

Historia y actualidad de los cultivos tridimensionales: cómo acercar la tecnología de los organoides a la comunidad científica

Aurora Astudillo^{1,2}, Alberto Centeno Cortés³,
Eva Ortega-Paíno⁴, Olivia Rodríguez
San Vicente⁵, Rubén García Fernández⁵,
Aurora García Robles⁶, Nuria Montserrat^{6,7,8}.

¹ Biobanco SSPA Instituto de Investigación Biosanitaria del Principado de Asturias ISPA, Spain.

² Instituto de Oncología del Principado de Asturias IUOPA, Spain.

³ Unidad de Cirugía Experimental, Centro Tecnológico de Formación XXIAC, Hospital Universitario de La Coruña. Instituto de Investigación Biomédica de La Coruña (INIBIC), Spain.

⁴ Biobanco Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Madrid, Spain.

⁵ Servicio de Radiología Hospital Universitario de Cruces –Barakaldo. Bizkaia (Spain)

⁶ Pluripotency for Organ Regeneration, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain.

⁷ Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, Barcelona, Spain.

⁸ ICREA, Catalan Institution for Research and Advanced Studies, Barcelona, Spain.

RESUMEN

En los últimos años se ha avanzado considerablemente en el desarrollo de procedimientos la generación y diferenciación de células madre pluripotentes (CMPs) humanas para estudiar el desarrollo de nuestros tejidos y entender las enfermedades. Un paso importante en esta dirección también ha sido la obtención de organoides. Esta tecnología se basa en técnicas tradicionales de cultivo tridimensionales (3D) que aprovechan las características intrínsecas de las CMPs tales como su capacidad de auto-organización y diferenciación. La convergencia de disciplinas como la biología del desarrollo y la bioingeniería ofrece hoy en día la posibilidad de proporcionar estímulos externos que ayuden a generar organoides a partir de CMPs de manera controlada. Al mismo tiempo, hay aspectos importantes que la comunidad de organoides también está abordando al visualizar la fabricación de productos terapéuticos basados en organoides para la medicina de precisión y terapias de reemplazo autólogas y alogénicas. En este sentido, ha habido una serie de avances tecnológicos en diferentes aspectos de la fabricación de productos terapéuticos basados en organoides, incluido el desarrollo de líneas celulares de grado clínico, el almacenamiento a gran escala, el procesamiento ascendente y descendente, y la evaluación de la calidad de los productos terapéuticos celulares finales. En España, la Plataforma del Instituto del Salud

Carlos III Biobancos y Biomodelos incluye unidades con capacidades para la producción y caracterización de organoides a lo largo de todo el territorio español, representando una infraestructura sin precedentes para la generación de servicios científico-técnicos para el sector académico e industrial nacional e internacional. En este artículo ofrecemos en primer lugar, una perspectiva histórica sobre la tecnología de los organoides subrayando aspectos que puedan ayudar a la comunidad científica de cómo generar organoides a partir de CMPs. Después introducimos criterios a tener en cuenta durante el proceso de generación y caracterización de los organoides. Finalmente, os presentamos la Plataforma del Instituto del Salud Carlos III Biobancos y Biomodelos a fin de dar a conocer nuestra misión y visión para convertirnos en una estructura en red para la prestación de servicios en aplicaciones de biología del desarrollo, detección de fármacos, modelado de enfermedades y medicina personalizada a nivel nacional e internacional.

EVOLUCIÓN DE CULTIVOS 3D EN LA HISTORIA DE LOS ORGANOIDES

Revisar el origen de los cultivos tridimensionales (3D) nos lleva a un ensayo escrito a principios del siglo pasado por el zoólogo Henry Van Peters Wilson en 1907 titulado “*Sobre algunos fenómenos de coalescencia y regeneración en esponjas*”. En tal trabajo, Wilson ya presenta las cues-



ciones que hoy en día siguen siendo claves el campo de los cultivos 3D y los organoides, destacamos aquí alguna de sus reflexiones cuando estudiaba el cultivo de las esponjas marinas: “... *La esencia del asunto es que las esponjas siliciosas cuando se mantienen confinadas en las condiciones adecuadas degeneran de tal manera que, mientras la mayor parte de la esponja muere, las células en ciertas regiones se agregan para formar grumos de tejido indiferenciado*”. Fijémonos, Wilson no sólo se refiere a conceptos actuales como el cultivo de células y tejidos, sino que además demostró que las células de un organismo complejo, como la esponja marina, una vez disociadas podían volver a agregarse y reorganizarse dando lugar a una nueva esponja viable. Tal experimento demostró que las células de un organismo adulto contenían suficiente información para dar lugar a una estructura multicelular. De la misma manera, en el año 1906, Ross G. Harrison fue pionero en el sistema de cultivo mediante gotas colgantes (del inglés, “hanging drop”) para estudiar el origen de las células nerviosas mediante el cultivo de fragmentos de nervios embrionarios de rana en una gota de linfa. Este enfoque permitió la observación directa de un nervio en crecimiento *in vivo*, sentando las bases para otros experimentos de cultivo de tejidos de diferentes orígenes embrionarios durante períodos prolongados de tiempo. Mucho más tarde, y ya entrada la década de 1950, los esfuerzos llevados a cabo por muchos investigadores condujeron al desarrollo de métodos que sustentaban el cultivo de fragmentos de tejidos (por el método de Strangeways y Fell, en el año 1926 y el método de papel de lente de Trowell en 1954 y 1955). A la par de todos estos trabajos, otras observaciones pioneras mostraron las capacidades regenerativas de los tejidos de diferentes especies animales a reorganizarse después de su destrucción parcial o completa. Estos estudios se realizaron en varias especies animales, como esponjas, celenterados y

también usando células embrionarias de anfibios. Además, numerosos trabajos pudieron definir las condiciones adecuadas para mantener el crecimiento y la supervivencia de las células disociadas mecánica o enzimáticamente *in vitro*. Estos avances a su vez precisaron la definición de nuevos reactivos, tales como el colágeno o la colagenasa, que luego permitieron la generación de los primeros organoides de células mamarias. A su vez, la investigación sobre la identificación de matrices de soporte para el cultivo celular 3D, identificó que el aislamiento de la matriz extracelular (MEC) de los condrosarcomas era de gran utilidad para tales objetivos, culminando en la definición de Matrigel®, el soporte más utilizado en la actualidad para generar y amplificar el crecimiento de cultivos 3D (incluyendo, esferoides y organoides).

Así pues, en la década de 1980, la comunidad científica había adquirido habilidades técnicas y acumulado conocimiento de la biología de la MEC para continuar explorando la generación de nuevos cultivos 3D, identificando pasos cruciales que posteriormente permitieron el cultivo de los organoides. Entre los primeros ejemplos de lo que hoy podría considerarse un cultivo de organoides, se encuentra el trabajo de Mina Bissell y sus colegas que fueron pioneros en el desarrollo de cultivos de glándulas mamarias en 3D, incorporando células mamarias individuales en una MEC rica en laminina1. Estos cultivos favorecían la morfogénesis de las células mamarias *in vitro* dando como resultado estructuras glandulares funcionales caracterizadas por polarización epitelial y secreción de B-caseína en respuesta a la interacción de las células con MEC. Posteriormente, el investigador Hans Clevers aplicó este conocimiento para cultivar suspensiones unicelulares de células madre intestinales de ratón Lgr5+ incrustadas en Matrigel® en condiciones de cultivo que incorporaban factores de crecimiento >>>

»» específicos para amplificar y diferenciar estas células, logrando generar organoides intestinales con una arquitectura similar a las criptas intestinales. Este estudio seminal y otros facilitaron el desarrollo de organoides derivados de células madre adultas (CMAs), incluyendo estómago, páncreas, colon, próstata e hígado. El progreso en organoides derivados de CMAs y los principales avances en este campo se han abordado recientemente en varias revisiones excelentes y en los artículos incluidos en este número especial de las Dras. Patricia Pérez Galán y Cristina Eguizábal. En la actualidad se aplican ligeras modificaciones de los métodos descritos desde la década de 1950s a los sistemas de cultivo de organoides actuales, incluido el uso del método de gota colgante para la formación de cuerpos embrioides para generar tejidos corticales neurales a partir de células madre embrionarias. Curiosamente, una evolución de lo descrito en la década de 1950 sobre el sistema de cultivo organotípico ha permitido la generación de organoides de riñón, entre otros.

CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES: CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS (CMEs) Y CÉLULAS MADRE DE PLURIPOTENCIA INDUCIDA

Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (CMEs) son células madre pluripotentes (CMPs) derivadas de la masa celular interna de un embrión de mamífero en la etapa de blastocisto. Fueron aisladas y cultivadas por primera vez a partir de embriones de ratones por Evans, Kaufmann y Martin en 1981. Posteriormente, Thompson demostró que también era posible aplicar tal metodología para obtener CMEs humanas². En ambas especies, se ha demostrado que las CMEs se pueden propagar y crecer de manera indefinida sin que estas pierdan su potencial proliferativo y capacidad para dar lugar *in vitro* e *in vivo* a células de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Tales características, supusieron que desde su derivación las CMEs se convirtiesen una promesa de suministro ilimitado de células para la investigación básica o la terapia celular. En este sentido, durante los últimos treinta años, una intensa investigación ha demostrado que las CMEs se pueden diferenciar *in vitro* a un gran número de tipos celulares. El tiempo y la eficacia de los protocolos informados difieren según el tipo de célula que se va a obtener, por lo que se han llevado a cabo investigaciones exhaustivas para mejorar los métodos de diferenciación. Aunque los avances en el campo han sido muy relevantes, aún quedan sin resolver algunas cuestiones muy importantes como aquellos relacionados con la identificación de factores clave que controlan la diferenciación de las CMEs a determinados tipos de células específicas.

Curiosamente, los mecanismos moleculares básicos que gobiernan la pluripotencia en las diferentes filias del rei-

no animal no se conservan. En este sentido, las CMEs de ratón y humanas muestran diferencias importantes con respecto a las vías de señalización específicas que regulan su autorrenovación. Mientras las proteínas de la familia BMP en combinación con LIF promueven la autorrenovación y el estado indiferenciado en las CMEs de ratón, tales factores promueven la diferenciación de las CMEs humanas. Otra diferencia interesante es la alta propensión de las CMEs humanas a derivar en trofoblastos en comparación con las CMEs de ratón. En este sentido, los mecanismos moleculares exactos que gobiernan la pluripotencia se han convertido en una de las cuestiones centrales clave de la biología del desarrollo.

CÉLULAS MADRE DE PLURIPOTENCIA INDUCIDA (CMPIS)

En 2006, el profesor Shinya Yamanaka y sus colegas³ demostraron por primera vez que al introducir diferentes factores de transcripción relacionados con la biología de la CME de ratón, el estado epigenético de los fibroblastos derivados de embriones de ratón podría revertirse a un estado pluripotente. En particular, el equipo japonés indujo la expresión ectópica de un subconjunto de factores de transcripción específicos: OCT3/4, factor de transcripción de unión al Octámero 4 (también conocido como POU5F1, factor de transcripción de clase 5 de dominio POU 1); SOX2, (SRY [región Y determinante del sexo] -cuadro 2); KLF4, Kruppel-Like Factor 4 y c-MYC (V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogen Homolog), generando en un período de apenas treinta días, células que eran muy parecidas a las CMEs de ratón en términos de capacidad de autorrenovación, expresión de factores endógenos relacionados con la pluripotencia, y potencial de diferenciación *in vivo* e *in vitro* para dar lugar a células pertenecientes a las tres capas germinales del embrión. Este descubrimiento fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina en 2012 al profesor Shinya Yamanaka y al Profesor John Gurdon quién casi seis décadas antes había conseguido reprogramar el núcleo de células somáticas a células totipotentes *in vivo*. En el estudio de Yamanaka, las células generadas se denominaron células madre pluripotentes inducidas (CMPIs), ya que en tal experimento el estado pluripotente fue forzado artificialmente *in vitro*. Apenas unos meses más tarde, el mismo grupo de investigación pudo demostrar que la misma metodología fue capaz de convertir fibroblastos humanos CMPIs humanas mediante la expresión de cuatro factores de transcripción: OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC.

El restablecimiento de todo el transcriptoma y epigenoma de una célula somática hacia un estado pluripotente se logró previamente mediante transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) y también mediante la fusión celular. Aunque la TNCS y la fusión celular ofrecen va-

rias ventajas frente a la tecnología CMPs (es decir, rápida y determinista), la investigación de la TNCS y la fusión celular sigue siendo difícil y requiere grandes cantidades de ovocitos. Por el contrario, en la reprogramación mediada por factores de transcripción, se conocen los factores que impulsan la reprogramación, lo que hace que el proceso sea fácilmente modulado y más fácil de seguir. En líneas generales, la metodología de la reprogramación muestra muchas ventajas frente a las tecnologías descritas anteriormente. En este sentido, en los últimos años se han realizado enormes esfuerzos para identificar la mejor fuente celular a reprogramar, así como la mejor metodología a aplicar, mejorando los procedimientos de reprogramación y tendiéndose a utilizar procedimientos no integrativos a fin de evitar la posible activación de los transgenes empleados durante el proceso de reprogramación. Nuestro país cuenta con una excelente fuente de células humanas pluripotentes: el Banco Nacional de Líneas Celulares del Instituto de Salud Carlos III (BNLC) iniciado en 2006. A estas colecciones de células se tiene acceso mediante la firma de un acuerdo de transferencia de material (del inglés material transfer agreement-MTA), una vez los proyectos de investigación que requieren estas fuentes celulares han obtenido la aprobación por la “Comisión de Garantías para la donación de células y Tejidos humanos”. La legislación española, además obliga a depositar las líneas celulares generadas en el ámbito de tales proyectos de investigación, que deben cumplir unos requisitos mínimos con demostrada capacidad de pluripotencia *in vitro* e *in vivo* (diferenciación a las tres capas embrionarias) y poseer un cariotipo estable. En el caso de las CMPIs, éstas deben mostrar un correcto silenciamiento de la expresión de los factores de reprogramación cuando éstos se han introducido con metodologías integrativas. También debe verificarse que las CMPIs contengan el DNA con la huella del tejido de origen. Y si proceden de pacientes con enfermedad genética conocida por mutación germinal, deben coincidir el diagnóstico genotípico. La colección de líneas celulares pluripotentes del BNLC procede de tejidos normales y patológicos, abriendo los segundos una excelente ventana para el estudio de los mecanismos patogénicos y ensayar potenciales terapias *in vitro*.

ORGANOIDES DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

Desde el aislamiento de las CMEs y la reprogramación de células somáticas humanas en CMPIs, ambas fuentes se han vuelto fundamentales para recapitular los principios fundamentales de la diferenciación y morfogénesis de los tejidos. Debido a que las células madre pluripotentes (CMPs) representan el punto de partida de la diferenciación (etapa de pluripotencia), ofrecen un modelo de ontogenia de órganos y un “sistema mínimo” para discernir de manera sistemática la contribución relativa de diferentes componentes celulares en procesos

morfogenéticos complejos. Aprovechando el amplio conocimiento acumulado a partir del campo de la biología de desarrollo del ratón y las CMPs de ratón, los estudios de investigación actuales emplean las moléculas de señalización de crecimiento que guían tales procesos para instruir la diferenciación de CMPs en crecimiento en monocapa o para generar estructuras similares a agregados de CMPs denominados cuerpos embrionarios (del inglés embryoid bodies-EBs). De hecho, tal abordaje fue clave para obtener por primera vez tejido cortical estratificado tras generar EBs a partir de CMEs. Más tarde, el investigador Yosiki Sasai mantuvo los EBs en cultivo en suspensión aplicando señales mínimas externas utilizando *Matrigel*[®], generando así organoides de copa óptica que contenían dominios espacialmente separados de retina neural y epitelio pigmentado de la retina. Sobre esta base, otros estudios que explotaron la capacidad inherente de las CMPs a diferenciarse de manera espontánea para generar organoides cerebrales con una amplia variedad de identidades regionales, mientras que enfoques más dirigidos utilizando compuestos químicos definidos han dado lugar a la generación de organoides con regiones cerebrales específicas. Una característica común de los diversos métodos desarrollados para los organoides neurales derivados de CMPs, es que los factores que se utilizan intentan reproducir las redes de señalización que conocemos ocurren *in vivo* en modelos animales como el ratón. De manera similar, otros organoides derivados de CMPs buscan imitar estos eventos de desarrollo para generar tejidos que imitan a los homólogos *in vivo*. Esto ahora ha tenido bastante éxito para el riñón, el intestino, el pulmón y el oído interno, por nombrar algunos de los organoides generados hasta la fecha a partir de CMPs. En resumen, el proceso de formación de organoides implica tres pasos cruciales:

1. Activar o inhibir las vías de señalización utilizando morfógenos e inhibidores de la señalización específicos de cada tejido, que permiten la identificación regional de las células madre (adultas o pluripotentes) en diferenciación.
2. Formulación de medios adecuados para la diferenciación terminal de los tipos celulares deseados.
3. Expansión en cultivos 3D agregando células o embibiéndolas en una matriz 3D que emule la composición proteica de la matriz del órgano nativo que se pretende generar.

Para organoides derivados de CMPIs hay que lograr la reprogramación, de eficiencia muy variable, seguida de la diferenciación al tipo de órgano requerido, con la ventaja de que, una vez se haya logrado, puedan ser usadas repetidamente para generar organoides de diferentes tejidos más allá de la vida del donante. En el caso de las >>>

»» células progenitoras adultas, para conseguir organoides a partir de ellas debe identificarse la apropiada población de las CMAs tal y como, brillantemente, el equipo de Hans Clevers hizo con las células identificables Lgr5 en el intestino, así como identificar los factores esenciales del nicho necesarios para la proliferación epitelial y la auto-renovación de las células madre. Hay que tener en cuenta que estos factores son diferentes cuando comparamos los tejidos de ratón y los de origen humano.

ORGANOIDES: EL MEJOR USO PRÁCTICO DE LAS PROPIEDADES EMERGENTES DE LAS CÉLULAS PLURIPOTENTES HUMANAS

Como se ha comentado al inicio, un gran trabajo previo ha precedido y fecundado la creación de los actuales organoides; que evolucionarán sin duda en el futuro por la confluencia con otras tecnologías, creadas con distinto propósito, pero que serán rentabilizadas para el desarrollo de estas microestructuras. Sin duda el principal reto es perfeccionar organoides para que dispongan de los dos componentes tisulares locales: el parénquima, o componente tisular noble de cada órgano, y el estroma que lo sustenta que provee de vascularización y es vehículo para factores de crecimiento y arena para la batalla inmunológica. Tal como en los tejidos de los telares la trama soporta la urdimbre. Los intentos de incorporar estroma a un organoide han sido tímidos, siendo los mayores éxitos los logrados a través del apoyo de animales, insertando el organoide en el estroma como el peritoneo u otro tejido bien vascularizado.

En el escaso tiempo en que esta tecnología se ha desarrollado, los organoides han demostrado su utilidad tanto para investigación básica como para investigación aplicada. Pueden imitar mejor la fisiología humana comparado con los modelos animales, y reemplazarlos como puente hacia los ensayos preclínicos. Algunas de las aplicaciones desarrolladas han sido:

1. Descubrimiento de los mecanismos de acción de mutaciones seleccionadas y ensayos de tratamientos específicos para los pacientes que padecen las enfermedades relacionadas. Se dispone de organoides obtenidos a partir de células CMPIs normales, o con mutaciones conocidas obtenidas a partir de células de donantes. También se han obtenido organoides a partir de células progenitoras procedentes de tejido normal, displásico y tumoral (ver artículo de Patricia Pérez Galán y colaboradores en este mismo número). Así mismo, los avances en edición génica han permitido introducir controladamente en células normales modificaciones genéticas con mutaciones seleccionadas, y desarrollar organoides a partir de ellas. Esto está facilitando el mejor conocimiento de los procesos de malignización paso a paso, así como la investigación en la potencial intervención terapéutica más exitosa.
2. Toma de decisiones terapéuticas en medicina personalizada. Su utilidad en procesos patológicos no tumorales ha quedado también bien demostrada con el éxito obtenido con los organoides procedentes de células de pacientes con fibrosis quística, enfermedad causada por mutaciones muy variadas de genes codificantes de canales de membrana, al lograr probar drogas en el organoide derivado del paciente, seleccionar las más eficientes y aplicarlas a los pacientes con un espectacular éxito.
3. Validación cruzada de hallazgos biológicos por la facilidad de compartir organoides siguiendo los mismos protocolos y las mismas células CMPIs de origen.
4. Plataforma in vitro para testar drogas, al poder generar un alto número de organoides en un tiempo controlado.
5. Adquirir conocimiento de los mecanismos de la infección, como el hallazgo de nuevos receptores en ensayos de organoides renales con virus SARS-CoV-2, o la preferente infección de las células cerebrales de la placa germinal por el virus Zika, verificado en organoides cerebrales.
6. Medicina regenerativa. Organoides intestinales libres de mutaciones que han sido ampliamente ensayados en animales a fin de reestablecer la función intestinal.

CÓMO DISEÑAR ESTRATEGIAS PARA OFRECER UN MICROENTORNO APROPIADO PARA EL CRECIMIENTO CONTROLADO DE ORGANOIDES

Para el adecuado crecimiento celular en 2D y 3D se necesita replicar de manera fidedigna el medio ambiente en el que los tejidos y órganos residen en nuestro organismo. Desde hace más de 30 años se ha estado usando con éxito un producto comercial obtenido de animales denominado Matrigel® (como se comentó anteriormente, esta MEC proteica se extrae del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm). Entre sus componentes, los hay de matriz fibrilar como el colágeno IV; y no fibrilares como los proteoglicanos. Puede contener factores de crecimiento. Contiene también otras proteínas que varían con los lotes; de ahí que, a pesar de los buenos resultados como sustrato para crecer células, se haya intentado sustituirlo por productos de los que se conoce el 100% de sus componentes y que éstos sean homogéneos y reproducibles.

La experiencia adquirida con los organoides ha puesto en evidencia la necesidad de trabajar con microentornos de MEC más sofisticados: que puedan modificar su resistencia mecánica, crear un gradiente o que sean controladamente degradables. O que puedan portar ligandos bio-funcionales. Es decir, la idea de un

soporte mecánico o andamiaje para crecer células, pero con propiedades más similares a las condiciones del microentorno real, incluso temporalmente dinámico, pero siempre reproducible. Hoy aún parece lejano la evolución en tamaño y sofisticación de los organoides a los órganos. Pero sin duda que un importante salto en esa dirección va a ser el lograr el microentorno extracelular fisicoquímico apropiado.

De la misma manera, en los últimos cinco años ha evolucionado extraordinariamente una aplicación tecnológica que se revela complementaria con el avance de los organoides: los denominados “órganos-en-un-chip” (del inglés, “organ-on-chip”). Estos dispositivos son estructuras in vitro que tratan de reproducir la biología humana recreando el control de los procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Para ello combinan la ingeniería con la biología celular, produciendo sistemas que puedan servir de herramienta para probar la eficacia de drogas o evaluar el efecto de microorganismos en tales cultivos, así como para testar respuestas y valorar la fisiología y los cambios en el metabolismo de las células en ellos incorporadas. Con ese objetivo disponen de sistemas circulatorios asociados a micro-bombas peristálticas, sensores electroquímicos que proveen de mediciones constantes “on-line” de múltiples parámetros químicos y electrodos integrados tanto para registrar señales como para producirlas. A través de la incorporación en un chip de varios organoides procedentes de distintos tejidos, tales como hígado, corazón o riñón, se ha podido ver la interacción producida entre ellos y las modificaciones metabólicas propiciadas por la adición de productos o drogas. Estos biorreactores miniaturizados permiten una reducción en el consumo de medios, reducen el espacio de incubación y facilitan la comparación de un gran número de condiciones en paralelo, para optimizar los protocolos.

Hasta ahora estos dispositivos se han usado para test pre-clínicos incorporándoles células humanas y animales, pero en el futuro podrían utilizarse como mini-órganos funcionales (4) perfectamente controlados. Si bien ha de tenerse en cuenta que los organoides derivados de las CMPIs, aunque sean autólogas, pueden generar respuesta inmune por la posibilidad de reexpresar genes fetales. Éste es uno de los riesgos para su uso funcional, como lo es también la reprogramación incompleta derivada de ciertas fuentes de CMPs.

PLATAFORMAS DE SERVICIOS EN ORGANOIDES: MARCO INTERNACIONAL Y LA PLATAFORMA DEL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III DE BIOBANCOS Y BIOMODELOS

Las mejoras en la estandarización y generación de organoides han facilitado su implementación a dos grandes niveles: el académico, con interés científico preferente

y el comercial, con interés en el gran potencial económico de su aplicación en la medicina personalizada. En Europa predominan los biobancos de organoides a nivel académico, mientras que en América predominan los de uso comercial, en los que han invertido recientemente grandes empresas como Astra Zeneca, Sigma-Aldrich, American Type Culture Collection (ATCC), CellsCe y DefiniGem.

El gran impulso europeo a la tecnología de organoides viene impulsado por el liderazgo del investigador holandés Hans Clevers. Su capacidad para el trabajo en equipo ha logrado el más extenso biobanco de organoides europeo, el establecido por la asociación entre el Instituto Hubrecht, el University Medical Center Utrecht y la Royal Netherland Academy of Arts and Sciences (KNAW), que participan en el Hubrecht Organoid Technology (HUB), que aloja más 1000 tipos de organoides distintos de diferentes órganos y enfermedades. Habiendo demostrado su utilidad en la medicina personalizada, ha habido más intentos de crear biobancos de organoides a un nivel más amplio, como en el proyecto europeo *PreCanMed* del European Regional Development Fund y el *Interreg-V-A Italia-Austria Programme 2014-2020*, que se propuso una implementación interregional de un biobanco de organoides. Probablemente en el inmediato futuro, recursos europeos como el Biobanking and Biomolecular Resources Infrastructure (BBMRI) pondrán su foco en la creación de biobancos europeos.

En este contexto, en el año 2020 el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) inició una experiencia pionera al promover la creación de la Plataforma ISCIII de Biobancos y Biomodelos (PISCIIIIBB) mediante una convocatoria competitiva. De esta manera el ISCIII respondía a las prioridades del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2017-2020 en el ámbito sanitario, consiguiendo así integrar distintos tipos de investigación como estrategia para acortar el intervalo entre la producción de un nuevo conocimiento y su transferencia y aplicabilidad real en la práctica médica. Así pues, a finales del año 2020 la resolución de la convocatoria dio lugar a una composición multidisciplinar de la PISCIIIIBB que contaba con 41 instituciones de toda España, agrupando biobancos hospitalarios, redes autonómicas, biobancos en red, biobancos de los principales Institutos de Investigación Sanitaria y biobancos de centros de investigación y universidades de todo el país, así como instituciones con reconocimiento internacional en el ámbito de organoides, la impresión 3D y el modelo animal. Cabe destacar, que desde el pasado 2021 el Reino de España es miembro asociado de la Infraestructura de Investigación de Biobancos y Recursos BioMoleculares – Consorcio Europeo de Infraestructuras de Investigación (BBMRI-ERIC) designando >>>

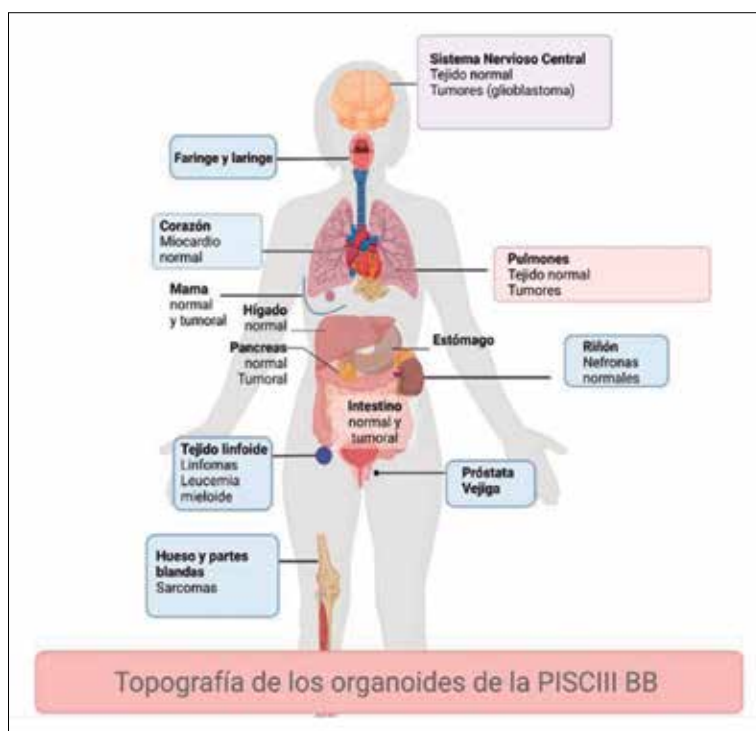


Figura 1

Topografías de los organoides ofertados por la PISCIIBB. La oferta en red nos permite contar con organoides de las principales localizaciones anatómicas, que se podrán ampliar con la incorporación en régimen de biobanco de organoides procedentes de otras plataformas CIBER. Figura creada con *BioRender.com*.

>>> además a la PISCIIBB como Nodo Nacional. La entrada de España y el ISCIII en el BBMRI-ERIC es un paso más para la consolidación de la investigación colaborativa con apoyo europeo e internacional. De esta manera, el ISCIII además impulsa y cristaliza su modelo de plataformas de investigación cooperativa

Además, en la misma convocatoria, se desarrollaron dos Plataformas científico-tecnológicas más: la Plataforma de soporte para la investigación clínica (SCREEN) y la Plataforma de innovación en tecnologías médicas y sanitarias (ITEMAS) que facilitará la industrialización de los desarrollos y la investigación del Servicio Nacional de Salud (SNS). En su conjunto, la finalidad de las PLATAFORMAS del ISCIII es proporcionar soporte de alto nivel científico, técnico y tecnológico a los proyectos de I+D+I en Ciencias y Tecnologías de la Salud, promover proyectos transversales propios de su área de actuación, potenciar la participación española en programas y plataformas internacionales, así como fomentar la innovación en tecnologías sanitarias como un instrumento que contribuya a la sostenibilidad del SNS.

En concreto la PISCIIBB cuenta con una composición excepcional que asegura la creación del Biobanco

de Organoides (HUB de Organoides) a escala nacional e internacional, con representación de todo el territorio geográfico español con la reciente incorporación de quince biobancos adheridos y la colaboración activa con CIBERONC.

Un trabajo en red como el de la PISCIIBB nos permite también superar las principales limitaciones en la generación de organoides humanos: 1º Estandarización: con establecimiento de protocolos compartidos y control de calidad; 2º Reducción de los costes mediante acuerdos de compra a gran escala de medios y recursos facilitando así la estandarización en la producción de organoides a escala nacional; 3º Aumento en la escala ofreciendo organoides de todos los órganos más relevantes del cuerpo humano (*Figura 1*). 4º Validación y control de calidad de todos los organoides ofertados en red mediante la participación de todas las unidades de la PISCIIBB.

Así como en un mismo tumor hay heterogeneidad celular, la hay también entre individuos. Pero lo que aparenta ser una debilidad, es una ventaja en el caso de un biobanco vivo en red como el que oferta la PISCIIBB; ya que, al estar basada predominantemente en biobancos hospitalarios, recoge todo su potencial y experiencia para el manejo inicial del tejido y la trazabilidad detallada, permitiendo contar con una extensa base de datos del paciente donante, con todos los detalles de sus características biomédicas, pero preservando su privacidad mediante pseudonimización o codificación, contando además con la caracterización detallada, morfológica, inmunohistoquímica y genética del tejido de origen y su microentorno, normal o patológico, teniendo en cuenta que el material de la escisión quirúrgica de un paciente que ha dado su consentimiento informado, puede ser usado para hacer organoides de tejido normal y patológico de una misma persona. Esto supone un gran potencial al permitir por este medio, deslindar la problemática de un organoide en el que crecen células normales y patológicas al poder identificar las características de las primeras.

La imbricación de Biobancos con los biomodelos supone que la experiencia ganada por las unidades que conformaron las previas plataformas nacionales de biobancos (Red Nacional de Biobancos) y que pasaron a formar parte de la nueva PISCIIBB, así como los incorporados recientemente, pueden aportar su visión y dinamizar la PISCIIBB y su interacción con las Pla-

taformas *SCREN* e *ITEMAS* del ISCIII. Con este avance, por el que los recursos en biobancos y biomodelos son ofrecidos en régimen de biobanco a los investigadores nacionales e internacionales, se puede disponer de una oferta que permite superar una parte significativa de las dificultades que plantea el trabajo con biomodelos, especialmente con organoides. Para ello, el trabajo en red permite compartir y dar servicio en asesoría y ejecución de protocolos hasta llegar a altos porcentajes de éxito y una homogeneidad en la oferta. Se espera además tener un biobanco virtual de la PISCIIBB. Con este objetivo desde el HUB de ORGANOIDES de la PISCIIBB las diferentes unidades que lo conforman (veinte unidades distribuidas por todo el país y que en el caso de unidades que son centros de investigación cuentan con biobancos asociados) están trabajando bajo el paraguas de Coordinación en diferentes grupos de trabajo, que abordan temas de extrema importancia: calidad, catálogo y aspectos ético-legales en base a la legislación vigente en nuestro país y teniendo en cuenta las recomendaciones promovidas por la Sociedad Internacional de Investigación con Células Madre [International Society for Stem Cell Research (ISSCR)] (5) o la Red Europea de Comités de Ética de Investigación [European Network of Research Ethics Committee (EUREC)]. En la elaboración del catálogo de organoides de la PISCIIBB, además de la relación de organoides ofertados y sus características topográficas, morfológicas y genéticas, se explicita la unidad que hace la oferta, la metodología usada para su generación, si se trata de un cultivo restrictivo o no; el número de pases en cultivo y si el organoide se oferta congelado o debe servirse en fresco. Por último, pero no menos importante, si se dispone de datos clínicos asociados de la muestra de origen (*Figura 2*).

Para lograr el objetivo de esta plataforma singular del ISCIII, hemos de dar continuidad a nuestro trabajo, progresando en red con las unidades que la conforman. Pero es esencial también que los resultados y la oferta del biobanco virtual sea conocida en los ambientes científicos, biotecnológicos y biofarmacéuticos. Este artículo cumple una parte de esa labor divulgativa necesaria, de difusión a nivel nacional e internacional de nuestra actividad.

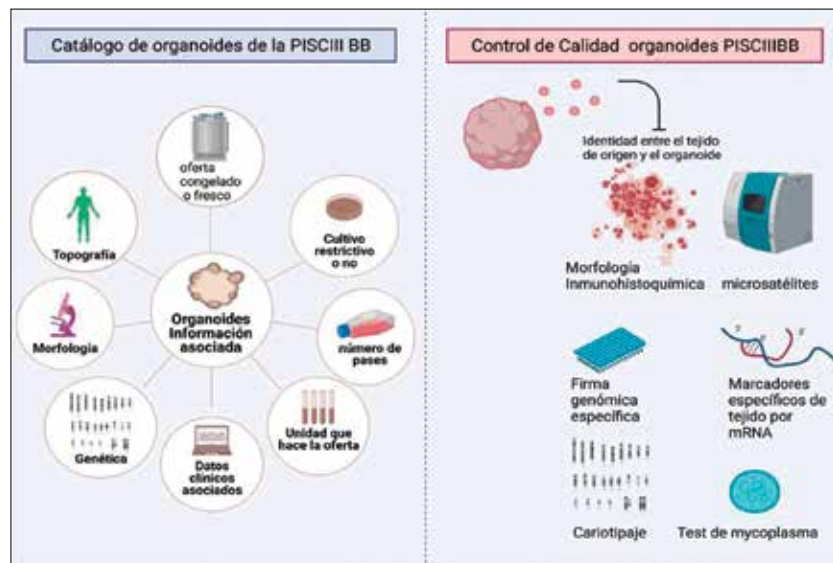


Figura 2

El catálogo de organoides ofertado por la PISCIIBB incluye información sobre la unidad que hace la oferta y su IP, localización topográfica del tejido o CPIs utilizados, si proceden de tejido normal o patológico, metodología usada, información morfológica y genética, si el cultivo es restrictivo o no, el número de pases que se ofertan, los datos clínicos asociados y si se conserva congelado o se debe servir fresco. Los organoides pueden ofertarse con un nivel de calidad escalable, que incluye la identificación del organoide en relación con el tejido de origen por medio de información histomorfológica, marcadores inmunohistoquímicos definidos, microsatélites (STR), marcadores específicos de tejido por mRNA, firma genómica y cariotipaje. Figura creada con *BioRender.com*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha recibido soporte del Instituto de Salud Carlos III (PTC20/00013). ■

PARA LEER MÁS

- Hasement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol.* 1991;115(5):1383.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663–76.
- Berishvili E, Casiraghi F, Amarelli C, Scholz H, Piemonti L, Berney T, et al. Mini-organs forum: how to advance organoid technology to organ transplant community. *Transpl Int* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Feb 22];34(9):1588–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34448263/>
- Lovell-Badge R, Anthony E, Barker RA, Bubela T, Brivanlou AH, Carpenter M, et al. ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2021 update. *Stem Cell Reports.* 2021 Jun 8;16(6):1398–408.