

Empleo de organoides intestinales como modelo 3D fisiológico alternativo a la experimentación animal.

Carlos García Estrada, DMV, PhD.

Área de Toxicología, Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana s/n, 24007, León.

Los cultivos celulares representan una herramienta fundamental durante la evaluación de la eficacia y citotoxicidad de moléculas candidatas en las etapas iniciales del proceso del descubrimiento de fármacos. Clásicamente, se han empleado modelos *in vitro* basados en ensayos con cultivos celulares en monocapa (cultivos 2D) que, aunque son relativamente sencillos de implementar, no representan modelos fisiológicos reales, proporcionan datos poco fiables y, a menudo, no permiten determinar algunos efectos tóxicos. Por otro lado, los métodos tradicionales de experimentación con animales han sido durante mucho tiempo el modelo de referencia en la evaluación de la toxicidad. Sin embargo, las implicaciones éticas relacionadas con el uso de animales de experimentación y las limitaciones de estos modelos han impulsado el desarrollo de enfoques *in vitro* alternativos, más precisos y humanitarios.

En este sentido, especialmente en la última década se han desarrollado cultivos en tres dimensiones (3D), los cuales incluyen esferoides y organoides. Los esferoides son agregados de células tumorales *in vitro* que recrean el comportamiento de un tumor, ya que contienen una capa externa de células expuestas en la superficie con acceso a nutrientes y oxígeno, otra intermedia de quiescencia y otra interna que incluye un núcleo hipóxico. Dichos modelos de esferoides 3D se están utilizando con éxito en el cribado de fármacos antitumorales.

Un grado mayor de complejidad en los cultivos 3D lo constituyen los organoides, los cuales pueden definirse como órganos diminutos creados en laboratorio a partir del cultivo de células tumorales o células madre embrionarias o pluripotenciales inducidas o células madre/progenitoras neonatales/adultas de tejido primario, con potencial de autoorganizarse en complejos parecidos a lo que serían órganos *in vivo* y reproducir funciones de órganos esenciales y respuestas personalizadas a patógenos específicos. Para conseguir la estructura tridimensional y la diferenciación celular, se precisa un nicho físico consistente en una matriz extracelular, y la adición de factores de crecimiento que dependen del tipo de organoide que se pretende generar. Existen modelos de organoides de prácticamente todos los órganos, incluidos el hígado, cerebro, retina, oído interno, pulmón, intestino, próstata, páncreas y ovario, entre otros, existiendo además modelos de enfermedad como esteatosis hepática, fibrosis pulmonar, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, fibrosis quística, enfermedad de hígado graso, hepatitis B, cardiomiopatía dilatada, diabetes mellitus, riñón poliquístico, eccema atópico, etc. El empleo de organoides tiene importantes ventajas, tales como su producción en laboratorio de forma controlada y facilidad de manipulación, el incluir varios tipos de células en su composición reproduciendo mejor la anatomía y fisiología del organismo vivo y representando un modelo fisiológicamente más relevante, y ser seguros y relativamente asequibles. A pesar de estos aspectos positivos, los organoides tienen algunas limitaciones, como no contar con vascularización y tener una vida limitada, aunque las ventajas de su uso superan con creces estas limitaciones.

En nuestro laboratorio hemos conseguido desarrollar organoides intestinales de ratón y oveja a partir de células de las criptas intestinales con el fin de implementar un sistema de alto

rendimiento en placas de 384 pocillos para el cribado de compuestos, reduciendo así el consumo de recursos y minimizando la necesidad de experimentos con animales vivos. Mediante el empleo de la técnica de azul alamar se puede calcular la viabilidad celular de los organoides de forma rápida y sencilla, obteniéndose así una medida más predictiva de la seguridad *in vitro* de los compuestos testados. Además, en virtud de la naturaleza del organoide, se puede emplear como modelo de barrera intestinal *in vitro* mediante la incorporación de células del sistema inmunológico (principalmente macrófagos derivados de la diferenciación de monocitos periféricos aislados de sangre) en placas Transwell™. Este sistema de cocultivo replica las complejas interacciones entre el epitelio intestinal y dicho sistema inmunológico, lo que permite la investigación de los efectos de los compuestos en un entorno más fisiológico. Esto no sólo mejora la precisión predictiva de la evaluación del efecto citotóxico, sino que también contribuye a la comprensión de la respuesta mediada por el sistema inmunológico ante la presencia de un compuesto determinado en el intestino.

Nuestro modelo de organoides intestinales está preparado para avanzar en el campo de la toxicología, reduciendo la dependencia de modelos animales tradicionales, acelerando la caracterización de productos farmacéuticos y químicos y, en última instancia, mejorando nuestra capacidad para proteger la salud humana y el medio ambiente.