



TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

GENERACIÓN DE ORGANOIDES HEPÁTICOS DE UN PACIENTE NIEMANN PICK TIPO B Y ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA

Autor/es: **Sara Núñez Torvisco**

Villaviciosa de Odón, *Junio, 2022*

Título del Trabajo: **GENERACIÓN DE ORGANOIDES HEPÁTICOS DE UN PACIENTE NIEMANN PICK TIPO B Y ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA**

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Investigación de Enfermedades Raras que forma parte de la estructura del Instituto de Salud Carlos III, dependiendo de la Subdirección General de Servicios Aplicados, Formación e Investigación. Colabora con el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (MSCBS) en el desarrollo del Registro Estatal de Enfermedades Raras y en la Estrategia Nacional para estas enfermedades.



Tutor/es: **Gema Gómez Mariano y Gracia Morales Kucharski**

ÍNDICE

Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	6
1.1. Enfermedad de Niemann Pick: Panorama histórico	6
1.2. Características clínicas y patológicas de la enfermedad de Niemann Pick	7
1.3. Mecanismo de acción enzimática de la Esfingomielinasa Ácida (ASM)	8
1.4. Ciclo de la esfingomielina (SM)	10
1.5. Genética del Déficit de Esfingomielinasa Ácida (ASMD)	11
1.6. Diagnóstico de Niemann Pick tipo B	12
1.7. Terapias para el tratamiento de Niemann Pick tipo B	12
1.8. Generación de organoides hepáticos como modelo de enfermedad	14
2. Objetivos	17
3. Materiales y métodos	18
3.1. Generación de organoides a partir de biopsias hepáticas del paciente Niemann Pick tipo B y del individuo control	18
3.2. Mantenimiento y conservación de organoides en expansión	19
3.3. Diferenciación de organoides en expansión a hepatocitos	19
3.4. Validación de biomarcadores de multipotencia y diferenciación por qRT-PCR	20
3.5. Genotipado de organoides hepáticos	21
3.6. Preparación de muestras de organoides diferenciados a hepatocitos para estudios de histología	23
3.6.1. Inclusión de organoides hepáticos en parafina	23
3.6.2. Cytospin: preparación de organoides hepáticos en portaobjetos de vidrio	23
3.7. Análisis de expresión de enzimas del metabolismo de la esfingomielina	24
4. Resultados	26
4.1. Generación de organoides de hígado de un paciente NPB y de un individuo control	26
4.2. Análisis de expresión génica hepatocito-específica en organoides en expansión y diferenciados a hepatocitos	27
4.3. Genotipado de organoides del paciente NPB	28
4.4. Identificación de células espumosas y depósitos de lípidos	29
4.5. Análisis de expresión de enzimas del metabolismo de la esfingomielina (SM) en organoides diferenciados del paciente NPB	32
5. Discusión	34
5.1. Organoides como modelo de cultivo celular 3D para el estudio de la enfermedad hepática Niemann Pick Tipo B	34

5.2. Los organoides de hígado del paciente NPB reproducen las características de la enfermedad hepática	36
5.3. Aumento de expresión de las esfingomielinasas ácida (ASM) y neutra (nSM2) del metabolismo de la esfingomielina (SM).....	38
5.4. Identificación de la variante más frecuente en España en el paciente NPB: p.Arg610del (R608del)	40
6. Conclusión.....	42
Bibliografía	43
Anexos	47
Sostenibilidad.....	47

Resumen

La enfermedad de Niemann Pick tipo B (NPB) es una enfermedad poco frecuente de depósito lisosomal, también conocida como Déficit de Esfingomielinasa Ácida (ASMD). Mutaciones en el gen *SMPDI*, que codifica la esfingomielinasa ácida (ASM) dan lugar a la deficiencia de dicha enzima, que cataliza la degradación de la esfingomielina (SM) a ceramida y fosfatidilcolina. El déficit de la enzima da lugar al depósito de esfingomielina (SM) en las células y a la fisiopatología de la enfermedad.

En este trabajo se ha establecido un modelo celular tridimensional (3D) para el estudio de la enfermedad de Niemann Pick tipo B mediante la generación de organoides hepáticos de un paciente NPB y de un individuo control. Los organoides se caracterizaron molecularmente mediante el estudio de biomarcadores específicos de hepatocitos y de células progenitoras. Además, se ha realizado el diagnóstico genético del paciente mediante el genotipado, permitiendo detectar la mutación responsable de la enfermedad en el exón 6 del gen *SMPDI* (NM_000543.5: c.1829_1831delGCC; p.Arg610del (R608del)) y se ha analizado la expresión génica de las enzimas que participan en el metabolismo de la SM. Por otro lado, se realizaron estudios histológicos que han identificado células hepáticas espumosas y la presencia de depósitos de lípidos en el interior celular, característicos de los pacientes con la enfermedad de NPB.

Los resultados de este trabajo manifiestan las futuras perspectivas sobre el gran potencial que poseen los organoides hepáticos como modelo *in vitro* para el estudio de la enfermedad Niemann Pick tipo B.

Palabras clave: organoides hepáticos, Niemann Pick tipo B, esfingomielinasa ácida, *SMPDI*, células espumosas, modelo de enfermedad.

Abstract

Niemann Pick disease type B (NPB) is a rare lysosomal deposition disease, also known as Acid Sphingomyelinase Deficiency (ASMD). Mutations in the *SMPD1* gene, which encodes acid sphingomyelinase (ASM) result in deficiency of the enzyme that catalyses the degradation of sphingomyelin (SM) to ceramide and phosphatidylcholine. Deficiency of the enzyme results in the deposition of sphingomyelin (SM) in cells and the pathophysiology of the disease.

In this work a three-dimensional (3D) cellular model has been established for the study of Niemann Pick type B disease by generating liver organoids from an NPB patient and a control individual. The organoids were molecularly characterized by the study of specific biomarkers of hepatocytes and progenitor cells. In addition, genetic diagnosis of the patient was performed by genotyping, allowing detection of the mutation responsible for the disease in exon 6 of the *SMPD1* gene (NM_000543.5: c.1829_1831delGCC; p.Arg610del (R608del)) and gene expression of enzymes involved in sphingomyelin metabolism were analysed. On the other hand, histological studies have identified foamy liver cells and the presence of intracellular lipid deposits, characteristic of patients with NPB.

The results of this work show future perspectives on the great potential of hepatic organoids as an *in vitro* model for the study of Niemann Pick type B disease.

Keywords: liver organoids, Niemann Pick type B, acid sphingomyelinase, *SMPD1*, foam cells, disease modelling.

1. Introducción

La enfermedad de Niemann Pick (NP) es una enfermedad de depósito lisosomal causada por la acumulación de lípidos. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico se caracterizan por presentar enzimas lisosomales disfuncionales que dan lugar a la acumulación de macromoléculas dentro de los lisosomas, y que después se extiende a otros compartimentos celulares. Como consecuencia de esta acumulación se produce inflamación, fibrosis y muerte celular, dando lugar a daño tisular en los órganos afectados. Engloba un grupo de trastornos que han sido descritos y divididos en dos clases diferentes en función de la deficiencia presente en los pacientes:

1. En los tipos A (NPA) y B (NPB) los pacientes cursan la enfermedad con deficiencia en la actividad enzimática de la esfingomielina fosfodiesterasa 1 (ASM). Esta enzima es una esfingomielinasa ácida lisosomal que cataliza la conversión de esfingomielina a ceramida y fosfatidilcolina. La deficiencia de esfingomielinasa ácida (ASMD) se debe a mutaciones en el gen *SMPD1* que codifica la enzima y que se encuentra localizado en el cromosoma 11p15.1-p15.4 (He, 2017).
2. Los tipos C y D, agrupados bajo el nombre de enfermedad de Niemann Pick tipo C (NPDC), se caracterizan por presentar deficiencia de la proteína transportadora de colesterol intracelular, NPC1 o NPC2. Estas proteínas se encuentran en la membrana de endosomas y lisosomas, regulando el tráfico de colesterol intracelular mediante su unión al extremo N-terminal del colesterol. NPDC se produce por mutaciones en los genes *NPC1* o *NPC2*, localizados en los cromosomas 18q11.2 y 14q24.3, respectivamente (Vanier, 2013).

1.1. Enfermedad de Niemann Pick: Panorama histórico

El primer paciente de NP lo reportó Albert Niemann, un pediatra alemán, en 1914. Observó hepatoesplenomegalia y una rápida neurodegeneración en un niño judío Askenazi. Esta descripción corresponde ahora a la NPA. Por otro lado, en 1927 el patólogo alemán, Ludwig Pick, denominó la enfermedad descrita por Niemann como “esplenomegalia de células lipoides”, distinguiéndola de la enfermedad de Gaucher, con la que comparte muchas de sus características clínicas y patológicas. Más adelante, se reportó el caso de dos hermanos suizos, de edad adulta, que presentaban

hepatoesplenomegalia masiva sin trastornos neurológicos, clasificando esta forma de la enfermedad como NPB (Schuchman & Desnick, 2018).

En cuanto a la causa de la enfermedad, fue el bioquímico Ernst Klenk quien identificó en 1934 que el lípido que se acumula en la NP es esfingomielinina y, en consecuencia, una enzima catalizadora de la degradación de este lípido debía ser deficiente. Entonces, en 1966, Roscoe Brady y sus compañeros del Laboratorio de Neuroquímica caracterizaron una esfingomielinina fosfodiesterasa procedente de hígado de rata (Kanfer et al., 1966), que luego resultó deficiente en ensayos de actividad enzimática en muestras de tejido de pacientes infantiles de NP.

1.2. Características clínicas y patológicas de la enfermedad de Niemann Pick

La pérdida de función de ASM da lugar a la acumulación de SM en los lisosomas y en las membranas plasmáticas de las células. El acúmulo progresivo de SM deriva en la destrucción celular de órganos y tejidos en los pacientes.

Dentro de la ASMD existen los tipos conocidos como Niemann Pick tipo A (NPA), B (NPB) y una forma intermedia conocida como A/B (NPA/B):

La **ASMD de tipo A** (NPA: MIM # 257200) tiene una prevalencia global de 1:250.000, y cabe destacar que la incidencia es mayor para los judíos Askenazi (1:40.000). Además, es responsable del 75% de los casos de NP. Es la forma clínica neuropática más grave. Los pacientes desarrollan síntomas desde los primeros meses de vida, y a partir de los 10 meses exhiben graves trastornos en el sistema nervioso central (SNC), deterioro psicomotor rápido y progresivo, hepatoesplenomegalia y enfermedad pulmonar. Esto da lugar a que estos pacientes tengan una esperanza de vida inferior a 2-3 años (He, 2017).

En cambio, la **ASMD de tipo B** (NPB: MIM # 607616) es crónica y tiene una prevalencia de 1:1.000.000. La mayoría de los pacientes con este tipo de enfermedad no desarrollan rasgos neuropáticos y suelen vivir hasta la edad adulta. El progreso de la enfermedad en estos pacientes es muy variable (Schuchman, 2007). Es una forma clínica no neuropática, con manifestación predominante de hepatoesplenomegalia, perceptible desde la infancia hasta la edad adulta. Más tarde, se produce insuficiencia respiratoria e insuficiencia hepática, que son dos de las complicaciones más frecuentes con alta mortalidad en

pacientes afectados. En un estudio de tres pacientes pediátricos (de entre 2 y 11 años) de NPB (Klzyjypy et al., n.d.-a), se describió el curso de la enfermedad en cada uno de ellos, manifestando las diferencias y similitudes que se encontraron. Para ello, realizaron un examen físico a los tres pacientes, que presentaban características clínicas similares, como hepatoesplenomegalia, afección hepática, retraso en el crecimiento y afección hematológica. Sin embargo, sólo uno de ellos presentaba afección cardiaca, una mancha rojo cereza en la mácula y afección ósea. Dos de ellos tenían afección pulmonar y neurológica. También, se llevaron a cabo análisis bioquímicos e histológicos, de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados: los tres pacientes cursaban la enfermedad con trombocitopenia, alteración de las enzimas hepáticas y del perfil lipídico, presencia de células espumosas en aspirado de medula ósea y ASM deficiente. Anemia, leucopenia y prolongación de los tiempos de coagulación sólo se observó en dos pacientes. Otros trabajos como los de Wasserstein et al., 2004 y Mcgovern et al., 2009 realizaron ensayos con un número más elevado de individuos, corroborando la amplia variabilidad fenotípica de este tipo de NP y estableciendo como rasgos clínicos frecuentes hepatoesplenomegalia, desarrollo del crecimiento anormal y fibrosis pulmonar.

Existe una forma clínica intermedia **ASMD tipo A/B**, que presenta los síntomas periféricos de NPB, pero tiene además implicaciones neurológicas, aunque menos graves y de desarrollo más lento que en NPA (Pavlú-Pereira et al., 2005; Wasserstein & Schuchman, 2022), destacando trastornos en el SNC y supervivencia hasta la edad adulta. Además, se ha observado la aparición de una mancha rojo cereza en la mácula de los pacientes de estos dos tipos de NP cuando el estado de la enfermedad es avanzado.

1.3. Mecanismo de acción enzimática de la Esfingomielinasa Ácida (ASM)

La ASM es una glicoproteína soluble, que cataliza la conversión de SM en ceramida y fosforilcolina, mediante escisión de un enlace fosfodiéster (*Figura 1*). Se localiza principalmente en los lisosomas y su actividad es óptima a pH~5 y 37°C, aunque mantiene la mitad de su actividad máxima a pH neutro (Zeidan & Hannun, 2010). Se han reportado hasta siete isoformas de la enzima, pero sólo la esfingomielinasa ácida 1 ha resultado ser catalíticamente activa (Albinet et al., 2013). La SM es el esfingolípido más abundante de la célula, ubicuo en las células de mamífero, aunque presenta niveles más elevados en el SNC y es esencial para el correcto funcionamiento de la célula. Además, es uno de los

componentes más abundantes de las balsas lipídicas de la membrana plasmática junto con el colesterol. Por otro lado, la ceramida actúa como segundo mensajero intracelular regulando varias actividades celulares como la proliferación celular, el crecimiento y la apoptosis, motivado por diversos agentes extracelulares como citoquinas inflamatorias, hormonas, óxido nítrico, factores de crecimiento y otros factores de estrés. Por lo tanto, la importancia de esta enzima reside en el equilibrio que debe existir entre los niveles de esfingomiélinea y ceramida para mantener la homeostasis celular (Kolodny, 2000; Schuchman, 2007).

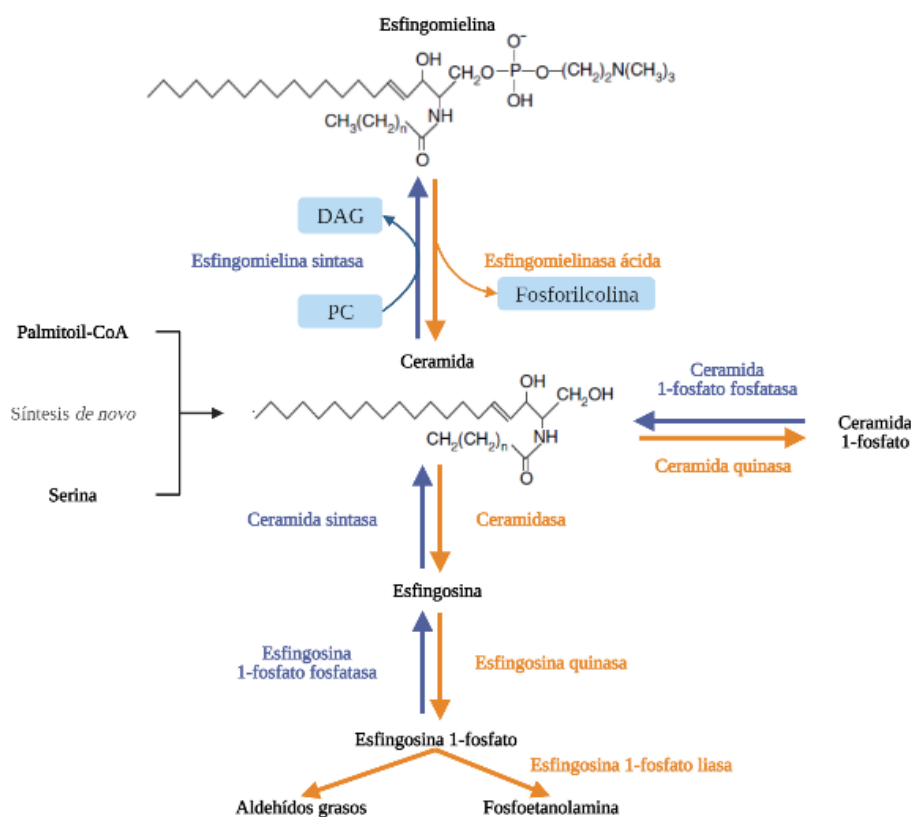


Figura 1. Mecanismo de acción de la esfingomielinasa ácida (ASM) (DAG: diacilglicerol; PC: fosfatidilcolina). Creado con BioRender.com por Sara Núñez Torvisco 2022.

Respecto al tráfico de ASM a los lisosomas sigue una vía similar a la de muchas otras hidrolasas lisosomales, gracias sobre todo a la presencia de residuos de manosa 6-fosfato unidos a las cadenas laterales de N-oligosacáridos. Esto se debe a que la enzima tiene seis sitios de glicosilación y debe estar glicosilada para ser activa. Mientras la ASM lisosomal se encuentra glicosilada por N-oligomanosas, la ASM secretada presenta un complejo

patrón de glicosilación que determina el tráfico de la misma, ya que sólo la glicosilación de manosa 6-fosfato permite la unión a los N-oligosacáridos, dirigiendo la enzima secretada a los lisosomas (Albinet et al., 2013). También se liberan pequeñas cantidades de enzima a la circulación desde las células.

Cuando las células están sometidas a estrés (por radiación, conjugación de receptores de superficie, exposición a patógenos) la ASM se transloca desde los lisosomas al exterior de la membrana plasmática, donde degrada SM en ceramida. Entonces, se produce una reorganización de las balsas lipídicas de la membrana plasmática aumentando su tamaño y desencadenando la señalización de determinadas proteínas que provocan cambios en la célula, normalmente apoptosis o senescencia (Schuchman, 2007).

No obstante, cabe destacar que la ASM es una metaloproteína que contiene numerosos motivos de unión a Zn^{2+} y requiere la unión de este elemento para su activación. Mientras que la forma lisosomal de la enzima se encuentra estrechamente unida a Zn^{2+} , la forma secretada permanece segregada durante la vía secretora del aparato de Golgi y requiere la posterior adición del metal una vez expuesta en el exterior de la membrana para ser funcional (Albinet et al., 2013).

1.4. Ciclo de la esfingomielina (SM)

La biosíntesis de esfingolípidos tiene lugar en el aparato ER-Golgi, y se conoce como la vía *de novo*. Esta vía contiene algunas reacciones irreversibles que conducen a la ceramida (ceramida en el ER, ER-Cer) (Figura 2). Las esfingomielinas sintasas (SMS 1 y 2) transfieren un grupo fosforilcolina, en una reacción reversible, de fosfatidilcolina a ceramida, generando diacilglicerol y SM. Esta SM sintetizada *de novo* abandona el ER-Golgi y se transporta a diferentes orgánulos en la célula, principalmente a los lisosomas y la membrana plasmática. Además, es secretada al espacio extracelular donde puede ser incorporada a las lipoproteínas. La SM en los diversos compartimentos puede ser entonces hidrolizada por un número diverso de esfingomielinasas, como la esfingomielinasa ácida (ASM) en los lisosomas y el espacio extracelular, la esfingomielinasa neutra (nSM) en la membrana plasmática y otras membranas internas o la esfingomielinasa alcalina (alkSM) que se encuentra asociada a la parte externa de la membrana plasmática o libre en el lumen intestinal. La generación de ceramida a partir de SM puede ser desencadenada por estrés celular y puede provocar la señalización

celular hacia la muerte celular, la diferenciación celular o la detención del ciclo celular. La ceramida procedente de SM puede degradarse aún más a esfingosina por varias ceramidasa específicas de orgánulos (ácidas, neutras y alcalinas). La esfingosina (Sph) puede ser fosforilada en esfingosina-1-fosfato (S1P), desencadenando una serie de efectos biológicos favorables a la supervivencia a través de cinco receptores GPCR (receptores acoplados a proteínas G) diferentes, por receptores intracelulares o por degradación y salida de la vía de los esfingolípidos. La Sph puede ser transportada desde un compartimento y ser reciclado en la red ER-Golgi reingresando al ciclo de la SM al ser reaclilado por ceramidas sintasas a ceramida (vía de recuperación) (Adada et al., 2016).

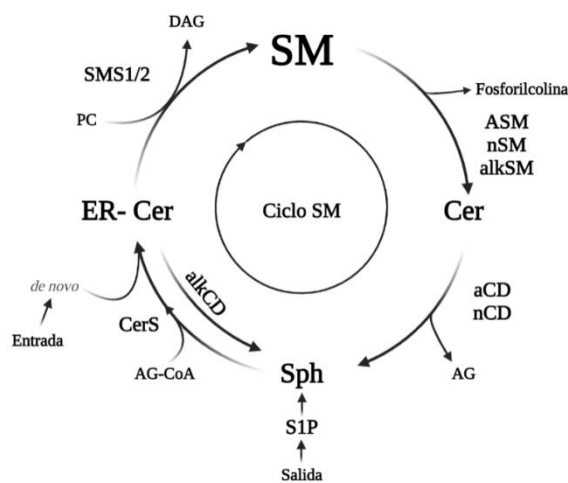


Figura 2. Ciclo de la esfingomielina (SM). ASM (esfingomielinasa ácida); nSM (esfingomielinasa neutra); alkSM (esfingomielinasa alcalina); Cer (ceramida); aCD (ceramidasa ácida); nCD (ceramidasa neutra); alkCD (ceramidasa alcalina); AG (ácido graso); Sph (esfingosina); S1P (esfingosina-1-fosfato); CerS (ceramida sintasa); SMS1/2 (esfingomielina sintasa 1 y 2); PC (fosfatidilcolina); DAG (diacilglicerol). Creado con BioRender.com por Sara Núñez Torvisco 2022. Modificada de Adada et al., 2016.

1.5. Genética del Déficit de Esfingomielinasa Ácida (ASMD)

La ASMD es una enfermedad poco frecuente de origen genético que se transmite por herencia autosómica recesiva. Mutaciones en el gen *SMPDI* dan lugar a la enfermedad. Este gen abarca 5 kb del cromosoma 11 (11p15.1-11p15.4) y consta de seis exones. Codifica para la proteína ASM de 631 aa (1896 pb). Hasta la fecha, se han descrito más de 180 mutaciones que causan los tipos A, B y A/B y se han encontrado varios polimorfismos dentro del gen *SMPDI* de individuos normales. Se han establecido las primeras correlaciones genotipo-fenotipo para esta enfermedad y se han identificado 3 variantes en el gen *SMPDI*, p. His284SerfsX18, p. Phe465Ser, y p. Ser486Arg, asociadas con NPA, siendo la última la que presenta una clínica más severa. Por otro lado, se han asociado dos variantes neuroprotectoras a pacientes NPB, p. Arg602His y p. Asn522Ser, y una variante p. Tyr500His, asociada al tipo intermedio NPA/B (Schuchman & Desnick, 2018; Zampieri et al., 2016).

1.6. Diagnóstico de Niemann Pick tipo B

El diagnóstico de NPB, al igual que para el resto de ASMD, no puede realizarse basado únicamente en motivos clínicos, sino que debe detectarse e identificarse también la variante alélica patogénica en el gen *SMPDI* mediante el análisis genético. La determinación del genotipo sirve para predecir el fenotipo y es de ayuda en el posterior asesoramiento genético. Por otro lado, puede medirse la actividad enzimática de la ASM en linfocitos de sangre periférica o en fibroblastos del epitelio cultivados, que debe ser menor al 10% (Vanier, 2013; Wasserstein & Schuchman, 2022).

Adicionalmente, se ha observado que algunos biomarcadores como la quitidriosidasa y el CCL/8 (quimiocina-ligando 18) aparecen elevados en la mayoría de los pacientes con NPB. Estos biomarcadores permiten la detección de macrófagos con acumulación de lípidos, evidenciando la reducida actividad enzimática de la ASM en estos pacientes (Kluzjy et al., n.d.-a). Examinar la médula ósea también puede ser un indicador interesante cuando revela la presencia de histiocitos espumosos.

Por otra parte, al ser una enfermedad de herencia autosómica recesiva es posible realizar un diagnóstico prenatal cuando se conoce que ambos progenitores son portadores heterocigotos de una variante patogénica de *SMPDI*. Se realiza por medición de la actividad enzimática de la ASM o por pruebas genéticas en el ADN extraído de muestras de vellosidades coriónicas o amniocitos cultivados (Vanier, 2013).

1.7. Terapias para el tratamiento de Niemann Pick tipo B

Hasta la actualidad, el tratamiento de la NPB está limitado a la sintomatología. Las medidas aplicadas para aliviar y/o reducir las manifestaciones clínicas de estos pacientes incluyen la terapia de alimentación como apoyo nutricional, la transfusión de factores de coagulación, la esplenectomía parcial para aquellos individuos con hiperesplenismo grave, el aporte de oxígeno en pacientes con insuficiencia pulmonar, la administración de fármacos hipolipemiantes, etc (Kolodny, 2000; Vanier, 2013; Wasserstein & Schuchman, 2022).

Más allá, se han realizado trasplantes de médula ósea (TMO) que han resultado en una reducción del tamaño del hígado y el bazo. Sin embargo, se han asociado complicaciones severas posteriores a este procedimiento, que deben tenerse en cuenta al elegirlo como

posible tratamiento. El efecto del TMO se ha estudiado en profundidad en ratones KO (*Knocked out*) para ASM y a pesar de haber obtenido efectos positivos en órganos reticuloendoteliales, los efectos sobre el deterioro neurológico fueron prácticamente despreciables. Por ello, se sugiere este procedimiento como una opción para aquellas formas no neuropáticas de NP, como es el tipo B (Schuchman, 2007).

Muchas de las enfermedades de depósito lisosomal son tratadas mediante terapias de remplazo enzimático (ERT) siendo altamente efectivas en algunos casos, pero para otras el impacto clínico es limitado debido a que las enzimas administradas no pueden superar la barrera hematoencefálica y alcanzar el SNC. Este es el caso de los tipos A y A/B de Niemann Pick que presentan afectación neurológica. La incapacidad de la enzima recombinante para cruzar la barrera hematoencefálica y la ausencia de mejora en el componente neurológico después de ERT en ratones ASM KO indican que este enfoque es inadecuado para las formas neuroviscerales y que es necesario encontrar otras alternativas terapéuticas. Para salvar este obstáculo se están desarrollando en la actualidad estrategias de terapia génica, terapias de reducción de sustrato o el uso de chaperonas farmacológicas (Zampieri et al., 2016).

Actualmente se encuentran en curso dos ensayos clínicos, uno para adultos y otro pediátrico, para pacientes con ASMD que carecen de compromiso neurológico, es decir, Niemann Pick tipo B (ASCEND: NCT02004691 y ASCENDPeds: NCT02292654) (McGovern et al, 2017). Los resultados del ensayo clínico en adultos son espectaculares ya que se han obtenido en los pacientes tipo B reducciones de los depósitos de SM, en el bazo del 40%, en el hígado del 50%, así como una mejora de la capacidad pulmonar de entre el 30-40%. En este sentido, también se han reducido los niveles de colesterol total, LDL (*Low Density Lipoprotein*), VDL (*Very Low Density Lipoprotein*) y triglicéridos, y han subido los niveles de HDL (*High Density Lipoprotein*). Los resultados del ensayo clínico en niños son igualmente esperanzadores tras un año desde el inicio del ensayo (Diaz et al., 2021; Thurberg et al., 2020).

1.8. Generación de organoides hepáticos como modelo de enfermedad

Los organoides son sistemas de cultivo 3D que se generan directamente de las células de los pacientes y que sirven para el modelado de enfermedades. En la actualidad, los cultivos *in vitro* tridimensionales (3D) están emergiendo como nuevos sistemas para estudiar la organogénesis, el desarrollo de tejidos, los mecanismos moleculares de las enfermedades y el comportamiento de las células madre. El desarrollo de este sistema ha sido posible gracias a la gran cantidad de estudios existentes tanto de los procesos de organogénesis como de células pluripotentes humanas. El avance en estos estudios ha permitido generar cultivos de organoides capaces de recoger *in vitro* todos los procesos de organogénesis que se dan en los tejidos *in vivo*. La generación de los organoides se produce a partir de células madre adultas, pluripotentes o progenitores embrionarios y conservan una funcionalidad similar a la del tejido del que proceden y son capaces de auto-organizarse y auto-renovarse. Por otro lado, presentan una importante ventaja y es que mantienen en gran medida su estabilidad genómica durante los largos periodos en los que se mantienen en cultivo (Lancaster & Huch, 2019).

Para establecer este tipo de cultivos se utiliza una matriz BME (*Cultrex Basement Membrane Extract*) como soporte, que actúa como membrana extracelular. También se han desarrollado hidrogeles naturales que se asemejan a la matriz extracelular (MEC) humana y presentan diversas ventajas como el mantenimiento de un entorno de proteínas, factores de crecimiento y citoquinas que proporcionan señales bioquímicas, biofísicas y mecánicas a las células. No obstante, es difícil controlar su consistencia y capacidad de reproducir organoides a largo plazo debido a la complejidad y variabilidad de sus componentes (Nuciforo & Heim, 2020; Rossi et al., 2018).

En cuanto a los protocolos de generación de organoides requieren, en su mayoría, la adición de señales exógenas específicas que permitan el proceso de diferenciación de las células madre adultas, ya que las señales iniciales contenidas en el sistema no contienen todos los componentes necesarios para ello (Zhu et al., 2021a). Además, varían en función del tipo celular inicial (una única célula, un agregado celular homogéneo o un co-cultivo de diferentes tipos celulares), así como, de las condiciones de cultivo iniciales (sobre una matriz, en suspensión o sobre una interfaz aire-líquido).

En concreto, los organoides hepáticos se han desarrollado mayormente a partir de células madre adultas (AdSCs), bien como células aisladas o desde tejido diseccionado. Este tipo de organoides se presume que reproducen las condiciones regenerativas y homeostáticas del tejido de origen. Así, las células madre de órganos con una continua renovación, como el epitelio del intestino delgado, el colon o el estómago, dan lugar a organoides que imitan el papel homeostático de esas células *in vivo*. Sin embargo, en aquellos generados desde tejidos con una lenta renovación como el páncreas o el hígado, en los cuales las células madre presuntamente sólo participan en caso de lesión, se consideran buenos modelos de regeneración (Rossi et al., 2018).

Las AdSCs que se encuentran en el hígado, son pequeñas células cercanas al árbol del conducto biliar que se activan en forma de células ovaladas en un proceso denominado reacción ductal (cuando el hígado se ve afectado por agentes nocivos). Se caracterizan por su escaso citoplasma, su pequeño núcleo ovalado y su potencial de diferenciación bidireccional, que les permite diferenciarse en hepatocitos y colangiocitos (células epiteliales del conducto biliar). Por lo tanto, se pueden obtener organoides de ambos tipos celulares, conocidos como hepato-organoides y colangio-organoides, respectivamente. Los protocolos descritos para generar ambos tipos comparten muchas de sus características como el requerimiento de mitógenos (factores de crecimiento), inhibidores de TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) y potenciadores de la vía de señalización Wnt como RSpO (*R-spondin*), que permiten su expansión a largo plazo. Sin embargo, también tienen necesidades individuales como la adición de forskolina para los colangio-organoides y de GSK3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 beta) para los hepato-organoides (Akbari et al., 2019; Zhu et al., 2021a).

La posibilidad de producir organoides modelo manteniendo el perfil genético de cada paciente ofrece una nueva y esperanzadora visión en el estudio de las enfermedades hepáticas. El hígado es el órgano digestivo más importante del cuerpo. Realiza numerosas funciones involucradas en procesos metabólicos, de síntesis, inmunológicos y detoxificadores. Las enfermedades hepáticas suponen un desafío debido a la escasez de donantes y el limitado conocimiento acerca de los mecanismos hepatopatológicos (Nuciforo & Heim, 2020; Olgasi & Cucci, 2020). Por ello, los organoides hepáticos representan un modelo *in vitro* prometedor para la investigación básica, así como para el desarrollo de terapias clínicas en patologías hepáticas. De esta forma, se evitan las

limitaciones que suponen los cultivos bidimensionales (2D), que no reproducen la arquitectura completa del tejido, así como, las diferencias interespecíficas que implica el uso de modelos animales (Zhu et al., 2021a).

En la actualidad existe un modelo de ratón KO para el estudio de ASMD, pero no se dispone de ningún modelo generado a partir de muestras humanas de pacientes para los distintos tipos de ASMD. La generación de organoides hepáticos de pacientes con ASMD permitirá caracterizar la enfermedad estableciendo relaciones genotipo-fenotipo entre las mutaciones que presenten los pacientes y las manifestaciones clínicas, que podrán trasladarse a otros pacientes portadores de las mismas mutaciones. Por otro lado, los organoides permitirán probar posibles fármacos y determinar sus efectos para emplearlos como posibles tratamientos de la enfermedad, ya que permiten realizar *screening* de fármacos dando lugar a posibles terapias personalizadas. Además, se podrán estudiar los mecanismos moleculares de la enfermedad que permitirán un mejor conocimiento de la enfermedad y que pueden ser aplicables a otras enfermedades de depósito lisosomal.

Los organoides constituyen un buen modelo no sólo para ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares y fisiopatológicos de las enfermedades, sino que constituyen la base para una futura terapia personalizada en los que ensayar diferentes estrategias terapéuticas.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo de fin de grado es la generación de organoides de hígado de un paciente con Niemann Pick tipo B, así como su genotipado y el estudio de la enfermedad hepática en el modelo de cultivo establecido.

Concretamente los objetivos principales del trabajo son:

Objetivo 1

1. Generación de organoides de hígado a partir de una biopsia hepática de un paciente Niemann Pick tipo B y de un control:
 - 1.1. Mantenimiento, expansión, conservación y diferenciación de organoides de hígado generados a partir de biopsia hepática, de un paciente Niemann Pick tipo B y de un individuo control.
 - 1.2. Caracterización molecular de organoides de hígado del paciente NPB y del control mediante identificación de marcadores de células progenitoras y de hepatocitos.

Objetivo 2

2. Diagnóstico genético del paciente Niemann Pick tipo B:
 - 2.1. Genotipado de organoides de hígado del paciente Niemann Pick tipo B para determinar la mutación responsable de la enfermedad, a partir de ADN extraído de la biopsia hepática, mediante PCR y secuenciación del gen *SMPD1*.

Objetivo 3

3. Caracterización de la enfermedad hepática en organoides de hígado del paciente con Niemann Pick tipo B:
 - 3.1. Identificación de células espumosas en hepatocitos de organoides mediante tinción Hematoxilina/Eosina.
 - 3.2. Identificación de depósitos de esfingomiélinas mediante tinción con Oil Red O.
 - 3.3. Análisis de expresión génica de enzimas que participan en el metabolismo de la esfingomiélinas (SM).

3. Materiales y métodos

3.1. Generación de organoides a partir de biopsias hepáticas del paciente Niemann Pick tipo B y del individuo control

A partir de biopsias de hígado humano de un paciente NPB y de un individuo control, proporcionadas por el Hospital 12 de octubre (Madrid), se aislaron los ductos donde se encuentran las células madre ductales adultas. Es importante que el tiempo transcurrido entre la cirugía para la obtención de las biopsias y el aislamiento de los ductos sea inferior a 48 horas y que las biopsias de hígado humano se guarden en medio basal (Advanced DMEM/F-12, Penicilina/Estreptomicina 1%, Glutamax 1%, HEPES 10mM) a 4°C hasta su recepción en el laboratorio. Se obtuvieron los consentimientos informados de los dos sujetos del estudio (paciente y control) y la investigación fue aprobada por el comité ético del Instituto de Salud Carlos III.

Siguiendo el protocolo descrito por Huch y colaboradores. (Huch et al. 2015a; Broutier et al. 2016), se establecieron organoides hepáticos a partir de células progenitoras adultas (AdSCs) del hígado humano. La biopsia extraída del paciente se conservó fría durante 24h en medio basal (DMEM/F12 avanzado, 1% penicilina/estreptomicina, Glutamax al 1%, Hepes 10 mM) hasta que se llevó a cabo el procesamiento de la muestra. La biopsia de hígado se disgregó y se lavó con medio frío (DMEM, Glutamax, DGlu, Piruvato, 1% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina). Seguidamente se realizó una digestión con colagenasa (solución salina de equilibrio de Earle (EBSS), colagenasa D 2,5 mg/ml, DNasa I 0,1 mg/ml) y se realizó una centrifugación. Las células se colocaron en la matriz BME2 (*Cultrex Basement Membrane Extract BME Type 2*, BME2) en una placa de 24 pocillos con el medio basal suplementado con 25 ng/ml de Nogging humano recombinante, medio condicionado al 30% con Wnt3a y 10 μ M de Y-27632 inhibidor de ROCK (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase*), constituyendo el medio de aislamiento. En estas condiciones de cultivo, solo las AdSCs progenitoras que se localizan principalmente en los ductos biliares, crecen dando lugar a organoides con forma de esferas y que tienen la capacidad de auto-renovarse. Al proceder con los pases en cultivo de los organoides se retiró la matriz y después de disgregarse mecánicamente con la pipeta, se pasaron a una nueva matriz. Para realizar la expansión, los organoides se cultivaron en un medio de expansión (EM) (medio basal, N-acetilcisteína 1 mM, medio acondicionado Rspo1 al 5%, nicotinamida 10mM, 50 ng/ml de HGF humano

recombinante (factor de crecimiento de hepatocitos), suplementado con 10 μ M de inhibidor de ROCK, 10nM recombinante humano-gastrina I, 50 ng/ml de hEGF recombinante (factor de crecimiento epidémico humano) y 100 ng/ml FGF10 humano recombinante (factor de crecimiento de fibroblastos).

3.2. Mantenimiento y conservación de organoides en expansión

Una vez generados los organoides, para mantenerlos en expansión se realizaron cambios de medio cada 3-4 días. Para ello, se añadieron 500 μ l/pocillo de medio de expansión (medio basal, suplemento B27 sin Vit A 1:50, suplemento N2 1:100, N-acetilcisteína 1 mM, medio condicionado Rspo1 10%, nicotinamida 10mM, gastrina I-Leu 10 nM, hEGF 50 ng/ml, FGF10 100 ng/ml, HGF 25 ng/ml, forskolina 10 μ M, TGF β i 5 μ M), suplementado con ROCK inhibidor 10 μ M, sólo para el primer medio de expansión tras el aislamiento de las células ductales. Es importante que el medio esté atemperado (temperatura ambiente) porque la matriz se despolimeriza con el frío. Los pases se realizaban cuando los organoides alcanzaban una confluencia del 80-90%.

Los organoides generados tanto del paciente con Niemann Pick tipo B, como del control, se congelaron y conservaron en nitrógeno líquido. Para ello, se colocan los organoides en 500 μ l de medio basal + DMSO 10% en un criovial de congelación y se mantuvieron al menos 24 h a -80°C para pasarlos después a nitrógeno líquido (-196°C). Estos organoides congelados podrán ser utilizados en el futuro para diferentes estudios.

3.3. Diferenciación de organoides en expansión a hepatocitos

La diferenciación de los organoides en expansión a hepatocitos se realiza cambiando el medio de crecimiento de los organoides. Este medio contiene factores que permiten la diferenciación de las células madre a hepatocitos diferenciados. Este proceso se logró añadiendo al cultivo un medio de diferenciación (DM) durante 15 días (medio basal, 1:50 B27 suplemento con o sin vitamina A, 1: 100 suplemento N2, 1mM N-acetilcisteína, 10nM gastrina I recombinante humana, 50 ng/ml de EGF humano recombinante, 100 ng/ml de FGF10 humano recombinante, 50nM A83-01 (inhibidor de ALK5, ALK4 y ALK7), 10 μ M de inhibidor de γ -secretase (DAPT)).

3.4. Validación de biomarcadores de multipotencia y diferenciación por qRT-PCR

Se usó el RNeasy mini kit (50) de QIAGEN® para extraer el ARN total de los organoides tanto en expansión, como diferenciados del paciente NPB y del individuo sano. Para la extracción de ARN de los organoides se utilizó el protocolo del kit para muestra de tejido. Una vez extraído el ARN, se sintetizó el ADNc con el Maxima First Strand cDNA kit (Thermo Fischer®), siendo la concentración de partida del ARN de 500 ng en todas las muestras. La reacción de síntesis se produjo tras incubar durante 10 minutos a 25°C, seguida de 30 minutos a 50°C y 5 minutos más a 85°C. Se prepararon diluciones 1/10 del ADNc sintetizado y se seleccionaron los cebadores y las sondas específicas para los marcadores a analizar (*LGR5*, *KRT19*, *ALB*, *APOB* y *GAPDH*) (Tabla 1).

Gen*	Cebador directo (5´-3´)	Cebador reverso (3´-5´)	Universal Probe Library for Human (Roche)
<i>LGR5</i>	ACCAGACTATGCCTTTGGAAAC	TTCCCAGGGAGTGGATTCTAT	#78, cat.no. 04689011001
<i>KRT19</i>	GCCACTACTACACGACCATCC	CAAACCTTGGTTCGGAAGTCAT	#71, cat.no. 04688945001
<i>ALB</i>	AGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAA	GGTTCAGGACCACGGATAGA	#44, cat.no. 04688040001
<i>APOB</i>	ACAGCTGATTGAGGTGTCCA	AGCCACTGGAGGATGTGAGT	#90, cat.no. 04689151001
<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	#60 cat no. 04688589001

Tabla 1. Cebadores y sondas específicas para qRT-PCR de los marcadores *LGR5*, *KRT19*, *ALB*, *APOB*. * *LGR5* (Receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repetición rica en leucina), *KRT19* (Queratina-19), *ALB* (Albúmina), *APOB* (Apolipoproteína B) y *GAPDH* (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa).

La qPCR se llevó a cabo usando el Taqman Fast Advance Master Mix de Thermo Fischer® y la preparación de las muestras se describe en la Tabla 2. Se analizaron las muestras por triplicado. Como controles positivos de marcadores de expansión y de diferenciación se usaron muestras de ARN de un cultivo de HepG2 (línea celular inmortal de carcinoma hepatocelular) y de tejido hepático. El control negativo se realizó con H₂O. La amplificación del ADNc se realizó en el termociclador QuantStudio 5 (Thermo

Fischer®). La activación de la polimerasa se produjo a 95°C durante 20 segundos y se realizaron 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 segundo y elongación a 60°C durante 20 segundos. Se llevó a cabo una cuantificación relativa de la expresión génica mediante el método Ct comparativo, obteniendo el valor *fold-change* (DDCt) y utilizando el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) como gen constitutivo. Los datos resultantes se analizaron con el *software* de análisis de datos QuantStudio 3 y 5 (AppliedBiosystems®).

	Volumen (µl/muestra)
Cebador directo (10 µM)	0,2
Cebador reverso (10 µM)	0,2
Sonda (10 µM)	0,1
Taqman® Fast Advance Master Mix	5
H₂O	2,5
ADNc (1/10)	2

Tabla 2. Preparación de las muestras para la qPCR Taqman Fast Advance.

3.5. Genotipado de organoides hepáticos

Para determinar la variante causante de la enfermedad se extrajo ADN de la biopsia hepática del paciente de NPB con el kit E.Z.N.A.® Tissue DNA (Omega Bio-Tek) y se amplificaron por PCR los 6 exones del gen *SMPD1*. Para amplificar los exones se utilizaron los cebadores directos (F: forward) y en reverso (R: reverse) que se indican en la *Tabla 3*. Se realizaron dos PCR diferentes, una para el exón 1, en la que se aplicó un gradiente de temperatura usando DNA AmpliTools HotSplit Master Mix (Biotools®) y otra para el resto de exones (2, 3, 4, 5, y 6), que se realizó usando AmpliTools HotSplit Master Mix (Biotools®). Los programas que se utilizaron para la amplificación, así como el termociclador se indican en la *Tabla 4*.

Exón	Nombre cebador	Secuencia	Tamaño Amplicón (pb)
1	SMPD1_5F	AAGGAGACGTCTTCCACCGA	906
	SMPD1_5R	GCATGTAGCCATGGGTGTCC	
2	SMPD1_2F	TGGAAATGGAGGCCCAAG	996
	SMPD1_2R	TTAGGGGAGCCAAATGAAGA	
3-4	SMPD1_3F	ACTGTGAGCTCCTTGCAGGT	667
	SMPD1_3R	TGCTCAAGGGAATTTTCAGC	
5-6	SMPD1_4F	GGGGAGGCTCCTCACTAGAA	976
	SMPD1_4R	AGCTCCAGGAAAGGAGAAGG	
Final 6	SMPD1_6F	AGGGCTCGAGAAACCTATGG	846
	SMPD1_6R	ATGGGCACCTCTGCTGTATT	

Tabla 3. Cebadores diseñados para amplificar los 6 exones del gen *SMPD1* y tamaño de los amplicones en pares de bases. Cebador F (directo(forward)); Cebador R (cebador reverso).

Exón	Termociclador	Programa
1	Applied Biosystems® Veriti 96-Well Thermal Cycler	94°C 4 min x1 94°C 30 seg x40 63°C 30s x1 72°C 7 min x1 4°C ∞
2, 3, 4, 5 y 6	Eppendorf	94°C 4 min x1 94°C 30 seg x40 63°C 30 seg x40 72°C 1 min x1 72°C 7 min x1 4°C ∞

Tabla 4. Condiciones de amplificación de los exones del gen *SMPD1*.

Posteriormente, se purificaron los productos de PCR correspondientes a los exones del gen *SMPD1*. Para ello, se prepararon 5 µl de los productos de PCR, junto con 1,5 µl de ExoSAP-IT (Applied Biosystems®) y se calentaron 15 minutos a 37°C y otros 15 minutos a 80°C.

Por último, se prepararon las muestras para la secuenciación Sanger. Se añadieron 7 µl de H₂O + 7 µl del cebador de secuenciación correspondientes a cada exón + 2 µl de una dilución 1/5 de los productos de PCR purificados (se obtuvieron dos tubos por producto, ya que en uno se añadió el cebador directo (F) y en otro el reverso (R)). Estos tubos fueron

entonces secuenciados en un secuenciador automático (ABI PRISM 377 Applied BioSystems®) en el servicio de Genómica del ISCIII.

Para determinar la presencia de variantes en la muestra de ADN de la biopsia del paciente se compararon las secuencias obtenidas de cada uno de los exones del gen *SMPD1* con una secuencia de referencia NG_011780 (*SMPD1*).

3.6. Preparación de muestras de organoides diferenciados a hepatocitos para estudios de histología

3.6.1. Inclusión de organoides hepáticos en parafina.

Se prepararon organoides diferenciados a hepatocitos en cassettes de parafina del paciente NPB y del individuo sano de la siguiente manera: se aspiró el medio de unos 6 pocillos de las placas de 24 en cultivo, añadiendo 100 µl de matriz BME2, que transcurridos 2-3 minutos se raspó y se introdujo en los cassettes para recoger los organoides. Entonces, se introdujo el cassette en paraformaldehído (PFA) 4% durante 1 hora y posteriormente, se pasó a etanol 70%. Después, se realizaron cortes a 3 µm en el Servicio de Histología (ISCIII) y se tiñeron con Hematoxilina/Eosina. Para ello, se calentaron a 60°C durante 10 minutos (desparafinación), se deshidrataron con etanol unos 5 minutos y se rehidrataron con agua. Entonces, se sumergieron en hematoxilina entre 3-5 minutos, se hizo un lavado con abundante agua y otro con ácido clorhídrico 0,5%, tras el cual se realizó otro lavado con agua y se sumergieron durante 3-5 minutos en eosina. Por último, se hizo un lavado con agua y tres con etanol de 3-5 minutos para deshidratar las muestras. Antes y después de la tinción se introdujeron las muestras en xilol durante 5 minutos. Posteriormente se observaron en el microscopio invertido Leica® DM IL LED y se tomaron imágenes en el microscopio EVOS M5000 Invitrogen®.

3.6.2. Cytospin: preparación de organoides hepáticos en portaobjetos de vidrio

Para detectar la acumulación de lípidos y la presencia de células espumosas, se realizó un cytospin con organoides diferenciados tanto del paciente NPB, como del individuo sano. Para ello, se recogieron los organoides en cultivo, unos 6 pocillos de la placa de 24, se lavaron los pellets con PBS-BSA 0,1% frío y se dejaron sedimentar por gravedad 10 minutos en hielo. Posteriormente, se añadieron 200 µl de PBS 1X por falcon de 15 ml y

se cargaron 50 μ l y 150 μ l en la cámara del cytopspin. Se centrifugaron entonces, a 600 rpm durante 1 minuto. Tras ello, se fijaron los organoides en los portaobjetos con paraformaldehído (PFA) 4% a temperatura ambiente durante 1 hora, (después pueden guardarse en PBS 1X a 4°C). Por un lado, se tiñeron los organoides mediante hematoxilina/eosina y por otro, se tiñeron con la tinción de lípidos celulares Oil Red O, llevando a cabo el protocolo siguiente: los portaobjetos seleccionados se dejaron atemperar a temperatura ambiente durante 30 minutos y fueron introducidos en una solución de formalina al 10% durante 10 minutos para fijar los tejidos. Tras un lavado rápido en isopropanol al 60%, los lípidos neutros de los cortes se tiñeron durante 30 minutos con una solución del colorante Oil Red O 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich®) en isopropanol, filtrada y diluida en agua (3:2), con la cual adquieren un color rojizo. Por último, y tras un lavado rápido con isopropanol al 60% y dos lavados con agua destilada de 5 minutos, los cortes fueron contrastados con hematoxilina de Mayer's (Panreac AppliChem®) para teñir los núcleos durante 3 minutos y, tras quitar el exceso del colorante, fueron montados con el medio de montaje Eukitt®. Todas las imágenes de las muestras en las que se realizó cytopspin se obtuvieron con el Hamamtsu scanner nanozoomer s360 y se procesaron con el programa NDP.view2.

3.7. Análisis de expresión de enzimas del metabolismo de la esfingomielina

El estudio de expresión de las enzimas que participan en el metabolismo de la esfingomielina (SM) se realizó a partir de los ADNc obtenidos para el estudio de biomarcadores en los organoides del paciente NPB y del control. Se prepararon diluciones 1/10 del ADNc sintetizado y se diseñaron los cebadores para amplificar los genes que participan en el metabolismo de la esfingomielina y que se muestran en la *Tabla 5*.

La qPCR se llevó a cabo a partir de los organoides diferenciados del paciente NPB y del control por triplicado usando Fast SYBR® Green Master Mix. La preparación de las muestras se realizó como se indica en la *Tabla 6*. El control negativo de la qPCR se realizó con H₂O y el gen constitutivo que se utilizó fue el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). La amplificación del ADNc se realizó en el termociclador QuantStudio 3 (Thermo Fischer®). La activación de la polimerasa se produjo a 95°C durante 20 segundos y se realizaron 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 segundo y de hibridación a 55°C durante 20 segundos. La curva de *melting* se realizó a

95°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos y 95°C durante 1 minuto para la elongación. Se llevó a cabo una cuantificación relativa de la expresión génica mediante el método Ct comparativo, obteniendo el valor *fold-change* (DDCt). Los datos resultantes se analizaron con el *software* de análisis de datos QuantStudio 3 y 5 (AppliedBiosystems®). Se utilizó la prueba t de Student para comparar la expresión génica entre el control y el paciente NPB. Se consideraron valores estadísticamente significativos si $p < 0,05$.

Nombre Proteína	Gen	Nombre Cebador F	Cebador F	Nombre Cebador R	Cebador R
Esfingomielina sintasa	<i>SGMS1</i> (SMS1)	SMS1_F	TTCTGGTGGTATCACACTA TG	SMS1_R	GTAAGATCGAGGTACAAT TCC
Esfingomielinasa ácida	<i>SMPD1</i> (ASM)	ASM_F	CTCGGGCTGAAGAAGGAA CCCA	ASM_R	AGCGTCTCCACACCTCCAC CAT
Esfingomielinasa neutra 2	<i>SMPD3</i> (nSM2)	nSM2_F	CTGTTTCTCAAGGTGCAG	nSM2_R	ACGAGGAGGTAGATTTTC G
Esfingomielinasa neutra 3	<i>SMPD4</i> (nSM3)	nSM3_F	CATACCCTTGTCTCCTATG	nSM3_R	GCCACATTTCAACAAAA CC
Ceramidasa ácida	<i>ASAH1</i> (CA)	CA_F	AGCGTGGGTGTTGAATCC	CA_R	ACAGCAGTTAGAACCAGA AGG
Esfingosina kinasa	<i>SPHK2</i> (SK2)	SK2_F	AGTGTGGAGAGCTGAAG	SK2_R	TGTTACATCAACGGGACC
Gliceralhído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>GAPDH</i>	GAPDH_F	CCTCGTCCCGTAGACAAAA TG	GAPDH_R	TGAAGGGGTCGTTGATGG C

Tabla 5. Cebadores diseñados para amplificar las enzimas que participan en el metabolismo de la esfingomielina (SM) y del gen constitutivo GAPDH. Cebador F (cebador directo(forward)); Cebador R (cebador reverso (reverse)).

	Volumen (μ l/muestra)
Cebador directo (10 μM)	0,4
Cebador reverso (10 μM)	0,4
Master Mix Fast SYBR Green	5
H₂O	2,2
ADNc (1/10)	2

Tabla 6. Preparación de las muestras para la qPCR Fast SYBR Green.

4. Resultados

4.1. Generación de organoides de hígado de un paciente NPB y de un individuo control

Se generaron organoides de hígado del paciente con la enfermedad de Niemann Pick tipo B y de un individuo control a partir de biopsias de hígado. En la *Figura 3* se muestran los diferentes estadios del cultivo para la generación de los organoides hepáticos, desde la biopsia hepática extraída a partir del individuo control y del paciente con la enfermedad de NPB. A partir de la biopsia (*Figura 3a*) se aislaron los ductos donde se encuentran las células madre ductales (*Figura 3b*), que tras 7 días en cultivo en el medio de aislamiento se crecen en medio de expansión con ROCK dando lugar a los organoides con forma quística y un tamaño inferior a 400 μm (*Figura 3c*). Tras 15-20 días de estar las células madre en expansión, los organoides mantienen su morfología, pero su lumen aumenta de tamaño considerablemente. Cuando se inicia el proceso de diferenciación a hepatocitos comienzan a perder la uniformidad en unos 5 días (*Figura 3d*), dejando de ser circulares y se van oscureciendo progresivamente a lo largo de la diferenciación (*Figura 3e-f*). Esto es debido a que los organoides se van rellenando de células diferenciadas a hepatocitos, a la vez que se van compactando y disminuyendo de tamaño. Los organoides empiezan a tener una estructura amorfa y más compleja en el lumen. Estos cambios aparecen de forma más temprana en la parte más alejada del centro del organoide, sugiriendo que la diferenciación se produce desde fuera hacia dentro en los límites del organoide. Este fenómeno recuerda a la estructura de un blastocito, que está formado por el blastodermo a modo de membrana y el blastocele en la cavidad interna.

Además de generar y mantener los cultivos de organoides de hígado en expansión para realizar diferentes experimentos, se conservaron en nitrógeno líquido distintas alícuotas, tanto de los obtenidos a partir de la muestra del paciente NPB como del control para poder utilizarlos en un futuro en estudios de investigación de la enfermedad en el laboratorio.

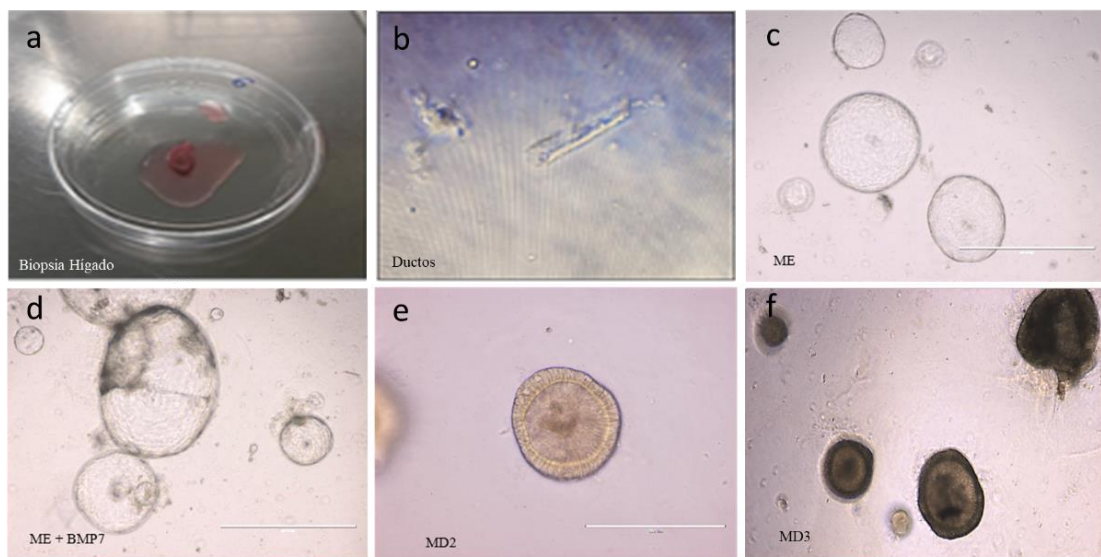
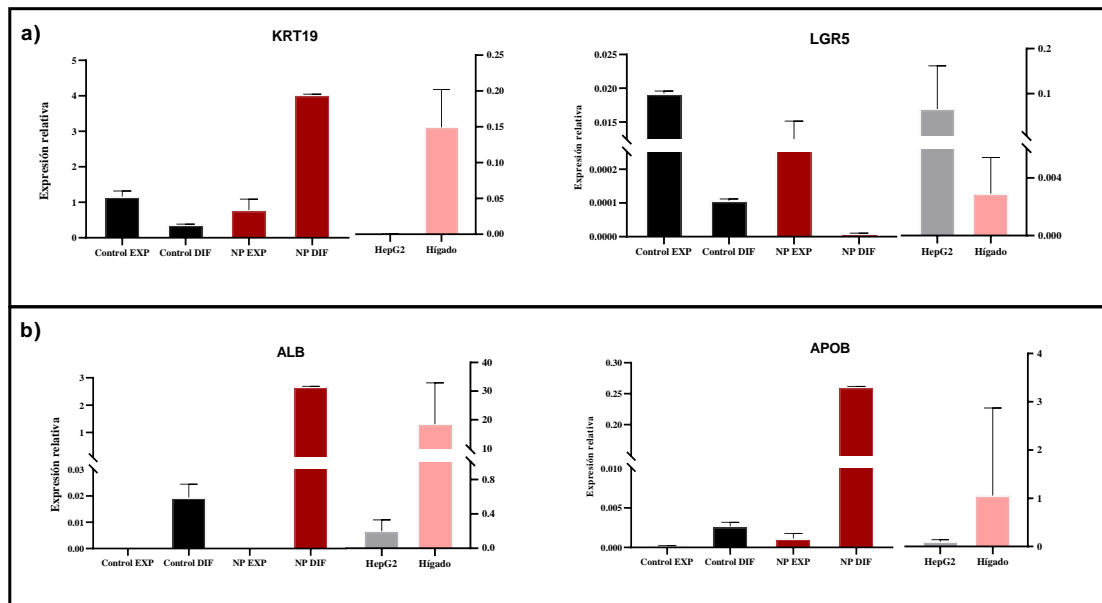


Figura 3. Imágenes del aislamiento, expansión y diferenciación de organoides de hígado en cultivo a 4x. a) Biopsia de hígado humano. b) Aislamiento de células ductales; c) Organoides en medio de expansión; d) Organoides en medio de expansión + BMP7 (pre-diferenciación, 5 días); e) Organoides en medio de diferenciación (10 días); f) Organoides en medio de diferenciación (15 días); ME: Medio de Expansión, MD: Medio de diferenciación.

4.2. Análisis de expresión génica hepatocito-específica en organoides en expansión y diferenciados a hepatocitos

Se realizó el análisis de la expresión de marcadores de células progenitoras, ductales y de hepatocitos en organoides en expansión y diferenciados a hepatocitos, del paciente Niemann Pick tipo B y del control, para determinar si se había conseguido establecer un cultivo de hepatocitos diferenciado. Para este estudio se utilizaron además dos controles, una línea celular HepG2 y una muestra de tejido hepático adulto.

Los resultados del análisis mostraron, como era de esperar, que los organoides diferenciados del paciente NPB y del control, expresaban un perfil hepático al mostrar niveles de expresión génica elevados en genes específicos de hepatocitos como la albúmina (*ALB*) y la apolipoproteína B (*APOB*), al igual que se observó en la muestra de tejido hepático adulto y en la línea celular HepG2. En el caso de los organoides en expansión se observa que los niveles de expresión de ambos marcadores son prácticamente indetectables (*Figura 4*).



Organoides control
 Organoides Paciente
 HepG2
 Hígado

Figura 4. Resultados análisis de expresión génica en organoides (Control y Paciente NP) y controles (HepG2 e Hígado). a) Marcadores de multipotencia (KRT19 y LGR5); b) Marcadores específicos de hepatocitos (ALB y APOB). (EXP: Expansión, DIF: Diferenciación).

Se validó también la expresión de los marcadores ductales y de células progenitoras tanto en organoides en expansión del control como en los del paciente NPB. El marcador de células progenitoras (LGR5) se expresaba en los organoides en expansión, tanto en el control como en NP, al igual que en la línea celular HepG2. En cuanto al marcador de células ductales, KRT19, se observaron diferencias entre los organoides control y NPB, aunque todos los organoides mostraban una expresión elevada de este gen, al igual que la muestra de tejido hepático.

4.3. Genotipado de organoides del paciente NPB

Para realizar el diagnóstico genético del paciente se realizó la PCR de los distintos exones del gen *SPMD1* obteniéndose los distintos amplicones que fueron posteriormente purificados y secuenciados mediante secuenciación Sanger. En la *Figura 5* se muestran los resultados una vez amplificadas los exones en una electroforesis en gel de agarosa al 2%, usando el marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb (0,5 mg/ml) Biotools®.

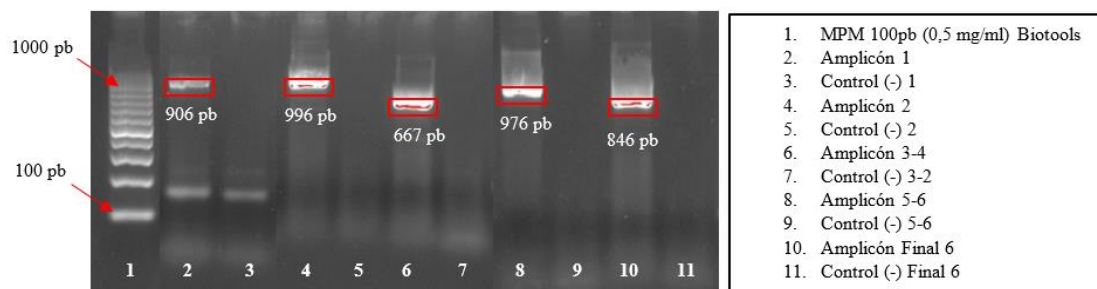


Figura 5. Gel de agarosa de los exones amplificados del gen *SMPD1*, mostrando la banda (recuadro rojo) correspondiente a cada amplicón. 1) Marcador de peso molecular de 100 pb (0,5 mg/ml) Biotools; 2) Amplicón 1 (906 pb); 4) Amplicón 2 (996 pb); 6) Amplicón 3-4 (667 pb); 8) Amplicón 5-6 (976 pb); 10) Amplicón final 6 (846 pb); 3,5,7,9 y 11) Controles negativos de amplicones.

El genotipado del paciente NPB permitió identificar la variante responsable de la enfermedad del paciente. La variante que se detectó en el paciente se corresponde a una deleción en homocigosis de tres pares de bases en el exón 6 del gen *SMPD1*, NM_000543.5: c.1829_1831delGCC (Figura 6). Esta deleción se traduce en la pérdida de una arginina en la secuencia proteica de la enzima esfingomielinasa ácida (ASM) p.Arg610del (R608del), manteniéndose el marco de lectura.

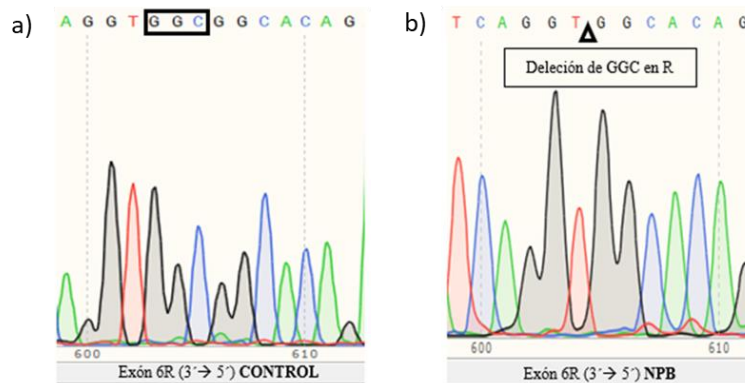


Figura 6. Secuencia exón 6 del gen *SPMD1* (R: reverso 3' → 5'); a) Secuencia individuo control. b) Secuencia del paciente NPB: variante patogénica (NM_000543.5: c.1829_1831delGCC).

4.4. Identificación de células espumosas y depósitos de lípidos

El análisis histológico, mediante distintas tinciones, de los organoides diferenciados a hepatocitos del paciente Niemann Pick tipo B en comparación con los organoides diferenciados del individuo control permitió, por un lado, la identificación de células hepáticas espumosas en el paciente y por otro, la acumulación de lípidos en el interior celular. En las Figuras 7 y 8 se muestran las células espumosas detectadas tanto en las

muestras de organoides diferenciados a hepatocitos, incluidas en parafina (*Figura 7*), como en las muestras de cytopspin (*Figura 8*), teñidas ambas con hematoxilina/eosina. Las células espumosas presentan estructuras vacuoladas en el citoplasma que es una característica descrita para los pacientes con la enfermedad de Niemann Pick. Como se puede observar en las figuras en las células de los organoides del individuo control no aparecen estas vacuolas en el citoplasma.

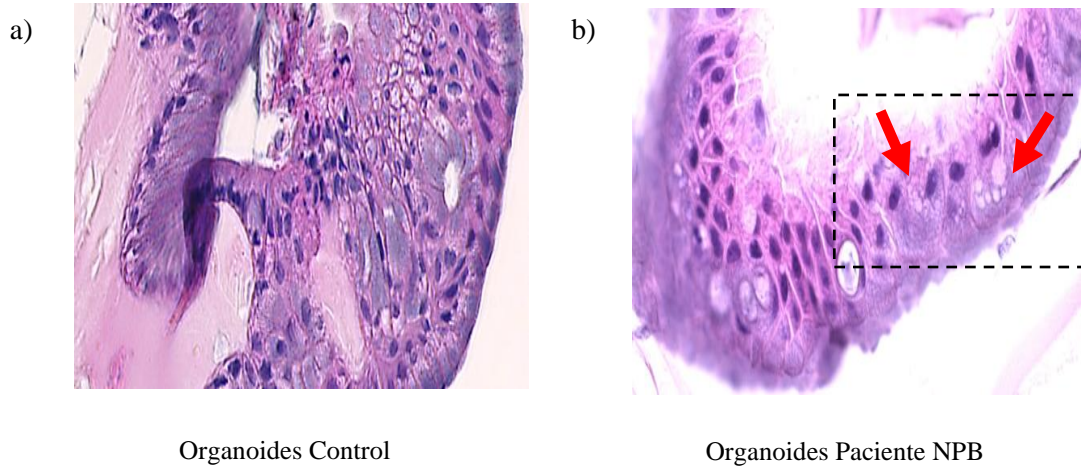
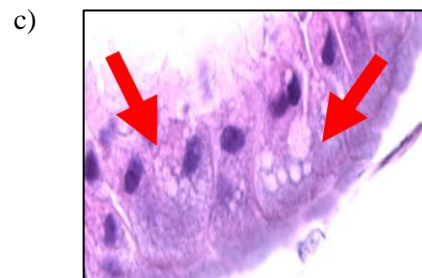


Figura 7. Cortes histológicas de organoides diferenciados a hepatocitos incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina/eosina. a) Individuo control b) Paciente NPB: en las flechas rojas se pueden observar las células hepáticas espumosas. Observados en microscopio invertido a 20x., c) Zona ampliada de la imagen b.



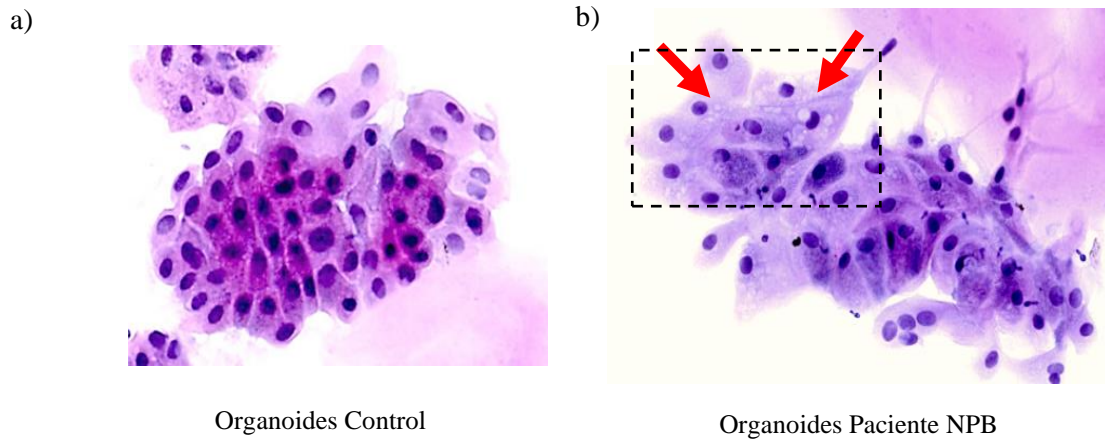
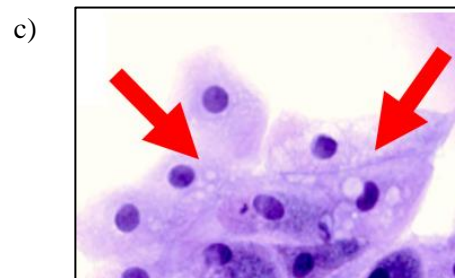


Figura 8. Cytospin de organoides diferenciados a hepatocitos teñidos con hematoxilina/eosina a) Individuo Control, b) Paciente NPB. Se muestran células hepáticas espumosas (flechas rojas). Observados en Hamamtsu scanner nanozoomer s360 a 20x, c) Zona ampliada de imagen b.



Se ha detectado la presencia de depósitos de lípidos en el interior celular en las muestras de los organoides diferenciados a hepatocitos del paciente NPB mediante la tinción Oil Red O, lo que indica un incremento en la acumulación de lípidos, en comparación con los organoides del individuo control (Figura 9).

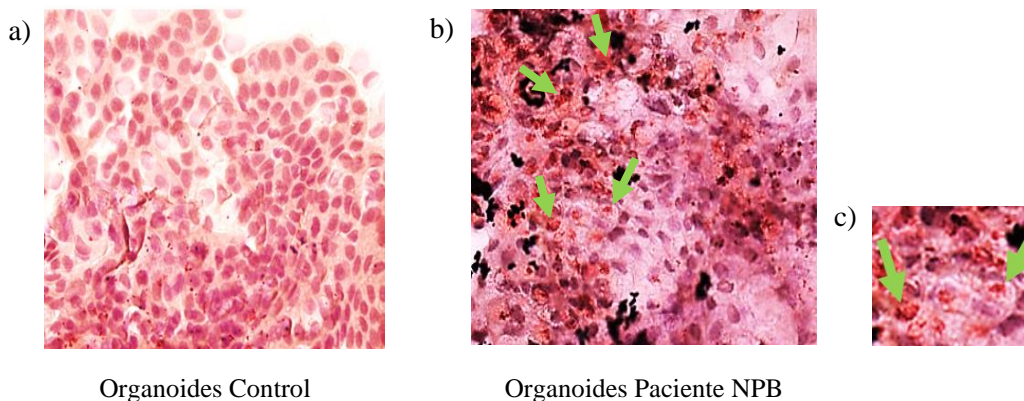


Figura 9. Organoides diferenciados a hepatocitos teñidos con Oil Red O: a) Individuo control; b) Paciente NPB. Se visualizan los depósitos de lípidos teñidos de rojo (marcados por flechas verdes). Observados en Hamamtsu scanner nanozoomer s360 a 20x, c) Zona ampliada de la imagen b.

4.5. Análisis de expresión de enzimas del metabolismo de la esfingomielina (SM) en organoides diferenciados del paciente NPB

Se analizó la expresión de algunas de las enzimas que participan en el metabolismo de la esfingomielina (SM) (*Figura 10*), en los organoides diferenciados a hepatocitos del paciente NPB frente al control.

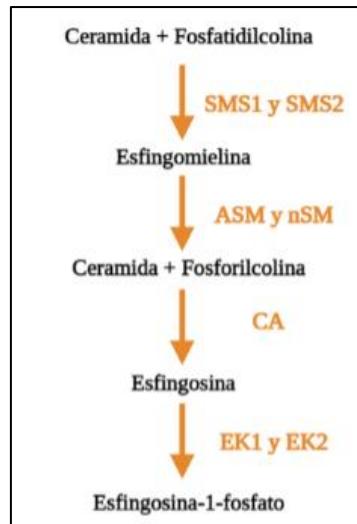


Figura 10. Esquema de la ruta metabólica de la esfingomielina (SM). Se indican en naranja las enzimas que participan en el metabolismo de la SM. Enzimas: SMS (esfingomielinasa sintasa 1 y 2), ASM (esfingomielinasa ácida), nSM (esfingomielinasas neutras 1, 2 y 3), CA (Ceramidasa) y SK (esfingosina kinasa 1 y 2). Creado con el Software BioRender.com por Sara Núñez Torvisco 2022.

Se estudiaron los niveles de expresión de las siguientes enzimas que participan en el metabolismo de la SM: SMS1, ASM, nSM2 y 3, CA y SK2. Los resultados nos indican que un aumento de los niveles de SM en el hígado del paciente NPB, dan lugar a una alteración de la expresión de las enzimas que participan en el metabolismo de la SM. En concreto, se observó que la enfermedad da lugar a un aumento significativo de los niveles de expresión de las enzimas que participan en la hidrólisis de la SM a ceramida y fosforilcolina, es decir, tanto de la esfingomielinasa ácida (ASM) como de la esfingomielinasa neutra 2 (nSM2). Por otro lado, las enzimas como la ceramidasa ácida (CA) y la esfingosina kinasa 2 (SK2) que participan en el metabolismo de la esfingosina o la SMS1 que genera SM a partir de fosfatidilcolina y ceramida también tienen mayor expresión que el control, pero no se considera significativo (*Figura 11*).

Genes metabolismo SM

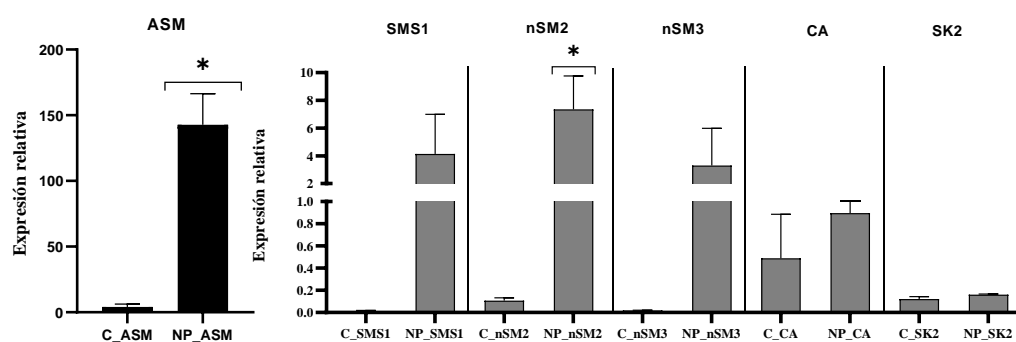


Figura 11. Análisis de la expresión de enzimas que participan en el metabolismo de la esfingomielina (SM) en organoides diferenciados a hepatocitos del paciente NPB (NP) y control (C). a) Expresión de esfingomielinasa ácida (ASM); b) Expresión de otras enzimas que participan en el metabolismo de la SM: SMS1 (esfingomielina sintasa 1), nSM2 y nSM3 (esfingomielinasas neutras 2 y 3), CA (ceramidasa) y SK2 (esfingosina kinasa). * P valor < 0,05.

5. Discusión

5.1. Organoides como modelo de cultivo celular 3D para el estudio de la enfermedad hepática Niemann Pick Tipo B

Durante el desarrollo de este trabajo se ha generado un nuevo modelo de cultivo 3D, consistente en organoides de hígado para estudios funcionales en hepatocitos humanos. Este modelo de organoides hepáticos ofrece diferentes ventajas respecto a otros sistemas ya existentes, siendo en la actualidad uno de los mejores para realizar estudios funcionales en hepatocitos (Huch et al. 2015a; Huch et al. 2015b; Nibourg et al., 2012; Tafaleng et al., 2015).

Los cultivos de organoides ofrecen diferentes ventajas: primero, se pueden expandir a largo plazo y presentan gran estabilidad genómica; segundo, son capaces de recapitular las funciones de las células hepáticas y permiten establecer diferencias entre los mecanismos moleculares del hígado enfermo y el sano, *ex vivo*; por último, tal y como ha sido descrito en modelos de ratón, se pueden trasplantar regenerando la función que estaba alterada en el hígado (Huch et al. 2015a; Yui et al. 2012), proporcionando nuevos caminos para la terapia génica y la medicina regenerativa. Las ventajas de estos sistemas junto con el avance en tecnologías de impresión 3D y de imagen, están favoreciendo el estudio de enfermedades hepáticas y de nuevas terapias.

Existe un gran número de enfermedades monogénicas y poco frecuentes con afectación hepática que pueden beneficiarse del establecimiento de organoides de hígado para el estudio de la enfermedad, incluyendo la enfermedad de Niemann Pick.

Las estrategias de generación de organoides hepáticos tienen como principal objetivo reproducir las fases más importantes de la organogénesis, para establecer modelos *in vitro* para el estudio de enfermedades. El establecimiento de líneas de organoides hepáticas deben, por lo tanto, seguir las mismas etapas de desarrollo que se suceden *in vivo*. Así, durante el aislamiento de las células ductales debe ocurrir un proceso equivalente al que se produce durante la gastrulación, cuando la blástula da lugar al endodermo. La yema hepática se produce entonces a partir del endodermo estimulada por señales de Activin/Nodal, WNT, FGF y BMP. Una vez se ha formado esta estructura, los hepatoblastos se expanden y se diferencian a hepatocitos y epitelio biliar, mientras que el mesénquima derivado del endodermo participa en la generación de fibroblastos hepáticos

y células estrelladas. Por último, se produce la maduración de los hepatocitos y colangiocitos, al igual que la integración celular del mesénquima y el endotelio (Akbari et al., 2019).

Se ha reportado en varios estudios la plasticidad bipotente de una subpoblación de hepatoblastos que sirven como progenitores para la generación de hepato-organoides y colangio-organoides (Nuciforo & Heim, 2021; Zhu et al., 2021b). Estas células expresan en su superficie el receptor acoplado a proteína G rico en repeticiones de leucina (*LGR5*), lo que lo convierte en un marcador apropiado de células madre epiteliales del conducto biliar. Estas células se conocen como células madre hepáticas *LGR5*⁺. Su capacidad de diferenciación a hepatocitos o células epiteliales del conducto biliar está limitada a eventos de reparación hepática, estando prácticamente ausentes en el hígado adulto sano, mientras que se encuentran incrementadas en fenómenos de regeneración dirigidos por la vía de señalización Wnt. No obstante, se pueden expandir organoides hepáticos a partir de fragmentos de ductos biliares sanos siguiendo los mismos protocolos (Morris et al., 2013).

Como está descrito en el trabajo de Broutier y sus colaboradores (Broutier et al., 2016), para establecer cultivos de organoides de hígado adulto expandibles a largo plazo se requiere el uso de una matriz, junto con diferentes factores de crecimiento como HGF, EGF, FGF Y Rspo1. Estas condiciones permiten la expansión de organoides hepáticos a partir de tejido hepático adulto y de progenitores inducidos por daño hepático durante meses. Normalmente, los organoides en expansión van a expresar el marcador ductal *KRT19* y se van a organizar en una estructura tridimensional con una sola capa epitelial parecida al compartimento hepático ductal y una zona pseudoestratificada que se asemeja a la yema hepática de un embrión E9-E10. En un estudio (Morris et al., 2013) sobre la expansión *in vitro* de células madre hepáticas *LGR5*⁺ inducidas por la regeneración dirigida por la vía Wnt observaron una expresión elevada de este marcador en células madre ubicadas en los ductos biliares, permitiendo la expansión de progenitores de hígado adulto a partir del compartimento ductal. Los organoides en expansión que generaron mostraban una elevada expresión de *LGR5* y marcadores progenitores como *SOX9*, *CD44* y *PROM1*. Además, expresaban tanto marcadores ductales, como de linaje hepático, confirmando que las células *LGR5*⁺ son bipotentes. En cuanto a marcadores de hepatocitos maduros, la expresión era escasa o nula. Sin embargo, tras exponer los

organoides a las condiciones de diferenciación reportaron la expresión de más de 200 genes relacionados con la maduración hepática, como *TBX3*, *PPAR γ* y *BMP2*, al igual que marcadores de maduración hepática como *CYP3A11*, *FAH*, *G6P* y *ALB*. Algunos genes implicados en el metabolismo lipídico y del colesterol, como puede ser el *APOB*, así como citocromos P450, también estaban inducidos, mientras que el perfil progenitor dejó de expresarse. Sin embargo, destacan que el fenotipo ductal no desapareció del todo, ya que algunas zonas mantenían células *KRT19*⁺. Aun así, las pruebas de función hepática mostraron que las células de los organoides diferenciados eran competentes para acumular glucógeno, captar LDL y secretar cantidades considerables de albúmina al medio. En cualquier caso, al expandir y diferenciar los organoides *in vivo* las células adquirirían el fenotipo completo de maduración hepática, silenciando cualquier remanente de expresión ductal. Como cabía esperar, el estudio de expresión de marcadores de expansión y de diferenciación en organoides hepáticos del paciente NPB y del control en este trabajo, indicaron una elevada expresión del marcador *LGR5* en los organoides en expansión y de los marcadores de *ALB* y *APOB* en los organoides diferenciados. Además, pudimos detectar expresión del marcador *KRT19* en los organoides diferenciados a hepatocitos tanto del control como del paciente NPB. Estos resultados coinciden con lo descrito en el trabajo de (Nuciforo & Heim, 2021), en el que se establece que los colangio-organoides en expansión crecen como estructuras quísticas que expresan una combinación de marcadores específicos de hepatocitos y colangiocitos, que una vez se diferencian, se convierten en células con función hepática capaces de secretar albúmina, almacenar glucógeno, metabolizar xenobióticos, captar lípidos y producir ácidos biliares. A pesar de ello, expresan que los colangio-organoides diferenciados muestran una maduración hepática incompleta al exhibir una expresión residual de marcadores ductales *in vitro*, que sólo se observa completamente ausente cuando se trasplantan *in vivo*.

5.2. Los organoides de hígado del paciente NPB reproducen las características de la enfermedad hepática

Aplicando los métodos de cultivo 3D desarrollados previamente a partir de células madre adultas (AdSC) (Huch et al. 2015a), se han podido desarrollar organoides de hígado a partir de muestras de pacientes con Niemann Pick tipo B, que se ha comprobado que adquieren las características histopatológicas típicas de la enfermedad, como son la

presencia de células hepáticas espumosas y la acumulación de depósitos de lípidos en el interior celular.

La acumulación de SM y otros lípidos en las células, especialmente en las del sistema reticuloendotelial, es una manifestación clínica característica de la enfermedad de Niemann Pick. Estas células predominan en el bazo, el hígado y los pulmones, resultando en la aparición de hepatoesplenomegalia y enfermedad pulmonar. En este trabajo se han identificado células espumosas en los organoides hepáticos del paciente NPB. Normalmente, los pacientes NPB cursan la enfermedad con un perfil lipídico aterogénico, es decir, presentan una disminución de colesterol HDL, mientras que las concentraciones de LDL se encuentran incrementadas. Además, se suele observar hipertrigliceridemia y elevación de la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Esta acumulación de lípidos en las células del organismo del paciente puede derivar en otras características fenotípicas de la enfermedad. La aparición de una mancha rojo cereza en la mácula de algunos pacientes NPB resulta ser una consecuencia del abundante acúmulo de lípidos en las células ganglionares retinianas. Por otro lado, la afección pulmonar que sufren estos pacientes se debe a la acumulación de macrófagos cargados de lípidos en la pleura, las paredes bronquiales y los septos alveolares, que les genera un deterioro progresivo de la función pulmonar (Klzyjypy et al., n.d.-b).

Además, la acumulación de lípidos en los pacientes con enfermedades por depósito lisosomal se conoce que está estrechamente relacionada con el proceso intracelular de la autofagia. La autofagia es el principal mecanismo intracitoplasmático de degradación de materia dentro de los lisosomas que permite el reciclaje de constituyentes y la producción de energía en condiciones de estrés. Está implicada tanto en la supervivencia celular, como en la apoptosis. Se regula a muchos niveles por diversos moduladores que están en continuo descubrimiento. Entre estos moduladores destaca la identificación de la ASM, implicada en numerosas afecciones patofisiológicas (Perrotta et al., 2015). La conexión entre la enzima y el proceso de autofagia reside en la contribución de los esfingolípidos en la formación del fagoporo y la membrana autofagosomática, asociándose las alteraciones en las balsas lipídicas con defectos en la autofagia. Aunque el conocimiento de la relación ASM-autofagia es todavía bastante reciente y requiere la continuación de su estudio, se puede establecer que un desequilibrio en la actividad enzimática de la ASM, bien por supresión o sobreexpresión, resulta en la desregulación del flujo autofágico,

interviniendo en la patogénesis de diversas enfermedades como el cáncer, enfermedades del sistema nervioso y cardiovasculares y disfunciones hepáticas. En 2014 se realizó un estudio en el que se reportó que la acumulación de lípidos contribuía al deterioro de la autofagia, ya que la adición de SM a un cultivo primario de neuronas de ratón *wildtype* para ASM resultó ser responsable de las alteraciones causadas en el complejo autofagosoma-lisosoma de estas células. Así mismo, se señaló que la permeabilización de la membrana lisosomal y la liberación de catepsina B en neuronas y fibroblastos deficientes para ASM son causantes de la acumulación autofago-lisosomal y su escasa capacidad degenerativa (Gabandé-Rodríguez et al., 2014).

Cuando las células del hígado, el bazo, los pulmones, los nódulos linfáticos, la corteza suprarrenal y la médula ósea están cargadas de lípidos, adoptan una apariencia espumosa tras ser analizadas histológicamente (Miller, n.d.). Estas células espumosas, han sido identificadas por los patólogos como células vacuoladas teñidas con Hematoxilina/Eosina en secciones de parafina. Esto se debe a que los solventes que se utilizan para deshidratar y limpiar la muestra en el proceso de desparafinación eliminan el componente lipídico de la SM, de forma que al estar este compuesto en grandes cantidades en las células de los pacientes NPB aparecen huecos en las mismas, dando lugar a la característica apariencia de las células espumosas (Taksir et al., 2012). Un inconveniente de este método de fijación es la imposibilidad de cuantificar la SM acumulada en los tejidos de los pacientes de ASMD. En el hígado, las células espumosas se detectan en los hepatocitos, las células epiteliales del conducto biliar y en las células de Kupffer. El deterioro tisular que provocan las anomalías lipídicas en el hígado de los pacientes NPB puede degenerar en fibrosis, que normalmente progresa a cirrosis (Miller, n.d.).

5.3. Aumento de expresión de las esfingomielinasas ácida (ASM) y neutra (nSM2) del metabolismo de la esfingomielina (SM)

En este estudio, se ha detectado en los organoides hepáticos del paciente NPB un aumento en los niveles de expresión del gen que codifica para la ASM (*SMPD1*), probablemente debido a la acumulación de la SM. El déficit de ASM en Niemann Pick provoca una importante acumulación de SM, que desencadena una cascada de disfunción catabólica. Además, la mayoría de la literatura describe que la ASM hidroliza únicamente esfingomielina para generar ceramida e ignora su capacidad para degradar más de veinte fosfolípidos diferentes *in vitro*. La deficiencia de ASM en la enfermedad de Niemann

Pick tipo A y B afecta principalmente, aunque no sólo, al catabolismo celular de la SM, provocando además de una acumulación progresiva de SM, una acumulación secundaria de otros lípidos como el colesterol, la glucosilceramida y el gangliósido GM2, dando lugar a un agravamiento del curso clínico de la enfermedad (Breiden & Sandhoff, 2021).

Uno de los efectos de la acumulación de SM es el bloqueo de la secreción de colesterol, que lleva a una acumulación secundaria masiva del mismo en pacientes ASMD. Tanto la SM como el colesterol inhiben varios procesos lisosomales, mientras que los productos de degradación de la acción de la ASM (ceramida y diacilglicerol) son estimuladores de muchos procesos lisosomales y celulares. Un desequilibrio SM/ceramida puede provocar estrés celular y apoptosis, por lo que un aumento en la expresión de ASM de los pacientes NPB explicaría un intento por restaurar el equilibrio SM/ceramida y mantener la homeostasis celular.

En cuanto al aumento significativo de la expresión de nSM2 en los organoides del paciente NPB, en 2003 algunos autores describieron que la nSM2 es específica para la SM endógena y demostraron que esta enzima es capaz de acelerar el catabolismo de SM (Marchesini et al., 2003).

Los resultados del análisis de expresión enzimática obtenidos en este trabajo sugieren la existencia de un mecanismo celular para aumentar el catabolismo de la SM en los pacientes NPB para tratar de reducir los depósitos de SM en el interior celular. Asimismo, la nSM2 ha sido ampliamente estudiada en el contexto de regulación de la respuesta inmunitaria e inflamatoria y se ha demostrado que los factores inflamatorios TNF- α , IL1- β e IFN- γ activan la enzima. En concreto, los hepatocitos son muy sensibles a la estimulación con IL-1 β , dando lugar a una respuesta inflamatoria elevada debido a unos mayores niveles de actividad de nSM2. Esto convierte a la nSM2 en una excelente diana para el tratamiento de la inflamación en enfermedades hepáticas (Adada et al., 2016).

5.4. Identificación de la variante más frecuente en España en el paciente NPB: p.Arg610del (R608del)

Hasta la fecha, se han descrito más de 180 mutaciones diferentes (ver Human Gene Base: <http://www.hgmd.org/>), pero sólo se han encontrado unas pocas con una frecuencia relativamente alta en poblaciones específicas. La variante p.Arg610del (R608del) que se detectó en el paciente NPB, es una de las variantes más frecuentes de la enfermedad Niemann Pick tipo B en España, Italia y el Norte de África. La frecuencia alélica de esta mutación en pacientes norteafricanos, la mayoría de ellos homoalélicos, es tan alta que se sospecha que sea en esta población en la que se originó la variante. Se ha descrito que es el alelo mutante predominante en la región del Magreb del norte de África, con una frecuencia del 87%. En España se ha detectado con una frecuencia del 38% y en un informe que incluye pacientes de países de Europa, EE. UU. y Brasil con un 25%. A nivel mundial, esta variante alélica supone un 12% del total de las variantes descritas para la enfermedad de Niemann Pick tipo A y B (Zhang et al., 2013).

La descripción de esta variante permitió establecer la primera correlación genotipo/fenotipo en pacientes Niemann Pick tipo A y tipo B, gracias a un estudio sobre la heterogeneidad fenotípica de la enfermedad (Disease, 1991). Esta correlación genotipo/fenotipo fue confirmada en un estudio de caracterización de mutaciones en el gen *SMPD1* en una cohorte de pacientes españoles (Irun, 2013). Este estudio reveló que los pacientes homoalélicos para la variante R496L, identificada en pacientes NPA, mantenían menos del 1% de la actividad enzimática de la esfingomielinasa ácida, mientras que pacientes NPB con genotipo R496L/DR608 o DR608/DR608 presentaban una actividad enzimática residual suficiente para no desarrollar manifestaciones neurológicas, sugiriendo que las consecuencias de sustituir una arginina por una leucina en la posición 496 son significativamente más graves para la actividad y estabilidad de la enzima que la delección de una arginina en la posición 608. Por otro lado, de todas las mutaciones que analizaron (p.V130A, p.L225P, p.R228C, p.Y367C, p.Y467S, p.A482E, p.T486A y p.Arg610del (R608del)) sólo las variantes p.R608del, p.V130A y p.L225P mostraban actividad residual notable, siendo del 21,5%, 33,3% y 11%, respectivamente, en comparación con la *wildtype*.

Dado que los organoides que se han generado derivan directamente de un individuo afectado, la generación de organoides derivados de pacientes portadores de otras variantes

pueden ayudarnos a dilucidar la compleja heterogeneidad de la enfermedad hepática entre distintos individuos afectados y a su vez estudiar factores modificadores que hacen que individuos con el mismo genotipo desarrollen manifestaciones de la enfermedad hepática diferentes.

Se puede determinar que los organoides de hígado generados en el desarrollo de este trabajo son un buen modelo para el estudio de la enfermedad hepática en los pacientes con Niemann Pick tipo B y que puede trasladarse al estudio de los tipos A y A/B.

6. Conclusión

La generación de líneas de organoides hepáticos a partir de biopsias de hígado se realizó con éxito tanto en el paciente con la enfermedad de Niemann Pick como en el control, estableciendo un modelo celular *in vitro* para el estudio de la enfermedad de Niemann Pick tipo B. La acumulación de lípidos en el interior de los organoides diferenciados del paciente, junto con la presencia de células espumosas mostraron algunas de las características histopatológicas de la enfermedad de NPB en los organoides en cultivo. Además, se ha identificado un aumento en la expresión de las enzimas implicadas en la degradación de la SM que sugiere la existencia de un mecanismo celular para aliviar los depósitos de lípidos en los hepatocitos. Por otro lado, ha sido posible caracterizar genéticamente al paciente, identificando la mutación responsable de la enfermedad, en el exón 6 del gen *SMPDI* p.Arg610del (R608del) y que aparece descrita en la literatura como una de las variantes más frecuentes en España. El establecimiento de este modelo permitirá seguir caracterizando molecularmente la enfermedad hepática mediante el análisis de expresión génica con RNASeq para determinar variaciones en la expresión de otros genes que pudieran estar modulando la enfermedad, así como estudios de terapias farmacológicas mediante la utilización de inhibidores de la síntesis de esfingomielina (SM). Por otro lado, la generación de organoides hepáticos de otros pacientes, con otras mutaciones pueden permitir caracterizar fisiológicamente la enfermedad hepática y establecer correlaciones fenotipo/genotipo.

Bibliografía

- Adada, M., Luberto, C., & Canals, D. (2016). Inhibitors of the sphingomyelin cycle: Sphingomyelin synthases and sphingomyelinases. In *Chemistry and Physics of Lipids* (Vol. 197, pp. 45–59). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.07.008>
- Akbari, S., Arslan, N., Senturk, S., & Erdal, E. (2019). Next-Generation Liver Medicine Using Organoid Models. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(December), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00345>
- Albinet, V., Bats, M.-L., Bedia, C., Sabourdy, F., Garcia, V., Ségui, B., Andrieu-Abadie, N., Hornemann, T., & Levade, T. (2013). Sphingolipids: Basic Science and Drug Development. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 215(215), 127–152. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1368-4>
- Breiden, B., & Sandhoff, K. (2021). Acid sphingomyelinase, a lysosomal and secretory phospholipase c, is key for cellular phospholipid catabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22169001>
- Broutier, L., Andersson-rolf, A., Hindley, C. J., Boj, S. F., Clevers, H., Koo, B., & Huch, M. (2016). *Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.097>
- Diaz, G. A., Jones, S. A., Scarpa, M., Mengel, K. E., Giugliani, R., Guffon, N., Batsu, I., Fraser, P. A., Li, J., Zhang, Q., & Ortemann-Renon, C. (2021). One-year results of a clinical trial of olipudase alfa enzyme replacement therapy in pediatric patients with acid sphingomyelinase deficiency. *Genetics in Medicine*, 23(8), 1543–1550. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01156-3>
- Disease, T. B. (1991). *Niemann-Pick Type B Disease*. 88(September), 806–810.
- Gabandé-Rodríguez, E., Boya, P., Labrador, V., Dotti, C. G., & Ledesma, M. D. (2014). High sphingomyelin levels induce lysosomal damage and autophagy dysfunction in Niemann Pick disease type A. *Cell Death and Differentiation*, 21(6), 864–875. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.4>
- He, R. (2017). *Enfermedad de Niemann Pick tipo-A . Presentación de 12 casos Niemann Pick disease type-A* : 38(3), 152–164.
- Irun, P. (2013). *Identification of seven novel SMPD1 mutations causing Niemann – Pick disease types A and B*. 356–361. <https://doi.org/10.1111/cge.12076>

- Kanfer, J. N., Young, O. M., Shapiro, D., & Brady, R. (1966). of Sphingomyelin. *Journal of Biological Chemistry*, 241(5), 1081–1084. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)96805-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96805-5)
- Klzyjypy, O., Yzv, L. S. J., Sh, K. L., Kl, L., Kl, S. H., Kl, L. U., Luapth, S. H., & Lu, L. (n.d.-a). *Pick tipo B . Estudio de tres casos y revisión de la literatura Niemann- Pick disease type B . Study of three cases and.* 30–37.
- Klzyjypy, O., Yzv, L. S. J., Sh, K. L., Kl, L., Kl, S. H., Kl, L. U., Luapth, S. H., & Lu, L. (n.d.-b). *Pick tipo B . Estudio de tres casos y revisión de la literatura Niemann- Pick disease type B . Study of three cases and.* 30–37.
- Kolodny, E. H. (2000). Niemann-Pick disease. *Current Opinion in Hematology*, 7(1), 48–52. <https://doi.org/10.1097/00062752-200001000-00009>
- Lancaster, M. A., & Huch, M. (2019). Disease modelling in human organoids. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 12(7). <https://doi.org/10.1242/dmm.039347>
- Marchesini, N., Luberto, C., & Hannun, Y. A. (2003). Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase2 and its role in sphingolipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 13775–13783. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212262200>
- Mcgovern, M. M., Wasserstein, M. P., Giugliani, R., Bembi, B., Vanier, M., Mengel, E., Brodie, S. E., Skloot, G., Desnick, R. J., Kuriyama, N., & Gerald, F. (2009). *NIH Public Access*. 122(2). <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3016.A>
- Miller, S. M. (n.d.). *NIEMANN-PICK DISEASE Enfermedad de Niemann-Pick*.
- Morris, A. S. C., Denham, A. S., Bassett, H. H., & Curby, W. T. (2013). 基因的改变NIH Public Access. *Bone*, 494(7436), 979–999. <https://doi.org/10.1038/nature11826>.In
- Nibourg, G. A. A., Chamuleau, R. A. F. M., van Gulik, T. M., & Hoekstra, R. (2012). Proliferative human cell sources applied as biocomponent in bioartificial livers: A review. In *Expert Opinion on Biological Therapy* (Vol. 12, Issue 7, pp. 905–921). <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.685714>
- Nuciforo, S., & Heim, M. H. (2020). Jo ur l P re of. *JHEP Reports*, 100198. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100198>
- Nuciforo, S., & Heim, M. H. (2021). Organoids to model liver disease. *JHEP Reports*, 3(1). <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100198>
- Olgasi, C., & Cucci, A. (2020). *iPSC-Derived Liver Organoids : A Journey from Drug Screening , to Disease Modeling , Arriving to Regenerative Medicine*.

- Pavlů-Pereira, H., Asfaw, B., Poupětová, H., Ledvinová, J., Sikora, J., Vanier, M. T., Sandhoff, K., Zeman, J., Novotná, Z., Chudoba, D., & Elleder, M. (2005). Acid sphingomyelinase deficiency. Phenotype variability with prevalence of intermediate phenotype in a series of twenty-five Czech and Slovak patients. A multi-approach study. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(2), 203–227. <https://doi.org/10.1007/s10545-005-5671-5>
- Perrotta, C., Cervia, D., de Palma, C., Assi, E., Pellegrino, P., Bassi, M. T., & Clementi, E. (2015). The emerging role of Acid Sphingomyelinase in autophagy. *Apoptosis*, 20(5), 635–644. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1101-9>
- Rossi, G., Manfrin, A., & Lutolf, M. P. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics*, 19(11), 671–687. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0051-9>
- Schuchman, E. H. (2007). The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(5), 654–663. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0632-9>
- Schuchman, E. H., & Desnick, R. J. (2018). *Types A and B Niemann-Pick Disease*. 120, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.12.008>
- Tafaleng, E. N., Chakraborty, S., Han, B., Hale, P., Wu, W., Soto-Gutierrez, A., Feghali-Bostwick, C. A., Wilson, A. A., Kotton, D. N., Nagaya, M., Strom, S. C., Roy-Chowdhury, J., Stolz, D. B., Perlmutter, D. H., & Fox, I. J. (2015). *Induced Pluripotent Stem Cells Model Personalized Variations in Liver Disease Resulting From α 1-Antitrypsin Deficiency*. <https://doi.org/10.1002/hep.27753/supinfo>
- Taksir, T. v., Johnson, J., Maloney, C. L., Yandl, E., Griffiths, D., Thurberg, B. L., & Ryan, S. (2012). Optimization of a Histopathological Biomarker for Sphingomyelin Accumulation in Acid Sphingomyelinase Deficiency. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 60(8), 620–629. <https://doi.org/10.1369/0022155412451129>
- Thurberg, B. L., Diaz, G. A., Lachmann, R. H., Schiano, T., Wasserstein, M. P., Ji, A. J., Zaher, A., & Peterschmitt, M. J. (2020). Long-term efficacy of olipudase alfa in adults with acid sphingomyelinase deficiency (ASMD): Further clearance of hepatic sphingomyelin is associated with additional improvements in pro- and anti-atherogenic lipid profiles after 42 months of treatment. *Molecular Genetics and Metabolism*, 131(1–2), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.06.010>
- Vanier, M. T. (2013). Niemann – Pick diseases. In *Pediatric Neurology, Part III* (1st ed., Vol. 113). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00041-1>

- Wasserstein, M. P., Desnick, R. J., Schuchman, E. H., Hossain, S., Wallenstein, S., Lamm, C., & Niemann-pick, A. O. T. B. (2004). *The Natural History of Type B Niemann-Pick Disease : Results From a 10-Year Longitudinal Study*. 114(6). <https://doi.org/10.1542/peds.2004-0887>
- Wasserstein, M. P., & Schuchman, E. H. (2022). *Acid Sphingomyelinase Deficiency Summary Genetic counseling GeneReview Scope*. 1–22.
- Zampieri, S., Filocamo, M., Pianta, A., Lualdi, S., Gort, L., Coll, M. J., Sinnott, R., Geberhiwot, T., Bembi, B., & Dardis, A. (2016). SMPD1 mutation update: Database and comprehensive analysis of published and novel variants. *Human Mutation*, 37(2), 139–147. <https://doi.org/10.1002/humu.22923>
- Zeidan, Y. H., & Hannun, Y. A. (2010). The Acid Sphingomyelinase/Ceramide Pathway: Biomedical Significance and Mechanisms of Regulation. *Current Molecular Medicine*, 10(5), 454–466. <https://doi.org/10.2174/156652410791608225>
- Zhang, H., Wang, Y., Gong, Z., Li, X., Qiu, W., Han, L., Ye, J., & Gu, X. (2013). Identification of a distinct mutation spectrum in the SMPD1 gene of Chinese patients with acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-15>
- Zhu, X., Zhang, B., He, Y., & Bao, J. (2021a). Liver Organoids : Formation Strategies and Biomedical Applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 18(4), 573–585. <https://doi.org/10.1007/s13770-021-00357-w>
- Zhu, X., Zhang, B., He, Y., & Bao, J. (2021b). Liver Organoids: Formation Strategies and Biomedical Applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 18(4), 573–585. <https://doi.org/10.1007/s13770-021-00357-w>

Anexos

Sostenibilidad

La investigación realizada busca la equidad y justicia social en cuanto a la aportación de conocimiento y la declaración de posibles nuevas terapias para una enfermedad poco frecuente, como es la enfermedad de Niemann Pick. La caracterización y el entendimiento de las bases moleculares de este tipo de patologías son esenciales para permitir su diagnóstico y el desarrollo de tratamientos adecuados que mejoren la calidad de vida de los individuos que las padecen. Desafortunadamente, suele ser difícil diagnosticar estas enfermedades y los pacientes a menudo se enfrentan a patologías sin tratamientos disponibles. Esto se debe a la escasa prevalencia que presentan las enfermedades poco frecuentes frente a aquellas que son más comunes, para las que se destinan la mayor parte de las investigaciones. Por ello, este trabajo persigue ampliar la información de la que se dispone respecto a la NP a través de la investigación básica.

Además, el uso de organoides como modelo de enfermedad permite reducir el uso de animales de experimentación y ayudaría a desarrollar tratamientos más sostenibles económicamente que los disponibles actualmente.