



PONTIFICIA  
UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CHILE

# Evaluación de la respuesta inmune anti-tumoral mediada por linfocitos T en organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar

POR  
JAVIERA CONSTANZA OBREQUE CASTRO

Tesis presentada a la Facultad de Medicina, de la Pontificia Universidad Católica de Chile, para optar al grado académico de doctor en Ciencias Médicas

Profesores guía  
Dra. Carolina Bizama  
Dr. Juan Carlos Roa  
Dra. Viviana Montecinos

05-Abril-2024  
Santiago, Chile



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE  
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas  
Dirección de Investigación y Doctorado  
Escuela de Medicina

La Comisión Examinadora, constituida por los Profesores abajo firmantes, aprueba la Defensa Pública de la Tesis Doctoral titulada:

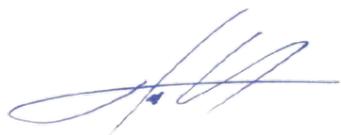
**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL MEDIADA POR LINFOCITOS T EN ORGANOIDES DERIVADOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE VESÍCULA BILIAR”**

**Aprobación Defensa Pública:**

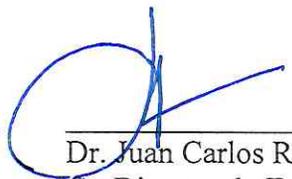
**SRA. JAVIERA CONSTANZA OBREQUE CASTRO**

Calificándose el trabajo realizado, el manuscrito sometido y la defensa oral, con nota  
(7.0) Sete

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jorge Carvajal  
Jefe  
Programa Doctorado en Ciencias Médicas  
Escuela de Medicina, PUC

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Felipe Heusser  
Decano  
Facultad de Medicina PUC

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Carolina Bizama  
Directora de Tesis  
Escuela de Medicina, PUC

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Carlos Roa  
Co-Director de Tesis  
Escuela de Medicina, PUC

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Viviana Montecinos  
Co-Directora de Tesis  
Escuela de Medicina, PUC

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Carolina Serrano  
Profesora Evaluadora Interna  
Escuela de Medicina, PUC

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Marcela Hermoso  
Profesora Evaluadora Externa  
Facultad de Medicina U de Chile

Santiago, 05 de abril del 2024

## Dedicatoria

Este trabajo de tesis se lo dedico a mi familia: Mamá, Papá, Pauli, Cata y Joaqui por su amor y apoyo incondicional, a la familia que decidí formar junto a Tomás por su amor, contención y motivación, especialmente en la ultima parte del proceso, y a todos los integrantes que forman parte de mi gran familia por el apoyo constante y a mi yaya, que no esta terrenalmente pero siempre presente. A mis amigas que dan las risas cuando más hacen falta y apoyan siempre.

Especialmente quiero dedicarle esta tesis a Catalina Donoso Obreque, te admiro profundamente por tu valentía y estoy orgullosa de la persona en que te has convertido.

## Agradecimientos

Mis agradecimientos a todos los que han formado parte de este proceso, comenzando con mi tutora de tesis, Dra. Carolina Bizama, por creer en mi y apoyarme siempre en este proyecto, a mis co-tutores Dr. Juan Carlos Roa por su colaboración constante y apoyo en el desarrollo de la tesis y la Dra. Viviana Montecinos por su aporte y apoyo durante la tesis. Al comité evaluador, especialmente a mi comisión de mi tesis, Dra. Marcela Hermoso y Dra. Carolina Serrano por sus críticas constructivas y el apoyo a desarrollar un mejor trabajo.

Mi gratitud con el laboratorio de oncología y colaboradores, especialmente a la Dra. Patricia García, por su apoyo constante y desinteresado durante este proceso. A los que fueron mis compañeros de laboratorio Dr. Luis Vergara y Felipe Suarez, por su apoyo constante durante el desarrollo de la tesis. Al Biobanco de tejidos y fluidos UC, por su gran trabajo y colaboración en esta tesis. Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Andree Boonstra y a su equipo de laboratorio por recibirme en la pasantía, fue una experiencia gratificante y motivante.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Médicas por la formación como capital humano, especialmente a Debbie Meza, con su rol fundamental para nosotros como alumnos, a la Dra. Paulina Bravo, por ser un ejemplo de investigadora y una guía desinteresada en mi formación como investigadora y académica. A mi generación de Doctorado por primeros años intensos, pero acompañados de risas y comidas.

Finalmente, agradecer a las instituciones que financiaron este trabajo de tesis, principalmente ANID, a través, de la Beca Doctorado Nacional folio 21180982, a los proyectos Fondecyt regular N°1171463, N°1221253 y N°1221345, a la Vicerrectoría de Investigación UC, al Proyecto ESCALON H2020 825510, al departamento de Anatomía Patológica y a la Facultad de Medicina UC.

## Tabla de contenido

Dedicatoria _____	3
Agradecimientos _____	4
Lista de Figuras _____	7
Lista De tablas _____	9
Resumen _____	10
Abstract _____	12
Capítulo 1 Introducción _____	14
1.1 Cáncer de Vesícula Biliar _____	14
1.3 Sistema Inmune y Cáncer _____	16
1.4 Mecanismos de evasión inmune _____	17
1.5 Inmunoterapias _____	18
1.6 Organoides derivados de pacientes: modelo representativo del tumor _____	20
Capítulo 2 Hipótesis y Objetivos _____	22
2.1 Hipótesis _____	22
2.2. Objetivo General _____	22
2.3 Objetivos específicos _____	22
Capítulo 3 Metodología _____	23
3.1 Objetivo 1: Caracterizar la expresión de los co-receptores de los immune checkpoint PD-L1, CD80, CD86 y MHC-II en las células epiteliales tipo cancer stem cells en los organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar _____	23
3.1.1.- Establecimiento de organoides derivados de pacientes _____	23
3.2 Objetivo 2: Evaluar la respuesta de linfocitos T provenientes de sangre periférica al interactuar directamente (co-cultivo) con organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar _____	26
3.2.1 Obtención de PBMC a partir de controles sanos _____	26
3.2.2 Evaluación de la activación y expresión de immune checkpoint en linfocitos TCD4 y TCD8 _____	26
3.3 Objetivo 3: Evaluar el efecto de la inhibición del immune checkpoint PD-1, en el modelo de interacción de células inmunes con organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar _____	28
Capítulo 4 Resultados _____	29
4.1 Objetivo específico 1: _____	29

4.1.1 Establecimiento y caracterización de histológica organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar avanzado _____	29
4.1.2 Caracterización de organoides mediante la expresión de transcritos de CD44, CD133, MHC-I, MHC-II IL-6 e IL-8. _____	32
4.1.3 Evaluación de células con fenotipo CSC, CD44+/CD133+ en organoides y expresión de correceptores MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 y PD-L1 en población CSC por citometría de flujo. _____	34
4.2 Objetivo específico 2. Evaluar la respuesta de linfocitos T provenientes de sangre periférica al interactuar directamente (co-cultivo) con organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar _____	37
4.2.1 Caracterización de PBMC de pacientes GBC _____	37
4.2.2 Estandarización de las condiciones de co-cultivo _____	38
4.2.3 Evaluación de la respuesta de Linfocitos T en co-cultivo con organoides _____	39
4.3 Objetivo específico 3: Evaluar el efecto de la inhibición del immune checkpoint PD-1, en el modelo de interacción de células inmunes con organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar _____	42
4.3.1 Caracterización de Linfocitos T en co-cultivo con organoides en presencia de inhibidores de PD-1 _____	42
4.3.2 Evaluación bajo condición co-cultivo autólogo y alogénico: _____	46
Capítulo 5 Discusión _____	50
Capítulo 6 Bibliografía _____	57
Capítulo 7 Información Suplementaria _____	63
7.1 Metodología _____	63
7.1.1 Evaluación de Linfocitos T y T reguladores en PBMC de pacientes GBC y GST _____	63
7.1.2 Cultivo de Linfocitos T y evaluación de Activación _____	64
7.1.3 Efecto de IFN- $\gamma$ en organoides _____	64
7.2.2 Efecto de tratamiento de IFN- $\gamma$ en la expresión de MHC-I _____	67
7.2.3 Evaluación de la activación y expresión de immune checkpoint en linfocitos TCD4 y TCD8 _____	68
7.2.4 Estandarización proporciones de co-cultivo y tiempos en co-cultivo de Organoides con PBMC. _____	69
7.2.5 Evaluación de la respuesta de linfocitos T en Co-cultivo de organoides GBC y PBMC de control sano en presencia de inhibidores Nivolumab o Pembrolizumab _____	72
7.2.6 Evaluación de Co-cultivo del organoide 1703 con PBMC en condición autólogo y alogénica _____	76
7.2.7 Evaluación de Complejo mayor de Histocompatibilidad tipo I en organoides y PBMC control _____	79

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representación de los immune checkpoint y sus correceptores reportado por Hahn y colaboradores. _____	17
<b>Figura 2:</b> Caracterización de los organoides mediante tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E). _____	30
<b>Figura 3:</b> Caracterización de los marcadores CK19, KI67 y P53 por inmunohistoquímica de tejidos y organoides. _____	31
<b>Figura 4:</b> Caracterización de la expresión relativa de transcritos en comparación a los genes de referencia mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real en las muestras de organoides. _____	33
<b>Figura 5:</b> Caracterización de la expresión de marcadores de células fenotipo CSC CD44+/CD133+, mediante citometría de flujo en los organoides. _____	35
<b>Figura 6:</b> Intensidad de fluorescencia media (MFI) de células fenotipo CSC CD44+/CD133+, mediante citometría de flujo en los organoides. _____	36
<b>Figura 7:</b> Evaluación de los porcentajes de expresión de los immune checkpoint CTLA4, LAG3, PD-1 y TIM3 en las subpoblaciones TCD4 y TCD8 en muestras de PMBC de pacientes con cáncer de vesícula biliar (GBC). _____	38
<b>Figura 8:</b> Caracterización de la subpoblación TCD4, marcadores de activación CD69, CD137 y los immune checkpoint CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC de control mediante citometría de flujo. _____	40
<b>Figura 9:</b> Caracterización de la subpoblación TCD8, marcadores de activación CD69, CD137 y los immune checkpoint CTLA4, LAG3 y PD-1 de co-cultivo de organoides y PBMC de control, mediante citometría de flujo. _____	42
<b>Figura 10:</b> Caracterización de la subpoblación TCD4 en co-cultivo con organoides de pacientes antes y posterior al tratamiento con inhibidores anti-PD-1. _____	44
<b>Figura 11:</b> Caracterización de la subpoblación TCD8 en co-cultivo con organoides de pacientes antes y posterior al tratamiento con inhibidores anti-PD-1. _____	46
<b>Figura 12:</b> Caracterización de la subpoblación TCD4, marcadores de activación CD69, CD137 y los immune checkpoint CTLA4, LAG3 y PD-1 mediante citometría de flujo de co-cultivo de organoide 1703T y PBMC autólogo y alogénico. _____	47
<b>Figura 13:</b> Caracterización de la subpoblación TCD8, marcadores de activación CD69, CD137 y los immune checkpoint CTLA4, LAG3 y PD-1 mediante citometría de flujo de co-cultivo de organoide 1703T y PBMC autólogo y alogénico. _____	49
<b>Figura Suplementaria 1:</b> Caracterización de la subpoblación TCD4, marcador de activación CD69 y los immune checkpoint CTLA4, LAG3, PD-1 y TIM3 en muestras de PBMC provenientes de pacientes GBC y pacientes GST mediante citometría de flujo. _____	65
<b>Figura Suplementaria 2:</b> Caracterización de la subpoblación TCD8, marcador de activación CD69 y los immune checkpoint CTLA4, LAG3, PD-1 y TIM3 en muestras de PBMC provenientes de pacientes GBC y pacientes GST mediante citometría de flujo. _____	66
<b>Figura Suplementaria 3:</b> Caracterización de la subpoblación de Treg, a partir de la subpoblación TCD4, se evaluó la población que expresa CD25hihg y FoxP3 positivo, en muestras de PBMC provenientes de pacientes GBC y pacientes GST mediante citometría de flujo. _____	67

<b>Figura Suplementaria 4:</b> Determinación del efecto de IFN- $\gamma$ en la expresión de MHC-I mediante citometría de flujo.	68
<b>Figura Suplementaria 5:</b> Caracterización de muestra control sano de PBMC basal y activado con anti-CD3/CD28.	69
<b>Figura Suplementaria 6:</b> Caracterización de la subpoblación TCD8 y la expresión de marcadores de activación (CD69 y CD137), marcadores de los immune checkpoint (PD-1, LAG3 y CTLA4) mediante citometría de flujo	70
<b>Figura Suplementaria 7:</b> Evaluación mediante citometría de flujo de linfocitos TCD8 en co-cultivo realizado en proporción 1:5 evaluados a las 24hrs y 48hrs.	71
<b>Figura Suplementaria 8:</b> Caracterización de la subpoblación TCD4, marcadores de activación CD69, CD137 y los immune checkpoint CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC de control, en presencia o no de inhibidores de PD-1 mediante citometría de flujo	73
<b>Figura Suplementaria 9:</b> Caracterización de la subpoblación TCD8, marcadores de activación CD69, CD137 y los immune checkpoint CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC de control, en presencia o no de inhibidores de PD-1 mediante citometría de flujo.	75
<b>Figura Suplementaria 10:</b> Caracterización de la subpoblación TCD4, marcadores de activación CD69, CD137 y los immune checkpoint CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC autólogo y alogénico, en presencia o no de inhibidores de PD-1 mediante citometría de flujo.	77
<b>Figura Suplementaria 11:</b> Caracterización de la subpoblación TCD8, marcadores de activación CD69, CD137 y los immune checkpoint CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC autólogo y alogénico, en presencia o no de inhibidores de PD-1 mediante citometría de flujo	78

## Lista De tablas

<b>Tabla 1:</b> Datos de anticuerpos utilizados en Inmunohistoquímica _____	24
<b>Tabla 2:</b> Listado de anticuerpos para caracterización mediante citometría de flujo _____	25
<b>Tabla 3:</b> Partidores utilizados en caracterización de organoides por qPCR _____	25
<b>Tabla 4:</b> Mix de anticuerpos para caracterización de linfocitos TCD4 y TCD8 _____	27
<b>Tabla 5:</b> Datos clinicopatológicos de los pacientes de los cuales se obtuvieron los organoides	30
<b>Tabla 6:</b> Resumen de las IHQ de CK19, KI76, P53 y PD-L1 de las muestras de 6 organoides y su tejido de origen. _____	32

<b>Tabla Suplementaria 1:</b> Mix T cell, lista de anticuerpos utilizados para evaluar linfocitos T en muestras de pacientes GBC y GST mediante citometría de flujo _____	63
<b>Tabla Suplementaria 2:</b> Mix T reguladores, lista de anticuerpos utilizados para evaluar linfocitos T en muestras de pacientes GBC y GST mediante citometría de flujo _____	64
<b>Tabla Suplementaria 3:</b> Mix de anticuerpos para evaluar organoides, todos corresponden a la marca Biolegend. _____	64
<b>Tabla Suplementaria 4:</b> Resultados de la tipificación de HLA-A y HLA-B en las muestras listadas _____	79

## Resumen

El cáncer de vesícula biliar (GBC) es una de las neoplasias más comunes y agresivas dentro del tracto biliar. Particularmente en nuestro país, el GBC se ha reportado como un problema de salud pública, especialmente en mujeres donde contribuye como la quinta causa de muerte por cáncer. Actualmente, el único tratamiento efectivo es la resección quirúrgica de la vesícula en estadios temprano. Sin embargo, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados, donde la única alternativa terapéutica es la quimioterapia con gemcitabina y cisplatino, la cual presenta muy baja respuesta. Es por esto, que la búsqueda de nuevos blancos de terapia y de modelos preclínicos que representen fielmente la respuesta a terapias ha cobrado gran interés en la investigación biomédica con enfoques en medicina personalizada. En los tumores de GBC se ha descrito la presencia de las células iniciadoras de tumor (TICs) o *cancer stem cells* (CSC), caracterizadas por la expresión doble positiva de los marcadores CD44 y CD133. Una de las características de las TICs, es la evasión de la respuesta inmune antitumoral, a través, de la expresión de los *immune checkpoint* (o puntos de control inmune) desencadenando la supresión de los linfocitos T citotóxicos, encargados de orquestrar la respuesta inmune antitumoral. En los últimos años, la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento del cáncer y actualmente se utiliza con resultados favorables en el tratamiento de diferentes tipos de tumores. Dentro de las inmunoterapias aprobadas por la FDA, se encuentran los inhibidores de los *immune checkpoint*, PD-L1/PD-1, CTLA4 y LAG-3. Inicialmente estas terapias fueron aprobados para su uso en melanoma, pero en la actualidad los dos primeros se utilizan en variados tipos de cáncer incluido el gástrico. Por lo tanto, para el análisis de la respuesta y predicción a estas nuevas inmunoterapias se requiere de nuevos modelos *in vitro* de cáncer, que sean capaces de recapitular la interacción de las células del cáncer con el componente inmune. Dentro de estos modelos, se propone el uso de los cultivos 3D de organoides tumorales derivados de pacientes (PDOs) como una poderosa herramienta que imita las características histológicas, genéticas y fisiopatológicas del tumor del cual derivan. Sin embargo, el principal desafío es enriquecer este modelo de PDOs tumorales con células del componente inmune para poder estudiar la respuesta de los pacientes a la inmunoterapia. Actualmente, el uso de co-cultivo entre organoides y células inmunes, se ha utilizado para generar linfocitos TCD8 reactivos y evaluar la capacidad citotóxica TCD8 en contra de las células tumorales. Tomando todo esto en consideración, el presente proyecto de tesis tuvo como hipótesis: “La interacción directa entre organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar y células inmunes, permite evaluar la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T y el efecto de inhibidores de PD-1”. Para responder esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos: **1.- Caracterizar la expresión de los co-receptores de los *immune checkpoint* PD-L1, CD80, CD86 y MHC-II en las células epiteliales tipo *cancer stem cells* en los organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar.** Para la caracterización se evaluarán 6 muestras de organoides derivados de pacientes con GBC a las cuales se les analizó su histología y todas fueron capaces de recapitular la morfología del tumor del cual derivan. Además, se les realizó extracción de RNA y posteriormente se evaluó por qPCR la expresión de transcritos CD44, CD133, MHC-I, MHC-II, IL-6 e IL-8. Dentro de los principales resultados encontramos que la expresión de transcritos presenta variabilidad entre las muestras y particularmente MHC-I presentó alta expresión en todas las muestras evaluadas. Adicionalmente, se realizó citometría de flujo de los organoides donde se determinó la población

CSC CD44+/CD133+ y a partir de esta población se analizó el porcentaje positivo para MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 y PD-L1. Los resultados muestran que el porcentaje de CSC CD44+/CD133+ en las muestras de organoides fluctúa entre 15% a 50%. Además, esta subpoblación CD44+/CD133+ expresó la molécula MHC-I y los correceptores de los *immune checkpoint* CD80, CD86, MHC-II y PD-L1 en diferentes porcentajes. Destacando la expresión de PD-L1 en esta subpoblación con un porcentaje promedio mayor al 20% en todas las muestras analizadas.

**2.- Evaluar la respuesta de linfocitos T provenientes de sangre periférica al interactuar directamente (co-cultivo) con organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar.** Dentro de este objetivo logramos la estandarización de co-cultivo de organoides derivados de pacientes GBC y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provenientes de controles sanos, evaluando la activación de los TCD8 y la expresión de los *immune checkpoint*. Dentro de los principales resultados se observó que bajo condición de co-cultivo con organoides, los linfocitos TCD8 responden frente a la presencia de los organoides con aumento de la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD137. Siendo esta respuesta variable entre los diferentes organoides derivados de pacientes. En cuanto a los *immune checkpoint* se observó una disminución en el porcentaje de expresión de PD-1 y LAG3 en organoides en co-cultivo respecto al PBMC control, observándose una respuesta específica para cada organoide derivado de paciente analizado.

**3.- Evaluar el efecto de la inhibición de *immune checkpoint* PD-1, en el modelo de interacción de células inmunes con organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar.** A partir del co-cultivo de organoides y PBMC (objetivo 2), se evaluó la activación de los linfocitos T en presencia de los inhibidores de PD-1, Nivolumab y Pembrolizumab. Dentro de los principales resultados, se observó una respuesta diferenciada entre las muestras de los distintos organoides derivados de pacientes estudiados. Además, pudimos confirmar que ambos inhibidores lograron bloquear PD-1 en los linfocitos en todas las muestras analizadas.

Creemos que estos resultados son un gran aporte como un primer estudio de la interacción de organoides derivados de pacientes GBC con células inmunes, esto con la finalidad de estudiar la respuesta de activación antitumoral y de establecer una plataforma de co-cultivo organoide y PBMC que podría usarse para explorar la respuesta a inmunoterapias en GBC. Como perspectiva futura, se propone la importancia de estudiar más detalladamente el efecto citotóxico directo inducido por la interacción de los organoides con linfocitos en cada muestra de paciente. Este estudio siembra un precedente de que la interacción de organoides con células inmunes tiene potencial para medir el efecto antitumoral *in vitro* de inmunoterapias basadas en la inhibición de PD-1/PD-L1 en pacientes con GBC. Además, esta plataforma de interacción podría tener potencial a futuro como herramienta de ayuda clínica en la predicción de la respuesta *ex vivo* a las inmunoterapias en cáncer de vesícula biliar.

## Abstract

Gallbladder cancer (GBC) is one of the most common and aggressive neoplasms within the biliary tract. Particularly in our country, GBC has been reported as a public health problem, especially in women where it contributes as the fifth cause of death from cancer. Currently, the only effective treatment is surgical resection of the gallbladder in early stages. However, the majority of patients are diagnosed in advanced stages, where the only therapeutic alternative is chemotherapy with gemcitabine and cisplatin, which has a very low response. This is why the search for new therapy targets and preclinical models that faithfully represent the response to therapies has gained great interest in biomedical research with approaches in personalized medicine. In GBC tumors, the presence of tumor-initiating cells (TICs) or cancer stem cells (CSCs) has been described, characterized by the positive expression of the markers CD44 and CD133. One of the characteristics of TICs is the evasion of the antitumor immune response, through the expression of immune checkpoints, triggering the suppression of cytotoxic T lymphocytes, responsible for orchestrating the antitumor immune response. In recent years, immunotherapy has revolutionized cancer treatment and is currently used with favorable results in the treatment of different types of tumors. Among the immunotherapies approved by the FDA are the immune checkpoint inhibitors, PD-L1/PD-1, CTLA4 and LAG-3. Initially these therapies were approved for use in melanoma, but currently the anti-PD-1 and anti-CTLA4 are used in various types of cancer, including gastric cancer. Therefore, to analyze the response and prediction to these new immunotherapies, new *in vitro* cancer models are required, which are capable of recapitulating the interaction of cancer cells with the immune component. Within these models, the use of 3D cultures of patient-derived tumor organoids (PDOs) is proposed as a powerful tool that mimics the histological, genetic and pathophysiological characteristics of the tumor from which they are derived. However, the main challenge is to enrich this model of tumor PDOs with cells of the immune component in order to study the response of patients to immunotherapy. Currently, the use of co-culture between organoids and immune cells has been used to generate TCD8-reactive lymphocytes and evaluate the TCD8 cytotoxic capacity against tumor cells. Taking all this into consideration, the present thesis project had as its hypothesis: "The direct interaction between organoids derived from patients with gallbladder cancer and immune cells allows us to evaluate the antitumor response mediated by T lymphocytes and the effect of PD-1 inhibitors. To answer this hypothesis, the following objectives were proposed:

- 1.- Characterize the expression of the co-receptors of the immune checkpoint PD-L1, CD80, CD86 and MHC-II in epithelial cells type cancer stem cells in organoids derived from patients with gallbladder cancer. For characterization, 6 samples of organoids derived from patients with GBC were evaluated, their histology was analyzed, and all were able to recapitulate the morphology of the tumor from which they were derived. In addition, RNA extraction was performed and the expression of CD44, CD133, MHC-I, MHC-II, IL-6 and IL-8 transcripts was subsequently evaluated by qPCR. Among the main results we found that the expression of transcripts presents variability between the samples and particularly MHC-I presented high expression in all the samples evaluated. Additionally, flow cytometry was performed on the organoids where the CD44+/CD133+ CSC population was determined and from this population the percentage positive for MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 and PD-L1 was analyzed. The results show that the percentage of CD44+/CD133+ CSCs in the organoid samples ranges between 15% to

50%. Furthermore, this CD44+/CD133+ subpopulation expressed the MHC-I molecule and the immune checkpoint coreceptors CD80, CD86, MHC-II and PD-L1 in different percentages. Highlighting the expression of PD-L1 in this subpopulation with an average percentage greater than 20% in all samples analyzed.

2.- Evaluate the response of T lymphocytes from peripheral blood when interacting directly (co-culture) with tumor organoids derived from patients with gallbladder cancer. Within this objective we achieved the standardization of co-culture of organoids derived from GBC patients and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy controls, evaluating the activation of TCD8 and the expression of immune checkpoints. Among the main results, it was observed that under the condition of co-culture with organoids, TCD8 lymphocytes respond to the presence of organoids with increased expression of the activation markers CD69 and CD137. This response being variable between the different organoids derived from patients. Regarding the immune checkpoint, a decrease was observed in the percentage of expression of PD-1 and LAG3 in organoids in co-culture compared to the control PBMC, observing a specific response for each patient-derived organoid analyzed.

3.- Evaluate the effect of the inhibition of immune checkpoint PD-1, in the interaction model of immune cells with organoids derived from patients with gallbladder cancer. From the co-culture of organoids and PBMC (objective 2), the activation of T lymphocytes was evaluated in the presence of the PD-1 inhibitors, Nivolumab or Pembrolizumab. Among the main results, a differentiated response was observed between the samples of the different organoids derived from patients studied. Furthermore, we were able to confirm that both inhibitors were able to block PD-1 in lymphocytes in all samples analyzed.

We believe that these results are a great contribution as a first study of the interaction of organoids derived from GBC patients with immune cells, with the aim of studying the antitumor activation response and establishing an organoid and PBMC co-culture platform that could be used to explore the response to immunotherapies in GBC. As a future perspective, the importance of studying in more detail the direct cytotoxic effect induced by the interaction of organoids with lymphocytes in each patient sample is proposed. This study sets a precedent that the interaction of organoids with immune cells has the potential to measure the in vitro antitumor effect of immunotherapies based on PD-1/PD-L1 inhibition in patients with GBC. Furthermore, this interaction platform could have future potential as a clinical aid tool in predicting the ex vivo response to immunotherapies in gallbladder cancer.

# Capítulo 1 Introducción

## 1.1 Cáncer de Vesícula Biliar

El cáncer de vesícula biliar (GBC por sus siglas en inglés) es una de la neoplasia más común dentro del tracto biliar, además corresponde al séptimo cáncer con mayor incidencia dentro de los cánceres gastrointestinales a nivel mundial. En el 2020 se estimó a nivel mundial 115.949 nuevos casos de GBC, donde se encontró a esta patología en el puesto 25 de los 36 cánceres estudiados alrededor de 185 países <sup>(1, 2)</sup>. La tasa de incidencia a nivel mundial se ha estimado en 1-2/100.000 habitantes <sup>(3)</sup> mientras que la tasa de mortalidad en 1,7/100.000 habitantes <sup>(4)</sup>. Sin embargo, estas estadísticas varían en algunos países, particularmente en Chile el GBC afecta a 12,8/100.000 mujeres y a 6,3/100.000 hombres <sup>(5)</sup>, con una tasa de mortalidad de 11/100.000 habitantes considerando las mujeres y de 7,6/100.000 habitantes considerando hombres <sup>(6)</sup>. De acuerdo con lo mencionado, el GBC se presenta como un problema relevante para la salud pública de Chile. Es por esto que, desde el año 2006 se ha implementado el plan de colecistectomía preventiva del cáncer de vesícula biliar en personas de 35 a 49 años en nuestro país, el cual tiene como objetivo principal extirpar la vesícula mediante colecistectomía en personas que presentaban cálculos en la vesícula <sup>(7, 8)</sup>. Sin embargo, a pesar de estas medidas, en la actualidad el GBC continúa dentro de los cánceres de mayor incidencia en pacientes chilenos, siendo el tercer cáncer de mayor incidencia en mujeres chilenas y el noveno en hombre. Además, corresponde a uno de los cánceres con mayor mortalidad en nuestro país, contribuyendo en mujeres chilenas como la quinta causa de muerte por cáncer <sup>(6)</sup>. Por lo tanto, el GBC sigue manteniéndose como un problema de salud en nuestro país, presentándose como los principales desafíos, el mejorar las estrategias de prevención, diagnóstico y la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

Se han reportado diferentes factores de riesgo asociados al desarrollo de GBC, dentro de los cuales encontramos el género, se ha descrito que las mujeres desarrollan GBC 2 a 6 veces más este cáncer que en los hombres; la edad avanzada, con edad promedio de diagnóstico de 67-72 años, predisposición genética, obesidad e infección con salmonella <sup>(9)</sup>. Adicionalmente también se ha descrito como factor de riesgo la etnicidad, por ejemplo, en Chile se ha reportado que pertenecer a la etnia mapuche aumenta 1,5 veces el riesgo de desarrollar GBC <sup>(10)</sup>. Sin embargo, uno de los principales factores de riesgo es la presencia de cálculos biliares, se ha reportado que su presencia aumenta el riesgo de desarrollar GBC entre un 21 a 57%. La presencia de cálculos se relaciona con un estado de inflamación persistente, lo cual favorece la proliferación celular para la renovación del epitelio e induce un daño crónico que favorece la acumulación de cambios morfológicos y genéticos que podrían desencadenar en cáncer <sup>(11)</sup>.

Dentro de los tratamientos para GBC se ha reportado que la resección quirúrgica de la vesícula biliar es el único tratamiento efectivo. Sin embargo, solo un 10% de los pacientes diagnosticados cumplen los requisitos para ser operado. La mayoría de los pacientes al momento del diagnóstico de GBC se encuentran en estados avanzados y/o con compromiso metastásico, y en esta etapa menos de un 10% de los pacientes presenta una supervivencia promedio de 5 años <sup>(12)</sup>. Para los pacientes en estadios avanzados, el tratamiento de primera línea es la quimioterapia

de gemcitabina con cisplatino, que ha demostrado mejorar la supervivencia promedio a 11,7 meses en pacientes con cánceres del tracto biliar avanzados comparado con el grupo tratado solo con gemcitabina, que presenta una supervivencia promedio de 8,2 meses <sup>(13, 14)</sup>. Sin embargo, se ha reportado en algunos pacientes con GBC avanzados, resistencia a los quimioterapias convencionales de gemcitabina, cisplatino, como también las quimioterapias basadas en 5-Fluoracilo (5-FU), oxaliplatino y capecitabina <sup>(15)</sup>. Adicionalmente, se ha reportado frecuente recurrencia de la enfermedad y baja respuesta a los tratamientos convencionales asociado al fenómeno de quimiorresistencia y alta agresividad propios de los pacientes con GBC <sup>(16) (17)</sup>. Particularmente, en GBC se han reportado diferentes mecanismos de resistencia a la quimioterapia convencional, dentro de los cuales encontramos procesos de autofagia, daño al DNA, daño en el ciclo celular, presencia de *células iniciadoras de tumor* (del inglés, TICs) o *cancer stem cells* resistentes a tratamientos, disfunción mitocondrial y cambios en el metabolismo <sup>(17)</sup>. Con estos antecedentes, postula la búsqueda de nuevos blancos de terapia y el desarrollo de modelos preclínicos para medicina personalizada son necesarios de forma urgente para poder ofrecer otras alternativas de tratamiento a estos pacientes y que se genere un impacto en la calidad de vida de estos pacientes <sup>(18)</sup>.

## 1.2 Cancer Stem cells

Dentro de las células presente en los tumores, encontramos una variedad de células, entre las cuales están las denominadas células iniciadoras de tumor (TICs) o *cancer stem cells* (CSC), las cuales presentan un rol relevante en los procesos de auto-renovación, metástasis, resistencia a los tratamientos convencionales y recurrencias tumorales <sup>(19, 20)</sup>. Inicialmente esta población celular fue descrita en leucemia mieloide aguda y posteriormente su presencia fue reportada y caracterizada en diferentes tumores sólidos <sup>(21, 22)</sup>. Dentro de la caracterización de las CSC se han descrito la expresión de diferentes marcadores de superficie dentro de los cuales se encuentran CD24, CD44, CD133, CD123, CD47, ALDH, CD34 y EpCAM, los cuales pueden variar de acuerdo al subtipo específico de tumor y dado la heterogeneidad celular presente en cada uno de ellos<sup>(23)</sup>. Dentro de los marcadores de superficie, los más frecuentes asociados al fenotipo CSC, son los marcadores CD44 y CD133 que han sido utilizados para aislar esta población celular y poder estudiar sus diferentes características como de auto-renovación y resistencia a terapias <sup>(24)</sup>. En el caso de CD44, es una molécula de adhesión, la cuál se ha descrito su participación en procesos tumorigénicos, como son la capacidad de auto-renovación, proliferación tumoral, resistencia a la apoptosis y procesos de metástasis <sup>(19)</sup>. En este contexto se ha estudiado en fase pre-clínica el uso de anti-CD44 como una opción terapéutica, el cual presentó alta efectividad en un modelo de leucemia <sup>(25)</sup>. Otra de las moléculas características es CD133 o también denominado Prominin-1, es una glicoproteína de membrana, con alta expresión en diferentes tumores malignos, incluyendo GBC <sup>(26)</sup>, la expresión de este marcador en las células tumorales se asocia con alta capacidad proliferativa y con patrones de resistencia a la quimio y radioterapia <sup>(27)</sup>.

En cáncer de vesícula biliar, se ha descrito y caracterizado la presencia de las células fenotipo CSC, con expresión doble positiva de los marcadores CD44 y CD133, esta subpoblación celular presentó características asociadas al fenotipo CSC, como de auto-renovación medida por la generación de esferoides en medio sin suero y con propiedades de resistencia a terapia con gemcitabina y 5-FU <sup>(28)</sup>. Además, la subpoblación doble positiva CD44/CD133 presenta aumento en la expresión de transportadores de droga ABCG, el cuál se ha asociado previamente a resistencia a terapias, también se observó la capacidad tumorigénica de las células doble positivas en ensayos en animales, en la cual se inyectó la subpoblación fenotipo CSC y esta fue capaz de generar un tumor y metástasis <sup>(28)</sup>.

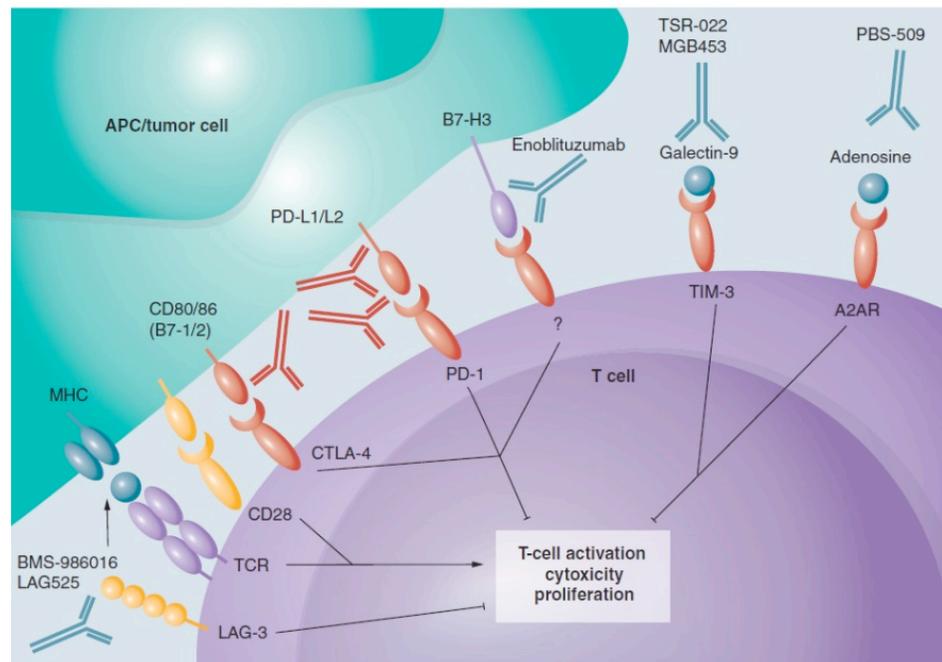
### 1.3 Sistema Inmune y Cáncer

Dentro del tumor se ha reportado la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs por sus siglas en inglés), los cuales corresponde a poblaciones de linfocitos T o B presentes en el tejido tumoral. La presencia de estos se relaciona con la respuesta inmune en contra del tumor, lo que genera un proceso de reclutamiento de estas células con la intención de responder frente a las células cancerígenas. Para desencadenar esta respuesta inmune, se necesita de una interacción, activación y co-estimulación de los linfocitos T de tipo CD4 (TCD4), CD8 (TCD8) y de linfocitos B <sup>(29)</sup>. Los linfocitos TCD4 son los responsables de activar a otras células inmunes y los linfocitos TCD8 son los encargados de reconocer y eliminar las células tumorales. Los linfocitos TCD8 se relacionan directamente con la respuesta antitumoral, estas células son activadas mediante el receptor de células T (TCR) que se une al antígeno presente en el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) presente en las células presentadoras de antígeno o células tumorales <sup>(30)</sup>, consecuentemente las células comienzan a proliferar y liberar citoquinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) <sup>(31)</sup> u otras con potencial citotóxico como granzimas y perforinas desencadenando la lisis de las células tumorales <sup>(32)</sup>,

Dentro de los estudios que han caracterizado las poblaciones de TILs, se ha descrito una relación entre la infiltración de linfocitos TCD8 y un pronóstico favorable en diferentes tipos de cáncer, dentro de los cuales se ha reportado el de ovario <sup>(33)</sup>, colorrectal <sup>(34)</sup>, mama, pancreático y tracto biliar <sup>(35)</sup>. Específicamente, las proteasas como granzimas y perforinas secretadas por estos linfocitos citotóxicos, favorecen la eliminación de las células tumorales por inducción de apoptosis y lisis celular, particularmente, la alta expresión de estas de estas proteasas ha sido asociadas con un pronóstico favorable <sup>(32)</sup>. En tumor pancreáticos se ha descrito específicamente, una relación entre infiltración tumoral de linfocitos T y una mayor supervivencia promedio de los pacientes. En específico, se ha reportado una asociación entre una mayor infiltración de linfocitos TCD8 y una baja expresión de PD-L1 en células tumorales en una cohorte de pacientes, asociándose ambas variables con mayor supervivencia de los pacientes <sup>(36)</sup>. En cáncer del tracto biliar también se ha descrito la infiltración de células inmunes en los tumores, dentro de los cuales se describe la presencia de linfocitos B, linfocitos citotóxicos TCD8, linfocitos T CD4 (efectores y reguladores), células NK, macrófagos asociados a tumor y neutrófilos asociados a tumor <sup>(37)</sup>. Adicionalmente, se ha reportado que en GBC la presencia de los TILs presenta un valor predictivo positivo en la supervivencia de los pacientes <sup>(35, 38)</sup>.

## 1.4 Mecanismos de evasión inmune

El tumor es capaz de desarrollar mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral mediante la supresión de los linfocitos efectores. Dentro de los principales mecanismos asociados a esta evasión se han descrito tres: uno estaría mediado por la expansión de linfocitos T reguladores (Treg) en el microambiente tumoral, otro por la secreción de citoquinas inhibitorias y el último por la expresión de moléculas denominadas *immune checkpoint* (puntos de control inmunitarios). En los últimos años, uno de los mecanismos de supresión que ha cobrado relevancia en el estudio del cáncer, son los denominados *immune checkpoint*. Estos corresponden a vías de señalización que modulan la respuesta inmune y se ha descrito que regulan principalmente la función de los linfocitos T en el microambiente tumoral<sup>(39, 40)</sup>. Se han reportado diferentes *immune checkpoint* como se detalla en la **Figura 1**, y los receptores correspondientes presente en las células tumorales y la existencia de inhibidores de algunos de estos *immune checkpoint*<sup>(41)</sup>. Dentro de las moléculas más estudiados, encontramos el ligando de muerte programada (PD-L1) que interactúa con su receptor la proteína de muerte programada (PD-1) y la proteína asociada a linfocito T citotóxico (CTLA-4) que interactúa con su receptor (CD80 o CD86), al interactuar los *immune checkpoint* con sus correceptores, se genera supresión del linfocito T, por lo tanto, evasión de la respuesta inmune antitumoral. Actualmente, para ambos *immune checkpoint* existen anticuerpos inhibitorios desarrollados y aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso como inmunoterapia para algunos tipos de tumores sólidos como cáncer colorrectal, urotelial, carcinoma hepatocelular y cáncer gástrico<sup>(42)</sup>.



**Figura 1:** Representación de los *immune checkpoint* y sus correceptores reportado por Hahn y colaboradores<sup>(41)</sup>.

Adicionalmente, estos mecanismos de evasión se han asociado con la presencia de las denominadas células iniciadoras de cáncer (TICs) o *cancer stem cells* (CSC). En líneas celulares de cáncer de mama (BCCs) se ha descrito que las células cancerígenas fenotipo CSC positivas al marcador CD44, son capaces de secretar altos niveles de IL-8, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), mecanismo por el cual se estaría inhibiendo la respuesta inmune antitumoral y evitando la proliferación de linfocitos T-helper (Th) <sup>(43)</sup>. En cáncer de páncreas se ha descrito la presencia de células fenotipo CSC CD44+/CD133+, en los pacientes estudiados, la presencia de estas células presentó una correlación positiva con la expresión de PD-L1, específicamente, esta correlación positiva se relacionó con un peor pronóstico para los pacientes con cáncer de páncreas <sup>(36)</sup>. Adicionalmente, se ha reportado la expresión de PD-L1 en la subpoblación de células fenotipo CSC en tumores de glioblastoma <sup>(44)</sup>, mama <sup>(45)</sup> y colón <sup>(46)</sup> los cuales podrían relacionarse a mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral.

Otro de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune descrita en tumores esta mediada por un incremento en la subpoblación de linfocitos Treg en el microambiente del tumor. Los Treg son los encargados de regular la respuesta inmune, por tanto, su presencia a nivel tumoral se relaciona a un control de la respuesta antitumoral mediada por los linfocitos TCD4 y TCD8. Además, se ha asociado la presencia de Treg en el microambiente tumoral, con un mal pronóstico en diferentes tipos de tumores solidos <sup>(31)</sup> y la disminución en el tumor de la presencia de Treg se ha asociado con mejor respuesta al tratamiento con anti-CTLA4 <sup>(47)</sup>.

## 1.5 Inmunoterapias

Las inmunoterapias han revolucionado el tratamiento el cáncer en los últimos años. Estas terapias se han desarrollado con el objetivo de modificar el sistema inmune y reestablecer la respuesta antitumoral <sup>(48)</sup>. Dentro de ellas podemos encontrar los bloqueadores o inhibidores de los *immune checkpoint*, las vacunas celulares contra el tumor y la terapia celular adoptiva <sup>(31)</sup>. Específicamente, se han reportado el desarrollo de diferentes inmunoterapias para el tratamiento del cáncer, dentro de las cuales encontramos, las vacunas de células dendríticas, inhibidores de *immune checkpoint*, terapia de células T con receptores quiméricos de antígenos (CAR-T) y células NK, las cuales tienen como objetivo principal reestablecer la respuesta inmune antitumoral de forma eficaz y enfocarse en la erradicación de las denominadas CSC <sup>(19)</sup>.

Dentro de las inmunoterapias utilizadas actualmente, las terapias en base al uso de los inhibidores de los *immune checkpoint* son los más reportadas en el último tiempo. En el caso de CTLA4 existe un anticuerpo monoclonal denominado Ipilimumab aprobado por la FDA en el 2011 para el tratamiento de melanoma metastásico, con resultados positivos en la respuesta clínica de los pacientes, mejorando la supervivencia promedio de los pacientes que fueron tratados con Ipilimumab como primera o segunda línea de tratamiento <sup>(49, 50)</sup>. Adicionalmente, los inhibidores PD-1 fueron aprobados por la FDA en el 2014, dentro de los cuales encontramos a Nivolumab, un anticuerpo monoclonal que se une al receptor PD-1 reestableciendo la respuesta inmune mediada por linfocitos T en contra del tumor <sup>(51)</sup> y presentando eficacia clínica en cáncer hepatocelular <sup>(52)</sup> y Pembrolizumab, otro anticuerpo monoclonal que se une a PD-1 y que ha

reportado presentar una actividad antitumoral especialmente en tumores que presentan un aumento en la expresión de PD-L1 <sup>(53)</sup>. Los inhibidores del *immune checkpoint* PD-1, tanto Nivolumab como Pembrolizumab, logran inhibir la interacción de PD-1/PD-L1, lo que potencia la actividad de las células T citotóxicas contra las células tumorales <sup>(54)</sup>. Recientemente, se ha reportado inhibidores del *immune checkpoint* LAG3, los cuales se encuentra en estudios clínicos de fase I y II, que permiten evaluar la seguridad de su uso en humanos <sup>(55)</sup>

En este contexto la búsqueda de biomarcadores para el uso de inmunoterapias en cáncer es un uno de los desafíos pendientes a explorar para fomentar su uso en terapia dirigida. En este sentido se ha reportado como posible marcador de susceptibilidad a las inmunoterapias basadas en inhibidores de *immune checkpoint*, la alta expresión de PD-L1 <sup>(56)</sup>. Además, se ha descrito la expresión de PD-L1 como un posible biomarcador específico para terapias anti-PD-1. Estudio de expresión de PD-L1 en 4 pacientes con melanoma, mostró que todos los pacientes expresaban PD-L1 y fueron tratados con Pembrolizumab, presentado resultados clínicos favorables de respuesta al tratamiento <sup>(57)</sup>. Adicionalmente, se ha reportado que pacientes con baja expresión de PD-L1 igualmente responden a inmunoterapias basadas en inhibidores del *immune checkpoint* PD-L1/PD-1. Por lo tanto, la caracterización de esta molécula y la búsqueda de otros nuevos biomarcadores o modelos que permitan predecir la respuesta a estas terapias continúa siendo un desafío.

En este contexto se han reportado diferentes estudios clínicos en cáncer del tracto biliar (BTC, por sus siglas en inglés), utilizando bloqueadores de los *immune checkpoint* como Pembrolizumab, dentro de los que se encuentra el estudio KEYNOTE-158 donde se observó que la expresión de PD-L1 no presentó un efecto significativo cuando se evaluó respuesta frente a la sobrevida libre de enfermedad. Esto podría ser debido a que el estudio se consideró a todos los pacientes BTC, con expresión positiva y negativa de PD-L1 y en ambos grupos se obtuvo una respuesta parcial al tratamiento con Pembrolizumab <sup>(58)</sup>. Adicionalmente, se ha reportado el uso de vacunas contra células tumorales en BTC, utilizando el gen supresor tumor de Wilms (WT1) y Mucina-1 (MUC1) como fuente de antígenos. La relevancia del uso de estas proteínas es en base a que WT1 esta mutado en un 80% de los BTC, mientras que MUC1 se encuentra sobreexpresado en un 90% <sup>(58)</sup> de los casos. Estos avances en vacunas resaltan la relevancia y diversidad de las inmunoterapias desarrolladas en el último tiempo.

Dentro del cáncer de vesícula biliar son pocos los antecedentes del uso de inmunoterapia, pero actualmente se encuentran en desarrollo diferentes estudios clínicos donde evalúan el uso de inmunoterapias en cáncer del tracto biliar avanzado. En estos estudios, preliminarmente se ha reportado que los pacientes responden favorablemente a los inhibidores de *immune checkpoint* en monoterapia tanto para anti-PD-L1, anti-PD-1 o anti-CTLA4 <sup>(59)</sup>. Adicionalmente, se ha reportado el caso de un paciente con GBC avanzado donde se utilizó Nivolumab como cuarta línea de tratamiento en combinación con radioterapia con resultados positivos en el paciente <sup>(60)</sup> y otro reporte de caso, donde se utilizó Pembrolizumab como segunda línea de tratamiento en GBC con metástasis, logrando una remisión completa de la enfermedad, luego de 2 años de seguimiento del paciente sin observar recurrencias <sup>(53)</sup>.

## 1.6 Organoides derivados de pacientes: modelo representativo del tumor

En los últimos años se han desarrollado nuevos modelos para el estudio de los tumores, correspondientes a los cultivos tridimensionales, los cuales representarían de mejor forma la estructura morfológica y gradiente de nutrientes y gases presente en los tumores<sup>(61)</sup>. Dentro de estos cultivos 3D encontramos los organoides derivados de pacientes (PDOs). Los PDOs son cultivos 3D que se generan a partir de células *stem cells* derivadas de tejidos adultos, que son capaces de diferenciarse *in vitro* y mantienen una estructura 3D similar al epitelio de origen<sup>(62)</sup>. Este modelo es capaz de mantener las características histológicas de su tumor de origen, así como también la heterogeneidad genética y fenotípica<sup>(62)</sup>. El primer organoide de cáncer descrito fue en cáncer colorrectal por Sato et al, y presentaba las características histológicas y genéticas del tumor del que se originó<sup>(63)</sup>. Posteriormente, se reportaron organoides derivados de diferentes tipos de tumores de distintos órganos como tracto gastrointestinal, pulmón, hígado, ovario, páncreas y vesícula biliar<sup>(64)</sup>. El desarrollo de organoides derivados de pacientes con GBC se ha reportado por Yuan y colaboradores<sup>(18)</sup> donde ellos reportan la caracterización de 1 organoide derivado de paciente GBC, el cual lograron establecer y que fue representativo al tumor de origen en características morfológicas y genéticas<sup>(18)</sup>. Adicionalmente, se ha reportado por García y colaboradores<sup>(65)</sup>, un estudio donde se evaluó la vía Hippo-Yap 1 como marcador de pronóstico en GBC, donde reportan el uso de 4 organoides derivados de pacientes con GBC, como un modelo de respuesta a drogas gemcitabina y verteporfina con perfiles de respuesta específicos para cada organoide<sup>(65)</sup>.

Sin embargo, el modelo de PDOs presenta una desventaja, respecto a la ausencia de interacción con componentes del microambiente tumoral como el epitelio tumoral, factores del microambiente tumoral, fibroblastos y las células del sistema inmune<sup>(62)</sup>. Por esto, se destaca la relevancia de seguir explorando las interacciones de los organoides y componentes del sistema inmune, como un modelo relevante en la búsqueda de nuevos blancos de terapia, estudio de la inmuno-oncología y como una plataforma clínica de ayuda en la predicción de respuesta a la inmunoterapia<sup>(66)</sup>. Siguiendo esta línea, durante estos últimos años se ha propuesto imitar el microambiente tumoral en cultivo mediante la interacción de organoides con células inmunes autólogas o alogénicas. En el caso de los componentes inmunitarios autólogos, las células son aisladas del mismo paciente del cual se establecen los organoides tumorales y en el caso de las alogénicas las células inmunes derivan de una persona diferente al paciente del cual se realizó el organoide<sup>(67)</sup>. Dentro de los modelos de interacción, se ha reportado la generación de co-cultivo entre organoides y componentes del sistema inmune, como lo son células mononucleares de sangre periférica (del inglés *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC). Con este modelo se ha logrado describir que los organoides son capaces de interactuar con linfocitos T e inducen actividad citotóxica específica de los TCD8 en contra de las células tumorales<sup>(68, 69)</sup>. En colangiocarcinoma también se ha reportado la generación del modelo de co-cultivo de organoides con PBMC, con el objetivo de determinar la actividad citotóxica de TCD8 en contra de células tumorales, generando una prueba de concepto de la relevancia e impacto de la realización de co-cultivos entre organoides y células inmunes<sup>(70)</sup>. Sin embargo, en algunos casos no es posible conseguir una buena cantidad de células inmunes del mismo paciente, por lo tanto,

se propone el uso alternativo de células inmunes alogénicas. El uso de células alogénicas, presenta desventajas como la potencial incompatibilidad de HLA <sup>(71)</sup> y estas células no son viables para probar especificidad del antígeno tumoral. Sin embargo, en base a los resultados desarrollados por la empresa de medicina de precisión CrownBio (Países Bajos), se ha propuesto el uso de células alogénicas para evaluar terapias inmunes. Postulándose la generación de co-cultivo de organoides y PBMC provenientes de controles sanos como plataforma útil para evaluar la respuesta y destrucción de organoides tumorales por células T alogénicas y para evaluar el efecto de los inhibidores de *immune checkpoint* <sup>(67)</sup>.

El cáncer de vesícula biliar continúa siendo un problema de salud pública de nuestro país, por lo cual los principales desafíos en investigación se centran en la búsqueda de nuevos blancos o estrategias terapéuticas. Últimamente ha cobrado relevancia el estudio de la respuesta inmune antitumoral y los mecanismos de evasión que pueden desarrollar estos tumores, proyectando su uso como predictores de respuesta a inmunoterapia. En este contexto, el proyecto de tesis tiene como finalidad caracterizar la presencia de receptores de los *immunes checkpoint* en células de tipo *stem cells* CD44+/CD133+ en los organoides de GBC y desarrollar un modelo de co-cultivo de organoides derivados de pacientes GBC con células mononucleares de sangre periférica derivada de controles sanos, con la finalidad de estudiar la respuesta de los linfocitos T y expresión de los *immune checkpoint* PD-1, CTL4 y LAG3 y evaluar el efecto de los inhibidores de PD-1 Nivolumab y Pembrolizumab, que actualmente son terapias aprobadas por la FDA.

## Capítulo 2 Hipótesis y Objetivos

### 2.1 Hipótesis

“La interacción directa entre organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar y células inmunes, permite evaluar la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T y el efecto de inhibidores de PD-1”

### 2.2. Objetivo General

Establecer un modelo de interacción de organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar y células inmunes, que permita evaluar la respuesta de linfocitos T y el efecto de la inmunoterapia anti-PD-1.

### 2.3 Objetivos específicos

- 2.3.1 Caracterizar la expresión de los co-receptores de los *immune checkpoint* PD-L1, CD80, CD86 y MHC-II en las células epiteliales tipo cancer stem cells en los organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar
- 2.3.2 Evaluar la respuesta de linfocitos T provenientes de sangre periférica al interactuar directamente (co-cultivo) con organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar
- 2.3.3 Evaluar el efecto de la inhibición del *immune checkpoint* PD-1, en el modelo de interacción de células inmunes con organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar

## Capítulo 3 Metodología

### **3.1 Objetivo 1: Caracterizar la expresión de los co-receptores de los *immune checkpoint* PD-L1, CD80, CD86 y MHC-II en las células epiteliales tipo cancer stem cells en los organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar**

#### **3.1.1.- Establecimiento de organoides derivados de pacientes**

Los organoides fueron establecidos a partir de una muestra de tejido de cáncer de vesícula biliar localmente avanzado proveniente del Biobanco de Tejidos y Fluidos de la UC. Todos los pacientes reclutados firmaron consentimiento informado del Biobanco previo a la obtención de las muestras de tejido durante la cirugía. Además, para el desarrollo de este proyecto se contó con las aprobaciones por Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile (CEC-MedUC), Fondecyt 1171463, número de Folio ID N° 1600829038 y el específico del proyecto de tesis de Javiera Obreque, Folio ID 200326008. Además, se contó con la aprobación del Comité de Bioseguridad de laboratorio Folio ID 200326008. Las muestras frescas fueron almacenadas en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM/F12, Gibco) con 1X de penicilina estreptomina bajo refrigeración hasta la llegada al laboratorio. Una vez recepcionadas, las muestras de tejido de aproximadamente 0.5 mm<sup>2</sup> fueron lavadas 3 veces con Dulbecco's phosphate-buffered saline 1x (DPBS 1x, Life Technologies). Luego, el tejido fue disgregado en pequeños fragmentos y fueron incubados bajo agitación en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium/Advanced (DMEM/Advanced, Gibco) conteniendo 0,125 mg/mL de Colagenasa y 0,125 mg/mL de Dispasa a 37°C por 90 minutos. Posteriormente el homogenizado fue pasado a través de un filtro malla (cell strainer) de 70 µM (BD Biosciences) y centrifugado descartando el sobrenadante. El pellet celular obtenido fue embebido en Matrigel y medio de cultivo “vesícula tumoral” en proporción 1:1 y se sembró una gota de 50 µl como domo de matrigel en placa de 24 pocillos (Corning) previamente incubada a 37°C. El domo de matrigel fue incubado por 30 min en la estufa de cultivo para polimerizar y se le adicionó cuidadosamente a cada pocillo 500 µL de medio de cultivo “vesícula tumoral”. Finalmente, los cultivos fueron mantenidos en la estufa de cultivo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo “vesícula tumoral” fue IntestiCult Organoid Growth Medium (Stemcell), suplementado con los factores B27, N2 (Life Technologies), N-acetilcisteína (Sigma-Aldrich), nicotinamida y factores de crecimiento específicos para diferenciación de vesícula biliar, según se describe en García Et al<sup>36</sup>.

#### **3.1.2 Mantención de organoides**

Los organoides fueron cultivados en placa de 24 pocillos, revisados constantemente, se les realizó cambio de medio cada 72hrs. Una vez que los cultivos alcanzaron 70-80% de confluencia, fueron subcultivados, se tomaron los domos de Matrigel y se traspasaron a un microtubo de 1,5 mL, los organoides fueron lavados 2 veces con DPBS 1x, se obtuvo un pellet celular que fue diluido en una proporción de 1:3 para su expansión de acuerdo a la cantidad necesaria para la realización de los diferentes experimentos planteados en esta tesis. Todos los cultivos fueron mantenidos en medio de vesícula tumoral (detallado previamente) y en una condición de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.1.3 Caracterización por inmunohistoquímica

El domo de matrigel conteniendo los organoides en confluencia (aprox. 70%) fueron lavados 3 veces con DPBS 1X y fijados en paraformaldehído 4% (PFA 4% v/v). Luego el pellet celular fue traspasado a un microtubo de 1.5 mL y se realizó inclusión en parafina, de acuerdo a los protocolos establecidos en el Servicio de Inmunohistoquímica del Departamento de Anatomía Patológica UC. Una vez obtenida la inclusión en parafina del organoide y su respectivo tejido, se realizaron cortes de 2  $\mu\text{m}$  de las muestras para la realización de la tinción de hematoxilina eosina (H&E) e inmunohistoquímica (IHQ). Para la realización de la inmunohistoquímica, posterior a la recuperación antigénica de acuerdo al Buffer y temperatura sugeridas por el fabricante de cada anticuerpo, las láminas con las muestras fueron incubadas durante 15 min con peróxido de hidrogeno 3% v/v para bloquear la peroxidasa endógena. Luego las láminas se incubaron con los anticuerpos primarios CK-19, P53 (Cell signaling) y KI-67 (Dako) durante una hora bajo las condiciones recomendadas por el fabricante de cada anticuerpo (detalles de los anticuerpos se encuentran en la **Tabla 1**). Posteriormente, las láminas fueron lavadas 3 veces con DPBS 1x-Tween 0.1% e incubadas durante 15 min con anticuerpo secundario universal (anti-mouse y anti-rabbit) unido a un polímero Súper Picture HRP (Life Technologies). Finalmente, la detección del anticuerpo fue realizada con el sustrato DAB Substrate-Chromogen System (Dako) y se realizó una contra tinción de los tejidos con hematoxilina de Harris. Todas las incubaciones fueron realizadas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas al microscopio óptico por observación en ciego del Dr. Juan Carlos Roa (Patólogo), quien determinó el porcentaje de positividad e intensidad de cada proteína evaluada.

Anticuerpo	Clon	Dilución	Isotipo	Catalogo	Marca
<b>Keratin-19 (CK-19)</b>	D7F7W	1:100	Rabbit	13092	Cell signaling
<b>Ki-67</b>	MIB-1	RTU	Mouse	M7240	Dako
<b>P53</b>	DO-7	1:50	Mouse	48818	Cell Signaling

**Tabla 1:** Datos de anticuerpos utilizados en Inmunohistoquímica

### 3.1.4 Caracterización mediante citometría de flujo

Los organoides bajo una confluencia del 70-80% fueron incubados por 5 min a 37°C con TrypLE Express Enzyme (TrypLE, Gibco) para la obtención de una suspensión de células únicas, para ser analizadas en el citómetro. Posterior a la incubación, el TrypLE fue diluido mediante la adición de 500  $\mu\text{L}$  de una solución de DPBS 1x y Suero Fetal Bovino 2% (FBS, Biologicals) y las células fueron centrifugadas a 300 g por 5 min, descartando el sobrenadante. Luego los pellets de células fueron incubados en oscuridad con el mix de anticuerpos en buffer de tinción DPBS 1x/FBS 2% por 30 min a 4°C. Los anticuerpos utilizados y la dilución correspondiente se encuentran detallados en la **Tabla 2**. Posteriormente las muestras fueron lavadas con 1 mL de DPBS 1x/FBS 2% y centrifugadas a 300 g por 5 min a 4°C, descartando el sobrenadante. Finalmente, el pellet de células fue resuspendido en 200  $\mu\text{L}$  de DPBS 1x/FBS 2% y traspasado a tubos de citometría (BD, Biosciences). Las muestras fueron procesadas en el equipo Fortessa LX20 (BD, Biosciences) y el análisis fue realizado utilizando el software FlowJo. Se evaluaron las diferentes subpoblaciones celulares a partir de la subpoblación *cancer stem cell* (CSC) mediante la selección de las células doble positivas para CD44+/CD133+ presentes en cada organoide.

Anticuerpo	Fluoróforo	Dilución	Clon	Isotipo	Catalogo
CD44	FITC	1:100	BJ18	Mouse	338804
CD80	PE	1:100	2D10	Mouse	305208
CD86	PECY7	1:100	BU63	Mouse	374210
CD133	APC	1:100	Clon 7	Mouse	372806
MHC-II	APC-CY7	1:100	L243	Mouse	307618
MHC-I	BV510	1:100	W6/32	Mouse	311436
PD-L1	BV785	1:100	MIH3	Mouse	374508

**Tabla 2:** Listado de anticuerpos para caracterización mediante citometría de flujo, todos corresponden a anticuerpos Biologend.

### 3.1.5 Evaluación de la expresión de transcritos CD44, CD133, MHC-I, MHC-II, IL-6 e IL-8 mediante expresión relativa de mRNA por PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)

El RNA se extrajo a partir de los organoides cuando estos alcanzaron una confluencia aproximada de 80%. Para la extracción se utilizó el kit comercial All prep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue cuantificado por absorbancia en equipo Epoch (Biotek), utilizando la placa Tek3 (Biotek). A partir de 1 µg de RNA se realizó la síntesis de cDNA con el kit comercial AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). Posteriormente, se evaluó por qPCR la expresión de transcritos de las citoquinas IL-6, IL-8, TGF-β, IL-15 e IFN-γ, y las moléculas CD44, CD133, MHC-I y MHC-II utilizando el kit Agilent Brilliant II QPCR (Agilent) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. La amplificación se realizó en el equipo Cobas 4800 (Roche) utilizando el siguiente programa de ciclos y temperaturas: Fase de annealing de 10 min a 95°C, luego 40 ciclos de amplificación (95°C 10 seg; 58°C 45 seg; 72°C 15 seg), finalizando con la etapa de melting. Como genes de referencia o controles se utilizó TFPC2 y QARS. Además, todas las reacciones fueron realizadas en duplicado técnico. La lista de los partidores específicos diseñados para la amplificación de las moléculas anteriormente mencionadas se encuentra en la **Tabla 3** y los valores de expresión relativa se calcularon en base a  $2^{-\Delta CT}$ .

Gen	Forward	Reverse
<b>CD44</b>	GCTGGCCAAGTCTTCACAAA	TTCCAGAGTTACGCCCTTGA
<b>CD133</b>	GGAGTGCAGCTAACATGAGT	GGTTTCATCCATGCTGGACA
<b>MHC-I</b>	TGTGCTCCCTCCCAATCAT	AGTTACAGCTCAGTGCACCA
<b>MHC-II</b>	ACTGGTTCAGCAACTGCAGA	TAGGCAAAGGGGAGCACAAA
<b>IL-6</b>	GTC AGG GGT GGT TAT TGC AT	AGT GAG GAA CAA GCC AGA GC
<b>IL-8</b>	CACTGCGCCAACACAGAAATTA	ACTTCTCCACAACCTCTGCAC
<b>IL-15</b>	TGTCCAATCACGGATTGCAG	ACCAGGGGCATCCAATCTTT
<b>IFN-γ</b>	GCAATCTGAGCCAGTGCTTT	TTTGAAGCACCAGGCATGA
<b>TGF-β</b>	TATTCCTTTGCCCGGCATCA	ACTTCAACAGTGCCCAAGGT

**Tabla 3:** Partidores utilizados en caracterización de organoides por qPCR

## **3.2 Objetivo 2: Evaluar la respuesta de linfocitos T provenientes de sangre periférica al interactuar directamente (co-cultivo) con organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar**

### **3.2.1 Obtención de PBMC a partir de controles sanos**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de control sano fueron obtenidas a partir de una muestra de 40 mL de sangre obtenida mediante punción venosa utilizando vacutainer con Heparina (BD Biosciences). La muestra fue diluida en proporción 1:1 con DPBS 1x, para luego ser traspasada lentamente con una pipeta serológica de 15 mL a un tubo cónico de 50 mL al cual previamente se le adicionó 15 mL de Ficoll-Paque Premium 1.073 (GE Healthcare). Los tubos fueron centrifugados a 1000 g por 25 min a temperatura ambiente (sin freno en la aceleración y desaceleración) obteniéndose una interfase enriquecida con las células mononucleares. Posteriormente, estas células fueron recuperadas de la interfase con una pipeta serológica y traspasadas a un nuevo tubo cónico de 50 mL y fueron tratadas con buffer de lisis amoníaco-cloruro-potasio (ACK, Life Technologies) para la eliminación de los glóbulos rojos remanentes. Luego se realizó un lavado con DPBS 1x y el pellet celular fue suspendido en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPIM-1640, Gibco) suplementado con 10% FBS, penicilina/estreptomicina 1x (Life technologies) y 200 UI/mL de interleuquina-2 (IL-2, Peprotech). El número de células inmunes fue cuantificado con azul de Trypan (Life technologies) en una cámara de Neubauer. Luego, se sembraron 200.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillo en condición basal (sin activación) y activada. Para la condición de activación, los pocillos fueron previamente tratados con 50 µL de anti-CD3 y anti-CD28 (5 µg/mL) en DPBS1x por 4 hrs a 37°C y lavado con DPBS1X. Las células en condición basal y de activación fueron mantenidas por 72hrs previas al co-cultivo a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos de la caracterización de co-cultivo con PBMC basal y activado se encuentran en **información suplementaria**.

### **3.2.2 Evaluación de la activación y expresión de *immune checkpoint* en linfocitos TCD4 y TCD8**

Para evaluar la activación y la expresión de *immune checkpoint*, se trabajó con los PBMC en condición basal y activados de acuerdo al punto **3.2.1**. Estos PBMC fueron recuperados en un microtubo de 1.5 mL y centrifugados a 300 g por 5 minutos a 4°C. Luego el pellet obtenido se incubó con 1mL de DPBS/FBS2% por 20 min a 4°C y posteriormente con el reactivo Zombie-UV (Biolegend) en una dilución de 1:1000 en DPBS 1X e incubados por 20 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionó 1 mL de DPSB-FBS2% y se centrifugaron las células a 300 g por 5 min. Al pellet celular obtenido se le adicionó 100 µL del mix de anticuerpos de linfocitos T (TCD4 y TCD8), detallados en la **Tabla 4**. Las células fueron incubadas con los anticuerpos por 30 min a 4°C, posteriormente se adicionó 1 mL de DPBS-FBS 2% y se centrifugaron a 300 g por 5 min a 4°C. Finalmente el pellet celular obtenido fue resuspendido en 200 µL de DPBS-FBS 2% y traspasado a tubos de citometría (BD Biosciences). Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo Fortessa LX-20 (BD Biosciences).

Anticuerpo	Fluoroforo	Clon	Dilución	Isotipo	Catalogo
CD3	FITC	OKT3	1:100	Mouse	344804
CD4	APC	OKT4	1:100	Mouse	317416
CD8	APC-Cy7	RPA-T8	1:100	Mouse	301016
CD69	PeCy7	FN50	1:100	Mouse	310912
CD137	PE	S18012C	1:100	Mouse	300804
PD-1	BV421	EH12.2H7	1:100	Mouse	329920
LAG3	BV510	11C3C65	1:100	Mouse	369318
CTLA4	BV786	BNI3	1:100	Mouse	369624

**Tabla 4:** Mix de anticuerpos para caracterización de linfocitos TCD4 y TCD8, todos los anticuerpos son marca Biolegend

### 3.2.3- Establecimiento del co-cultivo de organoides con PBMC

El protocolo de co-cultivo fue estandarizado de acuerdo con lo descrito previamente por Cattaneo et al<sup>31</sup> con algunas modificaciones de acuerdo a los objetivos de esta tesis. Los organoides con una confluencia cercana al 80% fueron tratados por 24 hrs con 200 ng/mL de IFN- $\gamma$  en medio vesícula tumoral y se preparó un control sin tratamiento (ST). Transcurridas 24 hrs de tratamiento se determinó el efecto de IFN- $\gamma$  en la subpoblación celular presente en el organoide, mediante evaluación de la expresión de los marcadores CD44, CD133 y MHC-I por citometría de flujo de acuerdo con el protocolo descrito en el **Punto 3.1.4**.

El co-cultivo se realizó con los PBMC obtenidos y activados como se describió previamente (**Punto 3.2.2**). El día del co-cultivo, los organoides fueron tratados con TrypLE por 5 min a 37°C para la obtención de células únicas y contadas en cámara de Neubauer. Posteriormente se adicionaron las células de organoides a los PBMC previamente cultivados en la placa de 96 pocillos. Dentro de la estandarización inicial se evaluó la proporción de 1:5 (1 organoide por cada 5 células de PBMC) y la proporción 1:10 (1 organoides por cada 10 células de PBMC). Adicionalmente se evaluó la influencia del tiempo de co-cultivo, realizando análisis a las 24, 48 y 72 hrs y se utilizó un porcentaje de Matrigel del 2%, basados en trabajos previos desarrollados en el laboratorio <sup>(65)</sup>. De acuerdo a los resultados de la estandarización (presentados en **información suplementaria**) se decidió realizar todos los experimentos de co-cultivo en una proporción de organoides/ células inmunes de 1:5, en Matrigel al 2% y mantenidos en cultivo por 72 hrs. Todos los co-cultivos fueron incubados a 37°C en estufa de cultivo a 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, el efecto en la población de linfocitos fue estudiado mediante citometría de flujo. Para esto se traspasaron todas las células del co-cultivo a un microtubo de 1.5 mL, se centrifugaron a 300 g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante del co-cultivo fue guardado a -80°C para posteriormente evaluar en este la secreción de citoquinas citotóxicas como perforina y granzima mediante ELISA.

Las células fueron preparadas para citometría como se menciona en el **Punto 3.2.2**, determinando la subpoblación de linfocitos TCD4 y TCD8. Además, se evaluó los marcadores de activación e *immune checkpoint* utilizando los anticuerpos listados en la **Tabla 4**.

### **3.3 Objetivo 3: Evaluar el efecto de la inhibición del *immune checkpoint* PD-1, en el modelo de interacción de células inmunes con organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar**

#### **3.3.1 Realización de Co-cultivo en presencia de inhibidores de PD-1 Nivolumab y Pembrolizumab.**

El co-cultivo se realizó con los PBMC obtenidos y activados como se describió previamente (**Punto 3.2.1**) las condiciones del co-cultivo utilizados para evaluar el efecto de los inhibidores fueron las previamente estandarizadas y descritas en el **Punto 3.2.3**, salvo que esta vez se utilizó medio de vesícula tumoral sin nicotinamida, acorde al protocolo de Zhou et al <sup>(70)</sup>. A los co-cultivos ya montados con PBMC basal y activado, y los organoides con las condiciones de ST y tratados con IFN- $\gamma$  se les adicionó los tratamientos con inhibidores correspondiente, Nivolumab se utilizó una concentración de 10 ng/mL <sup>(72)</sup> y Pembrolizumab a concentraciones de 15 ng/mL <sup>(73)</sup>. Cada inhibidor se evaluó de forma independiente y todos los cultivos fueron mantenidos por las 72 hrs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Terminado el tiempo de co-cultivo se evaluó la subpoblación de linfocitos TCD4 y TCD8 con los respectivos marcadores de activación (CD69 y CD137) y los *immune checkpoint* PD-1, CTLA4 y LAG3. Adicionalmente, el sobrenadante de los co-cultivos fue almacenado para evaluar la actividad citotóxica de los linfocitos TCD8 mediante la secreción de citoquinas por ELISA. Se realizó la citometría de flujo como se detalla en el **Punto 3.2.2** y utilizando los anticuerpos detallados en la **Tabla 4**.

## Capítulo 4 Resultados

### **4.1 Objetivo específico 1: Caracterizar la expresión de los co-receptores de los *immune checkpoint* PD-L1, CD80, CD86 y MHC-II en las células epiteliales tipo cancer stem cells en los organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar.**

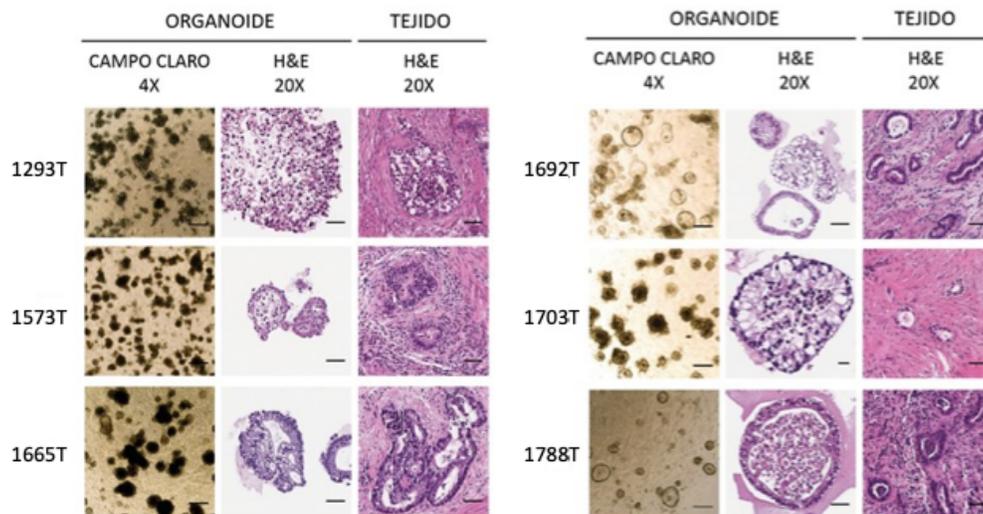
#### **4.1.1 Establecimiento y caracterización de histológica organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar avanzado**

Nuestro grupo de trabajo ha sido capaz de establecer un protocolo para la obtención, mantención, criopreservación y “*drug screening*” de organoides derivados de paciente con cáncer de vesícula biliar avanzado. El establecimiento se logró con una tasa de éxito cercana al 60% (6/10 muestras de adenocarcinoma). Para esta tesis se seleccionaron 6 muestras de organoides denominadas 1293T, 1573T, 1665T, 1692T, 1703T y 1788T. Los datos clinicopatológicos de las muestras utilizadas, se encuentra resumidos en la **Tabla 5**. Se observa que 4 de las muestras derivan de mujeres (4/6) y 2 de hombres (2/6), proporción representativa de los antecedentes de nuestro país, donde afecta más a mujeres que a hombres, el promedio de edad de los pacientes fue de 63,2 años y todas las muestras derivan de un adenocarcinoma localmente avanzado de tipo intestinal o tubular determinado por el diagnóstico histopatológico proveniente de las muestras tumorales recepcionadas por el Servicio de Anatomía Patológica.

Los organoides al igual que el tejido tumoral de origen fueron caracterizados histopatológicamente mediante tinción de H&E, pudiendo realizar una comparación en características morfológicas y de celularidad tumoral como se observa en la **Figura 2**. La tinción de H&E en los organoides y tejidos fue analizada de forma conjunta con el Dr. Juan Carlos Roa, co-tutor de esta tesis y patólogo con experiencia en cáncer de vesícula biliar. Los resultados observados demuestran que los organoides recapitulaban las características histopatológicas del tejido del cual derivan. Los organoides, presentaron claros aspectos neoplásicos como la desorganización estructural del epitelio y una pérdida en la relación núcleo/citoplasma, al igual que las encontradas en el epitelio tumoral de origen. De acuerdo a los resultados se logró establecer 6 cultivos de organoides tumorales de vesícula que presentan diferente morfología y características histológicas entre ellos, pero que son similares a los tejidos tumorales de los cuales derivan. Adicionalmente, hay que mencionar que la muestra 1293T es pobremente diferenciada, como se observa en la **Figura 2** tanto el tejido tumoral como el organoide derivado, ambos presentan células tumorales con citoplasma claro y vacuolado. En las muestras 1573T, 1665T y 1692T se observó morfologías heterogéneas de crecimiento sólido y glandular presentes tanto en los organoides como en el tejido de origen. Adicionalmente en la muestra 1573T en organoide y tejido tumoral presentó organización cribiforme, es decir, células tumorales formando estructuras de tipo tubular con lumen carente de estroma. Las muestras 1703T y 1788T correspondientes a tumores moderadamente diferenciados presentaron estructuras epiteliales de morfología glandular con presencia de células necróticas en el lumen tanto para los organoides como el tejido tumoral del cual derivaron.

Muestra	Edad	Sexo	Localización	Diagnostico histológico
<b>1293T</b>	60	Mujer	Vesícula biliar completa y ducto biliar	Adenocarcinoma tubular Pobrememente diferenciado
<b>1573T</b>	65	Hombre	Cuerpo y fondo de vesícula biliar	Adenocarcinoma tubular pobrememente diferenciado
<b>1665T</b>	52	Mujer	Cuello, bacinete y cuerpo de la vesícula biliar y ducto cístico	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado
<b>1692T</b>	64	Mujer	Cuello y bacinete de la vesícula biliar	Adenocarcinoma tubular-papilar moderadamente diferenciado
<b>1703T</b>	72	hombre	Cuello, cuerpo y fondo de vesícula biliar	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado
<b>1788T</b>	66	Mujer	Vesícula biliar completa	Adenocarcinoma tubular moderadamente diferenciado

**Tabla 5:** Datos clinicopatológicos de los pacientes de los cuales se obtuvieron los organoides.

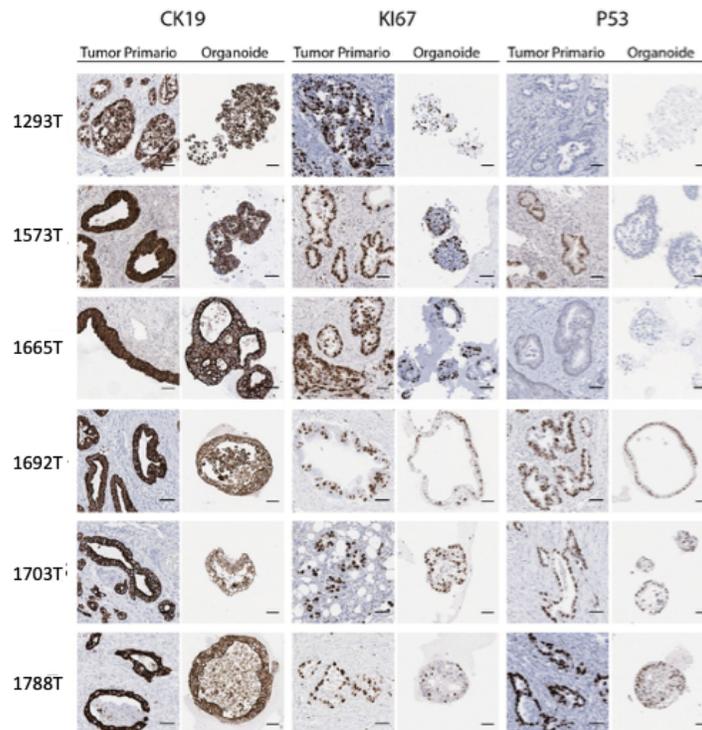


**Figura 2:** Caracterización de los organoides mediante tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E). Análisis histológico de las 6 muestras tumorales en campo claro (primera columna), la H&E del organoide (columna central) y su respectivo tejido (columna derecha). Donde se observa que los organoides recapitulan las características morfológicas de su tejido de origen. Muestras analizadas: 1293T, 1573T, 1665T, 1692T, 1703T y 1788T. Barra escala de 50µm.

Posteriormente para continuar con la caracterización histopatológica de los organoides y su tumor del cual derivaron se realizó análisis inmunohistoquímico. Donde se evaluó la expresión de proteínas de interés tales como, citoqueratina 19 (CK19), proteína del citoesqueleto que se expresa en epitelio, KI-67, proteína nuclear que permite evaluar la proliferación celular y P53, proteína supresora de tumores altamente mutada en tumores del tracto biliar. La **Tabla 6** muestra los resultados de la caracterización inmunohistoquímica de los 6 organoides con su respectivo tejido de origen expresados en porcentaje de células positivas e intensidad de la

tinción de cada marcador evaluado. Además, la **Figura 3** muestra imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica para cada uno de los marcadores, tanto en los organoides, como en su tejido tumoral de origen evaluado.

Se observa un 100% de células positiva para el marcador CK19 en la mayoría de las muestras. Además, esta proteína se expresó con intensidad +2 y +3 tanto en los organoides como en los tejidos de los cuales derivaron. Este resultado estaría confirmando la naturaleza epitelial de los organoides, asemejándose la expresión de este marcador a su respectivo tejido de origen. En cuanto a KI-67, se observó que las muestras de organoides presentaron un rango de células con núcleos positivos que varía entre un 25-80% comparado con el 70-80% de células positivas observada en los tejidos de origen. Si bien existen diferencias entre los organoides y el tejido tumoral las células epiteliales presentes, presentan porcentajes positivos lo que se relaciona con el estado de proliferación celular presente en tejido y organoides. En cuanto a la proteína P53 los organoides 1293T y 1665T son negativos para el marcador, lo que fue representativo a lo encontrado en el tejido tumoral de origen donde tampoco se observó expresión de la proteína. El organoide 1573T fue la única muestra que no conservó la expresión de la proteína P53 con respecto a su tejido de origen. Los organoides 1692T, 1703T y 1788T presentan porcentajes de células positivas e intensidad de la expresión en P53 similares a lo observado en el tejido de origen.



**Figura 3:** Caracterización de los marcadores CK19, KI67 y P53 por inmunohistoquímica de tejidos y organoides. En general, la expresión de cada proteína en el organoide se relaciona con lo presente en el tejido de origen. Muestras analizadas: 1293T, 1573T, 1665T, 1692T, 1703T y 1788T. Barra escala de 50 µm.

Muestra		CK19	KI67	P53
1293T (T1)	Tejido	80% 2+	80%	Negativo
	Organoide	100% 3+	50%	Negativo
1573T (T2)	Tejido	100% 3+	80%	60% 3+
	Organoide	100% 3+	40%	Negativo
1665T (T3)	Tejido	100% 3+	80%	Negativo
	Organoide	100% 2+	60%	Negativo
1692T (T4)	Tejido	100% 3+	50%	70% 2+
	Organoide	100% 3+	30%	80% 2+
1703T (T5)	Tejido	100% 3+	25%	80% 2+
	Organoide	100% 2+	80%	20% 1+
1788T (T6)	Tejido	100% 3+	80%	80% 3+
	Organoide	100% 3+	25%	70% 3+

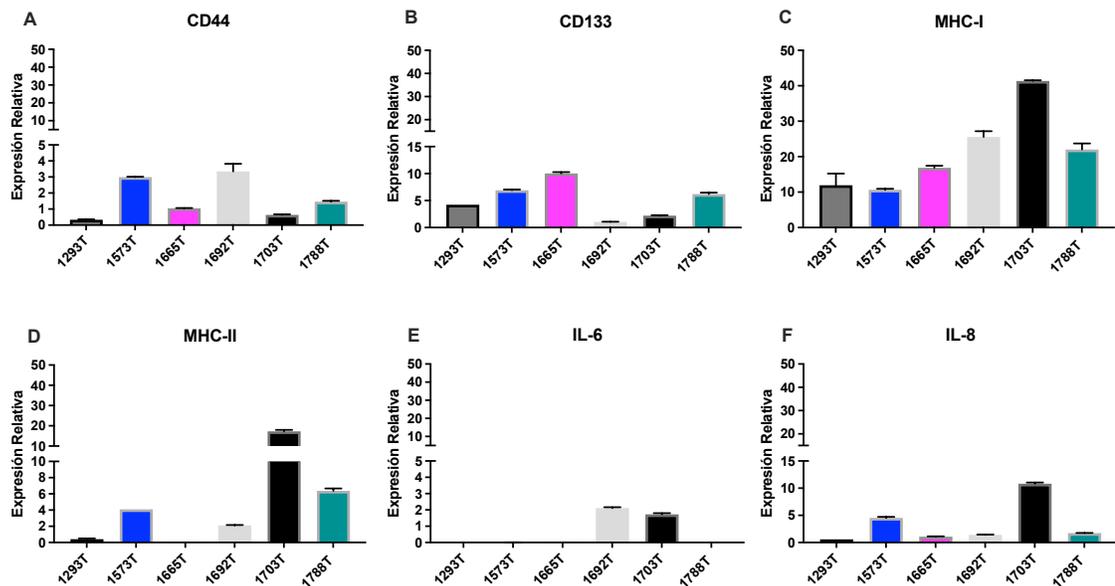
**Tabla 6:** Resumen de las IHQ de CK19, KI67, P53 y PD-L1 de las muestras de 6 organoides y su tejido de origen, evaluando celularidad y expresión positiva de cada molécula analizados histopatológicamente con el Dr. Juan Carlos Roa.

#### 4.1.2 Caracterización de organoides mediante la expresión de transcritos de CD44, CD133, MHC-I, MHC-II IL-6 e IL-8.

Continuando con la caracterización de los organoides, se evaluó la expresión de transcritos de las moléculas de superficie CD44, CD133, MHC-I y MHC-II, además de las citoquinas IL-6 e IL-8 en los 6 organoides, mediante PCR cuantitativo en tiempo real. En la **Figura 4** se observa la expresión relativa de todas las muestras evaluadas, las cuales fueron normalizadas con la expresión de los transcritos de genes de referencia QARS y TFCP2. En relación con los marcadores seleccionados para detección de fenotipo *cancer stem cells*, se observa en la **Figura 4-A** que CD44 presenta 3 veces más expresión de transcritos en las muestras 1573T y 1692T en comparación a sus respectivos genes de referencia. Las muestras 1293T y 1703T son las muestras que expresan menos transcritos de este marcador, observando menor expresión que los genes de referencia. Para el marcador CD133, se observa en la **Figura 4-B**, que todas las muestras expresan al menos 1 vez respecto a sus genes de referencia, la muestra 1665T es la que presentó mayor expresión de transcritos, con 10 veces más expresión de CD133 respecto a los genes de referencia. Las muestras 1573T y 1788T presentaron valores de 6 veces más de expresión de transcritos de CD133 y las muestras 1293T y 1703T presentó entre 2 a 5 veces la expresión de transcritos de CD133 respecto a los genes de referencia. Solo la muestra 1692T presentó valor de 1. Si se considera la expresión de CD44 y CD133 en conjunto, la muestra 1573T es la que presentó mayor expresión de ambos marcadores en conjunto, pero se debe considerar que todas las muestras presentaron expresión de transcritos para ambos marcadores.

En relación con la expresión de transcritos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) y Tipo II (MHC-II), en la **Figura 4-C** se observa que MHC-I presentó una alta expresión de transcritos en todas las muestras evaluadas, presentado valores cercanos a 10 para las muestras 1293T y 1573T y 40 veces más en la muestra 1703T de expresión de MHC-I en comparación al promedio de expresión de transcritos de los genes de referencia. Respecto a la molécula MHC-II, como se observa en la **Figura 4-D** la expresión de transcritos presentó una gran variabilidad entre las muestras de organoides, con una expresión relativa mayor a 10 en la muestra 1703T en comparación a sus genes de referencia y muy baja expresión en la muestra 1293T y 1665T con valores menores a 1.

Adicionalmente, se evaluaron los transcritos de las citoquinas IL-6 e IL-8, como se observa en la **Figura 4-E** en IL-6 la expresión de transcritos solo se observó en la muestra 1692T y 1703T en ambas con valores cercanos a 2 respecto a sus genes de referencia, en las muestras 1293T, 1573T, 1665T y 1788T no se observó expresión de transcritos mayores a los genes de referencia respectivos. Respecto a IL-8, como se observa en la **Figura 4-F**, la expresión de transcritos esta presente en todos los organoides evaluados respecto a sus genes de referencia. La muestra 1703T presentó una expresión 10 veces más comparada con los genes de referencia, y la muestra 1573T presentó expresión 5 veces más en comparación a sus genes de referencia, las otras muestras presentan valores cercanos a 1. Las moléculas IL-15, INF- $\gamma$  y TGF- $\beta$  fueron evaluados en las muestras, pero no se logró detectar amplificación de sus transcritos.



**Figura 4:** Caracterización de la expresión relativa de transcritos en comparación a los genes de referencia mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real en las muestras de organoides. Los resultados graficados corresponden a los valores de 1 experimento con 2 replicados técnicos. Como genes de referencia se utilizó QARS y TFPC2.

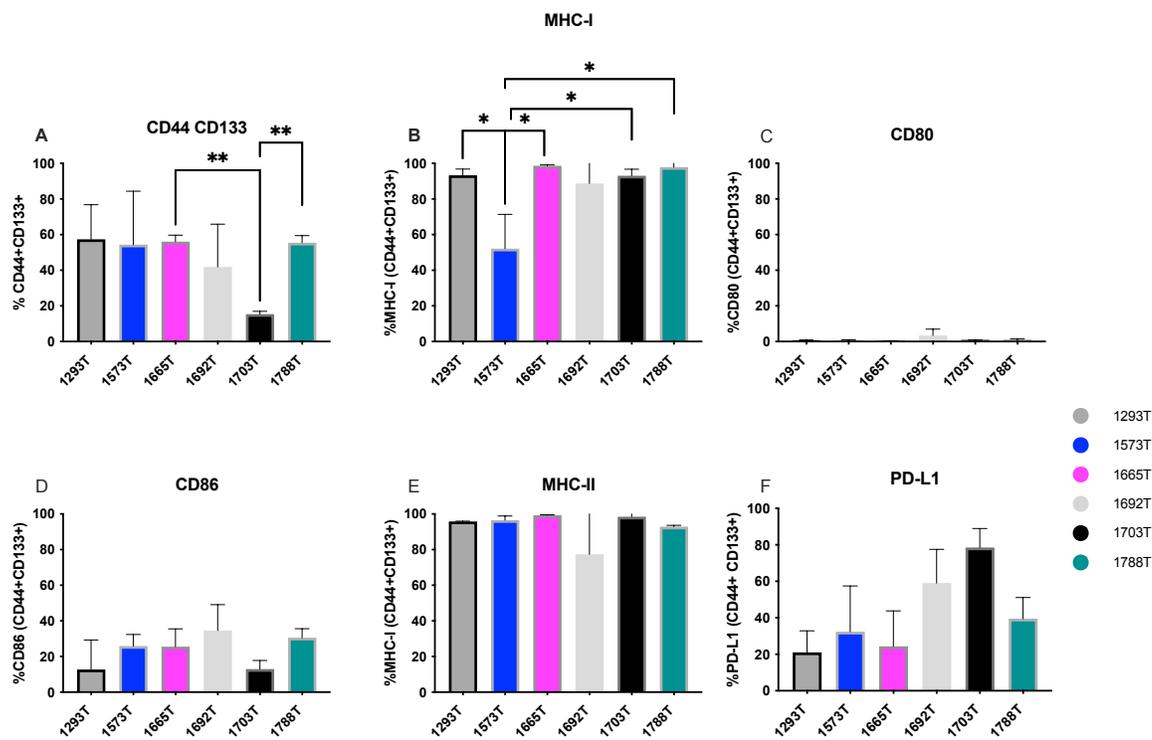
#### 4.1.3 Evaluación de células con fenotipo CSC, CD44+/CD133+ en organoides y expresión de correceptores MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 y PD-L1 en población CSC por citometría de flujo.

Se caracterizó la población de células doble positivas CD44/CD133 fenotipo CSC en las muestras de organoides 1293T, 1573T, 1665T, 1692T, 1703T y 1877T mediante citometría de flujo. Adicionalmente, en la población de células CD44+ y CD133+ (doble positivas o fenotipo CSC) se evaluó la expresión de la molécula MHC-I, la cual cumple un rol fundamental en la presentación de antígenos tumorales por parte de las de las células cancerígenas a células del sistema inmunes. En esta población también se determinó la expresión de los correceptores de la *immune checkpoint* MHC-II, CD80, CD86 y PD-L1.

Como se observa en la **Figura 5-A**, todos los organoides evaluados presentaron población doble positiva para los marcadores CD44+/CD133+. Particularmente, se observó que las muestras 1293T, 1573T, 1665T, 1692T y 1788T presentan porcentajes promedios cercanos al 50% de población CD44+/CD133+. La muestra de organoide 1703T presentó un porcentaje promedio de 15%, el cual fue significativamente menor al porcentaje promedio de las muestras 1665T y 1788T de la población CD44+/CD133+. Respecto a la molécula MHC-I, la cual es relevante en la presentación antigénica, los 6 organoides presentaron población positiva de esta molécula dentro de la población CD44+/CD133+, donde se observó que las muestras 1293T, 1665T, 1703T y 1788T expresan porcentajes sobre el 90% lo que fue significativamente mayor al porcentaje promedio de la muestra 1573T que tuvo porcentaje de 50% para esta molécula. A pesar de las diferencias obtenidas, todos los organoides evaluados presentan un porcentaje de las células fenotipo CSC que expresan MHC-I en la superficie y por tanto podrían participar en los procesos de presentación antigénica.

Como se mencionó anteriormente, se evaluó la expresión de las moléculas CD80, CD86, MHC-II y PD-L1 correspondiente a los correceptores de los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1. Dentro de los correceptores de CTLA4, correspondientes a CD80 y CD86 en la población doble positiva CD44/CD133, se observó que CD80 presentó baja o nula expresión de esta molécula en los organoides evaluados (**Figura 5-B**). Respecto a la molécula CD86, dentro de la población CSC los 6 organoides evaluados presentaron expresión del correceptor, las muestras 1293T y 1703T presentaron un promedio de 12% de la población positiva para CD86, mientras que la muestra 1692T, presentó un porcentaje promedio de un 35% de población positiva para CD86, siendo la muestra con el porcentaje más alto.

Para la molécula de MHC-II, correceptor de LAG3, se observó que las 6 muestras presentan porcentajes promedios sobre el 75% de células positivas para MHC-II en la población CSC como se observa en la **Figura 5-E**, no presentando diferencias significativas entre las muestras. Finalmente, se observó la expresión de PD-L1 que corresponde al correceptor de PD-1, los 6 organoides presentan población positiva de PD-L1 dentro de las células CD44+/CD133+, donde las muestras 1293T y 1665T presentaron menores porcentaje promedio, cercanos al 20% y la muestra 1703T presentó una población de 78% de células positivas de PD-L1 en la población CSC. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre las muestras evaluadas.



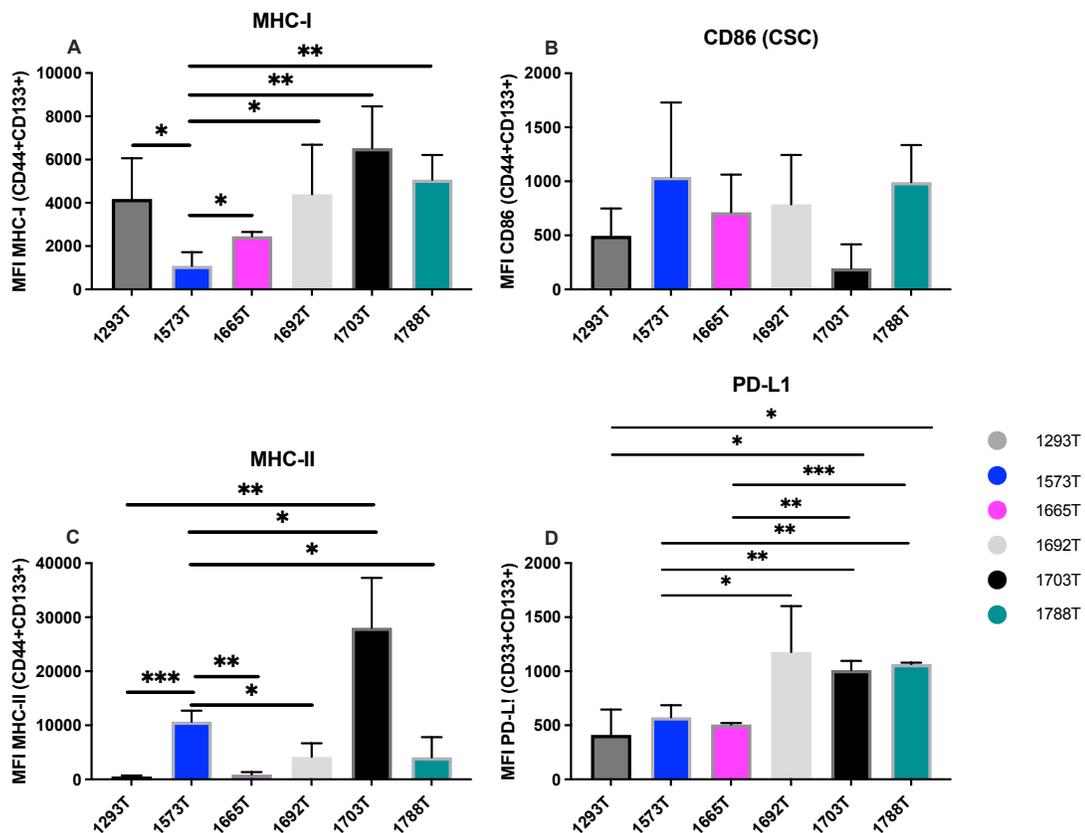
**Figura 5:** Caracterización de la expresión de marcadores de células fenotipo CSC CD44+/CD133+, mediante citometría de flujo en los organoides. A) Porcentajes CD44+/CD133+ en los organoides (B) porcentaje de MHC-I dentro de la subpoblación tipo CSC (C-F) porcentaje de expresión de los correceptores de *immune checkpoint* CD80, CD86, MHC-II y PD-L1. Las muestras de organoides se representan en diferentes colores y representa un n=2 para la muestra 1665T y 1788T y n=3 para las muestras 1293T, 1573T, 1692T y 1703T.

Dentro de la caracterización por citometría de flujo adicionalmente, se determinó la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los correceptores de los *immune checkpoint* CD80, CD86, MHC-II y PD-L1 y de la molécula MHC-I, para determinar si presentaban diferencias en su expresión dentro de las células CD44+/CD133+. Como se observa en la **Figura 6**, para los correceptores CD86, MHC-II y PD-L1 se observa que todos los organoides presentan MFI, pero con diferencias significativas entre las muestras. Cuando observamos MHC-I el patrón de MFI es similar al patrón que presenta en porcentaje celular, donde la muestra 1573T es la que presentó significativamente menor MFI comparado con las otras muestras (**Figura 6-A**).

Para la molécula CD86 se observa que la muestra 1703T es la única con un MFI menor a 500, las otras 5 muestras presentan valores sobre 500 con un máximo de cercano a 1000 de MFI para la muestra 1573T y 1788T, sin observar diferencias significativas entre las muestras evaluadas. Con respecto a MHC-II, se observó un patrón totalmente diferente entre el MFI y porcentaje de células, considerando que todos los organoides expresan un alto porcentaje de células positivas para el marcador celular (**Figura 5-E**), respecto al MFI se observa que la muestra 1703T presenta significativamente mayor MFI comparado con las muestras 1293T y 1573T como se observa en la **Figura 6-C**. Respecto a la muestra 1573T presentó MFI significativamente mayor comparado con la muestra 1293T, 1665T y 1692T y expresó MFI significativamente menor

respecto a las muestras 1703T y 1788T. Finalmente, para el correceptor PD-L1 se observó que todas las muestras presentaban MFI en un patrón similar al observado en la evaluación de porcentaje celular, sin embargo, en la evaluación de MFI se observaron diferencias significativas principalmente entre las muestras 1703T y 1788T al ser comparadas con las muestras 1293T, 1573T y 1665T como se observa en la **Figura 6-D**. El marcador CD80 no se encuentra representado debido a que su MFI era muy bajo o nulo.

Con los resultados presentados dentro del objetivo 1, se logró obtener una caracterización robusta de los organoides a nivel histológico donde se observó que recapitulan la morfología del tumor del cual derivan, a nivel de expresión de transcritos se logró caracterizar la expresión de moléculas relevantes con el fenotipo CSC como de citoquinas presentes en GBC. Además, también se logró la caracterización a nivel de expresión de proteínas mediante citometría de flujo donde se caracterizó la subpoblación celular CD44+/CD133+ y la expresión de marcadores de interés como MHC-I, MHC-II, CD80, CD86 y PD-L1.



**Figura 6:** Intensidad de fluorescencia media (MFI) de células fenotipo CSC CD44+/CD133+, mediante citometría de flujo en los organoides. A) MFI de MHC-I expresado en las células CD44+/CD133+ de los organoides (B-D) MFI de correceptores de *immune checkpoint*, CD86, MHC-II y PD-L1 y MHC-I. Las diferentes muestras de organoides se representan en diferentes colores y representa un n=2 para la muestra 1665T y 1788T y n=3 para las muestras 1293T, 1573T, 1692T y 1703T.

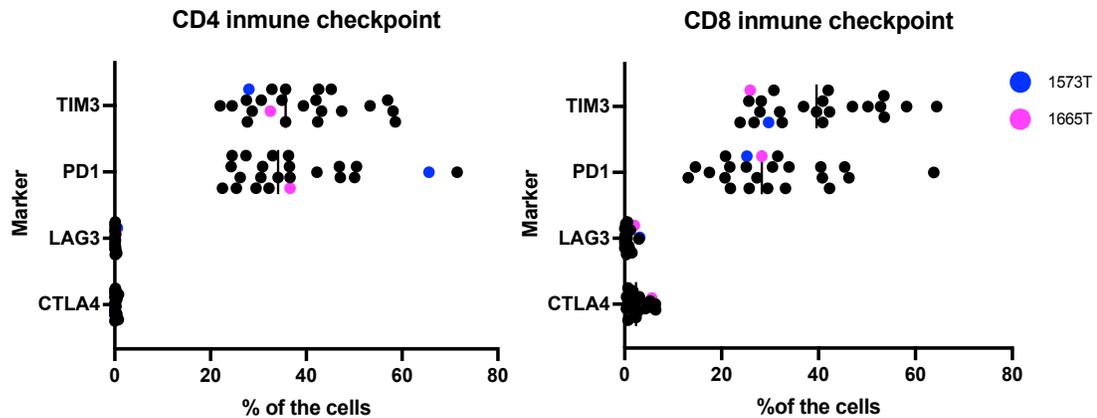
## 4.2 Objetivo específico 2. Evaluar la respuesta de linfocitos T provenientes de sangre periférica al interactuar directamente (co-cultivo) con organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar

### 4.2.1 Caracterización de PBMC de pacientes GBC

Durante el desarrollo de la tesis, se realizó una pasantía en el Laboratorio del Dr. Boonstra, en Erasmus University Rotterdam, en la cual se logró caracterizar la población de linfocitos T circulantes en muestras de PBMC provenientes de 23 muestras de pacientes con GBC y 22 muestra de pacientes con coledocistitis (GST). Dentro de las muestras de pacientes con GBC se evaluaron las muestras 1573T, 1665T y 1788T utilizadas para las actividades de caracterización y generación de co-cultivos en esta tesis. Dentro de los resultados obtenidos se determinó el porcentaje de población de linfocitos TCD4 y TCD8 en las muestras de pacientes, además del marcador de activación CD69 y la expresión de los *immune checkpoint* PD-1, CTLA, LAG3 y TIM3. En la subpoblación de células TCD4 y TCD8, no se observaron diferencias significativas en la expresión del marcador de activación CD69 comparando la población de GBC y GST. Además, cuando se analizó el porcentaje de expresión positiva de los *immune checkpoint* PD-1, CTLA4, LAG3 y TIM3 en la subpoblación TCD4 y TCD8 tampoco se encontraron diferencias significativas entre las muestras evaluadas, comparando entre GBC y GST (Protocolos y datos detallados en la **información suplementaria punto 11. 1**).

Considerando las muestras de pacientes con GBC, en la **Figura 7**, se muestra un gráfico representativo de la expresión de los *immune checkpoint* PD-1, CTLA, LAG3 y TIM3 en las subpoblaciones de linfocitos TCD4 y TCD8. Dentro de las muestras de los pacientes GBC, se evaluaron las muestras 1573T y 1665T, las cuales son parte de las 6 muestras que se caracterizaron los organoides en el **objetivo 1**, en el caso de los PMBC de la muestra 1788T no fue viable para desarrollar esta caracterización. Dentro de las subpoblaciones evaluada se observa que la población TCD4 expresan un porcentaje entre 20 y 80% de los *immune checkpoint* PD-1 y TIM3. Sin embargo, para los marcadores CTLA4 y LAG3 se observaron porcentajes bajos, alcanzado entre un 2-4% de células positivas en la subpoblación TCD4. Con respecto a la subpoblación TCD8, se observó que para el *immune checkpoint* PD-1 todas las muestras expresan este marcador, con porcentajes promedio cercano al 30% con una variación entre el 20 y 60% de población positiva para PD-1 dentro de las células TCD8. Considerando el porcentaje de expresión del marcador TIM3 se observa una variación de 20 al 80% de población positiva para la molécula dentro de la población TCD8. Para los marcadores CTLA4 y LAG3 se observaron porcentajes promedios cercanos a 2% de células positivas de estos *immune checkpoint* dentro de la población TCD8. Para los *immune checkpoint* graficados se destacaron con puntos representativos a las muestras trabajadas en la tesis, en azul la muestra 1573T y en magenta la muestra 1665T. Dentro de la subpoblación TCD4, la expresión de TIM3 en las muestras 1573T y 1665T es similar al promedio de los pacientes GBC, en cambio para PD-1 se observa que la muestra 1573T presenta un porcentaje mayor, con un 65,6% y la muestra 1665T expresa un porcentaje de 35% similar al promedio de las muestras correspondiente a un 34,1%. En cuanto a la subpoblación TCD8, se observa en TIM3 que las muestras 1573T y 1665T presentan un porcentaje menor al promedio de las muestras de pacientes GBC que corresponde a un 40%,

considerando el *immune checkpoint* PD-1 presentó un porcentaje de 28,3% de células positivas en las muestras de GBC, correspondiente a valores similares obtenidas en las muestras 1573T y 1665T con porcentajes de 28% y 29%, respectivamente.



**Figura 7:** Evaluación de los porcentajes de expresión de los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3, PD-1 y TIM3 en las subpoblaciones TCD4 y TCD8 en muestras de PMBC de pacientes con cáncer de vesícula biliar (GBC). N=23 pacientes. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraphPad Prisma versión 9

#### 4.2.2 Estandarización de las condiciones de co-cultivo

Para la generación del co-cultivo se basó en protocolos previamente reportado por Cattaneo et al <sup>(69)</sup>, Dijkstra et al <sup>(68)</sup>, el protocolo establecido por la empresa CrownBio <sup>(67)</sup> y el protocolo de co-cultivo establecido para colangiocarcinoma reportado por Zhou et al <sup>(70)</sup>. Como primer hito, se estableció el protocolo de aislamiento de PBMC con gradiente de Ficoll desde una muestra de sangre periférica de control y activación *in vitro* de los linfocitos T. Posteriormente se evaluó la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD137 y la expresión de los *immune checkpoint* CTLA4, LAG4 Y PD-1 en las subpoblaciones TCD4 y TCD8 mediante citometría de flujo. Basados en los protocolos anteriormente mencionado se realizaron estandarizaciones de parámetros como proporción celular entre organoides:PBMC (1:5 y 1:10), el tiempo de co-cultivo evaluando a 24hrs, 48hrs y 72hrs. Las figuras y detalles de los resultados obtenidos durante las estandarizaciones están dentro de la **información suplementaria**, considerando estos resultados se determinó realizar los ensayos de co-cultivo contemplados en los objetivos 2 y 3, utilizando una proporción de células de 1:5 (organoide:PBMC), una activación previa de 72hs de los PBMC con anti-CD3/CD28, la realización de los co-cultivos en presencia de un 2% de Matrigel y el co-cultivo fue realizado por un tiempo de 72hrs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

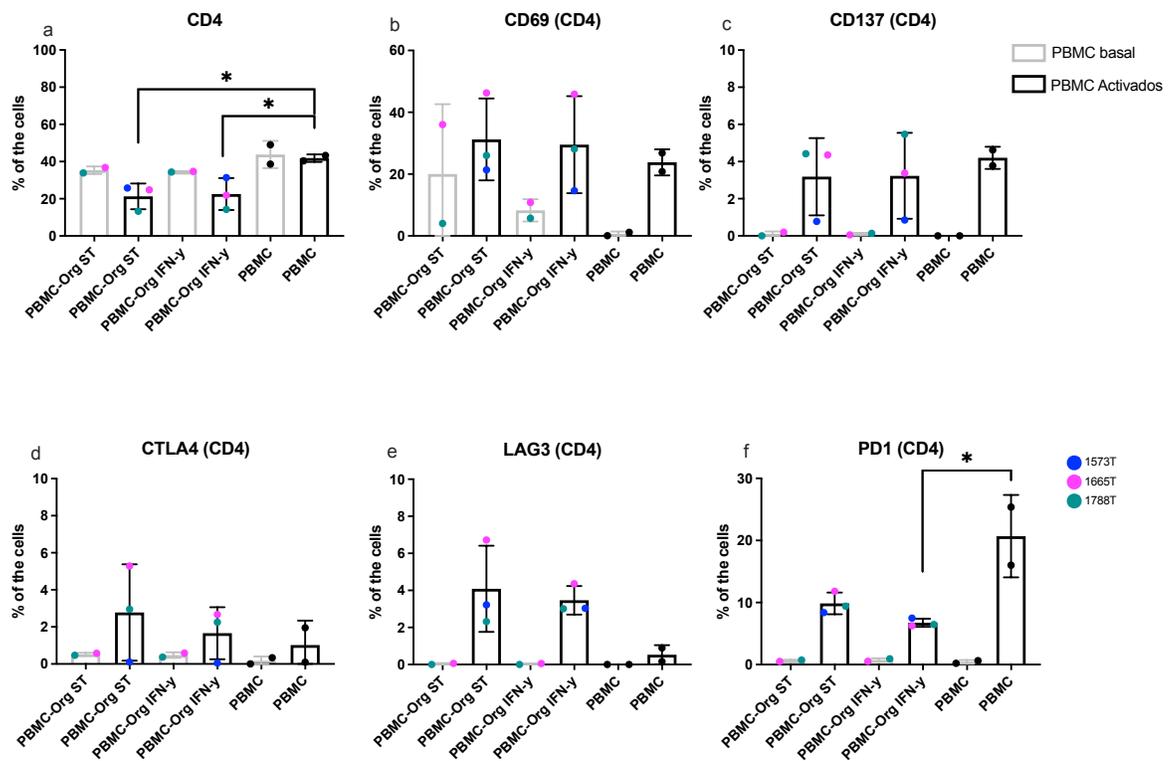
#### 4.2.3 Evaluación de la respuesta de Linfocitos T en co-cultivo con organoides.

Una vez estandarizadas las condiciones de cultivo de acuerdo a lo descrito en el **punto 4.2.2**, como segundo hito se evaluó la activación de los linfocitos TCD4 y TCD8 en la interacción de los PBMC con los organoides, analizando los marcadores CD69 y CD137. Además, se analizó la expresión de *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 en ambas subpoblaciones celulares, al término del co-cultivo.

En relación a la subpoblación TCD4 en el co-cultivo, en la **Figura 8-A**, se observa que en las condiciones de PBMC basal y activados existe aproximadamente un 40% de población TCD4 y este porcentaje es similar entre los tratamientos evaluados. Sin embargo, cuando se compararon los PBMC activados en las diferentes condiciones, se observó una disminución significativa de la subpoblación TCD4 de un 20% menos en la muestra PBMC-Org ST comparado con PBMC control y una disminución significativa de un 17% menos de la población TCD4 en la condición PBMC-Org IFN- $\gamma$  comparado con la condición PBMC control. Estos datos muestran que la presencia de organoides induce a una reducción de la población de TCD4 respecto a la condición de PBMC sin organoides. En la población de PBMC control, sin presencia de organoides tanto activados como basal no se presentaron diferencias significativas en la población de TCD4.

Como se observa en la **Figura 8-B y 8-C**, dentro de la subpoblación TCD4, se analizó la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD137, donde se observó que los co-cultivos con PBMC activados, el marcador CD69 presentó porcentajes promedios cercanos al 25% en todas las condiciones evaluadas, no presentando diferencias significativas entre las muestras. En cambio, en la condición de los PBMC basal los porcentajes variaron entre en 1% y 14% en promedio, y tampoco presentan diferencias significativas entre las diferentes condiciones. Sin embargo, se destaca la muestra 1665T que presentó una alta expresión de CD69 en la condición PBMC basal-Org ST, pudiendo generar una respuesta específica por parte de este organoide. Respecto al marcador CD137, las condiciones en presencia de PBMC activados presentaron una tendencia al aumento de este marcador con porcentajes cercanos al 3%, sin observar diferencias significativas entre las condiciones evaluadas. En los co-cultivo con la presencia de los PBMC basal, la expresión de CD137 fue cercana a 0 en todas las condiciones evaluadas.

En relación a la expresión de los *immune checkpoint* en la subpoblación TCD4, se observó una tendencia de aumento en la expresión de CTLA4, LAG3 y PD-1 comparando la condición PBMC activada con PBMC basal. En CTLA4 (**Figura 8-D**) se observa un aumento de 2% en presencia de PBMC activados y en LAG3 un 3% en PBMC activados (**Figura 8-E**). Sin embargo, como se muestra en la **Figura 8-F**, el mayor cambio observado fue en relación a la expresión de PD-1, donde se observó una disminución significativa de la expresión de PD-1 de 3 veces su porcentaje cuando se comparó el co-cultivo de organoides tratados con IFN- $\gamma$  (PBMC-Org IFN- $\gamma$ ) con el control respectivo de PMBC activado. Además, se observó una tendencia de disminuir a la mitad el porcentaje de PD-1 cuando se comparó la condición de co-cultivo PMBC activados con organoides sin tratamiento (PBMC-Org ST) con los PBMC activados. En el control de PMBC activado aumentó un 20% la subpoblación de TCD4 positiva para PD-1 en relación al control PMBC basal, en el cual la expresión fue cercana a 0.



**Figura 8:** Caracterización de la subpoblación TCD4, marcadores de activación CD69, CD137 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC de control mediante citometría de flujo. Condición de los cultivos: PBMC-Org ST barra negra (PBMC basal-Organoides sin tratamiento), PBMC-Org ST Barra gris (PBMC previamente activado con organoide sin tratar), PBCM-Org IFN-γ barra negra (PBMC basal con organoides tratados con IFN-γ), PBMC-Org-IFN-γ barra gris (PBMC previamente activados con organoides tratados con IFN-γ), PBMC barra negra (PBMC basales solos) y PBMC barra negra (PBMC previamente activados solos). “n” biológico = 4; muestras 1293T, 1573T, 1665T y 1788T. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \* p> 0.05 / \*\*p< 0.01 mediante test estadístico T-test.

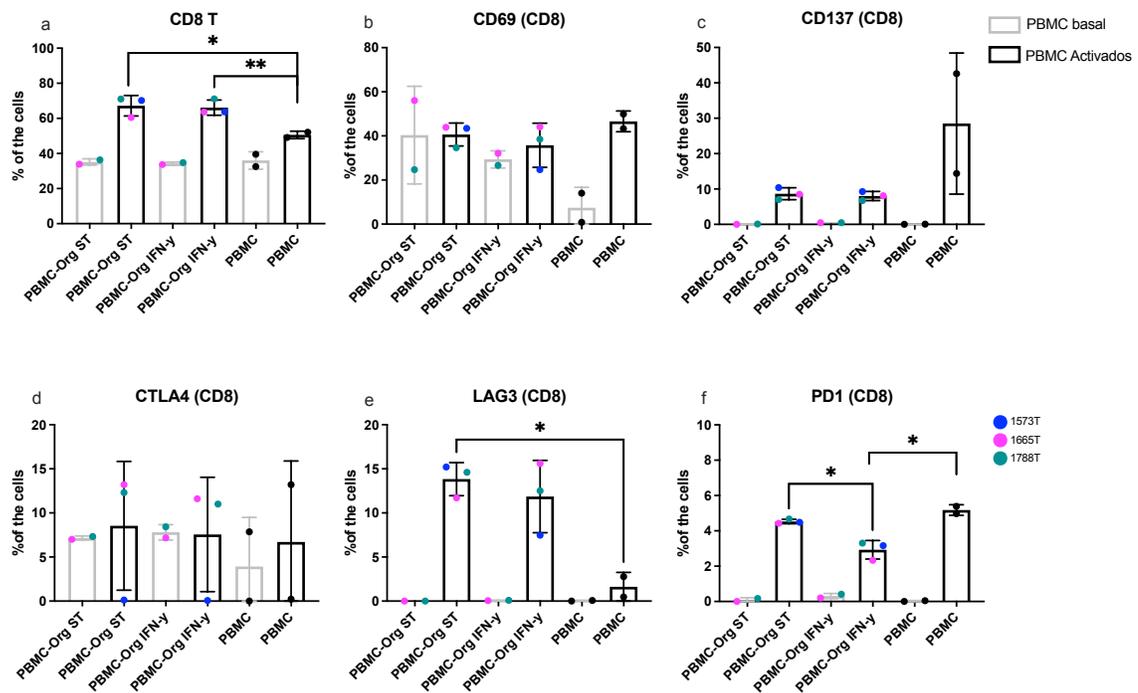
En relación a la subpoblación TCD8, **Figura 9-A**, se observó que los co-cultivos con PBMC previamente activados presentaron un aumento en la población TCD8 de aproximadamente un 30%, sin presentar diferencias significativas entre las condiciones de co-cultivo evaluadas. Se analizó las condiciones con los PBMC activados, fueron comparados los diferentes tratamientos. Considerando esto, se observó un aumento significativo de un 16% en el porcentaje de la subpoblación TCD8 en la condición co-cultivo PBMC activados con organoides sin tratamiento (PBMC-Org ST) y un aumento significativo de 13% la subpoblación TCD8 de co-cultivo de organoides tratados con IFN-γ (PBMC-Org IFN-γ) en comparación con PBMC. Además, no se observaron diferencias significativas entre las otras condiciones evaluadas.

En cuanto a los marcadores de activación CD69 y CD137 (**Figura 9-B y 9-C**) se observó una gran variabilidad de los porcentajes de células positivas entre las muestras evaluadas para el marcador CD69, sin presentar diferencias significativas ni tendencias claras entre las

condiciones evaluadas. Sin embargo, la muestra 1665T es la que presentó mayor porcentaje de CD69 en todas las condiciones evaluadas, incluida la condición PBMC basal. En cuanto a CD137 se observó un aumento cercano al 11% de células positivas en las condiciones de PBMC activados co-cultivados con organoides sin tratamiento (PBMC-Org ST) y con IFN- $\gamma$  (PBMC-Org IFN- $\gamma$ ), pero no se observaron diferencias significativas entre ellos. En cuanto a la condición de PBMC activados presentó porcentajes cercanos al 25% de células positivas para CD137 dentro de la subpoblación TCD8, pero con gran variabilidad entre las muestras, no observándose diferencias significativas en ninguna de las condiciones comparadas.

Adicionalmente, se determinó la expresión de los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1, en la subpoblación TCD8. En cuanto a la expresión de CTLA4 se presentó una gran variabilidad en los porcentajes de células positivas entre las muestras evaluadas en todas las condiciones, con un promedio de expresión de un 5% y no se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones (**Figura 9-D**). En cuanto a LAG3 se observó que las condiciones de PBMC activados en co-cultivo con organoides sin tratamiento (PBMC-Org ST) y con IFN- $\gamma$  (PBMC-Org IFN- $\gamma$ ) presentaron los porcentajes más altos, cercanos al 10% de células positivas para LAG3 dentro de la subpoblación TCD8. Particularmente, en la condición activado de PBMC-Org ST se presentó un porcentaje cercano al 15% de expresión de LAG3, el cual corresponde significativamente unas 5 veces más alto en relación al control de PBMC activado (**Figura 9-E**). El análisis de las células positivas para PD-1 en la subpoblación TCD8 mostró que bajo la condición de co-cultivo en presencia de PBMC basal, todas las condiciones presentan porcentajes cercanos a 0. Cuando se analizaron los co-cultivos en presencia de PBMC activados se presentó un porcentaje promedio cercano al 5% de población positiva de PD-1 dentro de la población CD8. La expresión de este marcador disminuyó significativamente en la condición de PBMC-Org IFN- $\gamma$  comparada con la condición PBMC-Org ST y de PBMC activado (**Figura 9-F**).

Dentro de los resultados obtenidos en el objetivo 2, se logró establecer un protocolo de co-cultivo de organoides derivados de pacientes con vesícula biliar con células inmunes derivadas de sangre periférica (PBMC). Adicionalmente, con el protocolo establecido se logró evaluar la respuesta de linfocitos T mediante la expresión de marcadores de activación como CD69 y CD137, además de la expresión de los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1. Dentro de los resultados observados encontramos respuestas diferenciadas entre los diferentes organoides derivados de pacientes utilizados para los ensayos. Estos resultados nos dan luces de que cada muestra derivada de paciente tendría una respuesta específica al estar co-cultivada con el PBMC derivado de un mismo control.



**Figura 9:** Caracterización de la subpoblación TCD8, marcadores de activación CD69, CD137 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 de co-cultivo de organoides y PBMC de control, mediante citometría de flujo. Condición de los cultivos: PBMC-Org ST barra negra (PBMC basal-Organoides sin tratamiento), PBMC-Org ST Barra gris (PBMC previamente activado con organoide sin tratar), PBCM-Org IFN-γ barra negra (PBMC basal con organoides tratados con IFN-γ), PBMC-Org-IFN-γ barra gris (PBMC previamente activados con organoides tratados con IFN-γ), PBMC barra negra (PBMC basales solos) y PBMC barra negra (PBMC previamente activados solos). “n” biológico = 4; muestras 1293T, 1573T, 1665T y 1788T. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \* p > 0.05 / \*\*p < 0.01 mediante test estadístico T-test.

### 4.3 Objetivo específico 3: Evaluar el efecto de la inhibición del *immune checkpoint* PD-1, en el modelo de interacción de células inmunes con organoides derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar

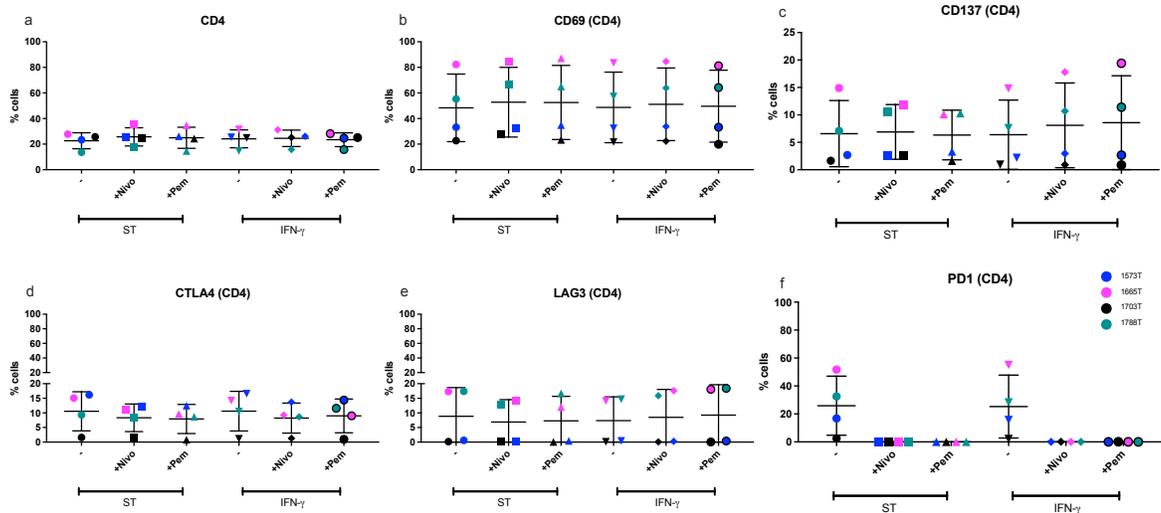
#### 4.3.1 Caracterización de Linfocitos T en co-cultivo con organoides en presencia de inhibidores de PD-1

Para este objetivo se realizaron los co-cultivos en las condiciones estandarizadas previamente en el objetivo 2 en presencia de los inhibidores de PD-1, Nivolumab y Pembrolizumab. Los resultados obtenidos provienen del co-cultivo realizados con los organoides 1573T, 1665T, 1703T y 1788T con PBMC control o alógeno. Para maximizar el análisis y discusión de los resultados obtenidos se presentan las figuras con las variables más relevantes a analizar, donde se consideran los co-cultivos de organoides tratados o no con IFN-γ en conjunto con los PBMC previamente activados. Todas las condiciones evaluadas incluyendo los controles de los PBMC basales en co-cultivo y los PBMC tanto basales y activados sin presencia de

organoides se encuentran analizados y los gráficos y su descripción correspondiente están presentes en **Información Suplementaria**.

Como se observa en la **Figura 10-A**, la subpoblación TCD4 representa un porcentaje promedio cercano al 25% en todas las condiciones evaluadas, no presentando diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Sin embargo, podemos observar variabilidad en el porcentaje de células TCD4 positivas entre las diferentes muestras evaluadas. En cuanto a los marcadores de activación, para CD69 se observa que todas las condiciones presentan un porcentaje promedio aproximado de 50% de células CD69 positivas dentro de la subpoblación TCD4 (**Figura 10-B**). Sin embargo, se observa una distribución heterogénea entre las muestras, donde se observa que la muestra 1665T presenta un porcentaje cercano al 80% de células positivas para CD69. Mientras que la muestra 1703T presentó el porcentaje más bajo de CD69 entre todas las muestras, con valor cercano al 20%. Las muestras 1573T y 1788T se encuentran con valores de CD69 entre el rango de porcentaje entre los valores de 20-80%. Para el marcador de CD137 también se observa una distribución heterogénea entre las muestras evaluadas, donde los organoides previamente tratados con IFN- $\gamma$  se observan porcentaje cercano al 8% y en los organoides sin tratamiento cercanos al 6% (**Figura 10-C**). En ambas condiciones (ST e IFN- $\gamma$ ) se observa variación entre 2-20% de población CD137 entre las muestras evaluadas. Sin embargo, en las muestras 1665T y 1788T el porcentaje de CD137 presenta una tendencia de aumentar en la subpoblación TCD4 de un 3 y 5%, respectivamente, cuando los co-cultivos son incubados en presencia de los inhibidores Nivolumab o Pembrolizumab.

En el caso de los *immune checkpoint*, encontramos que el marcador CTLA4 presenta porcentajes promedio aproximados al 10% de células positivas en las condiciones evaluadas. Sin embargo, en las muestras 1573T y 1665T en ambas condiciones ST y tratadas con IFN- $\gamma$  se observa una tendencia de disminución del porcentaje, de aproximadamente un 2% en los tratamientos con los inhibidores Nivolumab o Pembrolizumab. Para las muestras 1703T y 1788T se observan valores similares en el porcentaje de células CTLA4 positivas entre los tratamientos evaluados. En relación a LAG3, este *immune checkpoint* se expresa en porcentajes promedios cercanos al 8%. Sin embargo, cabe señalar que las muestras 1665T y 1788T expresan porcentajes cercanos al 15% y las muestras 1573T y 1703T expresan valores cercanos al 0% no observando diferencias ni tendencias entre los tratamientos evaluados. Cuando se evaluó PD-1, su expresión fue variable entre las muestras evaluadas con un porcentaje menor al 5% para la muestra 1703T, cercanas al 15% para la muestra 1573T, alrededor de un 35% para la muestra 1788T y un porcentaje cercano al 50% de células positivas para la muestra 1665T, sin observar diferencias entre el tratamiento con IFN- $\gamma$  y sin tratar. Al igual que para los otros *immune checkpoint*, no se observaron diferencias significativas entre las condiciones analizadas. Estos resultados se asemejan a lo previamente evaluado en el objetivo 2, condiciones de co-cultivo sin el uso de inhibidores, ya que lo más llamativo es que existe una gran variabilidad de expresión de los diferentes marcadores entre las diferentes muestras de pacientes estudiadas. Adicionalmente, como se observa en la **Figura 10-F**, en presencia de los inhibidores Nivolumab o Pembrolizumab, no se pudo determinar la expresión de PD-1 mediante citometría de flujo, esto estaría demostrando que los inhibidores fueron específicos para PD-1 impidiendo la unión del anticuerpo de citometría anti-PD-1.

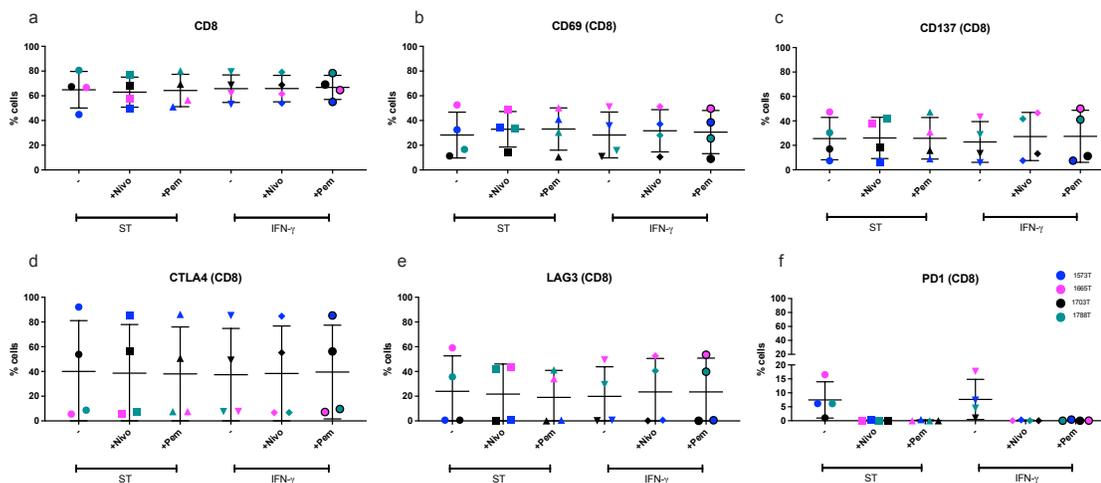


**Figura 10:** Caracterización de la subpoblación TCD4 en co-cultivo con organoides de pacientes antes y posterior al tratamiento con inhibidores anti-PD-1. Se evaluaron los marcadores de activación CD69, CD137 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC previamente activado como control mediante citometría de flujo. Condición de los cultivos: organoides sin tratamiento (ST), organoides tratados con IFN- $\gamma$  previo al co-cultivo (IFN- $\gamma$ ), co-cultivo sin inhibidores (-), co-cultivo tratado con Nivolumab (+Nivo), co-cultivo tratado con Pembrolizumab (+Pem). “n” biológico = 4 muestras 1573T, 1665T, 1703T y 1788T. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \*  $p > 0.05$  / \*\* $p < 0.01$  mediante test estadístico T-test.

Dentro de la subpoblación de linfocitos TCD8 **Figura 11-A**, se observan porcentajes promedios entre 60 y 65% en las diferentes condiciones evaluadas, con una distribución entre las muestras de células positivas que van entre un 40 y 80% para este marcador. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero al igual que lo observado para TCD4 llama la atención los porcentajes heterogéneos entre las distintas muestras de pacientes estudiadas. En cuanto a los marcadores de activación, observamos que para CD69 (**Figura 11-B**) presenta un porcentaje promedio aproximado de 30%, con un rango entre las muestras entre 20 y 50% de células positivas. La muestra 1665T presentó el porcentaje más alto de expresión de aproximadamente de 50% de células CD69 positivas en la subpoblación TCD8, sin variación entre las condiciones evaluadas. En la muestra 1788T se observa una tendencia de aumentar al doble de células positivas para el marcador CD69 comparando las condiciones sin inhibidores con la condición en presencia de Nivolumab o Pembrolizumab. Para el marcador de activación CD137 (**Figura 11-C**) se observa un porcentaje promedio cercano al 20%, con un rango entre las muestras con porcentajes variables entre un 5 y 40% de células positivas. La muestra 1665T y 1788T fueron las que presentaron porcentajes sobre el promedio. Particularmente, la muestra 1788T presenta una tendencia a aumentar un 10% de células positivas para CD137 dentro de la subpoblación TCD8, cuando los co-cultivos con organoides ST y tratados con IFN- $\gamma$  se incubaron en presencia de los inhibidores Nivolumab o Pembrolizumab. Al igual que para CD69 se observa una alta variabilidad entre las muestras, sin diferencias significativas entre los tratamientos.

En cuanto a la expresión de los *immune checkpoint*, CTLA-4 que se observa en la **Figura 11-D**, este presenta un porcentaje promedio cercano al 40% en todas las condiciones evaluadas. Entre las muestras evaluadas se observa variabilidad en los porcentajes de células positivas, donde se observa que la muestra 1573T presenta porcentajes cercanos al 85%, la muestra 1703T con porcentajes cercanos al 55% y las muestras 1665T y 1788T con porcentajes menores al 10% de células positivas de CTLA4 en la subpoblación TCD8. Adicionalmente no se observan diferencias ni tendencias de cambio entre las diferentes condiciones evaluadas. Con respecto a la molécula de LAG3 (**Figura 11-E**) se observa que presentó porcentajes promedios cercanos al 20% en todas las condiciones evaluadas. Sin embargo, también se observa una variabilidad entre las muestras donde 1665T y 1788T presentan porcentajes cercanos al 50% de población positiva y las muestras 1573T y 1703T valores cercanos al 0% de células positivas. La muestra 1788T presenta una tendencia a aumentar entre un 2 a 5% de las células positivas a LAG3 en la condición de ST e IFN- $\gamma$  cuando el co-cultivo fue realizado en presencia de Nivolumab o Pembrolizumb y la muestra 1665T presenta una tendencia de aumento de un 2% de células positivas a LAG3 en la condición IFN- $\gamma$  cuando el co-cultivo fue realizado en presencia de Nivolumab o Pembrolizumb.

En el caso de PD-1 como se observa en la **Figura 11-F**, las muestras presentaron un porcentaje promedio cercano al 10%, donde la muestra de mayor porcentaje corresponde a 1665T con valores sobre el 15%, las muestras 1573T Y 1788T presentaron porcentajes cercanos la 5% y la muestra 1703T con un porcentaje de 1% siendo la muestra de menor expresión de PD-1 en la subpoblación TCD8. Al igual como fue mencionado anteriormente, el bloqueo con los inhibidores no permite determinar la población PD-1 positiva mediante la citometría de flujo, cuando los co-cultivos se realizaron en presencia de Nivolumab o Pembrolizumb.



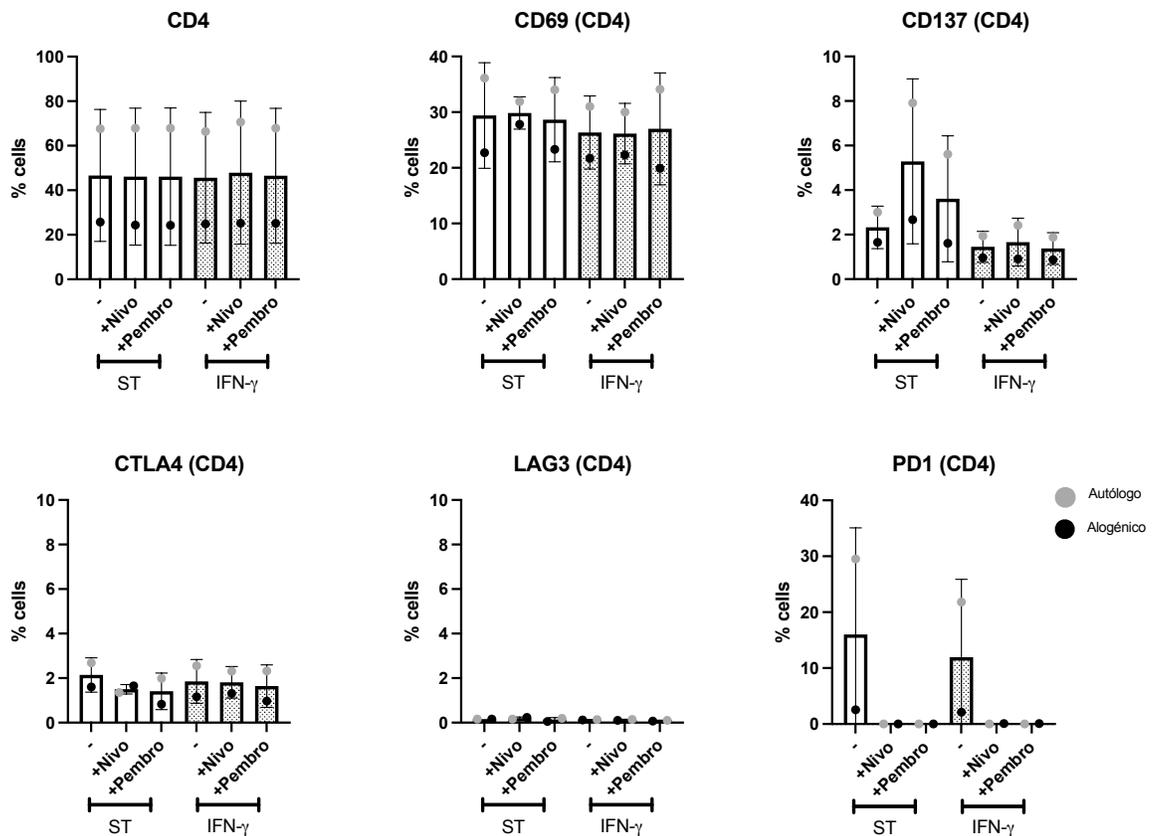
**Figura 11:** Caracterización de la subpoblación TCD8 en co-cultivo con organoides de pacientes antes y posterior al tratamiento con inhibidores anti-PD-1. Se evaluaron los marcadores de activación CD69, CD137 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 de co-cultivo de organoides y PBMC previamente activado como control mediante citometría de flujo. Condición de los cultivos, organoides sin tratamiento (ST), organoides tratados con IFN- $\gamma$  previo al co-cultivo (IFN- $\gamma$ ), co-cultivo sin inhibidores (-), Co-cultivo tratado con Nivolumab (+Nivo), Co-Cultivo tratado con Pembrolizumab (+Pem). “n” biológico = 4 muestras 1573T, 1665T, 1703T y 1788T. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \*  $p > 0.05$  / \*\* $p < 0.01$  mediante test estadístico T-test.

#### 4.3.2 Evaluación bajo condición co-cultivo autólogo y alogénico:

Adicionalmente se logró evaluar en el co-cultivo en la muestra 1703T en condición autóloga, es decir, con PBMC provienen del mismo individuo. Además, al igual que para los objetivos 2 y 3 los co-cultivos fueron comparados con un control alogénico donde los PBMC provienen de un donante sano. Los resultados son mostrados en la **Figura 12**. Al igual que en los resultados previos, sólo se mostrará la condición activada y en presencia de organoides, el gráfico con todas las condiciones se adjunta en **Información Suplementaria**. Dentro de la subpoblación TCD4 como se observa en la **Figura 12-A**, las muestras presentaron porcentajes mayores a 60% cuando el co-cultivo se realizó de forma autóloga, mientras que cuando fue en condiciones alogénico la subpoblación TCD4 se obtuvieron valores cercanos al 25%. Sin observar diferencias significativas entre las condiciones evaluadas.

En cuanto a los marcadores de activación, cuando analizamos CD69 se logró ver una distribución diferente entre la condición autóloga que presenta porcentajes cercanos a 30% y la condición alogénica donde se observa porcentajes entre un 25 y 30% (**Figura 12-B**). Para el marcador de activación CD137 como se observa en la **Figura 12-C**, se obtuvieron valores menores al 10% de células positivas en todas las condiciones evaluadas y sin diferencias significativas entre ellas. Cabe señalar, que bajo la condición de co-cultivo autólogo se presenta mayor porcentaje de CD137 con respecto a su condición control alogénica. Adicionalmente, se observa una pequeña tendencia de aumentar el porcentaje de CD137 en presencia de los inhibidores Nivolumab o Pembrolizumab en la condición de co-cultivo sin tratamiento (ST).

En relación a los *immune checkpoint* se observa que CTLA4 (**Figura 12-D**) presenta expresiones cercanas al 2% en todas las condiciones, tanto para el co-cultivo autólogo como el alogénico sin presentar diferencias entre las condiciones evaluadas. Respecto a LAG3, todas las condiciones evaluadas presentan porcentajes cercanos a 0% como se observa en la **Figura 12-E**. Finalmente, se observa en la **Figura 12-F** que la condición de co-cultivo autóloga presentó porcentajes de PD-1 entre un 20-30% células positivas en la subpoblación TCD4. A diferencia en el caso del co-cultivo alogénico, donde el porcentaje de PD-1 presentó un 2% de células positivas. Adicionalmente como se ha mencionado anteriormente con la presencia de los inhibidores no se observa población PD-1 positiva dentro de la población TCD4.

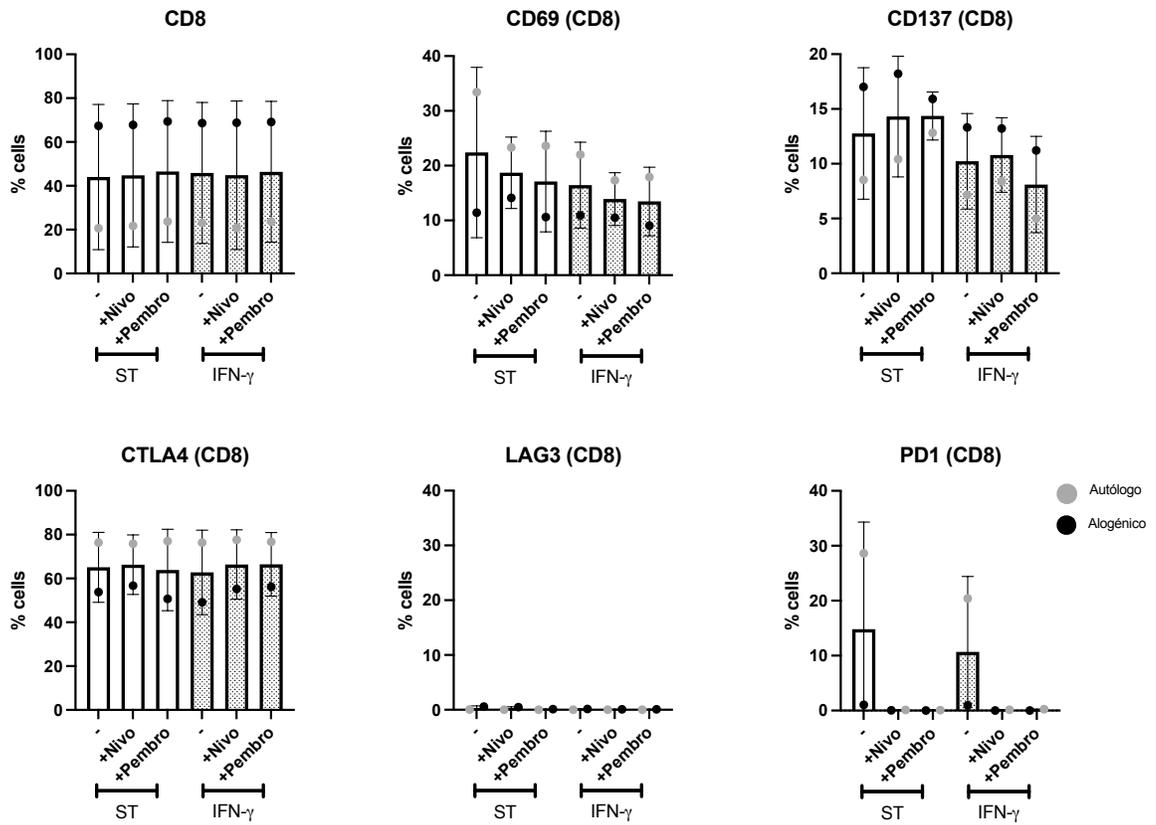


**Figura 12:** Caracterización de la subpoblación TCD4, marcadores de activación CD69, CD137 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 mediante citometría de flujo de co-cultivo de organoide 1703T y PBMC autólogo y alogénico. Condición de los cultivos, organoides sin tratamiento (ST), Organoides tratados con IFN- $\gamma$  previo al co-cultivo (IFN- $\gamma$ ), Co-Cultivo sin inhibidores (-), Co-cultivo tratado con Nivolumab (+Nivo), Co-Cultivo tratado con Pembrolizumab (+Pem). “n” biológico = 1 autólogo y 1 alogénico. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \* p> 0.05 / \*\*p< 0.01 mediante test estadístico T-test.

En cuanto a la subpoblación TCD8, se observa en la **Figura 13-A** que el co-cultivo autólogo presentó una población de 20% células positivas para CD8 y el co-cultivo alogénico de un 80%, lo que representó perfiles diferentes entre las condiciones. En cuanto a los marcadores de activación, se observa que CD69 (**Figura 13-B**) presenta porcentajes mayores al 20% en la condición autóloga con una tendencia a disminuir un 5% de células positivas cuando el co-cultivo fue realizado en presencia de Nivolumab o Pembrolizumab. Cuando se realizó de forma alogénica el porcentaje de CD69 fue entre 10-15% sin presentar diferencias entre las condiciones evaluadas. En el caso de CD137 como se observa en la **Figura 13-C**, los porcentajes de células positivas fueron entre el 15 y 20% bajo condición co-cultivo con PBMC autólogo y menores al 10% cuando los PBMC fueron alogénico, sin observarse tendencias ni diferencias entre las condiciones evaluadas.

En el caso de los *immune checkpoint* se observa que CTLA4 (**Figura 13-D**) presenta valores mayores al 70% de células positivas para el marcador dentro de la subpoblación TCD8, cuando el co-cultivo se realizó condición autóloga y entre 50 y 55% de células positivas cuando se realizó en condición alogénica. Respecto a LAG3, no se observa expresión del marcador en ninguna de las condiciones evaluadas como se muestra en la **Figura 13-E**. Respecto al *immune checkpoint* PD-1 se observa que en la condición de co-cultivo con PBMC autólogo se presentan porcentajes entre 20 y 30% (**Figura 13-F**). Adicionalmente, se observa que en condición co-cultivo alogénico el porcentaje disminuye, obteniendo valor de 1% de células positivas en las condiciones evaluadas. Adicionalmente, bajo ambas condiciones de co-cultivo con PBMC autólogo o alogénico en presencia de inhibidores no se detecta la expresión de PD-1 lo que nuevamente confirma el bloqueo del receptor.

Dentro de los resultados obtenidos en el objetivo 3, se logró realizar los co-cultivos en presencia de los inhibidores de PD-1, Nivolumab y Pembrolizumab, se logró evaluar la respuesta de linfocitos TCD4 y TCD8 mediante marcadores de activación CD69 y CD137, como también la expresión de los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1. Dentro de estos resultados se logró confirmar el bloqueo de PD-1 mediante el uso de los inhibidores. Además, se observó una respuesta heterogénea entre las muestras de organoides en cuanto a la expresión de los marcadores, consolidando la idea de la respuesta específica de los linfocitos T frente a la presencia de los diferentes organoides. Con estos resultados, se logró una primera aproximación de co-cultivo autólogo, mostrando un perfil de respuesta completamente distinto al presentado bajo la condición de control alogénica, generando un nuevo desafío a continuar maximizando el potencial del modelo de co-cultivo de organoides con células del sistema inmune.



**Figura 13:** Caracterización de la subpoblación TCD8, marcadores de activación CD69, CD137 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 mediante citometría de flujo de co-cultivo de organoide 1703T y PBMC autólogo y alogénico. Condición de los cultivos: organoides sin tratamiento (ST), organoides previamente tratados con IFN- $\gamma$ . Co-Cultivo sin inhibidores (-), co-cultivo tratado con Nivolumab (+Nivo), co-Cultivo tratado con Pembrolizumab (+Pem). "n" biológico =1. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \*  $p > 0.05$  / \*\* $p < 0.01$  mediante test estadístico T-test.

## Capítulo 5 Discusión

El cáncer de vesícula biliar es una neoplasia maligna con una alta prevalencia en nuestro país, destacando que en la población mapuche se ha reportado una incidencia de GBC de 20 casos por cada 100.000 habitantes <sup>(74)</sup>. Desafortunadamente, el GBC en nuestro país persiste como un problema de salud pública, especialmente para mujeres donde se presenta como la quinta causa de muerte por cáncer, pese a los esfuerzos realizados como la colecistectomía preventiva de la vesícula biliar en personas entre 35 y 49 años <sup>(8)</sup>. La resección quirúrgica de la vesícula es el único tratamiento efectivo contra el cáncer <sup>(75)</sup>. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no son candidatos a cirugía, por tanto, se establece en ellos el tratamiento estándar que ha sido ampliamente usada en este tipo de cáncer en los últimos 10 a 20 años, correspondiente a quimioterapia de gemcitabina y cisplatino <sup>(14)</sup>. Sin embargo, la tasa de respuesta a la quimioterapia es variable y muchos casos presentan mal pronóstico.

Basándonos en estos antecedentes, toma relevancia la búsqueda de nuevos modelos para evaluación de tratamientos, como quimioterapias, radioterapia e inmunoterapia, enfocándose en la medicina personalizada en este tipo de patologías. En esta tesis cobra protagonismo el establecimiento del modelo de cultivos tridimensionales de organoides derivados de pacientes. Durante el desarrollo de este trabajo, se logró establecer y caracterizar 6 organoides derivados de pacientes con diagnóstico de cáncer de vesícula biliar. Dentro de los datos demográficos se destaca que un 67% de las muestras derivan de mujeres (4/6) y un 33% correspondientes a muestras derivadas de hombres, los cuales presentan un promedio de edad de 68,5 años, particularmente en las muestras derivadas de pacientes mujeres la edad promedio de diagnóstico fue de 60,5 años. Los antecedentes clínico-patológicos de las muestras utilizadas son representativos a lo que se ha descrito previamente en nuestro país y similares a otras cohortes de pacientes, se reportó una caracterización de una cohorte de pacientes GBC en Portugal, donde la edad promedio de diagnóstico en hombres fue de 70,1 años y el porcentaje de mujeres presentes en la cohorte fue de un 63,4%. Además, en esta cohorte un 68,3% de los pacientes presentaban cálculos en la vesícula biliar al momento del diagnóstico <sup>(76)</sup>. En este sentido el establecimiento del protocolo de la generación de los organoides derivados de pacientes GBC en nuestro laboratorio, logró que los organoides fueran representativo de la morfología, heterogeneidad celular y mutacional (datos no mostrados) del tumor de origen. Siendo esto un hito relevante para el desarrollo de la investigación de esta patología. Previamente, se ha reportado el establecimiento y caracterización de organoides derivados de pacientes GBC utilizando solo una muestra y con un enfoque en caracterización histológica, genética y respuesta a droga donde los organoides son representativos del tumor de origen <sup>(18)</sup>. Adicionalmente, existen otros reportes de caracterización de organoides derivados de GBC con tasas de establecimiento de 12% y una preservación de los cultivos de al menos 6 meses <sup>(18, 77, 78)</sup>. Sin embargo, la aplicabilidad en las nuevas herramientas terapéuticas como la inmunoterapia o evaluar la respuesta frente a otros componentes del microambiente tumoral era un desafío pendiente que logramos responder en el trabajo desarrollado en esta tesis y los resultados presentados.

Las células con fenotipo CSC se han estudiado en diferentes tipos de tumores gastrointestinales. Específicamente en GBC se ha reportado la presencia de estas células y la expresión de marcadores, dentro de los que se destaca CD44 con una presencia en un 19,5% y molécula ALDH1 presente en un 41,5% de pacientes, ambas se han sido asociado al fenotipo CSC en una cohorte de pacientes GBC <sup>(76)</sup>. Respecto a CD133, otra molécula asociada al fenotipo CSC, se ha logrado aislar células CD133 a partir de líneas celulares derivadas de tumores de vesícula biliar y estas células presentaron mayor expresión de la molécula XRCC1 asociada a la reparación de DNA. Adicionalmente se estudió el efecto biológico de XRCC1 en las células CD133+, observándose que la presencia de XRCC1 en las células CD133 positivas fue asociada con quimioresistencia al tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU), inhibiendo la necrosis y apoptosis celular <sup>(79)</sup>. Adicionalmente, se ha reportado que células con fenotipo CSC caracterizados por la co-expresión de CD44 y CD133, presentan mayor resistencia a Gemcitabina y a 5-FU comparado con células que expresan solo CD44 o CD133 <sup>(28)</sup>. Otra publicación muestra que esta subpoblación celular doble positiva CD44 y CD133 presentó resistencia a Gemcitabina. Además, este fenómeno de resistencia se asoció a la expresión de miR-205-5p, cuando en estas células se presentaban aumentada la expresión de miR-205-5p disminuía su resistencia a Gemcitabina <sup>(80)</sup>. Por otro lado, contar con modelos que representen el enriquecimiento de CSC y permitan evaluar la eficacia de las nuevas terapias es otro importante desafío. En este sentido esta tesis contribuye a la caracterización de las células fenotipo CSC en los organoides derivados de pacientes con GBC y a la generación de un modelo basado en co-cultivo de estos organoides con células del sistema inmune para evaluar inmunoterapias. Dentro de los resultados obtenidos en esta tesis, se observa que todos los organoides presentaron un porcentaje de al menos un 20% de subpoblación fenotipo CSC esto medido a través de la expresión doble positiva de los marcadores CD44 y CD133. Esto refuerza que la expresión de ambos marcadores está presente en tumores de GBC y es mantenida en el modelo de organoides

Dentro de las inmunoterapias propuestas para tumores del tracto biliar, se ha evaluado el potencial terapéutico de las denominadas CAR-T que corresponde a células inmunes, específicamente células modificadas genéticamente para generar una respuesta contra un antígeno tumoral específico <sup>(19)</sup>. Recientemente, un estudio ha mostrado resultados promisorios utilizando inmunoterapia anti-CD133-CAR-T. Esta terapia fue capaz de eliminar células fenotipo CSC positivas para CD133 en colangiocarcinoma <sup>(81)</sup>. Dado esto, toma relevancia la caracterización y el estudio de diferentes componentes del microambiente tumoral, como son la presencia de las células tumorales fenotipo CSC, las células inmunes, mecanismos de evasión y resistencia. La búsqueda de modelos de co-cultivos entre células tumorales y componentes del microambiente tumoral, como los CAFs o células del sistema inmune ha avanzado enormemente este último tiempo, especialmente con la utilización de modelos 3D, que son capaces de recapitular el fenotipo, genotipo y fisiopatología del tumor derivado del paciente <sup>(82)</sup>. Adicionalmente, se ha reportado que las células fenotipo CSC presentan un aumento en la expresión de moléculas inmunosupresoras como PD-L1 y CTLA4, directamente relacionadas a mecanismos de evasión inmune <sup>(19)</sup>. En cáncer de mama se ha reportado un aumento significativo de la expresión de PD-L1 a partir de células con fenotipo CSC comparadas con las otras poblaciones de células tumorales más diferenciadas <sup>(83)</sup>. En cáncer de cabeza y cuello se ha observado un aumento en la expresión de PD-L1 en células CD44+, fenotipo CSC <sup>(84)</sup>. Además, en cáncer gástrico se ha observado la sobreexpresión de PD-L1 en células tipo CSC <sup>(85)</sup>. Estos antecedentes se relacionan

con los resultados encontrados en esta tesis, donde las células fenotipo CSC presente en los organoides derivados de GBC mostraron entre un 20% a 50% de células PD-L1 positivas, lo que concuerda con lo descrito en la literatura respecto al aumento de la expresión de molécula inmunosupresora en esta subpoblación celular. Dentro de los resultados relevantes asociados a esta tesis, cabe señalar que se logró caracterizar los organoides GBC, que fueron capaces de recapitular la morfología y heterogeneidad celular del tumor del cual derivaron. También se caracterizó la presencia de las células CSC con la expresión de los marcadores CD44 y CD133, en esta subpoblación celular se demostró la expresión de la molécula inmunosupresora PD-L1 y otros correceptores de los *immune checkpoint* CD86 y MHC-II.

Posteriormente durante la caracterización de la expresión de los *immune checkpoint* en células T circulantes derivadas de pacientes GBC, los resultados obtenidos muestran que el 100% de los pacientes GBC evaluados, expresan el *immune checkpoint* PD-1 en las subpoblaciones TCD4 y TCD8. Esta caracterización es relevante en nuestra población, debido a que es la primera vez que se analiza en las subpoblaciones inmunes, TCD4 y TCD8 por citometría de flujo la expresión de PD-1 en pacientes chilenos con patología GBC. Lo cual al complementarse con otros antecedentes aporta conocimiento como una primera aproximación de la expresión de este receptor en pacientes con GBC y la posibilidad de utilizar inmunoterapias dirigidas a este inhibidor de *immune checkpoint* en este tipo de cáncer. Existen estudios donde evalúan la expresión de PD-1 en pacientes GBC y nuestro aporte cobra relevancia como caracterización realizada en linfocitos T circulantes en una cohorte de pacientes chilenos. Un estudio reciente evaluó la expresión de PD-1 y PD-L1 a nivel tumoral en 47 pacientes, donde se observó mediante inmunohistoquímica de TMA de los tumores, que la expresión de PD-L1 en células tumorales estaba presente en un 98% (46/47) de los pacientes estudiados y en el 85% de los casos se observa que, un 50% o más de células expresaron PD-L1 en membrana con una alta intensidad de expresión (3+). Complementariamente la expresión de PD-1 fue evaluada en los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), donde se observó que un 78% de los pacientes presentaban expresión positiva de PD-1 en TILs <sup>(86)</sup>. Esto muestra que un alto porcentaje de pacientes con GBC expresan PD-1 a nivel tumoral, lo cual se podría relacionarse indirectamente, con nuestros resultados obtenidos en linfocitos circulantes, donde observamos que todos los pacientes evaluados expresan PD-1 en linfocitos TCD4 y TCD8. Por otra parte, un estudio evaluó TILs en pacientes chilenos con GBC, donde se reportó la infiltración de linfocitos TCD3 en el 100% de pacientes evaluados (79/79). Este resultado difiere a reportes previos de pacientes en Japón o Alemania donde solo un 30 a 50% de los pacientes presentan infiltración de TCD3 <sup>(38)</sup>, tomando relevancia de las diferencias presentadas en las distintas cohortes de pacientes de acuerdo al país de origen y a los factores de riesgos asociados. A pesar de que en nuestro estudio no se analizaron los TILs, se ha reportado de que el uso de PBMC de sangre periférica podría ser una alternativa fácil y accesible estudiar las interacciones del tumor con células inmunes <sup>(68, 70)</sup>. Por tanto, como primer antecedente el estudio de linfocitos circulantes en pacientes GBC son datos relevantes para la investigación en esta patología y creemos que podría ser interesante complementar estos antecedentes con futuros estudios se sumen a esta caracterización para poder evaluar y comparar los resultados obtenidos con otras cohortes de pacientes, o como potenciales biomarcadores para inmunoterapia.

Dentro de los resultados obtenidos en la tesis, se logró estandarizar el co-cultivo de organoides derivados de pacientes GBC con PBMC de controles sanos. A partir de estos co-cultivos se logró concluir que los organoides generan una respuesta de activación de los linfocitos TCD4 y TCD8, aumentando la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD137, como también un aumento en los porcentajes de los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1. Cabe destacar, que cada organoide presenta un perfil de activación diferente, por tanto, creemos que características propias del organoides, como el porcentaje de células fenotipo CSC o la expresión de moléculas inmunomoduladoras como PD-L1 podrían ser relevantes en la generación de cada respuesta específica. En este sentido, toma relevancia como resultado la caracterización de estas subpoblaciones y la expresión de sus marcadores de activación e *immune checkpoint* tanto a nivel de células circulantes como en el modelo propuesto de co-cultivo entre organoides GBC y PBMC control.

La mayoría de los reportes determinan la infiltración de células inmunes en los tumores. Dentro de estos, el cáncer del tracto biliar son una familia de cáncer epitelial heterogénea incluyendo colangiocarcinoma intrahepático y extrahepático, además del cáncer de vesícula biliar, los cuales han sido caracterizados por presentar un microambiente tumoral inmunosupresor y escasas de células infiltrantes del tipo T efectoras<sup>(87, 88)</sup>. Este escenario, hace altamente relevante intentar caracterizar el microambiente tumoral, como también la interacción entre las células tumorales y las del sistema inmune. Dentro de este desafío, toma relevancia los nuevos modelos de estudio de tumores como los organoides y ensayos donde se puedan evaluar la interacción con otros componentes del microambiente tumoral como los co-cultivo de organoides y células del sistema inmune.

Los organoides se han posicionado en los últimos años como un modelo representativo de la heterogeneidad tumoral, se ha reportado la utilidad de este modelo para estudiar la progresión del cáncer, evaluación de testeo a drogas entre otros<sup>(62)</sup>. En los últimos años, varios estudios han focalizado en evaluar como las células inmunes interactúan con organoides y otros componentes del microambiente tumoral. Uno de los primeros trabajos que mantuvo el componente inmune del paciente, fue descrito como un modelo de interfaz aire - líquido denominado ALI-PDOs el cual es capaz de mantener poblaciones del microambiente tumoral por hasta 40 días, después de este tiempo de cultivo y los pasajes influyen en la viabilidad de las células inmunes, limitando la aplicabilidad del modelo<sup>(89)</sup>. Trabajos posteriores se enfocaron principalmente en los nuevos modelos de tumor, los avances de la inmunoterapia y la necesidad de entender los mecanismos involucrados en las interacciones. En este sentido se logró estudiar usando modelo de co-cultivos la actividad citotóxica de los TCD8 en presencia de organoides derivados de pacientes<sup>(70)</sup>, y la capacidad de generar respuesta T frente a antígenos específicos derivados de organoides de cáncer colorrectal<sup>(68)</sup>. Ambos estudios se asemejan y potencian los resultados obtenidos en esta tesis. Además, todos estos estudios resaltan la relevancia del modelo de organoides tumorales como una plataforma *ex vivo* con potencial para la evaluación de respuesta inmune con proyecciones de uso en y la predicción de respuesta de inmunoterapia.

Cabe señalar que, durante este trabajo, en los co-cultivo se evaluó todas las condiciones realizadas considerando todos los controles como, PBMC basal y activado mediante el tratamiento con anti-CD3 y CD28 el cual es un estímulo policlonal de activación de las células T,

que induce la proliferación de las células T, en las subpoblaciones TCD4 como TCD8<sup>(90, 91)</sup> (estos resultados fueron reportados en la **Información Suplementaria**). Sin embargo, para una optimización de la presentación y discusión de resultados se decidió presentar solo la condición de linfocitos activados, debido a que es una característica de funcionalidad de los linfocitos<sup>(92)</sup> y se identificó cada muestra con un color diferente, para poder presentar de mejor manera los resultados, debido a la alta variabilidad que encontramos entre las muestras derivadas de cada paciente. Dentro de los resultados observamos en los co-cultivo que los PBMC provenientes de control, responden al estímulo de la presencia de los organoides y cambian algunas poblaciones de células inmunes.

En los co-cultivos de organoides y PBMC encontramos una alta expresión de CD69 tanto en la subpoblación TCD4 como TCD8, esto se relaciona con un estado de activación de los linfocitos y de que cuentan con la capacidad de responder frente a los estímulos presentados. La expresión de CD69 se observa alta en todas las condiciones en las cuales se encuentran presente los organoides. Particularmente, en las muestras 1665T y 1788T se observa alta expresión de CD69 tanto en la condición de co-cultivo con PBMC basal como PBMC previamente activado. El aumento de este marcador podría estar dado por la presencia de los organoides y, por tanto, podría interpretarse como una respuesta de las células inmunes frente a la presencia de células tumorales de los organoides. Interesantemente, la muestra 1665T que se caracterizó por un alto porcentaje de células fenotipo CSC y un alto porcentaje e intensidad de fluorescencia media para PD-L1, y en el co-cultivo con PBMC presentó una alta expresión PD-1 tanto en la subpoblación TCD4 como en la TCD8. Estos resultados son otro de los hitos relevantes de esta tesis, donde se logró la generación de un modelo de interacción entre células tumorales y células inmunes utilizando muestras de organoides derivados de pacientes GBC, que nos permitió evaluar la activación de células inmunes como TCD4 y TCD8.

Finalmente, se logró evaluar la respuesta de los linfocitos T en presencia de los inhibidores Nivolumab y Pembrolizumab en co-cultivo con los organoides GBC. De los resultados obtenidos se pudo concluir que la respuesta de los linfocitos T varía con los diferentes organoides, generando una mayor activación por parte de las muestras 1665T y 1788T y esta respuesta se observa potenciada en presencia de los inhibidores Nivolumab y Pembrolizumab. En los últimos años la inmunoterapia ha tomado gran relevancia en el tratamiento del cáncer, debido a los resultados positivos que se han obtenido en algunos tipos de cáncer<sup>(93)</sup>. Por tanto, la generación de modelos de predicción de respuesta para este tipo de terapia ha sido el objetivo de diferentes investigaciones. Bajo este contexto es que se ha propuesto a los organoides como un modelo de predicción de respuesta a terapias, pero que requiere de nuevos protocolos y ensayos de validación como modelo de predicción de respuesta a inmunoterapia<sup>(62)</sup>.

Dentro de estos *immune checkpoint* se considera que uno de los más relevantes y estudiados es el eje PD-1/PD-L1 por su rol en la evasión inmune. Además, el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 ha demostrado respuesta beneficiosa en el tratamiento en otros cánceres gastrointestinales<sup>(94, 95)</sup>. Recientemente, la inhibición de PD-1 también ha sido estudiada como un potencial blanco de terapia en algunos en casos clínicos de cáncer de vesícula biliar<sup>(53, 60)</sup>. De acuerdo a los antecedentes descritos, es que se valida el uso Nivolumab y

Pembrolizumab en la evaluación de la respuesta a terapia en el modelo de co-cultivo de organoides GBC y PBMC propuesto en esta tesis.

Dentro de los resultados se observó que ambos inhibidores, Nivolumab como Pembrolizumab, fueron capaces de bloquear a PD-1 en los linfocitos TCD8 y TCD4. Esta inhibición fue reproducible en los co-cultivo de todas las muestras evaluadas, en todos los casos no se detectó la expresión de PD-1 mediante citometría de flujo en presencia de los inhibidores, lo que nos estaría indicando que ambos anticuerpos estarían bloqueando a PD-1 de manera específica. Por otro lado, nuestros resultados mostraron una respuesta diferencial para cada muestra de organoide resaltando la variabilidad de respuesta que puede desencadenar las distintas muestras de pacientes. El bloqueo de PD-1 fue capaz de aumentar la activación de los linfocitos co-cultivados con la muestra de organoide 1788T, la cual experimentó un aumento de marcador CD137. Cabe señalar, que la expresión de las moléculas de activación e *immune checkpoint* presentaron variabilidad entre las diferentes muestras de organoides, pudiendo indicar esto que existe una respuesta específica acorde a las muestras de organoide derivadas de pacientes. La variabilidad en la respuesta podría estar relacionado a las características particulares de los tumores a partir de los cuales se establecieron los organoides, lo cual ha sido reportado previamente en co-cultivos de organoides derivados de colangiocarcinoma y PBMC donde se observa una respuesta citotóxica heterogénea entre las diferentes muestras<sup>(70)</sup>. Adicionalmente, el bloqueo de PD-1 mediante uso de anticuerpos podría estar potenciando la actividad citotóxica mediada por linfocitos TCD8, permitiendo la proliferación de estas células y secreción de granzimas y perforinas, que desencadenarían una lisis de células tumorales<sup>(93)</sup>. Sin embargo, esta actividad citotóxica no pudo ser confirmada en los co-cultivos, siendo uno de los desafíos a evaluar y confirmar a futuro.

Dentro de los tratamientos con inmunoterapia en cáncer de vesícula biliar se ha reportado dos casos clínicos de interés. En uno de los cuales un paciente con recurrencia de GBC y metástasis y otro caso de colangiocarcinoma distal (CC) que no respondieron al tratamiento de primera línea con gemcitabina en combinación con cisplatino, en ambos casos 2 años posterior al tratamiento con Pembrolizumab los pacientes se reportaron sin signos de enfermedad ni recurrencia<sup>(53)</sup>. Además, a esto se suma otro estudio en un paciente con GBC recurrente y metastásico con una expresión de PD-L1 mayor al 50% en el tumor, el cual presentó una respuesta beneficiosa en tratamiento combinado de radioterapia y Nivolumab sin eventos adversos<sup>(60)</sup>. Estos reportes marcan un precedente de los beneficios de la inmunoterapia anti-PD-1 en pacientes GBC y, por lo tanto, fomentan el desarrollo de más estudios clínicos para evaluar la efectividad de respuesta a esta inmunoterapia. Además, destacan la relevancia de contar con modelos celulares para la evaluación y predicción de la respuesta a inmunoterapias que puedan robustecer y validar el uso de estas terapias en GBC. En este último punto, es donde este trabajo de tesis cobra relevancia, debido a que se generó un modelo de co-cultivo de organoides con células inmunes en donde se observó una respuesta diferencial ante la presencia de Nivolumab y Pembrolizumab, pudiendo este modelo convertirse en una prueba de concepto para la evaluación de efecto de la inmunoterapia con inhibidores de PD-1 en cáncer de vesícula biliar.

Considerando los reportes previos, la realización de los co-cultivos en presencia de los inhibidores se realizó utilizando organoides derivados de pacientes GBC y PBMC derivados de un control sano (allogénico). En relación a esto, hay que tener en consideración que existe la posibilidad de que las muestras puedan o no ser compatibles a nivel del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y tipo II. Por lo tanto, realizamos análisis de histocompatibilidad mediada por MHC-I, en colaboración Laboratorio de Medicina Traslacional de la FALP (Información Suplementaria). El alorreconocimiento desencadenado por las células hospederas puede ser disminuido o eliminado mediante la selección de un donante que sea histocompatible con el receptor. Para lograr esto se trata de administrar en la clínica, células que expresen el antígeno de MHC lo más similar posible al que se encuentra presente en el receptor<sup>(96)</sup>. Dentro de los resultados de histocompatibilidad, cabe señalar que los PBMC del control sano comparte al menos un alelo en HLA-A o HLA-B con las muestras 1573T, 1665T y 1788T. Por tanto, tendría un grado mayor de compatibilidad con estas muestras a diferencia de la muestra 1703T, la cual no comparte ningún alelo con el PBMC del control sano. Sin embargo, la muestra 1703T es homocigota tanto para HLA-A como HLA-B, en el HLA-A presenta los alelos A\*03/A\*03, mientras que, el PBMC presenta alelo A\*02/A\*02, en relación a esto, se debe considerar que ambos alelos se han descrito como altamente frecuente en un 35 a 55% de la población<sup>(97)</sup> y pueden tener menos alorreacción.

Dentro de los resultados una sola muestra de organoide, la 1703T, se logró evaluar el uso de inhibidores utilizando los PBMC proveniente de la sangre periférica del propio paciente (autólogo). Dentro de los resultados se observó que existieron diferencias en los porcentajes de subpoblaciones TCD4 y TCD8, entre la condición autólogo y allogénico. Así como también en la expresión de marcadores de activación CD69 y CD137. Los resultados discrepantes usando PBMC allogénico y autólogo creemos que podría estar relacionado a que el PBMC allogénico no comparte alelos de HLA-A y HLA-B a diferencia del autólogo que es completamente histocompatible, como también podría estar relacionado con el mecanismo de memoria inmunológica presente en la condición autóloga, que podría estar generando una respuesta T citotóxica disminuida.

En conclusión, creemos que este estudio aporta en la generación de un modelo de interacción entre los organoides tumorales derivados de pacientes con cáncer de vesícula biliar con células inmunes provenientes de control sano. En este modelo se utilizó organoides tumorales con caracterización de población de células fenotipo CSC y la expresión de correceptores de moléculas inmunomoduladoras PD-1, CTLA4 y LAG3, los cuales fueron co-cultivados con células inmunes allogénicas. Bajo esta condición, este modelo sirvió para evaluar las subpoblaciones de linfocitos TCD4 y TCD8, marcadores de activación y la presencia de *immune checkpoint* PD-1, CTLA4 y LAG3 presentes en estas células inmunes. Además, se pudo evaluar preliminarmente en este modelo el uso de inmunoterapia, con Nivolumab y Pembrolizumab, lo que genera como perspectiva futura el uso de esta plataforma de co-cultivo como una herramienta con potencial en la evaluación y/o futura predicción de la respuesta a la inmunoterapia en pacientes con la patología de cáncer de vesícula biliar.

## Capítulo 6 Bibliografía

1. Nemunaitis JM, Brown-Glabeman U, Soares H, Belmonte J, Liem B, Nir I, et al. Gallbladder cancer: review of a rare orphan gastrointestinal cancer with a focus on populations of New Mexico. *BMC Cancer*. 2018;18(1):665.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
3. Campbell PT, Newton CC, Kitahara CM, Patel AV, Hartge P, Koshiol J, et al. Body Size Indicators and Risk of Gallbladder Cancer: Pooled Analysis of Individual-Level Data from 19 Prospective Cohort Studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26(4):597-606.
4. Koshiol J, Yu B, Kabadi SM, Baria K, Shroff RT. Epidemiologic patterns of biliary tract cancer in the United States: 2001-2015. *BMC Cancer*. 2022;22(1):1178.
5. Koshiol J, Wozniak A, Cook P, Adaniel C, Acevedo J, Azocar L, et al. Salmonella enterica serovar Typhi and gallbladder cancer: a case-control study and meta-analysis. *Cancer Med*. 2016;5(11):3310-235.
6. Parra-Soto S, Petermann-Rocha F, Martinez-Sanguinetti MA, Leiva-Ordenez AM, Troncoso-Pantoja C, Ulloa N, et al. [Cancer in Chile and worldwide: an overview of the current and future epidemiological context]. *Rev Med Chil*. 2020;148(10):1489-95.
7. Roa I, Ibacache G, Munoz S, de Aretxabala X. Gallbladder cancer in Chile: Pathologic characteristics of survival and prognostic factors: analysis of 1,366 cases. *Am J Clin Pathol*. 2014;141(5):675-82.
8. salud Md. Colectomía Preventiva en Adultos de 35 a 49 años. In: Pública SdS, editor. Serie Guías Clínicas MINSAL2010.
9. Hu ZI, Lim KH. Evolving Paradigms in the Systemic Treatment of Advanced Gallbladder Cancer: Updates in Year 2022. *Cancers (Basel)*. 2022;14(5).
10. Lorenzo Bermejo J, Boekstegers F, Gonzalez Silos R, Marcelain K, Baez Benavides P, Barahona Ponce C, et al. Subtypes of Native American ancestry and leading causes of death: Mapuche ancestry-specific associations with gallbladder cancer risk in Chile. *PLoS Genet*. 2017;13(5):e1006756.
11. Espinoza JA, Bizama C, Garcia P, Ferreccio C, Javle M, Miquel JF, et al. The inflammatory inception of gallbladder cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1865(2):245-54.
12. Lee W, Chandan VS. Gallbladder carcinomas: review and updates on morphology, immunohistochemistry, and staging. *Hum Pathol*. 2023;132:149-57.
13. Zaidi MY, Maithel SK. Updates on Gallbladder Cancer Management. *Curr Oncol Rep*. 2018;20(2):21.
14. Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthony A, Maraveyas A, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med*. 2010;362(14):1273-81.
15. Javle M, Zhao H, Abou-Alfa GK. Systemic therapy for gallbladder cancer. *Chin Clin Oncol*. 2019;8(4):44.
16. Sutherland M, Ahmed O, Zaidi A, Ahmed S. Current progress in systemic therapy for biliary tract cancers. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2022;29(10):1094-107.

17. Lai J, Yang S, Lin Z, Huang W, Li X, Li R, et al. Update on Chemoresistance Mechanisms to First-Line Chemotherapy for Gallbladder Cancer and Potential Reversal Strategies. *Am J Clin Oncol*. 2023;46(4):131-41.
18. Yuan B, Zhao X, Wang X, Liu E, Liu C, Zong Y, et al. Patient-derived organoids for personalized gallbladder cancer modelling and drug screening. *Clin Transl Med*. 2022;12(1):e678.
19. Izadpanah A, Mohammadkhani N, Masoudnia M, Ghasemzad M, Saeedian A, Mehdizadeh H, et al. Update on immune-based therapy strategies targeting cancer stem cells. *Cancer Med*. 2023;12(18):18960-80.
20. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):275-91.
21. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645-8.
22. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 2013;27(1):13-24.
23. Zeng Z, Fu M, Hu Y, Wei Y, Wei X, Luo M. Regulation and signaling pathways in cancer stem cells: implications for targeted therapy for cancer. *Mol Cancer*. 2023;22(1):172.
24. Muller L, Tunger A, Plesca I, Wehner R, Temme A, Westphal D, et al. Bidirectional Crosstalk Between Cancer Stem Cells and Immune Cell Subsets. *Front Immunol*. 2020;11:140.
25. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. 2006;12(10):1167-74.
26. Li C, Wang C, Xing Y, Zhen J, Ai Z. CD133 promotes gallbladder carcinoma cell migration through activating Akt phosphorylation. *Oncotarget*. 2016;7(14):17751-9.
27. Gisina A, Kim Y, Yarygin K, Lupatov A. Can CD133 Be Regarded as a Prognostic Biomarker in Oncology: Pros and Cons. *Int J Mol Sci*. 2023;24(24).
28. Shi C, Tian R, Wang M, Wang X, Jiang J, Zhang Z, et al. CD44+ CD133+ population exhibits cancer stem cell-like characteristics in human gallbladder carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(11):1182-90.
29. Paijens ST, Vledder A, de Bruyn M, Nijman HW. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(4):842-59.
30. Pandya PH, Murray ME, Pollok KE, Renbarger JL. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *J Immunol Res*. 2016;2016:4273943.
31. Xu H, Jia Z, Liu F, Li J, Huang Y, Jiang Y, et al. Biomarkers and experimental models for cancer immunology investigation. *MedComm (2020)*. 2023;4(6):e437.
32. Fridman WH, Zitvogel L, Sautes-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(12):717-34.
33. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(3):203-13.
34. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.

35. Goeppert B, Frauenschuh L, Zucknick M, Stenzinger A, Andrulis M, Klauschen F, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer. *Br J Cancer*. 2013;109(10):2665-74.
36. Hou YC, Chao YJ, Hsieh MH, Tung HL, Wang HC, Shan YS. Low CD8(+) T Cell Infiltration and High PD-L1 Expression Are Associated with Level of CD44(+)/CD133(+) Cancer Stem Cells and Predict an Unfavorable Prognosis in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4).
37. Fabris L, Sato K, Alpini G, Strazzabosco M. The Tumor Microenvironment in Cholangiocarcinoma Progression. *Hepatology*. 2021;73 Suppl 1(Suppl 1):75-85.
38. Fluxa P, Rojas-Sepulveda D, Gleisner MA, Tittarelli A, Villegas P, Tapia L, et al. High CD8(+) and absence of Foxp3(+) T lymphocytes infiltration in gallbladder tumors correlate with prolonged patients survival. *BMC Cancer*. 2018;18(1):243.
39. Long L, Zhang X, Chen F, Pan Q, Phiphatwatchara P, Zeng Y, et al. The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes Cancer*. 2018;9(5-6):176-89.
40. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(5):275-87.
41. Hahn AW, Gill DM, Pal SK, Agarwal N. The future of immune checkpoint cancer therapy after PD-1 and CTLA-4. *Immunotherapy*. 2017;9(8):681-92.
42. Naimi A, Mohammed RN, Raji A, Chupradit S, Yumashev AV, Suksatan W, et al. Tumor immunotherapies by immune checkpoint inhibitors (ICIs); the pros and cons. *Cell Commun Signal*. 2022;20(1):44.
43. Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, Ferrone S, Masuyama K. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2011;33(2):208-15.
44. Di Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E, Sovena G, Clavenna D, Franzin A, et al. Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res*. 2010;16(3):800-13.
45. Wu Y, Chen M, Wu P, Chen C, Xu ZP, Gu W. Increased PD-L1 expression in breast and colon cancer stem cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017;44(5):602-4.
46. Zhi Y, Mou Z, Chen J, He Y, Dong H, Fu X, et al. B7H1 Expression and Epithelial-To-Mesenchymal Transition Phenotypes on Colorectal Cancer Stem-Like Cells. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135528.
47. Arce Vargas F, Furness AJS, Litchfield K, Joshi K, Rosenthal R, Ghorani E, et al. Fc Effector Function Contributes to the Activity of Human Anti-CTLA-4 Antibodies. *Cancer Cell*. 2018;33(4):649-63 e4.
48. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res*. 2009;69(7):3077-85.
49. Lipson EJ, Drake CG. Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(22):6958-62.
50. Wang XY, Zuo D, Sarkar D, Fisher PB. Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 as a new therapeutic approach for advanced melanoma. *Expert Opin Pharmacother*. 2011;12(17):2695-706.

51. Shu Y, Tang Y, Ding Y, Zhang Q. Cost-effectiveness of nivolumab versus sorafenib as first-line treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol.* 2023;122:110543.
52. Yau T, Zagonel V, Santoro A, Acosta-Rivera M, Choo SP, Matilla A, et al. Nivolumab Plus Cabozantinib With or Without Ipilimumab for Advanced Hepatocellular Carcinoma: Results From Cohort 6 of the CheckMate 040 Trial. *J Clin Oncol.* 2023;41(9):1747-57.
53. Alshari OM, Dawaymeh TA, Tashtush NA, Aleshawi AJ, Al Manasra ARA, Obeidat KA. Completely resolved advanced biliary tract cancer after treatment by pembrolizumab: a report of two cases. *Onco Targets Ther.* 2019;12:5293-8.
54. Ai L, Chen J, Yan H, He Q, Luo P, Xu Z, et al. Research Status and Outlook of PD-1/PD-L1 Inhibitors for Cancer Therapy. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:3625-49.
55. Aggarwal V, Workman CJ, Vignali DAA. LAG-3 as the third checkpoint inhibitor. *Nat Immunol.* 2023.
56. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(4):847-56.
57. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med.* 2016;375(9):819-29.
58. Lo JH, Agarwal R, Goff LW, Heumann TR. Immunotherapy in Biliary Tract Cancers: Current Standard-of-Care and Emerging Strategies. *Cancers (Basel).* 2023;15(13).
59. Zayac A, Almhanna K. Hepatobiliary cancers and immunotherapy: where are we now and where are we heading? *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2020;5:8.
60. Kong W, Wei J, Liu J, Qiu Y, Shi J, He J, et al. Significant benefit of nivolumab combining radiotherapy in metastatic gallbladder cancer patient with strong PD-L1 expression: a case report. *Onco Targets Ther.* 2019;12:5389-93.
61. Nagle PW, Plukker JTM, Muijs CT, van Luijk P, Coppes RP. Patient-derived tumor organoids for prediction of cancer treatment response. *Semin Cancer Biol.* 2018;53:258-64.
62. Bleijs M, van de Wetering M, Clevers H, Drost J. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J.* 2019;38(15):e101654.
63. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RG, Van Es JH, Van den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology.* 2011;141(5):1762-72.
64. Huang YP, Liu K, Wang YX, Yang Y, Xiong L, Zhang ZJ, et al. Application and research progress of organoids in cholangiocarcinoma and gallbladder carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2021;11(1):31-42.
65. Garcia P, Rosa L, Vargas S, Weber H, Espinoza JA, Suarez F, et al. Hippo-YAP1 Is a Prognosis Marker and Potentially Targetable Pathway in Advanced Gallbladder Cancer. *Cancers (Basel).* 2020;12(4).
66. Fitzgerald AA, Li E, Weiner LM. 3D Culture Systems for Exploring Cancer Immunology. *Cancers (Basel).* 2020;13(1).
67. Zhang H. 527 Tumor organoid and immune cell co-culture system potentiates immunoncology drug development. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* 2020;8.
68. Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, et al. Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell.* 2018;174(6):1586-98 e12.

69. Cattaneo CM, Dijkstra KK, Fanchi LF, Kelderman S, Kaing S, van Rooij N, et al. Tumor organoid-T-cell coculture systems. *Nat Protoc.* 2020;15(1):15-39.
70. Zhou G, Lieshout R, van Tienderen GS, de Ruiter V, van Royen ME, Boor PPC, et al. Modelling immune cytotoxicity for cholangiocarcinoma with tumour-derived organoids and effector T cells. *Br J Cancer.* 2022;127(4):649-60.
71. Klein E, Hau AC, Oudin A, Golebiewska A, Niclou SP. Glioblastoma Organoids: Pre-Clinical Applications and Challenges in the Context of Immunotherapy. *Front Oncol.* 2020;10:604121.
72. Wang C, Thudium KB, Han M, Wang XT, Huang H, Feingersh D, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(9):846-56.
73. Patnaik A, Kang SP, Rasco D, Papadopoulos KP, Ellassaiss-Schaap J, Beeram M, et al. Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2015;21(19):4286-93.
74. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86.
75. Kang CM, Choi GH, Park SH, Kim KS, Choi JS, Lee WJ, et al. Laparoscopic cholecystectomy only could be an appropriate treatment for selected clinical R0 gallbladder carcinoma. *Surg Endosc.* 2007;21(9):1582-7.
76. Ramalhosa F, Amaral MJ, Serodio M, Oliveira RC, Teixeira P, Cipriano MA, et al. Clinicopathological prognostic factors for gallbladder carcinoma: a retrospective study. *J Gastrointest Oncol.* 2022;13(4):1997-2006.
77. Saito Y, Muramatsu T, Kanai Y, Ojima H, Sukeda A, Hiraoka N, et al. Establishment of Patient-Derived Organoids and Drug Screening for Biliary Tract Carcinoma. *Cell Rep.* 2019;27(4):1265-76 e4.
78. Wang Z, Guo Y, Jin Y, Zhang X, Geng H, Xie G, et al. Establishment and drug screening of patient-derived extrahepatic biliary tract carcinoma organoids. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):519.
79. Wu Z, Miao X, Zhang Y, Li D, Zou Q, Yuan Y, et al. XRCC1 Is a Promising Predictive Biomarker and Facilitates Chemo-Resistance in Gallbladder Cancer. *Front Mol Biosci.* 2020;7:70.
80. Zhang GF, Wu JC, Wang HY, Jiang WD, Qiu L. Overexpression of microRNA-205-5p exerts suppressive effects on stem cell drug resistance in gallbladder cancer by down-regulating PRKCE. *Biosci Rep.* 2020;40(9).
81. Sangsuwannukul T, Supimon K, Sujitjoo J, Phanthaphol N, Chieochansin T, Pongvarin N, et al. Anti-tumour effect of the fourth-generation chimeric antigen receptor T cells targeting CD133 against cholangiocarcinoma cells. *Int Immunopharmacol.* 2020;89(Pt B):107069.
82. Obreque J, Vergara-Gomez L, Venegas N, Weber H, Owen GI, Perez-Moreno P, et al. Advances towards the use of gastrointestinal tumor patient-derived organoids as a therapeutic decision-making tool. *Biol Res.* 2023;56(1):63.
83. Mansour FA, Al-Mazrou A, Al-Mohanna F, Al-Alwan M, Ghebeh H. PD-L1 is overexpressed on breast cancer stem cells through notch3/mTOR axis. *Oncoimmunology.* 2020;9(1):1729299.
84. Lee Y, Shin JH, Longmire M, Wang H, Kohrt HE, Chang HY, et al. CD44+ Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Suppress T-Cell-Mediated Immunity by Selective Constitutive and Inducible Expression of PD-L1. *Clin Cancer Res.* 2016;22(14):3571-81.
85. Yang Y, Wu KE, Zhao E, Li W, Shi L, Xie G, et al. B7-H1 enhances proliferation ability of gastric cancer stem-like cells as a receptor. *Oncol Lett.* 2015;9(4):1833-8.

86. Patil PA, Lombardo K, Cao W. Immune Microenvironment in Gallbladder Adenocarcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2021;29(8):557-63.
87. Keenan BP, McCarthy EE, Ilano A, Yang H, Zhang L, Allaire K, et al. Circulating monocytes associated with anti-PD-1 resistance in human biliary cancer induce T cell paralysis. *Cell Rep*. 2022;40(12):111384.
88. Zhou G, Sprengers D, Mancham S, Erkens R, Boor PPC, van Beek AA, et al. Reduction of immunosuppressive tumor microenvironment in cholangiocarcinoma by ex vivo targeting immune checkpoint molecules. *J Hepatol*. 2019;71(4):753-62.
89. Neal JT, Li X, Zhu J, Giangarra V, Grzeskowiak CL, Ju J, et al. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*. 2018;175(7):1972-88 e16.
90. Elsayed A, Pellegrino C, Pluss L, Peissert F, Benz R, Ulrich F, et al. Generation of a novel fully human non-superagonistic anti-CD28 antibody with efficient and safe T-cell co-stimulation properties. *MAbs*. 2023;15(1):2220839.
91. Bonyhadi M, Frohlich M, Rasmussen A, Ferrand C, Grosmaire L, Robinet E, et al. In vitro engagement of CD3 and CD28 corrects T cell defects in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol*. 2005;174(4):2366-75.
92. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2):465-72.
93. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(11):651-68.
94. Saude-Conde R, Nguyen D, Hendlisz A. Immunotherapies in non-metastatic gastrointestinal cancers. *Curr Opin Oncol*. 2023;35(4):334-46.
95. Payandeh Z, Khalili S, Somi MH, Mard-Soltani M, Baghbanzadeh A, Hajiasgharzadeh K, et al. PD-1/PD-L1-dependent immune response in colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2020;235(7-8):5461-75.
96. Kamm JL, Parlane NA, Riley CB, Gee EK, Dittmer KE, McIlwraith CW. Blood type and breed-associated differences in cell marker expression on equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells including major histocompatibility complex class II antigen expression. *PLoS One*. 2019;14(11):e0225161.
97. Sette A, Sidney J. Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics*. 1999;50(3-4):201-12.
98. Broutier L, Mastrogiovanni G, Verstegen MM, Francies HE, Gavarro LM, Bradshaw CR, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med*. 2017;23(12):1424-35.

## Capítulo 7 Información Suplementaria

### 7.1 Metodología

#### 7.1.1 Evaluación de Linfocitos T y T reguladores en PBMC de pacientes GBC y GST

Se trabajo con muestras de PBMC extraídos previamente por el Biobanco de Tejidos y Fluidos de la facultad de Medicina UC. Los PBMC se obtuvieron desde muestra de sangre periférica proveniente de pacientes con GBC y GST reclutados en el Biobanco previa firma del consentimiento informado. Una vez obtenido los PBMC fueron almacenados a -80°C, hasta su uso en este objetivo del proyecto ESCALON (Horizon 2020, n°825510). El protocolo de descongelación fue el estandarizado por el Laboratorio del Dr. Andree Boonstra, que se basa en descongelar rápidamente la muestra en baño termostático a 37°C, posteriormente traspasar las células a un tubo con 3 mL de FBS y posteriormente centrifugar a 1500 rpm por 5 min. Posteriormente se obtuvo un pellet celular que se resuspendió en 2 mL de medio RPMI-10%FBS y 1x Penicilina/estreptomina. Se procedió a contar las células utilizando cámara de Neubauer y azul trypan. Una vez obtenido el número de células se separó células para la evaluación a tiempo 0 (t cells y Treg) y células para ser cultivadas que se detallan en el **punto 7.1.2**.

Para evaluación de linfocitos T y T reguladores en pacientes GBC y GST se utilizaron 500.000 células por mix de cada muestra. Todos los mix fueron realizados en PBS (Buffer fosfato salino) 1x con FBS al 1%, de cada mix se adiciono 50 µL del mix correspondiente. En la **Tabla Suplementaria 1**, se encuentran los detalles de los anticuerpos utilizados para la caracterización de los linfocitos TCD4 y TCD8.

Para el mix de Treg, se utilizó el kit BD Cytotfix/Cytoperm (BD, Biosciences), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, los detalles de los anticuerpos utilizados se encuentran en la **Tabla Suplementaria 2**.

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Dilución
CD4	PerCp	Oct04	1:150
CD56	APC	N901	1:100
CD3	FITC	UCHT1	1:100
CD8	APC-H7	SK1	1:100
CTLA4	BV785	BNI3	1:100
CD69	PeCy7	TP1.55.3	1:50
PD-1	BV421	EH12.2H7	1:80
Tim3	PE	344823	1:20

**Tabla Suplementaria 1:** Mix T cell, lista de anticuerpos utilizados para evaluar linfocitos T en muestras de pacientes GBC y GST mediante citometría de flujo

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Dilución
CD62L	PeCy7	DREG-56	1:500
CD4	PerCp	Oct04	1:150
CD3	FITC	UCHT1	1:100
CD8	APC-H7	SK1	1:100
CTLA4	BV785	BNI3	1:100
PD-1	BV421	EH12.2H7	1:80
CD25	PE	M-A251	1:40
FoxP3	APC	PCH101	1:10

**Tabla Suplementaria 2:** Mix T reguladores, lista de anticuerpos utilizados para evaluar linfocitos T en muestras de pacientes GBC y GST mediante citometría de flujo

### 7.1.2 Cultivo de Linfocitos T y evaluación de Activación

Los PBMC fueron descongelados como se detalla en el **punto 7.1.1**, las células fueron llevadas a una concentración de  $2 \times 10^6$  cells/mL en medio RPMI 10%FBS, 1X P/S, fueron sembrados en placa de 96 pocillos, tomando 100  $\mu$ L de la suspensión celular y se cultivó en cada pocillo considerando duplicado para cada condición (Basal y activado), se consideró el número necesarios de pocillos para evaluar los 3 mix de anticuerpos a (T cell, T reg y citoquinas). Datos no mostrados.

### 7.1.3 Efecto de IFN- $\gamma$ en organoides

La muestra 1573T se utilizó para evaluar el efecto de IFN- $\gamma$  en los organoides, con una confluencia del 80%, se eliminó el medio y el organoide fue tratado con 500  $\mu$ L de cell recovery (Corning) e incubado por 30 minutos a 4°C, luego se tomaron las células se traspasaron a un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 300 g por 5 minutos, posteriormente el pellet se lavó con 1 mL de DPBS 1x, se centrifugó nuevamente, finalmente el pellet de células se respondió en 500  $\mu$ L de Medio de Vesícula tumoral y se adicionó 200 ng/mL de IFN- $\gamma$  y se dejó en cultivo por 24hrs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se tomaron las células y se traspasaron a un microtubo de 1.5 mL y se centrifugaron a 300 g por 5 min a 4°C, el pellet se lavó con 1mL de DPBS-FBS2% posteriormente se centrifugaron a 300 g por 5 min e incubados con el mix de anticuerpos como se detalla en el protocolo de citometría en la metodología de la tesis, los anticuerpos utilizados se encuentran detallados en la **Tabla Suplementaria 3**.

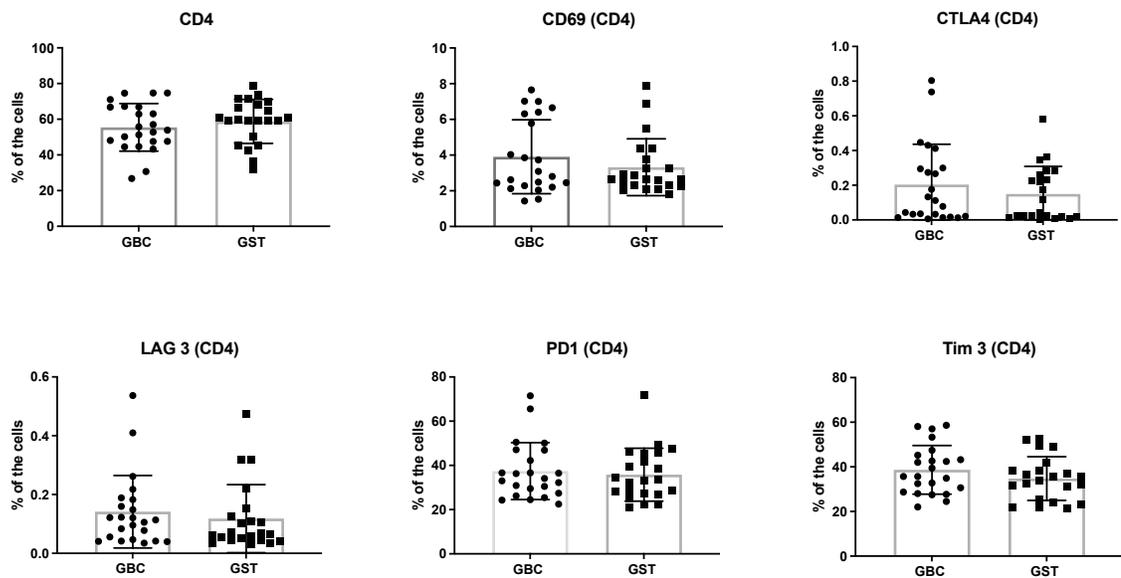
Anticuerpo	Fluoróforo	Dilución	Clon	Isotipo	Catalogo
CD44	FITC	1:100	BJ18	mouse	338804
CD133	APC	1:100	Clon 7	mouse	372806
MHC-I	BV510	1:100	W6/32	mouse	311436

**Tabla Suplementaria 3:** Mix de anticuerpos para evaluar organoides, todos corresponden a la marca Biolegend.

## 7.2 Resultados

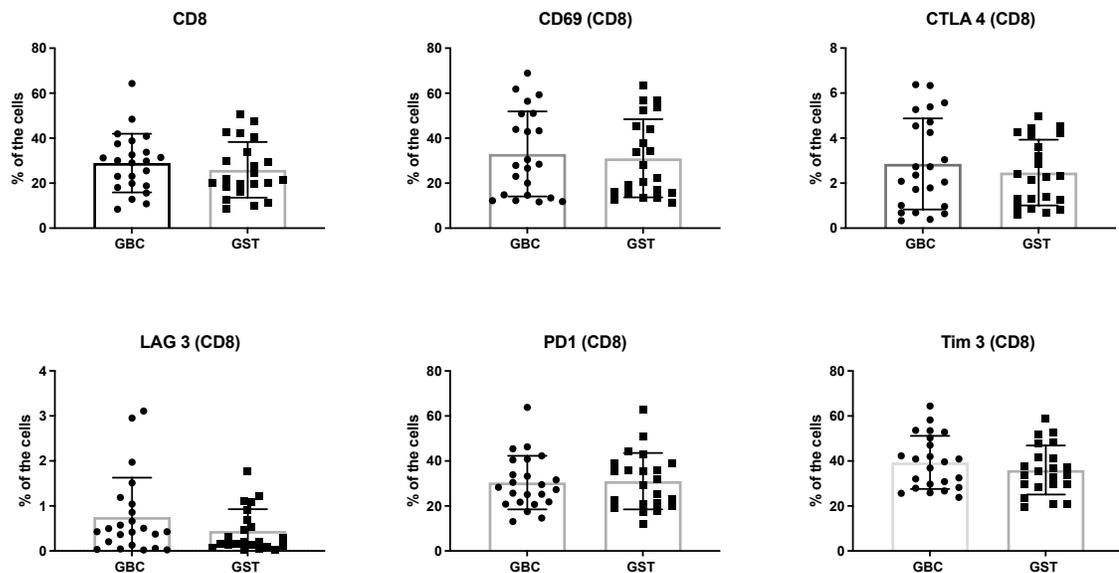
### 7.2.1 Evaluación de linfocitos T en población GBC y GST

Se determino el porcentaje de la subpoblación TCD4 presente en las muestras de 23 pacientes con GBC y 22 pacientes con GST obtenidas previamente por el Biobanco de Tejidos y Fluidos de la facultad de Medicina UC. Se observa que los pacientes con GBC tienen un porcentaje promedio de 55% de subpoblación CD4 y los pacientes con GST presentan un promedio de 58%, mostrando valores similares entre las muestras, sin presentar diferencias significativas, pero se observa variabilidad entre las muestras (**Figura Suplementaria 1**). A partir de la subpoblación TCD4 se evaluó el marcador de activación CD69, donde se observan células positivas en ambas muestras, pero con porcentajes promedios cercanos al 4%, pero abarcando un rango entre 2 y 8% entre las diferentes muestras. Adicionalmente, se determino el porcentaje de células positivas para los *immune checkpoint*, donde se observa que CTLA4 tiene valores muy bajos, menores al 1% igualmente se grafico, para LAG3 se observa que presenta valores menores al 0,6% por tanto cercanos a 0 en todas las muestras evaluadas, en cuanto a PD-1 se observa que todos los pacientes son positivos para la expresión de PD-1 en la población TCD4, los pacientes con GBC presentan un porcentaje promedio de 37% mientras que los pacientes con GST tienen un porcentaje promedio de 35%, valores similares y que no presentan diferencias significativas, en cuanto a TIM3 se observa que las muestras de GBC alcanzan un porcentaje promedio de 39%, mientras que el de las muestras GST expresa 6% menos alcanzando un 33% de TIM3 positivo en la subpoblación TCD4.



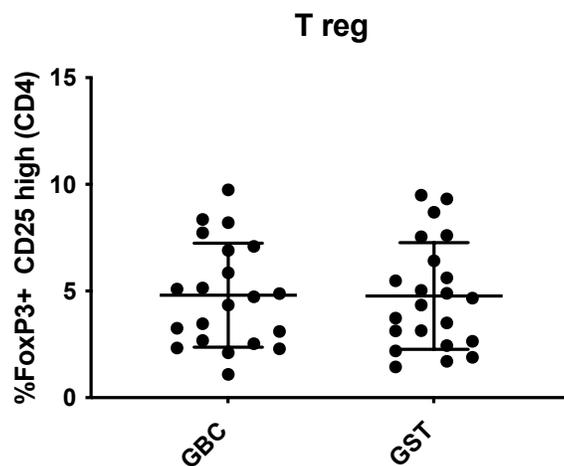
**Figura Suplementaria 1:** Caracterización de la subpoblación TCD4, marcador de activación CD69 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3, PD-1 y TIM3 en muestras de PBMC provenientes de pacientes GBC y pacientes GST mediante citometría de flujo. N GBC = 23 y N GST=22. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \*  $p > 0.05$  / \*\* $p < 0.01$  mediante test estadístico T-test.

En las mismas muestras se determino la subpoblación de TCD8 como se muestra en la **Figura Suplementaria 2**, donde se observa que los pacientes GBC presentan un 28% de células TCD8 mientras que los pacientes GST presentan un porcentaje promedio de 25%, pero sin diferencias significativas. En cuanto a la activación de linfocitos, se evaluó el marcador CD69, ambos presentan porcentajes promedios cercanos al 30% sin observar diferencia entre las cohortes de pacientes GBC y GST. Sin embargo, se observa dispersión entre las muestras provenientes de cada cohorte, en el caso de GBC presenta porcentajes que varían entre 11 y 68% entre las muestras, en el caso de las muestras de GST esta variación es entre 11 y 64% de células positivas para CD69 dentro de la subpoblación TCD8. También se determinó la expresión de los *immune checkpoint*, donde se observa que CTLA4 expresa valores con promedios de 2% tanto para las muestras provenientes de pacientes con GBC como GST, para LAG3 los porcentajes promedios son menores a 1 en ambas cohortes, se observa que dentro de las muestras de pacientes GBC al menos 6 muestras presenta porcentajes que superan el 1% de células positivas y se encuentran en un rango entre 1 y 4% de expresión, en el caso de las muestras de pacientes GST presentan solo 4 muestras que se encuentran entre un 1 y 2% de células positivas. Cuando se evaluó PD-1 se observo que los pacientes con GBC y GSTs presentan expresión de la molécula, con una expresión promedio de 30% de células positivas para PD-1 dentro del total de la subpoblación TCD8, finalmente la determinación de TIM3 también es positiva en las muestras GBC y GST, presentando porcentaje promedio de 39% en las muestras provenientes de pacientes con GBC y de 35% en las muestras provenientes de los pacientes con GSTs.



**Figura Suplementaria 2:** Caracterización de la subpoblación TCD8, marcador de activación CD69 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3, PD-1 y TIM3 en muestras de PBMC provenientes de pacientes GBC y pacientes GST mediante citometría de flujo. N GBC = 23 y N GST=22. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma Versión 9. \*p<0,05/ \*\*p<0,01.

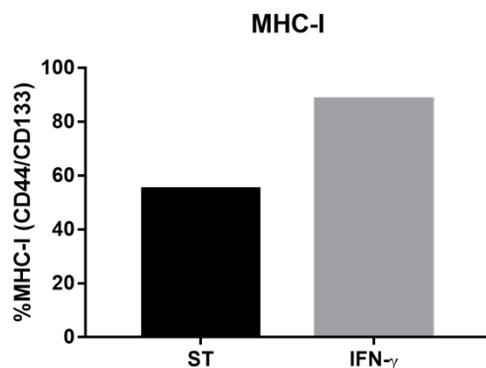
Dentro de la caracterización de los linfocitos circulantes descrita previamente, se determino la presencia de linfocitos T reguladores (Treg), la cual fue definida a partir de la población CD3+/CD4+, se evaluó la población que además expresa los marcadores CD25 y FoxP3 en las muestras de pacientes GBC y GST (**Figura Suplementaria 3**). Dentro de lo resultados obtenidos se observa que las muestras provenientes de pacientes GBC presentan un porcentaje promedio de 4,8% de población Treg con una dispersión entre las muestras con porcentajes que varían entre un 1% y 10% de población positiva, en cuanto a las muestras GST se observa que presentan un promedio de población Treg de 4,7% en promedio, pero se observa una variabilidad entre las muestras igualmente que varían entre un 1% y 10%, sin diferencias significativas entre las poblaciones de GBC y GST para la población de Treg.



**Figura Suplementaria 3:** Caracterización de la subpoblación de Treg, a partir de la subpoblación TCD4, se evaluó la población que expresa CD25high y FoxP3 positivo, en muestras de PBMC provenientes de pacientes GBC y pacientes GST mediante citometría de flujo. N GBC = 23 y N GST=22. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \* p> 0.05 / \*\*p< 0.01 mediante test estadístico T-test.

### 7.2.2 Efecto de tratamiento de IFN- $\gamma$ en la expresión de MHC-I

La muestra 1573T se utilizó para evaluar el efecto de IFN- $\gamma$  en los organoides, para lo cual el organoide fue tratado con 200 ng/mL de IFN- $\gamma$  y se dejó en cultivo por 24hrs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente se realizó una citometría de flujo, donde se determino el porcentaje de células positivas para MHC-I a partir de la población tipo CSC CD44+/CD133+. Como se observa en la **Figura Suplementaria 4**, cuando la muestra es tratada con IFN- $\gamma$ , se observa un aumento de 20% las células positivas para MHC-I, se ha reportado que el aumento de MHC-I mediado por la presencia de IFN- $\gamma$ , podría favorecer la presentación antigénica mediada por MHC-I a las células TCD8<sup>(68)</sup>, por tanto se decide realizar los co-cultivos con organoides sin tratar y previamente tratados con IFN- $\gamma$ .

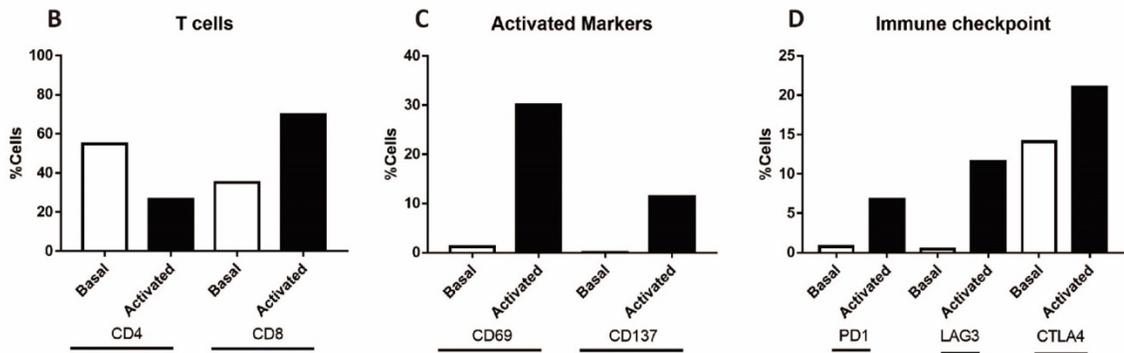
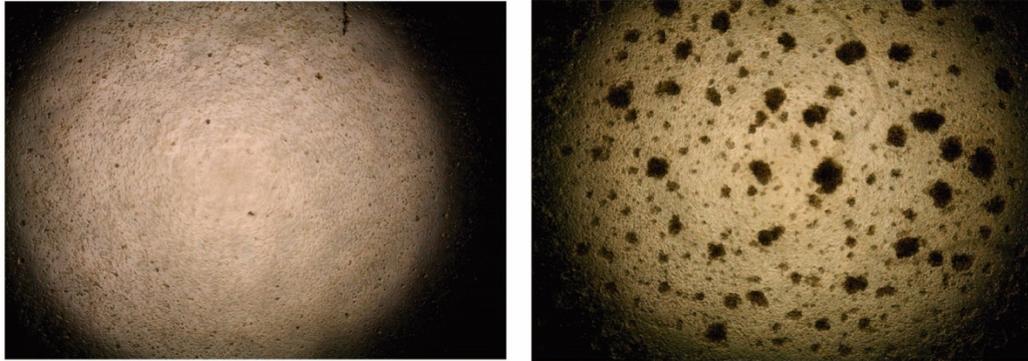


**Figura Suplementaria 4:** Determinación del efecto de IFN- $\gamma$  en la expresión de MHC-I mediante citometría de flujo. Muestra 1573T analizando la subpoblación CD44+/CD133+ donde se determinó el porcentaje de MHC-I positivo. Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9.

### 7.2.3 Evaluación de la activación y expresión de immune checkpoint en linfocitos TCD4 y TCD8

Como se mencionó previamente en el **punto 3.2.1 y Punto 3.2.2**, se realizaron pruebas de obtención de PBMC, cultivo y activación de PBMC donde se evaluó la expresión de marcadores de activación y expresión de *immune checkpoint*. En la **Figura Suplementaria 5**, se observa una fotografía de microscopía en campo claro representativa de PBMC en condición basal y activados. En la condición de activación se puede distinguir claramente agrupamiento de linfocitos proliferando en respuesta al estímulo de activación. Además, en la **Figura Suplementaria 5**, se observa el análisis de las subpoblaciones TCD4 y TCD8, en esta última se observa un incremento en el porcentaje de la población desde un 35% a un 70% desde la condición de PBMC basal a activado. A partir de la subpoblación T CD8 se analizó la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD137 observando un aumento de la población positiva para CD69 de 1 al 30% para y un aumento de 10% de células positivas para CD137 de la condición PBMC activado comparado con la condición basal. Se evaluó la expresión de los *immune checkpoint* PD-1, LAG3 y CTLA4 en la subpoblación T CD8, donde se observó un aumento de 10% en la población PD-1, un 15% en la población LAG3 y un 5% de la población CTLA4 en la condición de PBMC activados en comparación a la condición PBMC basal.

A

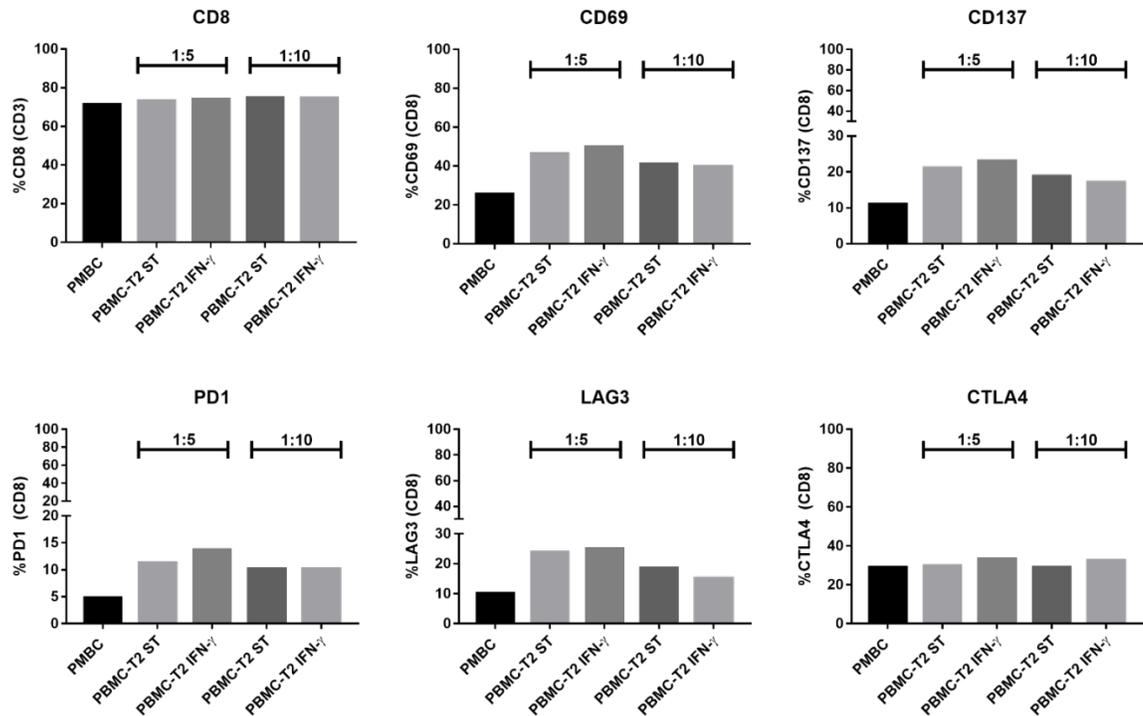


**Figura Suplementaria 5:** Caracterización de muestra control sano de PBMC basal y activado con anti-CD3/CD28. A) Imagen representativa campo claro 4X del cultivo PBMC basal y activado; B) Análisis de la subpoblación de CD4 y CD8 presentes en el PBMC basal y activado; C) Evaluación de los marcadores de activación CD69, CD137 en TCD8 y D) Expresión de PD-1, LAG3 y CTLA4 en los TCD8 en condición basal y activados mediante citometría de flujo. Los datos representan el promedio de 1 experimento de estandarización realizado en triplicado técnico.

#### 7.2.4 Estandarización proporciones de co-cultivo y tiempos en co-cultivo de Organoides con PBMC.

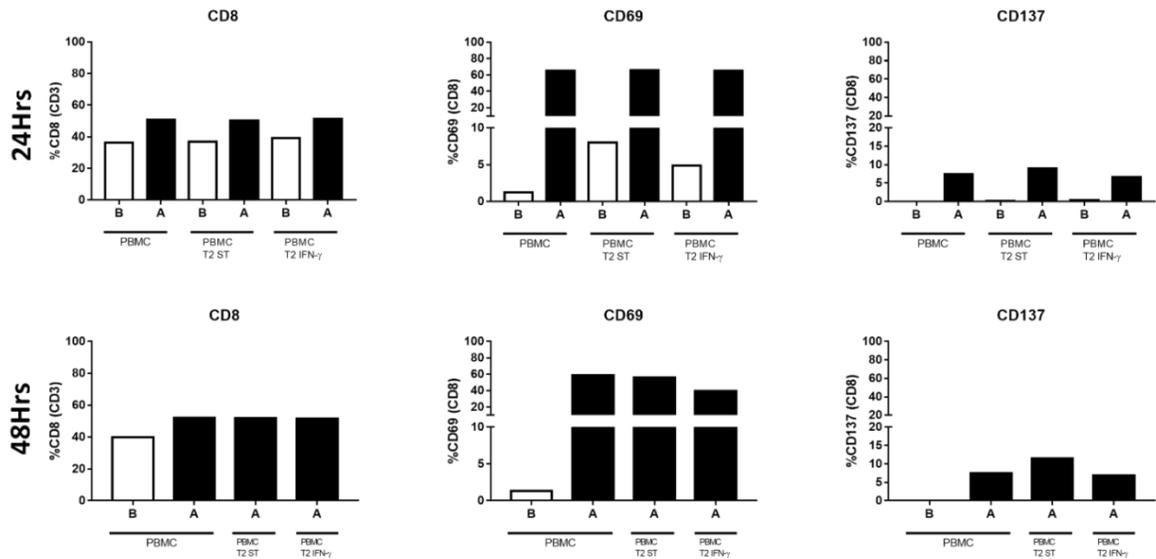
Posteriormente se realizó el co-cultivo donde se evaluó la proporción organoide:PBMC, evaluando 1:5 y 1:10. De acuerdo con los resultados obtenidos en la **Figura Suplementaria 6** se muestra la comparación de los PBMC solos y los PBMC-ORG ST y PBMC-ORG+IFN- $\gamma$  en la proporción 1:5 y 1:10 para la condición de activados. Cuando se realizó el co-cultivo en proporción de 1:5 se observó un aumento del 20% de la expresión de CD69 cuando los PBMC están en presencia de los organoides (ST o IFN- $\gamma$ ), comparados con la condición de solo PBMC. En relación con el marcador CD137, la condición PBMC:ORG ST y PBMC:ORG+IFN- $\gamma$  presentó un aumento del 10% de la población CD137 en la población TCD8, en comparación con los PBMC solos. Los porcentajes de ambos marcadores CD69 y CD137 son menores cuando el co-cultivo se realizó en la proporción 1:10 aumentando menos del 10% para CD69 y para CD137 independiente del tratamiento del organoide. Para los *immune checkpoint* se mantuvo esta diferencia donde el co-cultivo en proporción 1:5 de PBMC:ORG presentó un 5% de aumento en

la expresión PD-1 y un 10% en la expresión de LAG3. Sin embargo, en la proporción de 1:10, las diferencias en el incremento de expresión de estos marcadores fueron menor comparados con la proporción 1:5.



**Figura Suplementaria 6:** Caracterización de la subpoblación TCD8 y la expresión de marcadores de activación (CD69 y CD137), marcadores de los *immune checkpoint* (PD-1, LAG3 y CTLA4) mediante citometría de flujo de las condiciones de co-cultivo activados en proporción Organoide:PBMC 1:5 y 1:10. PBMC solo activado (PBMC) co-cultivo de PBMC + organoide T2 (PBMC T2 ST) y co-cultivo de PBMC + organoide T2 +IFN-γ (PBMC T2 IFN-γ). Los datos representan el promedio de 1 experimento de estandarización realizado en triplicado técnico.

Adicionalmente, se evaluó la realización del co-cultivo a diferentes tiempos considerando 24 hrs y 48 hrs y 72hrs de co-cultivo. Como se observa en la **Figura Suplementaria 7**, los marcadores de activación CD69 presenta porcentajes cercanos al 60% en TCD8 en todas las condiciones evaluadas y CD137 presentó un porcentaje cercano al 10% en TCD8 a las 24 hrs sin observar cambio entre las condiciones de PBMC solos y los PBMC-T2. Cuando se evaluó la activación a las 48hrs se observan porcentajes variables, pero no se logran replicar as diferencias obtenidas a las 72 hrs de co-cultivo (previamente evaluadas, **Figura Suplementaria 5**). En cuanto a la expresión de *immune checkpoint* también presentan porcentajes similares entre las condiciones evaluadas a las 24 y 48hrs **Figura Suplementaria 7**.

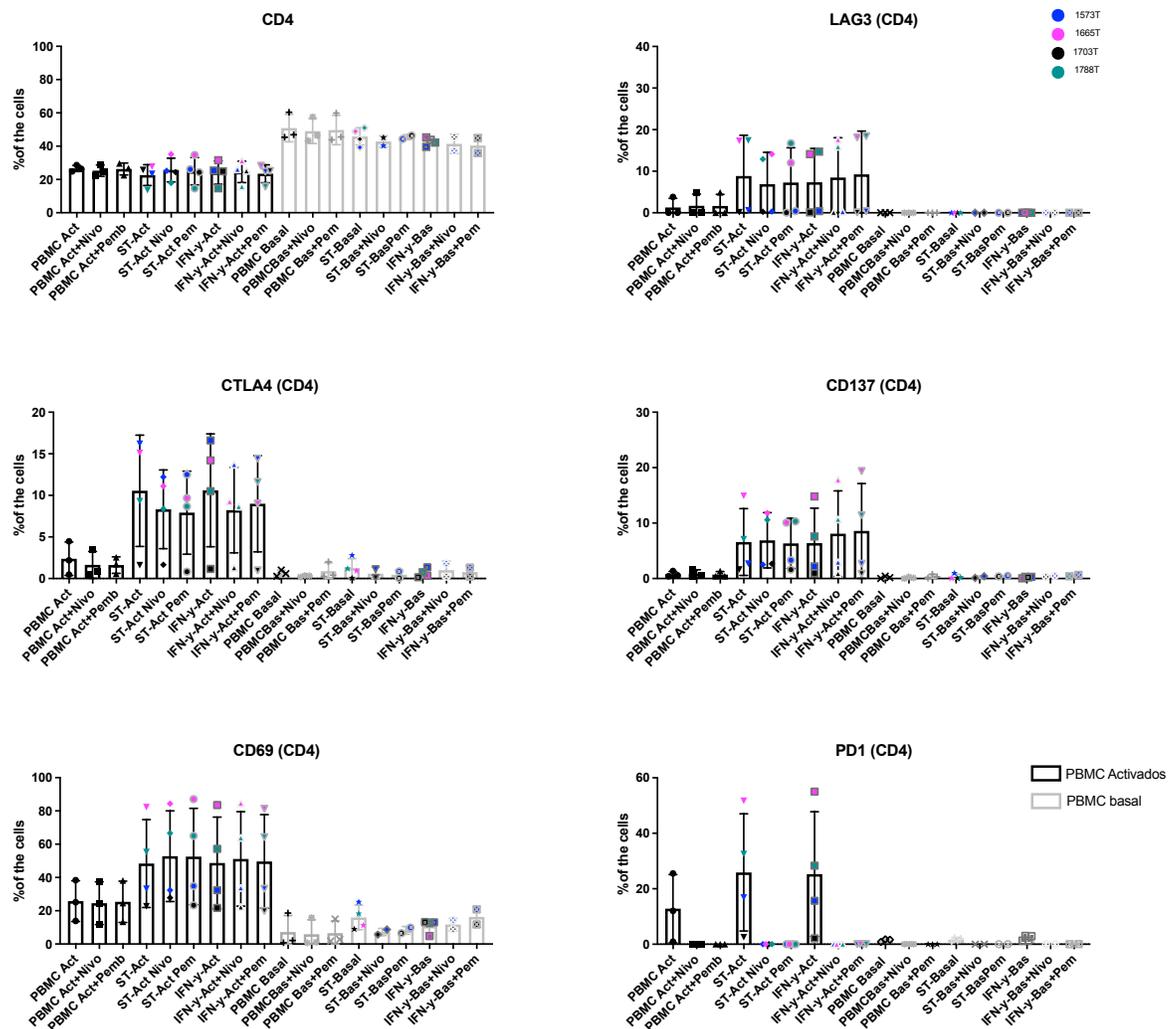


**Figura Suplementaria 7:** Evaluación mediante citometría de flujo de linfocitos TCD8 en co-cultivo realizado en proporción 1:5 evaluados a las 24hrs y 48hrs. A partir de la población TCD8 se evaluó los marcadores de activación CD69 y CD137 comparando la condición PBMC solos con los co-cultivo de organoide T2 y PBMC. (B=PBMC Basal; A=PBMC Activado). Los datos representan el promedio de 1 experimento de estandarización realizado en triplicado técnico.

De acuerdo a los resultados de estandarización, se definió trabajar con una proporción 1:5 entre organoides y PBMC, realizar una activación previa de los PBMC con anti-CD3/anti-CD28 por 72hrs e incubación del co-cultivo durante 72hrs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Adicionalmente, se ha reportado por Zhou et al <sup>(70)</sup> la recomendación de utilizar matriz extracelular (matrigel) con un porcentaje máximo de 10%. Además, nuestra experiencia previa en el laboratorio donde hemos realizado ensayos de testeo masivo de drogas en organoides de GBC se han realizado en la presencia de matrigel al 2% de acuerdo a Broutier <sup>(98)</sup>. Por lo tanto, en base a estos antecedentes, se determinó realizar los co-cultivos en presencia de matrigel 2% con el objetivo de mantener la organización 3D de los organoides y no interferir con la interacción con los linfocitos T.

### **7.2.5 Evaluación de la respuesta de linfocitos T en Co-cultivo de organoides GBC y PBMC de control sano en presencia de inhibidores Nivolumab o Pembrolizumab**

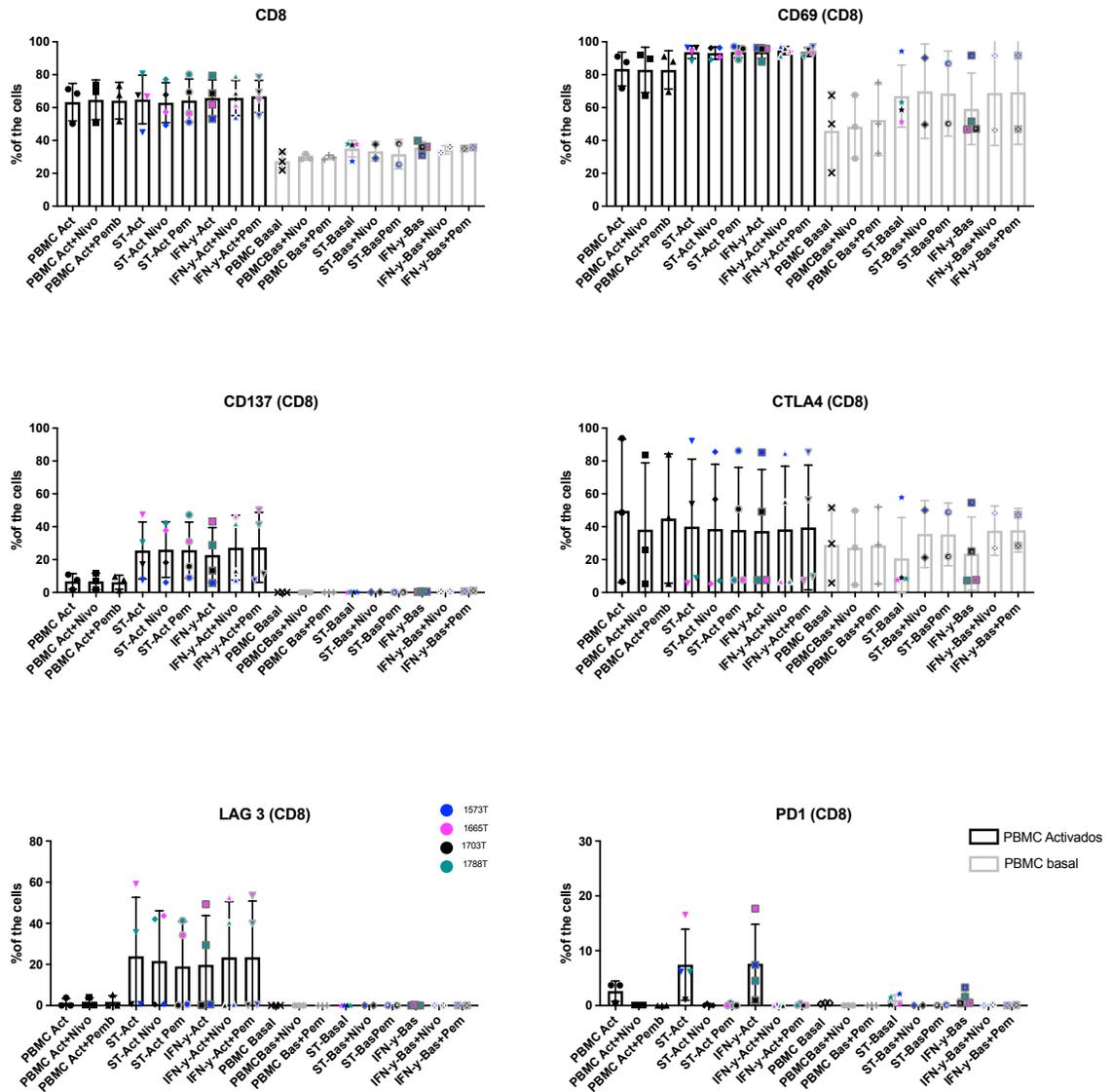
Dentro del objetivo 3, se determinó la activación de los linfocitos T en un co-cultivo de organoides derivados de pacientes GBC y PBMC provenientes de un control sano, como se mencionó en el escrito para optimizar la presentación de los resultados, en el escrito se mostraron los gráficos las condiciones de co-cultivo con los PBMC previamente activados. Sin embargo, los ensayos se realizaron tanto en condición de PBMC previamente activados (Barras negras) como PBMC basal (Barras grises), adicionalmente se utilizó como control experimental PBMC solos, es decir sin presencia de organoides, tanto para la condición basal como activados. Adicionalmente, se evaluó el efecto de los inhibidores Nivolumab y Pembrolizumab en las subpoblaciones TCD4 y TCD8, evaluando marcadores de activación CD69 y CD137 y la expresión de los *immune checkpoint* PD-1, CTLA4 y LAG3. Como se observa en la **Figura Suplementaria 8 y 9**, cuando los PBMC solos son tratados con Nivolumab o Pembrolizumab los porcentajes de TCD4 como de TCD8 se mantienen iguales a la condición sin inhibidores, en cuanto a los marcadores de activación y expresión de *immune checkpoint*, se observan perfiles similares en los PBMC solos y con inhibidores. Para PD-1 se observa que en la presencia de Nivolumab o Pembrolizumab, no se puede evaluar la expresión de PD-1, esto se correlaciona con el bloqueo que producen los inhibidores en esta molécula, por tanto, es una unión específica y que se mantiene con los días, y por tanto se observa su bloqueo. Cada muestra tiene un color diferente para poder distinguir dentro de los tratamientos, dada por la alta variabilidad entre las muestras. Dentro de la subpoblación TCD4 se observa que para el marcador de activación CD69 este aumenta en la condición PBMC activadas, y el porcentaje aumenta en promedio al doble cuando están presente los organoides, especialmente con la muestra 1665T y 1788T, para el otro marcador de activación CD137 también se observa un aumento de este marcador en la presencia de los organoides logrando un aumento al 10% de células positivas cuando el organoide es el 1665T o 1788T. Adicionalmente, se observa un incremento de la población CD137 positiva cuando en la muestra 1788T esta en presencia de los inhibidores Nivolumab o Pembrolizumab. En cuando a los *immune checkpoint*, se observa que en los PBMC activados estos aumentan con respecto a la condición Basal, pero cuando se encuentran en presencia de los organoides estos porcentajes aumentan aun más, pero debido a la variabilidad entre las muestras no se pueden observar diferencias significativas. Dentro de las muestras se observa que 1665T es una de las que presenta mayor aumento en los porcentajes de células positivas en todos los marcadores evaluados e inclusive la que expresa más PD-1 en la subpoblación TCD4.



**Figura Suplementaria 8:** Caracterización de la subpoblación TCD4, marcadores de activación CD69, CD137 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC de control, en presencia o no de inhibidores de PD-1 mediante citometría de flujo. Condición de los cultivos: organoides sin tratamiento previo con IFN- $\gamma$  (ST), organoides tratados con IFN- $\gamma$  previo al co-cultivo (IFN- $\gamma$ ), co-cultivo sin inhibidores (-), co-cultivo tratado con Nivolumab (+Nivo), co-cultivo tratado con Pembrolizumab (+Pem). "n" biológico = 4 muestras 1573T (azul), 1665T (magenta), 1703T (negra) y 1788T (verde). Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \* p > 0.05 / \*\* p < 0.01 mediante test estadístico T-test.

Dentro del objetivo también se evaluó la subpoblación TCD8, la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD137, como también los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1. Como se observa en la **Figura Suplementaria 9**, la subpoblación TCD8 total aumenta cuando los PBMC son previamente activados (barras negras) independiente de la condición evaluada. En cuanto a los marcadores de activación para CD69 se observa un aumento en la condición de PBMC solo activados previamente, la cual se mantiene y aumenta al 100% en la presencia de los organoides, independiente del tratamiento con IFN- $\gamma$  o la presencia de inhibidores. Cuando se observa CD137 en la subpoblación TCD8, vemos que en la condición de

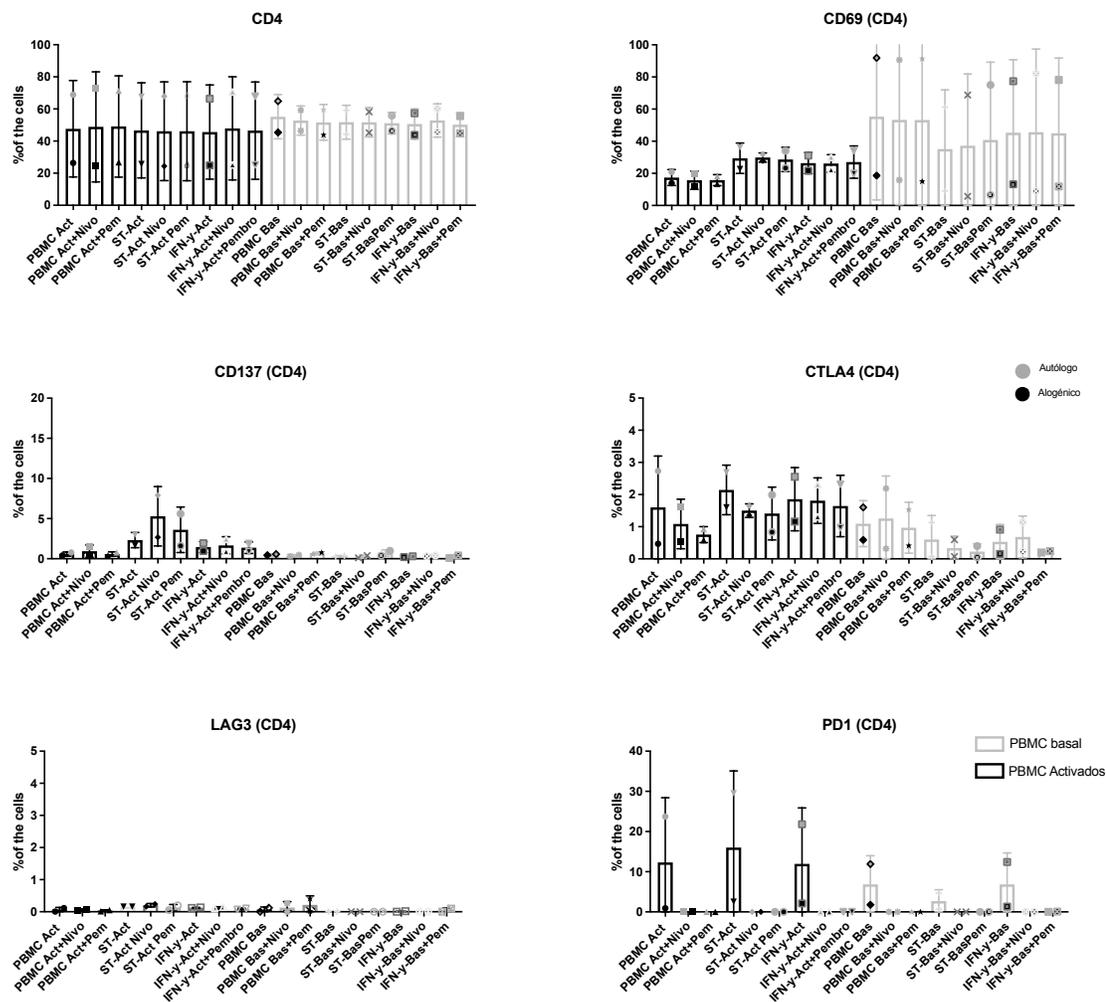
PBMC solos previamente activados el porcentaje promedio es cercano al 7%, cuando los co-cultivos están en presencia de los organoides este porcentaje llega a un 25% promedio, sin observar diferencias significativas por la variabilidad entre las muestras. Sin embargo, se observa que 1665T y 1788T son los que presentan porcentajes mas altos, sobre el promedio del 20%, adicionalmente, se observa en la muestra 1788T, que en presencia de los inhibidores Nivolumab o Pembrolizumab el porcentaje de CD137 aumenta un 10% con respecto a la condición sin inhibidores tanto en los organoides ST como en los organoides tratados con IFN- $\gamma$ . Cuando se analizan los *immune checkpoint*, se observa que la presencia de los organoides aumenta el porcentaje de LAG3 y PD-1 para las muestras 1665T y 1788T y en el caso de CTLA4 aumenta en presencia de 1573T y 1703T. Para PD-1 se observa la mayor expresión para la muestra 1665T con 15% y luego las muestras 1788T y 1573T con porcentajes de aproximadamente del 10%, sin observar expresión en los inhibidores como se menciono anteriormente.



**Figura Suplementaria 9:** Caracterización de la subpoblación TCD8, marcadores de activación CD69, CD137 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC de control, en presencia o no de inhibidores de PD-1 mediante citometría de flujo. Condición de los cultivos: organoides sin tratamiento previo con IFN- $\gamma$  (ST), organoides tratados con IFN- $\gamma$  previo al co-cultivo (IFN- $\gamma$ ), co-cultivo sin inhibidores (-), co-cultivo tratado con Nivolumab (+Nivo), co-cultivo tratado con Pembrolizumab (+Pemb). “n” biológico = 4 muestras 1573T (azul), 1665T (magenta), 1703T (negra) y 1788T (verde). Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \*  $p > 0.05$  / \*\*  $p < 0.01$  mediante test estadístico T-test.

### 7.2.6 Evaluación de Co-cultivo del organoide 1703 con PBMC en condición autólogo y alogénica

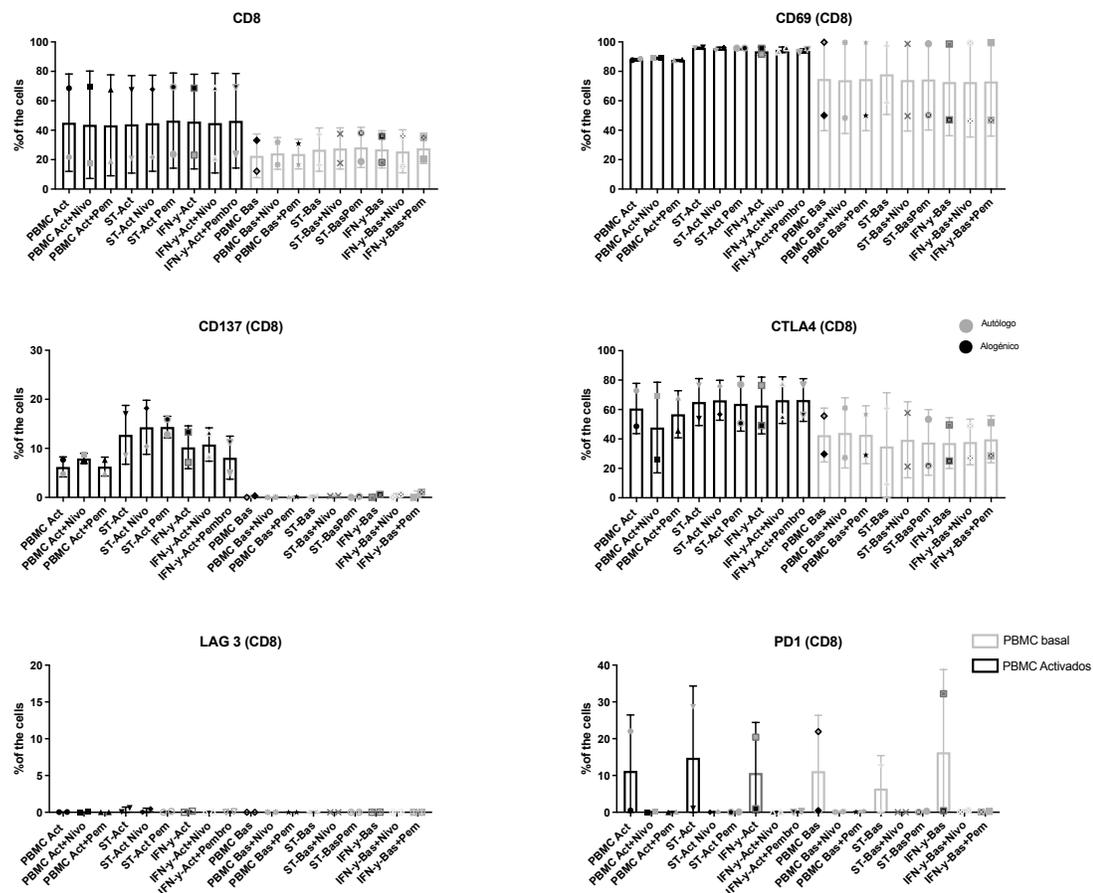
Como se menciono anteriormente, todos los co-cultivos fueron realizados en las condiciones presentadas en el escrito mas las condiciones basales, y los controles correspondientes, dentro de objetivo de evaluar la respuesta de los linfocitos T en presencia de organoides, se logro establecer un co-cultivo autólogo, es decir, con PBMC provenientes del mismo paciente 1703T y en condición alogénica, es decir, con PBMC proveniente de otro individuo, en este caso un control sano. Como se observa en la **Figura Suplementaria 10 y 11**, se observa la condición autóloga en puntos grises y la condición alogénica con puntos negros, se presentan perfiles distintos entre ambos tipos de cultivos. Para la subpoblación TCD4 se observa que en la condición autólogo-activada se presenta un alto porcentaje de población positiva de TCD4 alcanzando un 80%, difiriendo del 20% aproximado presente en la condición alogénico, en todas las condiciones evaluadas, en cuanto a los marcadores de activación para CD69 se observa que la condición basal los PBMC autólogo expresan alto porcentaje de CD69 alrededor del 80%, disminuyendo a 20% cuando se activan las células. Para el caso de CD137 se observa baja expresión en todas las condiciones evaluados, solo se observa un incremento de 5 % cuando los PBMC autólogos se encuentran previamente activados y en presencia de los inhibidores Nivolumab o Pembrolizumab. Cuando se observan los *immune checkpoint*, los porcentajes más altos están presente en la condición autóloga para CTLA4 y PD-1 y aumentan en los PBMC en presencia de los organoides. En cuanto a LAG3 presenta porcentajes menores a 1 en todas las condiciones y tratamientos evaluados.



**Figura Suplementaria 10:** Caracterización de la subpoblación TCD4, marcadores de activación CD69, CD137 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC autólogo y alogénico, en presencia o no de inhibidores de PD-1 mediante citometría de flujo. Condición de los cultivos: organoides sin tratamiento previo con IFN- $\gamma$  (ST), organoides tratados con IFN- $\gamma$  previo al co-cultivo (IFN- $\gamma$ ), co-cultivo sin inhibidores (-), co-cultivo con Nivelumab (+Nivo), co-cultivo tratado con Pembrolizumab (+Pem). “n” biológico = 4 muestras 1573T (azul), 1665T (magenta), 1703T (negra) y 1788T (verde). Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \*  $p > 0.05$  / \*\*  $p < 0.01$  mediante test estadístico T-test.

Para la subpoblación TCD8 observamos que cuando los PBMC son activados previamente aumenta en el cultivo alogénico, y el alogénico presenta porcentajes similares a la condición de PBMC basal. Cuando se observa los marcadores de activación se observa altos porcentajes de CD69 en todas las condiciones evaluadas, para el caso del cultivo autólogo este marcador mostraba porcentajes basalmente altos cercanos al 100%, en el caso del cultivo alogénico se observa un aumento de un 40% en este marcador, pero no se observan diferencias entre los tratamientos evaluados. Cuando se analiza CD137, se observa porcentajes positivos en la condición de PBMC previamente activado, siendo la condición alogénica la que presenta valores más altos por sobre el 15% mayores al 10% presente en la condición autóloga. Con

respecto a los *immune checkpoint*, para CTLA se observa que al menos un 20% de la población es positiva en este marcador en todas las condiciones evaluadas, este porcentaje aumenta cuando los PBMC son activados tanto en la condición autóloga como alogénica, pero sin observar diferencias entre los tratamientos evaluados. LAG3 no se observa población positiva (con valores menor al 1%) en todas las condiciones evaluadas. Finalmente, PD-1 presenta alta expresión en los PBMC autólogos, incluyendo la condición basal, en cambio en la condición alogénica se presenta expresión baja de PD-1 cercana al 2% y no se ve aumento frente a la activación de los PBMC ni presencia de los organoides, como se mencionó anteriormente en presencia de los inhibidores Nivolumab y Pembrolizumab no se puede determinar población positiva para PD-1 debido a que se encuentra bloqueado.



**Figura Suplementaria 11:** Caracterización de la subpoblación TCD8, marcadores de activación CD69, CD137 y los *immune checkpoint* CTLA4, LAG3 y PD-1 en co-cultivo de organoides y PBMC autólogo y alogénico, en presencia o no de inhibidores de PD-1 mediante citometría de flujo. Condición de los cultivos: organoides sin tratamiento previo con IFN- $\gamma$  (ST), organoides tratados con IFN- $\gamma$  previo al co-cultivo (IFN- $\gamma$ ), co-cultivo sin inhibidores (-), co-cultivo tratado con Nivolumab (+Nivo), co-cultivo tratado con Pembrolizumab (+Pem). "n" biológico = 4 muestras 1573T (azul), 1665T (magenta), 1703T (negra) y 1788T (verde). Los datos fueron analizados con FlowJo y graficados en GraPhad Prisma versión 9. \* p > 0.05 / \*\* p < 0.01 mediante test estadístico T-test.

### 7.2.7 Evaluación de Complejo mayor de Histocompatibilidad tipo I en organoides y PBMC control

Adicionalmente, se solicitó el servicio de tipificación del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (HLA-A y HLA-B) mediante PCR-SSP, al laboratorio de Medicina Traslacional de la FLAP. El equipo de trabajo a cargo del Dr. Franz Villarroel realizó la tipificación a partir de DNA de las muestras solicitadas: PBMC (control sano), 1573T, 1665T, 1703T y 1788T. La tipificación de HLA-A y HLA-B fue realizada utilizando el kit Micro SSPTM Generyc Trays SSPABDR. La interpretación de los resultados se realizó manualmente por la gente del laboratorio utilizando worksheet Micro SSPTM generic HLA class I and II" lot #011. Los resultados de la tipificación de HLA-A y HLA-B se encuentran detallados en la **Tabla Suplementaria 4**. Dentro de los resultados relevantes, el PMC comparte al menos un alelo de los HLA con las muestras 1573T, 1665T y 1788T

N° Muestra	ID Muestra	Origen	Tipo muestra	Concentración*	HLA-A	HLA-B
1	CSB345.E1DN1-CTRL01	Humano	DNA genómico PBMC	90,6 ng/μl	A*02/A*02	B*18/B*35
2	CSB345.E1DN2-1573	Humano	DNA genómico organoide	32,4 ng/μl	A*01/A*02	B*15/B*15
3	CSB345.E1DN3-1665	Humano	DNA genómico organoide	31,9 ng/μl	A*68/A*68	B*35/B*40
4	CSB345.E1DN4-1788	Humano	DNA genómico organoide	24,3 ng/μl	A*02/A*36	B*14/B*44
5	CSB345.E1DN5-1703	Humano	DNA genómico organoide	96,2 ng/μl	A*03/A*03	B*49/B*49

\*Muestras fueron cuantificadas utilizando equipo Cytation 5.

**Tabla Suplementaria 4:** Resultados de la tipificación de HLA-A y HLA-B en las muestras listadas