

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Avances en el desarrollo de organoides como modelo de estudio en medicina regenerativa

Paula Calvache Aguilar

Grau de Bioquímica

Any acadèmic 2018-19

Treball tutelat per Marta Monjo Cabrer Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional	itza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional Autor		Tutor	
per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats	Sí	No	Sí	No
exclusivament acadèmiques i d'investigació	Х		Х	

Paraules clau del treball:

organoide, medicina regenerativa, células madre pluripotentes inducidas.

Índice

Abs	stract	4
Abr	reviaturas	5
1	Introducción a los organoides	5
1	1.1 ¿Qué son los organoides?	5
1	1.2 Historia de los organoides	6
1	1.3 ¿Cómo se forman los organoides?	7
1	1.4 Aplicaciones de los organoides	10
2	Objetivos del Trabajo	11
3	Materiales y métodos	11
4	Resultados y discusión	13
4	4.1 Organoides intestinales	13
4	1.2 Uso de organoides en medicina regenerativa	17
	4.2.1 Biofabricación de intestinos in vitro	17
	4.2.2 Ingeniería de tejidos del intestino delgado (TESI)	18
	4.2.3 Trasplante directo de organoides	19
5	Conclusiones	22
6	Bibliografía	22

ABSTRACT

Con la tecnología actual en ingeniería de tejidos, se pueden crear unidades funcionales de diferentes órganos, denominados organoides, que se autoorganizan *in vitro* formando una estructura 3D, capaces de reproducir tanto la función como la estructura del órgano equivalente *in vivo*. Aunque tienen muchas más aplicaciones, son muy importantes en medicina regenerativa ya que pueden ser útiles para el tratamiento de un gran número de enfermedades donde el órgano no funciona como es debido, ya sea por un defecto genético, por un traumatismo o por otras causas. En este estudio se recogen los últimos avances en el desarrollo, así como en las diferentes formas de maduración de los organoides para su posterior trasplante en el huésped, centrándonos en los organoides intestinales y en las diferentes enfermedades que afectan a este órgano.

With the technology in tissue engineering that exists today, functional units of different organs can be created, called organoids, which self-organize *in vitro* forming a 3D structure, capable of reproducing both the function and the structure of the equivalent organ *in vivo*. Although they have many more applications, they are very important in regenerative medicine since they can be useful for the treatment of many diseases where the organ does not work properly, either due to a genetic defect, a trauma or other factors. This study includes the latest advances in the development, as well as in the different forms of maturation of the organoids for subsequent transplantation in the host, focusing mainly on the intestinal organoids and the different diseases that affect this organ.

ABREVIATURAS

ASCs (Células madre adultas)

PSCs (Células madre pluripotentes)

iPSCs (Células madre pluripotentes

inducidas)

ESCs (Células madre embrionarias)

ISCs (Células madre intestinales)

ECM (Matriz extracelular)

EGF (Factor de crecimiento epidérmico)

HIO (Organoides intestinales humanos)

TESI (Ingeniería de tejidos del intestino

delgado)

SBS (Síndrome del intestino corto)

TA (Células de amplificación transitoria)

EII (Enfermedad inflamatoria intestinal)

1 INTRODUCCIÓN A LOS ORGANOIDES

1.1 ¿Qué son los organoides?

Podemos definir un organoide como una unidad funcional de un órgano determinado, que es capaz de reproducir, en cultivo, una estructura biológica similar tanto en función como en estructura, a su equivalente *in vivo*. Son como versiones funcionales de nuestros órganos, pero en miniatura, formados por masas de células que se autoorganizan *in vitro* formando una estructura tridimensional. Hoy en día, un organoide puede provenir de un fragmento de algún tejido, de una célula madre ubicada en un órgano adulto (ASCs), de una célula madre pluripotente (PSCs) que puede ser una célula madre embrionaria (ESCs) o una célula madre pluripotente inducida (iPSCs) ¹. El uso de las iPSCs requerirá de un paso adicional comparado con las ESCs, ya que las células somáticas primero habrá que des-diferenciarlas mediante la expresión de los genes Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 ².

Para poder denominar organoide a una estructura debe cumplir unas características específicas: (i) debe poseer más de un tipo de célula característica del órgano que representa; (ii) es necesario que posea al menos una función específica de dicho órgano; (iii) la organización celular del organoide debe parecerse a la del órgano modelo (Figura 1) ³.

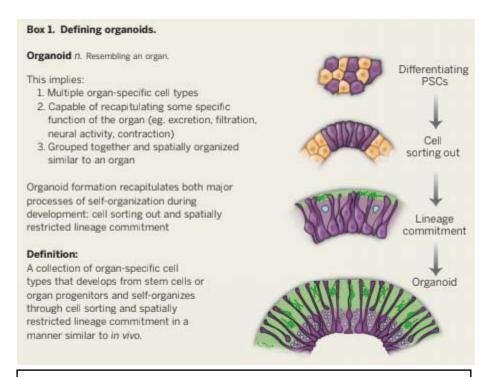


Figura 1. Esquema sobre la definición de organoides. "Lancaster M., Knoblich J. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. Recuperado de http://science.sciencemag.org/ ".

1.2 HISTORIA DE LOS ORGANOIDES

El campo de los organoides ha avanzado mucho en los últimos años. A día de hoy, se pueden recrear una serie de órganos y tejidos *in vitro*, al menos de manera parcial. En el simposio de 2016 se dieron cuenta de que los investigadores usaban los términos "organoides", "esferoides" y "cultivos 3D" de manera intercambiable. Fue por eso por lo que llegaron al consenso de que el cultivo de organoides se refiere al crecimiento de células en 3D para generar unidades celulares que se asemejan a un órgano tanto en función como en estructura. De ahí el término organoide, donde 'oides' en latín significa semejanza ⁴.

Sin embargo, el campo de investigación de los organoides empezó hace muchas décadas, cuando los pioneros en cultivos celulares empezaron a preguntarse cómo se producía la organogénesis. Ya en el año 1900, los investigadores querían reproducir la organogénesis en cultivo y para ello empezaron cultivando fragmentos de tejido. Harrison, en 1906, cultivó fibras nerviosas por la técnica

"hanging drop tissue culture" ⁵. Durante la década de 1920, la investigación se centró en la embriología, lo que condujo al desarrollo de cultivos en tubo y al método de vidrio de reloj ⁶. En 1950 se habían cultivado *in vitro* muchos otros órganos, pero con la limitación impuesta por los métodos que existían, que solo permitían el cultivo de láminas de órganos finas ^{7,8}. En esta misma década, Moscona cultivó células en suspensión y demostró que eran capaces de reagruparse y restablecer el patrón estructural de su tejido de origen 9. En 1971, Bissell y Tilles, determinaron que los hepatocitos adultos y los embrionarios, así como otros tipos de células, crecían mejor en colágeno, pero perdían sus funciones de diferenciación después de uno o dos días de cultivo 10. Fue en 1975 cuando Michalopoulos y Pitot descubrieron que era posible desencadenar la diferenciación de células epiteliales como los hepatocitos, modificando el comportamiento del sustrato al que estaban unidos. Se dieron cuenta de que cuando los geles se desprendían y flotaban en la parte superior del medio, las células hepáticas adultas expresaban marcadores de diferenciación específicos de tejido ¹¹. En 1977, Engelbreth, Holm y Swarm aislaron un gel con características de la membrana basal y lo denominaron sarcoma EHS, que hoy se conoce como Matrigel 12. En 1991, Streuli y otros investigadores, evidenciaron por primera vez que la ECM, a través de la interacción directa con las integrinas, estaba regulando la expresión y la diferenciación génica ¹³. En la década del 2000, una serie de experimentos demostraron que los cultivos en 3D eran una excelente forma de comprender los mecanismos del desarrollo y el impacto que tienen sobre el desarrollo de las enfermedades cuando estos mecanismos salen mal 1.

1.3 ¿CÓMO SE FORMAN LOS ORGANOIDES?

El proceso de desarrollo del cuerpo humano consiste en un conjunto de procesos controlados que derivan en los tejidos diferenciados a partir de un cigoto, un proceso similar ocurre cuando se forman los teratomas que son tumores que se forman a partir de PSCs que pueden contener diferentes tipos de tejidos en su interior ¹⁴. Los organoides, se pueden obtener a partir de PSCs gracias a un proceso similar a la formación de los teratomas, pero de manera controlada *in*

vitro y en presencia de un adecuado andamiaje 3D y de los factores bioquímicos correctos, los cuales permitirán que tenga lugar la autoorganización de las células. De igual manera, *in vitro* también se puede conseguir la homeostasis necesaria de cada tejido gracias a los medios de cultivo y sus condiciones específicas que garantizan la diferenciación y la renovación celular ¹⁵.

Entre los factores bioquímicos que se necesitan para la formación de organoides, se incluyen: factores de crecimiento y pequeñas moléculas cuya finalidad es manipular las vías de señalización más importantes en la homeostasis celular específica de cada tejido, que son añadidos de forma exógena; y los componentes del nicho derivados de las mismas células encargados de la señalización autocrina, paracrina o yuxtacrina. En cuanto al andamiaje, Matrigel® es una membrana basal, rica en proteínas de matriz extracelular, extraída de la línea celular Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) ¹⁶ muy comúnmente usada debido a que proporciona un buen andamiaje y también proporciona ligandos de la membrana basal que ayudan a la supervivencia celular y a la formación de organoides ¹⁵.

Diferentes estudios enfocados a entender el patrón de organización de tejidos sugieren que las células son capaces de llevar a cabo un proceso llamado "cell sorting out" o segregación celular, que consiste en la capacidad que tienen las células para reorganizarse y auto ensamblarse para dar lugar a estructuras con las mismas propiedades histológicas que sus modelos *in vivo*. Este proceso se lleva a cabo gracias a la intervención de proteínas de superficie que se encargan de la adhesión celular. En la morfogénesis de los tejidos, también se ve involucrado el mecanismo encargado de la especificación del destino celular, que es el responsable de que las células embrionarias se diferencien en un tipo celular u otro ³.

Es importante destacar que la formación de cada organoide requiere de factores específicos para su formación. En el caso del epitelio intestinal se puede conseguir que las células PSCs humanas deriven en un epigaster (*hindgut*), la

zona caudal del tracto gastrointestinal, al aplicar activina A en los primeros pasos del proceso, una molécula de la familia de los $TGF-\beta$ relacionada con la diferenciación celular, que es capaz de conducir las células a su conversión en mesodermo. Posteriormente, la adición de Wnt3 y Fgf4 (factores posteriorizantes) se encargan de especificar la identidad del epigaster que será el precursor del intestino 3 .

La formación del cerebro humano requiere de un alto grado de coordinación entre las células madre neurales (NSCs) y la dinámica del nicho dentro del cual habitan. Se puede conseguir a través del uso de diferentes morfógenos como BMP, Wnt, Shh, RA y FGF que las PSCs se diferencien en diversos subtipos neuronales. También existen diferentes protocolos que permiten dar lugar a estructuras más complejas del cerebro como el córtex o la pituitaria o organoides que presentan diferentes regiones cerebrales interdependientes ^{15,17,18}.

En el caso del hígado, no se ha conseguido dar lugar a un organoide de hígado propiamente dicho, pero si se ha conseguido generar brotes de hígado a partir de la diferenciación de las PSCs en células endodérmicas. Para conseguir esto fue necesario emplear tres poblaciones de células diferentes: PSCs humanas derivadas del hígado, células madre mesenquimales humanas y células humanas endoteliales. Se observó que al mezclarse en una capa de Matrigel® de alta densidad, estas células formaban agregados 3D de forma espontánea ³.

Para generar organoides retinales es necesario dar lugar a agregados tridimensionales de PSCs en un medio mínimo, para así generar un neuroectodermo. Con la finalidad de formar tejidos neuroepiteliales más firmes es necesario agregar Matrigel® al medio de cultivo en las etapas más tempranas de la formación del organoide. Con esto se consigue también la formación de un epitelio pigmentado. Esto favorece la formación de brotes de tejido primordial de la retina similares a la vesícula óptica. Estos brotes son separados del resto del tejido neuroepitelial para ser colocados en un medio de cultivo que garantiza la

identidad del tejido de la retina, dando lugar finalmente a copas ópticas bastante similares a la retina en etapas tempranas del desarrollo ³.

1.4 APLICACIONES DE LOS ORGANOIDES

A diferencia de los cultivos en 2D, los organoides tienen una serie de ventajas, ya que permiten el crecimiento, el movimiento y la diferenciación de las células en 3D. Esto los convierte en un modelo eficaz para comprender el desarrollo de los órganos, la morfogénesis de los tejidos y las bases genéticas o moleculares de las enfermedades. Además, pueden ser usados para estudiar el efecto de los fármacos e incluso en la terapia de reemplazo de tejidos ¹⁹. Otra ventaja es que los organoides se pueden expandir indefinidamente, se crioconservan como biobancos y se pueden manipular fácilmente usando técnicas similares a las establecidas en el cultivo tradicional ²⁰.

Como ya hemos comentado, una de las múltiples aplicaciones de los organoides es que permiten estudiar de manera intensiva los procesos que gobiernan el desarrollo embrionario. Esto se debe gracias a que las ESC, las iPSC y los tejidos fetales conservan las características de su etapa de desarrollo original y podemos obtener información más detallada del desarrollo embrionario en un cultivo al que se induce sistemáticamente la diferenciación de las células 20. Otra aplicación de los organoides es que pueden ser usados para modelar diferentes enfermedades. Un ejemplo de esto son las enfermedades genéticas, causadas por mutaciones en algún gen, en el que son útiles para el desarrollo de estrategias de tratamiento específicas para cada paciente ²¹. También pueden ser usados para estudiar las interacciones huésped – microbio, ya que el estudio de la infección y manifestación bacteriana y viral permitirá una mejor comprensión de los mecanismos patógenos y posteriormente conducirá a mejores estrategias de tratamiento 20. También pueden resultar muy útiles en la inmunoterapia, explotando los organoides para expandir las células inmunitarias in vitro, o en la terapia personalizada contra el cáncer, ya que la generación de cultivos organoides a partir de tejido tumoral derivado del paciente puede permitir el desarrollo de mejores estrategias de tratamiento específicas para éste ²¹.

Otra de las aplicaciones de los organoides consiste en el uso de estos para estudiar el efecto de los fármacos, donde son utilizados para probar y seleccionar nuevos compuestos para tratar diversas afecciones. La amplificación *in vitro* de los organoides derivados del paciente a partir de biopsias en el sitio de la enfermedad representan un recurso importante para el desarrollo de tratamientos personalizados. La capacidad de cultivar organoides sanos y enfermos de pacientes humanos también permite el uso de pruebas clínicas para combinaciones de medicamentos que se dirigen selectivamente al tejido enfermo, lo que ayuda a identificar tratamientos más efectivos y con mínimos efectos secundarios ²⁰.

La última de las aplicaciones que vamos a nombrar y en la que más nos vamos a centrar en este trabajo consiste en el uso de organoides en medicina regenerativa, donde podrían servir como una fuente ilimitada para reemplazar los tejidos dañados. Esto puede complementar el uso de organismos donantes y, además, prevenir una respuesta inmune después del trasplante, si se usan organoides derivados de tejido sano del mismo individuo ²¹.

2 OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo principal del trabajo es realizar un estudio bibliográfico para revisar los conocimientos actuales sobre el desarrollo de organoides para su uso como modelo de estudio en medicina regenerativa, centrándonos principalmente en los organoides intestinales.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

En los últimos años, el tema de los organoides vuelve a estar en auge y se puede encontrar una gran cantidad de información, en parte, gracias al gran número de aplicaciones que tienen estos organoides y por lo tanto al estudio de éstas en gran cantidad de publicaciones.

Para la búsqueda de la literatura utilizada, se empleó principalmente la base de datos computarizada PUBMED. Para empezar, se hicieron búsquedas relacionadas con los organoides, así como su uso como modelo de estudio en medicina regenerativa. Finalmente, también se hicieron búsquedas más concretas sobre organoides intestinales, relacionándolos también con la medicina regenerativa. Las palabras clave más usadas en los motores de búsqueda fueron:

- Organoides
- Organoides intestinales
- Organoides y medicina regenerativa
- Organogénesis
- Organoides y aplicaciones
- Organoides e historia

Usando estas palabras clave, se encontró una gran cantidad de información que podía ser de utilidad para el trabajo. Para acotar un poco más la búsqueda, se seleccionaron los artículos de revisión y se limitó la búsqueda a los últimos cinco años.

Para la parte introductoria del trabajo se realizó una búsqueda más general sobre los organoides, así como su proceso de formación, sus aplicaciones, y la historia:

Palabras clave	Publicaciones (Pubmed)
Organoid	575
Organogenesis	3501
Organoids AND applications	109
Organoids AND history	10

Debido a la gran cantidad de publicaciones en Pubmed, seleccionamos los artículos según su título. Aquellos que incorporaban las palabras 'organoid formation', 'organogenesis', 'history', 'applications' fueron seleccionados para posteriormente leer el abstract y decidir si podían ser de utilidad.

Para la parte más específica del trabajo, se realizó una búsqueda bastante más concreta sobre los organoides intestinales específicamente, sobre el uso de estos en medicina regenerativa y los avances más recientes que se tienen:

Palabras clave	Publicaciones (Pubmed)
Intestinal organoid	96
Organoids AND regenerative	111
medicine	
Intestinal organoid AND	27
regenerative medicine	

Como antes, debido a la gran cantidad de publicaciones en Pubmed, volvemos a seleccionar los artículos según su título. Aquellos que incorporaban las palabras 'engineering', 'transplantation', 'intestinal organoid technology', y las palabras 'intestinal y regenerative medicine' fueron seleccionados para posteriormente leer el abstract y decidir si podían ser de utilidad.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Organoides intestinales

El tracto gastrointestinal está compuesto de múltiples órganos que surgen de un tubo intestinal primitivo común que se extiende desde la boca hasta el ano. Este tubo intestinal se forma por el plegamiento de la capa endodérmica, ²² que a la vez se subdivide en tres regiones: la región anterior (foregut), la región media (midgut) y la región posterior (hindgut). Cada una de estas regiones genera órganos específicos durante el desarrollo embrionario ¹⁹.

La superficie del intestino delgado está comprendida por un epitelio altamente plegado de vellosidades, microvellosidades y criptas intestinales. Este elevado plegamiento que presenta sirve para aumentar la superficie total del intestino, facilitando de esta manera la absorción de nutrientes ²³. Las criptas intestinales funcionan como el nicho en el que residen las células madre intestinales (ISC) LGR5+, unas células que se intercalan entre las células Paneth ²⁴ con un ciclo relativamente lento, que dan lugar a una población de células multipotente y altamente proliferativa conocidas como células de amplificación transitoria (TA), que se diferencian a medida que migran desde la cripta hacia las vellosidades. Cuando las células TA se mueven fuera de la cripta están totalmente diferenciadas en uno de los muchos tipos de células que se requieren para que el epitelio funcione como es debido ²³. Estas células pueden ser enterocitos, células calciformes, células de Paneth y células enteroendocrinas, todas ellas derivadas de las células madre LGR5+ ²⁵.

La auto renovación y la diferenciación de las células madre LGR5+ se consigue a través de la regulación de varias vías de señalización dentro de las criptas intestinales. La señalización Wnt es considerada la ruta que mantiene la proliferación de las células madre LGR5+, controla el posicionamiento de la célula dentro de la cripta y activa la diferenciación terminal de las células Paneth. Además, mantiene el estado indiferenciado de las células progenitoras de la cripta intestinal ²⁶. Por lo tanto, la mayor concentración de Wnt3a y EGF está presente en la base de las criptas (Figura 2a), ya que se requieren para el mantenimiento y la proliferación de las células madre ²⁷. Existe un gradiente de concentración de Wnt3a en las criptas intestinales, con unos niveles más altos en la base de estas que luego van disminuyendo hacia la parte superior. Este gradiente, junto con el aumento de BMP en la parte superior de las criptas facilita la diferenciación inicial de las células madre LGR5+ junto con la proliferación y diferenciación de las células TA ²³.

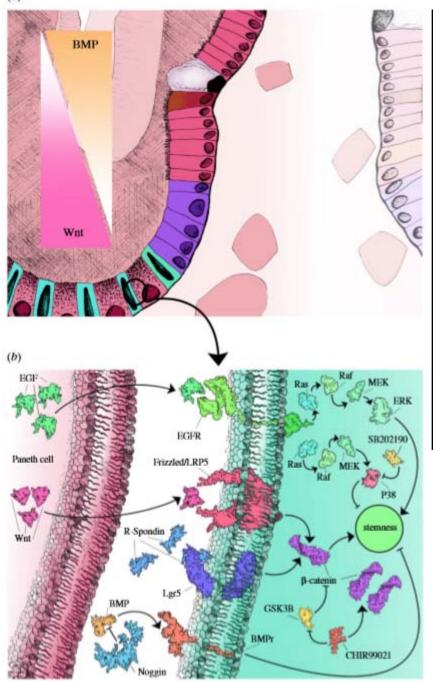


Figura 2. Vías de señalización involucradas en el mantenimiento de las células madre en el nicho intestinal. Representación del gradiente de señalización que promueve el mantenimiento de las células madre (Wnt) y la diferenciación (BMP) (a). Agonistas y antagonistas involucrados en las diferentes vías de señalización del mantenimiento de las células madre en el nicho intestinal (b). Fair KL, Colquhoun J, Hannan NRF. 2018 Intestinal organoids for modelling intestinal development and disease. Phil. Trans. R. Soc. B 373: 20170217.

http://dx.doi.org/10.1098/r

Los organoides intestinales se pueden crear ya sea mediante el aislamiento de criptas intestinales de donantes (tejido intestinal adulto) o mediante la diferenciación in vitro de células ESCs o iPSCs. En ambos casos, los organoides resultantes comparten muchas características similares al epitelio intestinal nativo. Además, se ha demostrado que los organoides intestinales presentan las mismas funciones que los órganos in vivo, incluida la producción de moco y las funciones absorbentes y secretoras ²⁸. Las condiciones de cultivo son prácticamente las mismas para ambos casos, requieren de un medio basal al cual se agregan factores de crecimiento, incluidos EGF, Noggin y gastrina, esenciales para regular el crecimiento de la mucosa intestinal y la proliferación de las células epiteliales intestinales. Wnt3a también es crucial para regular la auto renovación, la proliferación y la diferenciación 23. La vía de señalización de Wnt está regulada por R-Spondin-1 y por la inhibición de BMP4 mediante Noggin ²⁹ (Figura 2b). Además, los organoides se incorporan en Matrigel®, que sirve de andamio ya que imita de cerca la composición de la membrana basal y permite la proliferación, diferenciación y autoorganización de las células integradas en estructuras 3D ³⁰. Una vez incorporados, se auto ensamblan de manera que la superficie luminal del epitelio se dirige hacia el centro del organoide y el lado basolateral está en contacto con Matrigel® y el medio circundante ²³.

Aun así, se sabe que los organoides provenientes de las células madre intestinales adultas tienen la ventaja de la estabilidad genética y epigenética en relación con el sitio de origen, mientras que la diferenciación de las iPSCs está vinculada a la variación genética y epigenética ³¹. Además, los organoides derivados de células madre adultas LGR5+ dan lugar a cultivos que consisten exclusivamente en células epiteliales intestinales, mientras que los organoides derivados de células madre pluripotentes también pueden contener células mesenquimales ³², es decir, tipos de células distintas al linaje deseado. Estos últimos, son denominados organoides intestinales humanos (HIO) y se ha demostrado que estos organoides que consisten en células derivadas de diferentes capas germinales, recapitulan la diversidad celular compleja en los tejidos originales ³³.

4.2 USO DE ORGANOIDES EN MEDICINA REGENERATIVA

Con la aparición de nuevas tecnologías para cultivar células epiteliales intestinales *in vitro*, así como varias formas de organoides intestinales, existe un creciente interés por parte de los investigadores en el uso de estas células intestinales cultivadas como fuente para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa ³³.

El uso de los organoides en medicina regenerativa puede adoptar diferentes enfoques. Uno de estos enfoques sería el de la **biofabricación** para generar intestinos maduros y trasplantables, que imitan las estructuras y funciones originales. Esto se consigue mediante la combinación de la tecnología de los organoides con métodos para diseñar un entorno de cultivo apropiado, concretamente los materiales de los andamios tridimensionales. Otro método en el que se usan los organoides en la medicina regenerativa consiste en instarlos a madurar y convertirse en intestinos funcionales implantándolos en los huéspedes. Este proceso incluye el **trasplante directo de los organoides** en el huésped, que aprovechan los tejidos submucosos de los intestinos nativos como un andamio y, también incluye el uso de **andamios sintéticos para la regeneración de los tejidos (TESI)** ³³.

4.2.1 Biofabricación de intestinos in vitro

Hoy en día, sigue siendo un desafío hacer que el patrón geométrico del revestimiento epitelial de los organoides sea igual al de los intestinos, ya que el organoide no es una copia exacta del intestino *in vivo* en cuanto al tamaño, la estructura y la función. Las células epiteliales diferenciadas del intestino delgado constituyen la esfera central de los organoides epiteliales, pero no forman estructuras que imitan a las vellosidades ³⁴. Las células epiteliales en los HIO forman unidades de cripta-vellosidades pero tienen una función y arquitectura similar a los epitelios inmaduros durante la etapa fetal ²⁹. Debido a esto se ha adoptado un enfoque denominado biofabricación para producir intestinos funcionales que recapitulen las estructuras originales usando materiales biológicos y no biológicos. Se ha demostrado que las células epiteliales se

pueden ensamblar en las estructuras que imitan las vellosidades y las criptas intestinales cuando se siembran en un andamio sintético fabricado en 3D 35. Este proceso de biofabricación también puede incluir la descelularización de los tejidos intestinales mediante digestión química y enzimática y la recelularización de los andamios resultantes con células organoides ³⁶. Además, la composición del andamio de matriz extracelular 3D también es un factor importante en la tecnología de los organoides (Figura 3). Originalmente, se utilizaba Matrigel® como el andamio 3D 34, pero ahora se sabe que el colágeno tipo 1 también sirve como un andamio alternativo 37. Usando este tipo de andamio, se demostró que los organoides epiteliales del intestino delgado pueden alinearse y fusionarse, cambiando su estructura de una forma cerrada, a una hueca y con forma de tubo ³⁸. Estos avances en la biofabricación son muy importantes para generar tejidos intestinales más complejos, maduros y funcionales in vitro, para posteriormente poder usar estos organoides en medicina regenerativa para diferentes enfermedades intestinales, trasplantándolos en humanos mediante anastomosis 33

4.2.2 Ingeniería de tejidos del intestino delgado (TESI)

La construcción de intestino funcional *in vitro* es un paso importante de la ingeniería de tejidos en medicina regenerativa para enfermedades intestinales. Sin embargo, también puede ser útil para implantar células intestinales, aunque aún se encuentren en un estado inmaduro, e instarlas a generar tejidos maduros y complejos en los animales huéspedes ³³. El TESI se construye cortando segmentos del intestino denominados unidades organoides, que se siembran en un andamio tubular sintético y luego se implantan en el omento de ratas adultas ³⁹. Estas unidades organoides, dispuestas en el andamio, se vuelven vascularizadas por el omento para formar un quiste, que histológicamente se asemeja al intestino delgado ⁴⁰. Además, se observó que a diferencia de en el omento, durante el cultivo las células no se expandían mucho ⁴¹, lo que sugiere la presencia de algunos factores desconocidos *in vivo* que promueven la maduración de los tejidos implantados. También se demostró que el TESI se puede anastomosar al intestino delgado nativo después de la implantación, lo

que permite su maduración adicional ⁴². Además, encontraron que la versión humana de TESI, desarrolla un tejido que contiene los 4 tipos de células diferenciadas del epitelio del intestino delgado humano y los tipos de células mesenquimales ⁴³. En otro estudio se demostró que los HIO también se convierten en tejidos similares a los del intestino humano adulto cuando se utilizan como fuente de TESI y se implantan en el abdomen de ratón ⁴⁴, lo que sugiere que la tecnología organoide que permite la expansión del acervo de células madre en el cultivo, podría combinarse con TESI que permite la unión quirúrgica a los intestinos nativos.

El síndrome del intestino corto (SBS) es una condición en la cual la superficie insuficiente del intestino delgado produce malnutrición y dependencia de la nutrición parenteral intravenosa. El TESI ofrece una alternativa terapéutica al tratamiento estándar actual, el trasplante intestinal, y tiene el potencial de resolver sus mayores desafíos, la escasez de donantes y la inmunosupresión de por vida ⁴⁵. El uso de TESI en pacientes con este síndrome mejoraría enormemente el desarrollo del tratamiento, ya que permite la conexión en continuidad en los intestinos nativos (Figura 3).

4.2.3 Trasplante directo de organoides

El uso de organoides como método de trasplante directo podría constituir un nuevo enfoque terapéutico para pacientes con diversas enfermedades. Un claro ejemplo serían los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), donde la disfunción prolongada de la barrera intestinal se asocia con la pérdida continua de líquidos o la desnutrición y con la exposición a antígenos nocivos que favorecen aún más la inflamación ⁴⁶. Para ellos, la restauración de la barrera epitelial en los intestinos dañados mediante trasplante de órgano epitelial podría constituir una nueva perspectiva de tratamiento. Incluso, la sustitución de solamente un área pequeña del epitelio intestinal afectado podría mejorar el curso de la enfermedad ³³.

El resultado de un trasplante ortotópico exitoso de organoides epiteliales, fue descrito por primera vez con organoides epiteliales de colon ⁴⁷. Los organoides cultivados se trasplantaron en ratones receptores a los que se le indujo colitis aguda para generar regiones denudadas en el colon. Se vio que poco después del trasplante, las células trasplantadas cubrían la submucosa de los tejidos receptores lesionados. Además, los ratones con un injerto exitoso recuperaron su peso corporal más rápido que los ratones a los que se les simuló un trasplante. Esto fue una prueba de que el trasplante de organoides epiteliales que contienen células madre se convierten en una terapia para reparar epitelios dañados en varios tipos de enfermedades ⁴⁷. Además, se demostró que los organoides epiteliales intestinales compuestos de células inmaduras que conservan la plasticidad con respecto a la diferenciación pueden adaptarse al entorno a través de cambios fenotípicos. Esto se concluyó debido a que los organoides epiteliales del intestino delgado de ratón y las células endodérmicas diseñadas in vitro se incorporaron al colón y los tejidos del injerto mostraron fenotipos epiteliales colónicos ⁴⁸. En otro estudio se demostró que, al contrario, los organoides epiteliales del intestino delgado de origen adulto de ratón se comportan de diferente manera cuando se trasplantan en el colon, ya que estos regeneran nuevos epitelios que mantienen la morfología y la función del intestino delgado incluso en un entorno colónico 49. Estos hechos sugieren que el componente mesenquimal del colon adulto puede proporcionar señales para dirigir el destino de las células inmaduras hacia el fenotipo colónico, pero no es suficiente como para impulsar el estado de diferenciación de las células adultas del intestino delgado hacia las células colónicas. Todo indica que existen diferentes tipos de organoides epiteliales para usar como fuente de trasplante, según la disponibilidad de la fuente de la célula donante o el sitio de la región enferma en los pacientes afectados 33. Por lo tanto, tanto la reparación directa de los epitelios lesionados como el reemplazo parcial de los epitelios intestinales afectados con epitelios normales constituyen un nuevo enfoque terapéutico muy prometedor para varios tipos de enfermedades humanas (Figura 3).

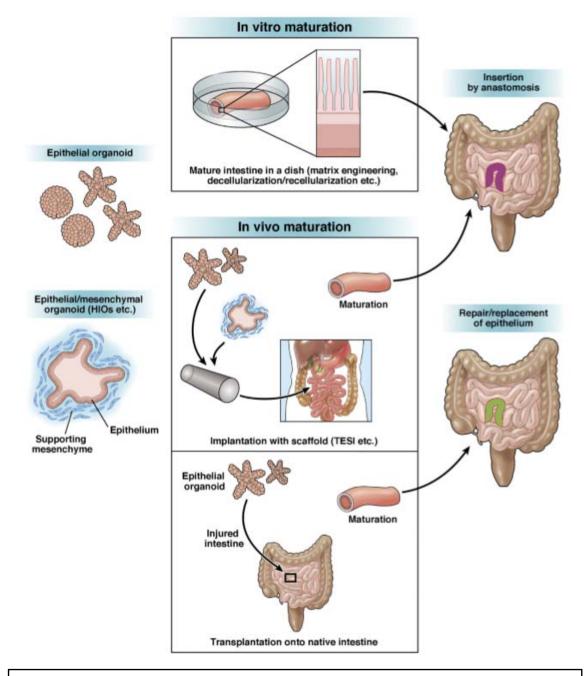


Figura 3. Combinación de la tecnología organoide con la medicina regenerativa. Diferentes formas de maduración del organoide para su posterior trasplante. "Nakamura T., Sato T. (2017). *Advancing intestinal organoid technology toward regenerative medicine*. Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29204508".

5 CONCLUSIONES

El área de investigación del cultivo de organoides está creciendo muy rápidamente debido al gran número de aplicaciones que presentan y al prometedor futuro que tienen en el ámbito de la medicina regenerativa. Se investigan nuevas técnicas de desarrollo de organoides para conseguir que se parezcan a los órganos nativos in vivo lo máximo posible. También se estudian diferentes métodos de trasplante que son muy útiles en la terapia de reemplazo mediante organoides saludables. Todos estos avances que van surgiendo dan la posibilidad de utilizar diferentes opciones de tratamiento según el tipo de enfermedad intestinal que se presente y también permite el uso de estos organoides en la medicina personalizada. Además, los organoides proporcionan una herramienta in vitro muy avanzada que permite realizar experimentos relevantes desde el punto de vista fisiológico que no se pueden realizar en animales o personas. Para un futuro, también se estudia poder combinar la tecnología organoide con la terapia génica ya que junto con la técnica CRISPR/Cas9 se podrían corregir mutaciones en organoides intestinales con el fin de generar tejidos sanos y trasplantarlos ²¹.

6 BIBLIOGRAFÍA

- 1. Simian, M. & Bissell, M. J. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J. Cell Biol.* **216**, 31–40 (2017).
- Fatehullah, A., Tan, S. H. & Barker, N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature Cell Biology* (2016). doi:10.1038/ncb3312
- Lancaster, M. A. & Knoblich, J. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* (80-.).
 345, 1247125–1247125 (2014).
- 4. Muthuswamy, S. K. Bringing together the organoid field: from early beginnings to the road ahead. *Development* **144**, 963–967 (2017).
- 5. Harrison, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. *Exp. Biol. Med.* **4**, 140–143 (1906).

- Strangeways, T. S. P. & Fell, H. B. Experimental Studies on the Differentiation of Embryonic Tissues Growing in vivo and in vitro.--II. The Development of the Isolated Early Embryonic Eye of the Fowl when Cultivated in vitro. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 100, 273–283 (1926).
- 7. Trowell, O. A. EXPERIMENTS ON LYMPH NODES COLTURED IN VITRO. Ann. N. Y. Acad. Sci. **59**, 1066–1069 (1955).
- Trowell, O. A. A modified technique for organ culture in vitro. *Exp. Cell Res.* 246–248 (1954).
- MOSCONA, A. & MOSCONA, H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J. Anat.* 86, 287–301 (1952).
- Bissell, D. M. & Tilles, J. G. MORPHOLOGY AND FUNCTION OF CELLS OF HUMAN EMBRYONIC LIVER IN MONOLAYER CULTURE. *J. Cell Biol.* 50, 222–231 (1971).
- Michalopoulos, G. & Pitot, H. C. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes: Morphological and biochemical observations. *Exp. Cell Res.* 94, 70–78 (1975).
- 12. Kleinman, H. K. & Martin, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 378–386 (2005).
- Streuli, C. H., Bailey, N. & Bissell, M. J. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J. Cell Biol.* 115, 1383–95 (1991).
- Instituto Nacional del Cáncer. Definición de teratoma Diccionario de cáncer - National Cancer Institute. (2019). Available at: https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/teratoma. (Accessed: 4th April 2019)
- 15. Yin, X. *et al.* Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell* **18**, 25–38 (2016).
- 16. VWR. Matriz de membrana basal Corning® Matrigel® | VWR. (2019).
 Available at: https://es.vwr.com/store/product/826102/matriz-de-membrana-basal-corning-matrigel. (Accessed: 4th April 2019)

- 17. Lancaster, M. A. *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**, 373–379 (2013).
- Danjo, T. *et al.* Subregional Specification of Embryonic Stem Cell-Derived Ventral Telencephalic Tissues by Timed and Combinatory Treatment with Extrinsic Signals. *J. Neurosci.* 31, 1919–1933 (2011).
- 19. Xinaris, C., Brizi, V. & Remuzzi, G. Organoid Models and Applications in Biomedical Research. *Nephron* **130**, 191–199 (2015).
- 20. Fatehullah, A., Tan, S. H. & Barker, N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat. Cell Biol.* **18**, 246–254 (2016).
- 21. Drost, J. & Clevers, H. Translational applications of adult stem cell-derived organoids. *Development* **144**, 968–975 (2017).
- 22. Lewis, S. L. & Tam, P. P. L. Definitive endoderm of the mouse embryo: Formation, cell fates, and morphogenetic function. *Dev. Dyn.* **235**, 2315–2329 (2006).
- 23. Fair, K. L., Colquhoun, J. & Hannan, N. R. F. Intestinal organoids for modelling intestinal development and disease. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **373**, 20170217 (2018).
- Gjorevski, N. & Ordóñez-Morán, P. Intestinal Stem Cell Niche Insights Gathered from Both *In Vivo* and Novel *In Vitro* Models. *Stem Cells Int.* 2017, 1–10 (2017).
- 25. Barker, N. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**, 1003–1007 (2007).
- 26. van Es, J. H. *et al.* Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat. Cell Biol.* **7**, 381–386 (2005).
- 27. Chia, L. A. & Kuo, C. J. The Intestinal Stem Cell. in *Progress in molecular biology and translational science* **96**, 157–173 (2010).
- Zachos, N. C. et al. Human Enteroids/Colonoids and Intestinal Organoids
 Functionally Recapitulate Normal Intestinal Physiology and Pathophysiology. J. Biol. Chem. 291, 3759–66 (2016).
- 29. Spence, J. R. *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**, 105–109 (2011).
- 30. Schneeberger, K. et al. Converging biofabrication and organoid

- technologies: the next frontier in hepatic and intestinal tissue engineering? *Biofabrication* **9**, 013001 (2017).
- 31. Schulte, L., Hohwieler, M., Müller, M. & Klaus, J. Intestinal Organoids as a Novel Complementary Model to Dissect Inflammatory Bowel Disease. *Stem Cells Int.* **2019**, 1–15 (2019).
- 32. Kraiczy, J. & Zilbauer, M. Intestinal Epithelial Organoids as Tools to Study Epigenetics in Gut Health and Disease. *Stem Cells Int.* **2019**, 7242415 (2019).
- Nakamura, T. & Sato, T. Advancing Intestinal Organoid Technology Toward Regenerative Medicine. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 51–60 (2018).
- 34. Sato, T. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* **459**, 262–265 (2009).
- 35. Wang, Y. et al. A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium. Biomaterials 128, 44–55 (2017).
- 36. Maghsoudlou, P., Totonelli, G., Loukogeorgakis, S. P., Eaton, S. & De Coppi, P. A Decellularization Methodology for the Production of a Natural Acellular Intestinal Matrix. *J. Vis. Exp.* e50658 (2013). doi:10.3791/50658
- 37. Jabaji, Z. *et al.* Type I Collagen as an Extracellular Matrix for the In Vitro Growth of Human Small Intestinal Epithelium. *PLoS One* **9**, e107814 (2014).
- 38. Sachs, N., Tsukamoto, Y., Kujala, P., Peters, P. J. & Clevers, H. Intestinal epithelial organoids fuse to form self-organizing tubes in floating collagen gels. *Development* **144**, 1107–1112 (2017).
- 39. Warner, B. W. Tissue engineered small intestine: a viable clinical option? *Ann. Surg.* **240**, 755–6 (2004).
- 40. Choi, R. S. & Vacanti, J. P. Preliminary studies of tissue-engineered intestine using isolated epithelial organoid units on tubular synthetic biodegradable scaffolds. *Transplant. Proc.* **29**, 848–51
- 41. Evans, G. S., Flint, N., Somers, A. S., Eyden, B. & Potten, C. S. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell

- primary cultures. J. Cell Sci. 101 (Pt 1), 219-31 (1992).
- 42. Kaihara, S. *et al.* Long-term follow-up of tissue-engineered intestine after anastomosis to native small bowel. *Transplantation* **69**, 1927–32 (2000).
- 43. Levin, D. E. *et al.* Human tissue-engineered small intestine forms from postnatal progenitor cells. *J. Pediatr. Surg.* **48**, 129–137 (2013).
- 44. Finkbeiner, S. R. *et al.* Generation of tissue-engineered small intestine using embryonic stem cell-derived human intestinal organoids. *Biol. Open* **4**, 1462–72 (2015).
- 45. Grant, C. N. *et al.* Intestinal Stem Cells in GI Physiology and Disease: Human and mouse tissue-engineered small intestine both demonstrate digestive and absorptive function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **308**, G664 (2015).
- 46. Salim, S. Y. & Söderholm, J. D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 362–381 (2011).
- 47. Yui, S. *et al.* Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat. Med.* **18**, 618–623 (2012).
- 48. Fordham, R. P. *et al.* Transplantation of Expanded Fetal Intestinal Progenitors Contributes to Colon Regeneration after Injury. *Cell Stem Cell* **13**, 734–744 (2013).
- 49. Fukuda, M. *et al.* Small intestinal stem cell identity is maintained with functional Paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto the colon. *Genes Dev.* **28**, 1752–7 (2014).