Edusfarm 14 *(2022), 27-46*
ISSN: 1886-6271
DOI: 10.1344/EDUSFARM2022.14.02

Rebut: 22 de setembre de 2021
Acceptat: 4 d'octubre de 2021

INTRODUCCIÓ ALS ORGANOIDES I EL SEU ÚS EN TOXICOLOGIA D'INVESTIGACIÓ

Boneta Ritz, Natàlia[1]

Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica
Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Universitat de Barcelona

Resum

Els organoides són cultius cel·lulars tridimensionals generats a partir de diferents tipus de cèl·lules mare que imiten l'estructura i el funcionament dels teixits, i confereixen la possibilitat de reproduir en medis de cultiu els seus equivalents *in vivo*. Aquesta tecnologia ha evolucionat ràpidament en els últims anys oferint models cada vegada més complexos per a l'estudi de l'organogènesi i totes les ciències que en deriven, i s'ha convertit en una de les principals i més prometedores eines de cultiu cel·lular. Aquest treball és una revisió bibliogràfica d'articles i documents científics en què s'han introduït els antecedents biomoleculars i històrics dels organoides i s'han desenvolupat algunes de les seves àmplies aplicacions com a eina d'investigació. S'ha aprofundit en l'aplicació d'aquesta tecnologia per a la comprensió de les relacions mecanístiques de la toxicocinètica, la toxicodinàmica i la seva implementació en la toxicologia d'investigació. Per acabar aquesta revisió, es plantejaran reptes per superar a fi d'assolir tot l'espectre fisiològic de teixits a través de la bioimpressió tridimensional automatitzada d'organoides i la tecnologia d'òrgan en xip.

Paraules clau: organoides, bioimpressió tridimensional.

Abstract

Organoids are three-dimensional cell cultures generated from different types of stem cells that mimic the structure and function of tissues, providing the ability to reproduce their organ equivalents. This technology has evolved rapidly over a brief period, offering increasingly complex models for the study of organogenesis and all the sciences that derive from it. It has become one of the leading and most promising cell culture tools in biomedical research. This paper is a bibliographic review of scientific articles and documents referencing the biomolecular and historical background of organoids and some of their wide applications in research. It also describes the useful application of this technology for understanding the mechanistic relations of the toxicokinetic and toxicodynamic, and its implementation in research toxicology. To conclude, we discuss the challenges that remain to achieve the complete physiological spectrum of tissues through automated three-dimensional bio-printing of organoids and organ-on-chip technology.

Keywords: organoids, 3D bioprinting.

[1] Graduada en Farmàcia (nbonetaritz@gmail.com).

©Universitat de Barcelona

Resumen

Los organoides son cultivos celulares tridimensionales generados a partir de diferentes tipos de células madre que imitan la estructura y el funcionamiento de los tejidos, lo que confiere la posibilidad de reproducir en medios de cultivo sus equivalentes *in vivo*. Esta tecnología ha evolucionado rápidamente en los últimos años, ofreciendo modelos cada vez más complejos para el estudio de la organogénesis y todas las ciencias que derivan de ella, y se ha convertido en una de las herramientas principales y más prometedoras de cultivo celular. Este trabajo es una revisión bibliográfica de artículos y documentos científicos, donde se han introducido los antecedentes biomoleculares e históricos de los organoides y se han desarrollado algunas de sus amplias aplicaciones como herramienta de investigación. Se ha profundizado en la aplicación de esta tecnología para la comprensión de las relaciones mecanísticas de la toxicocinética, la toxicodinámica y su implementación en la toxicología de investigación. Para terminar esta revisión, se plantearán retos que habrá que superar para conseguir todo el espectro fisiológico de tejidos a través de la bioimpresión tridimensional automatizada de organoides y la tecnología de órgano en chip.

Palabras clave: organoides, bioimpresión tridimensional.

1. Introducció

El terme «organoide», en què *-oide* prové del mot grec εἶδος i significa 'semblança', s'empra per definir un cultiu tridimensional de cèl·lules que s'autoorganitzen i es diferencien en tipus cel·lulars funcionals, reproduint les característiques i les funcions d'un teixit o òrgan determinat; per aquest motiu, podem veure referències amb el terme «mini-òrgans» (Eisenstein, 2018). És important diferenciar els cultius d'organoides dels cultius en suspensió —esferoides—, els quals no presenten unió a la matriu extracel·lular i suren en la matriu (Fennema *et al.*, 2013). Per definir un sistema amb el terme «organoide» ha de seguir tres criteris específics: que presenti més d'un tipus cel·lular de l'òrgan que reprodueix; que tingui almenys una funció específica d'aquest, i que l'organització cel·lular de l'estructura tridimensional imiti la del teixit d'origen (Calvache Aguilar, 2019).

Els organoides confereixen la possibilitat de reproduir en medis de cultiu els seus equivalents *in vivo*. Aquestes estructures poden obtenir-se a partir de cèl·lules mare embrionàries (CME), cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPCM) o bé cèl·lules mare adultes (CMA), i requereixen l'activació de vies de senyalització mitjançades per components intrínsecs, així com entorns extrínsecs específics (Corrò, Novellasdemunt i Li, 2020). Els estudis sobre la generació d'organoides han evolucionat tan ràpidament en els últims anys que això ha permès que es ramifiquin en múltiples direccions: des de l'estudi del modelatge de les malalties a la medicina personalitzada, l'estudi de les malalties infeccioses per patògens, la creació de biobancs i la medicina regenerativa (Lou i Leung, 2018). També s'ha introduït en la toxicologia d'investigació: els estudis toxicològics proporcionen informació sobre els efectes d'una sèrie de fàrmacs, toxines i contaminants. La comprensió de les vies de toxicitat, juntament amb els mecanismes d'acció, poden ajudar a adoptar nous marcadors biològics per al seu ús en la identificació i els senyals de seguretat; a més, podrien conduir a sistemes d'assaig *in vitro* humanitzats i al desenvolupament de medicaments menys dependents d'assajos amb animals (Beilmann *et al.*, 2019). Les tècniques de generació d'organoides es perfeccionen quasi diàriament, i es fan progressos importants per aconseguir que els models tridimensionals siguin cada vegada més fiables, reproduïbles i econòmics.

©Universitat de Barcelona

Edusfarm 14 *(2022), 27-46*
ISSN: 1886-6271

2. Metodologia i material

S'ha realitzat una revisió bibliogràfica de documents científics sobre la generació d'organoides, seleccionant informació sobre els seus antecedents, tant històrics com biotecnològics. També s'han consultat estudis científics en què s'empri aquesta tecnologia —cultiu 3D d'organoides— com a eina d'investigació i, concretament, en el camp de la toxicologia experimental. La major part d'aquesta cerca s'ha realitzat en format digital i s'han emprat dues bases de dades: PubMed i Google Scholar. L'accés als articles ha estat possible gràcies als recursos del CRAI de la Universitat de Barcelona.

Per començar, cal destacar que a la base de dades PubMed la recerca del terme *organoids* aplicant el filtre *systematic review* només inclou nou resultats, tots publicats entre l'any 2019 i el 2021. Són dades rellevant perquè mostren que és un camp molt recent que ha guanyat molta força en els últims anys.

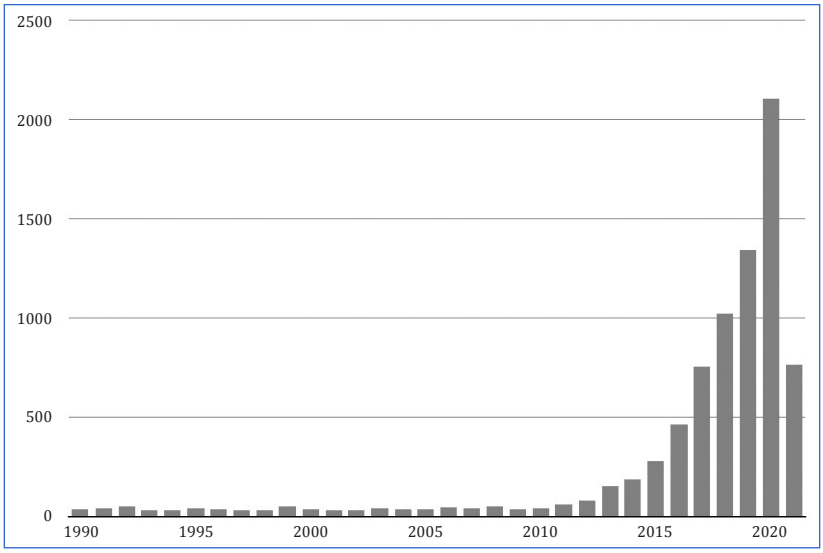

Figura 1. Resultats de la cerca del terme *organoids* a la base de dades PubMed entre els anys 1990 i 2020.

Els criteris d'inclusió i exclusió en la cerca bibliogràfica han estat diferents per a les diferents parts del treball. Per als primers quatre subapartats inclosos a l'apartat 3 («Resultats»), la finalitat ha estat estudiar el context històric, les bases de la tecnologia de cultiu cel·lular tridimensional i la seva formació. S'ha emprat la base de dades PubMed, el cercador web de Google i el llibre en format digital *Organoids and mini-organs: Introduction, history, and potential* (Davies, 2018). Pel que fa a les pàgines consultades a través del cercador, se n'ha avaluat la qualitat emprant els criteris següents:

- L'autoria de la persona, l'editorial o l'organització: atès que són uns dels principals indicadors de qualitat en un treball científic, s'han valorat el prestigi, el grau d'especialització i l'experiència en els temes consultats. En obres col·lectives s'ha considerat la funció que hi ha desenvolupat, establint com a criteri d'exclusió tota la informació d'autoria desconeguda.
- L'actualitat de la informació: s'ha considerat que la novetat és un factor rellevant per a l'àmbit estudiat en aquest treball, ja que molta informació pot quedar obsoleta en qüestió de pocs anys. S'han establert com a criteri d'exclusió les fonts anteriors a l'any 2000.

©Universitat de Barcelona

- L'objectiu de la publicació i l'audiència a qui va dirigida: s'han establert com a criteri d'inclusió tots aquells documents de caràcter científic i professional.
- La precisió, l'exactitud i l'objectivitat, com a determinants de la validesa i el grau de confiança: s'ha contrastat tota la informació amb una o més fonts, ometent les opinions personals i revisant la bibliografia dels documents.

Respecte a la base de dades PubMed, s'ha fet la cerca del terme *history organoids* aplicant els filtres *Books and Documents*, *Review*, *Systematic Review*, *from 2000-2021* i s'han obtingut 26 resultats, dels quals se n'han seleccionat tres, perquè contenien informació més concreta dels organoides. S'han exclòs les revisions o els documents que se centraven només en un tipus d'organoide concret o per a l'estudi d'una malaltia determinada. Per al terme *stem cell* i aplicant els filtres *Books and Documents*, *Review*, *Systematic Review*, *from 2000-2021*, s'han obtingut 71.777 resultats, de forma que s'ha acotat la cerca als anys 2013-2020. S'han escollit aquestes dates perquè, com s'explicarà més endavant en aquest treball, l'any 2012 va haver-hi un punt d'inflexió pel que fa a les investigacions en aquest camp, i s'ha assumit que la informació anterior a l'any 2012 pot estar obsoleta. També s'ha canviat el terme anterior per *stem cell differentiation* amb els filtres *Books and Documents*, *from 2013-2021* i s'han obtingut 71 resultats, dels quals s'ha consultat el resum de disset, i finalment se n'han emprat quatre.

Per al subapartat 3.5 («Aplicacions dels organoides en toxicologia d'investigació») s'ha buscat *organoids toxicology* aplicant els filtres *Free full test*, *Books and Documents*, *Clinical Trial*, *Meta-Analysis*, *Randomized Controlled Trial*, *Systematic Review* a la base de PubMed i s'han obtingut trenta resultats. S'ha revisat el resum tots, però finalment, per a la revisió, se n'han emprat sis, a causa de la poca especificitat del contingut de la resta. D'altra banda, s'ha emprat l'article *3Rs toxicity testing and disease modeling projects in the European Horizon 2020 research and innovation program* (Vinken, 2020) per seleccionar projectes d'investigació en què s'hagi emprat la tecnologia organoide per als assajos de toxicitat i avaluació de risc químic.

En la discussió, s'ha fet una cerca d'informació emprant el buscador de Google Scholar i aplicant els criteris d'inclusió i exclusió mencionats anteriorment per a la selecció de la informació.

3. Resultats

3.1. Antecedents biomoleculars per al cultiu d'organoides

Els organoides s'originen a partir de diferents tipus de cèl·lules mare (CM). És important conèixer les característiques d'aquest tipus cel·lular per comprendre l'estructura i formació dels organoides. Les cèl·lules mare són cèl·lules indiferenciades i immadures, amb capacitat de generar totes les altres cèl·lules especialitzades de l'organisme (U.S. National Library of Medicine, 2021). Es caracteritzen per dues propietats essencials: sota condicions adequades en l'organisme o al laboratori tenen la capacitat d'autorenovar-se, fet imprescindible per a la proliferació il·limitada, i de generar cèl·lules filles amb potencial d'especialitzar-se en diferents llinatges cel·lulars (Pimentel-Parra i Murcia-Ordoñez, 2017).

Les cèl·lules mare es poden classificar segons el seu potencial o capacitat de diferenciació (figura 2) i, d'altra banda, també poden classificar-se en funció del seu lloc d'origen. Avui dia no hi ha un consens científic respecte a aquesta classificació, però per a la major

©Universitat de Barcelona

part de la comunitat científica les cèl·lules mare es divideixen en dues: cèl·lules mare embrionàries (CME) i cèl·lules mare adultes (CMA). Tanmateix, investigadors de la Universitat de Wake Forest, al gener de 2007, van descobrir un tipus de cèl·lules mare que podrien estar a mig camí de les CME i les CMA (De Coppi *et al.*, 2007). Anys més tard, el 2012, es van identificar com a cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPCM) —descobertes per John B. Gurdon i Shinya Yamanaka, guanyadors del Premi Nobel de Fisiologia i Medicina de l'any 2012.

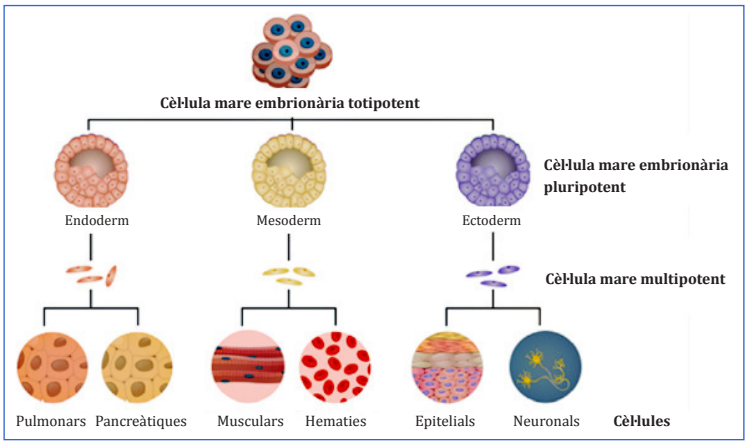

Figura 2. Classificació de les cèl·lules mare (CM). La CM totipotent, que és la cèl·lula mare embrionària primerenca, dona lloc a les CM pluripotents, que es diferencien en els diferents tipus cel·lulars de l'organisme i es mantenen en un organisme tota la vida, renovant les cèl·lules diferenciades (CH, 2021).

Les CME s'identifiquen en les primeres fases del desenvolupament embrionari i són cèl·lules pluripotents (Mata-Miranda, Vázquez-Zapién i Sánchez-Monroy, 2013). Poden ser aïllades de l'embrió en fase de blastocist i també poden extreure's de les gònades fetals (Pimentel-Parra i Murcia-Ordoñez, 2017). La generació de línies hCME (CME humanes) a partir de la massa cel·lular interna del blastocist, fins ara, havia obligat la posterior destrucció de l'embrió, cosa que havia suscitat debats ètics i polítics des dels inicis del seu ús en investigació (Vazin i Freed, 2010). Les CMA són cèl·lules mare multipotencials i unipotencials, i el procés cel·lular de diferenciació es creia irreversible un cop assolit aquest nivell (Dulak *et al.*, 2015). També s'anomenen cèl·lules somàtiques, es troben localitzades en òrgans específics, poden diferenciar-se en un tipus limitat de cèl·lules madures i tenen la funció de mantenir l'homeòstasi dels teixits conservant-los i restaurant-los (De Miguel-Gómez *et al.*, 2021).

L'any 2006, el grup d'investigació del doctor Shinya Yamanaka va implementar una tècnica per al desenvolupament de cèl·lules mare similars a les CME a partir de la introducció de quatre gens —Oct4, Sox2, Klf4 i c-Myc— a cèl·lules somàtiques de ratolí diferenciades (Cortés i García-Pérez, 2011). Aquestes cèl·lules es podien reprogramar a un estadi embrionari revertint tot el programa de diferenciació (Pimentel-Parra i Murcia-Ordoñez, 2017) i són les anomenades iPCM. Actualment, la comunitat científica és capaç de fer-ho amb cèl·lules humanes (hiPCM), afegint inclús menys de quatre gens (EuroStemCell, 2018). Les hiPCM s'han convertit en l'opció preferent, per la seva disponibilitat i l'absència de possibles problemes ètics associats a les hCME (De Miguel-Gómez *et al.*, 2021), ja que són molt similars: ambdós tipus expressen factors pluripotents humans i marcadors de superfície de les CME, i mostren la capacitat de diferenciar-se en les tres capes germinals (Cortés i García-Pérez, 2011).

©Universitat de Barcelona

3.2. Origen dels sistemes tridimensionals i organoides

Per començar, cal aclarir que l'any 2016 l'EMBO[2] va celebrar un simposi en què va reunir la comunitat científica amb un interès compartit en l'ús de mètodes de cultiu tridimensionals. De forma general, es va definir que l'ús dels termes «esferoides» i «cultiu 3D» de forma intercanviable amb «cultiu d'organoides» no era adequat. Es va determinar en consens que el cultiu d'organoides es refereix exclusivament al creixement de cèl·lules 3D per generar unitats cel·lulars que s'assimilin a un òrgan, tant en estructura com en funció (Muthuswamy, 2017).

El camp d'investigació dels organoides s'inicia a principis del segle passat, quan es comencen a publicar assajos sobre el procés d'organogènesi i, a conseqüència d'aquestes investigacions, s'inicien estudis de recerca sobre la naturalesa de l'organització biològica. A la dècada del 1950, diversos laboratoris van emprar la tècnica de dissociació seguida d'agregació, per determinar si les cèl·lules d'organismes complexes presentaven capacitat d'autoorganitzar-se. L'estudi de Moscona i Moscona (1952), va demostrar que algunes de les cèl·lules embrionàries dels polls, com les dels porífers, portaven suficient informació per reorganitzar-se en les estructures patró del teixit d'origen. La disposició que van adoptar les cèl·lules epitelials tubulars i les cèl·lules mesenquimàtiques, durant els processos d'agrupació i incubació, era una reminiscència de l'anatomia, a petita escala, dels teixits d'on s'havien extret —mesonefroides— (Feldman, 1955). Dues dècades després, Michalopoulos i Pitot van desencadenar la diferenciació de cèl·lules epitelials emprant gels flotants de col·lagen, fent créixer hepatòcits morfològicament correctes i amb capacitat d'expressió del citocrom P450, funció característica de les cèl·lules *in vivo* (Michalopoulos i Pitot, 1975). Posteriorment a aquestes investigacions, Emerman i Pitelka van emprar condicions de cultiu similars on es van generar cèl·lules epitelials mamàries amb capacitat secretora de proteïnes de la llet (Emerman *et al.*, 1977). Conjuntament, aquests estudis van demostrar que el cultiu a partir de cèl·lules mare és un camp que ofereix una vista detallada per a la comprensió de l'organogènesi, així com nous coneixements sobre el desenvolupament humà i les malalties. Des d'aquestes primeres investigacions s'han desenvolupat organoides a partir de diferents tipus de teixit: intestí prim, colon i fetge (Bautista, 2020). Els avenços han estat ràpids, l'any 2019 ja es va presentar un sistema complex format per tres organoides: fetge, pàncrees i tracte biliar (Koike *et al.*, [s. d.]). Fins i tot s'han desenvolupat organoides bronquials i pulmonars humans, entre altres, per a l'estudi de la fisiopatologia de la infecció per SARS-CoV-2 (Han *et al.*, 2020).

3.3. Com es formen els organoides?

El procés de formació d'un organoide presenta més o menys complexitat segons l'estructura o el teixit que es vulgui desenvolupar. De forma general, un organoide es pot iniciar a partir d'una sola cèl·lula mare o d'unes poques cèl·lules mare dissociades extretes d'un teixit (Davies, 2018). Els tipus d'organoides més senzills, d'acord amb el material de partida, són els que es fabriquen a partir de cèl·lules individuals. Independentment del punt de partida, les cèl·lules es col·loquen en un medi de cultiu —cada tipus d'organoide requereix un medi de cultiu específic— que, a més de tenir nutrients, és suplementat amb aquells factors de creixement identificats com a importants per al desenvolupament de l'òrgan específic (Yin, X. *et al.*, 2016). Seguidament, s'agrega una matriu amb substàncies similars a les de la matriu

[2] Organització Europea de Biologia Molecular, integrada per més de 1.800 científics, la qual promou l'excel·lència en les recerques i les investigacions de l'àmbit de les ciències de la salut.

©Universitat de Barcelona

extracel·lular, la qual permet la formació d'una estructura porosa que serveix com a suport perquè creixin les cèl·lules a diferents nivells (Bautista, 2020). Les cèl·lules formaran estructures esfèriques que suraran en el medi, i es poden diferenciar espontàniament o ser induïdes agregant o retirant els factors de diferenciació corresponents (Davies, 2018).

El mètode presentat per Sato *et al.* (2009) és un dels primers exemples de generació d'organoides a partir d'una sola cèl·lula mare, concretament per a la formació d'un «mini intestí». En l'assaig, es va emprar una cèl·lula mare individual aïllada de les criptes[3] intestinals suspesa en Matrigel[4], complementada amb molècules de senyalització determinades, cosa que en permetia la proliferació i la diferenciació. Les cèl·lules ràpidament polaritzen formant un quist. Algunes de les cèl·lules filles es mantenen com a cèl·lules mare, mentre que les altres es diferencien, trencant amb la simetria del sistema (Davies, 2018). Seguidament, parts de l'epiteli que contenen cèl·lules mare sobresurten en el Matrigel formant estructures semblants a les criptes intestinals, mentre que les zones intermèdies contenen cèl·lules diferenciades similars a les que trobem en les vellositats. Així, s'acaba generant un organoide que presenta tots els tipus cel·lulars diferenciats i amb l'arquitectura de les criptes intestinals que presenten els mamífers adults (Davies, 2018; Sato *et al.*, 2009).

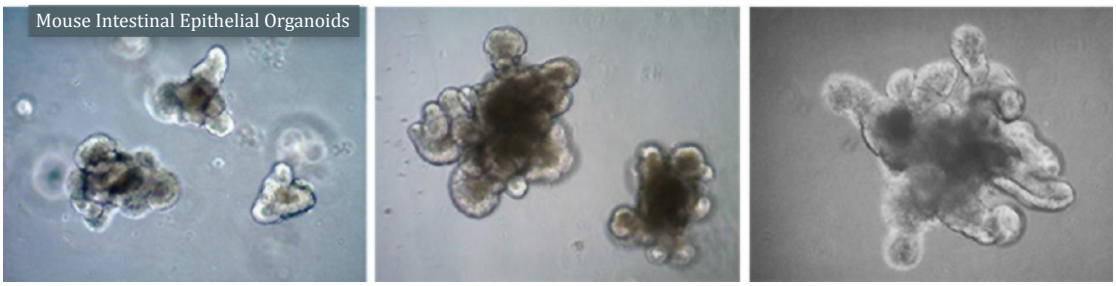

Figura 3. Organoides epitelials de ratolí. Es van generar a partir de teixit intestinal de ratolí adult, seguint el protocol descrit per Sato i Clevers (2013). A l'esquerra —dia 3—, les cèl·lules comencen a formar lúmens. Al centre —dia 5— i a la dreta —dia 7—, es formen estructures complexes similars a les criptes intestinals.

Aquest tipus d'organoides són generats de tal manera que permeten que els sistemes s'autoorganitzin en estructures tridimensionals durant la diferenciació cel·lular. Aquesta formació a l'atzar ha donat lloc a estructures variables en termes de mida i arquitectura interna, i afecta la reproductibilitat dels resultats. L'empresa emergent HoMoLog proposa la producció d'organoides derivats d'iPCM, introduint les cèl·lules reprogramades a una matriu orgànica apta per a la impressió tridimensional. La tecnologia desenvolupada en aquest projecte pretén superar aquest problema imprimint el material biològic —bioimpressió 3D— per produir organoides de forma controlada i reproduïble. En l'estudi de Salaris *et al.* (2019) es descriu un mètode per a l'obtenció de construccions corticals tridimensionals, basat en neurones corticals i cèl·lules glials derivades d'hiCPM que sobreviuen a llarg termini, mitjançant la tècnica de bioimpressió. Els autors han conclòs que les construccions corticals han mantingut les característiques cel·lulars i les propietats funcionals. A més, el constructe cortical desenvolupa propietats moleculars, morfològiques i funcionals de les xarxes neuronals i permet la seva utilització per a futurs estudis de modelatge de malalties o cribratge de

[3] Les criptes de Lieberkühn són invaginacions de forma tubular de l'epiteli intestinal i ocupen des de la llum del tub digestiu fins a la capa muscular de la mucosa (Clínica Universidad de Navarra, [s. d.]).
[4] Mescla gelatinosa de proteïnes derivada de cèl·lules tumorals de ratolí, necessària per al creixement òptim dels cultius cel·lulars (Hughes, Postovit i Lajoie, 2010).

©Universitat de Barcelona

fàrmacs (Salaris *et al.*, 2019). Els avenços en les tècniques de biofabricació obren les portes a l'optimització i l'estandardització dels procediments de formació d'organoides, un dels principals inconvenients d'aquest sistema de cultiu.

3.4. Els organoides com a eina d'investigació

Els estudis sobre la generació d'organoides s'han convertit en una de les principals eines de cultiu cel·lular en molts estudis biomèdics i, actualment, la tecnologia organoide s'aplica en el desenvolupament de fàrmacs, la toxicologia, l'oncologia, la microbiologia i la medicina regenerativa, entre altres (Lou i Leung, 2018).

Els organoides han permès l'estudi de processos biològics amb més precisió i profunditat, especialment del comportament de les cèl·lules mare durant el procés d'organogènesi i les interaccions de les cèl·lules amb l'entorn (Barbuzano, 2017). En els últims anys, diversos investigadors veuen en la tecnologia organoide una oportunitat per estudiar les malalties causades per anomalies en les mateixes cèl·lules mare (Clevers, 2016) i, per tant, per a l'estudi del modelatge de les malalties i la medicina personalitzada. És més, els organoides podrien arribar a combinar-se amb la correcció de gens, com un enfocament alternatiu per al tractament de malalties degeneratives hereditàries. En l'estudi de Dekkers *et al.* (2013) comparen la resposta d'organoides intestinals primaris de persones malaltes de fibrosi quística i d'organoides sans a la forskolina. Els resultats van mostrar una fiabilitat molt elevada per predir la resposta als moduladors de CFTR i s'ha convertit en la primera aplicació de medicina personalitzada per a pacients amb FQ —basada en organoides— als Països Baixos (Berkers *et al.*, 2019).

En el camp de la microbiologia s'ha observat que la tecnologia organoide ofereix models molt precisos per als estudis d'interacció hoste-patogen (Corrò, Novellasdemunt i Li, 2020). Els models d'organoides serveixen per estudiar els mecanismes d'infecció de malalties infeccioses humanes relacionades amb virus, bacteris i paràsits. Zhou *et al.* (2017), mitjançant l'ús d'organoides intestinals primaris humans, van demostrar que el tracte intestinal era altament susceptible al MERS-CoV i que podia ser una ruta alternativa d'infecció del síndrome respiratori d'Orient Mitjà.

D'altra banda, els organoides derivats de diferents tumors humans han obert un nou enfocament per a l'estudi i el modelatge de càncers humans *in vitro*, ja que, a diferència de les línies cel·lulars cancerígens en cultius monocapa, els organoides derivats de les cèl·lules canceroses solen conservar la seva heterogeneïtat tumoral i són ideals per a l'estudi de l'evolució dels tumors (Corrò, Novellasdemunt i Li, 2020). Per exemple, s'han produït organoides de càncer de mama on s'ha reproduït la morfologia, la histopatologia, l'estat dels receptors hormonals i el paisatge mutacional del tumor *in vivo* (Sachs *et al.*, 2018). També s'han produït organoides d'altres tipus de càncer, com el gàstric (Li *et al.*, 2014), d'ovari (Kopper *et al.*, 2019), de pròstata (Gao *et al.*, 2014) i de cervell (Da Silva *et al.*, 2018; Lancaster *et al.*, 2013).

Alguns dels principals reptes per a les teràpies de trasplantament d'òrgans (Kim, Koo i Knoblich, 2020) són l'escassetat de teixits de donants compatibles i les complicacions de les teràpies immunosupressores que, a més, són per a tota la vida. Yokoo *et al.* (2005) van generar un teixit similar al ronyó humà a partir de cèl·lules mare mesenquimàtiques humanes (MCM) trasplantades a embrions de rosegadors; aquest enfocament vindria a ser la generació d'organoides humans en organismes animals. Aquest sistema podria proporcionar els mitjans per generar òrgans propis a partir de MCM autòlogues —del mateix individu—

©Universitat de Barcelona

utilitzant el sistema de desenvolupament inherent d'un hoste xenogènic —procedent de diferent espècie— immunocompromès (Miyoshi *et al.*, 2020). Un altre grup d'investigació va trasplantar a ratolins cèl·lules progenitores de nefrons (CPN) humanes —derivades d'hiPCM— i van proposar un sistema de combinació amb què les cèl·lules progenitores de nefrons (CPN) de l'hoste poden ser eliminades per la toxina de la diftèria de forma específica per al temps i teixit. Aquesta eliminació permetia que les CPN del donant suplantessin les de l'hoste i es convertissin en nefrons connectats als conductes col·lectors de l'hoste (Yamanaka *et al.*, 2017). Es va concloure que la generació de ronyons xenogènics mitjançant tecnologia organoide, així com per a molts altres tipus de teixits, és una eina molt prometedora com a medi per a la producció d'òrgans bioartificials, tot i que encara existeixen reptes importants per superar (Miyoshi *et al.*, 2020).

3.5 Aplicacions dels organoides en toxicologia d'investigació

La toxicologia d'investigació ha contribuït a un canvi important en la toxicologia farmacèutica: el pas d'una disciplina descriptiva a una basada en l'evidència i el mecanicisme. Els estudis toxicològics proporcionen informació sobre els efectes d'una sèrie de fàrmacs, toxines i contaminants. I són especialment imprescindibles per al desenvolupament modern de fàrmacs. La comprensió de les vies de toxicitat juntament amb els mecanismes d'acció poden ajudar a adoptar nous marcadors biològics per al seu ús en la identificació i el seguiment dels senyals. Avui dia el seu valor és limitat, ja que no sempre es poden relacionar els senyals identificats en models *in vitro* i d'animals amb els d'un organisme humà; els sistemes d'organoides generats amb cèl·lules humanes poden facilitar una millor avaluació del risc de toxicitats i d'aquests senyals (Sheet, 2018). La toxicologia d'investigació té la flexibilitat d'adoptar noves tecnologies que proporcionin sistemes vàlids de preselecció de possibles fàrmacs, reduint el nombre de molècules candidates que s'hauran de provar en les fases posteriors. Els resultats preclínics en animals només permeten, en el millor dels casos, realitzar estimacions aproximades dels marges de seguretat, per una absència de biomarcadors de seguretat ben caracteritzats amb una relació mecànica clarament definida amb els éssers humans.

En l'estudi de Hedrich *et al.* (2020), es van aïllar cèl·lules mare intestinals del duodè de rates adultes i es van donar les condicions òptimes al cultiu per promoure el creixement i la diferenciació d'organoides intestinals. Posteriorment, es van incubar amb els fàrmacs naproxèn i celecoxib i es va observar una resposta de citotoxicitat equivalent amb els efectes citotòxics en el duodè de les rates *in vivo*. Aquest assaig ha demostrat la utilitat dels organoides de rata per als estudis de metabolisme de primer pas en fàrmacs d'administració oral. Es tracta d'un dels primers sistemes cel·lulars *in vitro* que empra organoides intestinals de rata específicament per a aquestes aplicacions. En els estudis de Mathur *et al.* (2015) i Huebsch *et al.* (2016) també s'ha observat la resposta a exposicions de diferents fàrmacs que afecten la força i la duració de la contractilitat cardíaca. Van demostrar exercir efectes similars als models *in vivo* en els sistemes microfisiològics cardíacs que havien format amb cardiomiòcits derivats d'iPCM.

D'altra banda, Alves-Lopes, Söder i Stukenborg (2017) van descobrir la generació d'organoides testiculars a partir de cèl·lules testiculars de rata de vint dies d'edat. Les cèl·lules de Sertoli i les cèl·lules germinals d'aquest sistema tridimensional van formar estructures tubulars esfèriques, les quals podien mantenir cèl·lules germinals indiferenciades fins als vint-i-un dies. Els autors també van informar que eren sensibles a les TNFα i IL1α,

©Universitat de Barcelona

cosa que conduïa a un deteriorament de la formació dels organoides, a la reducció del manteniment de les cèl·lules germinals i a la pèrdua de la integritat de la barrera hematotesticular, com s'havia informat en els resultats de testicles *in vivo*. Aquests resultats apunten a la possible utilització del model per assajar els efectes de factors experimentals i fàrmacs sobre la funció testicular (Alves-Lopes, Söder i Stukenborg, 2017; Sakib *et al.*, 2019).

Una via de reacció adversa (RA) descriu una cadena seqüencial d'esdeveniments vinculats causalment en diferents nivells d'organització biològica que condueixen a un efecte advers (EA) en la salut humana. Els organoides generats amb cèl·lules humanes poden facilitar una millor avaluació del risc de toxicitats en òrgans humans. En l'assaig de Wang *et al.* (2018) es va emprar un sistema d'organoides cerebrals derivats d'hiPCM amb els quals es va observar l'aparició de trastorns del neurodesenvolupament sota l'exposició prenatal a la nicotina. L'exposició a la nicotina, a nivells propis de fumadors diaris, va inhibir la diferenciació i l'organització dels organoides. Els autors conclouen que era similar al deteriorament de la neurogènesi observada en el cervell fetal de les mares fumadores. L'equip de Takasato *et al.* (2015) va generar organoides renals que contenien nefrons associats a una xarxa de conductes col·lectors envoltats d'interstici renal i cèl·lules endotelials. Dins d'aquests organoides, cada nefró individualment se segmentava en túbuls distals i proximals, nansa de Henle i glomèruls que contenien podòcits. La comparació dels perfils de transcripció dels organoides renals amb els teixits fetals humans va mostrar la congruència més gran fins ara amb un ronyó humà. Aquest model en resposta al cisplatí va mostrar que els túbuls proximals endociten dextrà i es dona el procés d'apoptosi. Això confirma que el cisplatí és nefrotòxic i suggereix que els organoides poden utilitzar-se per a la monitorització *in vitro* dels efectes adversos a fàrmacs, especialment en òrgans que solen ser susceptibles a patir toxicitats induïdes per fàrmacs —tracte gastrointestinal, fetge i ronyó.

Aquestes vies de toxicitat s'avaluen no només en fàrmacs, sinó també per al desenvolupament de tractaments per mitigar les exposicions i la detecció de toxines ambientals. Fa anys que es coneix que concretament els metalls pesants del medi ambient produeixen dany cel·lular i tissular. Les toxines ambientals, com el plom i altres metalls pesants, els pesticides i altres compostos, representen un problema important de salut a tot el món (Forsythe *et al.*, 2018). Pendergraft *et al.* (2017) van descriure la generació d'un sistema d'organoides testiculars humans utilitzant cèl·lules germinals adultes i cèl·lules de Leydig i Sertoli mitjançant el sistema de cultiu de gota penjant. Els organoides es podien mantenir en cultiu fins a vint-i-un dies i produïen testosterona. Els autors van exposar el sistema tridimensional a quatre compostos citotòxics diferents: busulfà, cisplatí, doxorubicina i etopòsid, per avaluar la viabilitat del model en la detecció de toxicitat. Es va observar en els organoides una disminució dosidependent a la viabilitat del sistema i un augment de l'apoptosi (Sakib *et al.*, 2019).

©Universitat de Barcelona

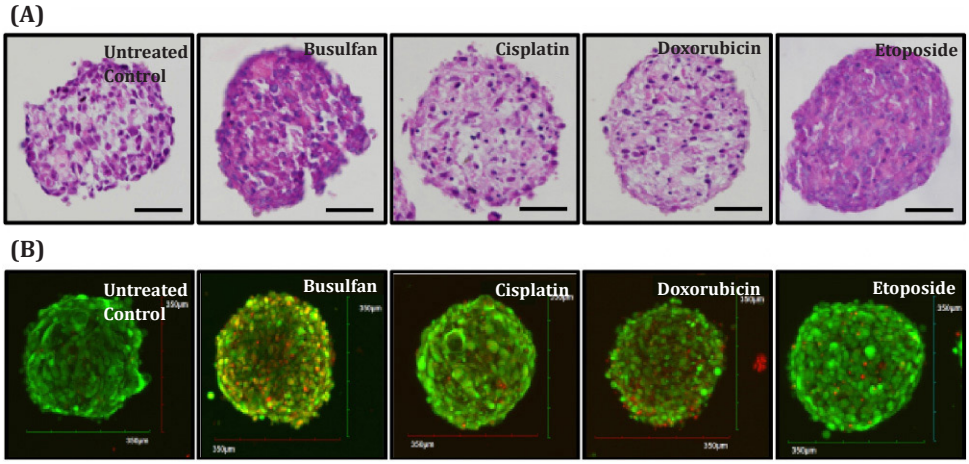

Figura 4. Avaluació morfològica i de viabilitat dels organoides testiculars humans en cultiu 3D després del tractament farmacològic: *a*) imatges representatives amb tinció d'HE; *b*) imatges confocals de projecció Z-*stack in vivo* / mort d'organoides testiculars en 3D després de ser exposats als fàrmacs corresponents durant 48 hores (Pendergraft *et al.*, 2017).

D'altra banda, Forsythe *et al.* (2018) van emprar organoides cardíacs i de fetge humans creats mitjançant bioenginyeria per analitzar un panell de toxines ambientals —plom, mercuri, tal·li i glifosat— i traçar la resposta dels organoides a aquests compostos. Els autors van concloure que, en utilitzar múltiples proves de viabilitat, són capaços de detectar els nivells de toxicitat en múltiples assaigs quan s'exposen a toxines ambientals presents al sistema.

També es poden mesurar els efectes aguts, i la tecnologia organoide seria fàcilment adaptable a qualsevol classe de teixit i per a la determinació de noves toxines. En l'assaig de Li *et al.* (2019), organoides intestinals —enteroides porcins— s'han aplicat com a model predictiu *in vitro* en un assaig toxicològic de micotoxines —metabòlits secundaris produïts per molts fongs filamentosos del fílum *Ascomycota*. La ingesta d'aliments que contenen deoxinivalenol (DON), un dels metabòlits de *Fusarium*, provoca freqüentment danys al teixit de l'intestí, la renovació del qual és impulsat per les cèl·lules mare intestinals (CMI). L'objectiu de l'estudi era investigar els efectes de l'exposició aguda de DON sobre l'activitat de les cèl·lules epitelials intestinals porcines i les CMI. Els autors van concloure que aquest estudi descriu un mètode fiable per a l'aïllament de criptes porcines i per al manteniment d'enteroides formats a partir d'aquestes. També van demostrar que l'exposició aguda a DON suprimeix l'expansió enteroide (Li *et al.*, 2019). L'ús d'organoides d'espècies animals ha demostrat la seva aplicació com a models predictius per a l'avaluació *in vitro* de toxines i contaminants ambientals. Els organoides d'espècies animals s'obtenen a partir de CMA de diferents fonts; queratinòcits —canins—, intestí —aviar, boví, caní i porcí—, fetge —caní i felí— i glàndula mamària —bovina i caprina— (Steimberg *et al.*, 2020).

En conclusió, els organoides són capaços d'augmentar la capacitat dels models *in vitro* per imitar condicions fisiològiques reals: proporcionen un sistema més representatiu i aporten avantatges en termes d'eficàcia dels medicaments i seguretat dels pacients, així com en la preselecció de molècules, com a models predictius per a l'avaluació *in vitro* d'assaigs de toxicitat i de l'exposició i la detecció de toxines ambientals. Tanmateix, cal tenir en compte algunes qüestions crítiques a l'hora d'abordar aquesta tecnologia per al cribratge toxicològic, com la baixa reproductibilitat dels models, la disponibilitat dels biomaterials i la selecció d'assajos i tecnologies específiques per a la lectura d'aquests sistemes avançats (Steimberg *et al.*, 2020).

©Universitat de Barcelona

A continuació s'ofereix una llista d'assajos i estudis toxicològics revisats en ordre cronològic:

Referència	Títol	Any
Mathur, A. *et al.*	«Human iPSC-based cardiac microphysiological system for drug screening Applications».	2015
Huebsch, N. *et al.*	«Miniaturized iPS-Cell-Derived Cardiac Muscles for Physiologically Relevant Drug Response Analyses».	2016
Alves-Lopes, J. P. *et al.*	«Testicular organoid generation by a novel in vitro three-layer gradient system».	2017
Pendergraft, S. S. *et al.*	«Three-dimensional testicular organoid: A novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro».	2017
Forsythe, S. D. *et al.*	«Environmental toxin screening using human-derived 3D bioengineered liver and cardiac organoids».	2018
Wang, Y. *et al.*	«Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure».	2018
Li, X. G. *et al.*	«Acute exposure to deoxynivalenol inhibits porcine enteroid activity via suppression of the Wnt/β-catenin pathway».	2019
Hedrich, W. D. *et al.*	«Development and characterization of rat duodenal organoids for ADME and toxicology applications».	2020

4. Discussió

4.1. Avantatges i limitacions respecte als models tradicionals

Els estudis sobre els mecanismes de formació, funció i patologia dels teixits i els òrgans són coneguts en gran manera gràcies a l'ús de sistemes de cultiu cel·lular *in vitro* i models animals. El tipus de cultiu cel·lular més utilitzat fins als darrers anys ha estat el cultiu monocapa, en què les cèl·lules creixen formant una monocapa en una placa de petri o bé en un matràs de cultiu, adherides a una superfície de plàstic (Kapałczyńska *et al.*, 2018). Els avantatges associats als models monocapa són la facilitat de control ambiental, l'observació de les cèl·lules, l'eventual manipulació i el baix cost en comparació amb els sistemes tridimensionals. Tanmateix, les cèl·lules monocapa no imiten les estructures fisiològiques dels teixits i els òrgans, i tampoc en són representatives les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula - entorn extracel·lular (Duval *et al.*, 2017) —aquestes interaccions són les responsables de la diferenciació cel·lular, la proliferació i l'expressió de gens i proteïnes, entre altres. En múltiples assaigs també s'ha pogut observar que l'estructura nuclear, la transducció de senyals i l'expressió gènica són diferents quan el mateix tipus cel·lular és cultivat en models tridimensionals i en monocapes (Mazzoleni, Di Lorenzo i Steimberg, 2009).

La naturalesa tridimensional dels organoides sí que permet imitar les estructures i els processos fisiològics, però, per contra, la limitació del transport per difusió d'oxigen i altres nutrients essencials i les alteracions de l'expressió gènica dependents del cultiu són possibles inconvenients en la seva utilització. Les cèl·lules dels organoides poden existir en diferents estats, en què les cèl·lules més externes són més prolífiques gràcies a un bon subministrament de nutrients, mentre que les cèl·lules més internes són majoritàriament hipòxiques i sovint amb estats quiescents, apoptòtics o necròtics, per culpa de l'acumulació de metabòlits a les regions més internes. Aquesta disposició cel·lular genera gradients bioquímics dife-

©Universitat de Barcelona

rencials entre les cèl·lules externes i internes. Un altre dels inconvenients tècnics dels sistemes tridimensionals és la difícil reproductibilitat dels resultats, entre altres motius, originada pels suports on es desenvolupen els cultius cel·lulars. Anteriorment s'ha parlat del Matrigel com a eina de suport, a causa de la seva composició: complexa, mal definida i variable, inclús dins d'un mateix lot, cosa que ha generat incertesa en els experiments de cultiu cel·lular. El gel proporciona senyals bioquímics i mecànics no específics per a la diferenciació espontània de les cèl·lules i dona lloc a efectes induïts que afecten la precisió i la reproductibilitat dels organoides. Els avenços recents en materials de suport han permès el desenvolupament de matrius lliures de xenogènesi, químicament definides i altament reproduïbles (Aisenbrey i Murphy, 2020). Deixant de banda les especificacions tècniques del sistema, mentre que els cultius monocapa poden ser analitzats pràcticament mitjançant qualsevol classe d'imatge, els sistemes d'organoides requereixen preparacions específiques per a la majoria de lectures d'imatges; moltes d'aquestes, en penetrar la mostra, produeixen danys o alteracions en el teixit i, amb les tècniques emprades fins ara, és complicat obtenir una alta resolució espacial dels sistemes tridimensionals (Meštrović, 2019). Per tant, caldria establir nous mètodes, més adequats, per a l'anàlisi dels organoides, definir nous paràmetres que garanteixin un control òptim de les condicions de cultiu i optimitzar nous protocols per a la separació de les cèl·lules de la matriu per a la realització d'anàlisis bioquímiques i la manipulació de mostres (Fontoura *et al.*, 2020).

En l'assaig de Fontoura *et al.* (2020) s'ha utilitzat la morfologia, la viabilitat cel·lular, la resposta a la quimioteràpia i l'anàlisi de l'expressió gènica per comparar un sistema de cultiu cel·lular monocapa, un model d'organoide i cèl·lules de tumors *in vivo* cultivats com a empelts en ratolins sinèrgics. En els resultats es va concloure que tots els mètodes de cultiu van ser capaços de mantenir el creixement cel·lular i tots els models d'organoides presentaven morfologies més similars al creixement *in vivo* que el cultiu cel·lular en monocapa. Després del tractament farmacològic amb dacarbazina, les cèl·lules cultivades en els sistemes organoides van mostrar més resistència en comparació amb els sistemes monocapa —van presentar fins a un 30 % més de viabilitat. L'anàlisi d'expressió gènica també va corroborar les similituds entre els grups d'organoides i *in vivo* en relació amb els monocapa. En conclusió, el cultiu de cèl·lules en sistemes d'organoides s'apropa més als teixits vius en termes de propietats bioestructurals i biofuncionals en comparació amb els cultius cel·lulars convencionals en monocapa (Duval *et al.*, 2017).

4.2. Impacte de la tecnologia organoide sobre l'experimentació animal

L'any 2017 es van utilitzar 2,18 milions animals d'experimentació només en assajos reglamentaris, segons l'últim informe de la Comissió Europea (Vinken, 2020). L'any 2010 es va adoptar una directiva sobre la protecció d'animals d'investigació i es va establir dins la legislació de la UE el principi de les tres R, un concepte de mètodes alternatius que es regeix per: *reduir* el nombre d'animals utilitzats, *reemplaçar* els animals per altres opcions i *refinar* les actuacions sobre els animals millorant-ne les condicions de vida. Amb aquesta nova legislació, els sistemes tridimensionals s'han convertit en una de les eines més valuoses per complir la petició europea de les tres R (Vinken, 2020).

Per avançar en aquest enfocament, un grup de catorze líders de la indústria farmacèutica amb seu a Europa va fundar el Fòrum de Líders en Toxicologia d'Investigació (ITLF), un grup obert i no exclusiu que comparteix experiències. L'ITLF va col·laborar amb el Centre of Alternatives to Animal Testing (CAAT-Europe) amb l'objectiu de millorar la interacció dels

©Universitat de Barcelona

experts del món acadèmic i dels organismes reguladors en aquesta nova perspectiva (Beilmann *et al.*, 2019). D'una banda, grups de científics creuen que la visió d'una investigació sense animals podria ser factible en un futur. Defensen que els models tridimensionals humans poden combinar-se amb les tècniques *in silico* —models informàtics complexos que poden predir amb precisió els processos ADME en la investigació toxicològica. S'ha demostrat que aquestes combinacions, en segons quin nivell de recerca, podrien proporcionar una predictibilitat molt més gran en comparació amb els models animals. Aquesta tecnologia, complementada amb estudis clínics i epidemiològics en humans, ofereix una nova finestra d'investigació de la salut i la malaltia (ECEAE, 2019).

D'altra banda, moltes empreses encara són reticents a integrar noves tecnologies o assaigs juntament amb l'avaluació de seguretat establerta que consisteix en estudis BPL *in vivo*, per culpa d'una percepció que els assaigs no BPL, o no totalment validats, podrien comprometre estudis essencials i posar en risc el procés d'aprovació (Beilmann *et al.*, 2019). A més, molts equips d'investigació defensen que, en el cas de malalties més complexes i que afecten múltiples sistemes orgànics —la diabetis o la malaltia renal crònica—, és poc probable que els sistemes tridimensionals arribin a substituir per complet els models animals (Davies, 2018). Mentre que els sistemes multiorgànics *in vivo* poden replicar tota la gamma d'absorció, disposició, metabolisme i excreció, els sistemes de cultiu tridimensionals o microfisiològics actuals no permeten una visió global. Aquesta realitat limita els assajos de rendiment a gran escala i dificulta la consolidació dels models tridimensionals. És poc probable, de moment, que existeixi un sistema universal útil per a totes les aplicacions (Truskey, 2018), però es podria esperar que això canviés en un futur. Cal tenir en compte que l'abandonament per motius de seguretat en les fases de desenvolupament de fàrmacs preclínics i clínics segueix representant un factor important en la pèrdua global de projectes i, per tant, existeix una pressió per millorar el poder predictiu global, incloses noves estratègies de cribratge i models d'investigació (Beilmann *et al.*, 2019).

4.3. El futur dels sistemes tridimensionals

Els mètodes per a la fabricació d'organoides encara presenten inconvenients considerables: les cèl·lules mare es desenvolupen de forma poc controlada en teixits circulars i tancats de vida curta. El conjunt comporta una incoherència anatòmica general amb la constitució dels òrgans *in vivo* (Fontoura *et al.*, 2020). Per fer front a les limitacions de les tècniques de cultiu convencionals d'organoides, s'estan desenvolupant tecnologies avançades com la integració dels organoides amb els òrgans en xip i la bioimpressió 3D.

La bioimpressió tridimensional d'organoides es basa en la manipulació robòtica del material cel·lular i les matrius d'encapsulació orgànica, que produeix una organització espacial controlada, comparable amb el funcionament d'una impressora 3D convencional (Steimberg *et al.*, 2020). Es tracta d'una integració capa a capa de biomaterials i cèl·lules vives, en una arquitectura tridimensional específica (Rawal *et al.*, 2021). En l'actualitat, la bioimpressió 3D s'utilitza principalment per a les iPCM prèvies al desenvolupament d'organoides per aconseguir elevades densitats cel·lulars abans de la diferenciació. Aquest procés es facilita amb l'ús de factors de creixement definits i petites molècules (Salaris *et al.*, 2019). Un dels elements fonamentals que caracteritza el procés de bioimpressió per a la formació d'organoides és el desenvolupament de biomaterials, que han de tenir unes característiques específiques: biocompatibilitat, imprimibilitat i capacitat de mantenir una estructura tridimensional. Per exemple, s'ha emprat com a substrat l'hidrogel, un material biocompatible ja emprat

©Universitat de Barcelona

com a suport tridimensional per al creixement cel·lular i altament programable. A més, es pot manipular tant en la mida dels porus com en les propietats físiques (Bordoni *et al.*, 2018). L'associació de biomaterials amb diferents tipus cel·lulars es coneix com a biotinta. En les investigacions sovint es tendeix a crear combinacions de biomaterials per a cada tipus cel·lular i amb unes especificacions d'imprimibilitat ben definides, perquè el procés sigui el més estandarditzat i reproduïble possible (Rawal *et al.*, 2021).

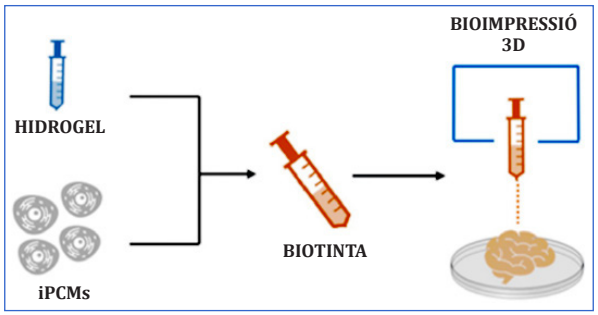

Figura 5. Tecnologia de bioimpressió 3D. L'hidrogel i les iPCM es combinen per obtenir una biotinta, que després s'utilitza per dissenyar i imprimir estructures tridimensionals (Bordoni *et al.*, 2018).

El repte següent consistirà a desenvolupar noves biotintes per a dipositar els agregats cel·lulars, així com tècniques de vascularització eficaces que permetin crear patrons per a la bioimpressió d'organoides que englobin tot l'espectre fisiològic de teixits (Bordoni *et al.*, 2018). La generació d'organoides per bioimpressió podria generar de forma automatitzada òrgans sencers funcionals, vascularitzats i amb densitats cel·lulars i complexitats al nivell dels teixits *in vivo*. Aquesta tecnologia també permetria estandarditzar protocols de cultiu cel·lular tridimensional en funció de les aplicacions biològiques a les quals anessin dirigides.

Els òrgans en xips són dispositius microfabricats de cultiu cel·lular dissenyats per modelar les unitats funcionals dels òrgans humans *in vitro* (Beilmann *et al.*, 2019). De forma general, el primer pas per a la construcció d'aquests sistemes és comprendre l'anatomia de l'òrgan i reduir-la als elements bàsics. A continuació, s'examinen aquestes unitats funcionals per identificar-ne les característiques, com els tipus cel·lulars, l'organització estructural i els microentorns bioquímics i físics específics de l'òrgan. Es dissenya un dispositiu de cultiu cel·lular per reproduir aquestes característiques. Els dispositius solen contenir múltiples microcambres de flux direccional individuals per cultivar diversos tipus de cèl·lules. Si cal, s'incorporen components addicionals que es poden accionar mecànicament, químicament, electromagnèticament o òpticament per emular l'entorn bioquímic i mecànic (Park, Georgescu i Huh, 2019). Finalment, el dispositiu dissenyat és produït mitjançant tècniques de microfabricació com la litografia tova.

La tecnologia dels òrgans en xips i el cultiu d'organoides representen dos mecanismes fonamentalment diferents però complementaris, amb el mateix objectiu comú de recapitular la complexitat dels òrgans humans *in vitro*. A diferència del cultiu d'organoides, la tecnologia d'òrgans en xips es basa en el coneixement dels òrgans humans i del seu entorn per dissenyar construccions artificials en què les cèl·lules i el seu microentorn es controlin amb precisió (Beilmann *et al.*, 2019; Park, Georgescu i Huh, 2019). Actualment, els investigadors estan explorant la possibilitat de combinar sinèrgicament les millors característiques de cada enfocament per desenvolupar una tecnologia *in vitro* més potent.

©Universitat de Barcelona

5. Conclusió

En aquesta revisió podem concloure que els organoides són sistemes de cultiu tridimensionals en procés de presentar la mateixa estructura i funcionament d'un òrgan viu, i que es formen a partir de cèl·lules mare. Les seves característiques permeten adoptar aquesta tecnologia en tota una sèrie de disciplines biomèdiques per les seves múltiples aplicacions: recerca de nous fàrmacs, desenvolupament de teràpies regeneratives i validació de processos d'edició genètica, entre altres. S'ha demostrat, d'una banda, que aquests sistemes tenen la capacitat d'optimitzar nous sistemes d'assaig toxicològic i reinventar les tècniques d'investigació, apropant-se cada vegada més a un model de recerca centrat en la biologia humana i lliure d'animals d'experimentació, i, de l'altra, que el cultiu de sistemes tridimensionals s'apropa més als teixits humans vius en termes bioestructurals i biofuncionals en comparació amb els cultius en monocapa. De moment, respecte als models animals, es conclou que, en el cas de malalties més complexes i que afecten múltiples sistemes orgànics, és difícil que els sistemes tridimensionals arribin a substituir per complet els animals d'experimentació.

Tenint en compte les mancances tècniques i metodològiques d'aquests sistemes, encara queda molt camí per assolir un model *in vitro* fisiològicament funcional i idèntic a un òrgan, però en pocs anys s'ha vist que aquesta tecnologia és capaç de reinventar-se a si mateixa i d'adoptar millores substancials i viables, no només en el marc teòric, sinó també en assajos clínics que disten menys d'un any entre ells. Els sistemes tradicionals d'avaluació de la toxicitat inclouen models basats en línies cel·lulars i cèl·lules primàries. El desenvolupament de tecnologies com els organoides 3D, els teixits bioimpresos i els MPS d'un o diversos òrgans donaran lloc a models amb més rellevància biològica, per als quals encara no s'ha establert una validació completa ni una aplicació rutinària.

6. Bibliografia

Aisenbrey, E. A., Murphy, W. L. (2020) «Synthetic alternatives to Matrigel». *Nature Reviews Materials*, 5(7), pp. 539-551. DOI: 10.1038/s41578-020-0199-8.

Alves-Lopes, J. P., Söder, O., Stukenborg, J. B. (2017) «Testicular organoid generation by a novel in vitro three-layer gradient system». *Biomaterials*, 130, pp. 76-89. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.03.025.

Barbuzano, J. (2017) «Organoids: A new window into disease, development and discovery». *Harvard Stem Cell Institute (HSCI)*, *Harvard University*. Disponible a: https://hsci.harvard.edu/organoids (accés: 25 abril 2021).

Bautista, R. (2020) «Los organoides: esos órganos en miniatura». *Divulga Natura*. Disponible a: https://www.divulganatura.com/los-organoides-los-organos-en-miniatura/ (accés: 25 abril 2021).

Beilmann, M. *et al.* (2019) «Optimizing drug discovery by investigative toxicology: Current and future trends». *Altex*, 36(2), pp. 289-313. DOI: 10.14573/altex.1808181.

Berkers, G. *et al.* (2019) «Rectal Organoids Enable Personalized Treatment of Cystic Fibrosis». *Cell Reports*, 26(7), pp. 1701-1708.e3. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.068.

Bordoni, M. *et al.* (2018) «From neuronal differentiation of iPSCs to 3D neuro-organoids: Modelling and therapy of neurodegenerative diseases». *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, p. 3972. DOI: 10.3390/ijms19123972.

Calvache Aguilar, P. (2019) *Avances en el desarrollo de organoides como modelo de estudio en medicina regenerativa.* Facultat de Ciències, Universitat de les Illes Balears. Disponible a: https://

©Universitat de Barcelona

dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/149841/Calvache_Aguilar_Paula.pdf?sequence=1&isAllowed=y (accés: 20 abril 2021).

CH (2021) «What Are Stem Cells?». *Course Hero*. Disponible a: https://www.coursehero.com/sg/cell-biology/what-are-stem-cells/ (accés: 18 maig 2021).

Clevers, H. (2016) «Modeling Development and Disease with Organoids». *Cell*. Cell Press, pp. 1586-1597. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.082.

Corrò, C., Novellasdemunt, L., Li, V. S. W. (2020) «A brief history of organoids». *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 319(1), pp. C151-C165. DOI: 10.1152/ajpcell.00120.2020.

Cortés, J. L., García-Pérez, J. L. (2011) «Células madre embrionarias y células pluripotentes inducidas: ¿pasado, presente y/o futuro en la medicina regenerativa?». *Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción*, 16 juny, pp. 55-61. Disponible a: https://revista.asebir.com/celulas-madre-embrionarias-y-celulas-pluripotentes-inducidas-pasado-presente-yo-futuro-en-la-medicina-regenerativa/ (accés: 21 abril 2021).

Da Silva, B. *et al.* (2018) «Spontaneous Glioblastoma Spheroid Infiltration of Early-Stage Cerebral Organoids Models Brain Tumor Invasion». *SLAS Discovery*, 23(8), pp. 862-868. DOI: 10.1177/2472555218764623.

Davies, J. A. (2018) *Organoids and mini-organs: Introduction, history, and potential.*, *Organoids and Mini-Organs*. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-812636-3.00001-8.

De Coppi, P. *et al.* (2007) «Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy». *Nature Biotechnology*, 25(1), pp. 100-106. DOI: 10.1038/nbt1274.

Dekkers, J. F. *et al.* (2013) «A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids». *Nature Medicine*, 19(7), pp. 939-945. DOI: 10.1038/nm.3201.

Dulak, J. *et al.* (2015) «Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine». *Acta Biochim Pol*, 62(3), pp. 329-37 DOI: 10.18388/abp.2015_1023.

Duval, K. *et al.* (2017) «Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture». *Physiology*. American Physiological Society, pp. 266-277. DOI: 10.1152/physiol.00036.2016.

ECEAE (2019) *Animal-Free Research in the 21st Century*. ECEAE. Disponible a: https://www.eceae.org/animal-free.html (accés: 6 maig 2021).

Eisenstein, M. (2018) «Organoides: los constructores del cuerpo». *Investigación y Ciencia (Scientific American)*, (499), p. 76. Disponible a: https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/los-primeros-agujeros-negros-733/organoides-los-constructores-del-cuerpo-16246.

Emerman, J. T. *et al.* (1977) «Hormonal effects on intracellular and secreted casein in cultures of mouse mammary epithelial cells on floating collagen membranes». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(10), pp. 4466-4470. DOI: 10.1073/pnas.74.10.4466.

EuroStemCell (2018) «Células iPS y reprogramación celular: cómo convertir cualquier célula del cuerpo en una célula madre». *Eurostemcell*. Disponible a: https://www.eurostemcell.org/es/celulas-ips-y-reprogramacion-celular-como-convertir-cualquier-celula-del-cuerpo-en-una-celula-madre (accés: 21 abril 2021).

Feldman, M. (1955) «Dissociation and Reaggregation of Embryonic cells of Triturus alpestris, Development». *The Company of Biologists*. DOI: 10.1242/DEV.3.3.251.

Fennema, E. *et al.* (2013) «Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues, Trends in Biotechnology». *Elsevier*. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.

Fontoura, J. C. *et al.* (2020) «Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance». *Materials Science and Engineering C*, 107, p. 110264. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110264.

Forsythe, S. D. *et al.* (2018) «Environmental toxin screening using human-derived 3D bioengineered liver and cardiac organoids». *Frontiers in Public Health*, 6, p. 16. DOI: 10.3389/fpubh.2018.00103.

©Universitat de Barcelona

Gao, D. *et al.* (2014) «Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer». *Cell*, 159(1), pp. 176-187. DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.016.

Han, Y. *et al.* (2020) «Identification of Candidate COVID-19 Therapeutics using hPSC-derived Lung Organoids». DOI: 10.1101/2020.05.05.079095.

Hedrich, W. D. *et al.* (2020) «Development and characterization of rat duodenal organoids for ADME and toxicology applications». *Toxicology*, 446, p. 152614. DOI: 10.1016/j.tox.2020.152614.

Huebsch, N. *et al.* (2016) «Miniaturized iPS-Cell-Derived Cardiac Muscles for Physiologically Relevant Drug Response Analyses OPEN». *Nature Publishing Group*. DOI: 10.1038/srep24726.

Hughes, C. S., Postovit, L. M., Lajoie, G. A. (2010) «Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture.». *Proteomics*, 10(9), pp. 1886-1890. DOI: 10.1002/pmic.200900758.

Kapałczyńska, M. *et al.* (2018) «2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures». *Archives of Medical Science*, 14(4), pp. 910-919. DOI: 10.5114/aoms.2016.63743.

Kim, H. J. *et al.* (2012) «Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow». *Lab on a Chip*, 12(12), pp. 2165-2174. DOI: 10.1039/c2lc40074j.

Kim, J., Koo, B. K., Knoblich, J. A. (2020) «Human organoids: model systems for human biology and medicine». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. *Nature Research*, pp. 571-584. DOI: 10.1038/s41580-020-0259-3.

Koike, H. *et al.* [s. d.] «Modelling human hepato-biliary-pancreatic organogenesis from the foregut-midgut boundary». *Nature*. DOI: 10.1038/s41586-019-1598-0.

Kopper, O. *et al.* (2019) «An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity». *Nature Medicine*, 25(5), pp. 838-849. DOI: 10.1038/s41591-019-0422-6.

Lancaster, M. A. *et al.* (2013) «Cerebral organoids model human brain development and microcephaly». *Nature*, 501. DOI: 10.1038/nature12517.

Li, X. *et al.* (2014) «Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture». *Nature Medicine*, 20(7), pp. 769-777. DOI: 10.1038/nm.3585.

Li, X. G. *et al.* (2019) «Acute exposure to deoxynivalenol inhibits porcine enteroid activity via suppression of the Wnt/β-catenin pathway». *Toxicology Letters*, 305, pp. 19-31. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.01.008.

Lou, Y. R., Leung, A. W. (2018) «Next generation organoids for biomedical research and applications». *Biotechnology Advances*. *Elsevier Inc.*, pp. 132-149. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.10.005.

Mata-Miranda, M., Vázquez-Zapién, G. J., Sánchez-Monroy, V. (2013) «Generalidades y aplicaciones de las células madre». *SciELO*. Disponible a: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-53372013000300009 (accés: 24 abril 2021).

Mathur, A. *et al.* (2015) «Human iPSC-based cardiac microphysiological system for drug screening applications». *Scientific Reports*, 5. DOI: 10.1038/srep08883.

Mazzoleni, G., Di Lorenzo, D., Steimberg, N. (2009) «Modelling tissues in 3D: The next future of pharmaco-toxicology and food research?». *Genes and Nutrition*. BioMed Central, pp. 13-22. DOI: 10.1007/s12263-008-0107-0.

Meštrović, T. (2019) «2D and 3D Cell Culture Comparison». *News Medical Life Sciences*. Disponible a: https://www.news-medical.net/life-sciences/2D-and-3D-Cell-Culture-Comparison.aspx (accés: 6 maig 2021).

Michalopoulos, G., Pitot, H. C. (1975) «Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations». *Experimental Cell Research*, 94(1), pp. 70-78. DOI: 10.1016/0014-4827(75)90532-7.

Miguel-Gómez, L. *et al.* (2021) «Stem Cells and the Endometrium: From the Discovery of Adult Stem Cells to Pre-Clinical Models». *Cells*. NLM (Medline). DOI: 10.3390/cells10030595.

©Universitat de Barcelona

Miyoshi, T. *et al.* (2020) «Kidney organoids in translational medicine: Disease modeling and regenerative medicine». *Developmental Dynamics*. John Wiley and Sons Inc., pp. 34-45. DOI: 10.1002/dvdy.22.

Moscona, A., Moscona, H. (1952) «The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo». *J. Anat.*, Jul., 86 (Pt 3), pp. 287-301.

Muthuswamy, S. K. (2017) «Bringing together the organoid field: From early beginnings to the road ahead». *Development (Cambridge)*. Company of Biologists Ltd, pp. 963-967. DOI: 10.1242/dev.144444.

Clínica Universidad de Navarra [s. d.] «Criptas de Lieberkühn». *Diccionario médico. Clínica Universidad de Navarra.* Disponible a: https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/criptas-lieberkuhn (accés: 24 abril 2021).

Park, S. E., Georgescu, A., Huh, D. (2019) «Organoids-on-a-chip». *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 960-965. DOI: 10.1126/science.aaw7894.

Pendergraft, S. S. *et al.* (2017) «Three-dimensional testicular organoid: A novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro». *Biology of Reproduction*, 96(3), pp. 720-732. DOI: 10.1095/biolreprod.116.143446.

Pimentel-Parra, G. A., Murcia-Ordoñez, B. (2017) «Células madre, una nueva alternativa médica». *Perinatología y Reproducción Humana*, 31(1), pp. 28-33. DOI: 10.1016/j.rprh.2017.10.013.

Rawal, P. *et al.* (2021) «Prospects for 3D bioprinting of organoids». *Bio-Design and Manufacturing* (0123456789). DOI: 10.1007/s42242-020-00124-1.

Sachs, N. *et al.* (2018) «A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity». *Cell*, 172(1-2), pp. 373-386.e10. DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.010.

Sakib, S. *et al.* (2019) «Three-dimensional testicular organoids as novel in vitro models of testicular biology and toxicology». *Environmental Epigenetics*, 5(3). DOI: 10.1093/eep/dvz011.

Salaris *et al.* (2019) «3D Bioprinted Human Cortical Neural Constructs Derived from Induced Pluripotent Stem Cells». *Journal of Clinical Medicine*, 8(10), p. 1595. DOI: 10.3390/jcm8101595.

Sato, T. *et al.* (2009) «Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche». *Nature*, 459(7244), pp. 262-265. DOI: 10.1038/nature07935.

Sato, T., Clevers, H. (2013) «Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: Mechanism and applications». *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 1190-1194. DOI: 10.1126/science.1234852.

Sheet, F. (2018) «Pharmacological safety testing in human adult stem cell-derived organoids | Projects | H2020 | CORDIS | European Commission», juny, pp. 1-3. Disponible a: https://cordis.europa.eu/project/id/737600/es; https://cordis.europa.eu/project/rcn/209165_en.html.

Steimberg, N. *et al.* (2020) «iPS, organoids and 3d models as advanced tools for in vitro toxicology». *Altex*, 37(1), pp. 136-140. DOI: 10.14573/altex.1911071.

Takasato, M. *et al*. (2015) «Kidney organoids from human IPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis». *Nature*, 526, pp. 564-568. DOI: 10.1038/nature15695. Epub 2015 Oct 7.

Truskey, G. A. (2018) «Human Microphysiological Systems and Organoids as in Vitro Models for Toxicological Studies». *Frontiers in Public Health*, 6, p. 185. DOI: 10.3389/fpubh.2018.00185.

U.S. National Library of Medicine (2021) «Células madre». *MedlinePlus*. Disponible a: https://medlineplus.gov/spanish/stemcells.html (accés: 20 abril 2021).

Vazin, T., Freed, W. J. (2010) «Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review». *Restorative Neurology and Neuroscience*. NIH Public Access, pp. 589-603. DOI: 10.3233/RNN-2010-0543.

Vinken, M. (2020) «3rs toxicity testing and disease modeling projects in the European horizon 2020 research and innovation program». *EXCLI Journal*, 19, pp. 775-784. DOI: 10.17179/excli2020-2450.

©Universitat de Barcelona

Wang, Y. *et al.* (2018) «Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure». *Lab on a Chip*, 18(6), pp. 851-860. DOI: 10.1039/c7lc01084b.

Yamanaka, S. *et al.* (2017) «Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system». *Nature Communications*, 8(1). DOI: 10.1038/s41467-017-01922-5.

Yin, X. *et al.* (2016) «Engineering Stem Cell Organoids». *Cell Stem Cell*, 18(1), pp. 25-38. DOI: 10.1016/j.stem.2015.12.005.

Yokoo, T. *et al.* (2005) «Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), pp. 3296-3300. DOI: 10.1073/pnas.0406878102.

Zhou, J. *et al.* (2017) «Human intestinal tract serves as an alternative infection route for Middle East respiratory syndrome coronavirus». *Science Advances*, 3(11). DOI: 10.1126/sciadv.aao4966.