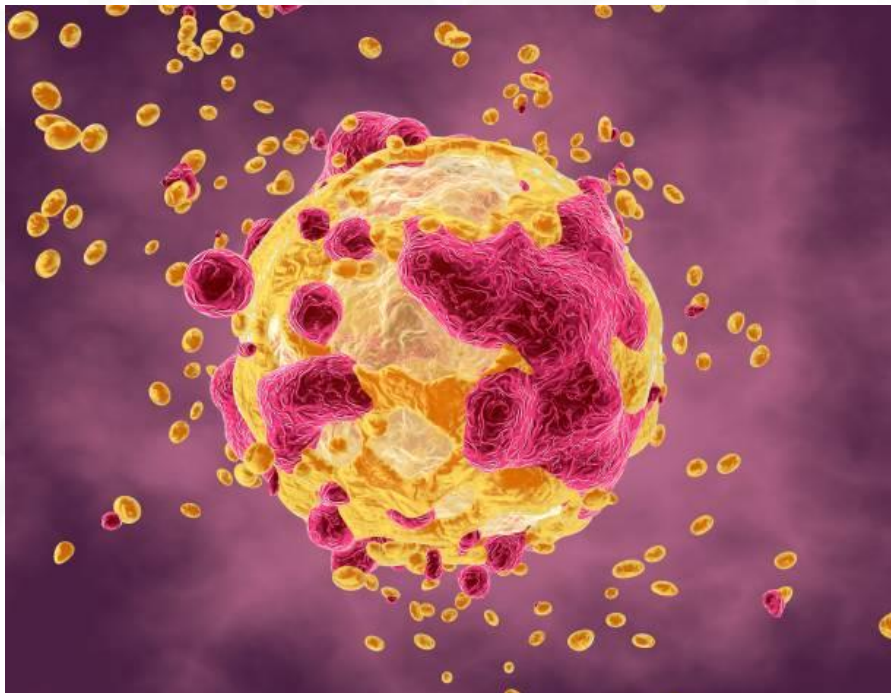


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

Derivación de modelos 3D de sarcomas como plataforma de escrutinio de fármacos



María Wenrong García Gorostola

Departamento de Morfología y Biología

Celular / Facultad de Biología

Enero / 2024



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



Resumen

Los sarcomas son un grupo heterogéneo de tumores malignos de origen mesenquimal con una prevalencia y tasa de recuperación bajas en comparación con otros tipos de cáncer. Por ello, es vital desarrollar modelos de investigación lo más fieles posibles al tumor. Los organoides, que son un tipo de modelo 3D, tienen la capacidad de imitar el microambiente tumoral y mantener las características genéticas y fenotípicas a diferencia del convencional cultivo 2D en monocapa. Teniendo esto en cuenta, en este trabajo se han realizado organoides de osteosarcoma derivados de xenoinjertos para probar diferentes fármacos y valorar su viabilidad, con el propósito de comparar el resultado con el de cultivos en monocapa. Los organoides se cultivaron siguiendo protocolos estándar para otros tipos de tejidos, adaptando el medio para tumores mesodérmicos. También se realizaron análisis histológicos con el fin de caracterizar los organoides y verificar si habían formado las estructuras típicas asociadas al tumor. Los resultados obtenidos mostraron que los organoides eran bastantes sensibles a doxorubicina y metotrexato con una IC50 de 0,22 y 0,075, respectivamente. Aquellos organoides resistentes a doxorubicina mostraron una menor sensibilidad a este fármaco, como era de esperar, pero también, presentaron una mayor sensibilidad a metotrexato. En comparación con los cultivos 2D los organoides mostraron cierta resistencia a todos los fármacos, lo que se debe a su estructura tridimensional que les permite mantener interacciones con otras células y el entorno. Sus características estructurales les permiten, además, mantener una gran heterogeneidad celular, adecuada para adaptarse a los tóxicos. Todos estos resultados respaldan a los modelos 3D como los mejores para reproducir un tumor tan heterogéneo y realizar ensayos farmacológicos en él. Por tanto, optimizar los protocolos es crucial de cara a que en un futuro se puedan llegar a desarrollar organoides derivados de pacientes y usarlos en terapias personalizadas.

Abstract

Sarcomas are a highly heterogeneous group of malignant tumors of mesenchymal origin, with both relatively low prevalence and recovery rates compared to other types of cancer. Therefore, it is crucial to develop models that faithfully mimic the tumor. Organoids are a type of 3D model with the ability to replicate the tumor microenvironment and maintain genetic and phenotypic characteristics, unlike conventional 2D monolayer cultures. Taking this into account, this study generated osteosarcoma organoids derived from xenografts to test different drugs and assess their viability, with the purpose of comparing the results with monolayer cultures. We cultivated the organoids following standard protocols for other tissues, while adapting the medium for mesodermal tumors. Histological analyses were also performed to characterize the organoids and verify the formation of typical osteosarcoma tumor structures. Our results revealed that the organoids were sensitive to doxorubicin and methotrexate, with IC50 values of 0.22 and 0.075, respectively. Resistant organoids to doxorubicin showed lower sensitivity to this drug, as expected, but also showed increased sensitivity to methotrexate. In comparison to 2D cultures, the organoids displayed some resistance to all drugs, which is due to their three dimensional structure that allows them to maintain interactions with other cells and the environment. This structural feature also enables them to maintain a significant cellular heterogeneity, suitable for adapting to toxins. All these findings support 3D models as superior for reproducing such a heterogeneous tumor and conducting pharmacological assays. Therefore, optimizing protocols is crucial so that in the future patient-derived organoids can be developed and used in clinical medicine in personalized therapies.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sarcomas	1
1.2 Osteosarcoma.....	1
1.3 Modelos de experimentación en cáncer.....	3
1.4 Cultivos celulares.....	4
1.5 Organoides.....	5
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1 Línea celular y origen de los organoides usados en la experimentación.....	8
3.2 Medios de cultivo	8
3.3 Descongelación y cultivo de organoides	9
3.4 Mantenimiento y control del cultivo de organoides	10
3.5 Pase y ampliación del cultivo de organoides	10
3.6 Ensayos de sensibilidad a medicamentos quimioterápicos en organoides	11
3.7 Análisis estadísticos.....	12
3.8 Preparación de organoides para histología	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1 Seguimiento del cultivo durante 5 días	14
4.2 Caracterización morfológica de organoides de osteosarcoma.....	15
4.3 Ensayo de fármacos antitumorales en organoides.....	16
4.4 Ensayos de fármacos antitumorales en modelos 2D y 3D	20
5. CONCLUSIONES	24
6. BIBLIOGRAFÍA	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sarcomas

Los sarcomas comprenden un grupo de tumores malignos muy diversos, de origen mesenquimal. Se pueden identificar mediante microscopia óptica y análisis de expresión genética (1).

Atendiendo a una clasificación general hay dos tipos de sarcomas: los sarcomas de tejido blando (se originan en tejidos como el muscular, adiposo, cartilaginoso, nervioso, linfático y sanguíneo) y los sarcomas óseos primarios (se forman a partir de tejido óseo y el más frecuente es el osteosarcoma) (1).

1.2 Osteosarcoma

El osteosarcoma (OS) es un tipo poco común de tumor maligno óseo primario, con una incidencia mundial de 3,4 casos por millón de personas al año. A pesar de su rareza, es el tercer cáncer más común durante la adolescencia, con una incidencia anual de 5,6 casos por millón de niños menores de 15 años (2). Este tipo de tumor representa aproximadamente el 6% de las enfermedades oncológicas en individuos menores de 20 años, y es el tipo más frecuente de tumor óseo maligno en niños y adolescentes, constituyendo el 56% de todas las neoplasias óseas en esta población (3). Tiende a desarrollarse durante la segunda década de vida y raramente se presenta antes de los cinco años (2).

Durante la mayor parte del siglo XX, la tasa de supervivencia a cinco años para este cáncer era muy baja, apenas del 20%. Sin embargo, en la década de 1970, con la introducción de la quimioterapia como tratamiento, esta tasa aumentó significativamente, alcanzando el 50%. En la actualidad, la tasa de supervivencia superado el 65% (2).

El osteosarcoma se caracteriza por producir matriz osteoide, tener una alta tendencia a la metástasis y por afectar preferentemente áreas de rápido crecimiento óseo, como el fémur distal, la tibia proximal y el húmero proximal (4). Teniendo en cuenta la ubicación del tumor en relación con el tejido óseo, hay dos grandes grupos. El primero está constituido por los osteosarcomas centrales o medulares, que se originan en el interior del hueso, donde las células cancerosas se desarrollan en la médula ósea. Por otro lado, los osteosarcomas superficiales o periféricos se desarrollan en la superficie del hueso, afectando el tejido óseo externo (5).

Histología

Histológicamente, el osteosarcoma se distingue por la producción directa de hueso neoplásico o sustancia osteoide, que es una matriz orgánica no mineralizada. Esta matriz, secretada por los osteoblastos, está formada principalmente por colágeno tipo I (90%) y en menor proporción por sustancia fundamental (10%), que incluye proteínas no colágenas, glicoproteínas, proteoglicanos, péptidos, carbohidratos y lípidos. La disposición anárquica y la falta de similitud con el hueso normal son características del osteosarcoma (Fig. 1) (6).

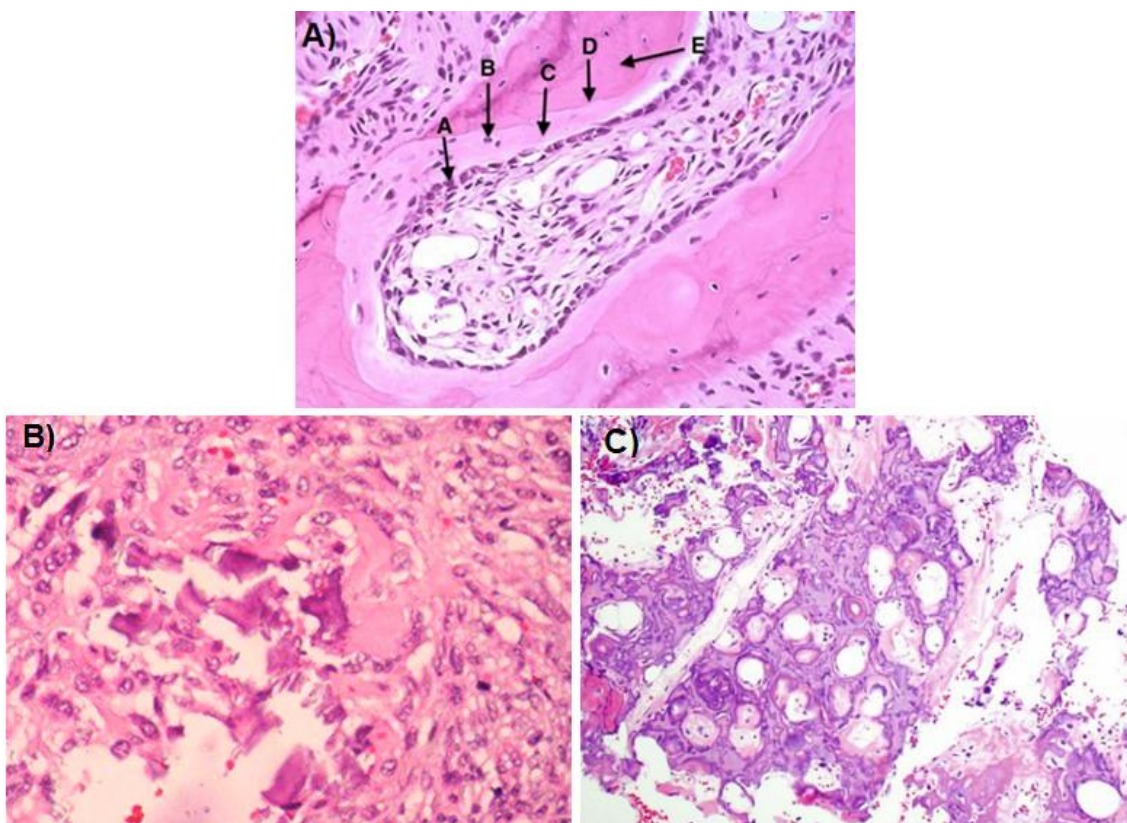


Figura 1: Comparación de muestras histológicas teñidas con Hematoxilina- Eosina de tejido óseo sano (A) y enfermo (B y C). A) Resorción ósea en la que se distingue un tejido óseo bien organizado. Sobre la capa osteogénica perióstica se distinguen los osteoblastos (A) que producen la matriz extracelular del hueso, osteoide (C), sobre la que están los osteocitos (B). La línea de cimentación (D) marca el límite entre el hueso en formación y el ya formado (E). B) Osteosarcoma hiper celular con células pleomórficas con mucha actividad mitótica y osteoide festoneado. C) Osteosarcoma hipocelular con mucha matriz ósea mineralizada, en el que, por tanto, se distingue mucho hueso ya formado teñido de color azul oscuro a rosa dependiendo del grado de mineralización. Imagen A de *Index of /histology/bone_lab/images*, (2015) (7) e imágenes B y C de Wei y Siegal (2013) (8).

Etiología

Etiológicamente, aproximadamente el 70% de los casos de osteosarcoma están relacionados con alteraciones cromosómicas, como mutaciones en los genes RB1, vinculado al retinoblastoma hereditario, y TP53, asociado al síndrome de Li-Fraumeni. Estas mutaciones implican la desactivación del gen supresor de tumores p53, que desempeña un papel fundamental en la regulación del ciclo celular. Además, ciertas exposiciones ambientales, como la interacción con el óxido de berilio, y la radioterapia, especialmente cuando se aplica en dosis elevadas durante la infancia, pueden aumentar el riesgo de osteosarcoma secundario. También, ciertas condiciones óseas anormales, como la enfermedad de Paget, pueden contribuir a la formación de osteosarcomas secundarios, aunque esto ocurre solo en aproximadamente el 1% de los pacientes con esta enfermedad (4).

Tratamiento

El osteosarcoma se trata de diferentes maneras, incluyendo quimioterapia, radioterapia y cirugía (5).

En un principio la amputación era el tratamiento principal, pero desde que se trata con quimioterapia antes de la cirugía las tasas de supervivencia han mejorado del 10-15% al 60-70% (5).

La quimioterapia antes de cirugía en ocasiones ha permitido quitar el tumor sin amputar, lo que mejora la calidad de vida del paciente. Aun así, la cirugía es el método principal y la radioterapia se usa en casos específicos, como en recurrencias locales o cuando el cáncer se propaga a los huesos (5).

Actualmente, el procedimiento estándar para la mayoría de los pacientes es recibir quimioterapia antes y después de la cirugía para aumentar las posibilidades de recuperación (5).

Generalmente, en los tratamientos quimioterápicos se utilizan cuatro agentes: metotrexato, doxorubicina, cisplatino e ifosfamida (2).

1.3 Modelos de experimentación en cáncer

En los laboratorios de investigación del cáncer, se utilizan principalmente tres tipos de modelos: líneas celulares tumorales, modelos murinos y xenoinjertos derivados de pacientes (PDX).

- Las líneas celulares tumorales son fáciles de cultivar y reproducir, ya que, se cuenta con un amplio conocimiento genético y molecular sobre ellas. Sin embargo, tienen la desventaja de ser propensas a la contaminación con otras células y a volverse genéticamente inestables con el tiempo, lo que puede afectar la validez de los experimentos. Además, no logran replicar completamente el microambiente complejo y heterogéneo de un tumor *in vivo* (10).
- Los modelos murinos son modificables genéticamente y permiten estudiar genes específicos y sus efectos en el desarrollo y progresión del cáncer. Aunque genéticamente son similares a los humanos, cuentan con un sistema inmunológico diferente, lo que limita los resultados. Además no logran reproducir la complejidad y heterogeneidad de los tumores (11).
- Los xenoinjertos derivados de pacientes (PDX), consisten en implantes de tejido tumoral humano en ratones. Estos modelos conservan las características genómicas de los pacientes en diversas etapas y antecedentes de tratamiento. Imitan la heterogeneidad intratumoral del cáncer y preservan las arquitecturas tumorales intrínsecas. Sin embargo, el proceso de formación de los PDX lleva mucho tiempo, es costoso y requieren cuidados y condiciones muy específicas para mantener su integridad y utilidad en la investigación (12).

En una posición intermedia entre las líneas celulares tumorales y los modelos murinos se encuentran los organoides. Aunque no son los modelos más comúnmente utilizados en laboratorios, han ganado gran relevancia en los últimos años debido a su capacidad para replicar fielmente las características del tejido original y para imitar la heterogeneidad intratumoral. Además, ofrecen la ventaja de poder personalizarse según las características genéticas de cada paciente (13).

La manipulación de los organoides es comparable a la de las líneas celulares 2D en condiciones de laboratorio, lo que facilita su cultivo y propagación indefinida bajo las condiciones adecuadas. Los organoides pueden generarse a partir de pequeñas muestras, como biopsias específicas de pacientes, y almacenarse en biobancos para su uso futuro. Debido a estas características se han convertido en un modelo versátil y valioso en investigación (13).

1.4 Cultivos celulares

Los cultivos celulares tienen una gran relevancia dentro de la investigación biomédica porque permiten mantener células *in vitro* y conservar sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas (14).

Los cultivos 2D son los más utilizados en la investigación por su fácil manejo y bajo costo. Sin embargo, estos modelos tienen sus limitaciones, ya que, consisten en células no especializadas que carecen de las señales típicas de un tejido, como la interacción célula-matriz extracelular (EMC) y las interacciones célula-célula (2). En contraste, el cultivo 3D, sí que recrea esas interacciones *in vitro*, por lo que es más fiable y de mayor calidad, ya que simula la estructura del tejido u órgano original, permitiendo que las células se comporten de manera similar a como lo harían en su entorno natural (14).

Además, las células cultivadas en sistemas 3D se comportan de manera distinta a las de sistemas 2D y retienen señales importantes de la matriz extracelular (ECM). Por lo tanto, los cultivos 3D proporcionan un enfoque fisiológicamente más relevante para analizar funciones genéticas y fenotipos celulares fuera del organismo (15).

Estas marcadas diferencias en las características físicas y fisiológicas entre los cultivos 2D y 3D hacen que las células cultivadas en sistemas 2D sean más susceptibles a los efectos de los fármacos, ya que no pueden mantener una forma normal como las células cultivadas en sistemas 3D y tienen una organización de receptores de superficie diferente. Por eso, el cultivo 3D proporciona un enfoque más realista en la investigación biomédica, especialmente en el ámbito del descubrimiento de medicamentos contra el cáncer (15).

1.5 Organoides

Un organoide es una estructura celular tridimensional formado a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), células madre embrionarias (ESCs), células de tejido adulto (TCD) o células diferenciadas de tejidos sanos o enfermos como los tumores (16).

Tienen la capacidad de reproducir procesos del desarrollo biológico y procesos patológicos que permiten verificar la calidad de fármacos y drogas, efectuar ensayos toxicológicos y probar tratamientos médicos precisos que nos acercan cada vez más a la medicina personalizada y regenerativa (17).

Para que una estructura pueda ser denominada organoide, debe cumplir con ciertas características específicas: en primer lugar, debe contener más de un tipo celular característico del órgano que representa; en segundo lugar, es esencial que tenga al menos una función específica de dicho órgano; por último, la organización celular del organoide debe asemejarse a la del órgano modelo (18).

Aplicaciones

Los organoides tienen muchas aplicaciones, entre las que se encuentra una alta capacidad para modelar diferentes enfermedades como, por ejemplo, las enfermedades genéticas, que son causadas por mutaciones en genes específicos. Los organoides también son útiles en el desarrollo de estrategias de tratamientos personalizados para cada paciente, ya que permiten estudiar detalladamente las características genéticas de la enfermedad (19).

Además, permiten el estudio del desarrollo embrionario gracias a las células madre embrionarias (ESC), las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y los tejidos fetales, que conservan las características de sus etapas originales de desarrollo. (20).

Los organoides pueden emplearse para investigar las interacciones entre el huésped y los microorganismos, dando una mejor comprensión de los mecanismos patógenos y mostrando estrategias de tratamiento más efectivas (1). También se utilizan en inmunoterapia, donde se pueden expandir las células inmunitarias in vitro, y en terapia personalizada contra el cáncer. La generación de cultivos de organoides a partir del tejido tumoral del paciente permite desarrollar estrategias de tratamiento específicas y personalizadas (19).

Igualmente, los organoides son valiosos para el campo de la medicina regenerativa, dado que tienen un potencial ilimitado para reemplazar tejidos dañados. Esta característica puede apoyar el uso de donantes de órganos y, además, prevenir respuestas inmunes tras el trasplante al utilizar organoides derivados de tejidos sanos del mismo individuo, evitando así rechazos y mejorando la efectividad de los tratamientos (19).

La última de las aplicaciones que mencionaremos y la cual tiene relación con el objetivo principal de este estudio se refiere al uso de organoides para investigar el impacto de los medicamentos. Los organoides se emplean para evaluar y elegir nuevos compuestos. La amplificación en laboratorio de los organoides obtenidos de biopsias del lugar afectado es un recurso fundamental para el desarrollo de terapias personalizadas. La habilidad para cultivar tanto organoides sanos como enfermos derivados de pacientes humanos simplifica la realización de ensayos clínicos para probar combinaciones de fármacos que se enfocan específicamente en un tejido. No cabe duda de que los organoides contribuyen a la identificación de tratamientos más eficaces y con efectos secundarios mínimos (20)

2. OBJETIVOS

En la actualidad más de la mitad de los pacientes diagnosticados con cáncer logran superar la enfermedad. Sin embargo, la tasa de supervivencia varía según el tipo de tumor y la línea celular de origen. Por ejemplo, los tumores de mama, en otro tiempo considerados mortales para muchos, ahora presentan altas tasas de supervivencia, gracias a los avances en el diagnóstico temprano y tratamientos efectivos. En contraste, otros tumores, como los carcinomas pancreáticos siguen siendo uno de los tipos de cáncer con peor pronóstico.

Ante este panorama, es esencial enfocar los esfuerzos de investigación en los tipos de tumores menos comunes, centrándose en la optimización de las terapias. Para ello es vital probar nuevos modelos de experimentación que recreen más fielmente los tumores y permitan el cribado de alto rendimiento.

Con estos antecedentes, en este trabajo realizado en células procedentes de osteosarcomas, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Caracterizar los organoides formados desde un punto de visto histológico para analizar si presentan las alteraciones típicas asociadas al osteosarcoma.
- Evaluar la capacidad de supervivencia de los mismos frente a diferentes tipos de agentes quimioterápicos con el fin de valorar su efectividad para tratar el osteosarcoma humano.
- Comparar la viabilidad biológica frente a fármacos de células de osteosarcoma humano cultivadas en cultivos 2D y 3D.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Línea celular y origen de los organoides usados en la experimentación

Se utilizó una línea celular tumoral comercial de osteosarcoma humano, la línea 143-B (CRL-8303) de la ATCC (Manassas, VA, EE. UU.), ampliamente usada en investigaciones y pruebas de medicamentos.

En el pasado, el laboratorio inoculó esta línea celular y su variante resistente a doxorrubicina, generada y caracterizada previamente (21), en ratones de experimentación inmunodeprimidos y se derivaron organoides formados a partir de estos xenógrafos. A partir de estos organoides se comenzó la experimentación de este trabajo.

Toda la experimentación, a excepción de la evaluación de la viabilidad celular de los organoides con luminiscencia, el análisis estadístico y la preparación de los organoides para histología, se hizo dentro de una sala de cultivos celulares clasificada como nivel de contención 2 en cabinas de seguridad biológica tipo II.

3.2 Medios de cultivo

En las tablas 1 y 2 se expone la composición de los diferentes medios de cultivo utilizados.

Tabla 1: Composición del medio basal (MB) o AdDMEM (+/+/+)

Componente	Referencia	Cantidad
Advanced DMEM/F12	Gibco, 12634010	
GlutaMax	Gibco, 35050061	1%
P/S	Gibco, 15140122	1%
HEPES	Gibco, 15630056	1%

Tabla 2: Composición de medio completo (MC) para mantenimiento y pase de organoides

Componente	Referencia	Concentración stock	Concentración medio
Medio base (véase tabla 1)	-	-	-
Nicotinamida (mM)	Sigma, N0636	1000	10
N-acetil-L-cisteína (mM)	Sigma, A9165	500	1,25
B27	Gibco, 12587010	50	1
hEGF (µg/mL)	PeptoTech, AF-100-15	100	0,05
hFGF-2 (µg/mL)	PeptoTech, AF-100-18B	100	0,005
Forskolin (µM)	Tocris Bioscience, 1099	20000	1

R-respondin ($\mu\text{g/mL}$)	Peprotech, 120-38	200	0,1
CHIR 99021 (μM)	Sigma, SML1046	3000	3
hFGF-10 ($\mu\text{g/mL}$)	Peprotech, AF-100-26	100	0,01
Noggin ($\mu\text{g/mL}$)	Peprotech, 120-10C	100	0,1
Y-27632 (μM)	Biogems, 1293823	100000	10
IL-6 (ng/mL)	Peprotech, 200-08	2000	20
IL-8 (ng/mL)	Peprotech, 200-06	2000	20

3.3 Descongelación y cultivo de organoides

Los organoides, que se descongelaron lo más rápidamente posible, habían sido criopreservados con DMSO (dimetilsulfóxido), un crioprotector que evita la formación de cristales de hielo que podrían dañar las membranas celulares, pero que, a su vez, resulta tóxico. Para descongelar los dos crioviales que contenían los organoides, uno de la línea parental y otro de la resistente, se metieron en un baño serológico a 37°C durante 1 minuto, y la suspensión celular resultante se diluyó en medio basal y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.

Cada pellet se resuspendió suavemente en 240 μL de BME (Basement Membrane Extract, ref.: 3536-005-02, Bio-Techne, MN, EE. UU.), para asegurar que las células quedasen embebidas en la matriz. La matriz de BME se polimerizó a 37°C, creándose así gotas tridimensionales semiesféricas de textura gelatinosa que actúan como estructuras de soporte para las células. Por esta razón, se almacenaron las alícuotas de 500 μL de BME en el congelador a -80°C y, durante su uso, se depositaron en un contenedor de hielo. Como referencia, se echó 10 μL de BME por cada semiesfera que se quería formar.

Seguidamente, se plaqueó en una multiplaca sin tratamiento (ref.: 144530, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) de 24 pocillos que fue precalentada a 37°C en una estufa. Se usaron los 12 pocillos centrales, los 6 pocillos superiores para la línea parental y los 6 pocillos inferiores para la línea resistente. En cada pocillo, se formaron 4 semiesferas equidistantes de 10 μL cada una con una micropipeta P10. Después, se invirtió la placa con un golpe seco para que las células creciesen en “hanging drop” (gota colgante), técnica que aprovecha la gravedad para mantener las semiesferas en suspensión y permitir que las células se autoensamblen en estructuras tridimensionales.

La placa se incubó durante 20-30 minutos en una estufa a 37°C para que las semiesferas solidificaran. Tras esto, se volvió a invertir la placa y se añadieron con cuidado, para no levantar las semiesferas, 500 µL de medio completo (MC) en cada pocillo. Luego, se dejó la placa incubando en una estufa a 37°C con una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

3.4 Mantenimiento y control del cultivo de organoides

El medio de cultivo de los organoides se refrescó cada 48 o 72 horas para asegurar una concentración adecuada de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo.

El medio antiguo se absorbió utilizando una pipeta Pasteur de cristal conectada a una bomba de vacío. La punta de la pipeta se apoyó en la pared del pocillo para tener un mayor control, mientras que la placa multipocillos se mantenía inclinada para facilitar la recolección de todo el medio. Luego, se usó una micropipeta P1000 para añadir cuidadosamente, dejando caer sobre la pared del pocillo, 500 µL de medio completo (MC) fresco, previamente atemperado a temperatura ambiente.

El estado de crecimiento de los organoides en el cultivo y las posibles contaminaciones se monitorizaron al microscopio óptico siempre después de cada pase y ampliación del cultivo de organoides, así como después de cada cambio de medio.

3.5 Pase y ampliación del cultivo de organoides

Cuando los organoides en el cultivo alcanzaron una densidad elevada, se procedió a realizar la expansión, lo cual suele ocurrir cada 7-14 días.

A partir de una placa multipocillos de 24 compartimentos, con 6 pocillos con organoides parentales y 6 con organoides resistentes, se amplificó para obtener tres placas adicionales. Una de estas placas se mantuvo sin cambios como placa de mantenimiento, conservando la disposición original. Las otras dos placas, destinadas a ser utilizadas para probar tratamientos, se cultivaron: una de ellas con organoides parentales y otra con organoides resistentes, ocupando la totalidad de los pocillos.

Para ello, primero se echó 5 µL 1 mg/mL de Dispasa II (ref.: 4942078001, Roche, Mannheim, Alemania) en cada pocillo de la placa de partida, con el fin de disgregar enzimáticamente la matriz de BME, y se dejó incubando a 37°C durante 30 minutos.

A continuación, se dividieron las muestras de organoides parentales en tres fracciones: una de 3 pocillos (1,5 mL), otra de 2 pocillos (1 mL) y la última de 1 pocillo (500 µL). Cada fracción se transfirió a tubos Eppendorf de 5 mL y se ajustó el volumen hasta 5

mL con medio basal frío para detener la acción enzimática de la Dispasa II. Lo mismo se hizo con las muestras de organoides resistentes.

Seguidamente, se plaqueó en una multiplaca sin tratamiento (ref.: 144530, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) de 24 pocillos que fue precalentada a 37°C en una estufa. Se usaron los 12 pocillos centrales, los 6 pocillos superiores para la línea parental y los 6 pocillos inferiores para la línea resistente. En cada pocillo, se formaron 4 semiesferas equidistantes de 10 µL cada una con una micropipeta P10. Después, se invirtió la placa con un golpe seco para que las células crecieran en “hanging drop” (gota colgante), técnica que aprovecha la gravedad para mantener las semiesferas en suspensión y permitir que las células se autoensamblen en estructuras tridimensionales.

La placa se incubó durante 20-30 minutos en una estufa a 37°C para que las semiesferas solidificaran. Tras esto, se volvió a invertir la placa y se añadieron con cuidado, para no levantar las semiesferas, 500 µL de medio completo (MC) en cada pocillo. Luego, se dejó la placa incubando en una estufa a 37°C con una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

3.6 Ensayos de sensibilidad a medicamentos quimioterápicos en organoides
A partir de cuatro placas multipocillos de 24 compartimentos cultivadas enteras, una de ellas con organoides parentales y otra con organoides resistentes, se cultivaron cuatro placas por completo de 96 pocillos con fondo plano (ref.: 353377, Corning, AZ, EE. UU.) tratadas para cultivos celulares. Las placas se trataron con Doxorribucina, Metotrexato, Mitramicina y Cisplatino a diferentes concentraciones, con el propósito de examinar la viabilidad biológica de los organoides a estos tratamientos.

Los pasos a seguir para conseguir tal fin son los mismos que los del apartado anterior, salvo por dos excepciones. Solo se centrifugó una vez para retirar el sobrenadante con la matriz de BME, ya que, como lo se quiere, es estudiar la viabilidad de los organoides, no interesa disgregarlos para formar nuevos. Lo que se pretende es dejar los ya formados y añadirles la matriz de BME de nuevo para que puedan interaccionar las células con el sustrato y recrear el microambiente tumoral. Al final, se incorporaron los fármacos del estudio a las concentraciones indicadas en la tabla 3 y se enrasaron hasta 2,8 mL con medio completo (MC). Posteriormente, se dejaron incubando durante 96 horas en una estufa a 37°C y con un 5% de CO₂.

Tabla 3: Medicamentos utilizados y las concentraciones empleadas en los ensayos de sensibilidad

Medicamento	Referencia	Concentración stock	Concentración final
Doxorrubicina	Selleckchem, S1208	10 mM en DMSO	0,001 μ M; 0,01 μ M; 0,05 μ M; 0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 10 μ M
Metotrexato	Selleckchem, S1210		
Mitomicina	Selleckchem, S1166		
Cisplatino	Cedido por Entrechem (colab)	10 mM en DMF	0,01 μ M; 0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 10 μ M; 20 μ M

Para cada experimento se realizaron triplicados biológicos y en todos los ensayos se incluyeron pocillos control de organoides con medio completo (MC).

Pasadas las 96 horas, se evaluó la viabilidad celular utilizando el reactivo CellTiter-Glo 3D (ref.: G9681, Promega, WI, USA) para la proliferación celular y citotoxicidad. CellTiter-Glo 3D se utiliza para determinar la viabilidad celular basándose en la cantidad de ATP presente, siendo un indicador del metabolismo celular activo. Emplea la enzima luciferasa para medir el nivel de ATP en las células, generando una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP producido. Una señal de luciferasa más intensa indica una mayor actividad metabólica, mientras que una señal reducida puede ser indicativa de citotoxicidad debido a la exposición a sustancias tóxicas o tratamientos. Se agregaron 100 μ L del reactivo a cada pocillo y las placas se cubrieron con papel de aluminio para evitar la entrada de luz. Se agitaron las placas durante 5 minutos y posteriormente se dejaron reposar durante 25 minutos. La luminiscencia generada se midió utilizando un lector de placas en modo luminiscencia, con un tiempo de integración de 0,5 s y una ganancia de 100, realizando la lectura desde arriba a una altura de 1 mm.

3.7 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software GraphPad Prism 9.0.1. Los resultados se expresaron como la media más/menos la desviación estándar, basándose en al menos tres experimentos independientes. Y se representaron como una regresión no lineal dosis-respuesta.

3.8 Preparación de organoides para histología

A partir de una de las placas no destinadas a probar tratamientos, realizadas durante el pase y ampliación de cultivos de organoides, se llevaron a cabo tres procedimientos histológicos de manera diferente, según se expone a continuación.

Se retiró el medio completo (MC) de tres pocillos de la placa utilizando micropipeta P1000. En dos de estos pocillos, se realizaron dos lavados con 1 mL de PBS cada uno, con cuidado de no levantar las semiesferas del fondo, y se eliminó el PBS restante para después dejar que los organoides se fijasen en formol al 4% durante toda la noche. Es importante tener en cuenta que el formol puede deshidratar los tejidos, incluyendo la matriz de BME, lo que puede afectar a su estructura y composición. Por esta razón, en uno de los dos pocillos se añadió además glutaraldehído al 0,1%, otro agente de fijación que no causa deshidratación. Aparte, en el tercer pocillo se hicieron también dos lavados con 1 mL de PBS cada uno, pero esta vez bruscos para levantar las esferas, se transfirió la suspensión a un Eppendorf de 3 mL y se disgregaron los organoides. Luego se dejó el Eppendorf reposando para que el pellet se formase por gravedad, fijándose con formol al 4%.

Al día siguiente, por la mañana, se retiraron los agentes de fijación (formol y glutaraldehído) y se hicieron dos lavados con 1 mL de PBS cada uno. Se añadió el histogel (ref: HG-4000-012, Eprelia, Japón) hasta cubrir los organoides o el pellet. Después se desmoldó todo y se incluyó en casetes de inclusión histológica, que se llevó a cabo en parafina. Este procesamiento de las muestras, así como la tinción con Hematoxilina-Eosina de las secciones obtenidas a partir de los bloques de parafina, se realizó en el laboratorio del Biobanco del Principado de Asturias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Seguimiento del cultivo durante 5 días

En la progresión temporal del cultivo, ambos tipos de organoides tanto aquellos de la línea parental como los de la resistente, presentaron una morfología esférica densa sin lumen (Fig. 2).

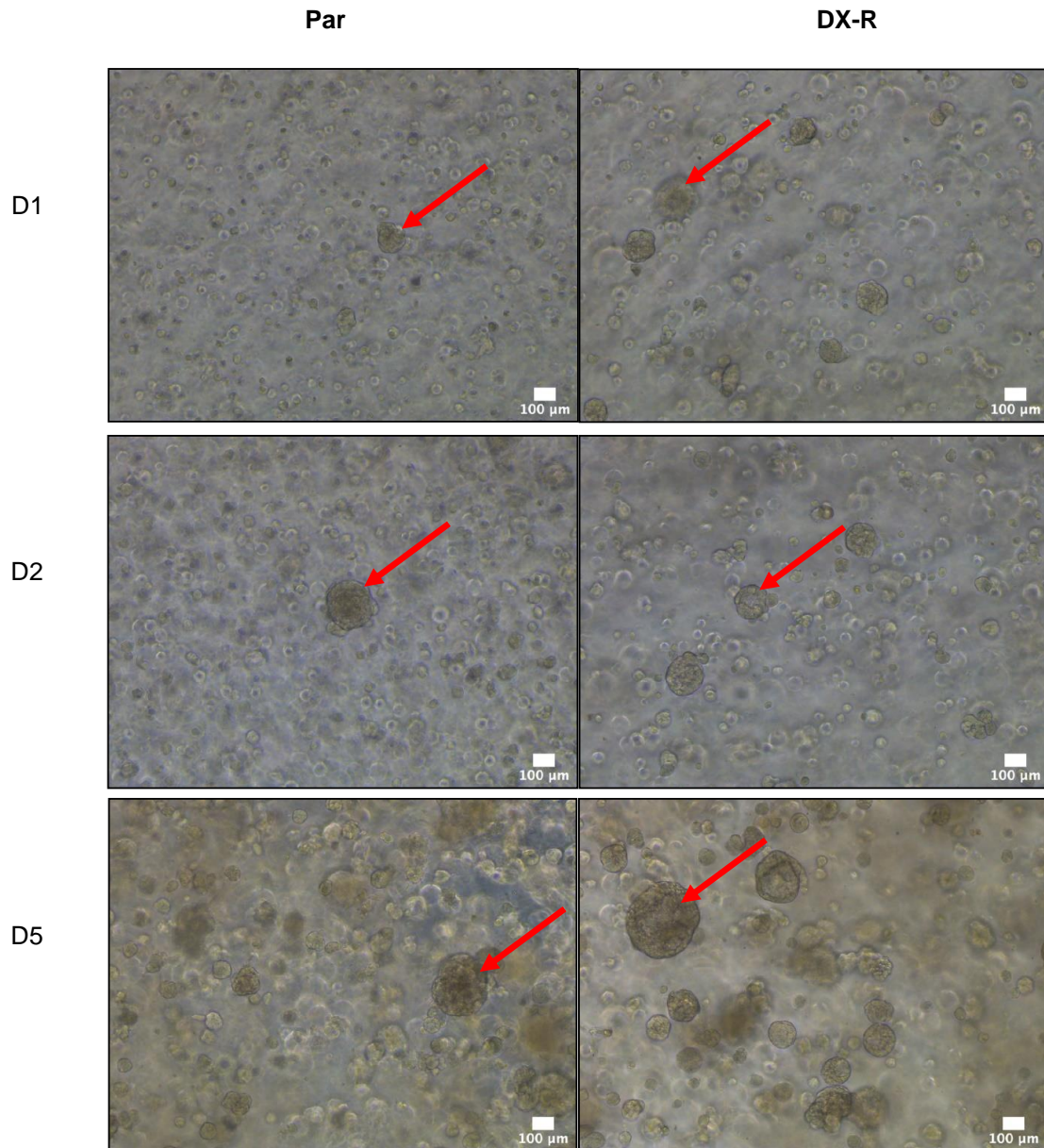


Figura 2: Evolución en el tiempo del cultivo de organoides de osteosarcoma derivados de xenoinjertos. D1 = día 1; D2 = día 2; D5 = día 5; Par = línea parental; DX-R = línea resistente; Flecha roja = organoide esférico sin lumen. Fotografías tomadas del microscopio óptico de campo claro.

Los organoides, tal como se observan en la Figura 2, experimentaron un aumento progresivo de tamaño con el tiempo, lo que implica la necesidad de realizar ampliaciones o pases del cultivo. Para este estudio se realizaron cada cinco días como máximo, pues es muy importante llevar a cabo la ampliación de los organoides antes de que alcancen dimensiones considerables, con el fin de evitar la muerte celular y la pérdida de la estructura. También es muy importante examinar regularmente el cultivo para identificar signos de contaminación, determinar el momento óptimo para realizar un pase o ampliación e identificar signos de inviabilidad (22).

Durante el procesamiento y establecimiento de los organoides, ambas líneas celulares presentaron un aumento de tamaño y una tasa de proliferación muy similar. Esto era esperable, ya que la diferencia biológica que hay entre ambas líneas no tiene por qué afectar al crecimiento en un medio de cultivo controlado. En general, no se identificaron inconvenientes significativos. La calidad de las muestras fue alta, dado que el punto de partida para esta investigación consistió en la utilización de un pase de organoides ya formados, los cuales fueron disgregados y preservados mediante congelación. Es decir, se partía de cultivos de organoides estables. Además, no se registraron contaminaciones durante el cultivo. El único inconveniente surgido fue durante el cultivo de una de las placas de tratamiento, específicamente con la mitramicina. En este caso, la mayoría de las esferas no se cultivaron en la placa correctamente, lo que pudo ser el causante de la pérdida de la morfología característica de los organoides y de generar errores potenciales en el ensayo de sensibilidad de dicho fármaco.

4.2 Caracterización morfológica de organoides de osteosarcoma

En este estudio se utilizó la tinción de Hematoxilina y Eosina para verificar si se conseguía replicar el osteosarcoma in vitro. Es esta una técnica histológica muy utilizada en todo tipo de tejidos y de investigaciones, ya que posibilita la obtención de información detallada acerca de la morfología, tanto a nivel celular como tisular. El inconveniente encontrado es que los osteosarcomas no presentan una estructura típica definida, sino que se distinguen por constituir un tejido óseo desorganizado. Por ello, caracterizar su morfología resulta complicado.

Hoy en día no hay protocolos estandarizados para el procesamiento histológico de muestras procedentes de sarcomas. Por tanto, se siguieron las recomendaciones de las instrucciones del histogel comercial utilizado, probándose tres tipos de metodologías de fijación, como se expuso en el apartado 3.8 de los materiales y

métodos. Sin embargo, únicamente se obtuvieron buenos resultados cuando la muestra se fijó con glutaraldehído.

En ambos cultivos, tanto de la línea Parental como de la Resistente, solo se observaron células con su núcleo y citoplasma discernibles (Fig. 3), no llegando a visualizarse ni matriz ósea, ni áreas con una marcada tasa de proliferación.

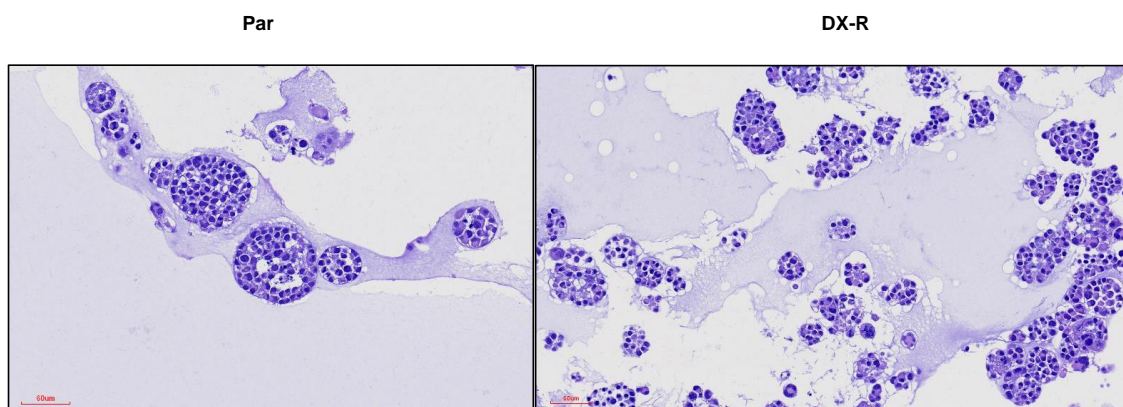


Figura 3: Muestras histológicas de organoides derivados de osteosarcoma (línea 143-B). A la izquierda se observan organoides de la línea Parental (Par) y a la derecha los organoides de la línea Resistente (DX-R). Se puede distinguir en ambas micrografías las células dentro de la gota que forma el organoide, con su núcleo y citoplasma. Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E). Fotografías tomadas con el microscopio óptico de campo claro.

Por consiguiente, la técnica histológica empleada en nuestro caso no fue suficiente para validar uno de los objetivos del trabajo, que era confirmar si los organoides habían adquirido la misma estructura que la de los osteosarcomas. No se evidenciaron características típicas de osteosarcoma en la muestra, tales como la presencia de matriz osteoide, elevada necrosis, y mitosis atípicas, las cuales son muy distintivas en el osteosarcoma convencional. De la misma manera, no se han observado células fusiformes ni formaciones óseas, características del osteosarcoma fibroblástico (23). En definitiva, haría falta de otro tipo de pruebas de marcaje más específico para cumplir este objetivo, como podría ser, por ejemplo, realizar una inmunohistoquímica para detectar la proteína SATB2, que se encuentra muy expresada en las células

4.3 Ensayo de fármacos antitumorales en organoides

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la sensibilidad de los organoides de osteosarcoma, tanto de la línea Parental como de la Resistente, al tratamiento con agentes quimioterapéuticos con el fin de determinar el agente más adecuado.

Ambas líneas de organoides se expusieron a diversas concentraciones de doxorubicina, metotrexato, mitramicina y cisplatino de manera independiente durante 96 horas. Tras evaluarse la viabilidad biológica mediante el uso de CellTiter-Glo 3D, se

observó que a medida que las concentraciones del fármaco aumentaban, disminuía proporcionalmente la viabilidad biológica de todos los organoides.

En la Figura 4 se representan las curvas de sensibilidad de los organoides frente a los fármacos.

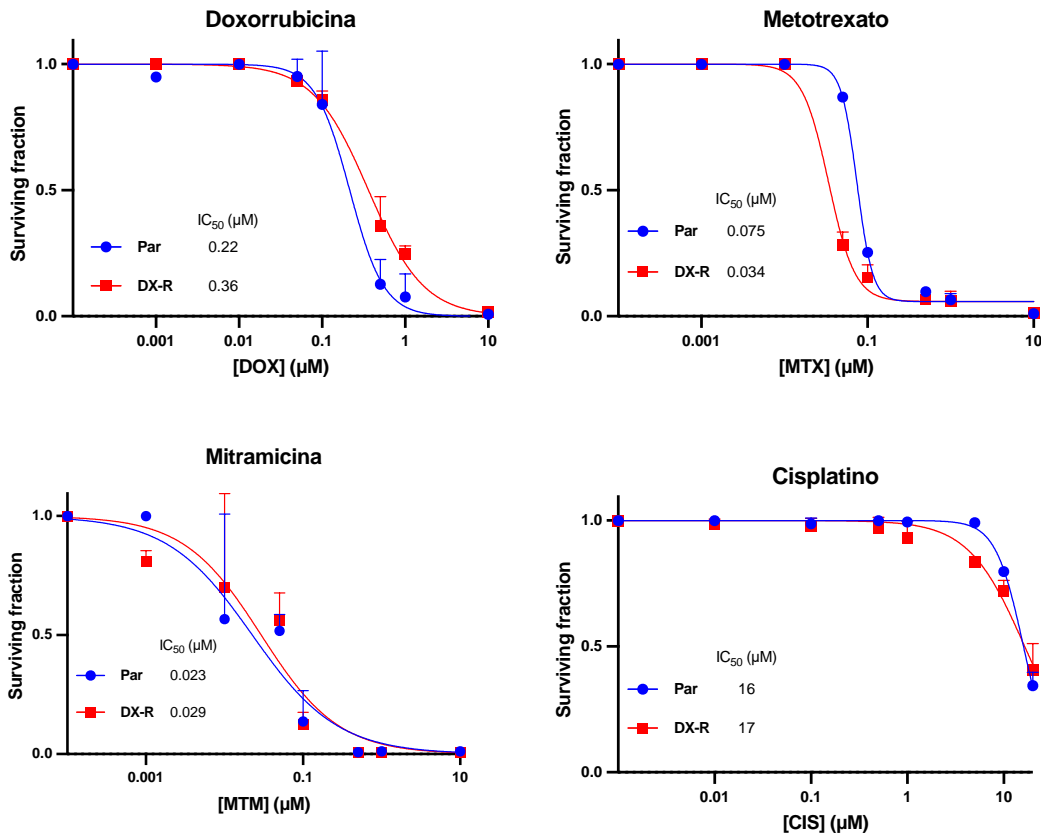


Figura 4: Curvas de sensibilidad de los organoides de osteosarcoma a los tratamientos con doxorubicina, metotrexato, mitramicina y cisplatino. Se representa la viabilidad biológica de dos líneas de organoides con respecto a un control sin tratamiento, en presencia de diferentes concentraciones de fármacos expresados en escala logarítmica en base 10.

El tratamiento de organoides con mitramicina y cisplatino, mostraron una pendiente de la curva similar tanto para las líneas parentales como para las resistentes. Sin embargo, a concentraciones bajas de medicamento, se evidenció una menor supervivencia de los organoides parentales en el caso de la mitramicina, mientras que en el cisplatino ocurrió lo contrario.

La sensibilidad que se observó en los organoides tratados con cisplatino fue muy pequeña, pues su viabilidad comienza a disminuir a concentraciones superiores a 1 µM en el caso de la línea resistente y 5 µM en la línea parental.

Por otro lado, la mitramicina fue el tóxico al cual los organoides resultaron ser más sensibles. En otras palabras, a las concentraciones más bajas, inferiores a $0,001 \mu\text{M}$, los organoides empezaron a experimentar una disminución en su viabilidad. Sin embargo, no fue sino cerca de los $10 \mu\text{M}$ que se observó una viabilidad nula para ambas líneas de organoides. Hay que mencionar, no obstante, que el resultado de este fármaco probablemente no sea concluyente, por lo mencionado al final del apartado 4.1 que, además, se reflejó en las barras de desviación típica (SD) de la gráfica.

En el caso de la doxorubicina, ambas líneas de organoides iniciaron el proceso de disminución de su viabilidad ligeramente por encima de $0,05 \mu\text{M}$ del fármaco. Sin embargo, la pendiente de la curva de la línea parental resultó ser más pronunciada que la resistente, de manera que la línea parental mostró una viabilidad nula aproximadamente a $3 \mu\text{M}$, mientras que la línea resistente mostró este mismo resultado a una concentración más elevada, alrededor de $10 \mu\text{M}$. Significa que, aunque en ambas líneas se empieza a observar muerte celular a la misma concentración de fármaco, la línea resistente necesita dosis más altas para conseguir tasas de muerte celular elevadas.

El tratamiento con metotrexato mostró que la línea resistente presentaba también mayor sensibilidad al fármaco, ya que, a concentraciones más bajas, los organoides experimentaban una mayor mortalidad.

Por consiguiente, los datos de este análisis muestran cómo la doxorubicina interfiere en el mecanismo intracelular de los organoides resistentes y los hacen más o menos sensibles a otros compuestos. Un estudio científico previo apoya este resultado, y muestra líneas de osteosarcoma resistentes a doxorubicina que son más sensibles a metotrexato y cisplatino (21). Esto se podría explicar a través de los mecanismos moleculares que inducen la resistencia a fármacos; sin embargo, la mayoría de estudios han relacionado la resistencia a doxorubicina, metotrexato y cisplatino a un mismo evento molecular, el cual es el aumento de flujo de las bombas de salida MDR (multidrug resistance) pertenecientes a la familia de transportadores ABC. Por lo tanto, los resultados de este experimento sugieren que hay diversos mecanismos moleculares que inducen la resistencia a fármacos (21).

En definitiva, los resultados de la experimentación dan información sobre la citotoxicidad de los fármacos para células tumorales. Sin embargo, también es importante relacionar lo anterior con la citotoxicidad que presentan frente a células sanas para determinar cuál de los quimioterápicos es más conveniente.

Asumiendo que las dosis prescritas reflejan la cantidad de fármaco que las células sanas del organismo humano pueden llegar a tolerar sin experimentar efectos nocivos graves, se pueden relacionar nuestros datos con las dosis de tóxicos utilizadas para tratamiento de osteosarcoma y así ver qué citotoxicidad tienen frente a células sanas.

En los tratamientos quimioterapéuticos las dosis que se suelen prescribir en ciclos de tres semanas para tratar sarcomas en adultos son las siguientes:

- Doxorubicina: 75 mg/m² (25)
- Metotrexato: 36.000 mg/m² (26)
- Cisplatino: 100 mg/m² (27)
- Mitramicina: 75 mg/m² (26)

En este contexto, el metotrexato resulta ser el fármaco que para el tratamiento de sarcomas se prescribe en mayor dosis, lo que quiere decir que su toxicidad frente a células sanas no debe ser muy nociva. Además, se observó en los resultados que fue el segundo medicamento con la IC50 más baja, lo que significa que fue el segundo compuesto del cual se necesitó menos concentración en el medio para detener la actividad de la mitad de las células tumorales. Por Tanto, se puede considerar al metotrexato como mejor tratamiento, dado que mata en mayor proporción células malignas que células sanas.

El cisplatino mostró la IC50 más elevada, llegando a los 16 µM, lo cual sugiere que fue el fármaco menos tóxico para las células tumorales a concentraciones bajas y medias. Por tanto, puede afirmarse que su función como agente quimioterapéutico se ve limitada, ya que su toxicidad y dosis de prescripción son significativamente menores que la del metotrexato y el resto de fármacos.

La mitramicina y la doxorubicina mostraron valores de IC50 más cercanos al metotrexato que el cisplatino. La mitramicina tuvo la IC50 más baja, lo que indica una mayor sensibilidad de las células tumorales al fármaco. Aunque la mitramicina y doxorubicina presentaron toxicidades similares a las del metotrexato frente a las células tumorales, las dosis administradas en tratamientos son menores, sugiriendo el papel complementario de estos fármacos como agentes quimioterapéuticos. Es relevante señalar que para concentraciones de 10 µM, tanto la doxorubicina como la mitramicina logaron un factor de supervivencia nulo, situación que no se observó con el metotrexato.

En resumen, parece que el metotrexato es la mejor opción terapéutica para abordar el osteosarcoma. Su eficacia, evidenciada por concentraciones reducidas y una curva de respuesta acentuada, respalda su potencial como agente quimioterapéutico en el tratamiento de esta neoplasia.

Esta conclusión se ve respaldada por un estudio previo que apunta a que el metotrexato es uno de los fármacos oncológicos más activos (28). La actividad del metotrexato se ha vinculado a varios mecanismos, entre los cuales estarían la competencia por el ácido fólico del entorno, generando deficiencia en las células y eventualmente induciendo su apoptosis, y también la interferencia durante la replicación del ADN (ácido desoxirribonucleico) y la división celular que provoca la detención de este proceso y su consiguiente muerte celular (29).

Otro estudio clínico ha mostrado que aproximadamente un tercio de los pacientes que se tratan con cisplatino acaban desarrollando lesiones renales agudas (30). Además, según el mismo estudio este fármaco puede llegar a causar daños en diversos órganos, como el oído, el sistema gastrointestinal y la médula ósea, aunque, la nefrotoxicidad destaca como el principal efecto adverso. Se podría decir que, por estas razones, la cantidad de cisplatino que se prescribe en clínica es muy baja, si se quiere tener un efecto citotóxico elevado, ya que las células tumorales tienen muy poca sensibilidad al cisplatino con respecto a otros fármacos.

A pesar de los grandes efectos adversos de algunos agentes quimioterapéuticos, como el cisplatino y la notable eficacia antitumoral de otros compuestos, como el metotrexato, la práctica clínica no recomienda el tratamiento exclusivo con un solo fármaco. Se aboga por la implementación de una terapia combinada, utilizando diversos medicamentos con perfiles distintos, con el objetivo de superar posibles resistencias celulares y minimizar los potenciales efectos secundarios que podrían surgir al emplear un único agente (28).

4.4 Ensayos de fármacos antitumorales en modelos 2D y 3D

Otro objetivo importante de este trabajo fue demostrar la validez de los modelos 3D dentro de la investigación biomédica, y analizar las disparidades de resultados en comparación con los modelos 2D.

Con este propósito, el Laboratorio de Sarcomas y Terapias Experimentales de la FINBA proporcionó los resultados, ya obtenidos en otras experimentaciones, de tratamientos con doxorubicina, metotrexato, mitramicina y cisplatino, llevados a cabo a las mismas concentraciones que las empleadas en esta experimentación. Estos tratamientos se realizaron tanto en cultivos en monocapa (2D) como en cultivos de

organoides (3D) tratados durante 72 horas, limitándose exclusivamente a la línea celular 143- B Parental.

Se apreció una gran sensibilidad a todos los fármacos, por parte de los cultivos celulares en monocapa (2D) (Fig. 5). A pesar de que las células en los cultivos 2D mostraron un inicio de la mortalidad a concentraciones muy bajas en todos los casos, la completa falta de viabilidad biológica se manifestó, a excepción de con el cisplatino, a concentraciones muy cercanas de las obtenidas en cultivos 3D.

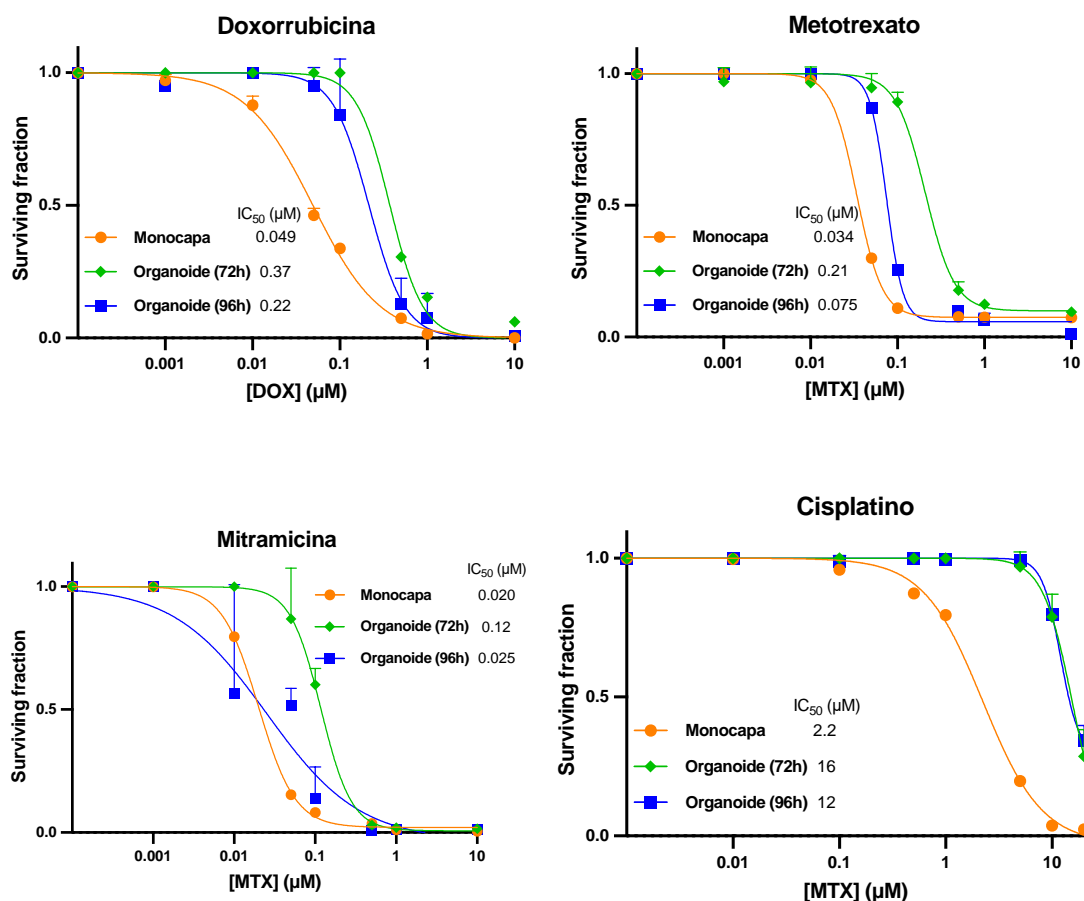


Figura 5: Curvas de sensibilidad de los cultivos celulares en monocapa (2D) y los cultivos de organoides (3D) a los tratamientos con doxorubicina, metotrexato, mitramicina y cisplatino. Se representa la viabilidad biológica de los diferentes tipos de cultivos con respecto a un control sin tratamiento, frente a determinadas concentraciones de fármacos expresados en escala logarítmica en base 10.

Los organoides tratados con doxorubicina y metotrexato durante 72 y 96 horas, mostraron que, a medida que se prolonga el tiempo de exposición del organoide al fármaco, se requiere una concentración menor para iniciar la mortalidad celular.

En el caso del cisplatino, las curvas de las 72 y 96 horas fueron muy similares y prácticamente, se registraron porcentajes de viabilidad idénticos. Por eso, en este

caso, se podría predecir que, para el tratamiento, la concentración del fármaco podría ser más determinante que el tiempo de exposición a dicha concentración.

La mitramicina fue el tratamiento que más diferencias mostró frente a lo esperado, teniendo en cuenta los resultados de la tabla 5. Este fue el único medicamento para el cual un cultivo de organoides, tratado durante 96 horas, demostró una mayor sensibilidad que un cultivo en monocapa. Asimismo, la mitramicina presentó la diferencia de sensibilidad entre un cultivo de organoides tratado durante 72 y 96 horas más significativa. Este resultado probablemente se deba a los fallos en la experimentación explicados en el apartado 4.1 y, por tanto, su fiabilidad está comprometida.

Observando los resultados anteriores, destaca que los organoides sean más sensibles a doxorribucina y el metotrexato conforme aumenta el tiempo de tratamiento. Este resultado puede deberse a los efectos que tienen las sustancias en los organoides. La doxorribucina causa daño en el ADN, detiene la proliferación, daña las mitocondrias y aumenta la expresión de P53 (31). De distinta manera, el metotrexato también interfiere en el ADN, lo hace alterando la replicación del ADN y la división celular compitiendo por el ácido fólico del medio (29). De manera que a más tiempo las células estén expuestas al fármaco y a sus consiguientes efectos, peor función biológica presentarán y menos concentración de medicamento será necesario para desencadenar la apoptosis.

También cabe mencionar la diferencia de reacción por parte de los cultivos celulares 2D y 3D ante los agentes quimioterápicos. Se vio que los cultivos 2D son más sensibles a los tratamientos que los 3D, esto se debe principalmente por la disposición espacial de cada uno. Los cultivos 2D son homogéneos, con todas las células expuestas de manera uniforme al entorno, mientras que los cultivos 3D, al ser tridimensionales, presentan una notable heterogeneidad, en la cual las células exteriores están en contacto con el medio nutritivo y el oxígeno, en un estado de proliferación, mientras que las células internas se encuentran en un ambiente de hipoxia, sin acceso a nutrientes, lo que altera su expresión y comunicación con otras células (32).

En relación a lo anterior, hay estudios que resaltan la relevancia de la hipoxia en la resistencia a fármacos en los modelos 3D, indicando que las células en condiciones de hipoxia inducen la detención del ciclo celular, evitando así ser afectadas por los agentes tóxicos. Además, la hipoxia puede influir en la expresión génica y las

interacciones celulares, generando una mayor heterogeneidad y, por tanto, resistencia (33). Por otro lado, investigaciones adicionales sugieren que las células en cultivos 3D tienen la capacidad de activar la expresión de proteínas asociadas con la proliferación y supervivencia, así como de activar transportadores de fármacos, contribuyendo así a la resistencia (34).

A la luz de todos los resultados, este trabajo ha demostrado el valor de los organoides como modelo de investigación. Gracias a ellos se ha demostrado que varios eventos moleculares pueden conducir a la resistencia a medicamentos, y que la resistencia a un fármaco modifica la relación de las células con otros debido a que se altera el funcionamiento biológico. Los organoides son el único modelo capaz de mantener las interacciones con otras células y el entorno, imitar el microambiente tumoral y mantener una elevada heterogeneidad, gracias a su estructura tridimensional. Esto hace de ellos un modelo ideal para la medicina personalizada. No obstante, primero se tendrían que conseguir organoides derivados de pacientes, para lo que sería necesario optimizar los procedimientos, pues a día de hoy, aún no se cuenta con protocolos estandarizados para osteosarcoma.

5. CONCLUSIONES

1. La tinción histológica convencional de hematoxilina y eosina no es suficiente para caracterizar morfológicamente los organoides obtenidos a partir de células de osteosarcoma de la línea 143-B, siendo necesarios otros marcajes más específicos que pongan de manifiesto algunas características histológicas de las mismas, como un marcaje inmunohistoquímico con la proteína SATB2 que se encuentra sobre expresada en osteosarcomas.
2. Si bien a los fármacos doxorubicina, metotrexato y cisplatino se les asocia un mismo mecanismo para generar resistencia, el cual se basa en el aumento de flujo de las bombas de los transportadores ABC, las células de osteosarcoma de nuestro estudio han demostrado ser resistentes al primero y sensibles a los otros dos, lo que implica que existen diversos mecanismos que las lleva a ganar resistencia a tóxicos.
3. Doxorubicina, metotrexato, mitramicina y cisplatino presentan diferente actividad farmacológica en los mencionados organoides, siendo recomendable utilizar una terapia combinada con varios de ellos, con el fin de evitar generar resistencias a los dichos fármacos y minimizar los efectos secundarios que produciría el uso de uno de ellos a grandes concentraciones.
4. El tratamiento de estos organoides con los fármacos empleados afecta de diferente forma la viabilidad celular de los mismos en función del tiempo de aplicación. Los organoides tratados con doxorubicina y metotrexato muestran una mayor sensibilidad a mayor tiempo de exposición al medicamento, mientras que, el tratamiento prolongado con cisplatino no muestra cambios de sensibilidad.
5. Los organoides de células de osteosarcoma de la línea 143-B son modelos más fiables para investigar este tipo de cáncer que los cultivos 2D, ya que muestran una resistencia a fármacos semejante a la de los tumores in vivo gracias a su estructura tridimensional que les permite recrear el microambiente tumoral y establecer interacciones con otras células y el entorno.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Skubitz KM y D'Adamo DR. Sarcoma. *Mayo Clinic Proceedings*. 2007; 82(11):1409-32. doi: 10.4065/82.11.1409.
2. Misaghi A, Goldin A, Awad M y Kulidjian AA. Osteosarcoma: a comprehensive review. *Société Internationale de Chirurgie Orthopédique et de Traumatologie*. 2018; 4:12. doi: 10.1051/sicotj/2017028.
3. Beltrán LM, Eidelman DO y Suárez NLG. Caracterización de los niños con osteosarcoma no metastásico quienes recibieron tratamiento con mifamurtida en dos instituciones de Bogotá (Colombia) entre 2014 y 2017. *Universitas Medica*. 2019; 60(4), 1-8. doi: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed60-4.oste>.
4. de Armas L, Delgado D, Alvarado K y Cordero C. Osteosarcoma: Etiología, diagnóstico y tratamiento. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica*. 2018; 8(4), 1-5. doi: https://doi.org/10.15517/rc_uchsd.v8i4.34243.
5. Roldán PL, Gómez SÁ y Pulido JG. Actualización del osteosarcoma para el médico de familia. *Sociedad Española de médicos de atención primaria*. 2011; 37(1): 22-29. doi: 10.1016/j.semerg.2010.06.008.
6. Picci P, Sangiorgi L, Caldora P, Benassi MS y Campanacci M. Histopatología del osteosarcoma. *Revista Española de Cirugía Osteoarticular*. 1995; 30(178): 211-216.
7. Index of /histology/bone_lab/images. (2015). medcell. Recuperado en 30-10-2023 de https://medcell.org/histology/bone_lab/images.
8. Wei S y Siegal GP. 2013. Atlas of bone pathology. Ed. Springer Science & Business Media, Atlanta.
9. Niu N y Wang L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics*. 2015; 16(3): 273-285. doi: 10.2217/pgs.14.170.
10. Ruggeri BA, Camp F y Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochemical pharmacology*. 2014; 87(1): 150-161. doi: 10.1016/j.bcp.2013.06.020.
11. Abdolahi S, Ghazvinian Z, Muhammadnejad S, Saleh M, Asadzadeh Aghdaei H y Baghaei K. Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research. *Journal of Translational Medicine*. 2022; 20(1): 206. doi: 10.1186/s12967-022-03405-8.
12. Fan H, Demirci U y Chen P. Emerging organoid models: leaping forward in cancer research. *Journal of hematology & oncology*. 2019; 12(1): 142. doi: 10.1186/s13045-019-0832-4.
13. García SC. Cultivo de células en 3D: la nueva dimensión de los cultivos celulares. *Cuadernos del Tomás*. 2013; (5): 215-232.
14. Kim J., Koo BK y Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020; 21(10): 571-584. doi: 10.1038/s41580-020-0259-3.

15. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F y Delort L. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages. *International journal of molecular sciences*. 2021; 22(22): 12200. doi: 10.3390/ijms222212200.
16. Zhao Z, Chen X, Dowbaj AS, Bratlie K, Lin L, Fong ELS, Balachander GM, Chen Z, Soragni A, Huch M, Zeng YA, Wang Q, Yu H. Organoids. *Nature Reviews Methods Primers*. 2022; 2:94. doi: 10.1038/s43586-022-00174-y.
17. Amiel-Pérez J, Amiel-Sáenz J y Amiel-Torrelío M. Organoids: fundamentals, present and future. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2022; 39: 227-235. doi: 10.17843/rpmpesp.2022.392.10203.
18. Calvache Aguilar, P. Avances en el desarrollo de organoides como modelo de estudio en medicina regenerativa [TFG, Universitat Islas Balears]. 2019. UIBrepositori. <http://hdl.handle.net/11201/149841>.
19. Drost J y Clevers H. Translational applications of adult stem cell-derived organoids. *Development*. 2017; 144(6): 968-975. doi: 10.1242/dev.140566.
20. Fatehullah A, Tan SH y Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature cell biology*. 2016; 18(3): 246-254. doi: 10.1038/ncb3312.
21. Gallego B, Murillo D, Rey V, Huergo C, Estupinan O, Rodríguez A, Tornin J y Rodríguez R. Addressing doxorubicin resistance in bone sarcomas using novel drug-resistant models, *International journal of molecular sciences*. 2022; 23 (12): 6425. doi: 10.3390/ijms23126425.
22. Oudin A, Baus V, Barthelemy V, Fabian C, Klein E, Dieterle M, Wantz M, Hau AC, Dording C, Bernard A, Michelucci A, Yabo YA, Kanli G, Keunen O, Bjerkvig R, Niclou SP y Golebiewska A. Protocol for derivation of organoids and patient-derived orthotopic xenografts from glioma patient tumors. *Structured Transparent Accessible Reproducible Protocols*. 2021; 2(2): 100534. doi: 10.1016/j.xpro.2021.
23. Rothzerg E, Xu J y Wood D. Different Subtypes of Osteosarcoma: Histopathological Patterns and Clinical Behaviour. *Journal of Molecular Pathology*. 2023; 4(2): 99-108. doi: <https://doi.org/10.3390/jmp4020011>.
24. de Álava E. Diagnóstico histológico de los tumores óseos. *Revisiones en cáncer*. 2018; 32(2): 3.
25. Ficha tecnica doxorubicina accord 2 mg/ml concentrado para solucion para perfusion efg. 2016. Centro de información de medicamentos. Recuperado el 30-02-2024 de <https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/73266.html>.
26. Castro Núñez I, Echarri Arrieta E, Ferriols Lisart F, García Silva A, Martínez Cutillas J, Oliveras Arenas M y de Puig de Cabrera E. Medicamentos citostáticos. Guía de utilización. 1993. Editado por la Sociedad Española de Farmacéuticos de Hospitales [SEFH]/Wyeth, Madrid.
27. Ficha tecnica cisplatino farmacia 1 mg/ml concentrado para solucion para perfusion efg. 2023. Centro de información de mecidacmentos. Recuperado el 30-02-2024 de http://cima/dochtml/ft/FT_62107.html.
28. van Dalen EC y de Camargo B. Methotrexate for high-grade osteosarcoma in children and young adults. *Cochrane database of dystematic reviews*. 2011; (5). doi: <https://doi.org/10.1002/14651858>.

29. Igualada Quintanilla J, Romero Candel G y Tejada Cifuentes F. Metotrexato: toxicidad pulmonar, hepática y hematológica. *Revista Clínica de Medicina de Familia*. 2016; 9(3): 159-166. doi: <https://scielo.isciii.es/scielo.php>.
30. Bernal-Barquero CE, Vázquez-Zapién GJ y Mata-Miranda MM. Revisión de las alteraciones en la expresión génica y vías apoptóticas provocadas en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. *Nefrología*. 2019; 39(4): 362-371. doi: 10.1016/j.nefro.2018.11.012.
31. Lüpertz R, Wätjen W, Kahl R, Chovolou Y. Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology*. 2010; 271(3):115-21. doi: 10.1016/j.tox.2010.03.012.
32. Urrutia Ayala FJ. Uso de cultivos 2D, esferoides u organoides como modelo de análisis de sensibilidad a drogas anticancerígenas en cáncer de ovario [Tesis doctoral, Universidad de Concepción]. 2021. DSpace <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/10561>.
33. Muz B, de la Puente P, Azab F y Kareem Azab A. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*. 2015; 3: 83-92. doi: <https://doi.org/10.2147/HP.S93413>.
34. Breslin S y O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget*. 2016; 7(29): 45745-45756. doi: 10.18632/oncotarget.9935.