

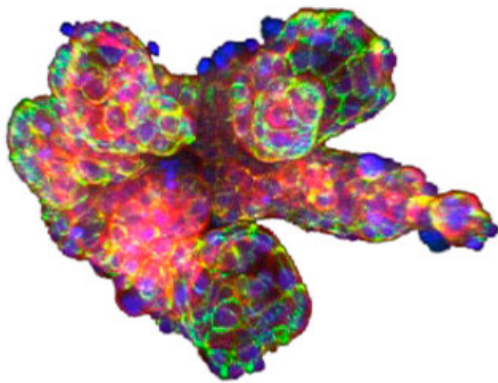
Análise 3D de organoides tumorais derivados de pacientes

Foram analisadas quantitativamente imagens confocais de organoides tumorais derivados de pacientes (PDO — Patient-Derived tumor Organoids) usando o software NoviSight™ 3D para avaliar suas características morfológicas e ligação de anticorpos de medicamentos com alvo molecular.

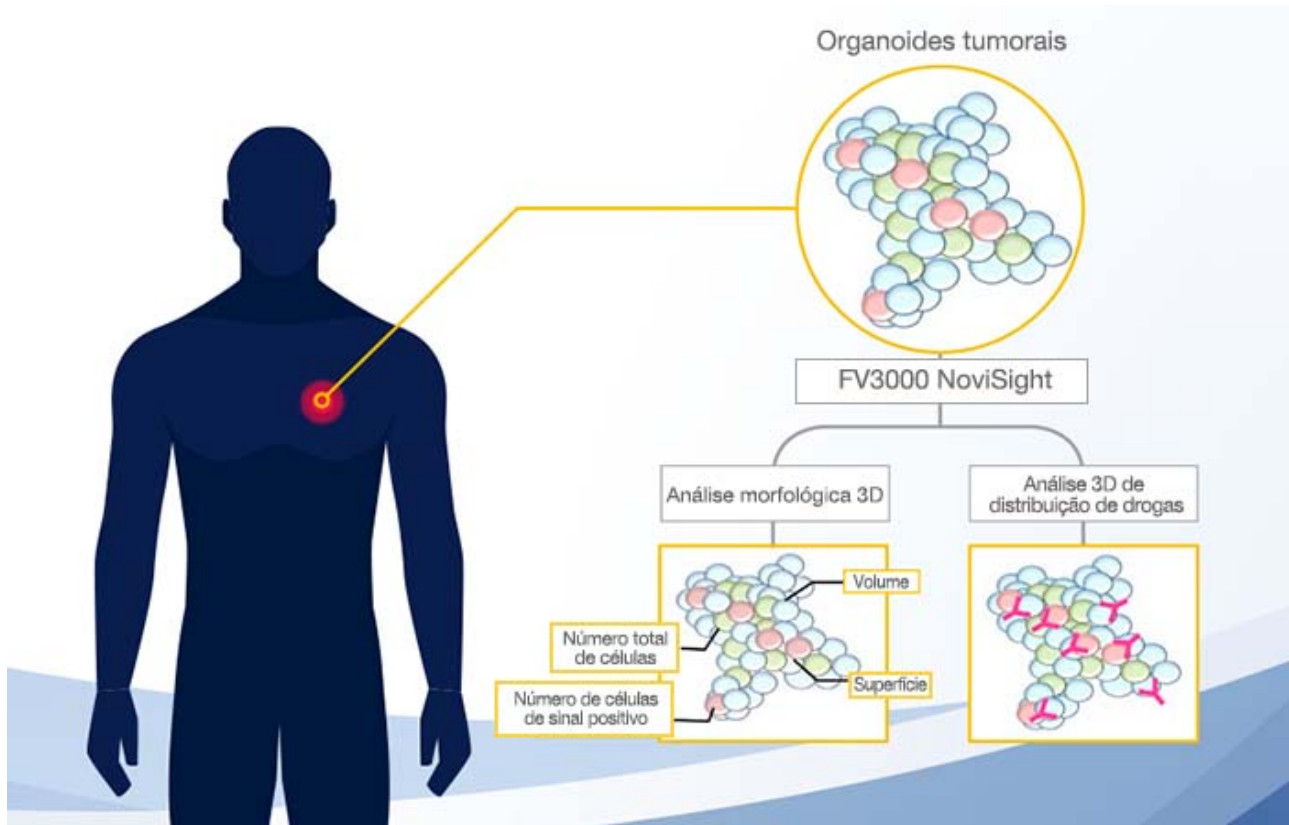
Introdução

Os modelos de tecido 3D são populares para a descoberta de medicamentos, uma vez que simulam o microambiente in vivo. PDOs são uma das ferramentas mais poderosas para recapitular a resposta original do paciente ao medicamento. Na verdade, um estudo recente revela que os perfis fenotípicos e genotípicos dos PDOs apresentam um alto grau de semelhança com o tumor original do paciente. Principalmente, os PDO poderiam prever a reatividade a medicamentos com mais de 80% de exatidão.

Ao usar organoides tumorais derivados de pacientes de Fukushima (F-PDO®), o microscópio confocal de varredura a laser FLUOVIEW® FV3000 da Olympus e o software de análise NoviSight 3D, oferecemos um novo processo de trabalho para a morfologia do PDO e a distribuição de medicamentos.



Resumo gráfico



Benefícios

- Gere imagens e analise PDO enquanto retém as informações em sua estrutura 3D.
- O software NoviSight pode identificar objetos em 3D, classificar os objetos e fornecer dados estatísticos.

Métodos

Preparação de células

Os F-PDOs foram então centrifugados, coletados e fixados com paraformaldeído a 4% de um dia para o outro. Erbitux®, um inibidor do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR — Epidermal Growth Factor Receptor), e Herceptin®, um inibidor do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), foram marcados com HiLyte™ Fluor 555 (Chemical Dojin) e incubados com F-PDOs por três horas.

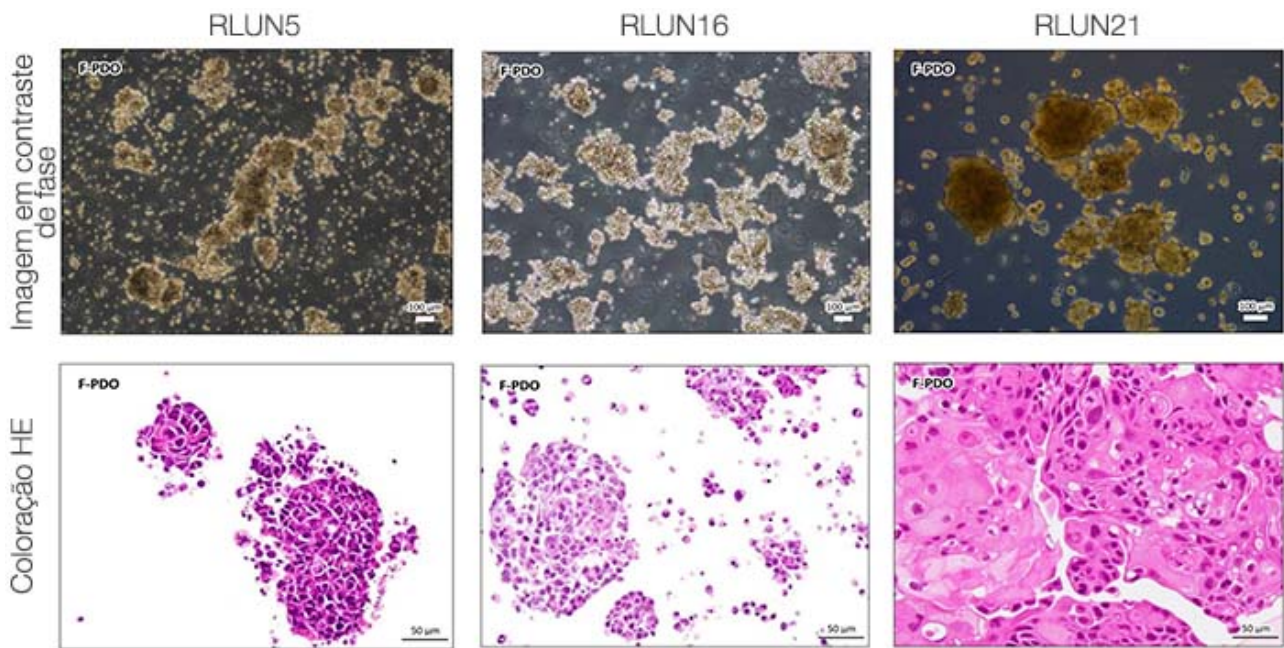


Figure 1 F-PDOs

Imunocoloração e limpeza

Realizamos o protocolo de imunocoloração Hama et al. com algumas modificações (Fig. 2). Cada F-PDO fixado foi incubado de um dia para o outro com um anticorpo Ki67 (Abcam, 16667) e diluído com a solução AbScale (0,33 M de ureia e 0,2% de Triton-X100). Após lavagem com AbScale, os F-PDOs foram incubados com um segundo anticorpo por três horas e diluídos com AbScale. Após lavagem com a solução de enxágue AbScale por uma hora, os F-PDOs foram fixados novamente com paraformaldeído a 4%. Em seguida, foram lavados com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS — Phosphate-Buffered Saline) e incubados de um dia para o outro usando o reagente de limpeza ScaleS4 com DAPI. Então, foram feitas imagens dos F-PDOs limpos com o microscópio confocal de varredura a laser FV3000 da Olympus.

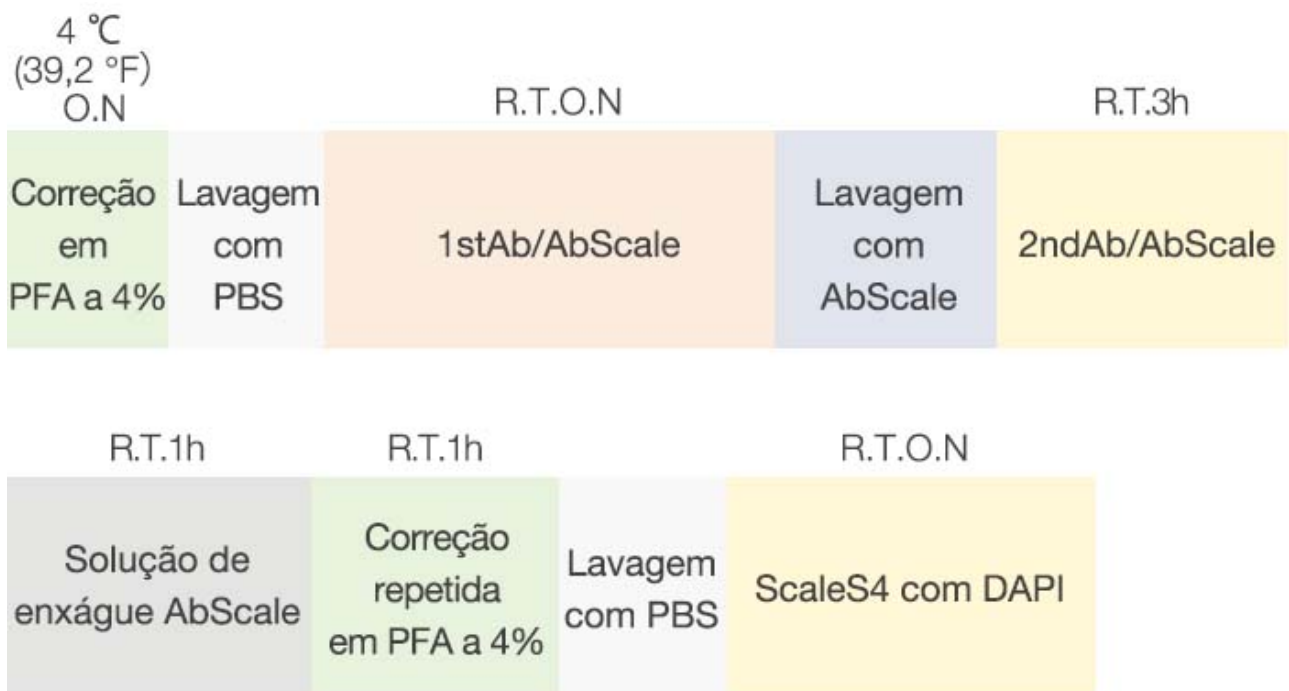


Figura 2 Esquema de imunocoloração e limpeza dos F-PDOs

Formação de imagem e análise

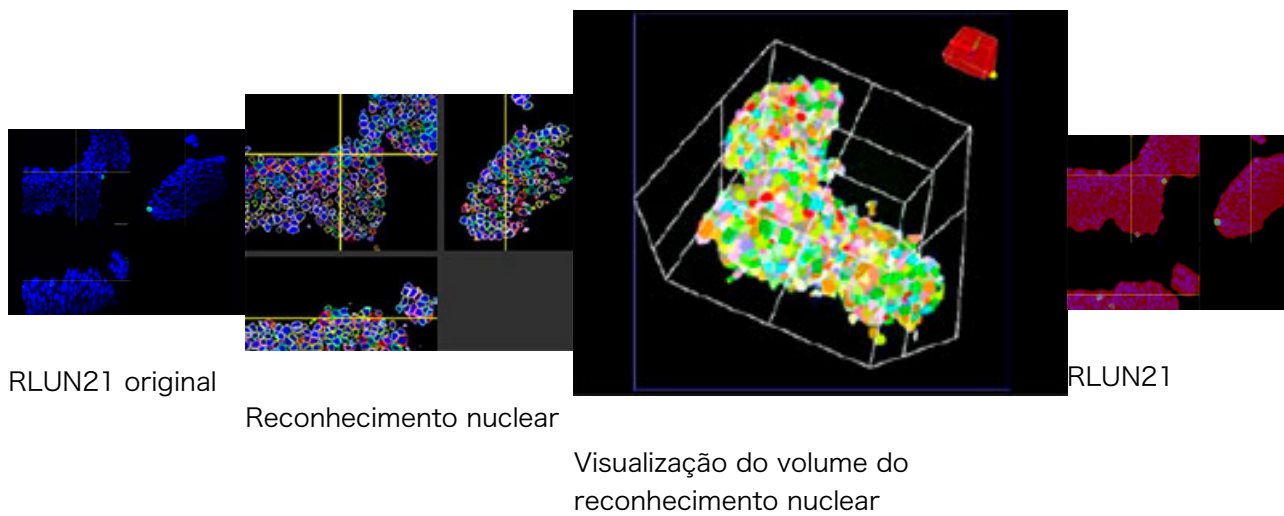
Usamos um aumento de 10x ou 30x com 2 μ m de Z-pitch para capturar imagens dos F-PDOs limpos para análise 3D.

Uma configuração de Z-pitch apropriada é importante para uma análise exata de células 3D. As imagens foram então importadas para o software NovoSight™ e reconstruídas em 3D. O software NovoSight pode reconhecer objetos 3D, como um núcleo, e convertê-los em dados quantitativos.

Resultados

Quantificação 3D da morfologia dos F-PDOs

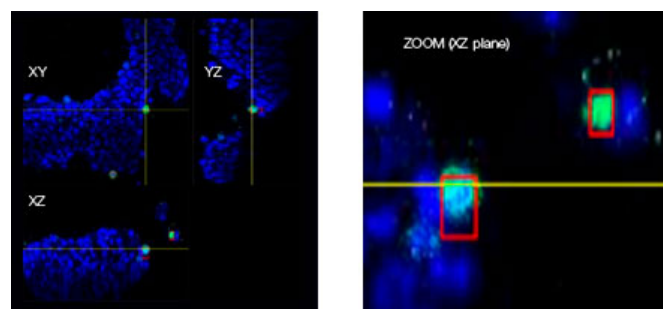
A



B



C



D

	RLUN5	RLUN16	RLUN21
número de células	926 (± 719)	294 (± 162)	2595 (± 1480)
volume (voxels)	3.35.E+06 ($\pm 3.26.E+06$)	1.08.E+06 ($\pm 6.85.E+05$)	1.13.E+07 ($\pm 9.12.E+06$)

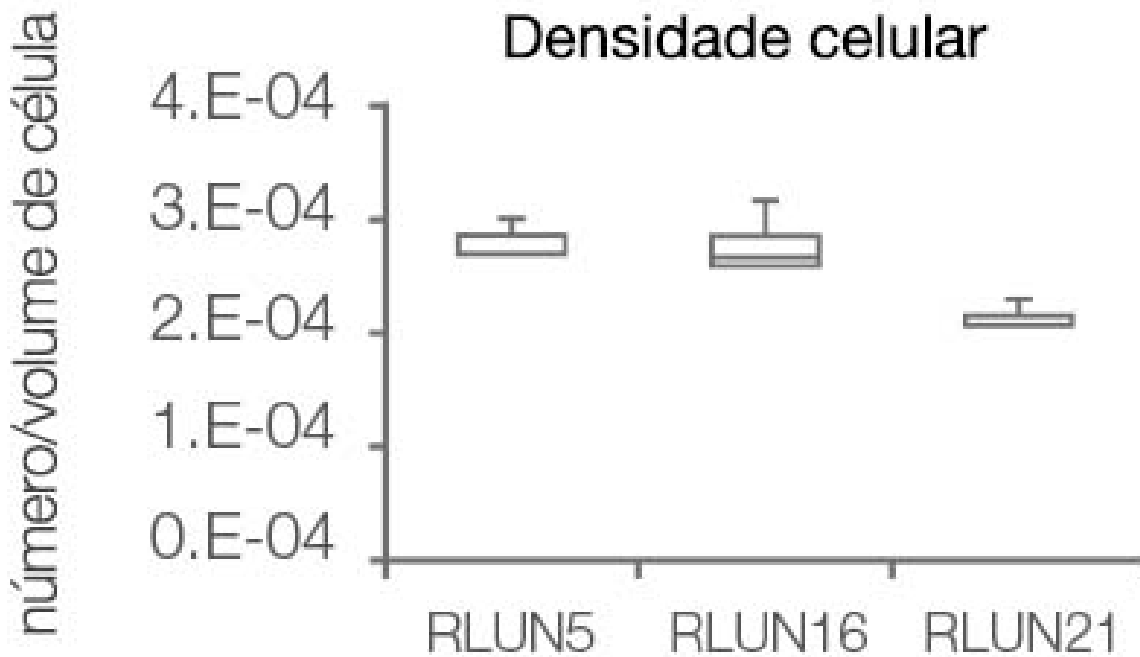


Figura 3 Quantificação 3D da morfologia dos F-PDOs

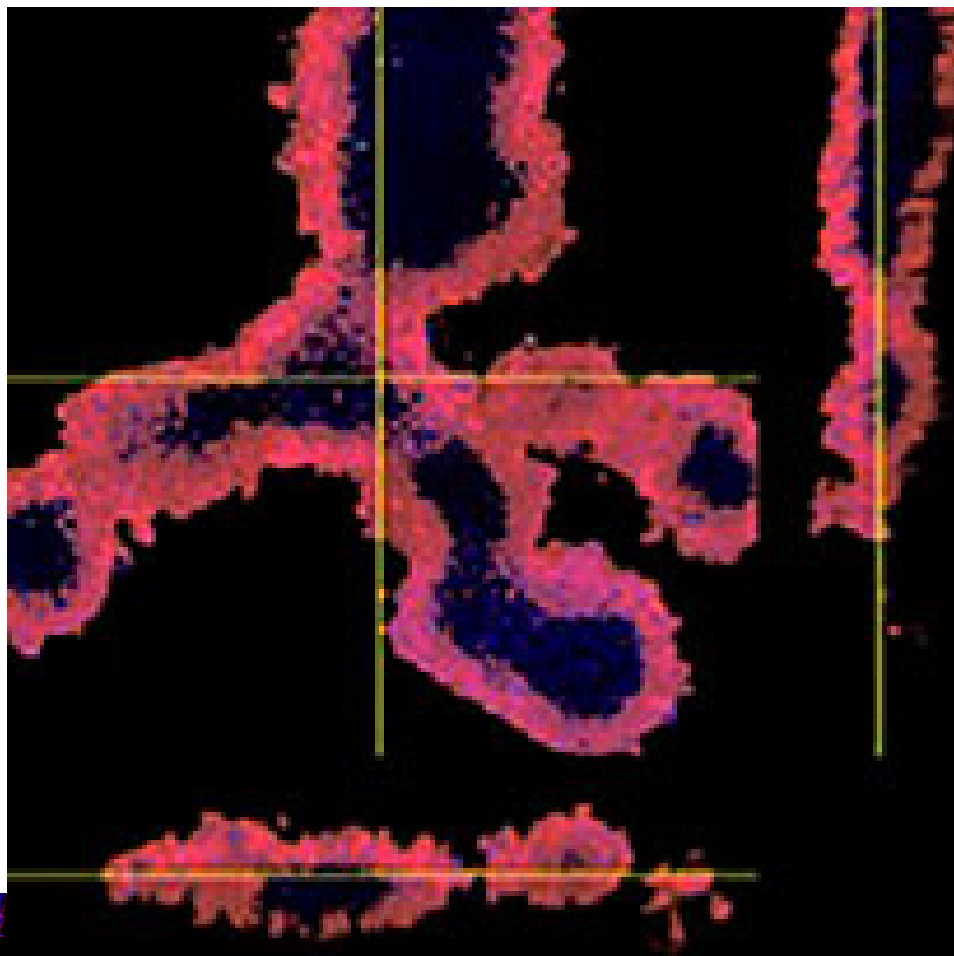
- A. Três visualizações laterais originais de RLUN21, reconhecimento nuclear NoviSight 3D (visualização de três lados e do volume) e reconhecimento da estrutura do NoviSight.
- B. As células Ki67 positivas/negativas foram classificadas pela intensidade de Ki67. O software NoviSight pode exibir células classificadas em uma “visualização de galeria”.
- C. As células Ki67 positivas classificadas podem ser exibidas em 3D com um círculo vermelho.
- D. Dados quantitativos dos F-PDOs.

Análise 3D de distribuição de medicamentos

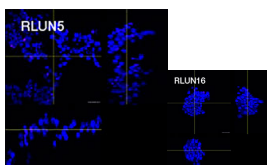
Quando adicionamos o Erbitux ou Herceptin marcado com HyLight-555 a cada F-PDO, o Erbitux ligou-se uniformemente a RLUN21 a partir de sua superfície, enquanto o Herceptin ligou-se irregularmente a RLUN21. O módulo de reconhecimento de volume do software NoviSight™ quantificou a proporção de volume positivo do medicamento anticorpo (Fig. 4A). Em seguida, usamos o software NoviSight para quantificar a diferença nos estilos de ligação, já que ele pode modificar a região direcionada para análise. Para isso, criamos duas regiões alvo: uma região de volume reduzido a partir da superfície em uma certa porcentagem e uma região de volume de contorno com qualquer largura. Calculamos a intensidade dos medicamentos anticorpos durante os volumes. Notamos uma grande diferença quantitativa entre o volume reduzido e o volume de contorno no Erbitux, enquanto havia pouca no Herceptin. Isso significa que o Erbitux se ligou fortemente à região de contorno de RLUN21, enquanto o Herceptin se ligou a RLUN21 sem parcialidade. Este método permitiu mostrar quantitativamente a distribuição de medicamentos anticorpos.

A

Reconhecimento do volume de medicamentos anticorpos

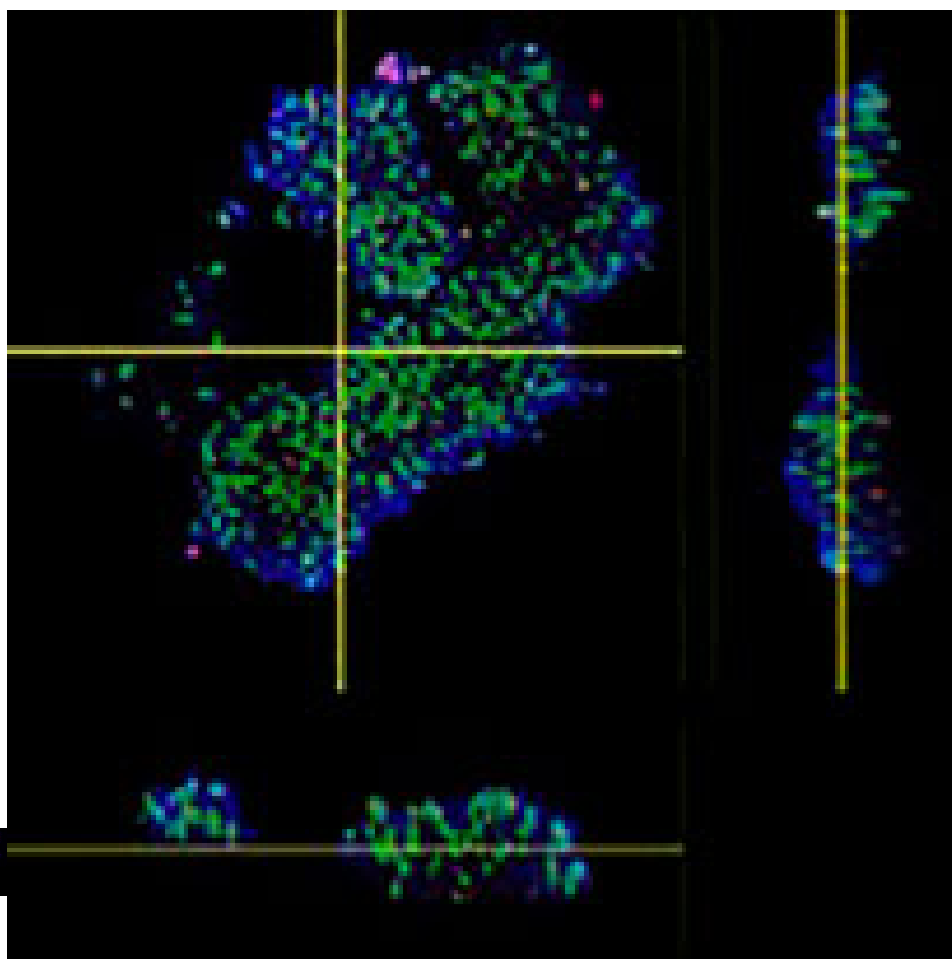
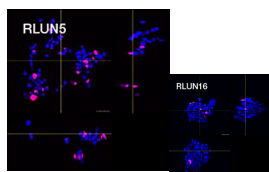


Erbix

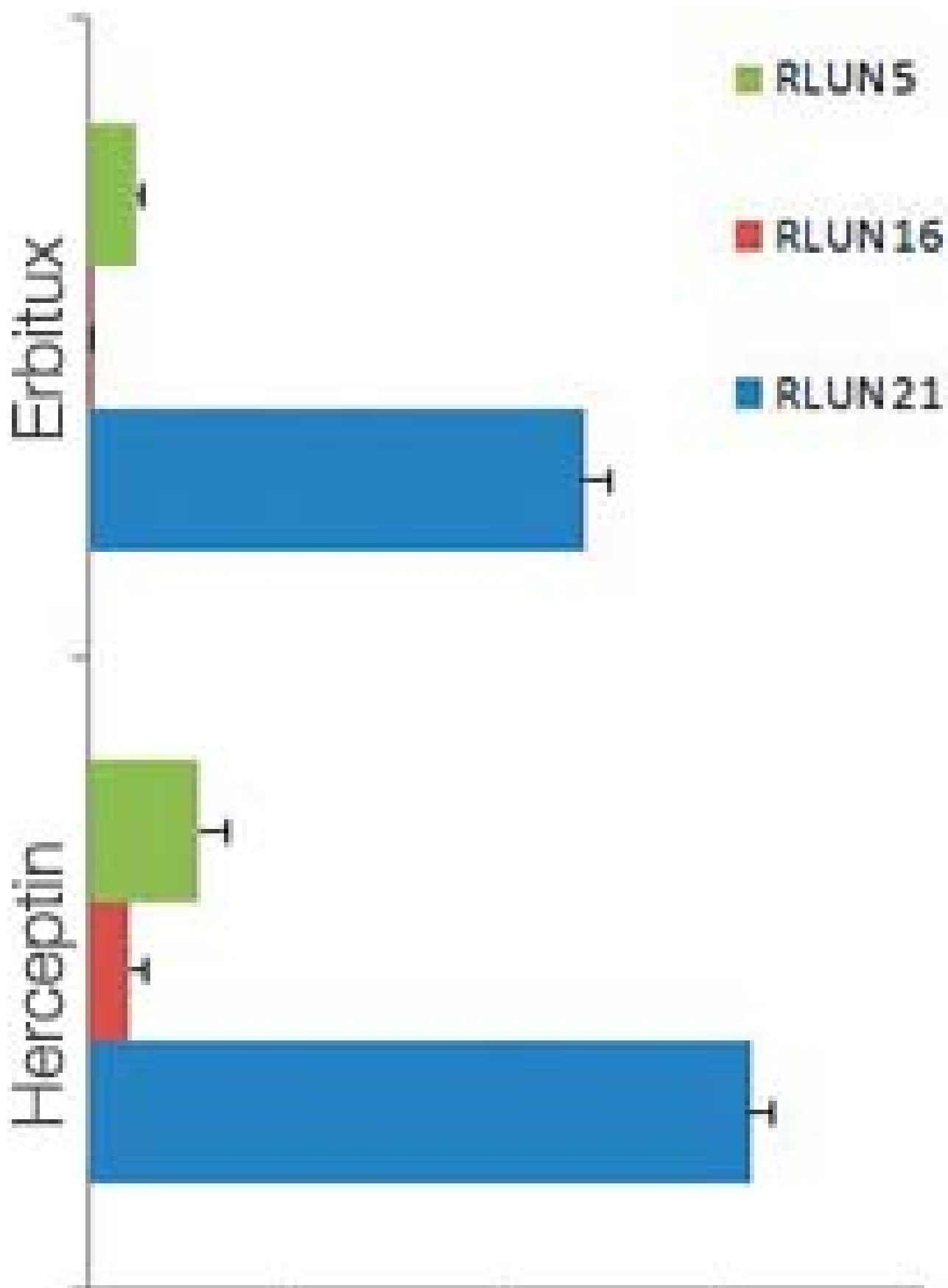


Reconhecimento do volume de medicamentos anticorpos

Herceptin



Volume positivo de anticorpos (%)





B

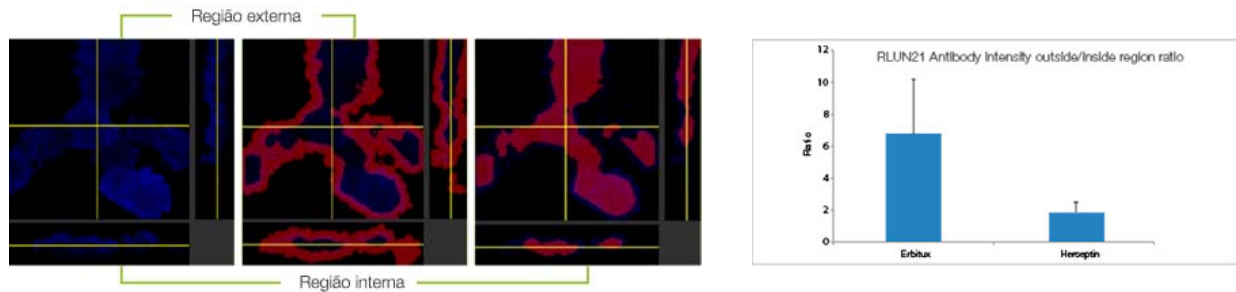


Figura 4 Quantificação 3D da distribuição de medicamentos anticorpos

A. Três imagens laterais dos F-PDOs com Erbitux ou Herceptin e reconhecimento do volume das ligações de medicamentos anticorpos do NoviSight. O gráfico mostra o volume de ligação de anticorpos no volume total.

B. Módulo de modificação da região do NoviSight. O NoviSight pode modificar a região direcionada para análise para fornecer dados quantitativos na região limitada.

Conclusão

Neste estudo, revelamos que o software NoviSight pode realizar análises quantitativas de PDOs de forma morfológica e farmacológica usando imagens capturadas pelo microscópio confocal de varredura a laser FV3000 da Olympus. Ao combinar as imagens de alta resolução do microscópio FV3000 com a alta exatidão de reconhecimento do software NoviSight, podemos produzir resultados quantitativos mais confiáveis.

Reference

1. Vlachogiannis G et al., (2018) Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*. 359(6378):920-926. doi: 10.1126/science.aao2774
2. Takahashi et al., (2019) An In Vitro System for Evaluating Molecular Targeted Drugs Using Lung Patient-Derived Tumor Organoids. *Cells*. 8(5), 481. doi:/10.3390
3. Tamura H, et al. Evaluation of anticancer agents using patient-derived tumor organoids characteristically similar to source tissues. *Oncol Rep.*,40, 635-646, 2018
4. Hama et al., (2016) Deep Imaging of Cleared Brain by Confocal Laser-Scanning Microscopy. *Nature Protocol Exchange*. doi:/10.1038 Mayu

Autores

Mayu Ogawa (Olympus)

Reconhecimento

Este estudo foi apoiado pelo Professor Takagi da Fukushima Medical University. Para saber mais sobre os F-PDOs (organoides derivados de pacientes de Fukushima), visite <https://www.fmu.ac.jp/home/trc/en/contract-research-provision/f-pdo/>

Produtos Relacionados



Software de análise celular 3D

NoviSight

O software de análise celular NoviSight 3D fornece dados estatísticos sobre esferoides e objetos 3D em experimentos com base em microplacas. Use-o para quantificar a atividade celular em 3D, capturar facilmente eventos celulares raros, obter contagens de células precisas e melhorar a sensibilidade da detecção. O software NoviSight funciona com uma variedade de técnicas de formação de imagem, incluindo a formação de imagem confocal de rastreamento de pontos, formação de imagem de dois fótons, formação de imagem confocal de disco giratório e formação de imagem de células vivas de super-resolução.

- Reconhecimento de imagem 3D rápido de estruturas inteiras a características subcelulares
- Análise estatística precisa
- Equipado com uma variedade de ensaios padrão prontos para usar ou crie o seu próprio facilmente

Saiba mais ► <https://www.olympus-lifescience.com/software/novisight>