

# Organoides: ¿qué son y para qué sirven?

**Propuesta de organoides de médula ósea para el estudio de procesos mieloproliferativos del Biobanco de A Coruña**

## INTRODUCCIÓN

### Organoides

Un organoide es una reproducción in vitro en miniatura de un órgano determinado, con una estructura biológica similar, tanto en función como en arquitectura, a su equivalente in vivo. Por tanto, es un tipo de cultivo celular en tres dimensiones que contiene tipos de células específicos de un órgano que pueden mostrar la organización espacial y replicar algunas de las funciones del órgano en cuestión. Existen organoides de diferentes tipos, procedentes de tejidos complejos como puede ser el de hígado, riñón, cerebro, etc, o tejidos tumorales establecidos a partir de explantes de biopsias de neoplasias, tanto de animales de experimentación como de origen humano. Hoy en día, pueden formarse a partir de una célula madre embrionaria o de una célula madre pluripotente, que puede estar ubicada en un órgano adulto o ser una célula madre pluripotente inducida (iPSCs), aunque el campo de investigación de los organoides empezó hace muchas décadas<sup>1</sup>.

En la década del 2000, se demostró que los cultivos tridimensionales (3D) eran una excelente forma de comprender los mecanismos del desarrollo y el impacto que tienen sobre el desarrollo de las enfermedades. Los métodos de cultivo 3D, abordan la falta de espacio y estructura trabecular en los cultivos tradicionales 2D y tratan de proporcionar puentes para que las células formen estructuras basándose en su capacidad para unirse espontáneamente en formaciones multidimensionales como los esferoides<sup>2,3</sup> (figura 1). Algunos enfoques que se están investigando en el contexto de estos cultivos son los andamios para el crecimiento celular fabricados con diversas sustancias biomiméticas<sup>4,5</sup>, pero en general, los estudios son escasos. Por ejemplo, T.M. Blanco<sup>6</sup> investigó los materiales más óptimos para andamios en cultivos ex vivo de leucemia mieloblástica aguda, basándose en la hipótesis de que la carencia de interacciones célula-célula y de contacto con la matriz extracelular de los cultivos 2D obstaculiza

**ÁNGEL MUÍÑO SAAVEDRA, CARMEN LAURA AÚZ ALEXANDRE, ALBA ARES GONZÁLEZ, VÍCTOR NORIEGA CONCEPCIÓN, ANA REY RICO, ÁLVARO MENA DE CEA Y ÁNGEL CONCHA LÓPEZ<sup>1</sup>**

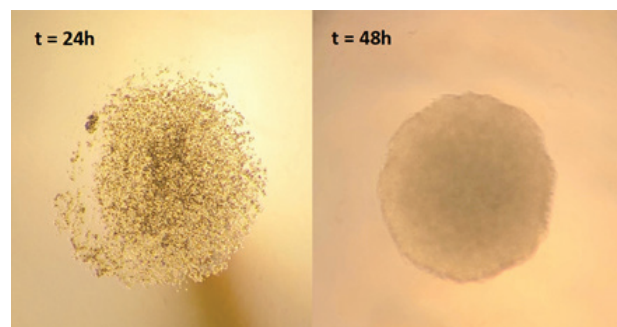


Figura 1: Formación de esferoide de células mieloides leucémicas en matriz de hidrogel (metilcelulosa) generado en el Biobanco A Coruña (20x - Abril/2022)

la proliferación espontánea y conduce a la dependencia de citoquinas exógenas. Demostraron que los andamios compuestos por poliuretano o ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) proporcionan una eficiencia de siembra y un crecimiento leucémico óptimos sobre otros materiales de soporte porosos. Otros métodos de cultivos 3D incluyen el uso de polímeros biomédicos e hidrogeles sintéticos<sup>7,8,9,10</sup>, que se pueden complementar con factores de crecimiento y nutrientes dependiendo de la naturaleza del experimento. Estos modelos 3D pueden incluso combinarse con células endoteliales y vasculares<sup>11</sup> y sistemas de perfusión dinámica<sup>12,13</sup>, que tratarían de simular el flujo sanguíneo fisiológico en la médula ósea.

El uso de organoides resulta especialmente beneficiosos en investigación biomédica, ya que sus características los convierten en un modelo eficaz para comprender el desarrollo de los órganos, la morfogénesis de los tejidos y las bases genéticas o moleculares de las enfermedades. Además, pueden ser usados para conocer

<sup>1</sup> - Ángel Muíño Saavedra, Carmen Laura Aúz Alexandre y Alba Ares González, Biobanco A Coruña - Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) / Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC) / Víctor Noriega Concepción, Servicio de Hematología y Hemoterapia - Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) / Ana Rey Rico, Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) – Universidad de A Coruña (UDC) / Álvaro Mena de Cea, Servicio de Medicina Interna. Unidad de Enfermedades Infecciosas - Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) / Ángel Concha López, Servicio de Anatomía Patológica - Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC)

el impacto celular a diversos tratamientos; para valorar la capacidad de respuesta a fármacos, así como para el estudio de nuevos biomarcadores o incluso emplearse en la terapia de reemplazo de tejidos<sup>14</sup>.

Los organoides reconstruyen una aproximación más ajustada al nicho natural que los cultivos celulares tradicionales bidimensionales y pueden además disminuir o evitar el uso de animales de experimentación.

### **Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA)**

En la última convocatoria de la Plataforma del Instituto Carlos III fue realizada una propuesta para la generación de organoides junto con otros biobancos de España como una iniciativa de I+D+I traslacional. En nuestro caso, hemos decidido trabajar en el desarrollo de organoides de medua ósea de leucemias mieloides agudas en su primera fase y posteriores procesos mieloproliferativos crónicos, siempre de origen humano.

La LMA es una neoplasia hematológica clonal, caracterizada por la proliferación de células inmaduras llamadas blastos, que desplazan el tejido hematopoyético normal de la médula ósea con la consiguiente aparición de anemia, neutropenia y trombocitopenia. Con los regímenes de tratamiento actuales, se obtienen tasas de respuesta a la quimioterapia (Idarrubicina-Citarabina) en torno al 60-80% en pacientes jóvenes, y del 40-60% en pacientes mayores de 60-65 años. Aun así, existe una alta tasa de recaída de la enfermedad, con tasas de supervivencia global del 27% a los 5 años, siendo el Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos (Alo-TPH) la única opción curativa para las LMA de intermedio y alto riesgo. Este procedimiento, sin embargo, no está al alcance de todos los pacientes ya que requiere de un donante compatible, y además presenta en la actualidad tasas de mortalidad tóxica entre el 20-30%. En los últimos años, la inmunoterapia celular basada en los CAR-Ts, técnica acreditada recientemente en el Hospital A Coruña, ha generado expectativas sin precedentes en el tratamiento del cáncer, mostrando respuestas clínicas robustas en pacientes con hemopatías malignas de células B, sin embargo esta terapia continúa siendo un reto para la LMA debido a la ausencia de un antígeno objetivo universal para esta patología.

El mejor conocimiento de la biología de la LMA ha permitido identificar por un lado a aquellos pacientes con mayor riesgo de resistencia a los tratamientos convencionales (ej, LMA con mutación TP53) y por otro lado identificar posibles dianas terapéuticas para la aplicación de trata-

mientos dirigidos (inhibidores de IDH1 e IDH2 para LMA con mutaciones IDH, inhibidores FLT3 para LMA FLT3 mutada ...). En cuanto al estudio mutacional de la LMA, destacar que ésta es una enfermedad policlonal, y que con frecuencia se objetiva la aparición de nuevas mutaciones y clones leucémicos en los momentos de recaída/progresión. Por ello, es de suma importancia el desarrollo de modelos leucémicos que ayuden a conocer los mecanismos que llevan a esta evolución clonal y mutacional, para así poder diseñar mejores estrategias terapéuticas y poder individualizar los tratamientos. En este último punto de individualización del tratamiento, existen en la actualidad varios fármacos ya desarrollados y aplicados en ensayo clínico, e incluso aprobados para uso asistencial por las Agencias Reguladoras (inhibidores FLT3, inhibidores IDH, Ac monoclonales anti CD33...). Sin embargo, éste es un campo todavía con una gran área de mejora, con un importante abanico de moléculas en desarrollo, cuya incorporación a la clínica requiere de mejoras en los modelos preclínicos.

### **OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN**

Como objetivo central del presente proyecto del Biobanco A Coruña, está la construcción de un modelo in vitro tridimensional de organoides de médula ósea que reproduzca lo más fielmente posible las propiedades estructurales y arquitectura de la médula ósea nativa, con el fin de proporcionar un modelo para el estudio en profundidad de la LMA, ensayo de nuevos fármacos y evaluación de su eficacia.

Para ello seguiremos el protocolo ya diseñado por Khan, A. et al.<sup>21</sup>, el cual puede ser sintetizado en cuatro pasos:

1. Agregación de células mesenquimales (MSCs).
2. Agregación de células progenitoras hematopoyéticas (HPSC), entre las que se hayan las células mieloblásticas leucémicas procedentes de un mismo individuo diagnosticado con LMA.
3. Inclusión de agregados celulares en andamio o soporte celular.
4. Cultivo en placas ULA.

Las células MSCs se encargarán de la creación y mantenimiento de la matriz extracelular. Las células HPSCs se encargarán de la generación, mantenimiento y renovación de los tipos celulares hematopoyéticos, y las células mieloblásticas leucémicas interactuarán con el resto de células configurando al organoide como leucémico y cuya actividad será el objeto clave de es-

tudio en ensayos futuros para conocer mejor la enfermedad.

En relación al andamiaje que dará soporte al crecimiento celular tridimensional y tras haber estudiado el estado de las técnicas de bioingeniería actuales en organoides de médula ósea, se realizarán pruebas con diferentes soportes celulares para conseguir in vitro unas propiedades y arquitectura similar a la médula ósea in vivo. Entre estas estructuras se pueden destacar los hidrogeles de metilcelulosa<sup>15</sup> o polientilenglicol<sup>16</sup>, matriges<sup>17</sup>, estructuras generadas por impresión 3D<sup>18</sup> e incluso hueso humano, para cuyo desarrollo contaremos con el apoyo de la Unidad de Criobiología del CHUAC (proveedor de fragmentos de hueso esponjoso humano), la plataforma de biomodelos del Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC) y del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidad de A Coruña, el cual ya desarrolla cultivos celulares tanto con células madre como con iPSCs.

Las muestras de médula ósea serán obtenidas del servicio de Hematología del CHUAC. El equipo de Terapia Celular y Molecular del INIBIC aporta una línea celular mesenquimal ya establecida, y la caracterización histológica y molecular se realizará en colaboración con los servicios hospitalarios del CHUAC de: Anatomía Patológica (H/E, inmunohistoquímica y NGS), Genética (cariotipos), Hematología (citometría de flujo) e Inmunología (tipaje HLA).

La actividad del biobanco para el desarrollo de estos organoides se dividirá en las siguientes fases:

#### Primera fase. Estudio piloto de factibilidad.

1. En una primera fase se llevará a cabo un estudio piloto de factibilidad, en el que se analizará y optimizará el desarrollo adecuado de los organoides, mediante el análisis en diferentes momentos:

- Análisis morfológico.
- Análisis fenotípico (CD16, CD13, CD34, CD117, CD11b, CD71, HLADR y CD45).

#### Segunda fase. Estudio prospectivo.

1. Análisis morfológico.
2. Análisis fenotípico (CD16, CD13, CD34, CD117, CD11b, CD71, HLADR y CD45).
3. Análisis fenotípico de las diferentes subpoblaciones leucémicas y de las aberrancias halladas por citometría de flujo.
4. Análisis citogenético por cariotipo.
5. FISH de las alteraciones frecuentes: ; t(15;17)(q24.1;q21.2), Trisomía 8, t(8;21)

(q22;q22.1), reorganizaciones 11q23.3, inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22).

6. Análisis molecular por NGS: ASXL1, CALR, CBL, CEBPA, DNMT3A, EZH2, FLT3, GATA2, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, MLL, NPM1, NRAS, PTPN11, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF1, WT1.

#### Tercera fase. Organoides como servicio de biobanco.

1. Establecer un biobanco de organoides de LMA para el desarrollo de terapias dirigidas.
2. Servir de plataforma para el desarrollo de nuevos proyectos a nivel cooperativo

#### BIBLIOGRAFÍA:

1. Simian, M. & Bissell, M. J. et al. 2017. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J. Cell Biol.* 216, 31–40.
2. Edmondson, R. et al. 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* 12, 207–218.
3. Raic, A. et al. 2019. 3D models of the bone marrow in health and disease: yesterday, today and tomorrow. *MRS Commun.* 9, 37–52.
4. Cartledge D.M. et al. 2019. Moving myeloid leukemia drug discovery into the third dimension. *Front. Pediatr.* 7, 314.
5. Langhans, S.A. et al. 2018. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front. Pharmacol.* 9, 6.
6. Blanco, T.M. et al. 2010. The development of a three-dimensional scaffold for ex vivo biomimicry of human acute myeloid leukaemia. *Biomaterials* 31(8):2243–51.
7. Bello, A.B. et al. 2018. Current approaches in biomaterial-based hematopoietic stem cell niches. *Acta Biomater.* 72:1–15.
8. Nicolas, J. Et al. 2020. 3D extracellular matrix mimics: fundamental concepts and role of materials chemistry to influence stem cell fate. *Biomacromolecules.* 21, 6, 1968–1994.
9. Tibbitt, M.W. et al. 2010. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 103(4), 655–663.
10. Worthington, P. et al. 2015. Peptide hydrogels - versatile matrices for 3D cell culture in Cancer medicine. *Front. Oncol.* 5:92.
11. Bray, L.J. et al. 2017. A three-dimensional ex vivo tri-culture model mimics cell-cell interactions between acute myeloid leukemia and the vascular niche. *Haematologica* 102(7): 1215–1226.
12. Kotha, S. et al. 2018. Engineering a multicellular vascular niche to model hematopoietic cell trafficking. *Stem Cell Res. Ther.* 9(1):77.
13. Rodling, L. et al. 2017. 3D models of the hematopoietic stem cell niche under steady-state and active conditions. *Scientific Reports.* 7, 4625.
14. Xinaris, C. et al. 2015. Organoid Models and Applications in Biomedical Research. *Nephron.* 130(3):191–9.
15. Sayoa, K. Et al. 2016. Fabrication of bone marrow-like tissue in vitro from dispersed-state bone marrow cells. *Regenerative Therapy.* 3, pages 32-37.
16. Giger, S. et al. 2022. Microarrayed human bone marrow organoids for modeling blood stem cell dynamics. 6(3):036101.
17. Janagama, D. et al. 2020. 3-D Cell Culture Systems in Bone Marrow Tissue and Organoid Engineering, and BM Phantoms as In Vitro Models of Hematological Cancer Therapeutics-A Review. *Materials (Basel).* 13(24):5609.
18. Borella, G., et al. 2021. Targeting mesenchymal stromal cells plasticity to reroute acute myeloid leukemia course. *Blood* 138(7):557-570.
19. Isern, J. et al. 2013. Self-Renewing Human Bone Marrow Mesenchymal Hematopoietic Stem Cell Expansion. *Cell Rep.* 3(5):1714-24.
20. Simón Méndez-Ferrer, S. et al. 2010. Mesenchymal and hematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829–834.
21. Khan, A. O. et al. 2022. Human bone marrow organoids for disease modelling, discovery and validation of therapeutic targets in hematological malignancies. *bioRxiv - Cancer Biology.* doi: <https://doi.org/10.1101/2022.03.14.483815>.