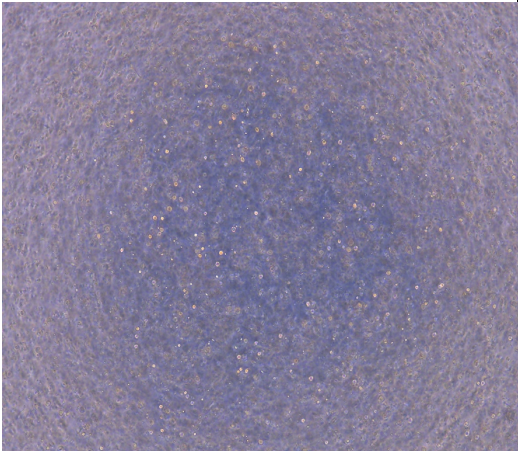
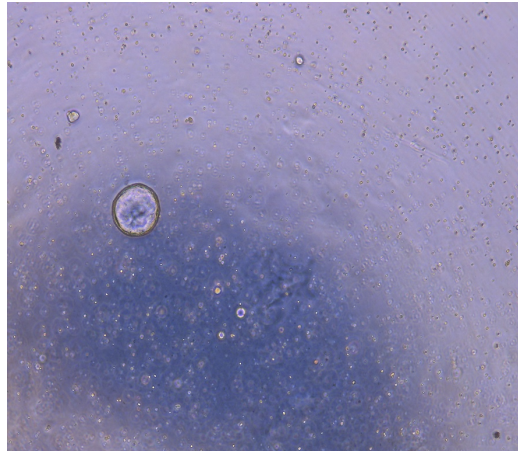

La morfología de los organoides de ovario fue heterogénea, con estructuras más condensadas intercaladas entre organoides quísticos, estos últimos de aparición más tardía en el cultivo. No podemos descartar que los organoides compactos sufrieran un proceso de necrosis central que justificase la degeneración a formas quísticas.

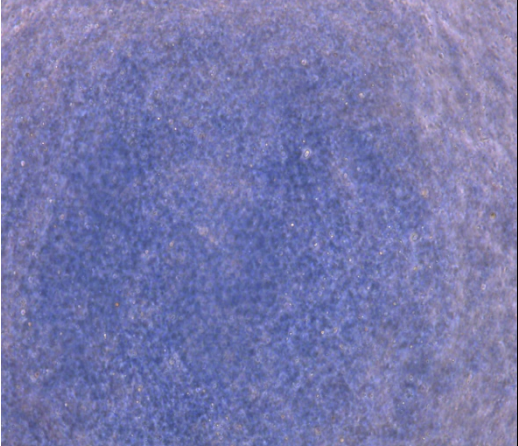
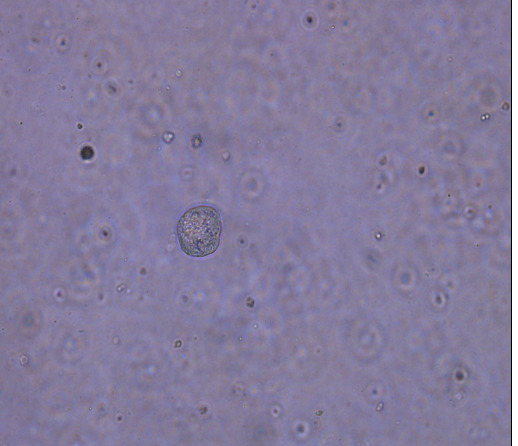
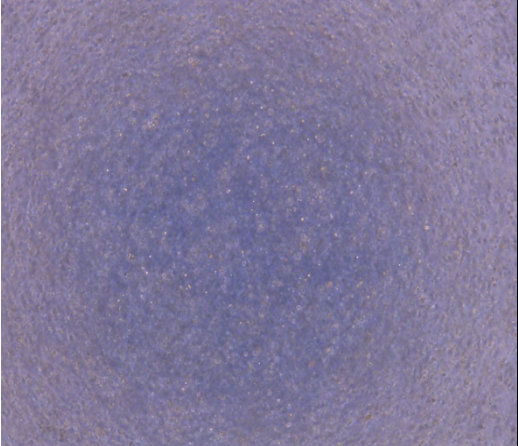
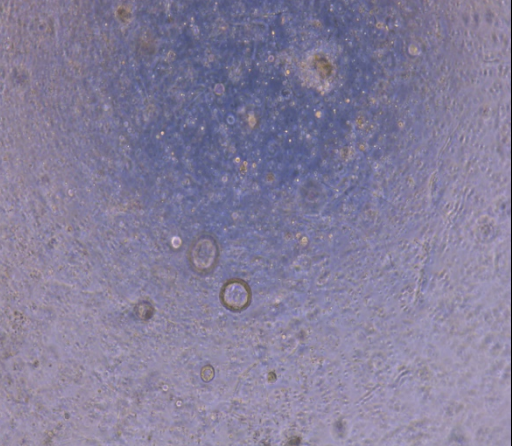
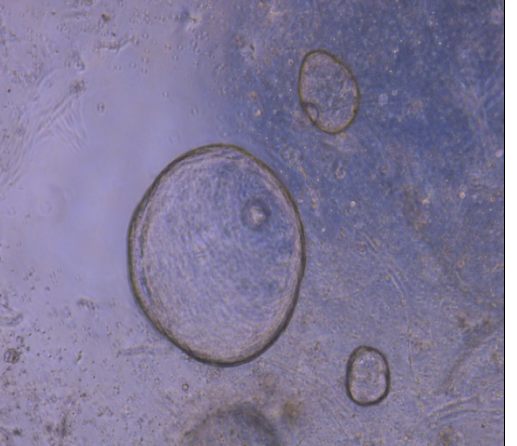
En los primeros días del cultivo también aparecían células de morfología fusiforme adheridas al fondo del pocillo compatibles con fibroblastos, que posteriormente desaparecían mediante selección negativa.

En los cultivos de pacientes de bajo riesgo de carcinoma endometrial se identificaron estructuras multicelulares bien diferenciadas con morfología glandular compatibles con organoides desarrollados a partir de tejido endometrial sano. Como se señala en la Introducción, es típico observar un sobrecrecimiento de los organoides sanos con respecto a los tumorales, lo que dificulta la consecución de un cultivo de organoides tumorales únicamente.

A continuación, se exponen las fotografías tomadas del cultivo en diferentes momentos (día 0, días 6-7, días 12-14):

		d0	d6-7	d12-14
ENDOMETRIO ALTO RIESGO	EM1			
	EM2			

ENDOMETRIO		d0	d6-7	d12-14
BAJO RIESGO	EM4			
ALTO RIESGO	EM3			

ENDOMETRIO		d0		
		d6-7		
BAJO RIESGO		d12-14		
		EM5		
EM6				

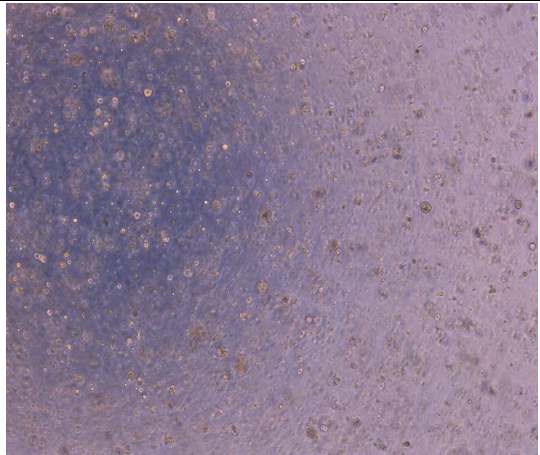
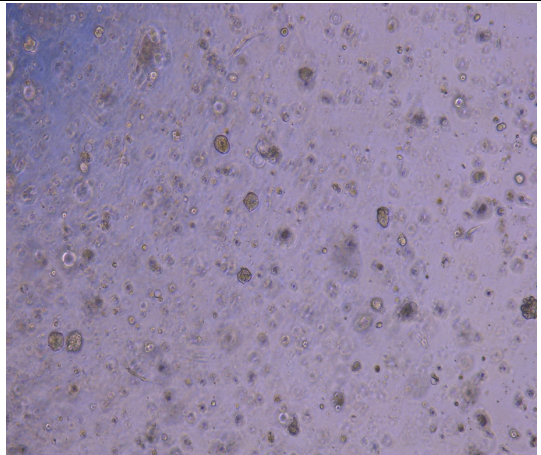
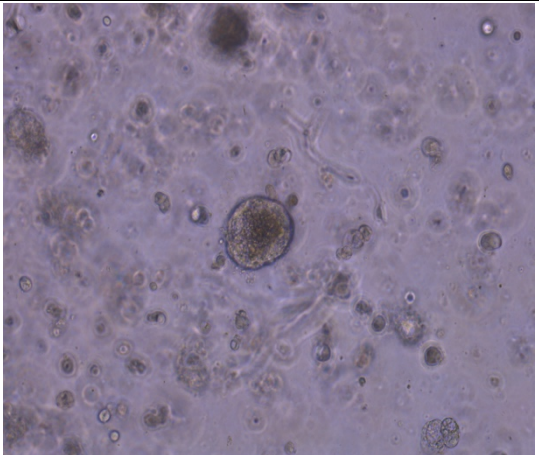
		d0	d6-7	d12-14
OVARIO	OV1			

Tabla 12: Imágenes seriadas del cultivo.

#### **4.4. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS DE ORGANOIDES**

Para poder amplificar los cultivos de organoides y mantenerlos en el tiempo, alrededor del día +15, cuando se obtuvieron cultivos con una densidad celular suficiente, se procede a la disrupción de la matriz con el objetivo de liberar las estructuras generadas para su disgregación y resiembra. Para ello, se llevó a cabo una comparación de distintos métodos para poder identificar el más efectivo: mediante disrupción mecánica y/o mediante disrupción enzimática.

En cuanto al método mecánico se disgregó la matriz y las células de los organoides mediante pipeteo con puntas de menor calibre de manera secuencial generando altas presiones que permitieron la disociación de las células sin afectar dramáticamente a la viabilidad de estas. Por otro lado, el método enzimático y con *Cell Recovery Solution* implicaba una primera disrupción mecánica de la matriz y una posterior incubación con el reactivo durante 20 minutos a 4°C lo cual afectaba negativamente a la cantidad de material obtenido y a su viabilidad, además debido al alto número de lavados requeridos para eliminar el reactivo se perdían gran cantidad de células.

En nuestro caso, el método más efectivo fue la disrupción mecánica lo cual nos permitió minimizar la manipulación de los organoides, disminuyendo las pérdidas y manteniendo una alta viabilidad celular consiguiendo finalmente obtener un cultivo estable a lo largo del tiempo.

#### **4.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS ORGANOIDES DE CÁNCER OVÁRICO MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA**

Los organoides de tumor ovárico fueron caracterizados de forma preliminar con los marcadores PAX8, panCKs y vimentina (Imagen 10). La intensidad de señal obtenida fue moderada para los tres marcadores, con una distribución celular congruente con la esperada. Los organoides caracterizados presentaban una morfología esférica con un lumen central. La polaridad celular se evidenció mediante un marcaje con Vimentina más intenso en la membrana basal con respecto a la apical. El marcaje con panCKs fue homogéneo por todo el citoplasma celular. PAX8, factor de transcripción nuclear, se confinaba a la región nuclear, marcada con DAPI.

Esta caracterización permite evidenciar el mantenimiento de las características fenotípicas del tumor original, a nivel de expresión de marcadores propios de las células tumorales ováricas, así como a nivel morfológico con preservación de la polaridad celular.

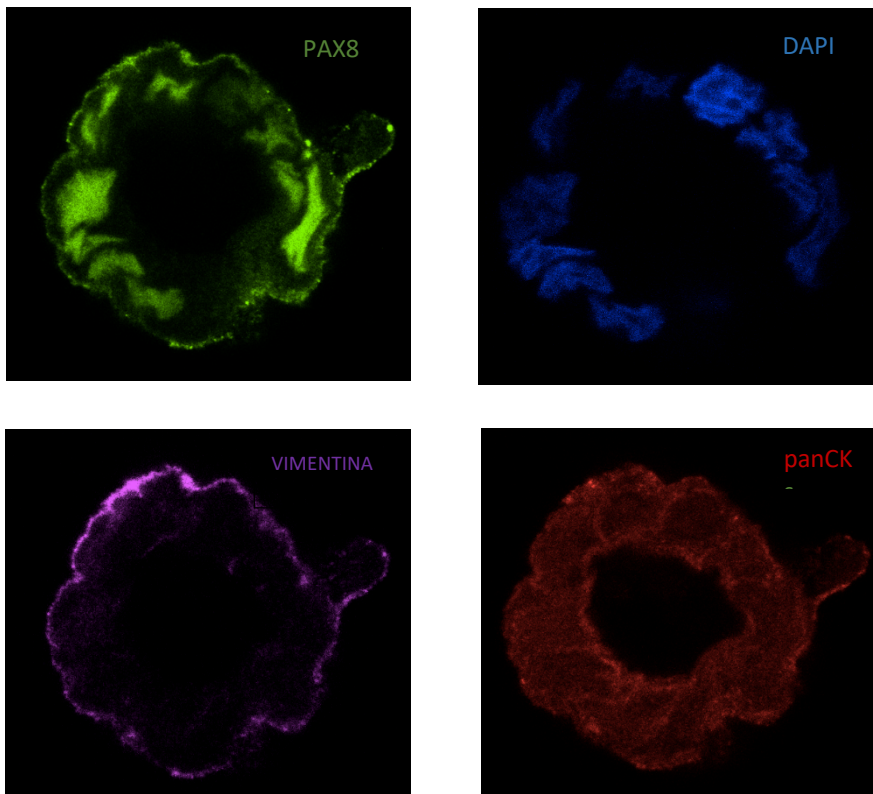


Imagen 10: Inmunofluorescencia de un organoide de cáncer ovárico.

## 5. CONCLUSIONES

- El método de procesamiento de las muestras desarrollado ha permitido obtener una suspensión de célula epitelial única con una viabilidad >75% en todos los casos.
- El método MBOC permite la obtención de estructuras 3-4 días antes que el método de gota, pero la manipulación posterior se ve dificultada, además de tener un mayor coste por mayor cantidad de reactivos.
- La tasa de éxito en la generación de organoides y el rendimiento del cultivo fueron muy variables entre las distintas muestras, no pudiendo atribuir la variabilidad a diferencias en la viabilidad de la suspensión celular de partida.
- El método mecánico permite una mayor viabilidad de las estructuras generadas sin uso de reactivos, frente al método enzimático y químico.
- La caracterización mediante inmunofluorescencia de los organoides de cáncer ovárico ha evidenciado positividad para el marcador PAX8 (característico de tumor de ovario), citoqueratinas (típico de estirpe epitelial) y vimentina, reflejando el mantenimiento de la polaridad celular.
- Es necesario estandarizar protocolos en el manejo de los organoides del cáncer endometrial y ovárico, así como desarrollar ensayos con un mayor número de pacientes para implementar su uso en la toma de decisiones terapéuticas en la práctica clínica.

## 6. REFERENCIAS

1. Santaballa A, Matías-Guiu X, Redondo A, Carballo N, Gil M, Gómez C, et al. SEOM clinical guidelines for endometrial cancer (2017). *Clin Transl Oncol* 2017 Dec 13;20(1):29-37.
2. Spriggs D. Gynecologic Malignancies. En: Jameson J, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 20e. McGraw Hill; 2018.
3. Hollis RL, Gourley C. Genetic and molecular changes in ovarian cancer. *Cancer biology & medicine* 2016;13(2):236-247.
4. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today>, acceso [06 de Abril 2022].
5. Catus L, Gallardo A, Prat J. Molecular genetics of endometrial carcinoma. *Diagnostic histopathology* (Oxford, England: 2008) 2009;15(12):554-563.
6. Alexa M, Hasenburg A, Battista MJ. The TCGA Molecular Classification of Endometrial Cancer and Its Possible Impact on Adjuvant Treatment Decisions. *Cancers* 2021 Mar 23;13(6):1478.
7. Concin N, Matias-Guiu X, Vergote I, Cibula D, Mirza MR, Marnitz S, et al. ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Radiotherapy and oncology* 2021 Jan 01;154:327-353.
8. Urlick ME, Bell DW. Clinical actionability of molecular targets in endometrial cancer. *Nature reviews. Cancer* 2019 Sep;19(9):510-521.
9. Redondo A, Guerra E, Manso L, Martín-Lorente C, Martínez-García J, Pérez-Fidalgo JA, et al. SEOM clinical guideline in ovarian cancer (2020). *Clin Transl Oncol* 2021 Jan 30;23(5):961-968.
10. Lesavage BL, Suhar RA, Broguiere N, Lutolf MP, Heilshorn SC. Next-generation cancer organoids. *Nat Mater* 2021 -08-12;21(2):143.
11. Yuki K, Cheng N, Nakano M, Kuo CJ. Organoid Models of Tumor Immunology. *Trends in immunology* 2020 Aug;41(8):652-664.
12. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(7):407-418.
13. Veninga V, Voest EE. Tumor organoids: Opportunities and challenges to guide precision medicine. *Cancer Cell*. 2021;39(9):1190-1201.
14. Boretto M, Maenhoudt N, Luo X, Hennes A, Boeckx B, Bui B, et al. Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. *Nat Cell Biol* 2019 -08;21(8):1041.
15. Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova-Davies T, Gomez MJ, Farrell L, et al. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol* 2017 -04-10;19(5):568.
16. Maru Y, Tanaka N, Itami M, Hippo Y. Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors. *Gynecologic oncology* 2019 Jul;154(1):189-198.
17. Berg HF, Hjelmeland ME, Lien H, Espedal H, Fonnes T, Srivastava A, et al. Patient-derived organoids reflect the genetic profile of endometrial tumors and predict patient prognosis. *Communications Medicine* 2021 Jul 30;1(1).

18. Kopper O, de Witte CJ, Löhmußaar K, Valle-Inclan JE, Hami N, Kester L, et al. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nature medicine* 2019 May;25(5):838-849.
19. Maenhoudt N, Defraye C, Boretto M, Jan Z, Heremans R, Boeckx B, et al. Developing Organoids from Ovarian Cancer as Experimental and Preclinical Models. *Stem cell reports* 2020 Apr 14;14(4):717-729.
20. de Witte CJ, Espejo Valle-Inclan J, Hami N, et al. Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids Mimic Clinical Response and Exhibit Heterogeneous Inter- and Intrapatient Drug Responses. *Cell Rep.* 2020;31(11):107762.

## 7. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

- Bolivar AM, Luthra R, Mehrotra M, Chen W, Barkoh BA, Hu P, et al. Targeted next-generation sequencing of endometrial cancer and matched circulating tumor DNA: identification of plasma-based, tumor-associated mutations in early stage patients. *Modern pathology* 2019 Mar;32(3):405-414.
- Casas-Arozamena C, Díaz E, Moiola CP, Alonso-Alconada L, Ferreiros A, Abalo A, et al. Genomic Profiling of Uterine Aspirates and cfDNA as an Integrative Liquid Biopsy Strategy in Endometrial Cancer. *JCM* 2020 -02-21;9(2).
- Cattaneo CM, Dijkstra KK, Fanchi LF, Kelderman S, Kaing S, Van Rooij N, et al. Tumor organoid–T-cell coculture systems. *Nat Protoc* 2019 -12-18;15(1):15.
- Cicchillitti L, Corrado G, De Angeli M, Mancini E, Baiocco E, Patrizi L, et al. Circulating cell-free DNA content as blood based biomarker in endometrial cancer. *Oncotarget* 2017 Dec 29;8(70):115230-115243.
- Girda E, Huang EC, Leiserowitz GS, Smith LH. The Use of Endometrial Cancer Patient–Derived Organoid Culture for Drug Sensitivity Testing Is Feasible. *International journal of gynecological cancer* 2017 Oct;27(8):1701-1707.
- Gu Z, Jia S, Liu S, Leng J. Endometrial Organoids: A New Model for the Research of Endometrial-Related Diseases. *Biology of reproduction* 2020 Jul 20;103(5):918-926.
- Hibaoui Y, Feki A. Organoid Models of Human Endometrial Development and Disease. *Front Cell Dev Biol* 2020 -02;8.
- Hill SJ, Decker B, Roberts EA, Horowitz NS, Muto MG, Worley MJ, et al. Prediction of DNA Repair Inhibitor Response in Short-Term Patient-Derived Ovarian Cancer Organoids. *Cancer Discov* 2018 -09-13;8(11):1404.
- Li X, Pan B, Song X, Li N, Zhao D, Li M, et al. Breast cancer organoids from a patient with giant papillary carcinoma as a high-fidelity model. *Cancer Cell International* 2020;20(1):86.
- Maenhoudt N, Defraye C, Boretto M, Jan Z, Heremans R, Boeckx B, et al. Developing Organoids from Ovarian Cancer as Experimental and Preclinical Models. *Stem Cell Reports* 2020 Apr 14;14(4):717-729.

- Mota A, Colás E, García-Sanz P, Campoy I, Rojo-Sebastián A, Gatiús S, et al. Genetic analysis of uterine aspirates improves the diagnostic value and captures the intra-tumor heterogeneity of endometrial cancers. *Mod Pathol* 2017;30(1):134.
- Murphy AR, Wiwatpanit T, Lu Z, Davaadelger B, Kim JJ. Generation of Multicellular Human Primary Endometrial Organoids. *Journal of Visualized Experiments* 2019(152).
- Nair N, Camacho-Vanegas O, Rykunov D, Dashkoff M, Camacho SC, Schumacher CA, et al. Genomic Analysis of Uterine Lavage Fluid Detects Early Endometrial Cancers and Reveals a Prevalent Landscape of Driver Mutations in Women without Histopathologic Evidence of Cancer: A Prospective Cross-Sectional Study. *PLoS Med* 2016 -12-27;13(12).
- Nanki K, Toshimitsu K, Takano A, Fujii M, Shimokawa M, Ohta Y, et al. Divergent Routes toward Wnt and R-spondin Niche Independency during Human Gastric Carcinogenesis. *Cell* 2018 Aug 09;174(4):856-869.e17.
- Neal JT, Li X, Zhu J, Giangarra V, Grzeskowiak CL, Ju J, et al. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell* 2018 Dec 13;175(7):1972-1988.e16.
- Votanopoulos KI, Forsythe S, Sivakumar H, Mazzocchi A, Aleman J, Miller L, et al. Model of Patient-Specific Immune-Enhanced Organoids for Immunotherapy Screening: Feasibility Study. *Ann Surg Oncol* 2019 Dec 19;27(6):1956-1967.
- Wiwatpanit T, Murphy AR, Lu Z, Urbanek M, Burdette JE, Woodruff TK, et al. Scaffold-Free Endometrial Organoids Respond to Excess Androgens Associated With Polycystic Ovarian Syndrome. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* 2020 Mar 01;105(3):769-780.

## 8. ANEXOS

### ANEXO 1: PROCESAMIENTO MUESTRA ASPIRADO ENDOMETRIAL

1. Las muestras deben ser mantenidas en una cubeta con hielo hasta su procesamiento (tiempo inferior a 1h)
2. Homogeneizar la muestra con PBS 1:1 con pipeta de P1000 (cortar punta) en tubos eppendorf 1.5mL
3. Centrifugar 20' 2500xg 4°C
4. Separar el sobrenadante y conservar a -80°C. Distribuir los pellets:
5. Preparar un falcon-50ml con 8mL de PBS
6. Añadir suficiente PBS al pellet (400-500uL) para cubrirlo y triturar con tijeras iris.
7. Transferir el pellet triturado del eppendorf al falcon-50mL con PBS y homogeneizar con una pipeta serológica de 5mL (10 veces aprox)
8. Pasar la muestra por un filtro de 40µm. Conservar el material retenido en el filtro.
9. Lavado invertido: invertir el filtro sobre placa y lavar con 5mL de PBS para recuperar el material atrapado en el filtro.
10. Centrifugar 10' 200xg 4°C
11. Desechar el sobrenadante y añadir 1-2mL de RBC buffer de lisis (Lucigen MRC0912H)
12. Incubar a 37°C 10'. A los 5' de la incubación, voltear el tubo varias veces para asegurar una mejor lisis de los eritrocitos.
13. Voltear el tubo varias veces y añadir 10mL de PBS
14. Homogeneizar con una pipeta serológica-5mL (10 veces aprox)
15. Centrifugar 10' 200xg 4°C
16. Añadir medio de digestión y agitar a 37°C 400xg 40'-1h
  - a. Fraccionar la muestra en 4 eppendorfs 1mL medio/tubo para una mejor digestión
17. Recuperar la muestra en un falcon-15mL y centrifugar 500xg 5min.
18. Retirar sobrenadante. Lavar con PBS. Spin.
19. Resuspender la muestra en 1mL TripLE/Accumax (precalentar a 37°C). Incubar a 37°C 5'. Pasar la muestra por una jeringa 1mL con aguja 19G seguido por una de 21G a TA (temperatura ambiente).
20. Llevar el volumen a 5mL con 1xPBS/5%FBS para lavar las células. Pipetear arriba y abajo para romper los clumps. Centrifugar a 500xg 5'
21. Si el pellet sigue teniendo aspecto hemático: retirar sobrenadante y hacer 2º lisis: RBC buffer de lisis, mezclar e incubar 10-15min a TA.
22. Llevar el volumen a 5mL con 1xPBS/5% FBS suplementado con 10µM Rock-Inhibitor Y-27632. Pipetear arriba y abajo y centrifugar 500xg 5'.
23. Filtrar con un filtro de 70µm, después pasar 5mL PBS/5%FBS/RI pipeteando. Tomar una alícuota de 2µL para conteo celular. Mezclar con 18µL de azul tripan (fresco y limpio), cargar 10µL de la mezcla en la cámara Neubauer.
24. Congelar células en FBS+ DMSO 10% a una concentración de  $1 \times 10^6$  células.

### ANEXO 2: PROCESAMIENTO MUESTRA LÍQUIDO ASCÍTICO

1. La muestra ha de conservarse en una cubeta con hielo hasta su procesamiento
2. Centrifugar en un falcon-50mL la muestra. 500xg 10' 4°C
3. Retirar el sobrenadante

4. Resuspender en 10mL de PBS con pipeta serológica. Pasar a un falcon-15mL
5. Centrifugar 500 xg 10' 4°C
6. Añadir 1-5mL RBC lysis buffer (lucigen MRC0912H). Incubar a 37°C 10'. A los 5' de incubación, voltear el tubo varias veces para facilitar la ruptura de los eritrocitos
7. Voltear el tubo varias veces y añadir 10mL de PBS, homogeneizar con serológica.
8. Centrifugar 500 xg 5' 4°C
9. Resuspender en 1mL de TrypLE (precalentado en baño a 37°C). Incubar a 37°C
10. Llevar el volumen a 5mL PBS/5% FBS suplementado con 10µM Rock-inhibitor para lavar las células. Pipetear arriba-abajo para romper los agregados celulares.
11. Mezclar en un eppendorf 2µL de trypan blue + 18µL de la suspensión de células (dilución 9:10); 0.9). Homogeneizar.
12. Preparar la cámara de Neubauer y cargar 10µL.
13. Cálculo concentración células:  

$$\text{Concentración (cél/mL)} = (\text{num células} \times 10\,000) / (\text{número de cuadrados} \times \text{dilución})$$
14. Congelar células en FBS/10%DMSO a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL (1mL en cada criovial)

### ANEXO 3: CULTIVO MEDIANTE MÉTODO BME-DROPLETS

1. Descongelar crioviales rápidamente en baño a 37°C.
2. Pasar el contenido del vial a un tubo con 3mL DMEM/F12 sin suplementar y resuspender
3. Centrifugar 500xg 5min 4°C
4. Aspirar sobrenadante y resuspender las células en la cantidad de medio de cultivo suplementado (añadir RI) necesario para generar las gotas:
  - Proporción BME-medio: 50-50
  - Gotas de 50µL: 25µL medio + 25µL BME
5. Añadir BME, resuspender (mantener en frío para impedir la polimerización del BME)
6. Formar una gota en el centro de cada pocillo una p24 (se recomienda precalentar la placa previamente en incubador)
7. Dar la vuelta a la placa e incubar 20-30min (37°C 5%CO<sub>2</sub>)
8. Añadir 500µL de medio de cultivo/pocillo (suplementar con rock-inhibitor 10µM).

### ANEXO 4: CULTIVO MEDIANTE MÉTODO MARU (MBOC: *BME Bilayer Organoid Culture*)

1. Descongelar crioviales rápidamente en baño a 37°C.
2. Pasar el contenido del vial a un tubo con 3mL DMEM/F12 sin suplementar y resuspender.
3. Centrifugar 500xg 5min 4°C
4. Aspirar sobrenadante y resuspender las células en 800µL de medio de cultivo por pocillo.
5. Generar gotas de 65µL de BME en cada pocillo. Incubar 20-30min (37°C 5%CO<sub>2</sub>).
6. Añadir 800µL de medio conteniendo las células en cada pocillo sobre las gotas de BME. Incubar *overnight*.
7. Al día siguiente, desechar el medio de cultivo con las células no viables que no se han integrado a la matriz. Cubrir con una capa de 70µL de BME e incubar nuevamente 20-30min (37°C 5%CO<sub>2</sub>). Cubrir con 500µL de medio de cultivo.

## **ANEXO 5: PASES ORGANOIDES MÉTODO QUÍMICO (*Cell Recovery Solution*)**

1. Aspirar el medio de cultivo de cada pocillo
2. Añadir 1mL/pocillo de *Cell recovery solution*. Pipetear arriba-abajo.
3. Lavar pocillo con PBS para recuperar el mayor material posible.
4. Dispensar el recuperado en 3 tubos (300µL/tubo)
5. Dejar los tubos en balancín 30min 4°C
6. Centrifugar 290 xg 5min 4°C
7. Aspirar sobrenadante
8. Resuspender en 10mL de medio basal frío.
9. Diluir en 2 tubos y centrifugar.
10. Resuspender en medio a 37°C pipetear arriba-abajo punta azul en amarilla en blanca 15 veces. Volver a centrifugar. Para una proporción 1:1, resuspender en 25µL de medio por cada pocillo a sembrar, añadir la misma cantidad de BME.
11. Dispensar las gotas en el centro de cada pocillo e incubar a 37°C 20-30min.
12. Cubrir con 500µL de medio de cultivo fresco (suplementar con RI 10µM)

## **ANEXO 6: PASES ORGANOIDES MÉTODO MECÁNICO**

1. Mezclar con una pipeta serológica el medio de cultivo con la gota en cada pocillo hasta conseguir una consistencia homogénea.
2. Pipetear arriba-abajo con serológica de 5mL y después con una P1000.
3. Recuperar el contenido de los pocillos en un falcon-15.
4. Hacer 1-2 lavados con PBS en cada pocillo → recuperar en el tubo.
5. Centrifugar 500xg 5min RT.
6. Aspirar sobrenadante con pipeta cuidadosamente (el BME dificulta centrifugación).
7. Resuspender el pellet en el medio de cultivo para formar las gotas (25µL/gota para proporción BME-medio de 1:1). Añadir 25µL de BME por cada gota. (Para un pase 1:2, calcularemos para el doble de pocillos de partida)
8. Dispensar las gotas en el centro de cada pocillo e incubar a 37°C 20-30min.
9. Cubrir con 500µL de medio de cultivo fresco (suplementar con RI 10µM)

## **ANEXO 7: MARCAJE DE ORGANOIDES MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA**

1. Retirar el medio de cultivo de cada pocillo y realizar 2 lavados con PBS.
2. Recoger 30-40 gotas de BME en una placa de 10cm. Fijarlas con 15-20 mL de PFA 4% (30-60min a TA).
3. Recuperar el material fijado en un falcon de 50mL. Dejar sedimentar los organoides en el fondo por gravedad (10-15min).
4. Aspirar con una pipeta el sobrenadante intentando mantener el pellet con los organoides en el fondo.
5. Realizar varios lavados con 20mL de PBS de la placa de 10cm para intentar recuperar el mayor material posible. Recuperar el material en un falcon de 50mL y dejar sedimentar 10-15min.

6. Aspirar el sobrenadante con pipeta intentando mantener el pellet de organoides en el fondo. Añadir 5mL de BSA 2.5% por el borde del tubo y resuspender el pellet volteando el tubo. No pipetear arriba y abajo para no romper las estructuras fijadas.
7. Mantener la solución de BSA 2.5% con las estructuras en una placa de 10cm (puede conservarse sellada con parafilm a 4°C durante un mes).
8. Centrifugar la muestra a 500xg 10min a 4°C.
9. Aspirar sobrenadante. Añadir 1mL Triton X-100 10min a TA en balancín para permeabilizar los organoides fijados.
10. Bloquear con BSA 5% 2-4h a TA en balancín.
11. Preparar los anticuerpos primarios (300-500µL) en solución de bloqueo (BSA 5%)
12. Incubar a 4°C ON en balancín.
13. Al día siguiente, añadir 1mL de PBS y centrifugar 500xg 10min 4°C
14. Incubar anticuerpo secundario 1h TA en balancín
15. Lavar con 1mL de PBS y centrifugar 500xg 10min 4°C.
16. Preparar el marcaje nuclear (DAPI 5 µg/mL en PBS, 300-500 µL por muestra).
17. Añadir la solución de DAPI a la muestra e incubar 15-20min.
18. Realizar 2 lavados con PBS de 10 minutos cada uno.
19. La muestra está lista para visualizar en el microscopio confocal.

## ANEXO 8: REACTIVOS EMPLEADOS

REACTIVO	CASA COMERCIAL	NO. CAT.
DMEM-F12	Gibco™	11320033
1.25U/ML DISPASE II	Sigma-Aldrich™	D4693
0.4 MG/ML COLLAGENASE V	Sigma-Aldrich™	C9263
FBS	Gibco™	10082147
NOGGIN	Peptotech <sup>R</sup>	120-10C
B27	Gibco™	17504044
N2	Gibco™	17502048
GLUTAMAX	Gibco™	35050061
INSULIN TRANSFERRIN SELENIUM	Gibco™	41400045
PENICILIN/STREPTOMYCIN	Gibco™	15140148
NICOTINAMIDE	Sigma-Aldrich™	72340
A83-01	Sigma-Aldrich™	SML0788
N-ACETYL L-CYSTEINE	Sigma-Aldrich™	A7250
EGF	Peptotech <sup>R</sup>	AF-100-15
B-FGF	Peptotech <sup>R</sup>	100-18B
SB202190	Sigma-Aldrich™	S7067
17-B ESTRADIOL	Sigma-Aldrich™	E8750
Y-27632	StemMACS™	130-106-538
RSPO1	Peptotech <sup>R</sup>	120-38
RBC lysis buffer	Thermo Scientific™	J62990-AP
PAN-CYTOKERATINS	Exbio™	1P-108
NUCBLUE	Invitrogen™	R37606
VIMENTIN	Cell-Signaling <sup>R</sup>	9856
PAX8	Proteintech <sup>R</sup>	10336-1-AP
ANTI-RB	Jackson-ImmunoResearch <sup>R</sup>	711-545-152
BME	Biotechne <sup>R</sup>	3532-010-02
PBS	Gibco™	14190144