

# Organoides linfáticos: biorreactores de la respuesta inmune y modelos de linfoma

Rubén Giménez-Martínez, Patricia Pérez-Galán.

Departamento de Hemato-Oncología  
 Institut d'Investigacions Biomèdiques  
 August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España.  
 Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBERONC)

## INTRODUCCIÓN

Existen tres grupos de órganos linfoides: primarios, secundarios y terciarios. Los órganos linfoides primarios (timo y médula ósea) generan células inmunes y definen el repertorio de receptores que tendrán los linfocitos T y B. En cambio, los órganos linfoides secundarios (ganglio linfático (GL), bazo, amígdalas) y los órganos terciarios (también llamados tejidos ectópicos linfoides) promueven que esos mismos linfocitos sobrevivan, interactúen con otras células, favorecen la conexión entre las respuestas innata y adaptativa, además de activar y sustentar una respuesta inmune adecuada. La posibilidad de desarrollar órganos linfoides artificiales (mayoritariamente de tipo secundario) que sean funcionales, ha atraído un gran interés entre los investigadores, sobre todo en la última década. Estos, al ser modelos *ex vivo*, pueden convertirse en una valiosa herramienta capaz de recrear respuestas inmunes en múltiples contextos, incluyendo escenarios propios de enfermedades infecciosas y autoinmunes, vacunas o procesos neoplásicos como los linfomas. Además, debido a la relevancia cada vez mayor que están tomando las inmunoterapias para el tratamiento del cáncer, disponer de un modelo capaz de imitar, en una placa de cultivo, la respuesta de cada paciente significa solucionar un problema hasta ahora no cubierto en la mayoría de linfomas.

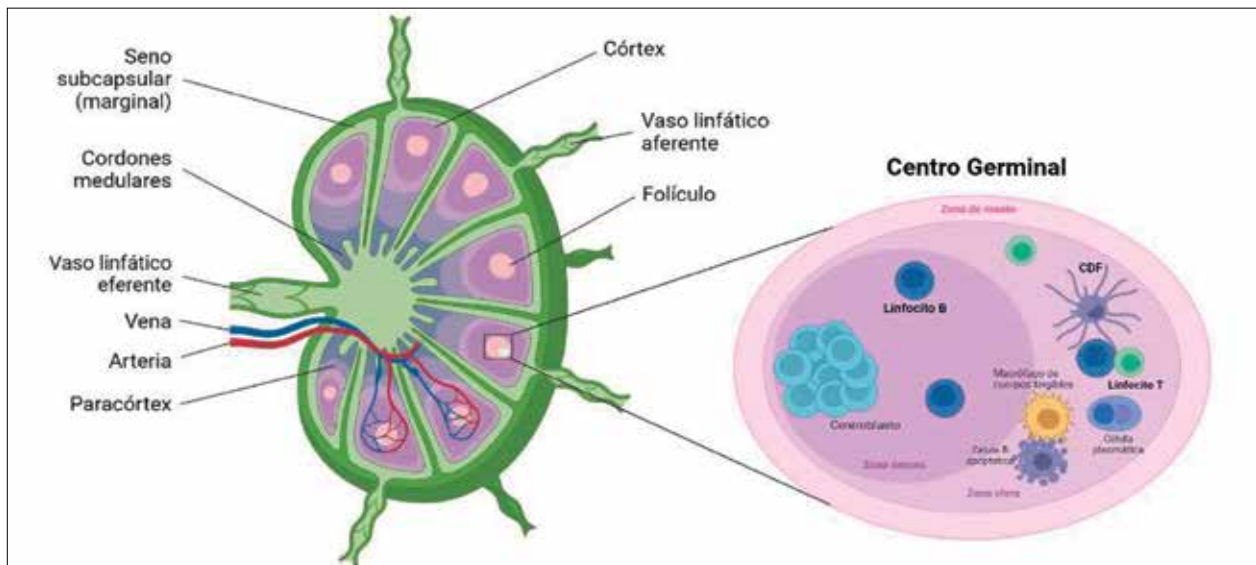
Los órganos linfoides secundarios constituyen tejidos altamente organizados y dinámicos que pueden adaptarse de forma mecánica y funcional en respuesta a antígenos. Es en esta singular microestructura y los diferentes tipos de células y factores, donde reside la funcionalidad de los órganos del sistema inmune. En consecuencia, la dificultad de generar un organoide del sistema inmune recae en la gran complejidad intrínseca de estos órganos, como es el caso del GL (Figura 1). Los GLs son estructuras anatómicas compuestas por un microambiente celular densamente compactado y una matriz extracelular rica en colágeno de tipo I. El GL está dividido en distintos micro-compartimentos celulares que a su vez están habitados por linfocitos B o

T, ilustrado en la Figura 1. Dentro del GL, los folículos están formados por una densa red estromal compuesta de células dendríticas foliculares (CDF) capaces de activar a los linfocitos B. De especial importancia es también el compartimento constituido por células T colaboradoras foliculares (TCF) para la formación de las estructuras sub-anatómicas llamadas centros germinales (CGs), que inducen la conversión de los linfocitos B en células productoras de anticuerpos.

En este artículo hemos resumido los esfuerzos hechos hasta ahora para mimetizar las diversas respuestas inmunes en organoides de tejido linfoide normal de humano y ratón, además de los organoides generados a partir de células primarias de linfoma.

## GENERACIÓN DE ORGANOIDES DEL SISTEMA INMUNE

El modelo más parecido a GL, hasta la fecha, ha sido generado por el grupo de Mark Davis de la Universidad de Stanford que aprovecha las resecciones de amígdala, siguiendo un proceso similar al que se usa para desarrollar organoides de otros órganos como el timo o tumores sólidos. Por lo general, las amígdalas son un tejido humano muy accesible y habitualmente infrautilizado, con la gran ventaja de contener todos los tipos celulares involucrados en la respuesta inmune adaptativa, a diferencia de la sangre periférica. Para la elaboración de estos organoides, los diferentes tipos de células provenientes de las amígdalas son descongelados y cultivados a una densidad alta en sistemas de migración "Transwell" junto con el antígeno de interés. Después de varios días en cultivo, aquellas células que hayan formado agregados serán observables. Este sistema organotípico es funcional y consigue recrear características clave en la formación de CGs como son: la producción de anticuerpos específicos, la hipermutación somática y la maduración de la afinidad, la diferenciación de los plasmablastos y el cambio de isotipo de inmunoglobulina. Este modelo ha demostrado su validez para estudiar respuestas a vacunas y para evaluar respuestas humorales a antígenos específicos.



**Figura 1**

**Estructura del ganglio linfático y detalle del centro germinal.** Estructura del ganglio linfáticos y detalle del centro germinal. Los GL están organizados en unidades denominadas foliculos drenados por vasos linfáticos de entrada (aferente) y de salida (eferente). Tienen dos secciones principales: el córtex, que forma el parénquima principal del órgano, y la médula, que se comunica con los vasos linfáticos eferentes que transportan la linfa del órgano conteniendo antígenos solubles e inmunocomplejos. El área del cortex que bordea la médula se llama paracórtex. El cortex contiene los foliculos linfoides compuestos principalmente por células B y en el paracórtex predominan las células T. En el exterior, un ganglio linfático está encerrado en una cápsula a través de la cual el órgano se comunica con los vasos linfáticos aferentes. El área entre la cápsula y la corteza se llama espacio subcapsular.

El centro germinal permite el encuentro con las células dendríticas presentadoras de antígeno (CDF), y procesos de selección para permitir la maduración de los linfocitos hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos. En la zona oscura las células B proliferan (centróblastos) y se produce la hipermutación somática. Después migran a la zona clara donde se seleccionan por afinidad con el antígeno presentado por las CDF y rescatadas gracias a las los linfocito T (helper). Estas células tras sufrir el cambio de clase de sus inmunoglobulinas madurarán a células plasmáticas.

Otro modelo alternativo, desarrollado en este caso por el grupo del doctor Ankur Singh, de la Universidad de Cornell, recrea un foliculo linfoide de ratón usando un hidrogel de gelatina con propiedades bio-adhesivas que se polimeriza gracias a la inclusión de nanopartículas de silicato bio-compatibles. Los linfocitos B, en este modelo, están purificados a partir de esplenocitos de ratón y co-cultivados con células estromales 40LB que expresan CD40L y BAFF para mimetizar la función de las células TCF y CDF en el foliculo. Partiendo de la encapsulación de las células obtenidas de la digestión de los bazo de ratón, se pueden obtener en una semana, agregados de linfocitos B proliferativos con un fenotipo de CG que den lugar a una respuesta controlada e incluso al cambio de isotipo de inmunoglobulina.

Por último, siguiendo la tendencia de crear órganos en chip, ha habido el intento de generar GLs en chip para recapitular funciones específicas de este órgano. Los órganos en chip son sistemas microfluídicos perfundidos formados por canales microscópicos en los que uno o varios tipos celulares pueden crecer y expandirse rodeadas de un microambiente similar al propio del tejido de origen. Estos sistemas no están diseñados para crear órganos enteros, si no para sustentar las unidades funcionales

más básicas que son capaces de recrear aspectos de la fisiología humana in vitro. La combinación de hidrogeles 3D/componentes de la matriz extracelular, con sistemas microfluídicos y perfusión, ha supuesto un salto hasta un nuevo nivel mucho más dinámico que reproduce de forma fiel las tensiones y los flujos en sistemas in vitro. Cabe destacar la recopilación de las técnicas más avanzadas de GL en chip hecha recientemente por Shanti A. en *Frontiers of Pharmacology* (en el apartado “Para leer más”). Kim S. también habla de la generación de otros órganos del sistema inmune (médula ósea y timo) en su revisión en *Nature Reviews* (en el apartado “Para leer más”).

### ORGANOIDES DE LINFOMA

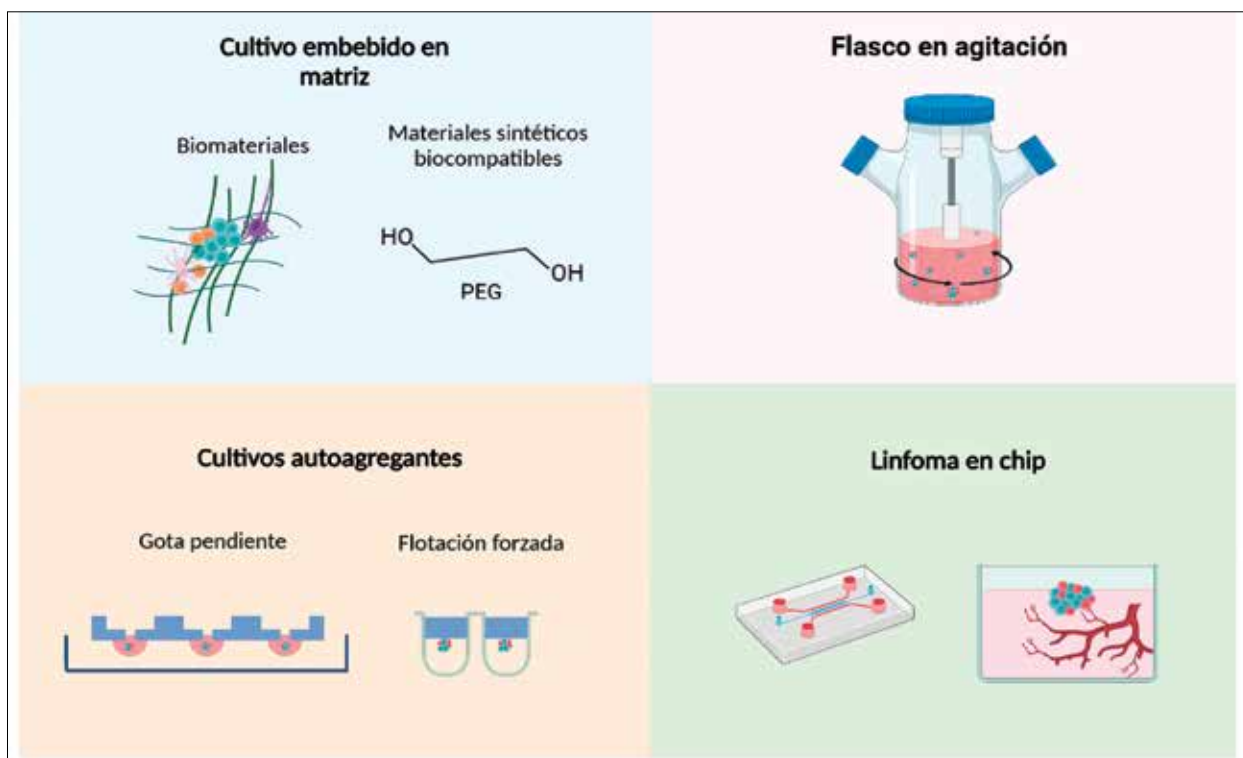
La creación de estos modelos es compleja debido a la escasa disponibilidad de material disponible, en esencia células sobrantes del proceso de diagnóstico. Al contrario que en el caso de los tumores sólidos, los linfomas nunca son extirpados y los pacientes reciben en la mayoría de los casos terapias sistémicas, a excepción de ciertos linfomas in situ de bajo grado. El diagnóstico más frecuente se realiza a través de una biopsia de la/s zona/s donde se encuentran las lesiones. Sin embargo, hoy en día, para intentar reducir las molestias en el paciente y el uso de técnicas invasivas, la biopsia con aguja fina está sustituyendo a las biopsias >>>

>>> tradicionales. Este cambio supone un obstáculo tanto para los patólogos al no observar la microestructura del ganglio y también desde el punto de vista de los investigadores que reciben escaso material de los pacientes.

Otro problema a tener en cuenta es el hecho de que los organoides de linfoma que tenemos actualmente no son fieles a la definición típica de organoide ya que no son capaces, al menos por el momento, de imitar la complejidad del órgano original (es decir el GL). Los modelos actuales intentan recrear el ecosistema general en 3D a base de introducir elementos de los compartimentos celular y de matriz extracelular presentes en el tejido maligno de origen, junto con tipos celulares, citoquinas y factores de crecimiento fundamentales.

Los esfuerzos para generar modelos válidos de organoides de linfoma se han centrado en el uso de matrices de diferente naturaleza y utilizando múltiples sistemas de cultivo que incluyen agitación continua (alginato), método de la gota en suspensión o estrategias de flotación forzada (placas de baja adherencia) que obligan a las células a agregarse entre si en ausencia de matriz (*Figura 2*). Algunos componentes biológicos como el colágeno o el

alginato se han usado de forma satisfactoria. En el caso del linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), el tipo agresivo más frecuente dentro de los linfomas no Hodgkin (LNH), Foxal y colaboradores han desarrollado un modelo 3D de esferoide basado en colágeno (método de la gota en suspensión), que contiene células de tumor LDCBG, fibroblastos de tipo linfoide y macrófagos para recrear el microambiente tumoral (TME por sus siglas en inglés). Este modelo se ha usado para estudiar diferentes terapias en el contexto de fagocitosis dirigida por anticuerpos. En el caso del linfoma folicular (LF), el tipo de LNH indolente más frecuente, las células primarias han sido encapsuladas con éxito en micro-esferas de alginato incorporando linfocitos B neoplásicos, matriz extracelular y células estromales de amígdala (CEAs). En este modelo, los linfocitos B neoplásicos forman esferoides muy cohesionados derivado de la gran expresión de componentes de la matriz extracelular y la adhesión de las CEAs que promueven el crecimiento del tumor. El análisis por RNA-seq puso de manifiesto la sinergia que se establece gracias a la disposición 3D, la matriz extracelular y las CEAs a la hora de incrementar vías de señalización en las células B neoplásicas in vitro, similares a las que se observan en linfocitos B neoplásicos primarios.



**Figura 2**

Estrategias actuales para la generación de organoides linfáticos. Los organoides linfáticos se pueden generar embebido los diversos tipos celulares que lo integran en biomateriales (matrigel, colágeno, gelatina, alginato,) o materiales sintéticos (PEG) que mimeticen la rigidez y las propiedades bioadhesivas de la matriz extracelular de los GL. Asimismo, para facilitar la generación de estas estructuras se pueden usar sistemas de agitación, placas de baja adherencia o de gota colgante (actualmente en desuso). En línea con las tendencias actuales también hay interés en la generación de ganglios-on-chip para poder renovar los nutrientes y el oxígeno, evaluar el efecto del flujo e incluso introducir vascularización.

Asimismo, en nuestro grupo hemos desarrollado un modelo de tumor de LF que incluye linfocitos B tumorales, linfocitos T autólogos y dos tipos celulares fundamentales en el TME de linfoma como son las CDFs y los macrófagos, encapsulados en colágeno I. Estas células proporcionan viabilidad a las células neoplásicas del tumor y les permiten proliferar. Los linfocitos B y T se autoorganizan en zonas diferenciadas con CDFs, encapsulando una estructura de folículo, mientras que los macrófagos se mantienen distribuidos por la totalidad del tumor. Estos macrófagos adoptan un fenotipo M2 que induce un comportamiento inmunosupresor en el TME. Además, la composición de la matriz extracelular se enriquece con colágeno IV, tenascina y fibronectina, entre otras proteínas, como resultado de la interacción entre la célula tumoral y el TME.

Resultados igualmente interesantes han sido obtenidos con materiales sintéticos bio-compatibles, por ejemplo, el polietilenglicol (PEG). Estos materiales son totalmente versátiles y permiten ajustar la dureza y el tamaño final del poro de los hidrogeles. Características imprescindibles a tener en cuenta ya que, los GLs son estructuras altamente permeables con áreas que deben permitir una rápida remodelación. Por ese motivo, acercar las células en una estructura 3D fija no es suficiente para recrear el comportamiento que se da en el órgano de origen. Para facilitar estos procesos, la consistencia del material no puede ser demasiado alta y las uniones entre las subunidades que lo forman deberían ser degradables. Para solventar este problema, se pueden añadir péptidos degradables por metaloproteinasas y así permitir el desplazamiento libre de las células a lo largo del tumor. Además, en estos tumoroides elaborados con materiales sintéticos, especialmente para neoplasias de linfocito B, es necesario incluir motivos de adhesión para que las células se unan al material. Las secuencias RGD (Arg-Gly-Asp) son reconocidas por integrinas presentes tanto en las células neoplásicas como en las del TME y facilitan no solo la adhesión sino también la transducción de señales intracelulares que promueven la supervivencia, la proliferación y un estado de CG (en el que se pueda dar la hipermutación somática y el cambio de inmunoglobulina). En aquellas matrices sintéticas que no incluyen estas secuencias de manera natural, se pueden añadir químicamente a la estructura principal.

Por último, como ya se ha descrito para GL normal, el linfoma en chip puede constituir un sistema muy versátil y útil para estudiar mecanismos específicos de la enfermedad, así como la distribución y respuesta a fármacos. Un modelo de linfoma en chip ha sido descrito por Mannino y colaboradores en el que las células de tumor son encapsuladas en un hidrogel a base de ácido hialurónico atravesado por un microcanal vascularizado y perfundible. Este modelo podría ser válido para estudios de administración de fármacos ya que permite establecer y

controlar los parámetros de difusión y evaluar los efectos del fármaco con relación a la permeabilidad de las células endoteliales.

### EN RESUMEN

La complejidad del microambiente 3D propia de los órganos linfoides juega un papel fundamental en la regulación de los procesos inmunes. La gran adaptabilidad y organización de estos tejidos dificulta su completa recreación in vitro. En primer lugar, es necesario escoger la composición de las proteínas de matriz extracelular o, por contra, un material sintético que lo mimetice, junto con las células que queremos cultivar. En segundo lugar, la incorporación de un sistema microfluídico facilita la renovación del medio de cultivo y tiene en cuenta las fuerzas ejercidas por los flujos, factor que se ha demostrado que puede afectar la señalización en los linfocitos B. Por último, la adición de vasos endoteliales y linfáticos se ha dejado de lado en los modelos actuales pero podría ser fundamental para recrear la administración de fármacos y el reclutamiento de efectores en el contexto de las inmunoterapias.

### PARA LEER MÁS

- Wagar LE, Salahudeen A, Constantz CM, Wendel BS, Lyons MM, Mallajosyula V, et al. Modeling human adaptive immune responses with tonsil organoids. *Nat. Med.* 27, 125–135 (2021).
- Purwada A, Jaiswal MK, Ahn H, Nojima T, Kitamura D, Gaharwar AK, Cerchiatti L, Singh A. Ex vivo engineered immune organoids for controlled germinal center reactions. *Biomaterials.* 2015 Sep;63:24–34.
- Shanti A, Hallfors N, Petroianu GA, Planelles L, Stefanini C. Lymph Nodes-On-Chip: Promising Immune Platforms for Pharmacological and Toxicological Applications. *Front Pharmacol.* 2021 Aug 16;12:711307.
- Kim S, Shah SB, Graney PL, Singh A. Multiscale engineering of immune cells and lymphoid organs. *Nat Rev Mater.* 2019 Jun;4(6):355–378 Tian YF, Ahn H, Schneider RS, Yang SN, Roman-Gonzalez L, Melnick AM, Cerchiatti L, Singh A. Integrin-specific hydrogels as adaptable tumor organoids for malignant B and T cells. *Biomaterials.* 2015 Dec;73:110–9.
- Lamaison C, Latour S, H elaine N, Le Morvan V, Saint-Vanne J, Mahouche I, Monvoisin C, Dussert C, Andrique L, Deleurme L, Dessauge E, Pangault C, Baulande S, Legoix P, Seffals M, Broca-Brisson L, Alessandri K, Carlotti M, Soubeyran P, Merlio JP, Mourcin F, Nassoy P, Recher G, Tarte K, Bresson-Bepoldin L. A novel 3D culture model recapitulates primary FL B-cell features and promotes their survival. *Blood Adv.* 2021 Dec 14;5(23):5372–5386.
- Mannino RG, Santiago-Miranda AN, Pradhan P, Qiu Y, Mejias JC, Neelapu SS, Roy K, Lam WA. 3D microvascular model recapitulates the diffuse large B-cell lymphoma tumor microenvironment in vitro. *Lab Chip.* 2017 Jan 31;17(3):407–414.