



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Mini-intestinos desarrollados en el laboratorio: un modelo *in vitro* de vanguardia para reducir el uso de animales de experimentación

MSc. Hellen Daghero Villanueva

Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
PEDECIBA Biología, Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Montevideo - Uruguay
Mayo de 2024



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Mini-intestinos desarrollados en el laboratorio: un modelo *in vitro* de vanguardia para reducir el uso de animales de experimentación

MSc. Hellen Daghero Villanueva

Tesis de Doctorado presentada al Programa de Posgrado de PEDECIBA Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas, opción Biología Celular y Molecular.

Orientadoras

Dra. Mariela Bollati-Fogolín
Dra. Romina Pagotto

Comisión de Admisión y Seguimiento

Dr. Gustavo Folle
Dra. Ana Hernandez
Dra. Paola Scavone

Montevideo - Uruguay
Mayo de 2024

Integrantes del Tribunal de Defensa de Tesis

Dra. Cecilia Casaravilla

Instituto de Química Biológica, Cátedra de Inmunología
Facultad de Ciencias - UdelaR

Dra. Paola Scavone

Laboratorio de Biofilms Microbianos, Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable - MEC

Dr. Uriel Koziol

Depto. De Biología Celular y Molecular - Sección Biología Celular
Facultad de Ciencias - UdelaR

*Yo te llevo dentro, hasta la raíz
Y, por más que crezca, vas a estar aquí*

Hasta la raíz - Natalia Lafourcade

A mis abuelos.

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a mis orientadoras, Mariela Bollati-Fogolín y Romina Pagotto, por su confianza, compromiso y apoyo a lo largo de la realización de mi tesis. Gracias por dejarme formar parte de este proyecto tan ambicioso, darme muchas oportunidades de formación y por impulsarme a ser mejor investigadora día a día.

También quisiera agradecer al programa PEDECIBA Biología y en especial a la Comisión de Admisión y Seguimiento y a los miembros del tribunal.

Fui afortunada de contar con diferentes becas para esta tesis. Agradezco a la ANII por la beca de doctorado nacional, a la Pasteur Network por la beca Calmette - Yersin y al Instituto Pasteur de Montevideo, en especial a Yolanda y Juan, quienes hacen posible la beca Paulina Luisi.

Un agradecimiento especial a mis compañeros de laboratorio: Romina, Paula, Karen, Saira, Cecilia e Ignacio. Por todo lo compartido dentro y fuera del lab; es un lujo tener colegas tan *cracks* y buena onda que además de enseñarme y apoyarme, siempre me hacen reír. Gracias a toda la UBC por la discusión de resultados y diseños experimentales. Saira y Romi: gracias por las veces que me cuidaron mis organoides algún feriado o fin de semana.

Gracias a Giulia Nigro y a Gérard Eberl del MIU Lab por recibirme en Pasteur París y permitirme aprender de todo el grupo. Gracias Giulia por ser tan amable y abierta a colaborar.

A todas las personas del Instituto que han colaborado directamente con nosotras en este proyecto: Marcelo Comini, Andrea Medeiros y Cristina Quiroga del LBRT, a Nadia Riera y Florencia Peñalba del LGM.

Asimismo, me gustaría agradecer a varias personas del IPM que me han asistido en diferentes áreas de mi tesis: Paola Lepanto me enseñó a usar el microinyector de Zebrafish para que yo pueda usarlo con los organoides; Marcela Díaz y Maximiliano Anzibar, por el apoyo en microscopía confocal; a Mariana Bonilla y Jorge Porfido por la ayuda en biología molecular; a Maca Sarroca por estar en todas. Gracias a todo el Instituto, al personal científico, administrativo, de comunicación, mantenimiento, y a la cantina Cienfuegos.

Por último, agradezco a quienes me apoyan fuera del instituto y me impulsan a ser mejor persona. Mamá, Papá, Ian, Tito y toda la familia tararirense y porteña. A mis entrañables amigas de la vida por las risas, los brindis y los abrazos. Y por último a Dante, por permitir que mamá escriba y defienda su tesis.

Resumen

El epitelio intestinal desempeña funciones cruciales, como la absorción de nutrientes, la interacción con la microbiota y la respuesta inmune. Alteraciones en la homeostasis de este tejido pueden llevar al desarrollo de varios desórdenes como procesos inflamatorios, infecciosos o cáncer. Contar con modelos apropiados que permitan estudiar los mecanismos involucrados en las enfermedades intestinales es importante para el avance en el desarrollo de nuevas terapias.

Tradicionalmente, los modelos de cultivo celular emplean células adherentes creciendo en monocapas. Estos constituyen sistemas de estudio simples y económicos. Sin embargo, al ser sistemas en dos dimensiones compuestos por un único tipo celular, no reflejan la complejidad de las interacciones celulares que ocurren en un tejido *in vivo*, limitando su poder predictivo. En este contexto, los cultivos en tres dimensiones (3D) se presentan como una interesante alternativa *in vitro* para el estudio de mecanismos fisiopatológicos y para el screening de compuestos bioactivos. Los organoides intestinales, también conocidos como “mini-intestinos”, constituyen un tipo de cultivos 3D, constituidos por estructuras multicelulares que se auto-ensamblan recreando la morfología y fisiología del epitelio intestinal y que, al contener células madre, tienen un poder replicativo ilimitado.

Bajo la premisa de que la integración del cultivo de organoides intestinales podría constituir una innovadora tecnología de cultivos 3D a nivel nacional, y considerando su complejidad superior en comparación con los cultivos convencionales, el objetivo de este trabajo fue implementar del cultivo de organoides intestinales murinos utilizando células madre adultas. Este enfoque se orientó hacia la exploración de su aplicabilidad en el análisis de las interacciones hospedero-microbiota y hospedero-patógeno, así como en la creación de nuevos sistemas reporteros del epitelio intestinal mediante el empleo de técnicas de edición génica.

Se generaron bancos de organoides de las distintas partes del intestino murino utilizando ratones de cepas salvajes y reporteros para la activación de NF- κ B (Balb/C-NF- κ B-RE-luc). Se evaluó la forma, tamaño y capacidad proliferativa de los organoides mediante la técnica de capacidad formadora de colonias evaluada por microscopía óptica y se determinaron los tipos celulares presentes en estos organoides mediante qPCR. Los organoides reporteros se emplearon para evaluar el potencial inmunomodulador de distintas bacterias y productos derivados de la microbiota intestinal en estos organoides utilizando medios condicionados de cepas probióticas y de microbiota humana. Se lograron establecer las condiciones para infectar

organoides murinos con *Trypanosoma cruzi*, modelando la fase crónica de la enfermedad y la infección oral. Por último, se evaluó la interacción de los organoides intestinales con células del estroma en modelo de co-cultivo en transwell con fibroblastos, destacando que la presencia de las células estromales favorece la diferenciación de la monocapa de organoides.

En suma, en este trabajo se implementaron los organoides intestinales murinos como tecnología de cultivo 3D, demostrando su utilidad en diversos estudios que van desde la interacción microbiota hasta la respuesta a patógenos, contribuyendo al avance de nuevos modelos *in vitro* relevantes para la etapa pre clínica.

Lista de siglas y abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARRIVE	del inglés, Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATCC	del inglés, American Type Culture Collection
BAFF	del inglés, B-cell activating factor receptor
BHI	del inglés, Brain Heart Infusion
BMP	del inglés, Bone Morphogenetic Protein
BSA	del inglés, Bovine Serum Albumin
CEUA	Comité de Ética en el Uso de Animales
CRISPR	del inglés, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DEX	Dexametasona
DMEM	del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTU	del inglés, Discrete Typing Units
EC50	Concentración Efectiva 50
EDTA	del inglés, EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EGF	del inglés, Epidermal Growth Factor
ESC	del inglés, Embryonic Stem Cell
FGF	del inglés, Fibroblast Growth Factor
GFP	del inglés, Green Fluorescent Protein
GSK3	Glucógeno Sintasa Kinasa 3
HDR	del inglés, Homology-Directed Repair
IC95	Intervalo de confianza del 95%
IL-1 β	Interleuquina 1 beta
IL-1R	Receptor de Interleuquina 1
IL-25	Interleuquina 25
IP	Ioduro de Propidio
iPSC	del inglés, induced Pluripotent Stem Cell
ISCs	del inglés, Intestinal Stem Cell
LB	Luria Bertani
LGR5	del inglés, Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5
LPS	Lipopolisacárido
MAP	del inglés, Mitogen-Activated Protein
MC	Medio Condicionado
MOI	del inglés Multiplicity of Infection
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
NF- κ B	del inglés, Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHEJ	del inglés, Non-Homologous End Joining

PAM	del inglés, Protospacer Adjacent Motif
PBS	del inglés, Phosphate Buffered Saline
PCR	del inglés, Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehído
PGE2	Prostaglandina E2
PGD2	Prostaglandina D2
pH	Potencial de hidrógeno
qPCR	del inglés, quantitative Polymerase Chain Reaction
RANK	del inglés, Receptor Activator of NF- κ B
RF	del inglés, Restriction Free
RHD	del inglés, Rel Homology Domain
RNP	Ribonucleoproteína
roGFP2	del inglés, reduction-oxidation sensitive green fluorescent protein 2
SD	del inglés, Standard Deviation
SDS	dodecil sulfato sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
sgRNA	del inglés, single guide RNA
TA	del inglés, Transit Amplifying
TALEN	del inglés, Transcription Activator-Like Effector Nuclease
TEER	del inglés, Trans-Epithelial Electrical Resistance
TGF- β	del inglés, Transforming Growth Factor beta
TLR	del inglés, Toll-like Receptor
TNF- α	del inglés, Tumor Necrosis Factor alpha
TNF-1R	del inglés, Tumor Necrosis Factor alpha Receptor 1
TNF-2R	del inglés, Tumor Necrosis Factor alpha Receptor 2
TNFRs	del inglés, Tumor Necrosis Factor alpha Receptors
WGA	del inglés, Wheat Germ Agglutinin
YCFA	del inglés, Yeast Casitone Fatty Acids
ZFN	del inglés Zinc-Finger Nucleases

Índice

Agradecimientos.....	V
Resumen.....	VI
Lista de siglas y abreviaturas.....	VIII
1. Introducción general.....	1
1.1. Epitelio intestinal.....	1
1.2. Células madre intestinales.....	3
1.3. Células intestinales diferenciadas.....	4
1.3.1. Secretoras.....	4
1.3.1.1. Células de Paneth.....	4
1.3.1.2. Células caliciformes.....	4
1.3.1.3. Enteroendocrinas.....	5
1.3.1.4. Células de penacho.....	5
1.3.2. Absortivas.....	5
1.3.2.1. Enterocitos.....	5
1.3.2.2. Células M.....	5
1.4. Modelos <i>in vitro</i> del epitelio intestinal.....	6
1.4.1. Líneas celulares humanas.....	6
1.4.2. Organoides intestinales.....	8
1.5. Aplicaciones de los organoides intestinales.....	11
1.6. Limitaciones del modelo.....	14
2. Hipótesis.....	16
3. Objetivos.....	17
3.1. Objetivo General.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. Capítulo 1.....	18
Generación del modelo de organoides intestinales reporteros.....	18
4.1. Introducción.....	18
4.1.1. El factor de transcripción NF- κ B y su rol a nivel intestinal.....	18
4.1.2. Sistemas reporteros.....	20
4.1.3. Edición genética.....	21
4.2. Métodos.....	24
4.2.1. Reactivos generales.....	24
4.2.2. Líneas celulares.....	24
4.2.2.1. Mantenimiento básico de las líneas celulares de mamífero.....	24
4.2.2.2. Criopreservación y descongelado de células.....	25
4.2.3. Preparación de medio condicionado L-WRN.....	25

4.2.4. Obtención de organoides de distintas secciones de intestino.....	26
4.2.4.1. Declaración ética y manejo de animales.....	26
4.2.4.2. Cultivo de organoides.....	26
4.2.4.3. Mantenimiento.....	27
4.2.4.4. Criopreservación y descongelado.....	28
4.2.5. Ensayo de formación de colonias y evaluación de parámetros morfológicos.....	28
4.2.6. Extracción de ARN y análisis de expresión por PCR cuantitativa.....	29
4.2.7. Ensayo reportero para la activación de NF- κ B en organoides intestinales.....	30
4.2.8. Inmunodetección de la subunidad p65 por microscopía confocal.....	31
4.2.9. Inmunodetección de ki67 y Lisozima por microscopía confocal.....	32
4.2.10. Generación de organoides intestinales reporteros mediante edición genética por CRISPR/Cas9.....	32
4.2.10.1. Metodología I: Incorporación de Cas9, guías y ADN molde mediante plásmidos.....	32
4.2.10.1.1. Plásmidos.....	32
4.2.10.1.2. RF-cloning.....	34
4.2.10.1.3. Prueba de transfección en células murinas NIH-3T3.....	36
4.2.10.2. Metodología II: Incorporación de RNPs y ADN molde.....	36
4.2.10.2.1. Selección de guías para el locus Rosa26.....	37
4.2.10.2.2. Diseño de plásmidos para ADN molde.....	37
4.2.10.2.3. Optimización del protocolo de nucleofección en organoides.....	37
4.2.10.2.4. Nucleofección en organoides con RNPs y ADN molde.....	38
4.3. Resultados.....	39
4.3.1. Obtención y caracterización del tamaño, morfología y capacidad replicativa de los organoides intestinales murinos NF- κ B-RE-luc.....	39
4.3.2. Caracterización de las poblaciones celulares intestinales.....	42
4.3.3. Caracterización de la actividad reportera.....	44
4.3.4. Generación de organoides reporteros mediante CRISPR/Cas.....	50
4.4. Discusión.....	57
4.4.1. Generación y caracterización de organoides intestinales murinos derivados de la cepa reportera NF- κ B-RE-luc.....	57
4.4.2. Generación de organoides intestinales reporteros.....	60
5. Capítulo 2.....	62
Aplicaciones de los organoides intestinales para estudios de la interacción hospedero-microorganismo.....	62
5.1. Introducción.....	62
5.1.1. Empleo de los organoides intestinales en el contexto de la inflamación intestinal y la relación intestino-microbiota.....	62
5.1.2. Búsqueda de nuevos modelos para el abordaje de las interacciones hospedero-patógeno.....	63
5.1.3. Modelando la enfermedad de Chagas con organoides intestinales.....	65
5.2. Métodos.....	67

5.2.1. Reactivos.....	67
5.2.2. Líneas celulares.....	67
5.2.3. Obtención de medios condicionados.....	67
5.2.4. Ensayo reportero para evaluar modulación de la activación de NF- κ B en organoides intestinales.....	68
5.2.5. Parásitos.....	68
5.2.6. Infección de organoides con <i>T. cruzi</i> en formato 3D.....	69
5.2.7. Infección de organoides con <i>T. cruzi</i> en formato 2D (monocapa).....	70
5.2.8. Inmunomarcación de los organoides infectados con <i>T. cruzi</i>	70
5.2.9. Optimización del cultivo de organoides en formato Transwell.....	71
5.2.10. Co-Cultivo de organoides intestinales con fibroblastos murinos.....	73
5.2.11. Medición de la resistencia transepitelial (TEER).....	73
5.2.12. Inmunomarcación de los co-cultivos.....	73
5.3. Resultados.....	75
5.3.1. Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de compuestos solubles derivados de microbiota intestinal humana con organoides reporteros para NF- κ B.....	75
5.3.2. Optimización de la infección de organoides con <i>T. cruzi</i> en formato 3D.....	78
5.3.3. Infección de organoides intestinales murinos con <i>T. cruzi</i> en formato 3D.....	81
5.3.4. Evaluación de la preferencia de <i>T. cruzi</i> por células proliferativas en colonoides infectados.....	85
5.3.5. Infección de organoides intestinales murinos con <i>T. cruzi</i> en formato monocapa (2D).....	87
5.3.6. Optimización de un modelo de co-cultivo organoide-fibroblasto en formato Transwell.....	90
5.4. Discusión.....	96
5.4.1. Capacidad inmunomoduladora de compuestos solubles derivados de la microbiota empleando el modelo de organoides intestinales reporteros para NF- κ B.....	96
5.4.2. Infección de organoides intestinales con <i>T. cruzi</i>	98
6. Conclusiones.....	103
7. Perspectivas.....	104
8. Referencias.....	106
9. Anexos.....	116
9.1. Anexo I: Mapas de plásmidos utilizados como ADN molde.....	116
9.2. Anexo II: Publicación y difusión de resultados.....	119
9.3. Anexo III: Financiación.....	121

1. Introducción general

1.1. Epitelio intestinal

En mamíferos, el intestino desempeña un papel fundamental en la función digestiva e inmunológica. Es responsable de la digestión de alimentos gracias a las enzimas pancreáticas y hepáticas vertidas en él, la absorción de nutrientes que llegan desde el estómago, y de mantener una barrera efectiva contra potenciales microorganismos patógenos. Pese a ser un epitelio simple, este tejido es capaz de cumplir su funciones a la vez que soporta abrasión mecánica constante, variaciones de pH amplias e interacciona con más de 10^{13} microorganismos colonizantes [1]. Dos características permiten que el intestino sea capaz de dichas funciones: la arquitectura del tejido y el continuo recambio celular.

El epitelio se organiza en unidades de criptas y vellosidades. Cada vellosidad es una protrusión de la pared intestinal y está rodeada de múltiples invaginaciones llamadas criptas de Lieberkühn en honor a su descubridor, Jonathan Nathanael Lieberkuhn (**Figura 1a**). Cada vellosidad está cubierta por un epitelio simple post mitótico, debajo del cual los capilares y los vasos linfáticos median el transporte de los nutrientes absorbidos hacia el organismo. Las vellosidades permiten ampliar sustancialmente la superficie del epitelio, permitiendo una gran capacidad de absorción. En este sentido, la longitud de las vellosidades es mayor en el duodeno, y va decreciendo a lo largo del intestino delgado, mientras el colon ya no presenta vellosidades dado que no tiene un rol en la absorción sino en la excreción (**Figura 1b**). Por otro lado, la abrasión química y mecánica que soportan las vellosidades requiere de una constante renovación para evitar daños en el epitelio. La vida media de las células absortivas es corta, de 2-4 días para el intestino murino y 3-5 días para el intestino humano [2]. Esto es posible gracias a una población de células que se encuentran continuamente dividiéndose: las células madre intestinales.

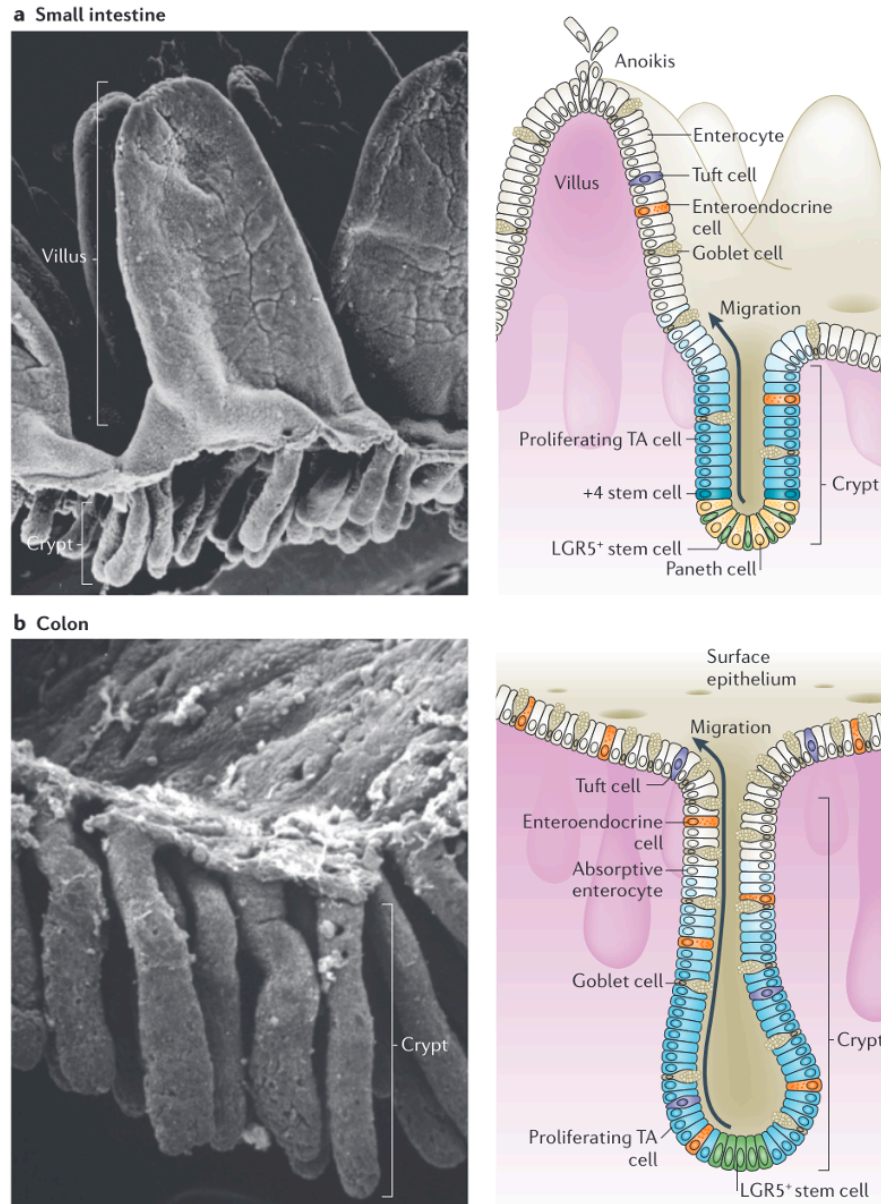


Figura 1. Organización estructural del intestino **a)** Micrografía electrónica de barrido del intestino delgado (panel izquierdo). Las células madre LGR5⁺ se ubican con las células de Paneth en la base de la cripta (panel derecho). Las células madre dan lugar a células proliferantes (TA, por sus siglas en inglés *Transit Amplifying*) que se dividen y se diferencian en las distintas células especializadas, reemplazando a las que se pierden mediante anoikis en el vértice de las vellosidades. **b)** Micrografía electrónica de barrido del colon (panel izquierdo). Se observa la ausencia de vellosidades, las células madre LGR5⁺ en la base de la cripta y las células amplificadoras que se dividen y se diferencian a los diferentes tipos celulares especializados (panel derecho). Extraído de Barker, 2014 [3].

1.2. Células madre intestinales

Si bien desde hace mucho tiempo se conocía que las únicas células intestinales en mitosis se ubicaban en la base de las criptas, mientras que el resto de las células del epitelio no se dividían, no fue hasta 1948, cuando Leblond y Stevens comprobaron estas observaciones y postularon su rol biológico. Sus trabajos permitieron demostrar que las células mitóticas se localizan exclusivamente en las criptas aún en animales adultos [4] y que el epitelio se puebla a partir de la división de estas células que luego son transportadas a lo largo de la vellosidad, donde una vez alcanzado el vértice, mueren y son expulsadas al lumen [5]. Estos resultados demostraron que esta continua renovación del tejido responde a un estado de homeostasis celular y no al crecimiento o regeneración del órgano.

La identificación definitiva de las células madre intestinales (ISCs, por sus siglas en inglés) se dio varios años después, gracias a estudios genéticos de rastreo de linaje celular que proporcionaron la prueba definitiva de la capacidad de las células de la base de las criptas de autorrenovarse y diferenciarse al resto de los tipos celulares presentes en el epitelio intestinal [6]. La identificación del receptor 5 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR5) como blanco directo de la vía de señalización de Wnt, que constituye el principal motor de la biología de la cripta, resultó clave para la identificación de las ISCs [7]. La generación de ratones Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 reveló que LGR5 es un marcador altamente específico para las células madre de la base de las criptas [6]. En el estudio de Barker y colaboradores, los experimentos de seguimiento de linaje mostraron que las células marcadas se extendían desde la base de la cripta hasta la parte superior de la vellosidad en el correr de 5 días, indicando que todas provenían de la división de las células LGR5 positivas. Estas zonas presentaban células de todos los tipos celulares epiteliales y muchas de las células de base de la cripta persistían a largo plazo. Por lo tanto, las células proliferativas positivas para LGR5 cumplían con los criterios de multipotencia: la generación de múltiples linajes y la auto renovación a largo plazo [1], [6].

La homeostasis del epitelio intestinal está sustentada por un balance entre la auto renovación de las células madre y su proliferación y diferenciación hacia otros tipos celulares (**Figura 2**). El microambiente o nicho adecuado para su correcta fisiología consiste de un componente epitelial (provisto por las células de Paneth) y un componente mesenquimal, dado por moléculas activadoras de las vías de Wnt y del factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus

siglas en inglés) y moléculas que inhiben la proteína morfogenética ósea (BMP, por sus siglas en inglés), como se describe a continuación.

1.3. Células intestinales diferenciadas

La determinación del tipo celular especializado comienza una vez que una célula abandona la zona de células madre en la parte inferior de la cripta, al disminuir los niveles de señalización de Wnt. La primera decisión en esta determinación es entre el linaje secretor o absorbente. Esta decisión depende de la presencia o ausencia de señales de Notch (**Figura 2**).

1.3.1. Secretoras

1.3.1.1. Células de Paneth

Estas células son las únicas células terminalmente diferenciadas que residen en la parte inferior de las criptas. Presentan grandes gránulos en la zona apical que contienen proteínas como lisozimas, péptidos antimicrobianos y defensinas, por lo que estas células cumplen una función en la inmunidad innata y en la regulación de la interacción con la microbiota intestinal [1], [8].

Por otra parte, las células de Paneth protegen y alimentan a las ISCs secretando Wnt3a y, por lo tanto, constituyen el nicho primario. El nicho de las células madre del colon está menos definido. Aunque las células de Paneth generalmente están ausentes en el intestino grueso, se ha identificado a células secretoras CD24 y KIT positivas ubicadas en estrecha proximidad a las células madre (LGR5 positivas) en la base de la cripta, sugiriendo que son probablemente componentes del microambiente de las células madre. Sin embargo, aún no se ha identificado la principal fuente de Wnt en el colon [3].

1.3.1.2. Células caliciformes

Las células caliciformes, también llamadas células en forma de cáliz por su típica apariencia en forma de copa, están especializadas en la síntesis y secreción de moco constituido principalmente por mucinas que se almacenan en numerosos gránulos citoplasmáticos [9]. Estas células son abundantes en el epitelio de las vellosidades del intestino delgado distal, donde proporcionan la lubricación adicional necesaria para facilitar el paso de las heces cada vez más compactas hacia el colon, mientras que hay una mayor densidad de ellas en el colon

[3]. Las capas de moco protegen al epitelio de las fuerzas de abrasión y del contacto e invasión de microorganismos a la vez que permiten el transporte de nutrientes [8], [10].

1.3.1.3. Enteroendocrinas

Las células enteroendocrinas, también llamadas neuroendocrinas, secretan diversas hormonas. Las células enteroendocrinas están dispersas como células individuales en toda la mucosa intestinal, representando aproximadamente el 1 % de las células epiteliales [8]. Se han descrito diferentes subtipos de células enteroendocrinas definidas por su morfología y la expresión de hormonas intestinales específicas como por ejemplo: péptidos tipo glucagón, colecistoquinina, somatostatina, péptido inhibidor gástrico, serotonina, grelina y taquiquinina [1].

1.3.1.4. Células de penacho

Las células de penacho, también conocidas como células Tuft, representan aproximadamente el 0,5 % de las células epiteliales en el intestino murino, y son ligeramente más prevalentes en la parte distal del intestino delgado en comparación con la parte proximal. Son células quimiosensoriales, capaces de sensor compuestos lumbinales y responder a dichos estímulos produciendo IL-25, acetilcolina, β -endorfinas y prostaglandinas como PGE2 y PGD2, que son potentes moléculas de señalización paracrina y endocrina [11].

1.3.2. Absortivas

1.3.2.1. Enterocitos

Los enterocitos, son células altamente polarizadas que llevan un borde en cepillo apical responsable de la absorción y transporte de nutrientes a través del epitelio. Los enterocitos constituyen más del 80 % de todas las células epiteliales intestinales [8]. Como células absortivas primarias, son responsables de la absorción de iones, agua, carbohidratos, péptidos y lípidos.

1.3.2.2. Células M

Las células M, o *microfold* en inglés, son células especializadas presentes en la zona del epitelio asociada a los folículos linfoides de la mucosa intestinal (placas de Peyer). Estas células tienen una alta tasa de endocitosis y transcitosis de antígenos lumbinales, por lo que tienen un papel importante en la respuesta inmune al regular el acceso de microorganismos y antígenos al tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal [12], [13].

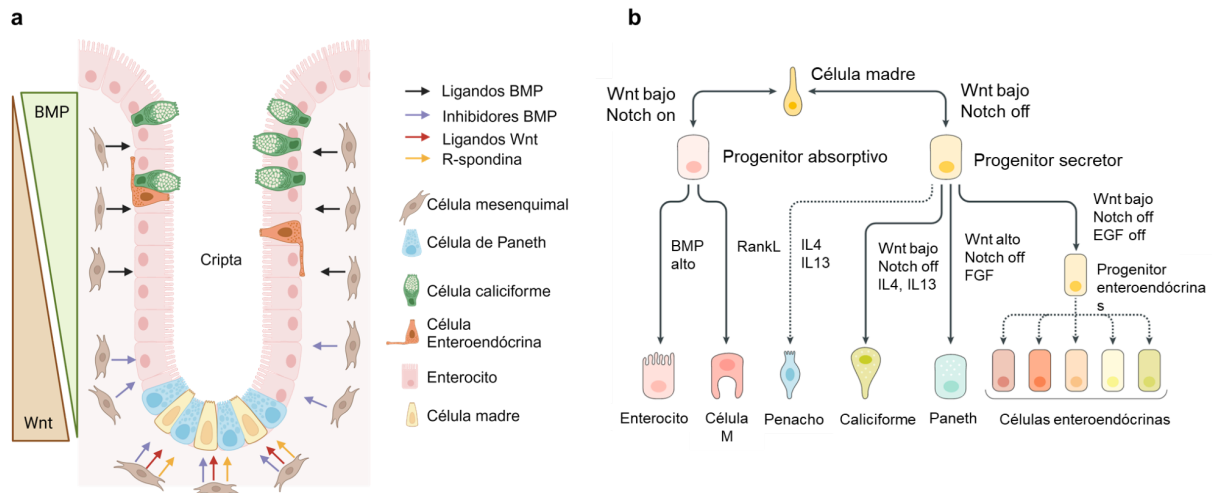


Figura 2. Principales señales regulatorias en la cripta y su efecto en la diferenciación celular. **a)** En la base de las criptas, Wnt y agonistas de Wnt (R-spondinas) son secretados por células mesenquimales y células de Paneth, generando altos niveles de Wnt en el entorno de las células madre. El gradiente de BMP actúa de forma contraria: mientras que a lo largo de la cripta las células mesenquimales producen ligandos de BMP para inducir la maduración y diferenciación de las células epiteliales, las células mesenquimales de la base de la cripta secretan proteínas inhibitorias de BMP protegiendo a las células madre. Figura creada con BioRender.com **b)** Esquema de diferenciación de células epiteliales. La señal de Notch determina el destino hacia el tipo secretor o absorbivo. Algunos mecanismos de diferenciación no han sido determinados aún. Las líneas punteadas indican señales que no han sido debidamente establecidas. Extraído y adaptado de Gehart y Clevers, 2019 [1].

1.4. Modelos *in vitro* del epitelio intestinal

En la investigación biomédica, la reproducción precisa de las características y funciones del epitelio intestinal es esencial para comprender los procesos fisiológicos y patológicos que ocurren en el tracto gastrointestinal. Para abordar esta necesidad, se han desarrollado diversos modelos *in vitro* que buscan simular la complejidad del intestino.

1.4.1. Líneas celulares humanas

Por un lado, las líneas celulares inmortalizadas son altamente proliferativas, homogéneas y relativamente fáciles y económicas de utilizar, lo que las hace muy versátiles para estudios

toxicológicos, de absorción o para el cribado de alto rendimiento (*high throughput screening*) [14]. Dentro de este grupo, se destacan las líneas HT29 (ATCC HTB-38) y Caco-2 (ATCC HTB-37). Ambas líneas celulares derivan de un adenocarcinoma colorrectal humano, pero tienen propiedades diferentes. Las células Caco-2 se han aceptado como el estándar para predecir la permeabilidad intestinal de fármacos por diferentes autoridades regulatorias [15], [16]. Esta línea experimenta una diferenciación espontánea formando un epitelio polarizado cuando alcanzan confluencia, iniciando aproximadamente 7 días después de la siembra y completándose cerca del día 21 de cultivo [17], [18]. Una vez polarizadas, estas células exhiben características semejantes a las de los enterocitos, como la presencia apical de bordes en cepillo, uniones estrechas y la expresión de diversas enzimas y transportadores específicos de los enterocitos [17]. Varias modificaciones han permitido acortar un poco el tiempo que lleva la diferenciación de las Caco-2, pero aún resta mejorar la representatividad de otros tipos celulares en estos cultivos [18]. Para ello, diversos modelos de co-cultivos con otros tipos celulares han sido desarrollados [19]. Por ejemplo, el co-cultivo de Caco-2 con una línea derivada de HT29 (HT29-MTX) productora de mucus [20], buscaba mejorar los estudios de absorción al incorporar la capa de mucus producida por estas células. Otros co-cultivos buscaban incorporar además otros tipos celulares como células tipo M o linfocitos B [17], [21], [22].

Otro inconveniente de las líneas celulares inmortalizadas es su diferencia con el tejido epitelial normal. De hecho, debido a su origen canceroso, albergan múltiples mutaciones genéticas; por ejemplo, las células Caco-2 son aneuploides y portan un gen p53 mutado [14]. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos el cultivo primario de células epiteliales intestinales viables continúa siendo difícil, y sin posibilidades de mantenerlo a largo plazo [18].

Los métodos empleados para el cultivo de estas líneas celulares son tradicionalmente en dos dimensiones (2D), los cuales no permiten recrear la complejidad estructural ni las interacciones celulares que tienen lugar en un tejido vivo, limitando su poder predictivo [23], [24]. Por ejemplo, para ensayos de absorción de fármacos *in vitro* se ha empleado la línea celular Caco-2 en sistemas 2D, cuando es una línea que presenta una baja expresión de enzimas metabolizadoras p450 y casi carece por completo de producción de mucus. Además, el modelo presenta una pobre correlación con los datos en humanos para medicamentos de absorción lenta, lo que puede deberse a la falta de una arquitectura tisular tridimensional [25]. En las últimas décadas, con el avance de nuevas tecnologías en materiales y técnicas, el desarrollo de cultivos en tres dimensiones (3D) ha emergido como una prometedora alternativa a los

sistemas tradicionales de cultivo. Estos cultivos 3D buscan replicar la arquitectura, las funciones mecánicas y la diversidad celular características del tejido, creando así un microambiente fisiológicamente más relevante [26]. La implementación de modelos 3D tiene como objetivo cerrar la brecha entre los cultivos celulares tradicionales y el tejido vivo, mejorando la correlación de los resultados obtenidos en estudios *in vitro* con los *in vivo*. En este contexto, resulta imperativo perfeccionar los ensayos basados en células para lograr una predicción más precisa de la eficacia y seguridad de los compuestos identificados como candidatos [27]. En este sentido, varias líneas celulares intestinales han sido empleadas en sistemas de cultivo en 3D empleando placas de baja adherencia para permitir la formación de esferoides [28], [29]. Este formato representa mejor los contactos célula-célula que ocurren en el tejido, pero aún presenta la limitación de contener un único tipo celular.

En suma, intentar simular las complejidades del entorno intestinal presenta numerosos desafíos, que van desde preocupaciones éticas asociadas con la experimentación animal hasta la limitada capacidad para modelar con precisión sus funciones intrincadas en un entorno de laboratorio. En los últimos años, ha surgido una innovación en tecnología de cultivos celulares tridimensionales: el desarrollo de los organoides intestinales, que han solucionado alguno de estos desafíos y han abierto el camino a una nueva era de investigación *in vitro*.

1.4.2. Organoides intestinales

Si bien el término “organoide” comenzó a utilizarse en los años 1965 - 1985 en experimentos que buscaban describir la organogénesis mediante experimentos de disociación y reagregación celular, a partir de 2009 se dio una resignificación a este término [30]. Un organoide se define ahora como una estructura tridimensional multicelular y autoorganizada, generada a partir de células madre y compuesta por tipos celulares específicos de un órgano [30].

En 2009, Sato y colaboradores describieron el protocolo para recapitular *in vitro* el nicho de las ISCs, y así permitir el cultivo a largo plazo de células epiteliales intestinales murinas en ausencia de un componente mesenquimal [31]. En este trabajo fundamental, lograron desentrañar las claves para un sistema de cultivo de intestino delgado que denominaron organoides intestinales, originado a partir de células madre y capaz de recrear no sólo la heterogeneidad celular propia del tejido, sino también su estructura tridimensional y su funcionalidad (**Figura 3, panel superior**).

Lo consiguieron incorporando (1) la señalización de Wnt mediante el agonista R-spondina 1 para la proliferación de las criptas [32], (2) la señalización de EGF asociada a la proliferación intestinal, (3) el empleo de un inhibidor de BMP (Nogina) que induce una expansión del número de criptas. Por último, considerando que las células intestinales aisladas experimentan apoptosis inducida al perder su anclaje célula-matriz (anoikis) *in vivo* [33] y dado que la laminina ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) está enriquecida en la base de las criptas, decidieron emplear el uso de una matriz extracelular de origen animal (rica en laminina) para respaldar el crecimiento del epitelio intestinal. La matriz deriva de un tipo de tumor murino que produce grandes cantidades de matriz extracelular con una composición similar a la membrana basal. Los extractos de este tumor se han desarrollado y vendido desde entonces, siendo Matrigel una de las marcas comerciales más utilizadas. Los componentes principales de esta matriz son las proteínas más abundantes en la lámina basal: laminina (~60 %), colágeno IV (~30 %), entactina (~8 %) y el proteoglicano de heparan sulfato perlecan (~2–3 %) [34]. La matriz también contiene otros tipos de colágeno, factores de crecimiento como el TGF- β (por sus siglas en inglés, *Transforming Growth Factor beta*) y FGF (por sus siglas en inglés, *Fibroblast Growth Factor*), metaloproteinasas remodeladoras de la matriz, entre otros. Estas proteínas estructurales y señalizadoras contribuyen a la función biológica de la matriz en los cultivos tridimensionales.

En este sistema de cultivo basado en matriz con EGF, R-spondina 1 (agonista de Wnt), y Nogina (inhibidor de BMP); tanto las criptas como las células madre (LGR5 positivas) aisladas de intestino delgado murino crecen de forma autónoma en estructuras similares a criptas con células madre y células de Paneth generadas *de novo* en su base. Asimismo, se ha demostrado que las células madre adultas del intestino delgado están regionalmente programadas y conservan sus perfiles de expresión génica específicos de la ubicación incluso después de un cultivo a largo plazo [35]. A diferencia de un cultivo primario tradicional, los organoides pueden subcultivarse por varios pasajes y criopreservarse de forma muy similar a una línea celular.

Posteriormente, se determinaron las condiciones para el cultivo de organoides de colon y estómago a partir de criptas o glándulas y a partir de células madre Lgr5 positivas aisladas [36], [37], [38]. En los organoides del intestino delgado, la presencia de las células de Paneth permite reducir los niveles de Wnt exógeno, pero la ausencia de células mesenquimales y de Paneth en los organoides del colon requiere la presencia continua de niveles relativamente altos de Wnt3a en el medio para mantener los cultivos [39]. Además del desarrollo de protocolos para el cultivo de organoides de distintas regiones del tracto gastrointestinal murino,

también se logró obtener organoides intestinales a partir de otras especies como perro, gato, caballo, cerdo, vaca, oveja, pollo, conejo [40], [41], [42], y también a partir de muestras humanas [38], [43] adecuando las condiciones de cultivo en cada caso. Por ejemplo, para el cultivo de organoides intestinales humanos, es necesario la suplementación del medio de cultivo con factores como Nicotinamida, SB202190 (inhibidor de la p38 MAP kinasa), A83-01 (inhibidor del receptor de TGF- β tipo I, ALK4,5 y 7).

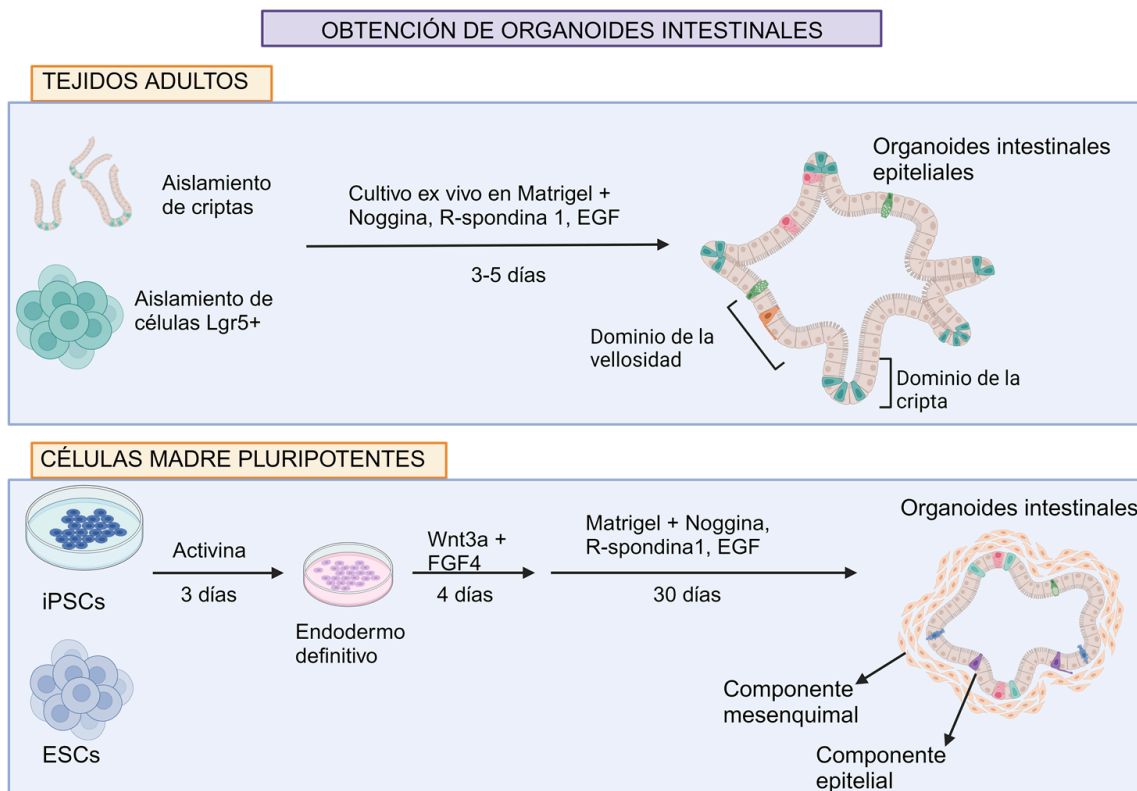


Figura 3. Obtención de organoides intestinales a partir de diferentes fuentes de células madre. Los organoides intestinales pueden generarse a partir de células madre adultas ya sea individuales o a partir del aislamiento de criptas intestinales. También pueden obtenerse organoides a partir de células pluripotentes. En este caso la fuente puede ser a partir de células diferenciadas reprogramadas a células pluripotentes inducidas (iPSCs) o células madre embrionarias (ESCs) obtenidas del macizo celular interno del blastocisto. Figura creada con BioRender.com

Por otra parte, la capacidad de generar mini-intestinos a partir de células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) también ha sido explorada, permitiendo a los investigadores estudiar aspectos del desarrollo gastrointestinal humano *in vitro* [44], [45]. Para ello es necesaria la activación secuencial de las vías de señalización de manera gradual que recapitula el desarrollo intestinal temprano (**Figura 3, panel inferior**). Estos pasos principales

del desarrollo incluyen la formación de endodermo definitivo, el patrón del endodermo posterior, la formación del tubo digestivo y el crecimiento y la morfogénesis intestinal [46]. Para generar el endodermo definitivo, las células pluripotentes humanas son tratadas con activina por tres días donde además se generan algunas células pertenecientes al mesodermo; y para la especificación a tubo digestivo posterior se adicionan los factores FGF4 y Wnt3a por 4 días. Estos factores también favorecen cambios morfológicos que permiten el desarrollo de esferoides en el cultivo en dos dimensiones. Los esferoides forman organoides intestinales cuando se cultivan en condiciones tridimensionales que favorecen la expansión y diferenciación de precursores intestinales, como se determinó para los organoides derivados de ISC_s adultas: matriz extracelular, medio suplementado con R-Spondina 1, Nogina y EGF [45], [47]. A diferencia de los organoides derivados de células madre adultas, estos organoides requieren de al menos un mes para su generación, dado que el proceso de diferenciación dirigida es más complejo de recrear. Los organoides se expanden durante 1 a 3 meses dando lugar a un epitelio intestinal polarizado, con estructuras parecidas a vellosidades y zonas proliferativas similares a criptas, y que presentan los principales tipos celulares epiteliales. Además presenta un componente mesenquimal rodeando las estructuras epiteliales compuesto por miofibroblastos y células musculares lisas [45], [48]. Por otro lado, si bien resulta interesante que estos organoides presentan un componente mesenquimal rodeando el epitelio, la arquitectura y composición celular que recrean es más similar a un intestino fetal que un intestino adulto [45], [46] y una vez establecidos es difícil amplificarlos en cultivo mediante subcultivos [49]. Por lo tanto, los organoides desarrollados a partir de células pluripotentes resultan particularmente útiles para obtener organoides para los cuales la obtención de células madre adultas no es posible, como el cerebro o la retina [50].

1.5. Aplicaciones de los organoides intestinales

El ratón y el ser humano son bastante similares en fisiología y estructuras anatómicas, y es una de las razones por las cuales los modelos murinos se han utilizado ampliamente en estudios biomédicos [51]. Sin embargo, estos modelos son costosos, consumen un tiempo considerable y no necesariamente recrean fielmente lo que sucede en el ser humano. Además, el uso de animales de experimentación trae asociadas consideraciones éticas, lo que llevó a Russell y Burch en 1959 a formular el principio de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento), subrayando la necesidad urgente de introducir métodos alternativos al uso de animales en la investigación [52]. En este sentido, los organoides surgieron en la comunidad científica como

un puente entre los modelos *in vitro* tradicionales y los modelos *in vivo*, permitiendo simular la diferenciación celular, la arquitectura espacial, las funciones mecánicas y la diversidad celular propias del órgano vivo.



Figura 4. Aplicaciones de los organoides intestinales en investigación. Figura creada con BioRender.com

En particular, los organoides intestinales se han utilizado ampliamente para modelar e investigar el desarrollo, la homeostasis y la regeneración intestinal [30], [50] (**Figura 4**). En cuanto al modelado de enfermedades, los organoides se pueden emplear para evaluar la relación hospedero-patógeno. Por ejemplo se han utilizado para estudiar la infección por bacterias como *Salmonella* [53], [54], [55] o *Clostridium difficile* [56], parásitos como *Cryptosporidium parvum* [57], [58] o *Toxoplasma gondii* [59], y virus como Norovirus, siendo el primer modelo *ex vivo* que permitió la replicación de Norovirus [60]. La mayoría de estos patógenos entran en contacto con el lado apical del epitelio intestinal. Dado que en los organoides intestinales el lumen queda localizado hacia el interior de las estructuras, dificultando el acceso a la cara apical, se han desarrollado diversas aproximaciones que intentan resolver esta limitación metodológica, entre ellas: 1) microinyección del microorganismo en el lumen del organoide, 2) disrupción mecánica de los organoides e introducción del microorganismo por las rupturas temporales generadas antes de que vuelvan a cerrarse, 3) disociación de organoides 3D en monocapas de células (2D) con el lado apical orientado hacia arriba o 4) empleo de organoides 3D con la polaridad invertida [61], [62], [63], [64].

Los organoides intestinales también pueden emplearse para modelar diversas enfermedades intestinales no infecciosas. Un caso emblemático surgió del trabajo de Dekkers y colaboradores, quienes emplearon organoides intestinales humanos para el *screening* de fármacos en pacientes con fibrosis quística. Esta enfermedad es causada por mutaciones en el canal de cloruro regulador de la conductancia transmembrana y afecta principalmente a los pulmones y al sistema digestivo. Empleando organoides intestinales derivados de biopsias de pacientes sanos y con fibrosis quística, diseñaron un ensayo para evaluar la funcionalidad del canal de cloruro *in vitro*. Para ello, los organoides fueron estimulados con forskolina, que activa a dicho canal y favorece el transporte de líquidos desde las células hacia el lumen del organoide. Esto redundó en el hinchamiento del organoide derivado de pacientes sanos, donde el canal es funcional. Las respuestas de los organoides se pueden cuantificar mediante análisis automatizado de imágenes en tiempo real. Esta respuesta de inflamación o hinchamiento inducida por forskolina está ausente en los organoides de pacientes con fibrosis quística, pero se puede restaurar para ciertos pacientes que presentan mutaciones particulares mediante la adición de fármacos que corrigen la actividad del canal [65]. Este ensayo de forskolina y la cuantificación de la respuesta de hinchamiento de los organoides tratados con diferentes fármacos podría permitir potencialmente la detección de fármacos efectivos para pacientes individuales (medicina personalizada).

Una de las aplicaciones más prometedoras de los organoides concierne al estudio del cáncer. Los organoides de cáncer (también llamados tumoroides u organoides tumorales) pueden generarse de manera muy eficiente a partir de tejido tumoral y propagarse fácilmente bajo condiciones definidas [38]. Por lo tanto, los organoides de cáncer pueden cerrar la brecha entre los modelos donde se emplean líneas celulares de cáncer en 2D y los sistemas de modelos basados en animales, incluidos los modelos de xenoinjertos derivados de pacientes [61]. Además, dado que los organoides mantienen las características del tejido del cual derivan y que son estructuras autoreplicantes, ha sido posible generar biobancos de organoides de pacientes con cáncer colorrectal [66], [67]. En estos biobancos se encuentran representados diversos subtipos moleculares del cáncer colorrectal y permiten estudios precisos de asociación entre la presencia de determinadas mutaciones y la eficacia del medicamento, facilitando el tamizaje de fármacos a gran escala. También es posible modelar diferentes aspectos del cáncer colorrectal con organoides derivados de células no cancerosas. Utilizando estrategias basadas en silenciamiento de RNA en organoides de colon murino de tipo salvaje, Li y colaboradores introdujeron mutaciones combinadas en Apc, p53, KrasG12D, Smad4 y

observaron una transformación progresiva hacia una histología similar a la de un adenocarcinoma invasivo *in vivo* [68]. Dos estudios independientes también han simulado la transformación oncológica introduciendo mutaciones secuenciales en las células madre de organoides de colon humano mediante herramientas de edición genética. Al realizar el xenotrasplante en modelos de ratón, se vio que los organoides con cuatro o cinco mutaciones fueron capaces de desarrollar adenocarcinomas después del trasplante [69], [70].

1.6. Limitaciones del modelo

Los organoides han demostrado ser muy útiles en diferentes aplicaciones de biología celular y ensayos biomédicos. Sin embargo, aún es necesaria más evidencia para que sean contemplados en los estudios traslacionales como el cribado de fármacos o aplicaciones de medicina regenerativa. Para ampliar el repertorio de aplicabilidad de los organoides es fundamental ir derribando algunas de las limitaciones que presentan.

Por un lado, aunque los modelos de organoides intestinales han logrado un gran avance en cuanto a su funcionalidad, como la producción de moco y funciones de absorción y barrera, no reproducen completamente el repertorio funcional total de sus tejidos respectivos. Por ejemplo, suelen carecer de tipos celulares especializados minoritarios y no logran recapitular la complejidad de la organización global tisular debido a la (parcial) ausencia de un compartimento mesenquimal, vascularización y/o del microbioma. Estas limitaciones pueden sobreponerse mediante el agregado de componentes al medio que promueve la diferenciación hacia tipos celulares especializados, o el co-cultivo con otros componentes del intestino como células mesenquimales o la microbiota. La aplicación de fuerzas de flujo, una interfaz de aire en la zona apical o de estímulos mecánicos puede mejorar la maduración terminal de las células *in vitro*, pero la integración de tales características sigue siendo técnicamente desafiante [71].

Por otro lado, la inaccesibilidad también plantea problemas para los diferentes compartimentos del organoide, especialmente en experimentos que requieren acceso al lado luminal del epitelio. En esos casos, es necesario recurrir a estrategias para el acceso al lumen como la microinyección, los cultivos en dos dimensiones o la reversión de la polaridad [64].

Otra gran limitación que presenta el cultivo de organoides es la falta de estandarización que conlleva a una gran heterogeneidad. La considerable variabilidad en eficiencia de formación, morfología y función, es inherente a la autoorganización *in vitro*, la variedad de medios de cultivos empleados para su desarrollo y la variabilidad de las matrices extracelulares

empleadas que afectan la proliferación y diferenciación celular. Esta variabilidad se observa no sólo intra-organoide sino también en las diferentes muestras [72]. La reducción de esta variabilidad será esencial para aprovechar completamente el potencial de los organoides en investigación fundamental y aplicada como el cribado de fármacos a escala preclínica. Estrategias de bioingeniería, como el aumento de la automatización, el uso de medios y matrices bien definidos sin componentes de origen animal, deben aún explorarse para reducir la variabilidad en el desarrollo de organoides y permitir sus aplicaciones en el campo de la medicina personalizada y regenerativa.

2. Hipótesis

La evidencia sugiere que el cultivo celular tridimensional (3D) refleja de manera más fiel el comportamiento celular *in vivo*, y que muchas respuestas obtenidas en modelos celulares tradicionales no pueden reproducirse en sistemas más complejos ni en organismos vivos.

Bajo la premisa que la incorporación de la tecnología de cultivos de organoides intestinales en nuestro país es factible y que dado su mayor nivel de complejidad en comparación con los métodos de cultivo celular convencionales, su aplicación proporcionará una aproximación *in vitro* más cercana a la fisiología animal, al tiempo que contribuirá a reducir el uso de animales de laboratorio. La hipótesis sostiene que los organoides intestinales murinos reporteros generados con la cepa transgénica NF- κ B-RE-luciferasa son capaces de responder de manera diferencial a compuestos inmunomoduladores derivados de la microbiota intestinal humana. Por otro lado, proponemos que los organoides intestinales murinos presentan variaciones en su susceptibilidad a la infección por *Trypanosoma cruzi*, permitiendo la caracterización de la infección del epitelio intestinal en estas condiciones.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo consiste en implementar el cultivo de organoides intestinales murinos obtenidos a partir de criptas intestinales adultas y aplicarlos a la generación de nuevos sistemas reporteros del epitelio intestinal y al estudio de la interacción con la microbiota y parásitos patógenos.

3.2. Objetivos específicos

- a) Generar y caracterizar organoides intestinales murinos reporteros para el factor de transcripción NF- κ B a partir de distintas secciones de intestino utilizando la cepa transgénica NF- κ B-RE-luciferasa.
- b) Generar nuevos sistemas reporteros de organoides intestinales mediante la técnica de edición genética CRISPR-Cas a partir de organoides de cepa salvaje.
- c) Determinar la capacidad inmunomoduladora de compuestos solubles derivados de la microbiota intestinal humana utilizando organoides reporteros NF- κ B.
- d) Evaluar la capacidad infectiva del parásito *Trypanosoma cruzi* sobre el epitelio intestinal empleando organoides murinos.

A fin de organizar de una manera más clara la información contenida en este trabajo, los objetivos serán desarrollados en dos capítulos, cada uno con su contexto, metodología, resultados y discusión respectiva. El capítulo 1 comprenderá el desarrollo de los objetivos específicos a y b; mientras que en el capítulo 2 se abordará el objetivo c y d. Una conclusión general y las perspectivas se presentan como cierre final al trabajo.

4. Capítulo 1

Generación del modelo de organoides intestinales reporteros

Objetivos desarrollados:

- Generación y caracterización organoides intestinales murinos reporteros para el factor de transcripción NF- κ B a partir de distintas secciones de intestino utilizando la cepa transgénica NF- κ B-RE-luciferasa.
- Generación de nuevos sistemas reporteros de organoides intestinales mediante la técnica de edición genética CRISPR-Cas a partir de organoides de cepa salvaje.

4.1. Introducción

4.1.1. El factor de transcripción NF- κ B y su rol a nivel intestinal

El factor de transcripción NF- κ B pertenece a una familia de factores de transcripción altamente conservados que regulan una amplia gama de procesos biológicos, incluyendo el crecimiento celular y la supervivencia, la inmunidad y la inflamación [73]. Este factor de transcripción está conformado por dímeros de proteínas muy conservadas que comparten un dominio llamado RHD (del inglés Rel Homology Domain). En mamíferos existen cinco genes que codifican para dichas proteínas RELA (p65), RELB (RelB), REL (c-Rel), NFKB1 (p50/p105) y NFKB2 (p52/p100), los cuales pueden formar homodímeros o heterodímeros [74]. Usualmente, los dímeros se mantienen inactivos en el citosol gracias a la presencia de proteínas inhibitorias del NF- κ B (I κ Bs: I κ B α , I κ B β y I κ B ϵ), las cuales ocultan la señal de exportación nuclear de los dímeros (**Figura 5**). La activación de NF- κ B se da por activación de la quinasa de I κ Bs (IKK), que induce la fosforilación y posterior ubiquitinación y degradación proteosomal de la proteína inhibitoria I κ B. Una vez que I κ B se degrada, NF- κ B se transloca al núcleo, donde se une a elementos cis-activadores presentes en un subconjunto de genes y desencadena su transcripción. Los genes expresados por la activación de NF- κ B están involucrados en varios procesos biológicos intestinales, como la proliferación celular, la diferenciación y supervivencia,

la inflamación y la carcinogénesis [75], [76]. Esta vía de señalización parece desempeñar un papel dual en el epitelio intestinal al ejercer efectos perjudiciales y funciones protectoras, dependiendo del estímulo recibido [74], [77]. Mientras que la activación excesiva de NF- κ B en células inmunes ha sido identificada como uno de los principales contribuyentes de la inflamación intestinal crónica [78], [79], otras aproximaciones genéticas en estudios recientes han indicado que la señalización NF- κ B en el epitelio intestinal sería necesaria para mantener la homeostasis del órgano. La activación de NF- κ B en las células epiteliales intestinales las protegería contra la apoptosis inducida por diferentes estímulos nocivos preservando la integridad de la barrera intestinal [80].

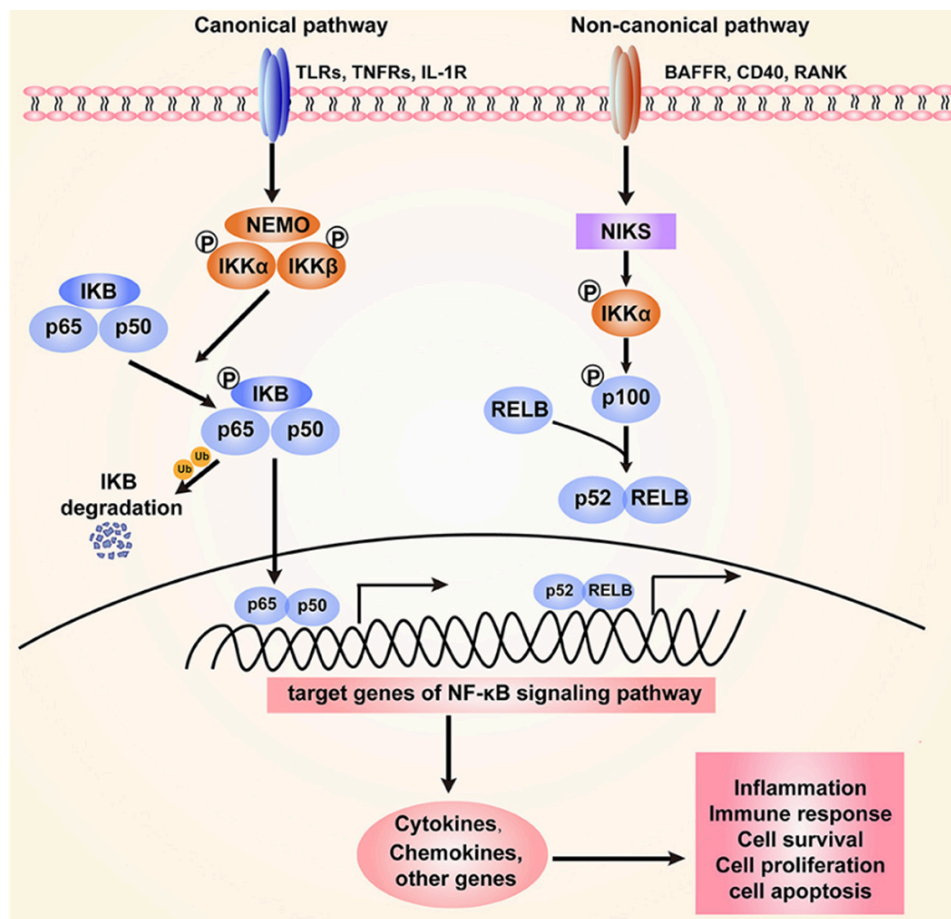


Figura 5. Activación de la vía de señalización del factor de transcripción NF- κ B. La vía canónica es inducida por TLRs (del inglés *Toll-Like Receptors*), TNFRs (del inglés *TNF- α Receptors*) e IL-1R (Receptor de la IL-1). La vía no canónica depende de la activación del complejo NF- κ B2 (p100)/RelB por el receptor BAFF, CD40 y RANK. La activación de la señalización del NF- κ B regula varios procesos celulares al inducir la expresión de citoquinas, quimioquinas y otros genes. Tomado de Peng et al., 2020 [81].

Modelos *in vitro* del epitelio intestinal han probado ser una gran herramienta para evaluar la contribución de la señalización mediada por NF- κ B en diferentes escenarios. La utilización de modelos reporteros se presenta como una alternativa rápida, reproducible y menos laboriosa para la evaluación de compuestos que actúen sobre distintas vías de señalización. En nuestro laboratorio contamos con distintos sistemas reporteros para la activación del factor de transcripción NF- κ B. Hemos desarrollado diferentes líneas celulares reporteras para la activación de NF- κ B [82], [83] utilizando la proteína fluorescente GFP (por sus siglas en inglés, *Green Fluorescent Protein*). Sin embargo, el uso de cultivos de líneas celulares tradicionales presenta la desventaja de estar genéticamente modificadas, alterando sus propiedades fisiológicas y sin lograr reproducir adecuadamente el entorno tridimensional natural de las células ni recrear la diversidad celular original del tejido, a veces proporcionando datos poco predictivos en cuanto a las respuestas en el organismo vivo [84]. En este contexto, los organoides intestinales presentan ventajas sobre los cultivos tradicionales ya que recrean la diversidad celular del intestino y tienen una capacidad replicativa ilimitada.

4.1.2. Sistemas reporteros

En este trabajo se caracterizan organoides intestinales murinos reporteros para la actividad de NF- κ B derivados de ratones transgénicos NF- κ B-RE-Luc. Este modelo transgénico, generado por Carlsen y colaboradores [85] (**Figura 6**), tiene un constructo de ADN integrado aleatoriamente al genoma que consta del gen de la luciferasa (de *Photinus pyralis*) optimizado para su expresión en células eucariotas y que está regulado por repeticiones en tándem de sitios de unión a NF- κ B, impulsando la expresión de la proteína reportera. De esta manera, una vez que se activa la vía del factor NF- κ B, se expresa a su vez el gen de la luciferasa permitiendo observar la actividad del factor de transcripción a través del agregado del sustrato

de luciferasa (luciferina) y cuantificando la señal luminiscente resultante.

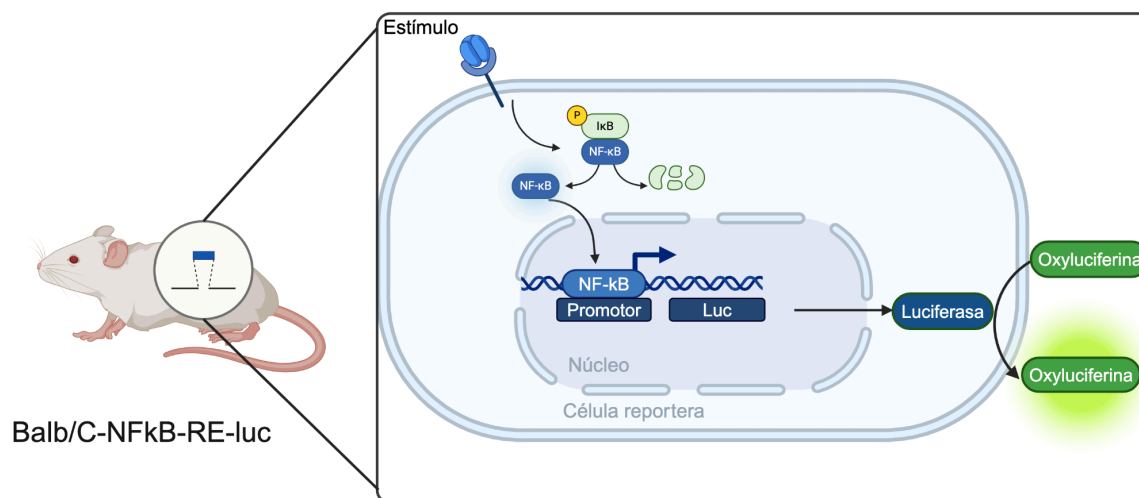


Figura 6. Esquema del modelo reportero murino NF- κ B-RE-luc. El genoma de estos animales contiene un transgen con un tándem de elementos de respuesta de NF- κ B ubicado aguas arriba de un promotor basal SV40, y un ADN copia modificada de luciferasa. Frente a un estímulo se induce la expresión de la proteína reportera, cuya actividad puede determinarse con un luminómetro o equipo de imagenología *in vivo*, tras la adición de su sustrato.

4.1.3. Edición genética

Una de las formas en que el empleo de estos cultivos en tres dimensiones puede colaborar a reducir y refinar el uso de animales de laboratorio es debido a la posibilidad de hacer edición genética en el organoide una vez formado. Esto permite que se pueda generar un nuevo genotipo de interés sin necesidad de contar con una cepa de ratón transgénica.

En las últimas décadas, los avances tecnológicos han facilitado significativamente la edición y regulación precisa del genoma. Una de las tecnologías recientes ha adaptado el sistema de defensa bacteriano como una plataforma simple y guiada por ARN para la edición y regulación altamente eficientes y específicas del genoma en diversos organismos, creando así herramientas revolucionarias para la investigación biomédica y nuevas posibilidades para el tratamiento de trastornos genéticos [86], [87], [88]. Este sistema denominado CRISPR (por sus siglas en inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) es un tipo de edición genética basado en una endonucleasa (denominada Cas) que es guiada por una secuencia de ARN hacia un sitio blanco comúnmente llamada ARN guía (sgRNA por sus siglas en inglés). Esta secuencia de ARN de simple hebra, tiene una porción unida a la endonucleasa, y una región de pocos nucleótidos (cerca de 20) que es complementaria al sitio de ADN genómico que será clivado por la nucleasa (**Figura 7**). De esta manera, la edición precisa del

genoma requiere la acción de una máquina molecular compuesta por dos partes principales: un dominio de unión al ADN que media el reconocimiento y la unión específica de secuencias de ADN, y un dominio efector que permite el corte del ADN cerca del sitio de unión [89].

El corte de doble hebra puede ser reparado por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) generando mutaciones que dan lugar a pequeñas inserciones o deleciones, generando la disrupción de un gen (*knock-out*). Por otro lado, el corte también puede repararse mediante el mecanismo de recombinación homóloga dirigida (HDR, por sus siglas en inglés). En este caso, se requiere de un ADN molde que tendrá brazos de homología con las regiones que están flanqueando el sitio de corte y de esta manera es posible insertar alguna secuencia en el sitio de corte (*knock-in*).

Con el fin de ampliar la cantidad de ensayos funcionales que podemos realizar en estos organoides, en el presente trabajo se propuso generar organoides que expresen sensores del estado redox intracelular. El estado redox de las cisteínas en las proteínas se equilibra con la relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) mediante enzimas de intercambio de tiol-disulfuro como las glutaredoxinas. Por lo tanto, la introducción de cisteínas cerca del cromóforo de las proteínas fluorescentes resulta en proteínas que cambian sus espectros mediante reacciones de oxidación/reducción (proteínas redox sensibles) [90]. Ya disponemos en nuestro laboratorio de líneas celulares que expresan establemente nuevos biosensores basados en proteínas fluorescentes como la roGFP2 (GFP redox sensible 2) [91]. Este biosensor permite monitorear en tiempo real y de manera no invasiva la proliferación y el estado redox intracelular. Sin embargo, las roGFPs expresadas endógenamente no responden bien a señales redox fisiológicas en células animales debido a su lenta respuesta y falta de selectividad al equilibrarse con los sistemas redox celulares. Para superar estas limitaciones, se utiliza la roGFP2 fusionada con la glutarredoxina-1 humana (Grx1), lo que permite que el biosensor catalice específicamente el equilibrio entre el glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG). Esta fusión mejora la sensibilidad y la resolución temporal del sensor, permitiendo la detección dinámica de cambios en el potencial redox intracelular [92]. En este caso, se desea incorporar en los organoides la secuencia de un biosensor que consiste en la proteína Grx1 fusionada a la proteína GFP redox sensible (hGrx1-roGFP2). Por lo tanto, la generación de estos organoides reporteros con roGFP2 es de utilidad para evaluar el papel de la señalización redox y el estrés oxidativo en eventos como la interacción parásito-hospedero, la diferenciación celular, el ciclo celular, la apoptosis y la disfunción metabólica.

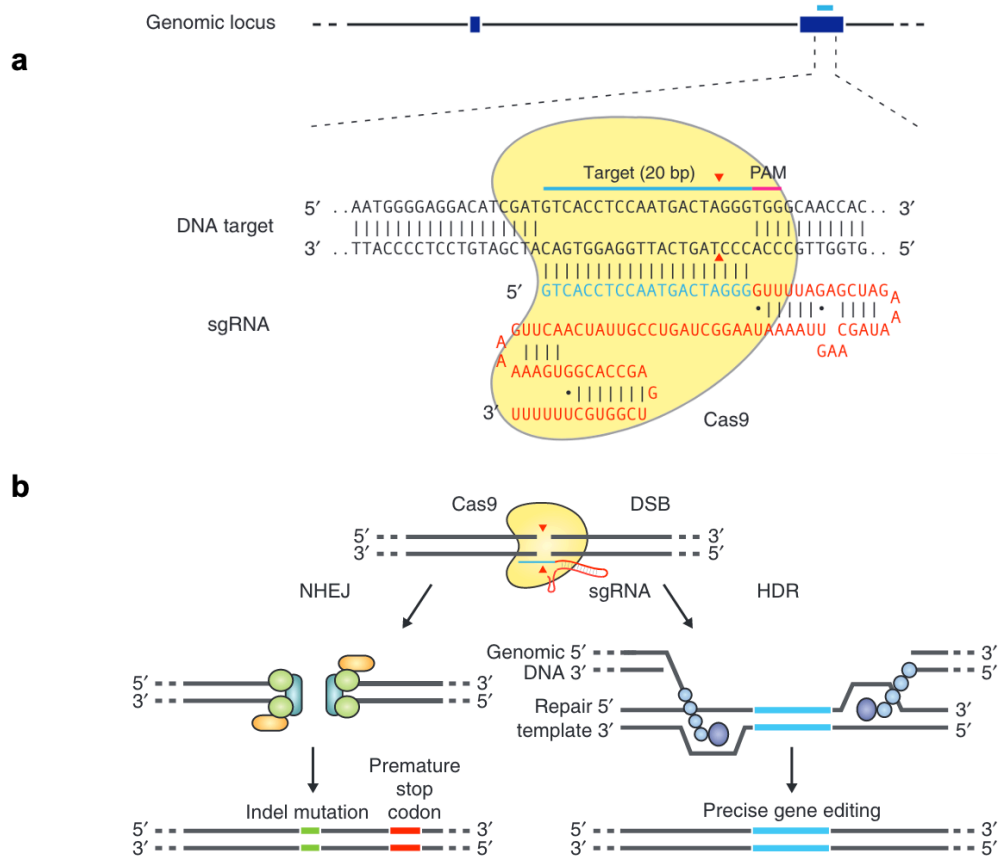


Figura 7. Sistema CRISPR/Cas9 para edición genética. **a)** La endonucleasa Cas9 de *S. pyogenes* (amarillo) es guiada por ARN al sitio de ADN genómico mediante un sgRNA que consta de una secuencia guía de 20 nt (celeste) y un andamio (rojo). La secuencia guía es complementaria al sitio blanco de ADN (barra celeste en la cadena superior), río arriba de un motivo 5'-NGG (PAM o *protospacer adjacent motif*, rojo) necesario para el corte de doble hebra que realiza la Cas9 (triángulo rojo). **b)** El corte inducido por Cas9 se puede reparar de dos maneras. En la vía NHEJ, propensa a errores, los extremos son procesados por una maquinaria endógena de reparación del ADN y se vuelven a unir, dando lugar a mutaciones aleatorias en el sitio de unión. Alternativamente, se puede suministrar un molde en forma de plásmido u oligo de simple hebra para aprovechar la vía HDR, lo que permite una alta fidelidad y una edición precisa. Extraído y adaptado de Ran y colaboradores, 2013 [88].

En suma, en este capítulo se desarrollará lo realizado para generar y caracterizar los organoides intestinales reporteros. Se obtuvieron organoides de distintas regiones del animal transgénico, se detectaron las principales poblaciones celulares presentes, se evaluaron parámetros de crecimiento y la respuesta reportera frente a estímulos conocidos.

Posteriormente, se procedió con el diseño de la edición genética de organoides murinos de cepas salvajes para la generación de nuevos organoides reporteros.

4.2. Métodos

4.2.1. Reactivos generales

La mayoría de los productos químicos utilizados fueron adquiridos de Sigma Aldrich, Merck (Saint Louis, EE. UU.). Además, se obtuvieron de Sigma Aldrich: Ampicilina, Kanamicina, Higromicina B, Seroalbúmina bovina (BSA), dimetilsulfóxido (DMSO), medio LB, Agar, Ioduro de Propidio (IP), Lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS), Factor de necrosis tumoral (TNF- α , por sus siglas en inglés). D-luciferina (sal potásica Xenolight™) fue obtenida de Perkin Elmer (Waltham, EE. UU.). Los medios de cultivo DMEM y Advanced DMEM/F12, suero fetal bovino (SFB), TrypLE, G418 (geneticina), Penicilina-Estreptomicina (P/S), los suplementos GlutaMAX, B27 y N2; y demás consumibles para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE. UU.). La matriz extracelular (extracto de membrana basal) Cultrex™ Tipo II se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, EE. UU.) o bien se usó la matriz de membrana Matrigel™ de Corning (Nueva York, EE. UU.). De Peprotech (Cranbury, EE.UU.) se obtuvieron las siguientes proteínas recombinantes: gastrina I, Wnt-3a, Nogina, R-spondina 1, factor de crecimiento epidérmico (EGF); y los inhibidores sintéticos: SB431542 (inhibidor de TGF- β) y Y-27632 (inhibidor de Rho quinasa, ROCK). La IL-1 β fue adquirida de Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE. UU.).

4.2.2. Líneas celulares

Para la producción de medio condicionado de organoides se empleó la línea celular murina L-WRN (CRL-3276™) obtenida directamente de ATCC (Manassas, EE. UU. <https://www.atcc.org/>). Para los ensayos de transfección se utilizó la línea NIH/3T3 (CRL-1658™), también obtenida de ATCC. Las células fueron cultivadas a 37 °C en una atmósfera húmeda controlada con 5 % de CO₂. Como medio de cultivo se utilizó DMEM suplementado con 10 % (v/v) de SFB (medio completo).

4.2.2.1. Mantenimiento básico de las líneas celulares de mamífero

Estas células crecen en adherencia, y para su mantenimiento en cultivo se utilizaron botellas de tipo T de 25, 75 y 150 cm²; se realizaron pasajes de las mismas cuando alcanzaban un 80 % de confluencia utilizando tripsina-EDTA para su disgregación. Las células se mantuvieron en

cultivo por un máximo de 10-15 pasajes y cumplido dicho período, se procedió a descongelar un nuevo criotubo del banco celular.

4.2.2.2. Criopreservación y descongelado de células

Las células en fase de crecimiento exponencial fueron tripsinizadas y se contaron en cámara de Neubauer. Posteriormente se centrifugaron a $250 \times g$ por 5 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en el medio de congelación (10 % DMSO y 90 % SFB, (v/v)) alcanzando una concentración entre 2×10^6 y 3×10^6 células por mL. Los criotubos fueron almacenados a -80°C utilizando una cámara de enfriamiento progresivo de 1°C por minuto (Nalgene, Nueva York, EE. UU.) y a las 24 – 48 horas se transfirieron a nitrógeno líquido para su conservación.

El descongelado de cada lote de células se llevó a cabo en forma rápida, para maximizar la supervivencia celular. Se retiró el criotubo del tanque de nitrógeno y se descongeló rápidamente en baño de agua a 37°C por un máximo de 2-3 minutos. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en medio y centrifugadas por 5 minutos a $250 \times g$. Luego fueron resuspendidas en 1 mL de medio de mantenimiento y se procedió al recuento y la determinación de la viabilidad de las células recuperadas. Finalmente, las células fueron sembradas en frascos de 25 o 75 cm^2 , según la cantidad de células o la demanda de células a utilizar en los diferentes ensayos.

4.2.3. Preparación de medio condicionado L-WRN

Para el medio de proliferación de las ISCs se requiere de Wnt, R-spondina y Nogina. En este trabajo se empleó el medio a partir del medio condicionado de la línea celular L-WRN (CRL-3276™) adaptando el protocolo de Miyoshi y Stappenbeck [93]. Las células fueron descongeladas y crecidas en medio de mantenimiento suplementado con antibióticos de selección: G418 250 mg/mL; Higromicina B 50 mg/mL. Para condicionar el medio, las células se subcultivaron en frascos T 150 sin antibióticos de selección. Cuando las células llegaron a confluencia se procedió a condicionar el medio de organoides. Para ello se lavaron los frascos con *Advanced* DMEM/F-12 y se agregaron 25 mL de medio a condicionar (*Advanced* DMEM/F-12, SFB 20 % (v/v), GlutaMAX 1X). El medio condicionado se recolectó cada 24 horas por 8 días y se mantuvo a 4°C . Al día 8 el medio condicionado fue filtrado y alícuotado en tubos cónicos de 50 mL. Se almacenaron a -20°C hasta su uso. Una vez descongelada la alícuota de medio condicionado se empleó durante 15 días.

4.2.4. Obtención de organoides de distintas secciones de intestino

4.2.4.1. Declaración ética y manejo de animales

Los protocolos de experimentación animal fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo (protocolo #002-21) y se realizaron de acuerdo con la ley nacional número 18.611 y a las pautas y regulaciones internacionales pertinentes sobre el bienestar de los animales de laboratorio. Además, se siguieron las pautas ARRIVE para llevar a cabo el presente estudio [94]. Los ratones transgénicos NFκB-RE-Luc (modelo # 10499, Taconic, Nueva York, EE. UU.) y los ratones BALB/cJ y C57B6 de tipo silvestre se criaron en la Unidad de Biotecnología de Animales de Laboratorio del Institut Pasteur de Montevideo en condiciones específicas libres de patógenos en jaulas ventiladas individualmente (IVC, 1285L, Tecniplast, Milán, Italia). Los animales fueron eutanasiados con CO₂ y se extrajeron biopsias intestinales para establecer cultivos de organoides y para extracción de ARN.

4.2.4.2. Cultivo de organoides

En todos los casos se emplearon ratones adultos de 6 a 8 semanas de edad, considerando incorporar tanto hembras como machos de cada cepa. Luego de la eutanasia con CO₂ se extrajo el intestino entero de cada animal cuidando de remover la mayor cantidad de tejido adiposo posible. De cada sección se cortó un trozo de 3 - 4 cm de largo, se procedió a lavar la luz de cada sección mediante un lavado con PBS suplementado con penicilina-estreptomicina 100 U/mL y 100 ug/mL, uno con hipoclorito al 0,3 % (v/v) y finalmente otro lavado con PBS. Luego se procedió a cortar los tejidos longitudinalmente y luego transversalmente en trozos de 0,5 cm. Los fragmentos se transfirieron a tubos cónicos de 50 mL y se lavaron con PBS frío. Todos los pasos siguientes se realizaron en hielo para mantener la viabilidad de las criptas intestinales. Se retiró el PBS frío y se adicionaron 20 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM, incubando por 20 min con agitación suave. Luego de eliminar el EDTA, los fragmentos se suspendieron en PBS con BSA 0,1 % (p/v) y se pipetearon hacia arriba y hacia abajo con una pipeta de 10 mL cinco veces para liberar las criptas. Se tomaron esos 5 mL y se transfirieron a un tubo rotulado como Fracción 1 y se repitió la extracción con PBS-BSA obteniendo otras dos fracciones. Luego se realizó otra incubación con EDTA 10 mM por 15 min y se colectaron las fracciones de la 4 a la 6. Se verificó el contenido de criptas de cada fracción por microscopía; las fracciones con criptas y sin vellosidades fueron agrupadas, se filtraron por

una malla de 70 μm y se centrifugaron a 200 x g durante 5 min a 4 °C. El *pellet* de criptas se resuspendió en matriz extracelular a razón de 500 criptas/30 μL de matriz. La suspensión cripta/matriz se sembró en una placa de múltiples pocillos de 12 (4 gotas de 30 μL por pocillo) y se incubó durante 10 min a 37 °C para que la matriz polimerice. Luego, se agregó 1 mL de medio de organoides por pocillo (*Advanced* DMEM/F12, GlutaMAX 1 % (v/v), penicilina-estreptomicina 100 U/mL-100 μg /mL, 50 % de medio condicionado L-WRN y 10 μM de Y-27632). El medio también se complementó con 10 μM de SB431542 (para los organoides del intestino delgado) o 10 nM de gastrina (para los organoides derivados del colon). Los organoides se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO_2 .

4.2.4.3. Mantenimiento

Para el mantenimiento, se renovó el medio cada 3 días con medio de organoides sin inhibidor Y-27632. Los organoides se amplificaron cada 4-7 días en una proporción de 1:2 para los organoides de colon y 1:3 para los organoides de intestino delgado. Para el subcultivo se aspiró el medio de cultivo se agregó 0.8 mL de PBS frío y se incubó la placa en hielo por 2 minutos para facilitar la despolimerización de la matriz. Las puntas de plástico fueron recubiertas con PBS - BSA 0,1 % (p/v) para evitar que los organoides se adhieran al plástico. Con la pipeta de 100-1000 μL con las puntas de plástico recubiertas con PBS - BSA 0,1 % (p/v), se resuspendieron las gotas de matriz y la suspensión PBS-organoides-matriz fue transferida a un tubo cónico de 15 mL. Se repitió el agregado de PBS frío a cada pocillo y pipeteando por toda la superficie para remover todos los organoides y transferirlos al tubo cónico. Se agregó PBS frío a cada tubo hasta 8 mL y los organoides fueron centrifugados a 230 x g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se retiró intentando aspirar toda la matriz extracelular pero cuidando de no aspirar organoides. En el caso de que quedaran muchos organoides en la fase de matriz, se procedió a lavar nuevamente con PBS frío y centrifugar. Luego, el *pellet* se resuspendió en 200 μL de PBS frío y se disgregaron los organoides pipeteando arriba y abajo 100 veces con una punta de plástico recubierta en PBS - BSA 0,1 % (p/v). Luego se agregaron 8 mL de PBS frío y se centrifugaron a 230 x g durante 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y los organoides disgregados fueron resuspendidos en la matriz extracelular previamente despolimerizada en baño de hielo. Se sembraron gotas de 30 μL para el mantenimiento y se incubó durante 10 min a 37 °C para que la matriz polimerice. Luego, se agregó medio de organoides como fue mencionado anteriormente y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO_2 .

4.2.4.4. Criopreservación y descongelado

Para la criopreservación se consideró generar al menos 3 criotubos de cada animal en pasaje bajo. Para ello a los organoides al día 3 o 4 de cultivo se les aspiró el medio de cultivo, se agregó PBS frío y se incubó la placa en hielo por 2 minutos para facilitar la despolimerización de la matriz. Las puntas de plástico fueron recubiertas con PBS - BSA 0,1 % (p/v) para evitar que los organoides se adhieran al plástico. Con la pipeta de 100-1000 μ L con las puntas de plástico pre-cubiertas, se resuspendieron las gotas de matriz y la suspensión PBS-organoides-matriz fue transferida a un tubo cónico de 15 mL. Se repitió el agregado de PBS frío a cada pocillo y pipeteando por toda la superficie para remover todos los organoides y transferirlos al tubo cónico. Se agregó PBS frío a cada tubo hasta 8 mL y los organoides fueron centrifugados a 230 x *g* durante 5 min a 4 °C. Estos lavados se repitieron hasta que no se detectó matriz remanente en el *pellet*. Se descartó el PBS y el *pellet* se resuspendió en el medio de congelación (SFB 90 %, DMSO 10 % (v/v), 10 μ M de Y-27632) considerando un mínimo de 4 gotas de organoides por criotubo. Los criotubos fueron almacenados a -80 °C utilizando una cámara de enfriamiento progresivo de 1 °C por minuto (Nalgene, Nueva York, EE. UU.) y a las 24 – 48 horas se transfirieron a nitrógeno líquido para su conservación.

El descongelado de organoides se llevó a cabo en forma rápida, para maximizar la supervivencia celular. Se retiró el criotubo del tanque de nitrógeno y se descongeló rápidamente en baño de agua a 37 °C por un máximo de 2-3 minutos. Posteriormente, se resuspendieron los organoides en 5-6 mL medio *Advanced* DMEM/F12 frío y fueron centrifugados por 5 minutos a 4 °C a 200 x *g*. Luego el *pellet* se resuspendió en la matriz previamente despolimerizada (en baño de hielo) y se sembraron gotas de 30 μ L. Luego de 10 min de incubación a 37 °C se procedió a agregar el medio completo de organoides.

Todos los ensayos se realizaron utilizando organoides en pasajes 4-15, en el día 3 luego del subcultivo, a menos que se especifique lo contrario.

4.2.5. Ensayo de formación de colonias y evaluación de parámetros morfológicos

Los organoides intestinales obtenidos fueron removidos de la matriz con PBS frío y disociados en células individuales utilizando TrypLE Express y se filtraron con un filtro celular de 50 μ m. Se procedió al recuento y se sembraron mil células individuales en 7 μ L de matriz por pocillo en una placa de 96 pocillos y se cultivaron en medio de organoides como se describió

anteriormente. Los organoides se visualizaron en los días 1, 4 y 8 del cultivo utilizando un microscopio invertido Olympus IX81 (Japón) con el objetivo 10x. Para el análisis se consideraron imágenes de seis pocillos por cada región intestinal en los días 4 y 8 después de la siembra. La capacidad de replicación se evaluó como el número de esferoides generados a partir de 1000 células epiteliales individuales sembradas, cuantificado en el día 4 del cultivo. Se midió la circularidad y el área de los organoides en los días 4 y 8 del cultivo mediante herramientas del programa Fiji [95]. En el día 8 del cultivo, se contó manualmente el número de gemaciones o *buds* por organoide. Todos los análisis de imágenes se realizaron con Fiji.

4.2.6. Extracción de ARN y análisis de expresión por PCR cuantitativa

El ARN total de los tejidos intestinales y los organoides (en el día 4 de cultivo) se purificó utilizando el kit de extracción total de ARN Monarch, según el protocolo del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, EE. UU.). La concentración de ARN en las muestras se determinó utilizando un espectrofotómetro DS-11Fx (DeNovix, Wilmington, EE. UU.). Para la transcripción reversa, se transcribieron 0,5 µg de ARN total utilizando la Transcriptasa Reversa M-MLV, según el protocolo del fabricante (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.). Se realizó la PCR cuantitativa en un termociclador Applied Biosystems QuantStudio™3 (Thermofisher Scientific, Waltham, EE. UU.), utilizando la sonda Universal SYBR Green FastStart (Roche, EE. UU.), 200 nM de cada *primer* específico (excepto los *primers* para la Cromogranina A, que se utilizaron a una concentración de 60 nM) y 1 µL de ADN copia (ADNc). Se utilizaron los siguientes parámetros de ciclos para todos los marcadores: 1 ciclo a 95 °C durante 4 min; 40 ciclos a 95 °C durante 10 s, 60 °C durante 20 s y 72 °C durante 30 s; 1 ciclo a 72 °C durante 5 min; análisis de curva de *melting* en un rango de temperatura de 95 °C a 60 °C. Los *primers* fueron sintetizados por IDT (Coralville, EE. UU.) y las secuencias se encuentran en la **Tabla 1**. El gen de la actina se utilizó como gen de referencia. Los niveles relativos de expresión génica se determinaron utilizando el método de la curva estándar. En cuanto a réplicas técnicas, los puntos de la curva estándar se realizaron por triplicado y las muestras desconocidas por duplicado. Por cada condición experimental se analizaron al menos dos réplicas biológicas (animales u organoides).

Tabla 1. *Primers* utilizados en experimentos de PCR cuantitativa

Gen	Forward primer (5'→3')	Primer reverso (5'→3')	Número de acceso Genbank
Cromogranina A	AGACTACAGACCCACTCCCG	AGATGACTTCCAGGACGCAC	NM_007693.2
Lgr5	TCTCCTACATCGCCTCTGCT	TTCCTCCGGAACCTGTCTCA	NM_010195
Lisozima	AACTACAACCGTGGAGACCG	TGCAATTGATCCCACAGGCA	NM_0.13590.4
Mucina 2	AAACTGCTCTCTGGACTGCC	TTGGTTGGTGTGCTGAGTGT	NM_023566.3
Vilina	ATTCCTTCAGACGCATGCCA	GCCCTCCCTTTTGAGTGTGA	NM_009509.2
β-actina	GCAGGAGTACGATGAGTCCG	ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	NM_007393.5
TNF-R1/ Tnfrsf1a	GATCCCCTGCCTGTCAAAGA	TCGCAAGGTCTGCATTGTCA	NM_011609.4
TNF-R2/ Tnfrsf1b	GATGCCAAGGTGCCTCATGT	TGGCTTCCGTGGGAAGAATC	NM_011610.3

4.2.7. Ensayo reportero para la activación de NF-κB en organoides intestinales

Los organoides se subcultivaron 1:2 y se sembraron en matriz (7 µL/pocillo) en placas de 96 pocillos con 0,15 mL de medio de organoides. En el día 4 de cultivo, se reemplazó el medio por un medio de ensayo (Advanced DMEM/F12 que contiene 1 % (v/v) de L-glutamina, 1 % (v/v) de penicilina/estreptomicina, 10 mM de HEPES y 1 % (v/v) de suplemento N2 y 1 % (v/v) de suplemento libre de suero B27) y se estimularon los organoides con diferentes concentraciones de estímulos proinflamatorios: 1-100 ng/mL de TNFα, 1-10 µg/mL de LPS, diluciones de 1/2 -1/500 de *Salmonella enterica* inactivada por calor (equivalente a 10⁸ UFC), 1-100 ng/mL de IL-1β. Cada condición se evaluó en triplicado. Después de 24 horas de incubación a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂, se retiró el medio, se añadieron 100 µL de solución de luciferina 1 mM a cada pocillo y se midió la actividad de luciferasa en un luminómetro (BMG Labtech, Reino Unido). Las unidades de luz arbitrarias de cada pocillo se normalizaron por la absorbancia a 570 nm obtenida a partir de un ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) para cada pocillo correspondiente. Para

ello, luego de la medición de luz se procedió a agregar 10 μ L por pocillo de una solución 5 mg/mL de MTT y se incubó por 3 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂. Se retiró el medio y se adicionaron 20 μ L de SDS 20 % (p/v) para disolver la matriz y se incubó por 1 hora a 37 °C. Finalmente se agregó 100 μ L de una solución 1:1 DMSO:isopropanol para solubilizar los cristales de formazán y se midió la absorbancia a 570 nm. Se utilizaron organoides no estimulados como controles negativos. La activación de NF- κ B se expresó como el cambio en la señal de luz normalizada respecto a la del grupo no estimulado.

4.2.8. Inmunodetección de la subunidad p65 por microscopía confocal

Los organoides de las regiones del colon y del yeyuno se sembraron en una placa de 6 pocillos múltiples (6 gotas de 20 μ L de matriz por pocillo) en medio de organoides. Después de 4 días de cultivo, se renovó el medio con medio de ensayo suplementado con TNF- α (50 ng/mL) y se incubó durante 3 horas adicionales. Luego, se retiró el medio y, de inmediato, la placa se colocó sobre hielo. Los organoides se retiraron de la matriz y se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % (v/v) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La permeabilización se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos con Tritón X-100 al 0,5 % (v/v) en PBS y luego se bloqueó con BSA al 2,5 % (p/v) en PBS durante 1 hora. Las muestras se incubaron con un anticuerpo primario policlonal de conejo Anti-NF- κ B-p65 (ab7970, Abcam, Cambridge, Reino Unido) (concentración final de 32 μ g/mL) y verde de metilo para teñir los núcleos (dilución 1:5000) en 2,5 % (p/v) de BSA, Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en PBS durante la noche a 4 °C. Después de la incubación, los organoides se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Waltham, EE. UU.) (dilución 1:1000) durante 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente. Los organoides se montaron en un portaobjetos utilizando el reactivo ProLong® Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Todas las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal láser Zeiss LSM 880 equipado con el objetivo 25X y láseres de 488 nm y 631 nm. Las imágenes se procesaron utilizando el software Fiji. La cuantificación de la translocación nuclear de NF- κ B se realizó utilizando la herramienta de Relación de Intensidad Núcleo/Citoplasma del programa Fiji. Este *plugin* calcula la proporción de la intensidad de señal en los núcleos y el citoplasma. Utilizando el canal de los núcleos se segmentan los mismo, y las mediciones se realizan en el canal del citoplasma (fluorescencia

del Alexa Fluor 488) después de haber corregido la intensidad del fondo, de forma de calcular luego qué proporción de la señal de p65 está en el citoplasma (C) y el núcleo (N) obteniendo la relación (relación N/C).

4.2.9. Inmunodetección de ki67 y Lisozima por microscopía confocal

Los organoides de colon y yeyuno se fijaron con una solución de PFA al 4 % (v/v) a temperatura ambiente por 30 minutos. La permeabilización se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos con Tritón X-100 al 0,5 % (v/v) en PBS y luego se bloqueó con BSA al 2,5 % (p/v) en PBS durante 2 horas. Las muestras se incubaron con un anticuerpo primario anti-Ki67 ab15580 (Abcam, Cambridge, Reino Unido; dilución 1:500) o anti-Lisozima A0099 (Dako, Santa Clara, EE. UU.; dilución 1:200) y con la sonda Hoechst 33342 (Invitrogen, Waltham, EE. UU.) para teñir los núcleos (dilución 1:1000) en buffer con 2,5 % (p/v) de BSA, Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en PBS durante la noche a 4 °C en cámara húmeda. Después de la incubación, los organoides se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Cy5 (Invitrogen, Waltham, EE. UU.; dilución 1:500) y con la sonda Phalloidin-Texas Red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.; dilución 1:100) durante 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente. Se empleó ProLong® Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) como medio de montaje. Las imágenes se adquirieron en el microscopio confocal Zeiss LSM 880 equipado con los objetivos 25X y 40X y los láseres 405, 561 nm y 631 nm. Las imágenes se procesaron utilizando el software Fiji [95].

4.2.10. Generación de organoides intestinales reporteros mediante edición genética por CRISPR/Cas9

Para la edición genética (*knock-in*) mediante la técnica de CRISPR/Cas9, es necesario contar con: 1) la endonucleasa Cas9, 2) el ARN guía simple hebra que es quien guía la endonucleasa al sitio de corte y, 3) el ADN molde que se desea insertar.

El sitio de inserción se determinó como el sitio de Rosa26, que es un sitio de inserción seguro para el genoma murino.

4.2.10.1. Metodología I: Incorporación de Cas9, guías y ADN molde mediante plásmidos

4.2.10.1.1. Plásmidos

De la empresa Addgene se adquirieron los plásmidos pR26-CMV const (número 12373) y pX330-sgR26 (número 12376) [96]. El plásmido pX330-sgR26 contiene la secuencia para expresar un ARN guía para el intrón 1 del locus Rosa26 murino (sgRNA AGGCGGATCACAAGCAATAA) junto al promotor U6. También contiene la secuencia para la expresión constitutiva de la endonucleasa Cas9 bajo el promotor de citomegalovirus (CMV) (**Figura 8a**). El plásmido pR26-CMVconst contiene dos regiones de homología con el sitio de corte para el locus Rosa26 de 794 y 811 pares de bases y un sitio de clonado múltiple para incorporar la secuencia de interés entre ambos brazos de homología. Ambos plásmidos fueron recibidos en agar; las bacterias se estriaron en Agar LB y posterior amplificación en caldo con incubación a 30 °C para minimizar eventos de recombinación. La purificación del ADN plasmídico se realizó con el kit NucleoBond Xtra Maxi Plus (MACHEREY-NAGEL, Düren, Alemania).

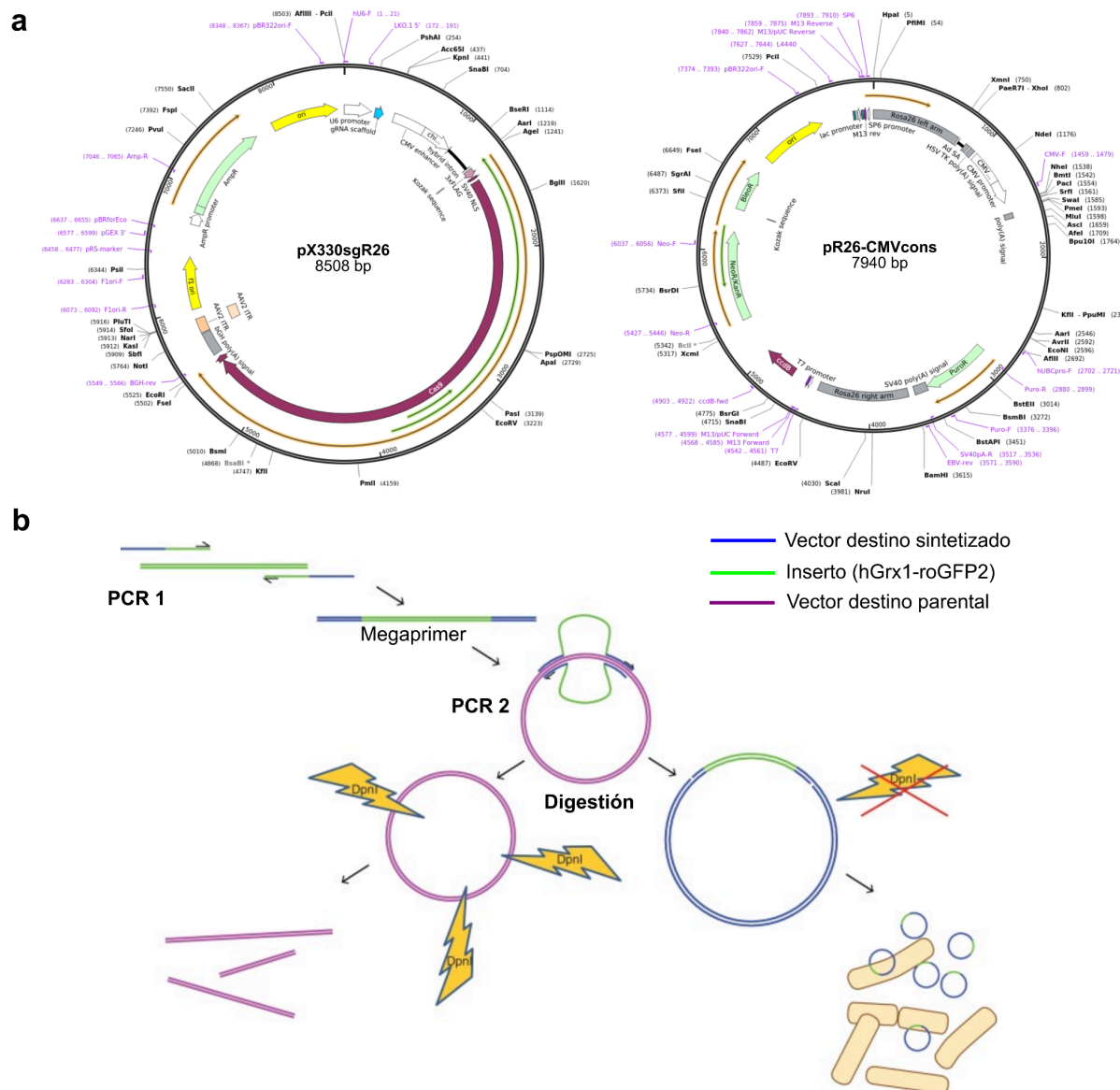


Figura 8. a) Mapas de los plásmidos pX330-sgR26 y pR26-CMVconst. Tomado de Addgene. **b)** Esquema de las etapas del clonado por RF-cloning.

4.2.10.1.2. RF-cloning

Para insertar el gen del sensor redox Grx1-roGFP2 en el vector pR26-CMVconst, se procedió a realizar un clonado libre de enzimas de restricción (*RF-cloning*) [97]. Para ello se diseñaron dos primers más largos que los convencionales que tienen una porción complementaria para los extremos del gen que se quiere insertar (**Figura 8b**, verde) y otra complementaria al sitio de clonado en el vector de destino (**Figura 8b**, azul). Estos primers se diseñaron utilizando la herramienta de <https://rf-cloning.org/> (**Tabla 2**). El producto resultante de esta primera PCR

contiene la secuencia del gen de interés flanqueado por las regiones complementarias al vector de destino del clonado, y sirve de *megaprimer* para la segunda PCR que utiliza como molde al vector de destino. Los primers utilizados para RF *cloning* se detallan en la **Tabla 2**. La reacción de PCR1 se realizó con la enzima ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) en un volumen final de 50 µL conteniendo: 10 µL de buffer High Fidelity 5X, 1 µL dNTPs 10 mM, 1,25 µL de cada primer (20µM), 10 pg de ADN molde y la cantidad necesaria de agua milliQ. El programa de ciclado utilizado fue de 30 segundos de desnaturalización a 98 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 10 segundos e hibridación a 72 °C por 30 segundos, y finalmente una extensión a 72 °C por 10 minutos. La formación del producto se evaluó corriendo un gel de agarosa al 1 % (p/v) en buffer TBE 0,5X a 90V por 1 hora, utilizando GoodView (SBS Genetech, Beijing, China) para teñir los ácidos nucleicos. La banda del producto se extrajo del gel y se purificó el ADN con el kit Gene JET Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante y el ADN purificado se cuantificó mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro para micro volúmenes (Nanodrop).

Tabla 2. *Primers* utilizados en experimentos de RF *cloning*. La porción azul es complementaria al vector de destino, la región en verde es complementaria al gen de hGrx1-roGFP2.

	Secuencia (5'→3')	Largo (bp)
Fwd	AGCTCGGTACCCGGGGATGCTAGCTCAAGAGTTTGTGAACTGC	43
Rev	CTGCAGGGCCCGGGCTTAATTATGGATCCTTACTTGTACAGCTCG	45

La reacción de PCR número 2, se realizó de la misma forma que la PCR1 pero utilizando 125 ng de megaprimer purificado y 35 ng del vector de destino (pR26-CMVconst). El protocolo de ciclado fue de una primera desnaturalización de 30 segundos a 98 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 10 segundos, hibridación a 68 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 4 minutos; y finalizando con una extensión de 10 min a 72 °C.

El producto de la PCR2 fue digerido con la enzima DpnI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) para eliminar el ADN metilado correspondiente al vector molde parental. Para ello, se incubó el producto de PCR2 con 0,5 UI de enzima por cada µL de producto de PCR2. La digestión se realizó por 90 minutos a 37 °C, seguido de la inactivación de la enzima por 20 minutos a 80 °C. Inmediatamente se procedió a transformar bacterias quimiocompetentes *E. coli* DH5α (Invitrogen, Waltham, EE. UU.) con el producto de la digestión.

4.2.10.1.3. Prueba de transfección en células murinas NIH-3T3

La línea celular murina NIH-3T3 se sembró en placas de 48 pocillos a una densidad de $3,5 \times 10^4$ células por pocillo, de modo que a las 24 horas alcanzaran una confluencia del 85 %.

Se empleó el reactivo Lipofectamine 2000® para la transfección y se probaron diferentes cantidades de plásmido (1; 0,5; o 0,25 µg de ADN total) y diferentes relaciones de plásmido pR26-CMVconst : pX330-sgR26 (50:50, 25:75 y 75:25). El ADN y el reactivo transfectante se diluyeron en medio OptiMEM® Reduced Serum Medium, se mezclaron (en una relación 1:2 y 1:3) e incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se renovó el medio al cultivo de células y se adicionó la mezcla ADN-lípido. Las células se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ y el medio se renovó 6 horas post-transfección. Como control de transfección se utilizó un plásmido de expresión constitutiva de la proteína reportera Grx1-roGFP2, y condiciones sin transfectar y con Lipofectamina pero sin ADN. A las 48 horas post transfección las células se tripsinizaron, se resuspendieron en medio de cultivo y se analizó el porcentaje de células GFP positivas por citometría de flujo en un citómetro Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.).

Como método alternativo a la Lipofectamina, se utilizó el nucleofector 2b (Lonza, Basilea, Suiza) para la incorporación de ADN a las células NIH-3T3. Este método es similar a la electroporación pero tiene unos parámetros eléctricos optimizados junto con *buffers* diseñados para determinados tipos celulares. Permite la incorporación de material genético al citoplasma y al núcleo. Para la nucleofección las células NIH-3T3 se sembraron en botellas de 75 cm² hasta llegar a un 70 % de confluencia. Luego se tripsinizaron y se utilizaron 1×10^6 células por reacción. Las células se centrifugaron a $250 \times g$ por 5 minutos, el *pellet* resultante se resuspendió en 100 µL de la Solución V y se adicionó 1 µg de ADN total (1 µg de ADN de plásmido control o 0,5 µg de cada plásmido para CRISPR) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó el programa T0-20. Inmediatamente luego de la nucleofección las células se sembraron en placas de 12 pocillos y se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ por 48 horas. Luego se analizó el porcentaje de células GFP positivas como se describió anteriormente.

4.2.10.2. Metodología II: Incorporación de RNPs y ADN molde

Otra forma de incorporar la endonucleasa y la guía de ARN es adicionarlas directamente como ribonucleoproteína (RNP). Para ello se debe sintetizar la guía de ARN simple hebra y generar la RNP *in vitro* previo a la transfección junto con el ADN molde.

4.2.10.2.1. Selección de guías para el locus Rosa26

Los ARN guías se seleccionaron empleando la herramienta web CHOPCHOP [98] que permite identificar las secuencias guía para un locus determinado. En este caso, se solicitaron las guías para el locus de Rosa26 y se seleccionaron 3 de acuerdo a la eficiencia de corte y la baja probabilidad de cortes *off-targets* (fuera del sitio blanco). Una vez seleccionadas, las guías se solicitaron a la empresa Synthego. Las secuencias complementarias al sitio de corte de las sgRNAs se muestran en la **Tabla 3**.

Guía	Secuencia	Contenido de GC (%)	Eficiencia (%)	Hebra	Off-targets
1	ACCGGCCAAUAAGUGUGGGG	60	66,82	-	0,0,0,0
2	GCCAAUCAGCGACGAGACGU	60	60,33	-	0,0,0,0
3	GGAGUCGUUUUACCCGCCGC	65	57,85	+	0,0,0,0

Tabla 3. Secuencias de sgRNA solicitadas. Los datos de contenido de GC %, eficiencia de corte, hebra que hibrida y off-targets se extrajeron de la herramienta CHOPCHOP. Los off-targets se calculan como la cantidad de secuencias que se encuentran con 0, 1, 2, o 3 mismatches respecto a la secuencia guía.

4.2.10.2.2. Diseño de plásmidos para ADN molde

Para el diseño del plásmido con ADN molde se procedió a solicitar el clonado de los brazos de homología para el sitio de corte de cada una de las guías solicitadas. Se partió del plásmido pcDNA3.1_hGrx1-roGFP2 y se le incorporó a ambos lados del gen de interés los brazos de homología de 500-600 pares de bases. También se incorporaron las guías y los sitios de corte en los extremos del inserto, de manera de que la RNP fuera capaz de cortar el inserto [99].

4.2.10.2.3. Optimización del protocolo de nucleofección en organoides

Para la puesta a punto de la transfección de organoides se empleó el kit Primary P3 (Lonza, Basilea, Suiza) y un plásmido control pmaxGFP que provee el mismo kit. Los organoides al día tres luego del subcultivo se removieron de la matriz, se lavaron con PBS y se incubaron con 1 mL de solución TrypLE suplementada con el inhibidor Y-27632 (10 μ M). Luego de 5-10 minutos la suspensión celular se filtró mediante una malla de 30 μ m. Se utilizaron 2 x 10⁵ células por cubeta resuspendidas en 100 μ L de solución P3 y 2 μ g de plásmido control. En este caso se empleó el 4D-Nucleofector (Lonza, Basilea, Suiza) y se probaron los programas DS138 y EA125. Inmediatamente luego de la electroporación, las células se resuspendieron en matriz y se sembraron en gotas de 40 μ L en una placa de 24 pocillos. Luego de 10 minutos a 37 °C para la polimerización de la matriz, se adicionó medio de expansión completo con 10 μ M del

inhibidor Y-27632. Como control se utilizó una condición sin plásmido. A las 72 horas se analizó el porcentaje de células GFP positivas por citometría de flujo y se tomaron fotos en el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81.

4.2.10.2.4. Nucleofección en organoides con RNPs y ADN molde

Para la nucleofección se emplearon las guías diseñadas y la endonucleasa EnGen Spy Cas9 NLS (New England Biolabs, Ipswich, EE. UU.) en relación 1:2 o 1:5 (Cas9:ARN guía). Por cada reacción se resuspendieron la endonucleasa y el ARN guía en la solución P3 del kit Primary P3 en un volumen final de 12,5 μ L. Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente para formar las RNPs. Posteriormente se agregó a cada cubeta (formato strip de 8 cubetas 20 μ L cada una) 12,5 μ L de RNP y 12,5 μ L de la suspensión celular (2×10^5 células) junto con 2 μ g de plásmido molde correspondiente. Se empleó el protocolo EA125 en el 4D-nucleofector. Como control se agregó un control con Cas9, plásmido molde pero sin ARN guía, y un control sin ADN ni RNP. Inmediatamente luego de la electroporación, las células se resuspendieron en matriz y se sembraron gotas de 40 μ L en una placa de 24 pocillos. Luego de los 10 minutos a 37 °C para la polimerización de la matriz, se adicionó medio de expansión completo con 10 μ M del inhibidor Y-27632. La señal de GFP se detectó a las 72 horas por microscopía de epifluorescencia.

Simultáneamente se comprobó *in vitro* la capacidad de las RNPs formadas con las tres ARN guías diseñadas de cortar los plásmidos molde. Para ello, se generaron las RNPs en un tubo de PCR con 3 μ L de buffer NEB 3.1r, 60 nM de guía, 60 nM de Cas9 y la cantidad suficiente de agua milliQ para llegar a 27 μ L. La mezcla se incubó 15 minutos a 25 °C y posteriormente se agregaron 30 nM de ADN molde (3 μ L). La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Luego se agregó 1 μ L de proteinasa K por muestra y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora. La reacción se verificó corriendo un gel de agarosa al 1 % (p/v) a 90 V por 1 hora.

4.3. Resultados

4.3.1. Obtención y caracterización del tamaño, morfología y capacidad replicativa de los organoides intestinales murinos NF- κ B-RE-luc

Se establecieron organoides intestinales a partir de las criptas obtenidas del intestino delgado y grueso de los ratones reporteros NF- κ B-RE-luc. Se realizaron 17 cultivos de organoides diferentes empleando intestinos de hembras y machos adultos de acuerdo al protocolo descrito en Métodos. En la **Tabla 4** se observa la cantidad de organoides de las distintas secciones que se obtuvieron. Si bien se utilizó la misma cantidad de material (secciones de 3-4 cm de largo), la sección que presentó mayor dificultad para que prosperara el cultivo de criptas fue el íleon. La imposibilidad de obtener cultivos viables se debió en primer caso a la contaminación de los cultivos, y en segundo lugar al escaso crecimiento de las criptas sembradas.

Tabla 4. Número de cultivos de organoides NF- κ B-RE-luc obtenidos a partir de distintas secciones de intestino de distintos animales.

<i>Tejido</i>	<i>Número total de cultivos</i>	<i>Sexo animales</i>	
	<i>viables</i>	<i>Machos</i>	<i>Hembras</i>
Duodeno	13	8	5
Yeyuno	10	4	6
Íleon	5	2	3
Colon	9	4	5

Después de 24 horas de cultivo, las criptas se cerraron, dando lugar a una estructura celular esférica (esferoide) (**Figura 9, Día 1**). Para el cuarto día de cultivo, los esferoides aumentaron en tamaño y complejidad, dando como resultado la típica arquitectura tridimensional con un lumen central encerrado por un epitelio polarizado simple y la cara basal de las células orientada hacia el exterior. Los organoides derivados del intestino delgado mostraron múltiples nuevas estructuras semejantes a criptas o gemaciones que emergen desde el centro hacia la matriz circundante, mientras que los organoides derivados del colon mostraron principalmente una forma esférica simétrica (**Figura 9, Día 4**).

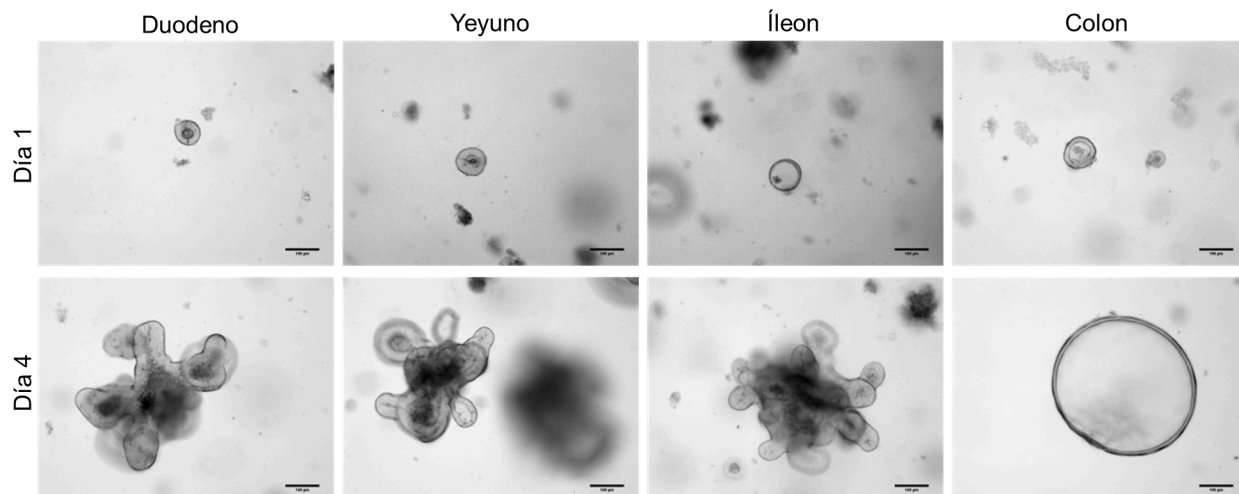


Figura 9. Cultivo de organoides intestinales reporteros de la actividad de NF- κ B. Los organoides intestinales se obtuvieron a partir del cultivo de criptas aisladas de las diferentes secciones de intestino. Imágenes representativas de microscopía de campo claro para los organoides al día 1 y 4 de cultivo. Escala = 100 μ m.

Para comparar el crecimiento, tamaño y la forma de los organoides obtenidos de distintas partes del intestino, se evaluó la formación de nuevos organoides a partir de la disgregación de organoides en una suspensión de célula única (**Figura 10**). La cantidad de organoides obtenidos tras la siembra de 1000 células epiteliales individuales por pozo se evaluó al día 4 post-siembra. Este parámetro estuvo entre $11,33 \pm 9,15$ y $7,35 \pm 4,20$ pero no se hallaron diferencias significativas entre las distintas regiones del intestino en la capacidad de generar organoides (**Figura 10a**). En cuanto a las características de crecimiento, los organoides sembrados a partir de una suspensión celular tomaron más días para aumentar su tamaño respecto al crecimiento de organoides a partir de criptas. Al día 8 de cultivo, todos los organoides aumentaron significativamente su área comparado con el día 4 (**Figura 10b**). En los organoides derivados del intestino delgado, se detectó un mayor número de gemaciones o *buds* por organoide, respecto a los organoides de colon (**Figura 10c**). Los organoides derivados de yeyuno fueron los que presentaron un mayor porcentaje de organoides con *buds* ($55,02 \pm 5,76$ %) mientras que en el caso de los de colon sólo presentaron alguna gemación el $26,25 \pm 7,86$ % (* $P < 0,05$). Por el contrario, los organoides de colon presentaron un mayor porcentaje de organoides esféricos sin gemaciones ($49,73 \pm 2,82$ %) mientras que para los organoides de yeyuno este porcentaje fue significativamente menor ($29,12 \pm 3,82$ %, # $P < 0,05$). La morfología circular de los organoides también se correspondió con estos resultados. En los organoides derivados del intestino delgado, se detectó una disminución en la circularidad de los

misimos al día 8 respecto al día 4. Sin embargo, esto no se observó en los colonoides que mantuvieron un alto porcentaje de organoides con morfología esférica (**Figura 10d**).

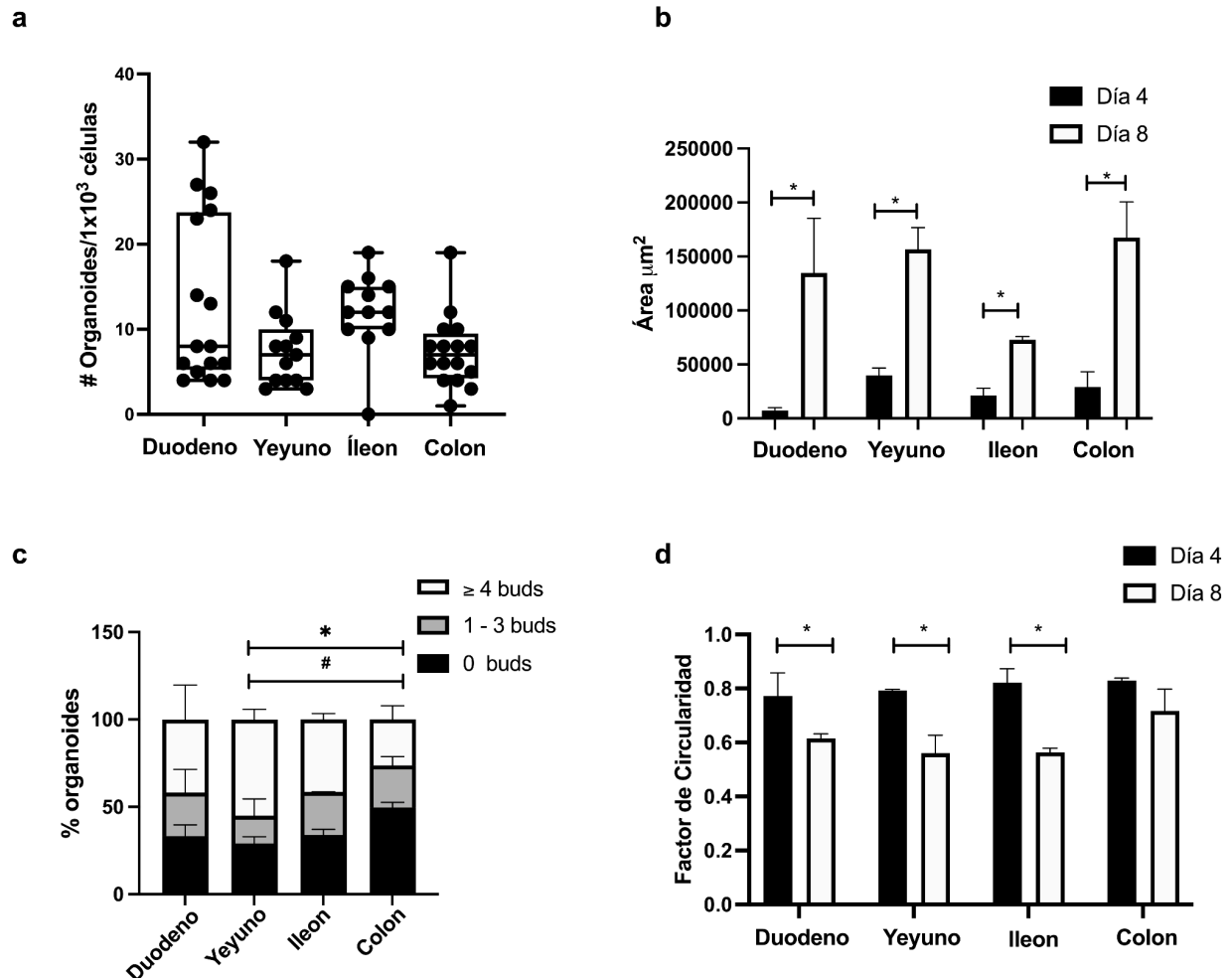


Figura 10. Caracterización del crecimiento de los organoides de distintas secciones de intestino. **a)** Capacidad replicativa de los organoides expresada como la cantidad de organoides formados al día 4 de cultivo a partir de 1000 células epiteliales individuales sembradas. **b)** Tamaño de los organoides medido al día 4 y 8 de cultivo; test-t, $*p < 0,05$. **c)** Porcentaje de organoides con más de 4, con 1 a 3 o sin buds se determinó de forma manual al día 8 de cultivo; ANOVA de una vía con post-test de Dunnett, $*p < 0,05$, diferencias entre el porcentaje de organoides sin buds (#) y entre el porcentaje de organoides con más de 4 buds (*). **d)** Factor de circularidad de organoides medido al día 4 y 8 de cultivo mediante el programa Fiji. Un valor de 1 representa un círculo perfecto, Test-t, $*p < 0,05$.

4.3.2. Caracterización de las poblaciones celulares intestinales

La caracterización de la población de células epiteliales presentes en los organoides se llevó a cabo mediante el análisis cuantitativo de la expresión de ARNm en organoides y muestras de tejido intestinal. Se evaluaron cinco genes específicos representativos de los principales tipos de células epiteliales intestinales: Lgr5 (ISCs), Lisozima (células de Paneth), Vilina (enterocitos), Cromogranina A (células enteroendocrinas) y Mucina 2 (células caliciformes). Como se muestra en la **Figura 11**, el patrón de expresión de Vilina, Cromogranina A y Lisozima fue similar entre el tejido y los organoides de la misma región intestinal. Lisozima no pudo detectarse en muestras de tejidos ni organoides derivados del colon, ya que las células de Paneth no están presentes en esta región intestinal. La expresión de Mucina 2 se redujo en los organoides derivados del colon en comparación con el mismo tejido ($P < 0,05$). Cabe destacar que, excepto para el íleon, los niveles de Lgr5 fueron mayores en los organoides en comparación con el tejido correspondiente ($P < 0,05$).

Dado que el medio de expansión promueve la proliferación de las células madres, se procedió a evaluar la presencia de las poblaciones celulares en organoides de intestino delgado y colon diferenciados por 36 h. En la **Figura 11b** se observa que en las condiciones de diferenciación, el marcador de ISCs (Lgr5) disminuye en las dos secciones analizadas. Por otro lado, se detectan aumentos en la expresión de marcadores de diferenciación como lisozima, mucina y cromogranina A en los organoides del intestino delgado.

La presencia de células de Paneth en los organoides derivados del intestino delgado se corroboró a nivel de proteínas mediante la inmunodetección de Lisozima, mientras que se encontraron células en proliferación activa en ambos tipos de organoide, según lo indicado por la presencia de células positivas para Ki67 (**Figura 11c**).

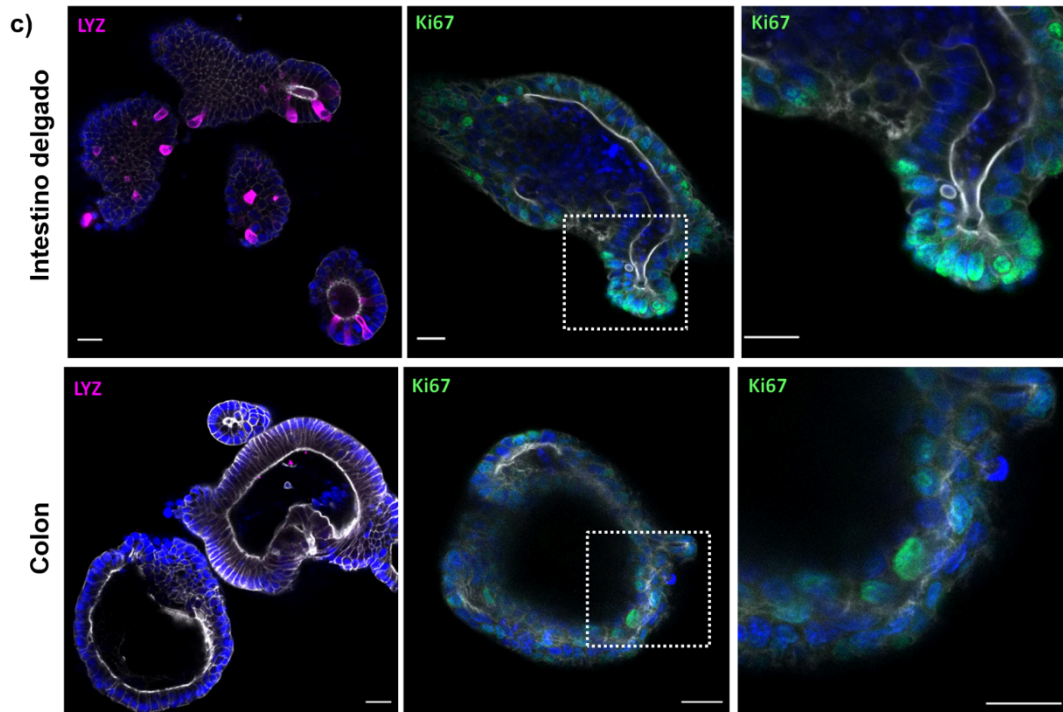
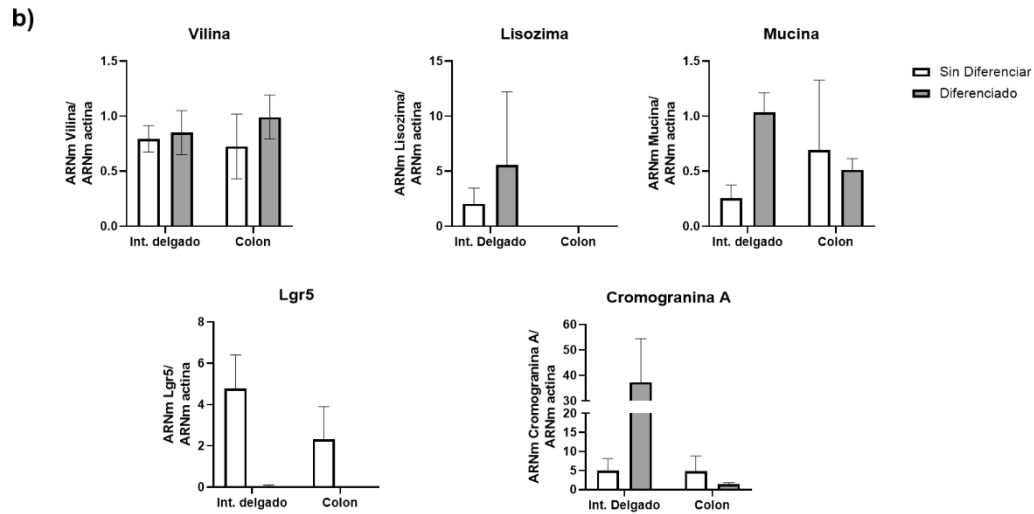
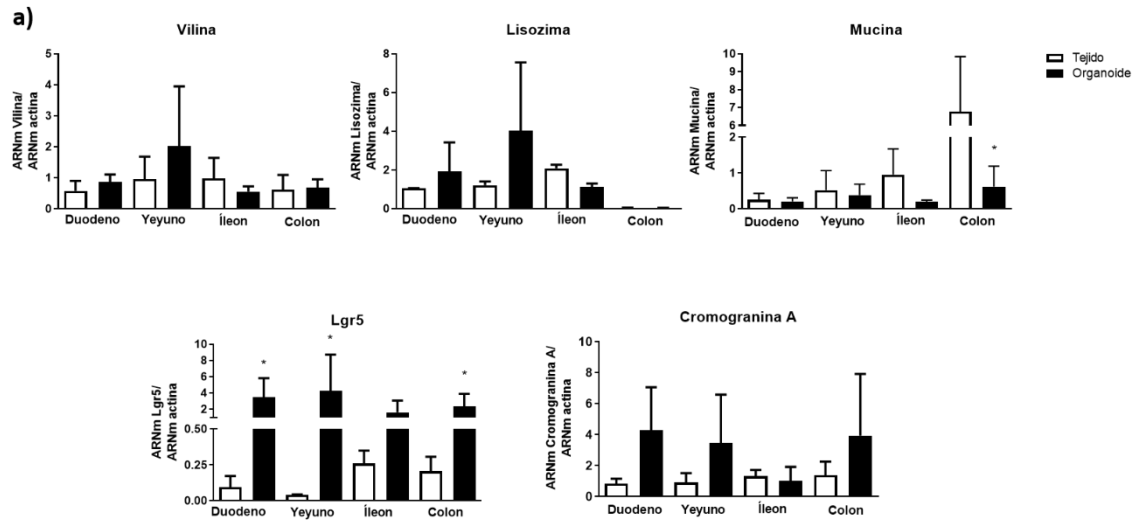


Figura 11. Marcadores específicos de poblaciones intestinales. **a)** La presencia de los principales tipos celulares intestinales se analizó por qPCR: Lgr5 para ISCs, Vilina para enterocitos, Lisozima para células de Paneth, Mucina 2 para células caliciformes y Cromogranina A para células enteroendócrinas. Los niveles de expresión de ARNm para cada marcador se normalizaron con la expresión de actina. Se representa la media $\pm$ SD de dos (tejidos) o tres (organoides) muestras independientes; Test-t, * $p < 0,05$. **b)** Expresión de los marcadores de los distintos tipos celulares normalizados con respecto al gen de Actina en muestras de organoides de intestino delgado y colon en medio de expansión (barras blancas) y medio de diferenciación (barras grises). **c)** Detección de células de Paneth (positivas para Lisozima, LYZ, en magenta), y células proliferativas (ki67 positivas, en verde) en organoides derivados de intestino delgado y colon por inmunofluorescencia. Núcleos en azul y Actina en blanco. Escala = 20 μ m.

4.3.3. Caracterización de la actividad reportera

Continuando la caracterización del modelo, también se evaluó la respuesta de los organoides reporteros derivados del duodeno, yeyuno, íleon y colon ante el TNF- α . La sensibilidad de la respuesta del reportero varió entre las regiones intestinales y, dentro de la misma región, entre diferentes cultivos (**Figura 12a, b**). Los organoides derivados del íleon y del yeyuno fueron los más sensibles al estímulo, mostrando un aumento significativo en la señal del reportero con concentraciones iguales o superiores a 1 y 2,5 ng/mL de TNF- α , respectivamente. Por otro lado, no fue posible detectar ninguna señal del reportero en los organoides de colon. Los organoides obtenidos del duodeno produjeron una respuesta detectable de luciferasa sólo a concentraciones más altas de TNF- α (a 10 y 100 ng/mL) (**Figura 12c**).

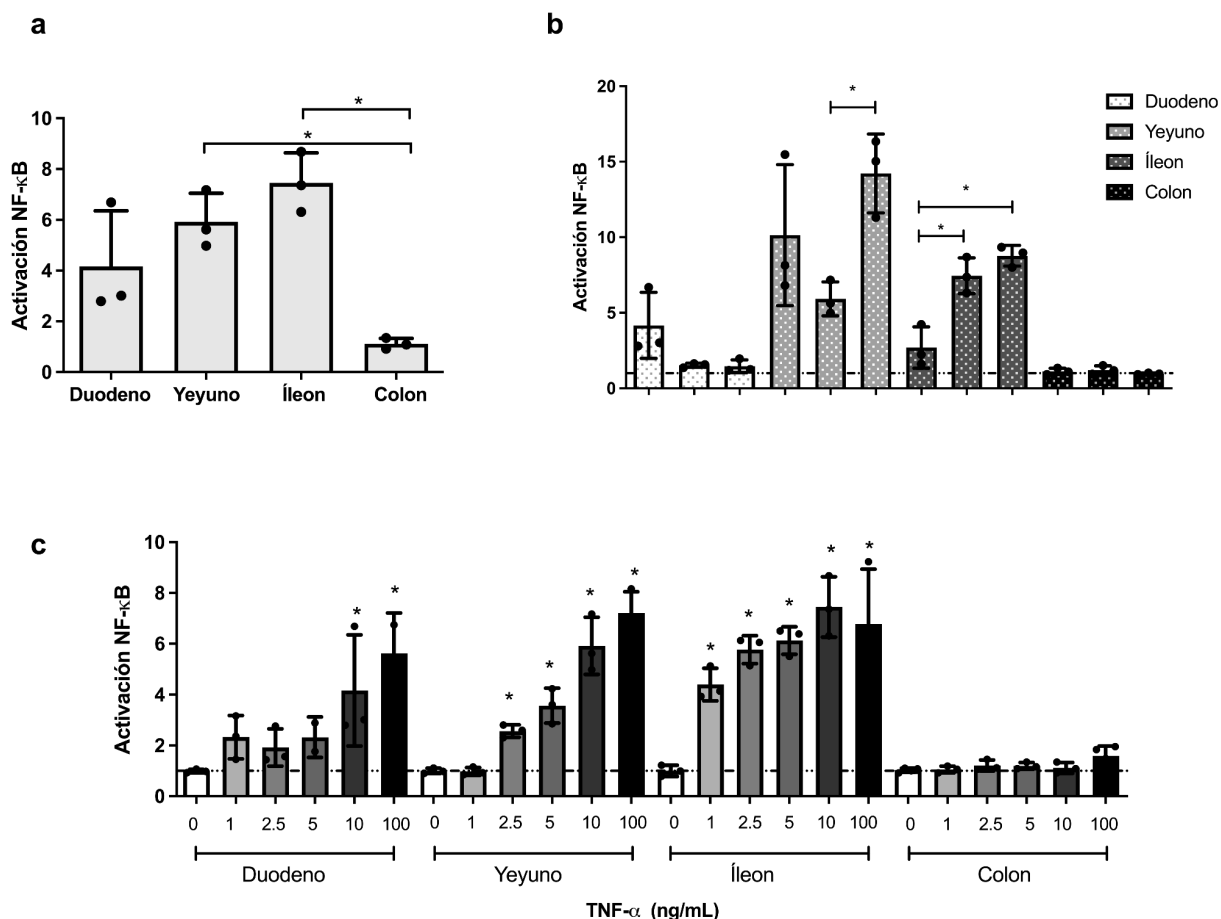


Figura 12. Evaluación de la activación de NF-κB por TNF-α en organoides reporteros NF-κB-RE-luc. Los organoides se sembraron y al tercer día de cultivo se incubaron con TNF-α por 24 h. La activación de NF-κB se determinó por detección de la actividad luciferasa y se normalizaron las unidades relativas de luz de los organoides estimulados con respecto a la señal de los organoides sin estimular. **a)** Comparación de la respuesta reportera de los organoides derivados de diferentes secciones intestinales tras una estimulación con 10 ng/mL de TNF-α. Todos los organoides derivados del mismo animal. **b)** Organoides de tres animales diferentes y sus secciones correspondientes se estimularon con TNF-α 10 ng/mL. **c)** Respuesta reportera de las distintas secciones del intestino a concentraciones crecientes de TNF-α. Los datos se presentan como la Media ± SD de triplicados; ANOVA de una vía con post-test de Dunnett, *p< 0,05.

La diferencia en la sensibilidad de respuesta al estímulo de TNF-α se evaluó determinando la concentración de TNF-α que proporciona la mitad de la respuesta máxima (valores de EC50) para los organoides de diferentes regiones (**Tabla 5**).

Parámetro	Organoides derivados de		
	Duodeno	Yeyuno	Íleon
EC50 (ng/mL)	12,11	3,66	0,12
IC95 % (ng/mL)	1,64 - 8,16	0,98 - 14,9	ND
R ²	0,54	0,92	0,47

Tabla 5. Parámetros de ajuste de la curva de respuesta a la concentración de TNF- α de organoides derivados de diferentes regiones intestinales. Se indica la concentración efectiva 50 (EC50) para TNF- α , el intervalo de confianza del 95 % (IC95 %) correspondiente y el coeficiente de determinación (R²) de la curva para cada tipo de organoide. Los datos fueron obtenidos a partir de triplicados de un experimento representativo.

Con respecto a la estabilidad del sistema reportero en el tiempo, se evaluó la actividad del reportero de NF- κ B en organoides de yeyuno con diferentes concentraciones de TNF- α en diferentes pasajes. En la **Tabla 6** se observa que la EC50 para los organoides de yeyuno fue muy similar en todos los pasajes, lo que permite una actividad reportera estable al menos durante 16 pasajes. A pesar de esto, se definió al pasaje 12 como el máximo número de pasajes para los demás ensayos.

Parámetro	Número de pasaje			
	9	12	13	16
EC50 (ng/mL)	4,86	3,81	3,77	3,16
IC95 % (ng/mL)	2,42–9,75	0,98–14,9	1,37–10,35	0,78–12,76

Tabla 6. Estabilidad de la actividad reportera de los organoides de yeyuno. Se indica la concentración efectiva 50 (EC50) para TNF- α y el intervalo de confianza del 95 % (IC95 %) correspondiente de la curva para cada pasaje. Los datos fueron obtenidos a partir de triplicados de un experimento representativo.

Para verificar que la medida del gen reportero se correlaciona con la funcionalidad de la vía de señalización de NF- κ B, fue evaluada de manera directa mediante la comparación de la translocación nuclear inducida por TNF- α de NF- κ B en organoides derivados del yeyuno y del colon. Los organoides fueron estimulados con 50 ng/mL de TNF- α durante 3 horas, y la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B fue analizada mediante microscopía confocal (**Figura 13**). Las imágenes muestran que en los organoides estimulados con TNF- α , la

señal de p65 se distribuye de manera más homogénea entre el núcleo y el citoplasma, mientras que en los controles no estimulados, la señal de p65 predomina en el citoplasma, siendo más evidente la presencia de núcleos no marcados (**Figura 13a**). Estos hallazgos sugieren que el TNF- α induce la translocación de la subunidad p65 al núcleo, mientras que en células no estimuladas, NF- κ B se detecta principalmente en el citoplasma. La translocación nuclear se cuantificó como la relación entre la intensidad de la señal de p65 del núcleo y el citoplasma (relación N/C). En ambos tipos de organoides, derivados del yeyuno y del colon, la relación N/C aumentó ($p < 0,05$) en los organoides estimulados con TNF- α en comparación con las condiciones no estimuladas, indicando la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B, un paso clave en el desempeño del ensayo de reportero (**Figura 13b, c**). Estos resultados confirmaron la presencia de una vía de señalización funcional de NF- κ B en los organoides derivados tanto del yeyuno como del colon. Por lo tanto, la falta de actividad del reportero en los organoides de colon no estaría asociada con una alteración de esta vía de señalización.

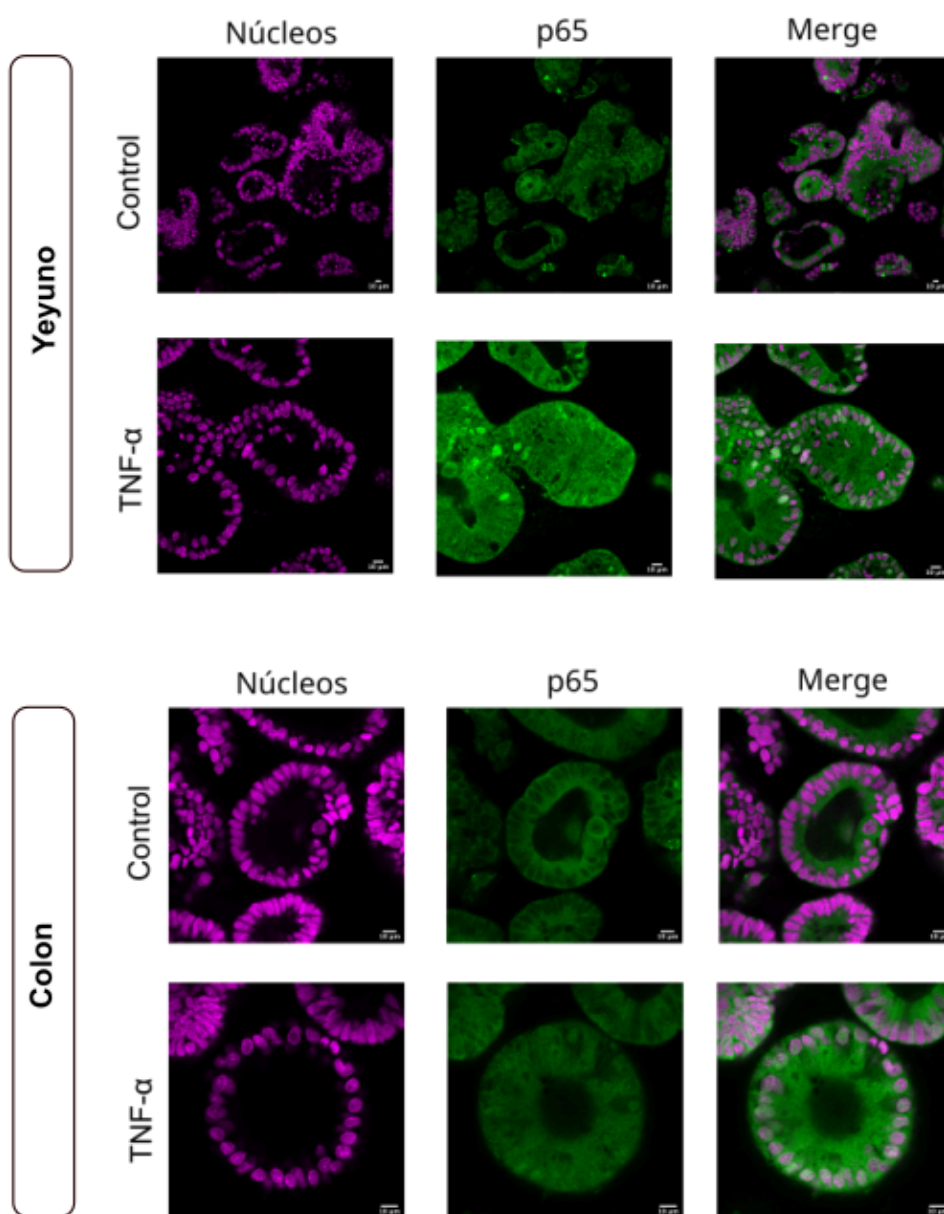
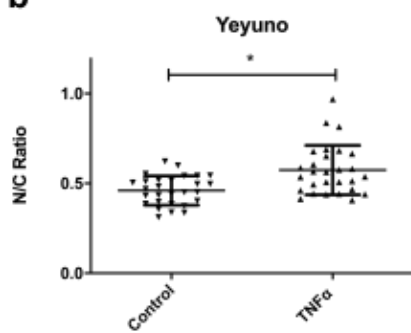
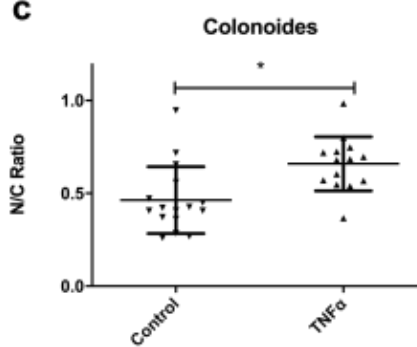
a**b****c**

Figura 13. Análisis de translocación nuclear de p65. (a) Organoides derivados de yeyuno y colon fueron estimulados con 50 ng/mL de TNF- α durante 3 h. Como control se utilizaron organoides sin estimular. La subunidad p65 del factor NF- κ B fue detectada con un anticuerpo anti-p65 (verde) y los núcleos fueron teñidos con verde de metilo (magenta). Las imágenes se tomaron en el microscopio confocal y se analizaron para cuantificar la translocación nuclear (b, c) midiendo la relación de intensidad de señal de p65 en núcleo y citoplasma (ratio N/C). Escala = 10 μ m. Test-t, *p< 0,05.

Los organoides obtenidos de una región intestinal con actividad reportera frente a TNF- α (yeyuno) y sin actividad reportera (colon) fueron evaluados más a fondo para determinar la presencia de los receptores de TNF- α 1 y 2 (TNF-R1 y TNF-R2). Ambos tipos de organoides intestinales expresan ARNm de TNF-R1 y TNF-R2 (**Figura 14**), lo que sugiere que ambos organoides tienen la capacidad de unirse al TNF- α y responder a este estímulo.

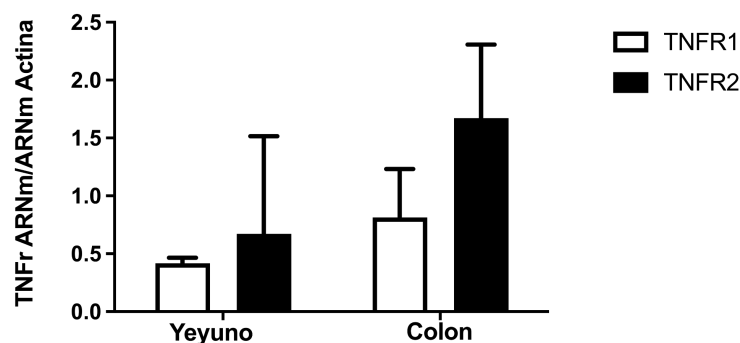


Figura 14. Detección de la expresión de receptores de TNF- α por qPCR. Los organoides de colon y yeyuno expresan ARNm de los receptores para TNF- α 1 y 2. Los valores de expresión se normalizaron con la expresión de actina.

Además del TNF- α , el epitelio intestinal está expuesto frecuentemente a otros estímulos inflamatorios. Por lo tanto, se procedió a evaluar la capacidad de los organoides de intestino delgado y grueso para responder a otros tres compuestos inductores de inflamación intestinal bien conocidos: el lipopolisacárido (LPS), un extracto de *Salmonella enterica* inactivado por calor [100] y la interleuquina 1 beta (IL-1 β). Ninguno de ellos indujo una respuesta detectable a través del gen reportero NF- κ B-RE-Luc en los organoides, independientemente de la región intestinal analizada (**Figura 15**).

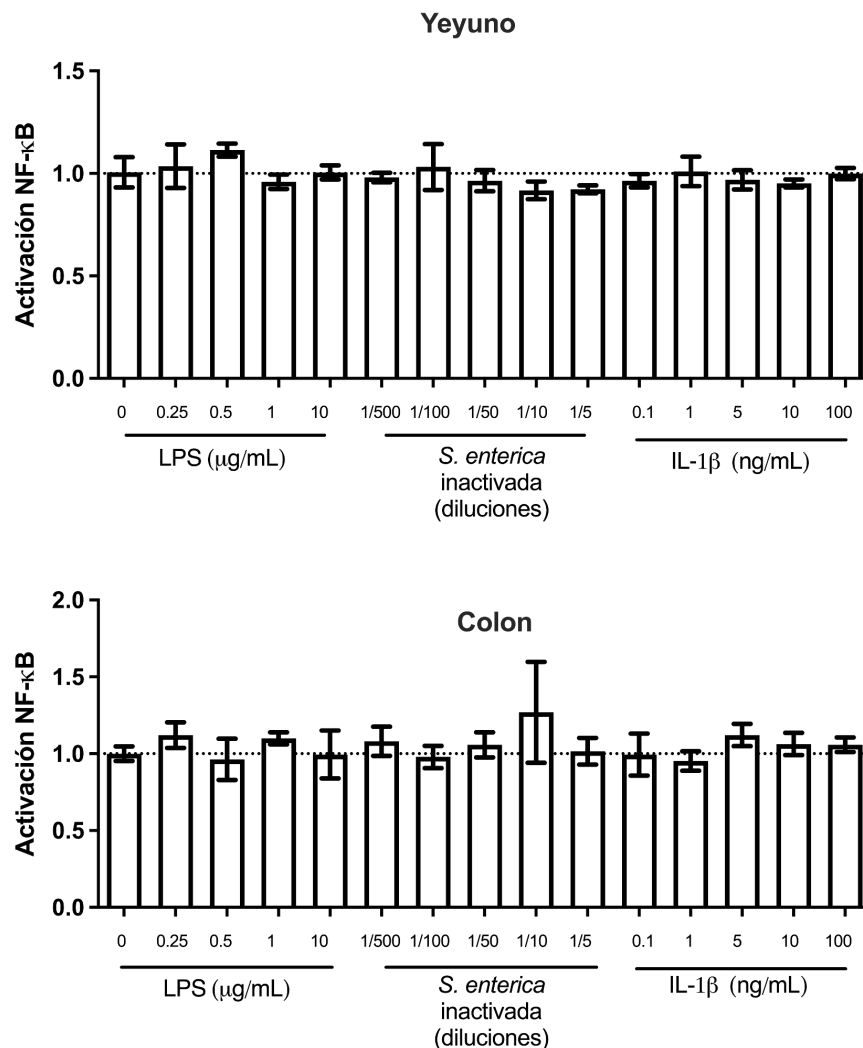


Figura 15. Evaluación de la capacidad reportera de los organoides NF-κB-RE-luc con diferentes estímulos pro-inflamatorios. Los organoides derivados de yeyuno y colon se estimularon por 24 h con diferentes concentraciones de LPS, IL-1β y una solución de *Salmonella enterica* inactivada por calor. La activación de NF-κB se calculó relativizando las unidades relativas de luz de los organoides estimulados con respecto a la señal de los organoides sin estimular. Los datos se expresan como la media ± SD de los triplicados de un experimento representativo.

4.3.4. Generación de organoides reporteros mediante CRISPR/Cas

Para la generación de organoides intestinales reporteros mediante la técnica de edición genética CRISPR/Cas9, primero se optó por un abordaje que incluía la incorporación de la endonucleasa y el ARN guía en forma de vector, junto con otro vector conteniendo el ADN

molde para la inserción del gen de interés: Grx1-roGFP2. Para ello se adquirió un plásmido que permitía la expresión constitutiva de Cas9 de *S. pyogenes* y el ARN guía para que la endonucleasa corte en el intrón 1 del locus Rosa26 del genoma murino (pX330-sgR26); mientras que el otro plásmido contenía las secuencias de homología al sitio de corte establecido (pR26-CMVconst) [96]. Para insertar el gen de interés entre estos brazos de homología se procedió a realizar un clonado sin enzimas de restricción. A partir del plásmido pcDNA3.1_hGrx1-roGFP2, se diseñaron los primers capaces de generar un producto de PCR que incluyera el gen de interés y extremos que sean complementarios al sitio de inserción en el vector de destino (pR26-CMVconst). Con esta PCR, se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado (1185 pares de bases) (**Figura 16**). Este producto fue purificado a partir del gel y utilizado como *megaprimer* para la segunda PCR que permite la incorporación del inserto en el vector de destino. Si bien esto fue posible optimizando los parámetros de la PCR, nunca se lograron transformar bacterias con el producto de la PCR2, por lo que se decidió tercerizar el subclonado del gen de interés en el vector pR26-CMVconst a una empresa (Genscript, Nueva Jersey, EE.UU).

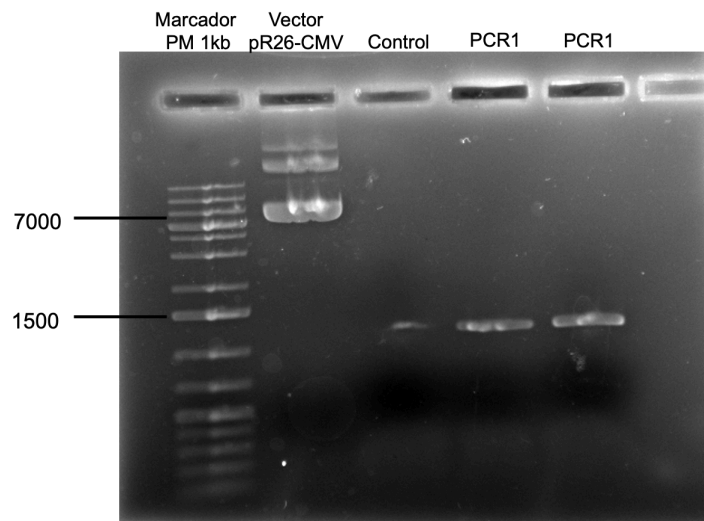


Figura 16. Resultado de la PCR1 para la obtención del *megaprimer*. Se detectan las bandas del tamaño esperado (1185 bp).

Con el plásmido de ADN molde y el vector pX330-sgR26 se procedió a probar el diseño del sistema transfecando una línea celular murina (NIH-3T3) y analizando los resultados a las 48 horas post transfección por citometría de flujo. Si bien se probaron diferentes parámetros como cantidad de ADN, relación ADN:lípidos, relación entre el plásmido de ADNmolde:Cas9-ARNguía,

no se logró obtener células GFP positivas (**Tabla 7**). La transfección del plásmido de expresión constitutiva del sensor tampoco produjo niveles importantes de células transfectadas (2,5 y 3,6 %).

Por esto se decidió probar la nucleofección como otra técnica de incorporación de ADN. Cuando las células fueron electroporadas en el Nucleofector 2b, el porcentaje de células transfectadas con el plásmido control fue mejor que en el caso de la lipofectamina, de 19,4 %. Sin embargo, no se logró obtener células transfectadas con los plásmidos requeridos para la edición genética.

Tras estos resultados se decidió cambiar la estrategia y en lugar de incorporar la endonucleasa y el ARN guía codificados en un vector, se procedió a transfectar la proteína junto con el plásmido del ARN molde.

Primero, se debió poner a punto un método de transfección de organoides. Se eligió continuar trabajando con la nucleofección ya que dio mejores resultados que la lipofección en los ensayos en NIH-3T3. Además, ya se ha reportado en la literatura una mejor performance del método de electroporación por nucleofector en organoides respecto a otros métodos [101]. Los organoides de la cepa C57B6J se crecieron en medio de expansión y al tercer día fueron nucleofectados con el plásmido control pmaxGFP utilizando los programas DS138 o el EA125. A las 72 horas post transfección se procedió a evaluar la presencia de células GFP positivas mediante microscopía de epifluorescencia. Como se observa en la **Figura 17** en ambos protocolos se detectaron organoides expresando la proteína GFP por microscopía.

Tabla 7. Optimización de las técnicas de transfección para la edición genética de organoides. Las células NIH-3T3 fueron transfectadas con lipofectamina y Nucleofector con los plásmidos de interés (pR26-CMVconst y pX330sgR26) o control (roGFP). Los resultados fueron analizados por citometría de flujo, cuantificando el porcentaje de células GFP positivas y el porcentaje de células negativas para yoduro de propidio (IP, viabilidad celular).

Transfección	Condición	Células GFP ⁺ (%)	Viabilidad Células IP ⁻ (%)
Lipofectamina	ADN:Lipo 1:2 1 µg ADN total pR26-pX330 (1:1)	0	66,82
Lipofectamina	ADN:Lipo 1:3 1 µg ADN total pR26-pX330 (1:1)	0	60,33
Lipofectamina	ADN:Lipo 1:2 1 µg ADN total pR26-pX330 (1:3)	0	79,0
Lipofectamina	ADN:Lipo 1:3 1 µg ADN total pR26-pX330 (1:3)	0	70,7
Lipofectamina	ADN:Lipo 1:2 0,5 µg ADN total pR26-pX330 (1:1)	0	97,5
Lipofectamina	ADN:Lipo 1:3 0,5 µg ADN total pR26-pX330 (1:1)	0	96,2
Lipofectamina	ADN:Lipo 1:3 1 µg ADN total Control roGFP2	2,5	90,4
Lipofectamina	ADN:Lipo 1:3 0,5 µg ADN total Control roGFP2	3,6	96,1
Lipofectamina	Sin ADN:Lipo 1:3 Mock	0	91,3
Nucleofector 2b	1 µg ADN total pR26-pX330 (1:1)	0,1	99,2
Nucleofector 2b	1 µg ADN total Control roGFP2	19,4	99,7

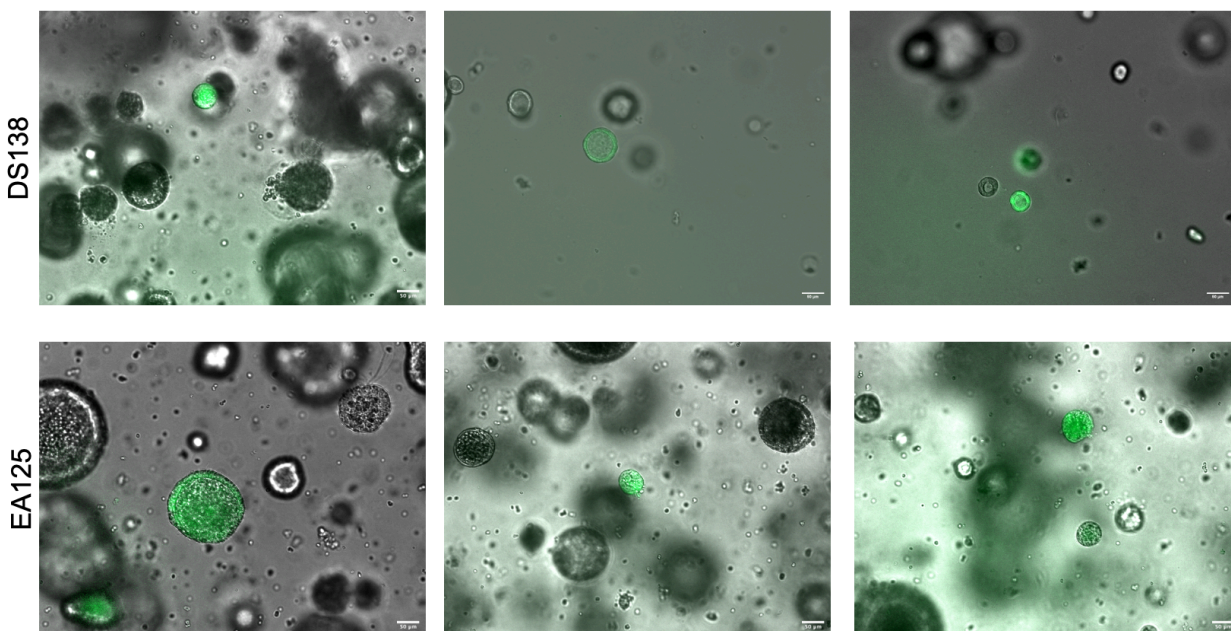


Figura 17. Prueba de transfección de organoides con el plásmido control pmaxGFP empleando el kit Primary P3 en el Nucleofector 4D. Las imágenes fueron tomadas 72 h post transfección. EA125 y DS138 hacen referencia a los dos protocolos de nucleofección utilizados. Escala = 50 μ m.

Luego de determinar el protocolo de transfección se procedió a transfectar los organoides con los elementos para insertar el sensor Grx1-roGFP2. Para probar los tres ARN guías diseñados junto con el ADN molde correspondiente y en relaciones molares diferentes de Cas9:ARNguía se emplearon las cubetas de 20 μ L. En todos los casos se decidió utilizar solamente el programa EA125 y se empleó la misma cantidad de ADN molde por condición (2 μ g). En la **Figura 18** se muestran las imágenes representativas de cada una de las construcciones. En ningún caso fue posible detectar organoides expresando el sensor redox.

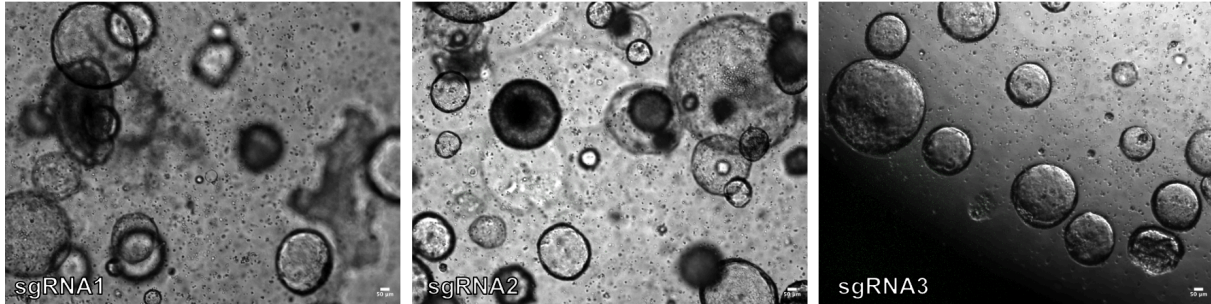


Figura 18. Imágenes representativas de los organoides transfectados con las RNPs y el ADN molde correspondiente a las tres guías a las 96 horas post-transfección. No se detectaron organoides expresando roGFP2.

Simultáneamente se realizó *in vitro* una prueba de corte de las RNP con el ADN molde. El ADN molde diseñado contiene la secuencia guía y los sitios de corte flanqueando el inserto. Por lo tanto se incubaron las tres guías diseñadas con la Cas9 para formar las RNPs y posteriormente se incubaron con el ADN molde para comprobar que son capaces de reconocer sitio y generar el corte. Como se observa en la **Figura 19**, el tratamiento con las RNPs genera cortes en los vectores de ADN molde. Si bien las guías son capaces de generar RNPs que corten el ADN molde, es posible que se requieran ensayos adicionales para evaluar la capacidad de insertar el gen de interés en los organoides o en la línea celular murina NIH-3T3.

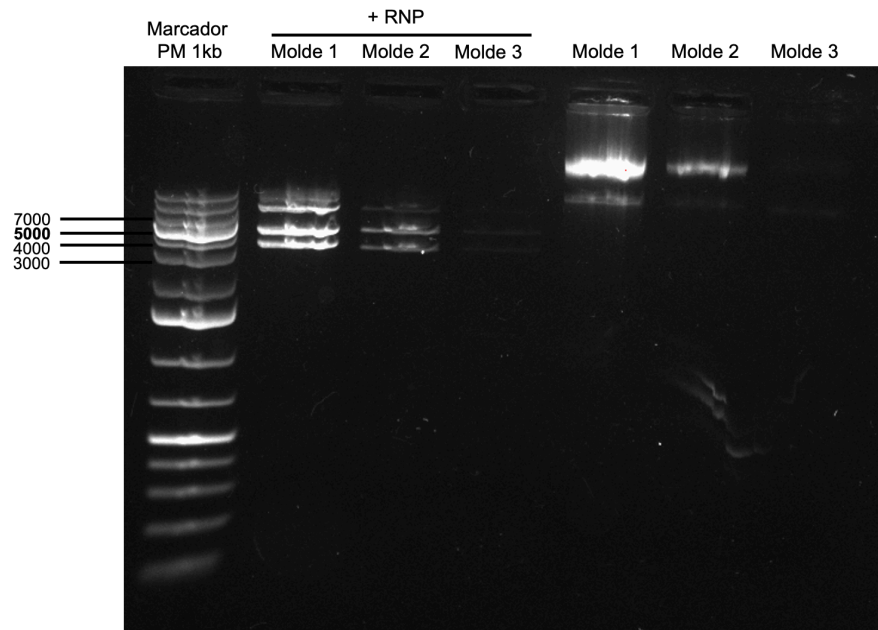


Figura 19. Prueba de corte *in vitro* de las RNPs. Los vectores que se emplean de molde para la edición genética fueron incubados con las RNPs formadas con su guía correspondiente. El vector de ADN molde 1 tiene un tamaño total de 7.8 kb, mientras que el 2 y el 3 de 7.6 kb. Tras el corte con las RNPs se espera un fragmento de 3.4 kb y uno de 4.4 kb para el molde 1, y uno de 3.2 kb y uno de 4.4kb para los moldes 2 y 3.

4.4. Discusión

El campo de los cultivos tridimensionales ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años, gracias a los avances en técnicas y materiales de cultivo, ofreciendo un amplio abanico de aplicaciones en el desarrollo de medicamentos y pruebas de toxicidad para una gran variedad de enfermedades [102]. A diferencia de los tradicionales cultivos en monocapa, en los cultivos en 3D se han adoptado diversas estrategias: células crecen en superficies de baja adherencia o en gotas colgantes, o bien crecen en condiciones de suspensión, asociadas a matrices o biopolímeros tipo hidrogeles prefabricados (también llamados plataformas, scaffolds) [27]. De esta manera, se generan estructuras con volumen, simulando de manera más fiel la disposición celular en un tejido vivo. El desafío principal seguirá siendo la creación de cultivos tridimensionales que sean biológicamente relevantes y recreen fehacientemente el microambiente del tejido *in vivo* y la fisiopatología de la enfermedad [84], [102].

Los organoides intestinales son un modelo interesante ya que derivan de la autoorganización de células madre ya sean pluripotentes o de células madre derivadas de tejidos. Los organoides se caracterizan por su alta complejidad, dada por su composición heterogénea en términos de presencia de diferentes tipos celulares, reflejando así de manera más fiel la arquitectura y funcionalidad del órgano [52].

4.4.1. Generación y caracterización de organoides intestinales murinos derivados de la cepa reportera NF- κ B-RE-luc

La activación del factor NF- κ B constituye una vía de señalización clave en respuesta a diversos estímulos inmunes y proinflamatorios, siendo de particular relevancia en los procesos inflamatorios intestinales. La importancia de estos procesos en la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias intestinales, resalta la necesidad de evaluar la inhibición de NF- κ B a nivel del epitelio intestinal en la búsqueda de nuevas intervenciones terapéuticas.

Este trabajo propone el empleo de novedosos organoides intestinales reporteros de NF- κ B como un modelo tridimensional para evaluar la inflamación en el intestino.

Los organoides intestinales derivados de duodeno, yeyuno, íleon y colon de ratones reporteros NF- κ B-RE-Luc fueron establecidos con éxito a partir del aislamiento y cultivo de criptas intestinales. La capacidad de crecimiento de estos organoides, que fue evaluada mediante el ensayo de formación de colonias, fue similar entre organoides derivados de distintas regiones del intestino. Sin embargo, se observaron claras diferencias morfológicas entre los organoides

derivados del yeyuno y del colon. Los organoides del yeyuno exhibieron un mayor porcentaje de gemaciones múltiples, mientras que los derivados del colon adoptaron una forma más esférica, evidenciada por un factor de circularidad superior y un mayor porcentaje de estructuras sin gemaciones en el día 8 de cultivo. Se ha postulado que estas disparidades morfológicas podrían vincularse al gradiente de Wnt presente en el medio de cultivo. Si bien el medio de cultivo empleado para ambas secciones es el mismo, en los organoides del intestino delgado, se plantea que las células de Paneth inducen un marcado microgradiente de Wnt, provocando que las criptas se eleven desde la superficie. En contraste, en los organoides de colon, la ausencia de células de Paneth resultaría en un estímulo más homogéneo, favoreciendo la forma esférica[103].

En cuanto a las poblaciones celulares intestinales, los organoides reprodujeron la diversidad celular epitelial de cada región intestinal, como indican los diferentes marcadores específicos de tipos celulares intestinales detectados. No obstante, se observaron algunas diferencias entre los organoides y los tejidos. La mayor expresión del marcador de células madre Lgr5 en la mayoría de los organoides respecto a los tejidos, o la menor expresión del marcador de células caliciformes (Mucina 2) en los organoides de colon en comparación con el tejido, podría deberse a las condiciones de cultivo, ya que la presencia de Wnt y R-spondina en el medio de cultivo favorecen la proliferación de las células madre intestinales sobre la diferenciación hacia células especializadas [1].

La actividad reportera de NF- κ B difirió entre los organoides intestinales de diferentes secciones. Los organoides derivados del yeyuno e íleon mostraron una curva de respuesta en función de la concentración de TNF- α , mientras que los organoides derivados del colon no produjeron ninguna señal detectable a las concentraciones evaluadas. La sensibilidad de un sistema reportero puede variar en función de diversos factores, tales como la ubicación en la cual se inserte el transgen en el genoma, el número de copias insertadas, las características intrínsecas de la proteína reportera y la maquinaria celular requerida para activar el sistema. El TNF- α es un estímulo bien conocido para la activación de la vía de NF- κ B en el epitelio intestinal, y desempeña un papel clave en los procesos inflamatorios [104]. Se une y activa dos receptores de superficie celular estructuralmente relacionados, TNF-R1 y TNF-R2, ambos expresados en los organoides reporteros de intestino delgado y colon. Asimismo, tras ser estimulados con TNF- α , se detectó la translocación de la subunidad p65 de NF- κ B al núcleo de los organoides derivados del yeyuno y del colon, indicando que esta vía de señalización es funcional en ambos tipos de organoides. Por lo tanto, estos resultados sugieren que las

diferencias observadas en la capacidad de respuesta del organoide reportero estarían asociadas con otro factor.

En este sentido, Carlsen y colaboradores informaron que el intestino delgado de ratones NF- κ B-RE-Luc mostró la mayor señal luminiscente mediante imagenología *in vivo* después de un desafío con LPS. No obstante, también se observó señal en las placas de Peyer de ratones tratados con el control (PBS). Además, al extraer los órganos y detectar la señal luminiscente *ex vivo* luego del estímulo con LPS, mostraron que la señal en el colon era menor en comparación con el intestino delgado [85]. Estos datos concuerdan con nuestros resultados, sugiriendo que la diferencia en la sensibilidad del reportero a lo largo del intestino puede ser una característica intrínseca del modelo animal y no del cultivo de organoides. De hecho, las similitudes entre el modelo *in vivo* y nuestro modelo *ex vivo* en cuanto a la actividad del reportero, refuerzan la habilidad de los organoides intestinales para replicar de manera cercana el comportamiento tisular. Esto fortalece el valor de esta herramienta como alternativa al uso de animales de laboratorio.

Si bien el tratamiento con TNF- α fue suficiente para provocar una clara respuesta del reportero en los organoides derivados del intestino delgado, otros estímulos proinflamatorios comúnmente presentes en el entorno intestinal, como el LPS, la IL-1 β o la *Salmonella enterica* inactivada, no lograron inducir una respuesta detectable.

Los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores de la familia de la IL-1 (IL-1R) comparten una gran similitud estructural y su activación culmina en la expresión de genes que codifican para citoquinas y quimioquinas proinflamatorias mediante la acción de la vía de NF- κ B [105]. Sin embargo, también se ha reportado sobre la falta de respuesta de los organoides (principalmente del intestino delgado) a diferentes ligandos de los TLR y a la IL-1 β , sugiriendo que esto podría atribuirse a los bajos niveles de expresión de TLR y IL-1R en el epitelio [106]. También es posible que una menor accesibilidad de los estímulos a los receptores de la superficie hayan afectado la respuesta. En estos experimentos, la superficie apical del epitelio se encuentra hacia el interior de los organoides, siendo el lado basolateral el que está expuesto a la matriz, en contacto más directo con los estímulos añadidos al medio. Estudios futuros que establezcan otros tiempos de incubación o que apliquen otras aproximaciones metodológicas para acceder a la zona luminal (como la microinyección o los cultivos bidimensionales) contribuirían a comprender mejor estos resultados.

4.4.2. Generación de organoides intestinales reporteros

Para la generación de organoides intestinales reporteros se decidió incursionar con la incorporación de un sensor redox hGrx1-roGFP2 con la técnica de CRISPR/Cas9 en el locus Rosa26. Existen muchas técnicas de edición genómica, como el empleo de nucleasas quiméricas como las ZFN y las TALEN [107]. El sistema CRISPR/Cas9 ha sido ampliamente utilizado para edición genómica de organoides y para iPSCs en general [70], [108], [109], [110]. Existen diferentes métodos para incorporar la endonucleasa Cas9 y el ARN guía. En este trabajo se probó la incorporación mediante plásmidos. Pero esta estrategia no fue exitosa, no sólo no fue posible conseguir la incorporación del sensor redox, sino que en algunos casos la cantidad de plásmido a transfectar generó mucha mortalidad. Existe evidencia de que el método de RNPs presenta una eficacia mayor comparada con el agregado de la Cas9 y la guía mediante plásmidos [111]. Por lo tanto también se decidió incorporar las RNPs empleando tres ARN guías diferentes para ampliar las chances de tener una edición exitosa. En cuanto al ADN molde también se optó por incorporar al constructo los sitios guía y de corte para las Cas9. Esta estrategia mostró mejor eficiencia de *Knock-in* en la línea 293 T [99], pero en nuestro caso esto no prosperó.

Si bien hasta el momento no hemos podido editar genéticamente los organoides, se han hecho avances considerables durante el proceso de optimización., se ha llegado a probar diferentes alternativas a la incorporación de la endonucleasa y el ARN guía, se diseñaron diferentes ARN guías y ADN molde, así como diferentes métodos de transfección. Es más, fue posible comprobar que el sistema de edición diseñado con RNP fue funcional *in vitro*. Sin embargo, la generación de un organoide reportero presenta desafíos adicionales que podrían explicar por qué no hemos sido exitosos en nuestros intentos. Uno de ellos es que para que se genere el organoide reportero, es necesario que la edición tenga lugar en las células madre, ya que las demás células diferenciadas, aún si fueron editadas, no persistirán en el tiempo . Por otro lado, la transfección fue evaluada a las 48 o 72 horas post-transfección; puede ser que a esos tiempos la cantidad de organoides generados no sea suficiente para detectar células transfectadas por citometría de flujo o microscopía. La optimización de estos pasos incorporando tiempos más prolongados de cultivo previo al análisis resultará clave para los próximos ensayos.

Por último, una desventaja de la estrategia actual es que el sensor que se quiere insertar tiene un tamaño de 1.8 kb, lo cual está muy cerca del límite reportado para incorporación de ADN por

la tecnología CRISPR/Cas9. Como el sitio de inserción no presenta reportero, se debe insertar la secuencia codificante del sensor junto a un promotor que permita su expresión. La eficiencia de la incorporación de ADN por el mecanismo de reparación dependiente de homología decrece con el tamaño del inserto. Una alternativa que resta explorar sería incorporar solamente la región codificante del biosensor directamente río abajo de algún promotor de alta expresión.

5. Capítulo 2

Aplicaciones de los organoides intestinales para estudios de la interacción hospedero-microorganismo

Objetivos desarrollados:

- Determinar la capacidad inmunomoduladora de compuestos solubles derivados de la microbiota intestinal humana utilizando organoides reporteros NF- κ B.
- Evaluar la capacidad infectiva del parásito *Trypanosoma cruzi* sobre el epitelio intestinal empleando organoides murinos.

5.1. Introducción

5.1.1. Empleo de los organoides intestinales en el contexto de la inflamación intestinal y la relación intestino-microbiota

En el intestino, la vía del factor NF- κ B está asociada con la inflamación y el cáncer en diferentes niveles. Por un lado, la inflamación intestinal es una respuesta protectora del hospedador ante la infección o el daño tisular. La activación de NF- κ B tras diversos estímulos desencadena una respuesta en el sitio de infección para combatir patógenos permitiendo mantener la homeostasis tisular. No obstante, la activación sostenida de la vía de NF- κ B puede llevar a daño tisular crónico, enfermedad inflamatoria intestinal [78] y cáncer, debido al incremento de estrés celular y acumulación de daño en el ADN [81], [112]. La alteración de la estabilidad genética y los estados epigenéticos en el epitelio dañado contribuye a generar un microambiente propicio para el desarrollo del cáncer [113].

Entre estos estudios, las interacciones entre el epitelio del hospedador y los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal son un componente integral en la investigación de diversas enfermedades gastrointestinales. El epitelio intestinal convive con un conjunto de microorganismos que colonizan el lado apical y cuya interacción tiene un impacto significativo en la fisiología gastrointestinal y la salud del hospedero. El microbioma cumple diversas

funciones como mantener la integridad de la barrera intestinal mediante la regulación de proteínas de las uniones estrechas, modular el sistema inmune, afectar el metabolismo lipídico e inhibir la colonización por organismos patógenos [114]. Además de interactuar directamente con receptores en la superficie apical del epitelio, los organismos comensales producen metabolitos que regulan la fisiología del epitelio y proporcionan un medio de comunicación con otros órganos del cuerpo. Varias enfermedades han sido relacionadas con alteraciones en el microbioma intestinal, incluyendo la enfermedad inflamatoria intestinal [115], obesidad [116], y cáncer [117], [118], lo que sugiere la existencia de importantes mecanismos moleculares y celulares regulados por organismos comensales.

La adopción de técnicas experimentales y herramientas de análisis para interrogar cultivos de organoides ha incrementado considerablemente la utilización de estos modelos en el intento de recrear las enfermedades inflamatorias y el cáncer, así como en el desarrollo y cribado de fármacos [119]. Para estudiar las interacciones entre el hospedero y los microorganismos *in vitro*, los organoides son una herramienta poderosa, ya que proporcionan un modelo en el cual es posible evaluar la respuesta del epitelio intestinal ante la presencia de bacterias y sus metabolitos [120]. La estimulación de los organoides con metabolitos bacterianos, en vez de bacterias vivas, representa un paso inicial hacia una mejor comprensión de cómo las bacterias comensales interactúan con los diversos tipos celulares del epitelio intestinal en respuesta a la inflamación. En este sentido, en el presente trabajo se procedió a validar el sistema de organoides intestinales reporteros NF- κ B-RE-Luc desarrollado en el capítulo 1, empleando compuestos con capacidad de reducir la actividad de NF- κ B inducida por TNF- α . Posteriormente, se evaluó la capacidad de diferentes sobrenadantes libres de células de bacterias probióticas y de bacterias aisladas de microbiota humana para modular la vía del factor NF- κ B empleando el sistema reportero.

5.1.2. Búsqueda de nuevos modelos para el abordaje de las interacciones hospedero-patógeno

Los modelos empleados en el laboratorio desempeñan un papel fundamental en la comprensión de los mecanismos que favorecen el desarrollo de enfermedades. En el ámbito de las interacciones entre el hospedador y el patógeno, estos sistemas tienen el desafío de recrear no sólo lo que le ocurre al organismo individual (es decir, el hospedador), sino también la compleja interacción con los microorganismos [121]. Al infectar, los patógenos suelen desencadenar una respuesta en el hospedador, y manipular dicha respuesta para

favorecer su propia supervivencia, creando un entorno local particular o nicho específico. La respuesta que presente el hospedador frente a una infección estará determinada por el tipo de patógeno, la ruta de entrada, el poder de colonización, el establecimiento de un reservorio, la susceptibilidad del hospedero, entre otros [62]. La búsqueda y refinamiento de nuevos modelos *in vitro* e *in vivo* ha proporcionado nuevas herramientas para estudiar esta diversidad de factores presentes en las enfermedades infecciosas.

Los modelos animales son modelos de gran complejidad que permiten el estudio de enfermedades infecciosas considerando las interconexiones entre diferentes órganos y tejidos involucrados, como el epitelio y las células del sistema inmune. Se han adoptado una amplia variedad de modelos animales para estudiar las interacciones hospedero-patógeno. Estos modelos van desde modelos de baja complejidad, como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el pez cebra *Danio rerio*, a modelos más complejos como ratones (salvajes, transgénicos, ratones humanizados) y primates no humanos [62], [121]. Sin embargo, estos modelos no siempre recrean completamente la infección que ocurre en humanos, y pueden ser costosos, sobre todo si se trata del manejo de animales en condiciones de bioseguridad de tipo 2 debido a los agentes infecciosos empleados, siendo difíciles de mantener.

Comprender la interacción de los patógenos con el epitelio intestinal y cómo eluden la barrera epitelial es crucial para esclarecer sobre las enfermedades entéricas. Como las células epiteliales son generalmente el sitio de ingreso de un patógeno, la invasión y la afectación de la función de barrera es una de las respuestas que se busca analizar en la interacción hospedero-patógeno [122]. Para ello, tradicionalmente se han empleado modelos *in vitro* de líneas celulares epiteliales inmortalizadas [123], [124], [125], con las limitaciones de que no replican la composición ni la estructura 3D del tejido *in vivo*. En los últimos años, los sistemas de cultivo tridimensionales basados en matrices o plataformas, cultivados como esferoides o agregados, están siendo cada vez más utilizados, incorporando una nueva dimensión en el estudio de la interacción con patógenos [30]. Los organoides intestinales, por su parte, no sólo aportan la tridimensionalidad al sistema de estudio, sino que recrean de forma especie-específica, la composición, diversidad y organización del epitelio intestinal de manera más fiel que cualquier otro sistema *in vitro*, brindando así nuevas oportunidades para el estudio de interacciones intestino-patógenos.

5.1.3. Modelando la enfermedad de Chagas con organoides intestinales

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) [126]. Se estima que en el mundo hay entre seis y siete millones de personas infectadas por *T. cruzi*, la mayoría de ellas en América Latina. El parásito se transmite a humanos (reservorio principal del circuito doméstico) y a otros animales a través de insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae. Sin embargo, también se ha reportado transmisión congénita, oral, asociada a accidentes de laboratorio y por transfusión sanguínea [127], [128]. En nuestro país la transmisión vectorial fue interrumpida en 1997; el tamizaje serológico de Chagas en donantes de banco de sangre se decretó como obligatorio en 1985 y es una de las patologías que se analizan en todas las gestantes para detectar y controlar la infección vertical [129].

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo e involucra una transición de formas replicativas a formas que son no replicativas pero altamente infectivas. En el intestino del insecto, la forma epimastigota se replica y se diferencia a tripomastigotas metacíclicos que es la forma infectiva no replicativa. Los tripomastigotas son capaces de invadir una amplia variedad de tipos celulares en el hospedero mamífero. Una vez en el citosol de la célula hospedera, los tripomastigotas se diferencian rápidamente a amastigotas, los cuales se dividen por fisión binaria y se diferencian a tripomastigotas móviles que lisan la célula mecánicamente [126].

En la mayoría de los casos, la fase aguda de la enfermedad se manifiesta con síntomas leves y no específicos y se caracteriza por niveles elevados de parásitos en sangre (parasitemia). Durante la fase crónica, la infección permanece clínicamente silenciosa en la mayoría de los casos, lo que se conoce como la forma asintomática o indeterminada de la enfermedad de Chagas. En aproximadamente el 30-40 % de las personas infectadas, la enfermedad progresa a una etapa crónica sintomática caracterizada por la colonización del parásito en varios tejidos como el corazón, el colon, los ganglios mesentéricos del intestino y los músculos [130]. El daño y la disfunción cardíaca y/o digestiva determinan la morbilidad y mortalidad de la enfermedad. No obstante, el tropismo del parásito por diferentes tejidos y las manifestaciones clínicas dependen de varios factores entre los que se destacan los genotipos del parásito y la respuesta inmune montada por el hospedador, por lo que la presentación clínica de la enfermedad de Chagas es variable [131].

Al momento solo existen dos fármacos aprobados con acción antiparasitaria para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: Nifurtimox y Benznidazol. Sin embargo, estos fármacos son más eficaces en estadios tempranos de la enfermedad, pero presentan numerosos efectos adversos, el tratamiento es prolongado y no pueden ser aplicados a todos los pacientes. En la enfermedad crónica avanzada solo se contempla el tratamiento de los síntomas.

El tracto gastrointestinal del hospedero, principalmente el colon, es un sitio relevante para la persistencia de *T. cruzi* en el organismo. Se ha reportado la presencia de parásitos en estado de reposo o latencia residiendo en este lugar inmunoprivilegiado, que podrían contribuir a la persistencia de la enfermedad, la recaída de la infección y el fracaso del tratamiento [132], [133]. Si bien se han detectado nidos de parásitos en la capa muscular del colon de ratones crónicamente infectados, aún no se ha estudiado la capacidad de *T. cruzi* para establecer infecciones y/o dañar el epitelio intestinal [132]. En este contexto, los modelos animales murinos empleados para esta enfermedad son objeto de controversia debido a preocupaciones éticas, pero también debido a que presentan muchas limitaciones para modelar la enfermedad en la etapa crónica [134]. Algunas de estas limitaciones pueden superarse mediante métodos de cultivo celular *in vitro* [135], [136].

Los organoides intestinales derivados de células madre representan una tecnología novedosa y fisiológicamente relevante en el estudio de la interacción epitelio-parásito. En este trabajo se establecieron protocolos de infección de organoides intestinales murinos para evaluar la infección epitelial con el parásito *T. cruzi*. Como estrategia experimental se emplearon técnicas de microscopía confocal para el recuento y caracterización de los organoides infectados. Se emplearon organoides en formato 3D y en monocapa, de manera de evaluar la capacidad del parásito para infectar el epitelio desde la cara basolateral y apical, respectivamente. Dado que el organoide derivado de células madre adultas sólo contiene las células epiteliales, para evaluar la interacción del epitelio con otros tipos celulares presentes en el tejido es necesario emplear sistemas de co-cultivo. Considerando que el estroma de la lámina propia puede ejercer una influencia en la respuesta a la infección del epitelio, resulta interesante explorar la adición de un componente mesenquimal al cultivo de organoides. En este sentido, se procedió a incorporar un sistema de co-cultivo con fibroblastos murinos que permitirá evaluar la contribución de otros tipos celulares presentes en el tejido en el proceso de infección por *T. cruzi*.

5.2. Métodos

5.2.1. Reactivos

La mayoría de los productos químicos utilizados fueron adquiridos de Sigma Aldrich, Merck (Saint Louis, EE. UU.). Los medios de cultivo DMEM y Advanced DMEM/F12, SFB, TrypLE, G418 (geneticina), Penicilina-Estreptomicina (P/S), los suplementos GlutaMAX, B27 y N2, GlutaMAX; y demás consumibles para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, EE. UU.). La matriz extracelular (extracto de membrana basal) Cultrex™ Tipo II se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, EE. UU.) o bien se utilizó la matriz de membrana Matrigel™ de Corning (Nueva York, EE. UU.). De Peprotech (Cranbury, EE.UU.) se obtuvieron las siguientes proteínas recombinantes: gastrina I, Wnt-3a, Nogina, R-spondin-1, factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés, "epidermal growth factor"); y los inhibidores sintéticos: SB431542 (inhibidor de TGF- β), Y-27632 (inhibidor de Rho kinasa, ROCK), CHIR 99021 (inhibidor de GSK-3, activador de Wnt), SB202190 (inhibidor de la kinasa p38 activada por mitógenos).

5.2.2. Líneas celulares

Se emplearon las líneas celulares HT-29 (ATCC HTB-38™) y Vero (ATCC CCL-81™) en los ensayos de infección con *T. cruzi* en monocapa. Para los ensayos de co-cultivo de organoides con fibroblastos, se utilizó la línea murina NIH/3T3 (ATCC CRL-1658™). En todos los casos, las células fueron cultivadas a 37 °C en una atmósfera húmeda controlada con 5 % de CO₂. Como medio de cultivo se utilizó DMEM suplementado con 10 % (v/v) de SFB (medio completo). Los procedimientos de cultivo, subcultivo y descongelado empleados fueron descritos en el inciso 4.2.2.1 y 4.2.2.2.

5.2.3. Obtención de medios condicionados

Las cepas *Lactobacillus reuteri* (ATCC 23272, actualmente denominada como *Limosilactobacillus reuteri* [137]) y *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014, actualmente denominada *Lactiplantibacillus plantarum* [137]) se crecieron a 37 °C durante 24 horas en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), y luego se diluyeron en caldo MRS según las pautas del ATCC. Para la preparación de medios condicionados de Lactobacilos, se inoculó 3 mL de un cultivo en fase exponencial de *L. reuteri* o *L. plantarum* (alcanzando una densidad óptica a λ 600 nm de aproximadamente 0,6) en 50 mL de medio de cultivo Advanced DMEM/F12 y se incubaron a 37 °C durante 6 horas. El medio se centrifugó dos veces, se ajustó el pH a 7.4, luego se filtró a

través de un filtro de 0,22 µm para eliminar las bacterias vivas y se almacenó a -20 °C hasta su uso en ensayos de validación. Los sobrenadantes de bacterias aisladas de la microbiota humana fueron proporcionados por Nadia Riera y Florencia Peñalba del laboratorio de Genómica Microbiana del Institut Pasteur. Brevemente, se obtuvieron diferentes aislamientos de la materia fecal de un mismo individuo en cámara de anaerobiosis en agar de extracto de levadura, casitona y ácidos grasos (medio YCFA, por sus siglas en inglés) o infusión de cerebro y corazón (medio BHI, por sus siglas en inglés). De las placas de aislamiento se procedió a inocular en el respectivo medio de cultivo líquido. Los subcultivos se incubaron por 48 horas a 30 °C en la cámara de anaerobiosis, se centrifugaron y filtraron empleando un filtro de 0,22 µm. Finalmente se almacenaron a -20°C hasta su uso en el ensayo reportero.

5.2.4. Ensayo reportero para evaluar modulación de la activación de NF-κB en organoides intestinales

Los organoides reporteros derivados de yeyuno se cultivaron como fue descrito en el inciso 4.2.7 del capítulo 1. Para validar el ensayo de los organoides reporteros se midió la actividad antiinflamatoria de inhibidores conocidos de NF-κB: Dexametasona 10 µM y BAY11-7082 10 µM. La evaluación de la interacción con componentes secretados por la microbiota se realizó mediante el mismo ensayo reportero. Para ello se utilizaron medios condicionados obtenidos de *L. reuteri* y *L. plantarum* (dilución 1:5), y los sobrenadantes obtenidos de bacterias aisladas de materia fecal humana (dilución 1:10). En los controles sin medio condicionado (con y sin estimular) se adicionó la misma cantidad de medio de cultivo de bacterias (dilución 1:10). Los organoides se estimularon con 10 ng/mL de TNF-α y simultáneamente se adicionaron los compuestos anteriormente indicados. Después de 24 h de incubación, se midió la actividad luciferasa como se describió anteriormente (ver inciso 4.2.7). Cada condición se evaluó en triplicado. Se incluyeron células sin tratamiento y células tratadas sólo con TNF-α o los diferentes compuestos como controles. Se utilizaron organoides no estimulados como controles negativos. La activación de NF-κB se expresó como el cambio en la señal de luz normalizada respecto a la del grupo no estimulado.

5.2.5. Parásitos

Los epimastigotes de la cepa Dm28C de *T. cruzi*, perteneciente a la unidad de tipificación discreta (DTU) TcI, fueron cultivados en *batch* durante 12-15 días en medio de Infusión Hígado-Triptosa (LIT, por sus siglas en inglés) suplementado con 10 % (v/v) de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 40 µM de hemina a 28 °C. Para la generación de

tripomastigotas infectivos, las células Vero ($2,5 \times 10^5$ células/mL en frascos T-25 con DMEM + 10 % (v/v) de SFB) fueron infectadas en una proporción de 10:1 (parásito:célula Vero) con tripomastigotas presentes en el sobrenadante del cultivo de epimastigotes envejecidos. La proliferación de parásitos intracelulares fue monitoreada, y el medio (DMEM + 2 % (v/v) de SFB) fue reemplazado cada 48 h. Cuando se detectaron altas cantidades de tripomastigotas extracelulares (6-7 días postinfección), se recolectó el sobrenadante, se centrifugó a $1250 \times g$ por 10 min y se resuspendió el *pellet* de parásitos en DMEM + 10 % (v/v) de SFB. Después de 24 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, los parásitos en suspensión se recuperaron del sobrenadante mediante centrifugación a $1250 \times g$ por 10 min, se resuspendieron en medio de cultivo completo de organoides y se contaron bajo el microscopio de luz. La cantidad de parásitos se ajustó de acuerdo a la MOI (del inglés *Multiplicity of infection*, que representa la relación células epiteliales : tripomastigotas) necesaria para cada ensayo.

5.2.6. Infección de organoides con *T. cruzi* en formato 3D

Para las infecciones con *T. cruzi* se emplearon los organoides derivados de la cepa salvaje C57BL/6J (ver inciso 4.2.4). Para ajustar el número de parásitos a la MOI correspondiente a ensayar, se utilizó un pozo de una placa de 6 pocillos como pozo testigo. Los organoides de dicho pozo se removieron de la matriz, se lavaron con PBS y se disgregaron mecánicamente con pipeta. Luego se incubaron con TripLE durante 5-10 min a 37 °C para obtener una suspensión de células individuales y poder cuantificar el número de células viables por pozo mediante recuento en cámara de Neubauer. Una vez determinado el número de células, se calculó el número de parásitos necesario considerando la MOI deseada. Para la infección los organoides intactos fueron retirados de la matriz, lavados con PBS y centrifugados a $300 \times g$ durante 5 min a 4 °C. A continuación, se removió el sobrenadante y el *pellet* de organoides se incubó durante 2 h a 37 °C con el número adecuado de tripomastigotas infectivos de *T. cruzi* en un volumen final de 100 µL de medio basal de organoides suplementado con 10 nM del inhibidor Y-27632. Posteriormente, los organoides infectados se centrifugaron a $300 \times g$ durante 5 min, se resuspendieron en la matriz, se sembraron en una placa multiwell negra de fondo transparente de 96 pocillos en gotas de 7 µL de matriz y se cultivaron durante 72 h en medio completo de organoides suplementado con Y-27632.

Cada experimento independiente (de un total de 3) se realizó con organoides obtenidos de diferentes ratones y de ambos sexos.

5.2.7. Infección de organoides con *T. cruzi* en formato 2D (monocapa)

Los organoides fueron disgregados y sembrados en monocapas en pozos pretratados con una dilución 1:10 de matriz en PBS durante 2 h a 37 °C. La suspensión de células individuales de los organoides se obtuvo incubando los organoides con TrypLE durante 5 min a 37 °C y la MOI fue ajustada utilizando el número de células sembradas por pozo (5×10^4 por pozo). Las células Vero y HT-29, se sembraron a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/pozo. Una vez establecidas las monocapas, los tripomastigotas infectivos se agregaron directamente al medio de cultivo y se incubaron durante 2 o 24 horas. Luego, se retiró el medio y se lavó la monocapa tres veces con PBS. Se añadió medio completo de organoides suplementado con Y-27632 y la placa de cultivo se incubó durante 48 a 72 horas.

Para la infección de organoides en 2D, cada experimento independiente (de un total de 2) se realizó con organoides obtenidos de diferentes ratones (2 líneas de organoides diferentes) y de ambos sexos.

5.2.8. Inmunomarcación de los organoides infectados con *T. cruzi*

Los organoides infectados fueron lavados tres veces con PBS y fijados con 4 % (p/v) de PFA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. La permeabilización se realizó tratando las muestras con 0,5 % (v/v) de Tritón X-100 en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de bloquear las uniones inespecíficas con BSA al 2,5 % (p/v) en PBS durante 2 horas, las muestras fueron incubadas con diferentes anticuerpos primarios y/o sondas (ver **Tabla 8**) resuspendidos en 2 % (p/v) de BSA, 0,1 % (v/v) de Tritón X-100 en PBS durante la noche a 4 °C. Luego, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas con anticuerpos secundarios y la sonda faloidina (ver **Tabla 8**) durante 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente.

Las imágenes fueron adquiridas utilizando el software Zen Black (Zeiss; Darmstadt, Alemania) en el microscopio confocal Zeiss LSM 880 equipado con objetivos de 25X (inmersión en glicerol) y/o 63X (inmersión en aceite), y láseres de 405, 488, 561 y 631 nm. Las imágenes fueron procesadas con el software Fiji [95]. Para la detección de parásitos en los organoides 3D infectados, se obtuvieron *Z-stacks* de 5 campos aleatorios por condición y la cuantificación se realizó con el *plug-in* "3D Object Counter" de Fiji, utilizando la tinción de núcleos para contar todas las células del stack y la señal de tripanotona reductasa o peroxirredoxina mitocondrial

para contar los amastigotes de *T. cruzi*. Los resultados de la cuantificación de este *plugin* fueron manualmente curados para poder determinar con certeza la cantidad de núcleos totales de organoide y la cantidad de parásitos totales de acuerdo a la señal del canal correspondiente. Para la detección de parásitos en los organoides infectados en formato 2D se tomaron 8 fotos de campos al azar por condición y se utilizó la herramienta *Analyze Particles* del programa Fiji para la cuantificación de núcleos de célula hospedadora y de amastigotas.

Tabla 8. Anticuerpos, fluoróforos y sondas utilizados para la inmunomarcación. Los anticuerpos primarios contra *T. cruzi* fueron provistos por el Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos (LBRT) y por la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Institut Pasteur Montevideo. El verde de metilo fue proporcionado por la Sección Biología Celular de la Facultad de Ciencias. WGA: del inglés *Wheat germ agglutinin*. Máximas longitudes de onda de excitación y emisión (Máx λ_{exc} / λ_{em})

Anticuerpo/Sonda	Especie	Dilución	Proveedor	Máx λ_{exc} / λ_{em} . (nm)
Anticuerpos primarios				
Tripanotona reductasa de <i>T. cruzi</i>	Conejo/Poli clonal	1:500	Proporcionado por LBRT - IPM	
Peroxirredoxina mitocondrial de <i>T. cruzi</i>	Ratón/Policl onal	1:400	Proporcionado por UBM - IPM	
Ki-67	Conejo/Poli clonal	1:500	Abcam_ab15580	
Anticuerpos secundarios				
IgG ratón Alexa Fluor 488	Cabra	1:500	Invitrogen	499/520
IgG conejoCy5	Cabra	1:500	Invitrogen	647/665
IgG conejo Alexa Fluor 488	Cabra	1:300	Invitrogen	499/520
Sondas/ Otros compuestos fluorescentes				
WGA Alexa Fluor 555	-	1:1000	Invitrogen	555/580
Phalloidin Alexa Fluor 647	-	1:200	Invitrogen	650/668
Phalloidin Texas Red	-	1:100	Invitrogen	591/608
Hoechst 33342	-	1:1000	Invitrogen	360/460
Verde de metilo	-	1:5000 (4µg/mL)	Proporcionado por Biología Celular - FCien	633/577

5.2.9. Optimización del cultivo de organoides en formato Transwell

La puesta a punto de las condiciones para el sistema de co-cultivo de organoides se realizó en el marco de una pasantía en la Unidad de Microambiente e Inmunidad del Institut Pasteur París, bajo la supervisión de la Dra Giulia Nigro. Para facilitar la observación de los cultivos, a partir de diferentes modelos murinos reporteros se obtuvieron: organoides intestinales Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2 (GFP-LGR5) obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EE. UU.) los cuales presentan expresión de GFP en las células madre intestinales (heterocigotas); y organoides intestinales de la cruce de ratones GFP-LGR5 y ROSAmT/mG, que presentan todas las células intestinales con la proteína reportera tdTomato en su membrana [138].

Los organoides de diferentes secciones del intestino (intestino delgado y colon) se obtuvieron con el protocolo detallado en el inciso 4.2.4.2, pero empleando el medio de cultivo sin el medio condicionado ni suero, incorporando en su reemplazo los suplementos B27 y N2 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.); con las siguientes proteínas recombinantes: EGF murino (50 ng/mL), Noggin (100 ng/mL), R-spondina 1 murina (500 ng/mL para intestino delgado y 1000 ng/mL para colon), y en el caso del colon se agregó Wnt3a (100 ng/mL sólo para colon) y 10 % (v/v) de SFB.

Previo a la siembra de los transwells se probaron diferentes adiciones al medio de cultivo para favorecer la proliferación de las células madre: Wnt3a (100 ng/mL), CHIR99021 (3 μ M), ácido valproico (2 mM) [139], [140], y se seleccionó aquella condición en la que los organoides mostraron mayor porcentaje de células GFP positivas por microscopía.

Para los co-cultivos se emplearon insertos transparentes de Tereftalato de polietileno (PET) Transwell-Clear de diámetro de 6,5 mm y tamaño de poro de 0,4 μ m, Corning (Nueva York, EE. UU.). A fin de optimizar el pre tratamiento de los insertos, éstos se pre-trataron durante 2 h a 37 °C con diferentes soluciones: Matrigel al 2 % en PBS, Matrigel 2 % en PBS y colágeno IV (50 μ g/mL) en agua o Colágeno IV (50 μ g/mL) en HCl 0,05 M.

Para la siembra de la monocapa de organoides, al día tres de cultivo los organoides se removieron de la matriz y se disgregaron mecánicamente por pipeteo o enzimáticamente con una incubación con TripLE durante 5 minutos a 37 °C. Luego, se sembraron en la cámara apical de los transwells en 100 μ L de medio de organoides de colon (recombinante) suplementado con 10 μ M de SB202190 y 10 μ M de Y-27632. El medio de la parte apical se

cambió cada 48 h y se siguió la adhesión y crecimiento de la monocapa por microscopía de campo claro y epifluorescencia.

5.2.10. Co-Cultivo de organoides intestinales con fibroblastos murinos.

El co-cultivo de organoides intestinales con fibroblastos se realizó pre-tratando los transwells con una solución de matriz al 2 % en PBS por 2 horas a 37 °C. Luego de ese tiempo se lavaron dos veces con PBS y se mantuvieron a 37 °C hasta la siembra de los fibroblastos. Las células NIH-3T3 se tripsinizaron, se contaron y se sembraron en una densidad de 5×10^4 células por inserto, utilizando la cara inferior del transwell. Para ello las células se resuspendieron en un volumen reducido (50 μ L) y la placa con los transwells se invirtió para poder sembrar los fibroblastos en la cara apical de la membrana. La placa con los transwells se incubó a 37 °C por 45 min para permitir la adhesión. Transcurrido este tiempo, se aspiró el medio remanente y los transwells se colocaron nuevamente en la posición original. Se colocó 900 μ L de medio completo de organoides en la cara basal y 100 μ L de PBS en la cara apical. Los organoides fueron removidos de la matriz, lavados con PBS y disgregados con el agregado de TripLE. Luego de 5 minutos a 37 °C la suspensión celular se filtró a través de una mesh de 30 μ m. Se removió el PBS de la cara apical de los transwells y se agregó 100 μ L de la suspensión celular de los organoides con 2×10^5 células por transwell. El medio de cultivo de la cara apical se suplementó con CHIR99021 (2,5 μ M), SB202190 (10 μ M), N-acetilcisteína (1 mM), Nicotinamida (10 mM) y el inhibidor Y-27632 (10 μ M) y se renovó cada 48 horas. Como control se utilizaron pocillos que contenían transwells con organoides pero sin fibroblastos en la cara basolateral.

5.2.11. Medición de la resistencia transepitelial (TEER)

El crecimiento de la monocapa se evaluó mediante la medición de la resistencia transepitelial (TEER, por sus siglas en inglés) diariamente. Para ello se empleó un voltímetro epitelial EVOM2 con electrodos STX3 (World Precision Instruments, Sarasota, EE.UU.) que fueron introducidos entre los compartimentos apical y basolateral de los insertos. Cada transwell fue medido tres veces. La resistencia eléctrica transepitelial de cada condición se obtuvo restando la resistencia medida en los transwells sin organoides y pre-tratados con Matrigel al 2 %, de la resistencia total medida y corregida por la superficie del inserto (0,33 cm²) para expresarla en ohmios por cm².

5.2.12. Inmunomarcación de los co-cultivos

Al día 7 las monocapas formadas se analizaron por microscopía de fluorescencia. Para ello se removió el medio en ambas caras del transwell y se realizaron tres lavados con PBS. A continuación, las membranas de los transwells se retiraron del inserto utilizando un bisturí y se cortaron en cuatro fragmentos. Las secciones de membrana fueron fijadas con una solución de PFA al 4 % (v/v) a temperatura ambiente durante 15 minutos. La permeabilización se realizó a temperatura ambiente con Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en PBS durante 15 minutos y luego se bloqueó con BSA al 2,5 % (p/v) en PBS durante 1 hora. Las muestras se incubaron con un anticuerpo primario anti-Ki67 ab15580 (Abcam, Cambridge, Reino Unido; dilución 1:500) y la sonda WGA conjugada a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Waltham, EE. UU., dilución 1:1000) o el anticuerpo primario anti-Ocludina (Abcam, Cambridge, Reino Unido; dilución 1:500), y con la sonda Hoechst 33342 (Invitrogen, Waltham, EE. UU.; dilución 1:1000) para teñir los núcleos, en buffer con 2,5 % de BSA, Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en PBS durante la noche a 4 °C en cámara húmeda. Después de la incubación, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Cy5 (Invitrogen, Waltham, EE. UU.) (dilución 1:500) y con la sonda Phalloidin-Texas Red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) durante 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente. Los fragmentos de membrana se montaron entre dos cubreobjetos utilizando ProLong® Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) como medio de montaje. Las imágenes se adquirieron en el microscopio confocal Zeiss LSM 880 equipado con los objetivos 40X y 63X y los láseres 405, 488, 561 y 631 nm. Las imágenes se procesaron utilizando el software Fiji.

5.3. Resultados

5.3.1. Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de compuestos solubles derivados de microbiota intestinal humana con organoides reporteros para NF- κ B

Basándonos en la respuesta de los organoides reporteros desarrollados en el capítulo 1, para validar el modelo reportero, seleccionamos los organoides derivados de la región que mostró mejor respuesta a TNF- α (organoides de yeyuno estimulados con 10 ng/mL de TNF- α) y evaluamos la modulación de la activación de NF- κ B frente a compuestos conocidos por interferir en dicha vía de señalización (**Figura 20a**).

La dexametasona (Dex) y el BAY11-7082 (Bay), ambos compuestos sintéticos conocidos por su efecto antiinflamatorio, redujeron significativamente la activación de NF- κ B inducida por TNF- α , según lo indicado por la disminución de la actividad de luciferasa (la activación de NF- κ B se expresa como el cociente entre cada condición y su control sin estimular (**Figura 20b**). Luego, evaluamos el uso de medios condicionados (MC) derivados de bacterias. Por un lado se emplearon MC de *L. plantarum* y *L. reuteri*, dos probióticos conocidos por sus efectos inmunomoduladores [141], [142]. Estos dos MC lograron reducir significativamente la activación de NF- κ B inducida por TNF- α (**Figura 20c**). Por otro lado, como aplicación del modelo, se evaluaron medios condicionados de bacterias aisladas de microbiota humana crecidas en un medio enriquecido YCFA que permite el crecimiento de varios géneros de bacterias anaerobias, para las cuales no teníamos información previa sobre su potencial antiinflamatorio. De las 8 muestras analizadas, todas ellas redujeron significativamente la activación de NF- κ B inducida por TNF- α (**Figura 21a**). Sin embargo, el porcentaje de viabilidad de los organoides luego del tratamiento con diferentes MC fue dispar. De hecho, cabe destacar que las muestras número 1, 15 y 20 si bien produjeron una modulación negativa de la actividad de NF- κ B medida a través de la emisión de luz, su respuesta se correlaciona con una muy baja viabilidad celular (cerca o inferior al 50 %), por lo que en estas condiciones no podemos asegurar que el efecto sobre la actividad reportera de estos organoides se deba a una modulación negativa de la vía de NF- κ B, sino más probablemente a un efecto citotóxico (**Figura 21b**). Al corregir los datos de luminiscencia considerando los valores aportados por el MTT, se observa que sólo tres medios condicionados disminuyen significativamente la activación de NF- κ B inducida por TNF- α en las condiciones ensayadas (**Figura 21c**, muestras MC 6, 14 y 18).

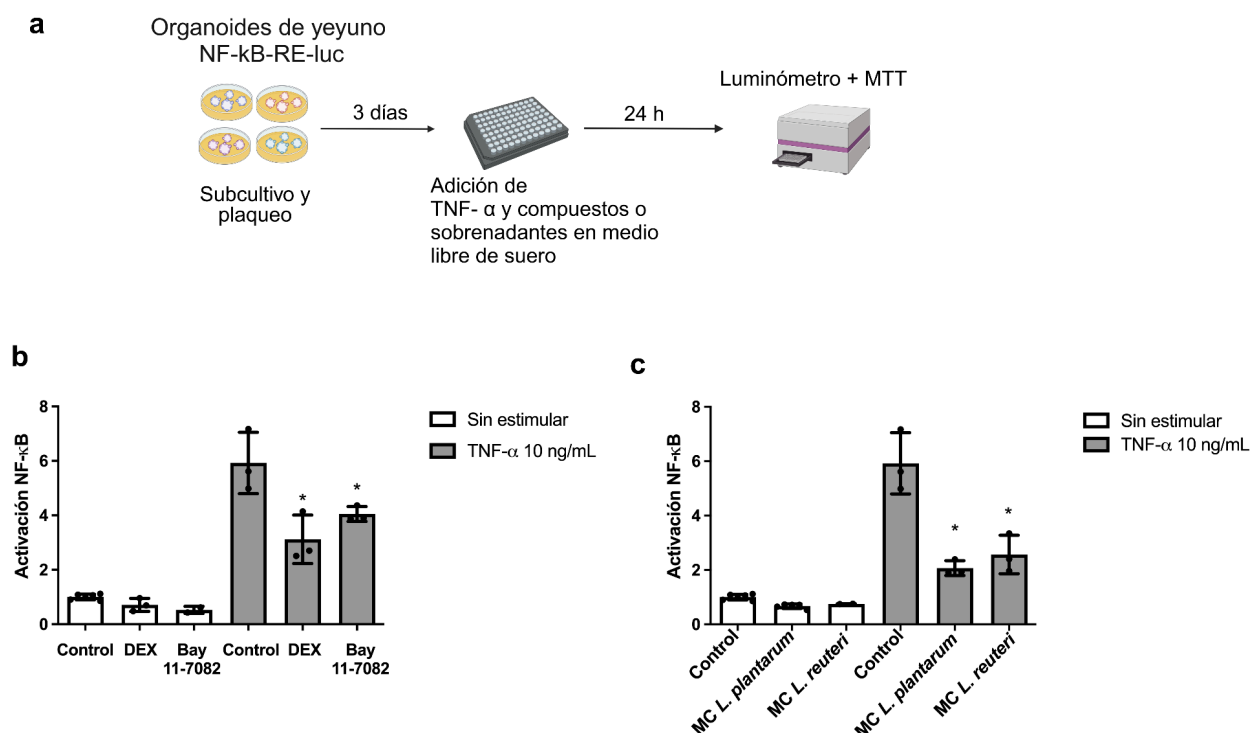


Figura 20. Evaluación de la actividad moduladora de la activación de NF-κB de compuestos. **a)** Los organoides NF-κB-RE-Luc fueron estimulados con 10 ng/mL de TNF-α y los diferentes sobrenadantes condicionados por 24 h. La activación de NF-κB se calculó relativizando las unidades relativas de luz de los organoides estimulados con respecto a la señal de los controles sin estimular. **b)** Validación del ensayo reportero en los organoides con inhibidores conocidos de NF-κB: Dexametasona (DEX) y BAY 11-7082. **c)** Medios condicionados (MC) de bacterias probióticas *L. plantarum* (ATCC 8014) y *L. reuteri* (ATCC 23272). Los datos se expresaron como la media ± SD de los triplicados de un experimento representativo. ANOVA de una vía y post-test de Dunnett, *P < 0,05, diferencias significativas con respecto al control estimulado con TNF-α.

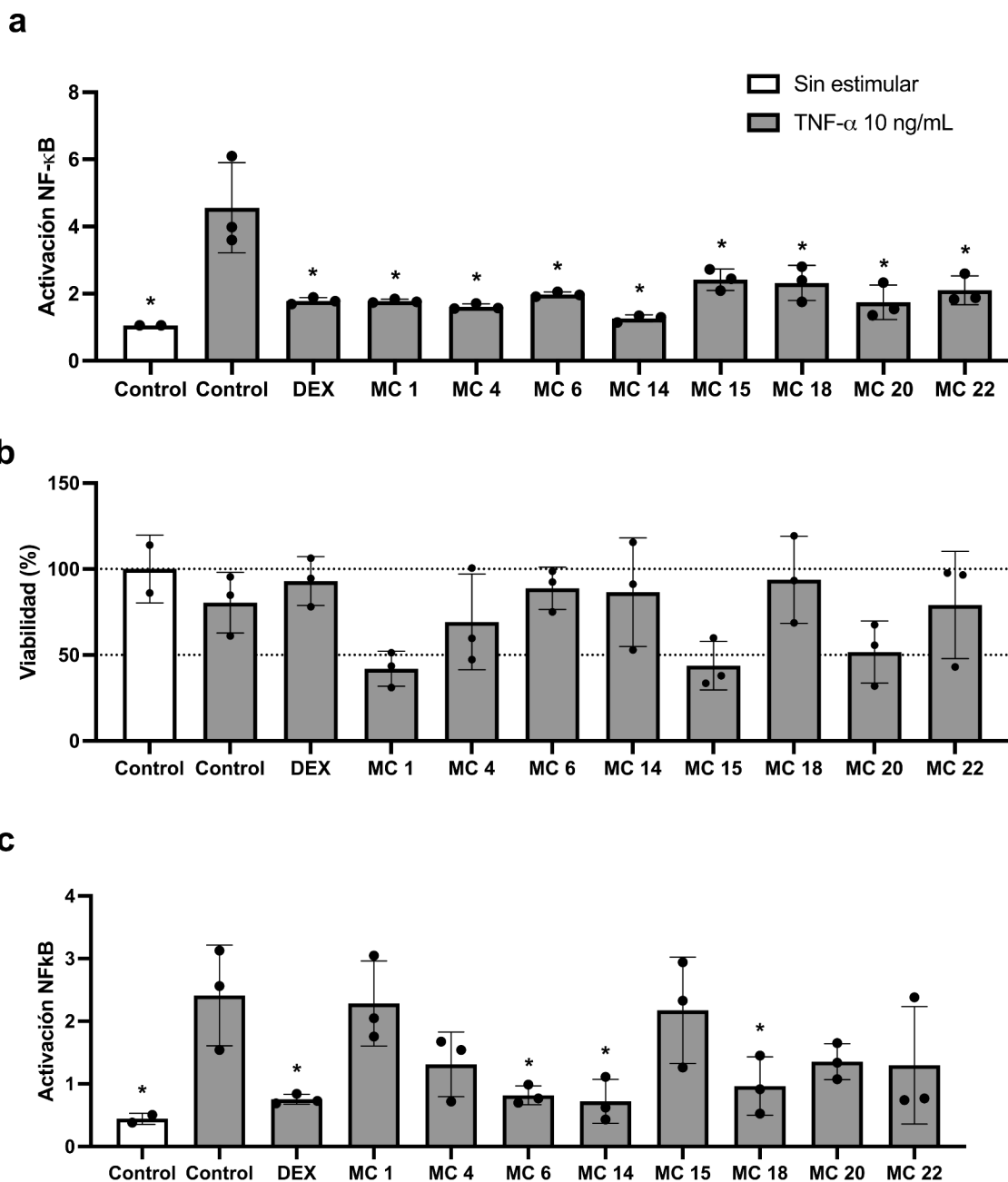


Figura 21. Evaluación de la actividad moduladora de la activación de NF-κB de compuestos solubles derivados de la microbiota humana. Los organoides NF-κB-RE-Luc fueron estimulados con 10 ng/mL de TNF-α y los diferentes sobrenadantes condicionados por 24 h. La activación de NF-κB se calculó relativizando las unidades relativas de luz de los organoides estimulados con respecto a la señal de los controles sin estimular. La DEX se incorporó como control de un compuesto modulador. **a)** Medios condicionados (MC) de bacterias aisladas de materia fecal humana. **b)** Citotoxicidad de las condiciones ensayadas en (a) evaluada con el método de MTT. **c)** Activación de NF-κB normalizada con los datos de MTT. Los datos se expresaron como la media $\pm$ SD de los triplicados de un experimento representativo; ANOVA de una vía y post-test de Dunnett, * $P < 0,05$, diferencias significativas con respecto al control estimulado con TNF-α.

5.3.2. Optimización de la infección de organoides con *Trypanosoma cruzi* en formato 3D

En la etapa crónica el colon es uno de los sitios donde el parásito es capaz de persistir indetectable en el organismo. La colonización del tejido intestinal por *T. cruzi* ocurre probablemente mediante la extravasación de los tripomastigotes circulantes en sangre hacia el espacio intersticial, seguida por la invasión de células desde la cara basolateral del tejido. Se ha reportado que las células del músculo liso y del sistema nervioso que rodean el colon son un blanco de la infección por el parásito [132], [143], [144]. No obstante, hasta el momento no se ha explorado completamente la interacción de *T. cruzi* con el epitelio intestinal, salvo con métodos tradicionales de cultivo celular. Tampoco se ha reportado acerca de la capacidad del parásito para colonizar las células epiteliales del colon, a pesar de que este órgano es una diana importante de la infección, el daño y la persistencia de este patógeno. Por lo tanto, para abordar esta pregunta, se procedió a establecer un protocolo de infección de *T. cruzi* (Dm28C) en organoides derivados de colon en su formato 3D. Para ello se probaron diferentes estrategias para elegir las condiciones óptimas de infección (**Tabla 9**).

Tabla 9. Condiciones evaluadas para infección de organoides con *T. cruzi*.

Condiciones ensayadas	
Fuente de parásitos	Cultivos envejecidos: forma epimastigota Infección de células Vero: forma tripomastigota
Modo de incubación	Directo en la matriz En suspensión
Tiempo y temperatura de incubación	4 h en baño de hielo 30 min 37°C + 4 h en baño de hielo 2 h 37 °C + 4 h en baño de hielo 2 h 37 °C
MOI (multiplicidad de infección Célula epitelial:célula de <i>T. cruzi</i>)	1:15 1:40 1:100

Inicialmente, los parásitos fueron colocados directamente en el medio de cultivo de los organoides, pero se detectó que no podían penetrar la gota de matriz extracelular donde están embebidos los organoides. Por este motivo, se optó por incorporar los parásitos directamente en la matriz líquida (en baño de hielo) con los organoides. La imagen representativa de la **Figura 22a** muestra que bajo esta condición, sólo una pequeña fracción de las células del organoide está infectada. Esto sugeriría que podría deberse a un impedimento físico de los parásitos para moverse libremente a través de la matriz, a continuación, los organoides fueron expuestos a los tripomastigotas antes de incluirlos en la matriz. Por lo tanto, se procedió a retirar los colonoides de la matriz e incubarlos en suspensión en medio líquido junto con los parásitos por diferentes tiempos y a diferentes temperaturas para posteriormente sembrarlos en la matriz. Como muestra la **Figura 22b**, los epimastigotas obtenidos a partir de cultivos envejecidos no fueron capaces de generar infección en la mayoría de los colonoides, aún empleando MOI elevadas. Finalmente, se definió el siguiente esquema apropiado para los experimentos de infección: incubación de organoides en suspensión con parásitos infectivos (obtenidos a partir de células Vero infectadas) durante 2 horas a 37°C, y posterior siembra en gotas de matriz. Mantener el cultivo por 72 horas post infección (hpi) antes de fijarlos (**Figura 22c, d**).

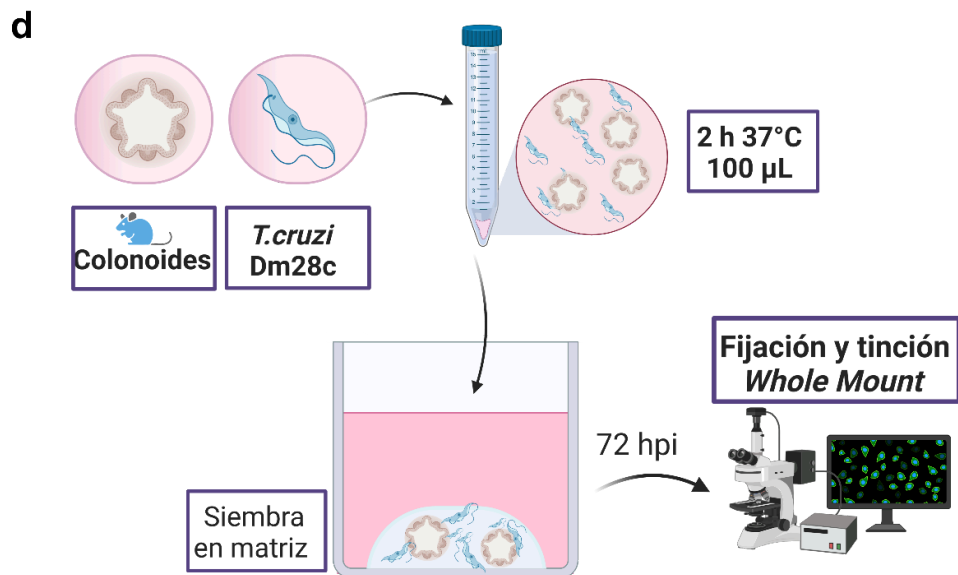
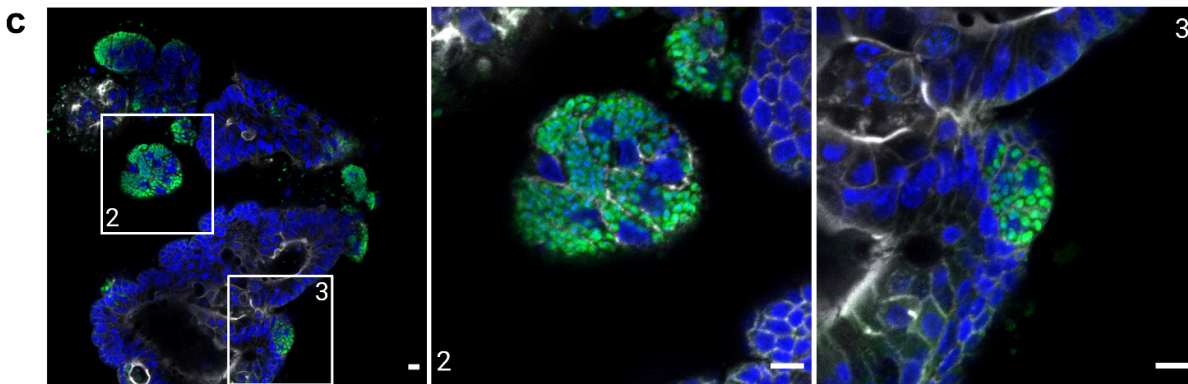
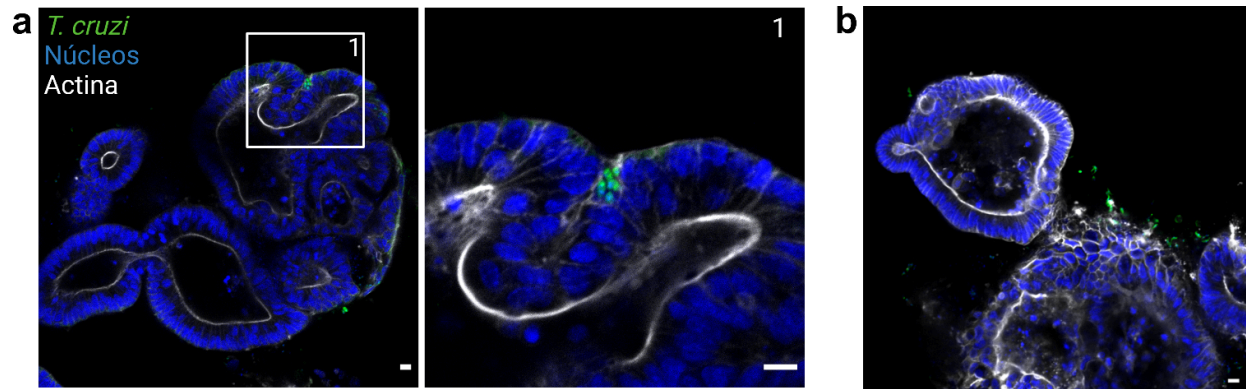


Figura 22. Imágenes representativas de diferentes ensayos de infección de organoides con *T. cruzi*. Los colonoides murinos fueron retirados de la matriz y posteriormente fueron directamente sembrados con los parásitos o incubados durante 2 horas en suspensión a 37 °C antes de resuspenderlos en la matriz. A las 72 hpi, la carga parasitaria fue evaluada mediante microscopía confocal. **a)** Imagen representativa de organoides infectados con parásitos tripomastigotas (MOI 1:15) incluidos directamente en la matriz. **b)** Imagen representativa de organoides infectados con parásitos epimastigotas (MOI 1:40) incluidos directamente en la matriz. **c)** Imagen representativa de organoides infectados con parásitos tripomastigotas (MOI 1:15) en ausencia de matriz. **d)** Esquema del protocolo de infección optimizado. Escala = 10 µm. Núcleos (azul, Hoechst 33342), *T. cruzi* (verde, anticuerpo anti-tripanotona reductasa), y Actina (blanco, Faloidina - Texas Red).

5.3.3. Infección de organoides intestinales murinos con *T. cruzi* en formato 3D

Una vez definido el protocolo de infección, los organoides derivados de colon se incubaron con tripomastigotes de *T. cruzi*, y la invasión celular se evaluó mediante microscopía confocal a las 72 hpi. (MOI 1:15). Este procedimiento permitió detectar varios focos de infección en los colonoides que se limitaron a zonas discretas de los mismos (**Figura 23a**). Para comprobar si este patrón de colonización del parásito es específico, los colonoides se infectaron nuevamente en suspensión pero empleando una MOI más alta (1:100; **Figura 23b**). Aunque esta condición resultó en un aumento general en el número de parásitos por organoide (**Figura 23c**), la infección aún continuó focalizándose en células/áreas específicas de los organoides (**Figura 23b**).

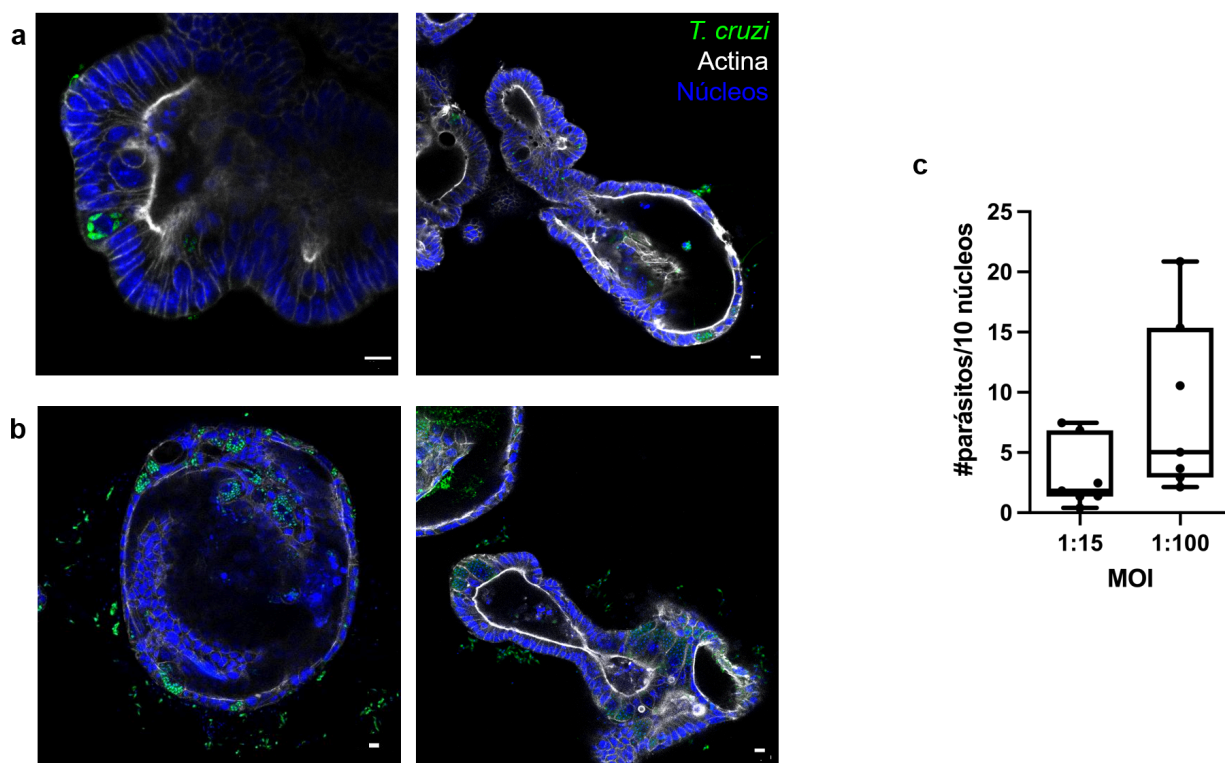


Figura 23. Infección de organoides de colon murino con *T. cruzi*. Los organoides fueron retirados de la matriz y, posteriormente, fueron directamente incubados durante 2 horas en suspensión a 37 °C con una MOI 1:15 (a) o 1:100 (b). A las 72 hpi, la carga parasitaria fue evaluada mediante microscopía confocal. c) Número de parásitos intracelulares cada 10 células de organoide evaluado a las 72 hpi. Datos de un experimento representativo de 2 experimentos independientes (líneas de organoides diferentes por experimento). Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico y se comparan mediante la prueba de Mann-Whitney (n = 7). Escala = 10 µm. Núcleos (azul, Hoechst 33342), *T. cruzi* (verde, anticuerpo anti-tripannotion reductasa), y Actina (blanco, Faloidina - Texas Red).

Para estudiar la cinética de invasión del parásito en los colonoides infectados, se cuantificó la carga parasitaria mediante microscopía confocal a las 24, 48 y 72 hpi (**Figura 24**). A las 24 horas, resultó difícil detectar los organoides infectados por microscopía ya que sólo se detectó uno o dos parásitos por célula infectada. Este número aumentó entre 6 y 19 veces a las 48 y 72 horas, lo que indica que *T. cruzi* es capaz de replicarse una vez que invade las células del organoide (**Figura 24**). Cabe destacar que independientemente de las condiciones de infección, los tripomastigotes internalizados pudieron diferenciarse en amastigotes replicativos, visualizados como pequeñas células de forma redondeada, que se dividieron activamente dentro de las células de los colonoides en la ventana de tiempo analizada.

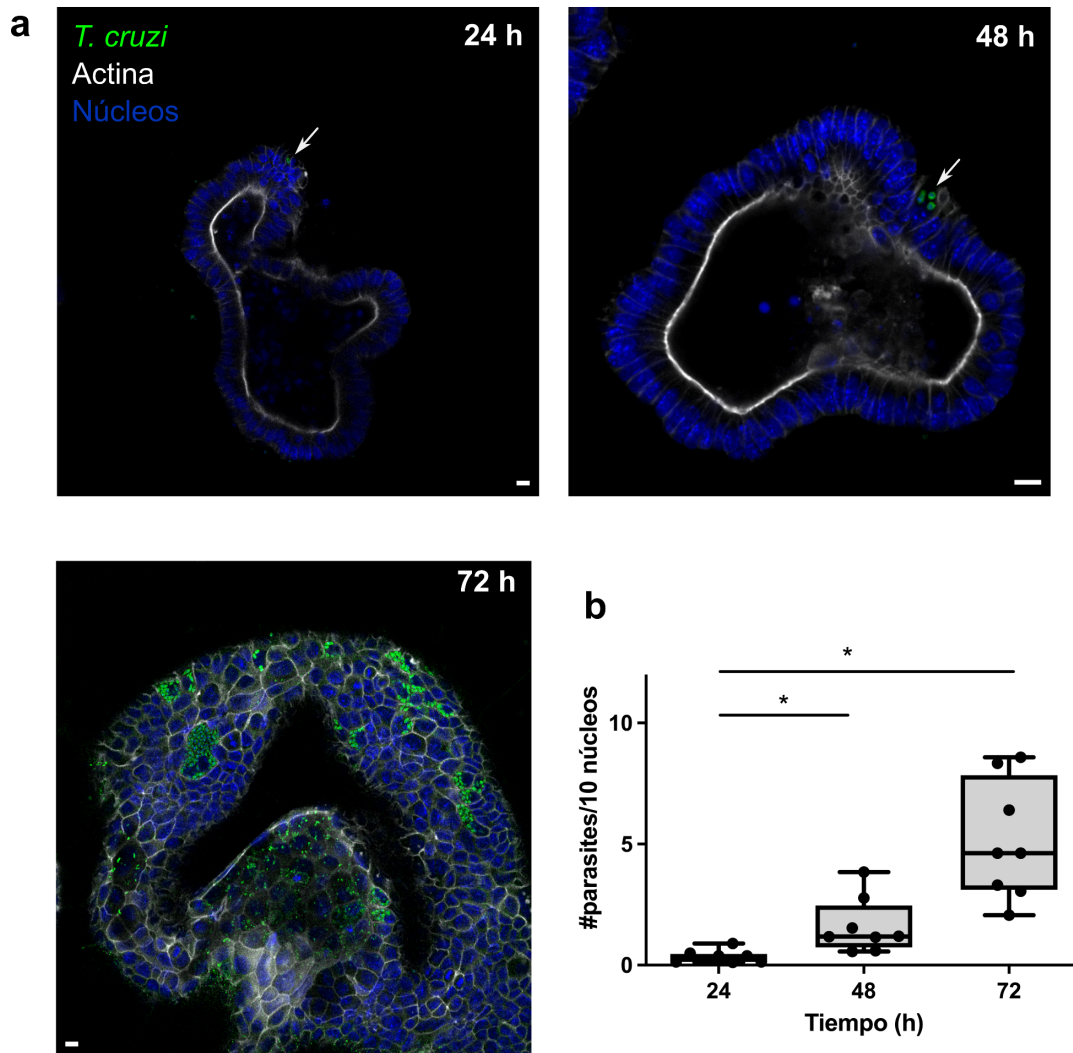


Figura 24. Cinética de la infección de colonoides por *T. cruzi*. (a) Imágenes representativas de organoides infectados con tripomastigotas (MOI 1:15) e incubados durante 24, 48 o 72 h. Las flechas indican células infectadas a 24 y 48 hpi. (b) Cuantificación del número de parásitos intracelulares cada 10 células a distintos tiempos. Datos de un experimento representativo de 2 experimentos independientes. Los datos se expresan como la mediana y rango intercuartílico y se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn's ($n = 8$), $*p < 0,05$. Escala = 10 μm . Núcleos (azul; Hoechst 33342), *T. cruzi* (verde, anticuerpo anti-tripanonina reductasa), y Actina (blanco, Faloidina - Texas Red).

Por otro lado, se procedió a comprobar si este patrón de infección del parásito se observaba en los organoides derivados de intestino delgado. Los organoides derivados de colon y yeyuno se infectaron con el protocolo optimizado y se evaluó la cantidad de parásitos a las 72 hpi por microscopía confocal (**Figura 25**). Los organoides derivados de yeyuno

presentaron menor número de parásitos por organoide en comparación a los organoides derivados de colon infectados con una MOI 1:15. Esta diferencia se mantuvo aún cuando los organoides de yeyuno se infectaron con una MOI mayor (1:100), lo que concuerda con los hallazgos clínicos de la enfermedad crónica donde el colon es el tejido afectado. Dada esta diferencia en la capacidad de infección y dada la relevancia del colon en la etapa crónica de la enfermedad, para los siguientes ensayos se procedió a utilizar exclusivamente organoides de colon.

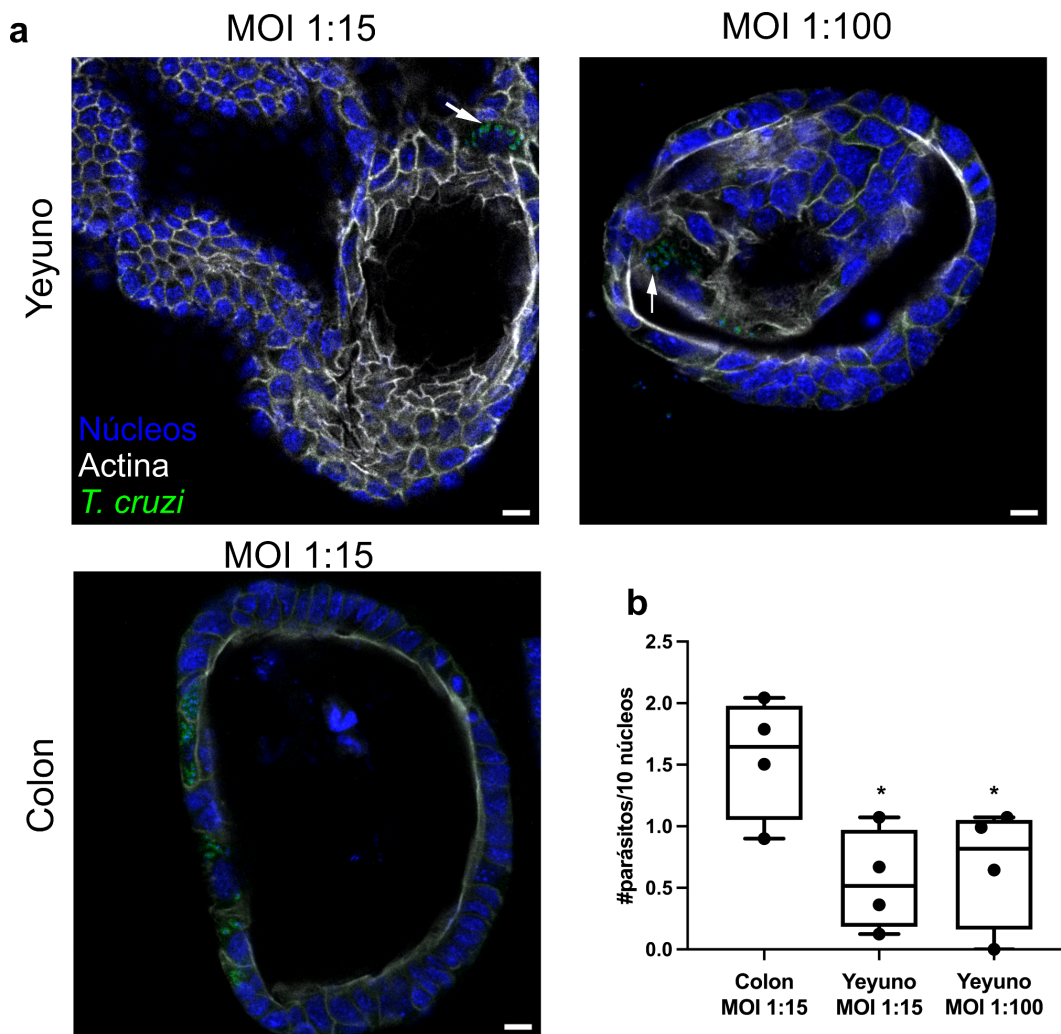


Figura 25. Infección de organoides de colon y yeyuno murino con *T. cruzi*. Los organoides fueron retirados de la matriz e incubados durante 2 h en suspensión a 37°C con las MOI indicadas. A las 72 hpi, la carga parasitaria fue evaluada mediante microscopía confocal. **a)** Imágenes representativas de los organoides infectados. **b)** Número de parásitos intracelulares cada 10 células de organoide evaluado a las 72 hpi. Datos de un experimento representativo de 2 experimentos independientes. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico y se comparan mediante la prueba de ANOVA de una vía y post-test de Dunnett (n = 4), *p<0,05. Escala = 10 µm. Núcleos (azul; Hoechst 33342), *T. cruzi* (verde, anticuerpo anti-tripanonotona reductasa), y Actina (blanco, Faloidina - Texas Red).

5.3.4. Evaluación de la preferencia de *T. cruzi* por células proliferativas en colonoides infectados

Debido a las observaciones que los sitios de infección estaban restringidos a algunas regiones discretas de los colonoides, independientemente de la MOI utilizada, se procedió a determinar si los parásitos tenían preferencia por algún tipo particular de célula. Por lo tanto, los parásitos y los colonoides se incubaron durante 2 horas en suspensión con un MOI de 1:15 y luego se cultivaron durante 72 horas. Para evaluar si existía preferencia por células proliferativas o células diferenciadas (no proliferativas), las células proliferativas de los colonoides infectados (células madre y células progenitoras) se detectaron mediante tinción con el anticuerpo anti-Ki67 (**Figura 26**). Tanto las células proliferativas (Ki67 positivas; **Figura 26a**) como las no proliferativas (Ki67 negativas; **Figura 26b**) fueron infectadas por los parásitos. Por otro lado, las células secretoras especializadas como las células caliciformes, que son muy abundantes en colon, se identificaron mediante tinción con WGA, pero no se detectaron parásitos infectando este tipo celular (**Figura 26c**).

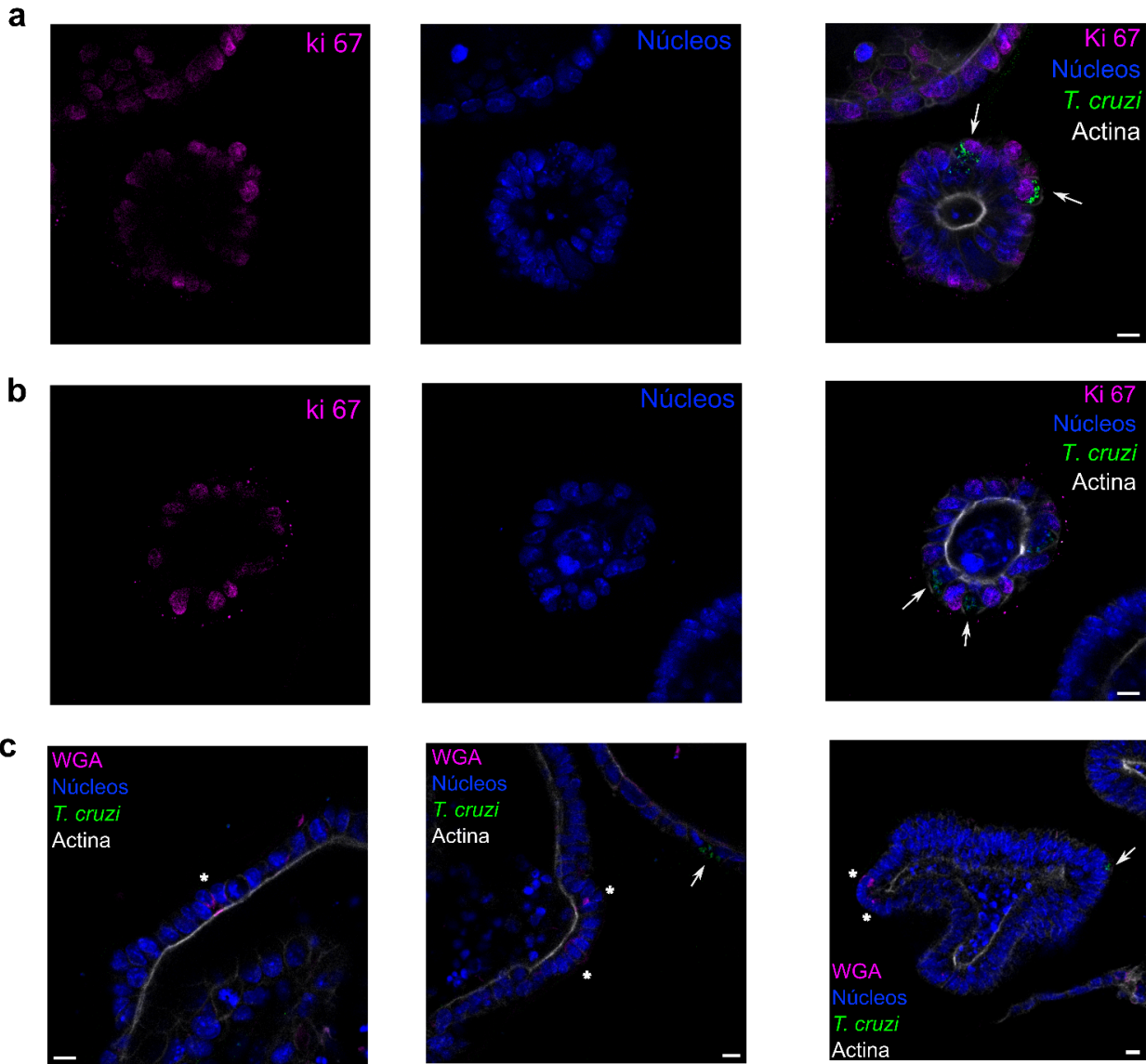


Figura 26. Evaluación del tropismo de *T. cruzi* por células del epitelio intestinal. Imágenes representativas de organoides infectados con parásitos (MOI 1:15) analizados 72 hpi. Las flechas indican las células infectadas. Se detectan parásitos infectando tanto células Ki67 (magenta) (a) positivas como (b) negativas. (c) Las células caliciformes detectadas (*) no resultaron infectadas, mientras que en el mismo campo (flechas blancas) fue posible evidenciar células infectadas. Núcleos (azul, Hoechst 33342), *T. cruzi* (verde, Ac anti-peroxirredoxina mitocondrial), Actina (blanco, Faloidina-Alexa Fluor647), y células caliciformes (magenta, WGA-Alexa Fluor 555) Escala = 10 μ m.

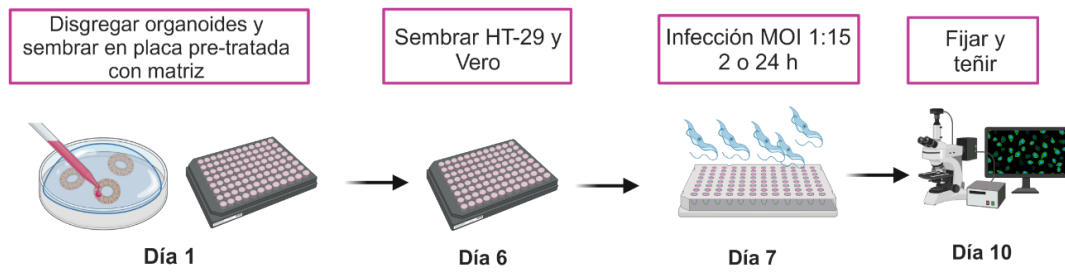
5.3.5. Infección de organoides intestinales murinos con *T. cruzi* en formato monocapa (2D)

Con el fin de evaluar si existía alguna preferencia del parásito para infectar las diferentes caras del epitelio intestinal, se propuso evaluar un método de infección desde la cara apical. Para ello, se desarrolló un protocolo sencillo de cultivo en monocapa de los organoides (**Figura 27a**), de modo de facilitar el acceso por el lado apical del parásito al repertorio completo de células epiteliales presentes en los colonoides. Previamente, se debió optimizar el cultivo de organoides en monocapa empleando el formato de placa de 96 pocillos. Los organoides se retiraron de la matriz, fueron disgregados mecánica y enzimáticamente hasta obtener una suspensión celular homogénea y esta suspensión celular se sembró en una placa multipocillo pretratada con matriz.

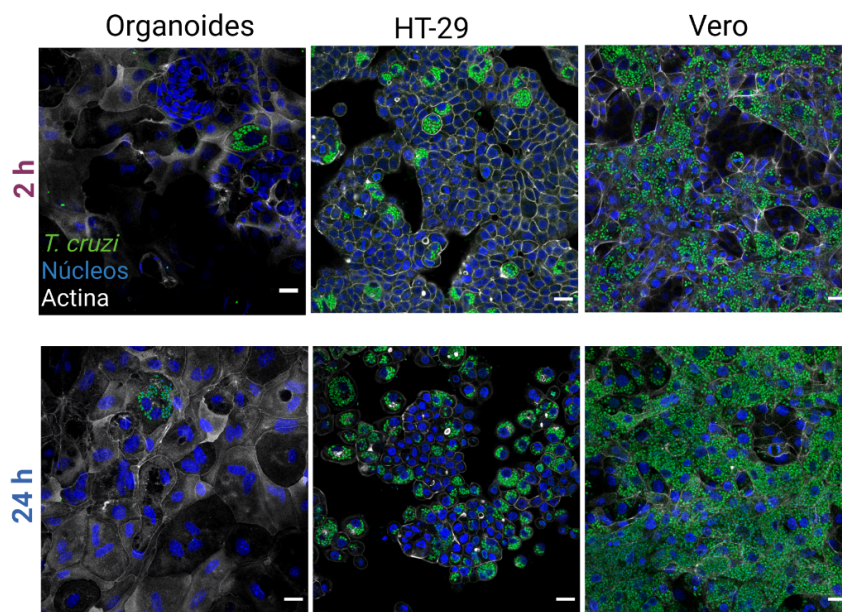
Una vez que la monocapa alcanzó la confluencia, se añadieron tripomastigotas a una MOI de 1:15 y se incubaron durante 2 o 24 horas. Tras la eliminación de los parásitos no internalizados mediante sucesivos lavados con PBS, la incubación se prolongó durante un total de 72 horas y se evaluó la cantidad de parásitos por microscopía confocal al igual que para el sistema en 3D. A modo de comparación, se infectaron simultáneamente con *T. cruzi* una línea celular tumoral de colon humano (línea celular HT-29) y una de riñón de mono verde, utilizada de rutina para el cultivo de los parásitos (línea celular Vero), utilizando las mismas condiciones que para las células de los colonoides. De manera similar a los hallazgos obtenidos en las infecciones por la cara basolateral de colonoides intactos, *T. cruzi* infectó solo un número discreto de células epiteliales a pesar de la gran disponibilidad de área de células en el cultivo derivado de organoides en 2D (**Figura 27b**). Prolongar el tiempo de exposición de la monocapa a tripomastigotes extracelulares de 2 a 24 h no produjo cambios significativos en el número de células infectadas por campo o en la cantidad de amastigotas por célula (**Figura 27c, d**). Cabe mencionar que un breve tiempo de infección (2 h) también llevó a una infección parcial en las células epiteliales intestinales humanas HT-29, aunque el número de parásitos/células y de células infectadas fue ligeramente superior al observado en las células derivadas de los colonoides. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con los colonoides, al extender la exposición de la línea HT-29 a los tripomastigotes a 24 h, resultó en un aumento significativo de casi 4 veces en el porcentaje de células infectadas y el número de parásitos por célula (**Figura 27c, d**). No obstante, el nivel de infección logrado en esta línea celular no alcanzó el máximo obtenido en las células Vero, que es la línea celular utilizada para obtener parásitos infectivos (**Figura 27b**). De hecho,

una incubación de 2 horas de este tipo celular con tripomastigotas a la misma MOI resultó en un 75 % de infección de la monocapa celular, cifra que llegó a un máximo del 98 % cuando la incubación se extendió a 24 h (Figura **27b, d**). De hecho, el número de amastigotes por célula Vero se duplicó al prolongar el tiempo de incubación de 2 a 24 h, lo que podría deberse a un mayor número de tripomastigotas invadiendo una misma célula (**Figura 27c**). Para todas las condiciones ensayadas, el parásito fue capaz de completar su ciclo de diferenciación y multiplicación dentro de las diferentes células hospederas. En general, estos datos indican que ciertas células derivadas de colonoides y de la línea celular de cáncer colorrectal HT-29 son susceptibles a la infección por *T. cruzi* Dm28c, siendo menos susceptibles a la infección por *T. cruzi* en comparación con la línea Vero que es altamente permisiva a la invasión y multiplicación del parásito. Por otro lado, en las infecciones de monocapas de organoides se repite la evidencia de la presencia de focos puntuales de infección al igual que lo observado en las infecciones 3D. Esto sugiere un posible tropismo celular del parásito que sería independiente del sitio de contacto (apical/basolateral) con el epitelio.

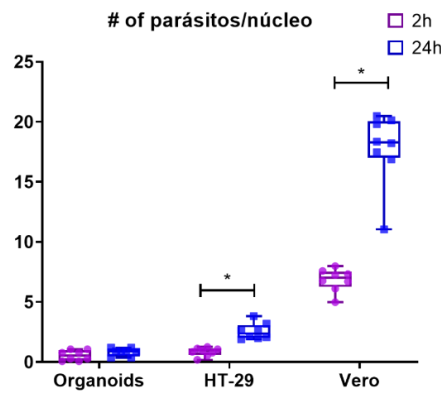
a



b



c



d

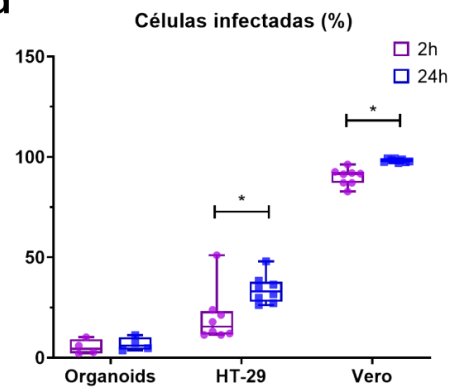


Figura 27. Infección de *T. cruzi* en monocapas celulares. Las monocapas de colonoides y las líneas celulares HT-29 y Vero, se incubaron con *T. cruzi* durante 2 o 24 horas y posteriormente se cultivaron durante 72 horas adicionales. **a)** Esquema del protocolo de infección en monocapa. Los organoides deben ser disgregados mecánica y enzimáticamente para posteriormente ser sembrados en una placa de 96 pocillos previamente tratada con matriz diluída. **b)** Imágenes representativas de las monocapas infectadas con tripomastigotas (MOI 1:15). El número de parásitos intracelulares por célula hospedera **(c)** y el porcentaje de células infectadas por campo **(d)** fueron cuantificados con el programa ImageJ. Se muestran los resultados de un experimento representativo de 2 experimentos independientes. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. Prueba de Mann-Whitney ($n = 8$), $*p < 0,05$. Escala = 25 μm . Núcleos (azul, Hoechst 33342), *T. cruzi* (verde, Ac. anti-tripanonina reductasa), y Actina (blanco, faloidína - Texas Red).

5.3.6. Optimización de un modelo de co-cultivo organoide-fibroblasto en formato Transwell

El sistema de co-cultivo de organoides con otros tipos celulares ofrece una representación más precisa del microambiente tisular, lo que puede mejorar la relevancia y la utilidad de los modelos de organoides. Por lo tanto, se procedió a optimizar un sistema de co-cultivo en formato de transwell para mejorar la complejidad y el valor predictivo de los ensayos *in vitro* con organoides murinos. Inicialmente se decidió comenzar con la incorporación de una línea de fibroblastos murinos (NIH 3T3) dado que los fibroblastos son una de las células principales del estroma presente en la lámina propia. Para ello se probaron diferentes condiciones empleando organoides intestinales derivados de cepas reporteras: Lgr5-GFP y Lgr5-Cre:Rosa26-mTmG que permitieron evaluar rápidamente las mejores condiciones para el cultivo (**Tabla 10**).

Tabla 10. Condiciones evaluadas para optimizar el co-cultivo en formato transwell.

Condiciones ensayadas		
Medio de expansión de organoides	<u>Colonoides:</u> - Medio de colonoides - Intesticult®	<u>Intestino Delgado:</u> - Medio de Int. Delgado - Medio de Int. Delgado con: - CHIR99021 3µM - CHIR99021 3µM + Ácido Valproico 2mM - CHIR99021 3µM + Wnt3a 100 ng/mL
Pre-tratamiento de los transwells	Matrigel 2% en PBS + colágeno 50 µg/mL IV en agua Matrigel 2% en PBS Colágeno IV 50 µg/mL en HCl 0,05 M	
Método de disgregación	Mecánica Enzimática - TrypLE	
Cantidad de muestra sembrada	0,5 well de organoides/inserto 1 well de organoides/inserto	

Para un correcto establecimiento de las monocapas a partir de un cultivo de organoides, es necesario obtener un cultivo de organoides con una gran cantidad de células proliferativas. Esto se debe a que el rendimiento en la siembra de monocapas es bajo debido a que sólo las células proliferativas serán capaces de dividirse para cubrir la superficie del transwell, y estas células suelen reducir su tasa de proliferación en formato monocapa. Para la elección del medio de cultivo inicial previo a la siembra de las monocapas, se procedió a realizar un cultivo de organoides y monitorear a distintos tiempos mediante microscopía de epifluorescencia la cantidad, forma y presencia de células madre (GFP positivas) en los organoides (**Figura 28a**). Si bien todos los medios de expansión utilizados permitieron la expansión de los organoides, para el caso de los organoides de intestino delgado el suplemento del medio con CHIR99021 y Ácido Valproico y con CHIR99021 y Wnt3A, indujeron un estado altamente proliferativo de los organoides, evidenciado por un mayor número de células GFP positivas por organoide, por lo que los organoides se encuentran en un estado altamente proliferativo. Por otro lado, en los organoides de colon, tanto el medio tradicional de colonoides como el medio comercial Intesticult presentaron un comportamiento

idéntico en cuanto a la cantidad de células proliferativas GFP positivas. Sin embargo, se detectó que con el medio Intesticult los organoides tendían a adherirse al fondo de la placa y diferenciarse, lo cual podría repercutir negativamente en la generación de las monocapas.

Por lo tanto, se definió que el mejor medio para producir monocapas derivadas de organoides es, para el caso de colonoides, el propio medio de expansión. Por su parte, para monocapas derivadas de organoides de intestino delgado es mejor suplementar con CHIR99021 y Wnt3a, siendo este último suministrado como medio condicionado LWRN al 50 %. Seguidamente se procedió a identificar el mejor pre-tratamiento de los insertos transwell que favorezca la adhesión de los organoides. Como se observa en la **Figura 28b**, los transwell recubiertos con matriz diluída al 2 % en PBS fueron los que permitieron una mejor adhesión y proliferación de las monocapas de los organoides. Por el contrario, las condiciones con colágeno IV no sólo presentaron menor adhesión sino que en el caso de la condición pre tratada con colágeno IV reconstituido en HCl 0,05 M se notó una mayor cantidad de acumulación de células formando organoides en lugar de monocapa. Por otro lado, se determinó que tanto la disgregación mecánica como la enzimática permiten la formación de monocapas viables en los organoides (**Figura 28c**). La principal ventaja de la disgregación enzimática es que posibilita estimar mejor el número de células sembradas por transwell, ya que permite hacer un recuento a partir de la suspensión celular. En cambio, la disgregación mecánica produce una suspensión de fragmentos de organoides heterogéneos difícil de estandarizar.

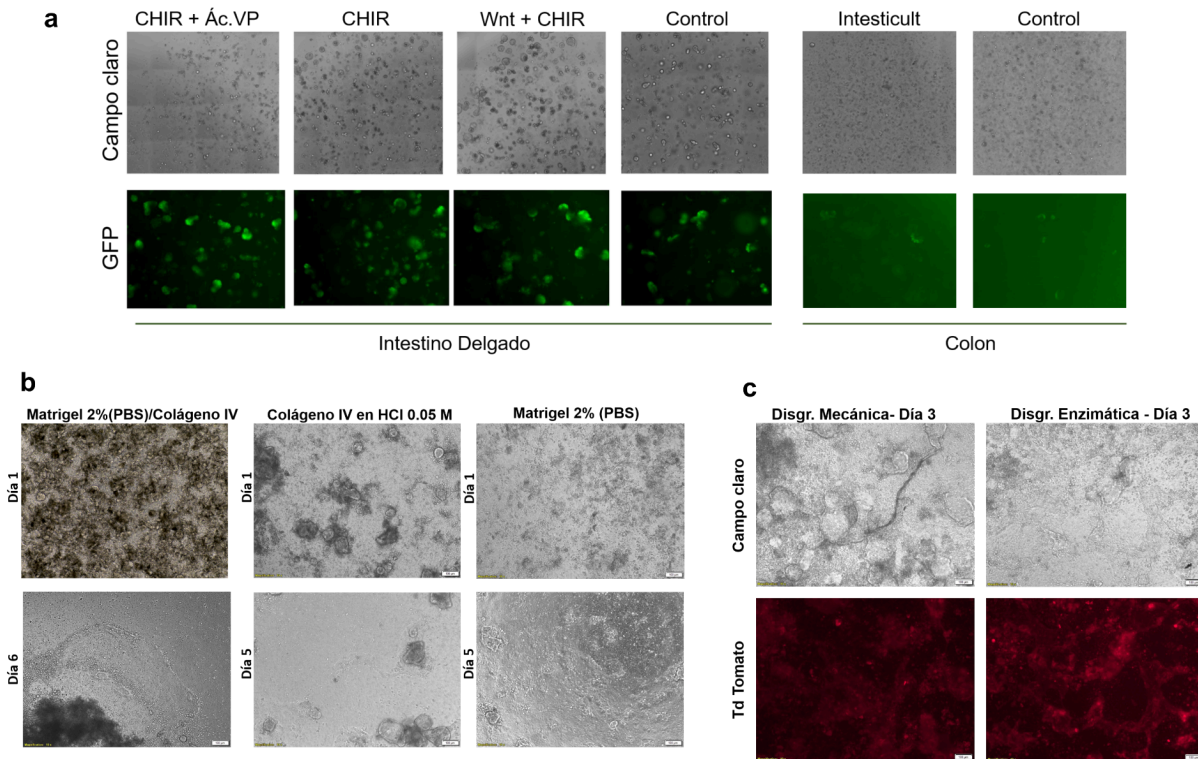


Figura 28. Optimización de los parámetros para el cultivo de organoides en monocapa en transwell. **a)** Los organoides reporteros Lgr5-GFP fueron utilizados para determinar el mejor medio de cultivo para promover una mayor proliferación de las células madre previo al cultivo en 2D. Se ensayaron diferentes pre-tratamientos de los transwells para favorecer la adhesión de las células derivadas de los organoides reporteros Lgr5-Cre:Rosa26-mTmG. Imágenes representativas de los organoides empleando diferentes pre-tratamientos de los transwells **(b)** y diferentes métodos de disociación **(c)**. Escala = 100 μ m.

Una vez optimizadas las condiciones de cultivo en monocapa en transwell, se procedió a incorporar la capa de fibroblastos al otro lado de la membrana del inserto. Los transwells fueron primero pre-tratados (con la solución de matriz en PBS al 2 %) por 2 h y luego lavados para proceder al agregado de los fibroblastos sobre la cara inferior del transwell en un volumen reducido (colocando los insertos en posición invertida). Se incubaron a 37 °C por 45 min para permitir la adhesión de los fibroblastos y simultáneamente se comenzó el procesamiento de los organoides para ser sembrados. Los transwells fueron colocados nuevamente en la posición correcta y se sembró la suspensión celular de organoides en la cara apical. Como control, se emplearon insertos sin el agregado de fibroblastos en la cara inferior. Una configuración de transwell permite medir la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) para evaluar el crecimiento del monocapa epitelial y la integridad de las uniones estrechas, ambos indicadores de la función de barrera epitelial, por lo que se procedió a

seguir la medida de la resistencia transepitelial a lo largo del tiempo (**Figura 29**). Los insertos de los co-cultivos organoide-fibroblasto presentaron valores de TEER mayores que los insertos control (sin fibroblastos). Esta diferencia fue más evidente en los insertos de intestino delgado que en los de colon. Además, por la tasa de aumento de TEER se observa que las monocapas de intestino delgado crecen más rápido que las de colon, pero la presencia de los fibroblastos no parece estar relacionada a este fenómeno. Por el contrario, al día 7 de cultivo, los co-cultivos colon:fibroblastos disminuyen su resistencia, mientras que la monocapa de yeyuno se mantiene estable, lo que indicaría que la presencia de los fibroblastos en ese momento de cultivo podría estar afectando la viabilidad de la monocapa de colon pero no la de yeyuno. Por lo tanto, los co-cultivos se podrían emplear para la infección con *T. cruzi* a partir del día 4 (cuando el valor de TEER es superior a $100 \Omega \text{ cm}^2$) y en el caso de colon, ese plazo no debería extenderse más allá del día 6 de cultivo. El aumento en la TEER que produce la presencia de los fibroblastos respecto a los transwell control se evidenció también mediante la detección de ocludina (**Figura 29b**), proteína presente en las uniones estrechas. Este aumento en la expresión de ocludina en los transwells que presentan fibroblastos también se vio acompañado de un aumento en el número de células caliciformes (WGA positivas) detectadas por campo, por lo que indicaría un aumento en el grado de diferenciación de la monocapa. Por el contrario, en cuanto a la cantidad de células proliferativas marcadas con ki67 no se detectaron diferencias entre las condiciones con y sin fibroblastos.

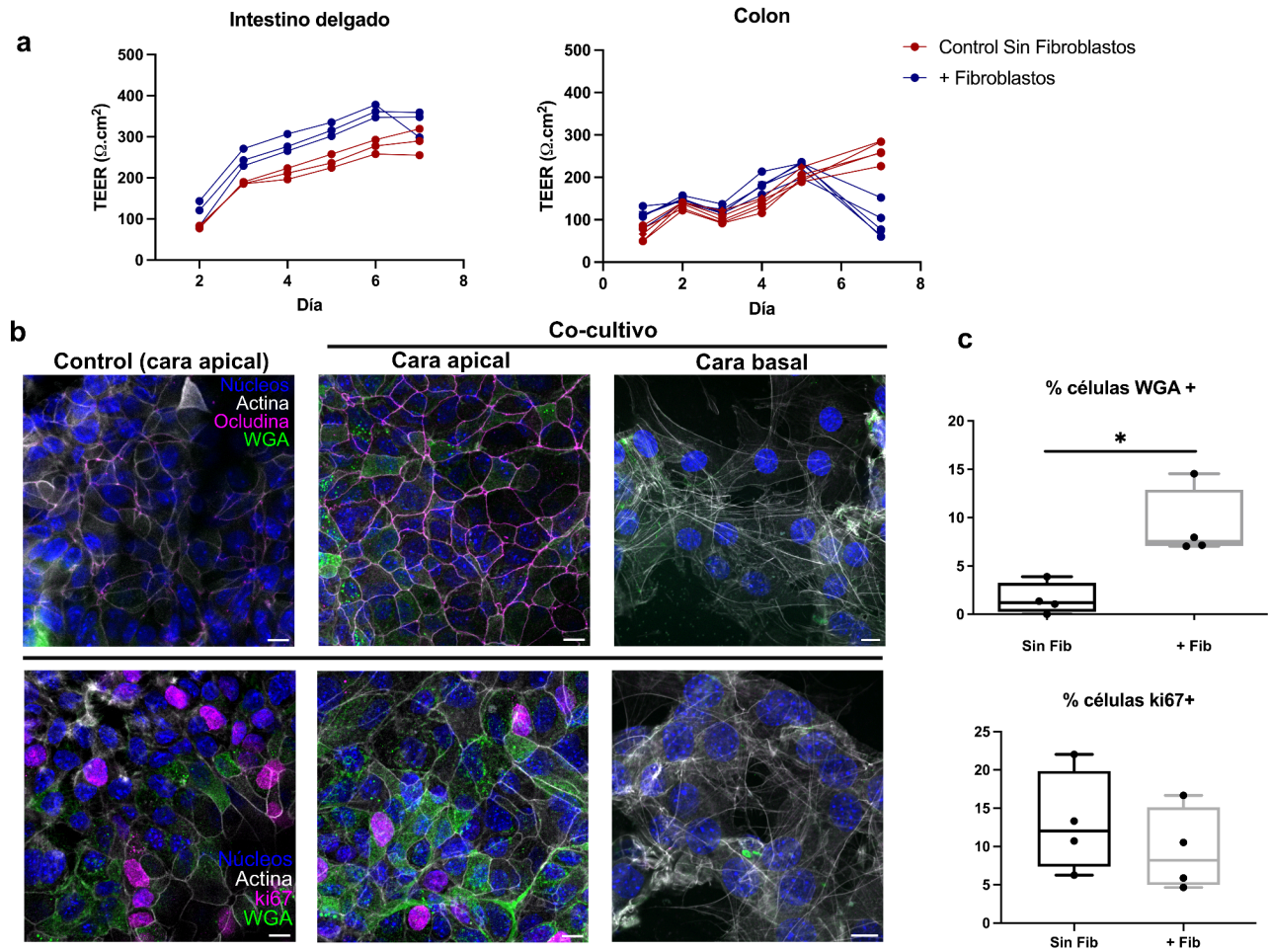


Figura 29. Co-cultivo de organoides intestinales con fibroblastos murinos (línea NIH-3T3). **a)** Los organoides se sembraron en transwells en presencia o ausencia de fibroblastos en la cara inferior y se siguió el crecimiento de la monocapa midiendo la resistencia transepitelial (TEER). **b)** Imágenes representativas de las monocapas al día 7 con la detección de ocludina o ki67 (magenta). **c)** El porcentaje de células positivas para ki67 o WGA por campo se cuantificó con Fiji. t-Test, * $p < 0,05$. Escala = 10 μm . Núcleos (azul, Hoechst 33342), Células caliciformes (verde, WGA - AF488), y Actina (blanco, faloidína - Texas Red).

5.4. Discusión

5.4.1. Capacidad inmunomoduladora de compuestos solubles derivados de la microbiota empleando el modelo de organoides intestinales reporteros para NF- κ B

La inflamación desempeña un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades intestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer colorrectal. El desarrollo de modelos *in vitro* que recrean la fisiología y composición celular del tejido permite obtener resultados con un valor predictivo superior al de los modelos 2D. En este sentido, con el fin de validar la utilidad de nuestro modelo, los organoides reporteros estimulados con TNF- α fueron desafiados con dos compuestos antiinflamatorios de probada actividad inhibitoria de la vía de señalización de NF- κ B. Ambos provocaron una disminución significativa en la actividad de luciferasa, poniendo en evidencia la habilidad del modelo para evaluar posibles inhibidores de NF- κ B. La dexametasona es un potente glucocorticoide conocido por inhibir la activación de NF- κ B. Mediante su unión a p65 y el posterior aumento de la tasa de exportación nuclear de dicha subunidad p65, logra la inhibición de la transactivación de genes blanco [145], [146]. Por su parte, el BAY 11-7082 tiene múltiples blancos, entre los cuales se ha documentado la inhibición de la fosforilación de I κ B- α , la cual es esencial para la liberación de NF- κ B del complejo citosólico I κ B- α /NF- κ B y por lo tanto impide la translocación de p65 al núcleo [147], [148].

En cuanto a los compuestos derivados de los sobrenadantes de bacterias probióticas, nuestros resultados sugieren que ambas cepas podrían secretar factores capaces de modular la activación de NF- κ B en las células epiteliales intestinales. *L. plantarum* es una de las especies de Lactobacillus más comúnmente detectadas en el intestino de voluntarios sanos. Se ha demostrado que ciertas cepas de *L. plantarum* mejoran los signos de colitis mediante la inhibición de la activación de NF- κ B mediada por LPS y mejora la disbiosis de la microbiota intestinal en un modelo murino de colitis inducida por dextran sulfato de sodio [141]. Asimismo, se ha descrito que los sobrenadantes de *L. plantarum* (sin presencia de células) pueden inhibir las vías de NF- κ B en líneas celulares intestinales inhibiendo la capacidad de unión de NF- κ B, la degradación de I κ B α y la actividad del proteasoma [149]. A través de la regulación directa o la modulación indirecta a través de la microbiota del hospedero, *L. reuteri* tiene un rol destacado en el control de infecciones y en la atenuación de enfermedades inflamatorias intestinales [150]. También se ha demostrado que algunas cepas pueden producir metabolitos solubles con propiedades antiinflamatorias. Por ejemplo, el medio condicionado de cepas de *L. reuteri* aisladas de microbiota humana ha mostrado disminuir la activación de NF- κ B tras diferentes

estímulos proinflamatorios en diferentes líneas celulares como HT-29, THP-1 y KBM-5 [151]. La cepa CRL 1098 ha mostrado producir factores que inhiben la vía de NF- κ B en macrófagos murinos, reduciendo la inflamación inducida por LPS en los pulmones [142], mientras que la cepa 6475 produce histamina, que inhibe la producción de TNF- α en células THP-1 [152].

La salud gastrointestinal se ve positivamente afectada por las señales del microbioma intestinal, pero las interacciones perjudiciales pueden llevar a diversas enfermedades, como la enfermedad inflamatoria intestinal y el cáncer de colon [153]. Estas interacciones generalmente implican el contacto de las bacterias o sus productos con el epitelio intestinal. En el presente trabajo se emplearon medios condicionados de aislamientos derivados de una muestra de microbiota humana, de los cuales, si bien todos mostraron inhibir la señal luminiscente respecto al control estimulado, ciertas muestras mostraron elevada citotoxicidad en los organoides. Al corregir los valores de señal luminiscente con los correspondientes valores de actividad metabólica por MTT, sólo tres medios condicionados fueron los que redujeron significativamente la activación de NF- κ B inducida por TNF- α en los organoides de yeyuno. Estos tres medios condicionados corresponden a aislamientos identificados como *Enterococcus hirae* (*E. hirae*), *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), y *Escherichia coli* (*E. coli*). Estas especies son abundantes en la microbiota humana y hay reportes de su acción anti-inflamatoria en líneas celulares y modelos animales. En particular, los lisados celulares de *E. hirae*, entre otras especies de enterococos, fueron capaces de inhibir la actividad transcripcional de NF- κ B en una línea celular de epitelio intestinal porcino [154]. Sobrenadantes libres de células de aislados de *E. coli* (*E. coli* KUB-36) derivados de una muestra de microbiota humana mostraron efectos anti-inflamatorios en células de macrófagos THP-1 inducidas por LPS, ya que suprimieron de manera significativa la producción de citoquinas inflamatorias IL-6, IL-8, IL-1 β y TNF- α [155]. La α -toxina de *C. perfringens* es capaz de inhibir la expresión de TNF- α , la fosforilación de I κ B- α y de la subunidad p65 de NF- κ B, así como la actividad del gen reportero de NF- κ B en células RAW 264.7 estimuladas con LPS [156]. La α -toxina es el principal factor patogénico de *C. perfringens*. Pese a estos reportes, es importante destacar que si bien pueden tener efectos beneficiosos en la inflamación, también existen cepas de estas tres especies que son patogénicas. La interferencia bacteriana con la señalización de la vía NF- κ B del hospedador puede ser beneficiosa no sólo para las bacterias comensales sino también para la infección. La presencia de efectores bacterianos que interfieren negativamente con la inflamación puede proteger a las bacterias patógenas de la respuesta inmune a la vez que protege al intestino de la destrucción inflamatoria del tejido [157]. En este sentido, de los sobrenadantes que produjeron una citotoxicidad cercana al 50 % y que no produjeron una

modulación de la vía NF- κ B, dos de ellos corresponden a *C. perfringens* y uno a *E. hirae*. Por lo que los efectos observados de los sobrenadantes sobre los organoides reporteros se deben a una diferencia en los metabolitos solubles secretados que son cepa-específicos. Dentro de los metabolitos secretados por bacterias de la microbiota reportados como posibles inmunomoduladores se encuentran los ácidos grasos de cadena corta como acetato, piruvato, fumarato, butirato y propionato; los metabolitos secundarios de ácidos biliares [158].

Los medios condicionados derivados de bacterias pueden replicar parcialmente los efectos de las bacterias vivas. Sin embargo, agregar estos factores a los organoides 3D intactos (exponiendo el lado basolateral del epitelio) puede no imitar sus acciones *in vivo*, ya que las bacterias y sus productos normalmente entran en contacto con la superficie apical del intestino [153]. Esta limitación puede ser remediada empleando otras estrategias que permitan el acceso a la cara luminal.

En suma, estos resultados muestran que los organoides intestinales reporteros podrían ser una herramienta útil para detectar agentes antiinflamatorios que actúan en diferentes niveles de la vía NF- κ B en el intestino delgado.

5.4.2. Infección de organoides intestinales con *T. cruzi*

Si bien los organoides intestinales se han utilizado en estudios de fisiología y desarrollo del epitelio intestinal [30], [63], y en la comprensión de la interacción con diferentes patógenos y la microbiota intestinal [153], estos modelos aún no se habían utilizado para estudiar aspectos de la enfermedad de Chagas [159]. La infección de *T. cruzi* en el colon durante la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, cumple un rol significativo como reservorio de parásitos que se vuelven refractarios al tratamiento con los fármacos disponibles y que no son reconocidos por el sistema inmune del hospedero. La falta de modelos novedosos para estudiar en profundidad esta interacción parásito-intestino nos motivó a optimizar y caracterizar nuevos protocolos de infección de organoides, que recrean de forma más representativa que las líneas celulares las condiciones fisiológicas del tejido.

Es así como en este trabajo se estableció el primer modelo de infección de organoides intestinales murinos por *T. cruzi* en diversos formatos. La aproximación metodológica de la infección de organoides en suspensión con tripomastigotes altamente infectivos, fue la más apropiada para evaluar las células infectadas por microscopía. Al exponerse a la cara basolateral de los organoides intactos, simulando la colonización del tejido en la etapa crónica de la enfermedad, los parásitos fueron capaces de invadir y replicarse en las células

epiteliales de los organoides. Además, los organoides intestinales derivados de colon presentan una mayor tasa de infección que los organoides derivados de intestino delgado, lo que refuerza la elección del modelo de colonoides para profundizar los estudios de la infección por *T. cruzi*.

Experimentos de infección a intervalos de tiempo más prolongados permitirían evaluar fenómenos posteriores, como la migración del parásito al lumen del colonoide o la lisis celular. Sin embargo el tiempo de incubación post infección en el formato 3D es limitado ya que los organoides tienden a acumular las células muertas en su interior si no son subcultivados. En cuanto a la capacidad de *T. cruzi* de invadir el epitelio intestinal, los resultados sugieren que parece estar restringida a ciertos tipos de células, ya que el incremento de la MOI a 1:100 aún resultó en un número discreto de células de colonoides que fueron permisivas a la infección. Se obtuvo un resultado similar cuando la infección se realizó desde el lado apical del organoide sembrado en forma de monocapa 2D. Si bien hay reportes de infecciones orales por *T. cruzi*, el sitio primario de penetración al organismo durante la transmisión oral de la enfermedad de Chagas no está del todo comprendido [160], [161], [162]. Nuestros resultados indican que el parásito puede establecer infecciones en las células epiteliales del colon cuando se accede a ellas desde la cara apical. Por lo tanto, el sistema de cultivo 2D puede ser de interés para estudiar la vía de transmisión oral de *T. cruzi*. El método de infección en monocapa constituye una alternativa valiosa para acceder al organoide desde la superficie luminal, evitando el uso de técnicas más complejas, como la microinyección. El método optimizado en este trabajo para la infección de organoides murinos derivados del colon en 2D, es relativamente simple y versátil. Está adaptado a un formato de placa de 96 pocillos, donde no se necesita un inserto Transwell, y el volumen de medios y soluciones de tinción se reduce significativamente en comparación con otros formatos de placa o cámara. Además, a diferencia de la microinyección no es necesario incorporar equipamiento especializado, con la correspondiente disponibilidad de personal entrenado para microinyectar y el número de réplicas técnicas y biológicas que se pueden utilizar es mayor.

En cuanto al patrón de infección observado con *T. cruzi*, no sólo se detectaron focos discretos de células infectadas tanto en las infecciones de organoides murinos en 3D y 2D, sino que también en la línea celular humana HT-29 derivada de cáncer colorrectal. Esto fue notablemente diferente a la infección masiva que se observó en la línea Vero, una línea celular derivada de células epiteliales del riñón de un mono verde africano. Por lo tanto,

estos datos indicarían que la susceptibilidad de ciertas células derivadas del colon a ser infectadas por *T. cruzi* no puede atribuirse al origen (especie) de las células hospedadoras ni tampoco a la polarización celular. Esta selectividad entonces podría deberse a una combinación de factores y señales específicas del hospedero como receptores presentes o moléculas secretadas en ciertos tipos celulares; en conjunto con factores del patógeno (estadío, cepa, virulencia). De hecho, la entrada de *T. cruzi* a las células hospedadoras es un proceso multifactorial que puede seguir diversos mecanismos: algunos dependientes de actina, otros dependientes e independientes de la acción de los lisosomas [163]. Cuáles son los factores que contribuyen a la selectividad de *T. cruzi* observada por ciertas células derivadas del colon aún no se ha determinado. En estos experimentos, tanto las células proliferativas como las no proliferativas fueron infectadas por el parásito, pero aún no se han identificado tipos celulares específicos responsables de las zonas discretas de infección dentro del organoide. En este sentido, no observamos células caliciformes infectadas por *T. cruzi*. En el intestino estas células están especializadas en crear una capa de moco que protege a las células epiteliales del contacto con factores externos [9]. Por este motivo, y dado que estas células son muy abundantes a nivel de colon, es factible pensar que una barrera densa de proteínas fuertemente glicosiladas podría bloquear el acceso del parásito a las células caliciformes y a las células cercanas. Sin embargo, cabe mencionar que en nuestras condiciones experimentales para el cultivo de organoides se está utilizando un medio de cultivo que favorece la proliferación de células madre en lugar de la diferenciación celular (poca abundancia de células caliciformes). Por lo tanto, para verificar estos resultados se deben realizar nuevos experimentos utilizando organoides diferenciados o induciendo la diferenciación para favorecer la detección de diferentes tipos celulares especializados, modelando mejor las interacciones de *T. cruzi* con el epitelio intestinal.

Por otra parte, en este trabajo se emplearon los organoides intestinales murinos, representando el compartimento epitelial del tejido en la infección. En cambio, se han desarrollado sistemas de co-cultivo de organoides con otros tipos de células, como células nerviosas, estromales [164] e inmunológicas [165], lo cual resulta muy útil para aumentar la complejidad del sistema y analizar la interacción colon-*T. cruzi* con mayor profundidad. En este caso, se logró optimizar el co-cultivo de organoides murinos con fibroblastos, representando uno de los componentes principales del mesénquima de la lámina propia. Los avances recientes con aproximaciones de transcriptómica de célula única abarcando el desarrollo, homeostasis, y patología intestinal, han revelado la importancia funcional y la

heterogeneidad de los fibroblastos intestinales [166]. Dentro de las funciones que desempeñan podemos destacar la regulación de la diferenciación epitelial, reclutamiento de células inmunes, morfogénesis tisular, y producción y remodelación de la matriz extracelular [167]. Los resultados indican que si bien la incorporación de suplementos potenciadores de Wnt al medio de cultivo como CHIR99021 permite el crecimiento de las monocapas en formato transwell, la presencia de los fibroblastos tiene consecuencias claras en la polarización y diferenciación de la monocapa. Por un lado, se detectó que la medida de resistencia transepitelial fue mayor en presencia de fibroblastos. Pero además se pudo comprobar que las monocapas que se desarrollaron en presencia de fibroblastos mostraron una mayor expresión de ocludina y de marcadores de células caliciformes. Esta diferenciación estaría dada aún en presencia de factores de crecimiento para las células madre, dado que el medio de cultivo es el mismo a lo largo del cultivo. Los fibroblastos intestinales son capaces de fomentar la diferenciación celular al secretar un conjunto de factores como ligandos de BMPs y factores no canónicos de Wnt [139], [168]. Esto podría ser la razón de por qué se observa una mayor diferenciación en las monocapas que están co-cultivadas con fibroblastos. Estos hallazgos también concuerdan con una presencia menor (aunque no estadísticamente significativa) de células proliferantes en estos co-cultivos determinada por la expresión de ki67. Cabe mencionar que las monocapas derivadas de organoides de colon presentaron una menor TEER que las de intestino delgado. Esto se ha observado para monocapas de organoides intestinales fetales humanos [122], aunque en las monocapas de colon murino estos hallazgos parecen no ser tan claros y depende de las condiciones de diferenciación [140].

Altay y colaboradores lograron generar monocapas de organoides del intestino delgado murino en un medio enriquecido con el medio condicionado de miofibroblastos subepiteliales. Al igual que los fibroblastos, estas células representan una fuente no epitelial importante de activadores de la vía de señalización Wnt, y observaron una mayor expansión celular y función de barrera permitiendo mantener el cultivo por varios pasajes [139]. A diferencia de otros estudios en los que la diferenciación intestinal de la monocapa se logró mediante la remoción de activadores de Wnt en el medio, nuestro diseño experimental (como la de Altay y colaboradores) permite la diferenciación y maduración de la monocapa epitelial al tiempo que preserva un nivel basal de proliferación. Las señales exógenas son proporcionadas por los miofibroblastos en el caso de Altay y colaboradores, y por los fibroblastos NIH3T3 en nuestro caso, las cuales junto con las señales endógenas producida

por la propia monocapa, contribuyen a la formación de monocapas epiteliales maduras. Por lo tanto, este modelo presentado será útil para evaluar la invasión del parásito en un contexto con células epiteliales maduras en condiciones proliferantes. Además, el desarrollo de estos modelos también permitirá evaluar la infección con otros microorganismos en el contexto intestinal. En el modelo presentado en este trabajo no se consideraron tiempos mayores a una semana de co-cultivo, debido a que los fibroblastos que crecen en la cara inferior del inserto Transwell pueden llegar a confluencia y comenzar a morir. La presencia de las células vivas en el modelo optimizado permitirá evaluar el efecto de la infección de *T. cruzi* en estas células además del epitelio y cómo influye la presencia de este tipo celular en la susceptibilidad de las células epiteliales a la infección por el parásito. No obstante, de necesitar evaluar tiempos más largos podrían emplearse medios condicionados de fibroblastos en lugar de las células vivas.

En resumen, por primera vez se emplearon organoides intestinales para estudiar la enfermedad de Chagas. Demostramos que los protocolos de infección en 2D y 3D permiten aproximaciones complementarias que en su conjunto pueden ayudar a la comprensión de la relación parásito-intestino. Además, las monocapas epiteliales intestinales derivadas de organoides en formato transwell reportadas aquí, ofrecen un método de cultivo actualizado y novedoso que proporciona tanto una organización celular similar a la *in vivo* como propiedades de barrera funcional. Más aún, es un cultivo robusto en un formato compatible con estudios que requieren acceso tanto a los compartimentos luminal como basolateral, como ensayos de absorción de medicamentos, tráfico intracelular e interacciones microbio-epitelio.

6. Conclusiones

En este trabajo demostramos que la tecnología de cultivo de organoides puede ser introducida exitosamente en un laboratorio de cultivo celular estándar. Se obtuvieron organoides intestinales de todas las líneas murinas utilizadas y se conformó un banco de organoides murinos de diferentes secciones del intestino. Estos organoides presentan los principales tipos celulares de la región del epitelio de la cual derivan. Los organoides con el reportero NF- κ B-RE-Luc ofrecen una estrategia novedosa para explorar la activación o la inhibición de la señalización de NF- κ B inducida por TNF- α en el epitelio del intestino delgado. Este ensayo reportero demostró ser útil para la evaluación de diferentes componentes solubles de la microbiota donde se observó una inhibición de la activación de NF- κ B inducida por TNF- α .

La edición genética mediante CRISPR/Cas9 permite la generación de organoides intestinales reporteros, pero las estrategias empleadas en el presente trabajo no han permitido llegar al modelo reportero final. Pese a que al término de este trabajo no se logró alcanzar el objetivo propuesto, los avances logrados sugieren su concreción a mediano/corto plazo.

Se han establecido diferentes métodos para la infección de organoides intestinales con el parásito *T. cruzi*. Estos formatos resultan ensayos simples y relativamente económicos para estudiar la infección de *T. cruzi* en organoides intestinales en 2D y en 3D. Los resultados obtenidos brindan información interesante sobre la capacidad de invasión y proliferación del parásito en el tejido intestinal del hospedero, además de permitir modelar lo que ocurre en la etapa crónica de la enfermedad a nivel del colon.

La generación de co-cultivos de organoides intestinales con células estromales mostró que es posible complejizar los modelos de organoides epiteliales y que la presencia del componente estromal favorece el grado de diferenciación de las células epiteliales.

En suma, en este trabajo hemos comprobado que el cultivo de organoides intestinales es un modelo *in vitro* robusto, que permite un formato compatible con estudios que requieren acceso tanto a los compartimentos luminal como basolateral, y en los cuales la heterogeneidad celular puede jugar un rol relevante. Los usos y aplicaciones aquí desarrollados pueden ser extrapolados a otras áreas de estudio (ensayos de absorción de medicamentos, tráfico intracelular e interacciones microorganismo-epitelio), redundando en resultados más representativos a la vez que se contribuye a la reducción en el uso de animales de laboratorio.

7. Perspectivas

La futura aplicación de los modelos de organoides intestinales con el reportero NF- κ B-RE-Luc en sistemas de co-cultivo junto con células inmunitarias y microorganismos vivos representa una perspectiva interesante para profundizar en la comprensión del papel que desempeña este factor de transcripción en la fisiología y patología del tejido del intestino delgado. Esto podría aplicarse no sólo a ensayos de cribado de fármacos con acción sobre la vía del factor NF- κ B, sino también de absorción intestinal de fármacos o evaluación de la permeabilidad de la barrera intestinal.

La mejora en las herramientas y protocolos para la edición genética de organoides intestinales podrá redundar en reporteros de otras vías de señalización de interés o de diferentes sensores redox. En particular resulta de utilidad contar con reporteros fluorescentes para ampliar el rango de ensayos aplicables a los organoides reporteros empleando microscopía y/o citometría de flujo, a la vez que no sería necesario generar un nuevo animal transgénico.

El modelo de organoides representa una herramienta valiosa para comprender diversos aspectos de la interacción entre el hospedero y el patógeno. En el contexto particular de la infección con *T. cruzi*, proponemos evaluar si existe algún grado de tropismo por algún tipo celular en particular dentro del intestino o si existe alguna propiedad de las células epiteliales de los organoides que impida su infección. En este sentido, a partir de los resultados de este trabajo, se obtuvo financiación a través de un convenio de movilidad con el Weizmann Institute of Science, en el cual se propone infectar organoides con parásitos fluorescentes, aislar las células infectadas mediante *cell-sorting* y finalmente evaluar los marcadores celulares presentes en dicha población o realizar transcriptómica de célula única en colaboración con el laboratorio del Dr. Moshe Biton. A su vez, se formó un consorcio entre miembros de la red Internacional Pasteur financiado por un proyecto ACIP (del francés *Actions Concertées Inter-Pasteuriennes*). Este consorcio está formado por la Dra. Giulia Nigro del Institut Pasteur París (donde realicé mi pasantía en el 2022), la Dra. Silvane Maria Fonseca Murta del Instituto Oswaldo Fiocruz de Río de Janeiro, y nuestro laboratorio junto al del Dr. Marcelo Comini del Institut Pasteur Montevideo. En el marco de dicho proyecto se propone continuar el desarrollo de los sistemas de co-cultivos de organoides con otros tipos celulares para evaluar la participación de células inmunitarias y del estroma durante la infección intestinal por *T. cruzi*; y extender los estudios realizados hasta el momento con la cepa Dm28C a otras cepas de *T.*

cruzi. También es interesante utilizar este modelo de infección de organoides para evaluar el efecto de los fármacos disponibles para la enfermedad de Chagas, que tienen muy poca eficacia en las etapas crónicas de la enfermedad.

Por último, para contar con modelos más representativos de la patología humana (enfermedad de Chagas, inflamación intestinal crónica) incorporaremos los organoides intestinales humanos, obtenidos ya sea a partir de hiPSCs o de biopsias. Esto permitirá contar con modelos de organoides especie-específicos para evaluar la fisiología y fisiopatología intestinal humana.

8. Referencias

- [1] H. Gehart and H. Clevers, "Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells," *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 16, no. 1, pp. 19–34, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41575-018-0081-y.
- [2] A. S. Darwich, U. Aslam, D. M. Ashcroft, and A. Rostami-Hodjegan, "Meta-analysis of the turnover of intestinal epithelia in preclinical animal species and humans," *Drug Metab Dispos*, vol. 42, no. 12, pp. 2016–2022, Dec. 2014, doi: 10.1124/dmd.114.058404.
- [3] N. Barker, "Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 15, no. 1, pp. 19–33, Jan. 2014, doi: 10.1038/nrm3721.
- [4] C. P. Leblond and C. E. Stevens, "The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat," *The Anatomical Record*, vol. 100, no. 3, pp. 357–377, 1948, doi: 10.1002/ar.1091000306.
- [5] C. P. Leblond and B. Messier, "Renewal of chief cells and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of thymidine-H3 into mice," *Anat Rec*, vol. 132, no. 3, pp. 247–259, Nov. 1958, doi: 10.1002/ar.1091320303.
- [6] N. Barker *et al.*, "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5," *Nature*, vol. 449, no. 7165, pp. 1003–1007, Oct. 2007, doi: 10.1038/nature06196.
- [7] M. van de Wetering *et al.*, "The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells," *Cell*, vol. 111, no. 2, pp. 241–250, Oct. 2002, doi: 10.1016/s0092-8674(02)01014-0.
- [8] L. G. van der Flier and H. Clevers, "Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium," *Annual Review of Physiology*, vol. 71, no. 1, pp. 241–260, 2009, doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.
- [9] G. M. H. Birchenough, M. E. V. Johansson, J. K. Gustafsson, J. H. Bergström, and G. C. Hansson, "New developments in goblet cell mucus secretion and function," *Mucosal Immunol*, vol. 8, no. 4, pp. 712–719, Jul. 2015, doi: 10.1038/mi.2015.32.
- [10] J. J. Kim and W. I. Khan, "Goblet Cells and Mucins: Role in Innate Defense in Enteric Infections," *Pathogens*, vol. 2, no. 1, Art. no. 1, Mar. 2013, doi: 10.3390/pathogens2010055.
- [11] S. K. Hendel, L. Kellermann, A. Hausmann, N. Bindselev, K. B. Jensen, and O. H. Nielsen, "Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases," *Front Immunol*, vol. 13, p. 822867, Feb. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.822867.
- [12] T. Kanaya *et al.*, "Development of intestinal M cells and follicle-associated epithelium is regulated by TRAF6-mediated NF- κ B signaling," *J Exp Med*, vol. 215, no. 2, pp. 501–519, Feb. 2018, doi: 10.1084/jem.20160659.
- [13] A. L. Man, M. E. Prieto-Garcia, and C. Nicoletti, "Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys?," *Immunology*, vol. 113, no. 1, pp. 15–22, Sep. 2004, doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01964.x.
- [14] J. Creff, L. Malaquin, and A. Besson, "In vitro models of intestinal epithelium: Toward bioengineered systems," *J Tissue Eng*, vol. 12, p. 2041731420985202, Feb. 2021, doi: 10.1177/2041731420985202.
- [15] F. Antunes, F. Andrade, D. Ferreira, H. M. Nielsen, and B. Sarmento, "Models to predict intestinal absorption of therapeutic peptides and proteins," *Curr Drug Metab*, vol. 14, no. 1, pp. 4–20, Jan. 2013.
- [16] I. J. Hidalgo, T. J. Raub, and R. T. Borchardt, "Characterization of the human colon

- carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability," *Gastroenterology*, vol. 96, no. 3, pp. 736–749, Mar. 1989.
- [17] F. Antunes, F. Andrade, F. Araújo, D. Ferreira, and B. Sarmento, "Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs," *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 83, no. 3, pp. 427–435, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.ejpb.2012.10.003.
 - [18] J. Costa and A. Ahluwalia, "Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, 2019, Accessed: Jan. 22, 2024. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00144>
 - [19] N. Panse and P. M. Gerk, "The Caco-2 Model: Modifications and enhancements to improve efficiency and predictive performance," *Int J Pharm*, vol. 624, p. 122004, Aug. 2022, doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122004.
 - [20] G. J. Mahler, M. L. Shuler, and R. P. Glahn, "Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability☆," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 20, no. 7, pp. 494–502, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.05.006.
 - [21] F. Araújo, C. Pereira, J. Costa, C. Barrias, P. L. Granja, and B. Sarmento, "In vitro M-like cells genesis through a tissue-engineered triple-culture intestinal model," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 104, no. 4, pp. 782–788, May 2016, doi: 10.1002/jbm.b.33508.
 - [22] F. Araújo and B. Sarmento, "Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies," *Int J Pharm*, vol. 458, no. 1, pp. 128–134, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.10.003.
 - [23] F. Pampaloni, E. G. Reynaud, and E. H. K. Stelzer, "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2007, doi: 10.1038/nrm2236.
 - [24] D. J. Holt, L. M. Chamberlain, and D. W. Grainger, "Cell-cell signaling in co-cultures of macrophages and fibroblasts," *Biomaterials*, vol. 31, no. 36, pp. 9382–9394, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.101.
 - [25] S. H. Kim *et al.*, "Three-dimensional intestinal villi epithelium enhances protection of human intestinal cells from bacterial infection by inducing mucin expression," *Integrative Biology*, vol. 6, no. 12, pp. 1122–1131, Dec. 2014, doi: 10.1039/c4ib00157e.
 - [26] K. A. Fitzgerald, M. Malhotra, C. M. Curtin, F. J. O' Brien, and C. M. O' Driscoll, "Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery," *J Control Release*, vol. 215, pp. 39–54, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.020.
 - [27] S. Breslin and L. O'Driscoll, "Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery," *Drug Discov. Today*, vol. 18, no. 5–6, pp. 240–249, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.drudis.2012.10.003.
 - [28] E. Gheytanchi *et al.*, "Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines," *Cancer Cell Int*, vol. 21, p. 204, Apr. 2021, doi: 10.1186/s12935-021-01898-9.
 - [29] A. Sargenti *et al.*, "Physical Characterization of Colorectal Cancer Spheroids and Evaluation of NK Cell Infiltration Through a Flow-Based Analysis," *Front. Immunol.*, vol. 11, Dec. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.564887.
 - [30] H. Clevers, "Modeling Development and Disease with Organoids," *Cell*, vol. 165, no. 7, pp. 1586–1597, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.082.
 - [31] T. Sato *et al.*, "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche," *Nature*, vol. 459, no. 7244, Art. no. 7244, May 2009, doi: 10.1038/nature07935.
 - [32] H. Clevers, K. M. Loh, and R. Nusse, "Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control," *Science*, vol. 346, no. 6205, p. 1248012, Oct. 2014, doi: 10.1126/science.1248012.

- [33] C. Hofmann *et al.*, “Cell-cell contacts prevent anoikis in primary human colonic epithelial cells,” *Gastroenterology*, vol. 132, no. 2, pp. 587–600, Feb. 2007, doi: 10.1053/j.gastro.2006.11.017.
- [34] E. A. Aisenbrey and W. L. Murphy, “Synthetic alternatives to Matrigel,” *Nat Rev Mater*, vol. 5, no. 7, pp. 539–551, Jul. 2020, doi: 10.1038/s41578-020-0199-8.
- [35] S. Middendorp *et al.*, “Adult Stem Cells in the Small Intestine Are Intrinsically Programmed with Their Location-Specific Function,” *STEM CELLS*, vol. 32, no. 5, pp. 1083–1091, 2014, doi: 10.1002/stem.1655.
- [36] N. Barker *et al.*, “Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro,” *Cell Stem Cell*, vol. 6, no. 1, pp. 25–36, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.stem.2009.11.013.
- [37] M. M. Mahé *et al.*, “Establishment of gastrointestinal epithelial organoids,” *Curr Protoc Mouse Biol*, vol. 3, pp. 217–240, Dec. 2013, doi: 10.1002/9780470942390.mo130179.
- [38] T. Sato *et al.*, “Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett’s epithelium,” *Gastroenterology*, vol. 141, no. 5, pp. 1762–1772, Nov. 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050.
- [39] H. C. K. Angus, A. G. Butt, M. Schultz, and R. A. Kemp, “Intestinal Organoids as a Tool for Inflammatory Bowel Disease Research,” *Frontiers in Medicine*, vol. 6, 2020, Accessed: Feb. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2019.00334>
- [40] E. Mussard *et al.*, “Culture of rabbit caecum organoids by reconstituting the intestinal stem cell niche *in vitro* with pharmacological inhibitors or L-WRN conditioned medium,” *Stem Cell Research*, vol. 48, p. 101980, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.scr.2020.101980.
- [41] R. H. Powell and M. S. Behnke, “WRN conditioned media is sufficient for *in vitro* propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals,” *Biology Open*, vol. 6, no. 5, pp. 698–705, Mar. 2017, doi: 10.1242/bio.021717.
- [42] M. Beaumont *et al.*, “Intestinal organoids in farm animals,” *Veterinary Research*, vol. 52, no. 1, p. 33, Feb. 2021, doi: 10.1186/s13567-021-00909-x.
- [43] P. Jung *et al.*, “Isolation and *in vitro* expansion of human colonic stem cells,” *Nat Med*, vol. 17, no. 10, pp. 1225–1227, Sep. 2011, doi: 10.1038/nm.2470.
- [44] J. O. Múnera and J. M. Wells, “Generation of Gastrointestinal Organoids from Human Pluripotent Stem Cells,” *Methods Mol Biol*, vol. 1597, pp. 167–177, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6949-4_12.
- [45] J. R. Spence *et al.*, “Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*,” *Nature*, vol. 470, no. 7332, pp. 105–109, Feb. 2011, doi: 10.1038/nature09691.
- [46] J. M. Wells and J. R. Spence, “How to make an intestine,” *Development*, vol. 141, no. 4, pp. 752–760, Feb. 2014, doi: 10.1242/dev.097386.
- [47] K. W. McCracken, J. C. Howell, J. M. Wells, and J. R. Spence, “Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells *in vitro*,” *Nat Protoc*, vol. 6, no. 12, pp. 1920–1928, Nov. 2011, doi: 10.1038/nprot.2011.410.
- [48] K. W. McCracken *et al.*, “Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids,” *Nature*, vol. 516, no. 7531, pp. 400–404, Dec. 2014, doi: 10.1038/nature13863.
- [49] J. Kim, B.-K. Koo, and J. A. Knoblich, “Human organoids: model systems for human biology and medicine,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 21, no. 10, pp. 571–584, 2020, doi: 10.1038/s41580-020-0259-3.
- [50] M. A. Lancaster and J. A. Knoblich, “Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies,” *Science*, vol. 345, no. 6194, p. 1247125, Jul. 2014, doi: 10.1126/science.1247125.
- [51] T. L. A. Nguyen, S. Vieira-Silva, A. Liston, and J. Raes, “How informative is the mouse for

- human gut microbiota research?," *Disease Models & Mechanisms*, vol. 8, no. 1, pp. 1–16, Jan. 2015, doi: 10.1242/dmm.017400.
- [52] O. Urzi *et al.*, "Three-Dimensional Cell Cultures: The Bridge between In Vitro and In Vivo Models," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 15, p. 12046, Jul. 2023, doi: 10.3390/ijms241512046.
 - [53] Q. Hou *et al.*, "Bacillus subtilis programs the differentiation of intestinal secretory lineages to inhibit Salmonella infection," *Cell Reports*, vol. 40, no. 13, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.celrep.2022.111416.
 - [54] S. S. Wilson, A. Tocchi, M. K. Holly, W. C. Parks, and J. G. Smith, "A small intestinal organoid model of non-invasive enteric pathogen–epithelial cell interactions," *Mucosal Immunology*, vol. 8, no. 2, pp. 352–361, Mar. 2015, doi: 10.1038/mi.2014.72.
 - [55] Y. Zhang, S. Wu, Y. Xia, and J. Sun, "Salmonella-infected crypt-derived intestinal organoid culture system for host–bacterial interactions," *Physiol Rep*, vol. 2, no. 9, p. e12147, Sep. 2014, doi: 10.14814/phy2.12147.
 - [56] J. L. Leslie *et al.*, "Persistence and Toxin Production by Clostridium difficile within Human Intestinal Organoids Result in Disruption of Epithelial Paracellular Barrier Function," *Infect Immun*, vol. 83, no. 1, pp. 138–145, Jan. 2015, doi: 10.1128/IAI.02561-14.
 - [57] I. Heo *et al.*, "Modelling Cryptosporidium infection in human small intestinal and lung organoids," *Nat Microbiol*, vol. 3, no. 7, pp. 814–823, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41564-018-0177-8.
 - [58] X.-T. Zhang *et al.*, "Cryptosporidium parvum infection attenuates the ex vivo propagation of murine intestinal enteroids," *Physiol Rep*, vol. 4, no. 24, p. e13060, Dec. 2016, doi: 10.14814/phy2.13060.
 - [59] L. Luu *et al.*, "An Open-Format Enteroid Culture System for Interrogation of Interactions Between Toxoplasma gondii and the Intestinal Epithelium," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 9, p. 300, Aug. 2019, doi: 10.3389/fcimb.2019.00300.
 - [60] K. Ettayebi *et al.*, "Replication of Human Noroviruses in Stem Cell-Derived Human Enteroids," *Science*, vol. 353, no. 6306, pp. 1387–1393, Sep. 2016, doi: 10.1126/science.aaf5211.
 - [61] D. Dutta, I. Heo, and H. Clevers, "Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 23, no. 5, pp. 393–410, 2017, doi: 10.1016/j.molmed.2017.02.007.
 - [62] D. Dutta and H. Clevers, "Organoid culture systems to study host–pathogen interactions," *Curr Opin Immunol*, vol. 48, pp. 15–22, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.coi.2017.07.012.
 - [63] J. Puschhof *et al.*, "Intestinal organoid cocultures with microbes," *Nat Protoc*, vol. 16, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2021, doi: 10.1038/s41596-021-00589-z.
 - [64] J. Y. Co *et al.*, "Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions," *Cell Reports*, vol. 26, no. 9, pp. 2509–2520.e4, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.108.
 - [65] J. F. Dekkers *et al.*, "A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids," *Nat Med*, vol. 19, no. 7, pp. 939–945, Jul. 2013, doi: 10.1038/nm.3201.
 - [66] M. Fujii *et al.*, "A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis," *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 6, pp. 827–838, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.stem.2016.04.003.
 - [67] M. van de Wetering *et al.*, "Prospective derivation of a Living Organoid Biobank of colorectal cancer patients," *Cell*, vol. 161, no. 4, pp. 933–945, May 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.03.053.
 - [68] X. Li *et al.*, "Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture," *Nat Med*, vol. 20, no. 7, pp. 769–777, Jul. 2014, doi: 10.1038/nm.3585.
 - [69] J. Drost *et al.*, "Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer," *Science*, vol. 358, no. 6360, pp. 234–238, Oct. 2017, doi: 10.1126/science.aao3130.

- [70] M. Matano *et al.*, “Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids,” *Nat. Med.*, vol. 21, no. 3, pp. 256–262, Mar. 2015, doi: 10.1038/nm.3802.
- [71] M. Hofer and M. P. Lutolf, “Engineering organoids,” *Nat Rev Mater*, vol. 6, no. 5, Art. no. 5, May 2021, doi: 10.1038/s41578-021-00279-y.
- [72] O. Cameron, J. F. Neves, and E. Gentleman, “Listen to Your Gut: Key Concepts for Bioengineering Advanced Models of the Intestine,” *Adv Sci (Weinh)*, p. e2302165, Nov. 2023, doi: 10.1002/advs.202302165.
- [73] Q. Zhang, M. J. Lenardo, and D. Baltimore, “30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology,” *Cell*, vol. 168, no. 1, pp. 37–57, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2016.12.012.
- [74] A. Wullaert, M. C. Bonnet, and M. Pasparakis, “NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation,” *Cell Res*, vol. 21, no. 1, pp. 146–158, Jan. 2011, doi: 10.1038/cr.2010.175.
- [75] A. Soleimani, F. Rahmani, G. A. Ferns, M. Ryzhikov, A. Avan, and S. M. Hassanian, “Role of the NF- κ B signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer,” *Gene*, vol. 726, p. 144132, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.gene.2019.144132.
- [76] A. J. Schottelius and H. Dinter, “Cytokines, NF-kappaB, microenvironment, intestinal inflammation and cancer,” *Cancer Treat Res*, vol. 130, pp. 67–87, 2006, doi: 10.1007/0-387-26283-0_3.
- [77] M. E. Spehlmann and L. Eckmann, “Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction,” *Curr Opin Gastroenterol*, vol. 25, no. 2, pp. 92–99, Mar. 2009, doi: 10.1097/MOG.0b013e328324f857.
- [78] I. Atreya, R. Atreya, and M. F. Neurath, “NF-kappaB in inflammatory bowel disease,” *J Intern Med*, vol. 263, no. 6, pp. 591–596, Jun. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01953.x.
- [79] D. K. McDaniel, K. Eden, V. M. Ringel, and I. C. Allen, “Emerging Roles for Noncanonical NF- κ B Signaling in the Modulation of Inflammatory Bowel Disease Pathobiology,” *Inflamm Bowel Dis*, vol. 22, no. 9, pp. 2265–2279, Sep. 2016, doi: 10.1097/MIB.0000000000000858.
- [80] T. Karrasch and C. Jobin, “NF- κ B and the intestine: Friend or foe?,” *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 14, no. 1, pp. 114–124, Jan. 2008, doi: 10.1002/ibd.20243.
- [81] C. Peng, Y. Ouyang, N. Lu, and N. Li, “The NF- κ B Signaling Pathway, the Microbiota, and Gastrointestinal Tumorigenesis: Recent Advances,” *Front. Immunol.*, vol. 11, Jun. 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01387.
- [82] G. Mastropietro, I. Tiscornia, K. Perelmuter, S. Astrada, and M. Bollati-Fogolin, “HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, p. 860534, 2015, doi: 10.1155/2015/860534.
- [83] H. Daghero, R. Pagotto, M. G. Vallespi, and M. Bollati-Fogolin, “Generation of stable reporter breast and lung cancer cell lines for NF- κ B activation studies,” *J Biotechnol*, vol. 301, pp. 79–87, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.05.014.
- [84] K. Duval *et al.*, “Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture,” *Physiology (Bethesda)*, vol. 32, no. 4, pp. 266–277, Jul. 2017, doi: 10.1152/physiol.00036.2016.
- [85] H. Carlsen, J. Ø. Moskaug, S. H. Fromm, and R. Blomhoff, “In vivo imaging of NF-kappa B activity,” *J Immunol*, vol. 168, no. 3, pp. 1441–1446, Feb. 2002, doi: 10.4049/jimmunol.168.3.1441.
- [86] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier, “A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity,” *Science*, vol. 337, no. 6096, pp. 816–821, Aug. 2012, doi: 10.1126/science.1225829.
- [87] F. J. M. Mojica and F. Rodriguez-Valera, “The discovery of CRISPR in archaea and bacteria,” *The FEBS Journal*, vol. 283, no. 17, pp. 3162–3169, 2016, doi: 10.1111/febs.3162-3169.

- 10.1111/febs.13766.
- [88] F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, and F. Zhang, "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system," *Nat Protoc*, vol. 8, no. 11, pp. 2281–2308, Nov. 2013, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
 - [89] H. Wang, M. La Russa, and L. S. Qi, "CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond," *Annu Rev Biochem*, vol. 85, pp. 227–264, Jun. 2016, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607.
 - [90] K. A. Lukyanov and V. V. Belousov, "Genetically encoded fluorescent redox sensors," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1840, no. 2, pp. 745–756, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.030.
 - [91] J. Franco *et al.*, "In vitro activity and mode of action of distamycin analogues against African trypanosomes," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 126, pp. 776–788, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2016.12.002.
 - [92] M. Gutscher *et al.*, "Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential," *Nat Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 553–559, Jun. 2008, doi: 10.1038/nmeth.1212.
 - [93] H. Miyoshi and T. S. Stappenbeck, "In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells as organoids," *Nat Protoc*, vol. 8, no. 12, pp. 2471–2482, Dec. 2013, doi: 10.1038/nprot.2013.153.
 - [94] N. P. du Sert *et al.*, "The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research," *PLOS Biology*, vol. 18, no. 7, p. e3000410, Jul. 2020, doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.
 - [95] J. Schindelin *et al.*, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nat Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jun. 2012, doi: 10.1038/nmeth.2019.
 - [96] E. D. Routh *et al.*, "Transcriptomic Features of T Cell-Barren Tumors Are Conserved Across Diverse Tumor Types," *Front. Immunol.*, vol. 11, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00057.
 - [97] S. R. Bond and C. C. Naus, "RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects," *Nucleic Acids Res*, vol. 40, no. Web Server issue, pp. W209–213, Jul. 2012, doi: 10.1093/nar/gks396.
 - [98] K. Labun, T. G. Montague, M. Krause, Y. N. Torres Cleuren, H. Tjeldnes, and E. Valen, "CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing," *Nucleic Acids Research*, vol. 47, no. W1, pp. W171–W174, Jul. 2019, doi: 10.1093/nar/gkz365.
 - [99] J.-P. Zhang *et al.*, "Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage," *Genome Biology*, vol. 18, no. 1, p. 35, Feb. 2017, doi: 10.1186/s13059-017-1164-8.
 - [100] M. Crispo *et al.*, "Transgenic Mouse Model Harboring the Transcriptional Fusion Ccl20-Luciferase as a Novel Reporter of Pro-Inflammatory Response," *PLOS ONE*, vol. 8, no. 11, p. e78447, Nov. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0078447.
 - [101] D. Sun *et al.*, "A functional genetic toolbox for human tissue-derived organoids," *eLife*, vol. 10, p. e67886, 2021, doi: 10.7554/eLife.67886.
 - [102] S. A. Langhans, "Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 9, 2018, Accessed: Jan. 30, 2024. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00006>
 - [103] T. Sato and H. Clevers, "Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications," *Science*, vol. 340, no. 6137, pp. 1190–1194, Jun. 2013, doi: 10.1126/science.1234852.
 - [104] M. E. Delgado and T. Brunner, "The many faces of tumor necrosis factor signaling in the intestinal epithelium," *Genes Immun*, vol. 20, no. 8, pp. 609–626, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41435-019-0057-0.
 - [105] M. U. Martin and H. Wesche, "Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular*

- Cell Research*, vol. 1592, no. 3, pp. 265–280, Nov. 2002, doi: 10.1016/S0167-4889(02)00320-8.
- [106] A. E. Price *et al.*, “A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns,” *Immunity*, vol. 49, no. 3, pp. 560–575.e6, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.immuni.2018.07.016.
 - [107] T. Gaj, C. A. Gersbach, and C. F. Barbas, “ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering,” *Trends Biotechnol*, vol. 31, no. 7, pp. 397–405, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
 - [108] M. Fujii, H. Clevers, and T. Sato, “Modeling Human Digestive Diseases With CRISPR-Cas9-Modified Organoids,” *Gastroenterology*, vol. 156, no. 3, pp. 562–576, 2019, doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.048.
 - [109] D. Hockemeyer and R. Jaenisch, “Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing,” *Cell stem cell*, vol. 18, no. 5, pp. 573–86, May 2016, doi: 10.1016/j.stem.2016.04.013.
 - [110] G. Schwank and H. Clevers, “CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Mouse Small Intestinal Organoids,” in *Gastrointestinal Physiology and Diseases: Methods and Protocols*, A. I. Ivanov, Ed., in Methods in Molecular Biology. , New York, NY: Springer New York, 2016, pp. 3–11. doi: 10.1007/978-1-4939-3603-8_1.
 - [111] N. Skoufou-Papoutsaki *et al.*, “Efficient genetic editing of human intestinal organoids using ribonucleoprotein-based CRISPR,” *Dis Model Mech*, vol. 16, no. 10, p. dmm050279, Oct. 2023, doi: 10.1242/dmm.050279.
 - [112] S. Hibiya *et al.*, “Long-term Inflammation Transforms Intestinal Epithelial Cells of Colonic Organoids,” *J Crohns Colitis*, vol. 11, no. 5, pp. 621–630, May 2017, doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw186.
 - [113] V. S. W. Li, “Modelling intestinal inflammation and infection using ‘mini-gut’ organoids,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 18, no. 2, pp. 89–90, Feb. 2021, doi: 10.1038/s41575-020-00391-4.
 - [114] S. E. Blutt, S. E. Crawford, S. Ramani, W. Y. Zou, and M. K. Estes, “Engineered Human Gastrointestinal Cultures to Study the Microbiome and Infectious Diseases,” *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, vol. 5, no. 3, pp. 241–251, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.12.001.
 - [115] P. Qiu, T. Ishimoto, L. Fu, J. Zhang, Z. Zhang, and Y. Liu, “The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 12, Feb. 2022, doi: 10.3389/fcimb.2022.733992.
 - [116] B.-N. Liu, X.-T. Liu, Z.-H. Liang, and J.-H. Wang, “Gut microbiota in obesity,” *World J Gastroenterol*, vol. 27, no. 25, pp. 3837–3850, Jul. 2021, doi: 10.3748/wjg.v27.i25.3837.
 - [117] A. Artemev, S. Naik, A. Pougno, P. Honnavar, and N. M. Shanbhag, “The Association of Microbiome Dysbiosis With Colorectal Cancer,” *Cureus*, vol. 14, no. 2, p. e22156, doi: 10.7759/cureus.22156.
 - [118] C. A. Brennan and W. S. Garrett, “Gut Microbiota, Inflammation, and Colorectal Cancer,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 70, pp. 395–411, 08 2016, doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095513.
 - [119] L. Sun *et al.*, “TNF α regulates intestinal organoids from mice with both defined and conventional microbiota,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 164, pp. 548–556, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.176.
 - [120] G. Nigro, M. Hanson, C. Fevre, M. Lecuit, and P. J. Sansonetti, “Intestinal Organoids as a Novel Tool to Study Microbes-Epithelium Interactions,” *Methods Mol. Biol.*, Sep. 2016, doi: 10.1007/7651_2016_12.
 - [121] C. Aguilar, M. Alves da Silva, M. Saraiva, M. Neyazi, I. A. S. Olsson, and S. Bartfeld, “Organoids as host models for infection biology – a review of methods,” *Exp Mol Med*, vol. 53, no. 10, Art. no. 10, Oct. 2021, doi: 10.1038/s12276-021-00629-4.

- [122] T. Roodsant *et al.*, “A Human 2D Primary Organoid-Derived Epithelial Monolayer Model to Study Host-Pathogen Interaction in the Small Intestine,” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 10, 2020, Accessed: Feb. 01, 2024. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00272>
- [123] B. A. Feltis *et al.*, “Clostridium difficile toxins A and B can alter epithelial permeability and promote bacterial paracellular migration through HT-29 enterocytes,” *Shock*, vol. 14, no. 6, pp. 629–634, Dec. 2000, doi: 10.1097/00024382-200014060-00010.
- [124] C. Covarrubias, M. Cortez, D. Ferreira, and N. Yoshida, “Interaction with host factors exacerbates Trypanosoma cruzi cell invasion capacity upon oral infection,” *Int J Parasitol*, vol. 37, no. 14, pp. 1609–1616, Dec. 2007, doi: 10.1016/j.ijpara.2007.05.013.
- [125] M. P. Briceño *et al.*, “Toxoplasma gondii Infection Promotes Epithelial Barrier Dysfunction of Caco-2 Cells,” *J Histochem Cytochem*, vol. 64, no. 8, pp. 459–469, Aug. 2016, doi: 10.1369/0022155416656349.
- [126] A. Rassi and J. A. Marin-Neto, “Chagas disease,” *The Lancet*, vol. 375, no. 9723, pp. 1388–1402, Apr. 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
- [127] K. S. Pereira, F. L. Schmidt, A. M. A. Guaraldo, R. M. B. Franco, V. L. Dias, and L. A. C. Passos, “Chagas’ Disease as a Foodborne Illness,” *Journal of Food Protection*, vol. 72, no. 2, pp. 441–446, Feb. 2009, doi: 10.4315/0362-028X-72.2.441.
- [128] A. Requena-Méndez *et al.*, “Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis,” *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 9, no. 2, p. e0003540, Feb. 2015, doi: 10.1371/journal.pntd.0003540.
- [129] R. Salvatella, “Chagas en Uruguay, 1937-2016: Información básica para su prevención, control y atención,” *Archivos de Pediatría del Uruguay*, vol. 87, no. 1, pp. 49–52, Mar. 2016.
- [130] K. C. F. Lidani *et al.*, “Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem,” *Frontiers in Public Health*, vol. 7, 2019, Accessed: Oct. 12, 2022. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2019.00166>
- [131] J. Andersson, A. Örn, and D. Sunnemark, “Chronic murine Chagas’ disease: the impact of host and parasite genotypes,” *Immunology Letters*, vol. 86, no. 2, pp. 207–212, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0165-2478(03)00019-1.
- [132] A. I. Ward *et al.*, “In Vivo Analysis of Trypanosoma cruzi Persistence Foci at Single-Cell Resolution,” *mBio*, vol. 11, no. 4, pp. e01242-20, Aug. 2020, doi: 10.1128/mBio.01242-20.
- [133] A. I. Ward, F. Olmo, R. L. Atherton, M. C. Taylor, and J. M. Kelly, “Trypanosoma cruzi amastigotes that persist in the colon during chronic stage murine infections have a reduced replication rate,” *Open Biol*, vol. 10, no. 12, p. 200261, Dec. 2020, doi: 10.1098/rsob.200261.
- [134] C. Fonseca-Berzal, V. J. Arán, J. A. Escario, and A. Gómez-Barrio, “Experimental models in Chagas disease: a review of the methodologies applied for screening compounds against Trypanosoma cruzi,” *Parasitol Res*, vol. 117, no. 11, pp. 3367–3380, Nov. 2018, doi: 10.1007/s00436-018-6084-3.
- [135] L. A. Martello *et al.*, “Characterization of Trypanosoma cruzi infectivity, proliferation, and cytokine patterns in gut and pancreatic epithelial cells maintained in vitro,” *Parasitol Res*, vol. 112, no. 12, pp. 4177–4183, Dec. 2013, doi: 10.1007/s00436-013-3609-7.
- [136] M. E. Rodríguez *et al.*, “Transmigration of Trypanosoma cruzi trypomastigotes through 3D cultures resembling a physiological environment,” *Cellular Microbiology*, vol. 22, no. 8, p. e13207, 2020, doi: 10.1111/cmi.13207.
- [137] J. Zheng *et al.*, “A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae,” *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 70, no. 4, pp. 2782–2858, Apr. 2020, doi: 10.1099/ijsem.0.004107.
- [138] M. D. Muzumdar, B. Tasic, K. Miyamichi, L. Li, and L. Luo, “A global double-fluorescent

- Cre reporter mouse,” *Genesis*, vol. 45, no. 9, pp. 593–605, Sep. 2007, doi: 10.1002/dvg.20335.
- [139] G. Altay *et al.*, “Self-organized intestinal epithelial monolayers in crypt and villus-like domains show effective barrier function,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Art. no. 1, Jul. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-46497-x.
 - [140] K. Kozuka *et al.*, “Development and Characterization of a Human and Mouse Intestinal Epithelial Cell Monolayer Platform,” *Stem Cell Reports*, vol. 9, no. 6, pp. 1976–1990, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.10.013.
 - [141] P. Yu, C. Ke, J. Guo, X. Zhang, and B. Li, “Lactobacillus plantarum L15 Alleviates Colitis by Inhibiting LPS-Mediated NF- κ B Activation and Ameliorates DSS-Induced Gut Microbiota Dysbiosis,” *Frontiers in Immunology*, vol. 11, 2020, Accessed: Jan. 31, 2024. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.575173>
 - [142] M. Griet *et al.*, “Soluble Factors from Lactobacillus reuteri CRL1098 Have Anti-Inflammatory Effects in Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e110027, Oct. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0110027.
 - [143] B. P. Vazquez *et al.*, “Inflammatory responses and intestinal injury development during acute Trypanosoma cruzi infection are associated with the parasite load,” *Parasites & Vectors*, vol. 8, no. 1, p. 206, Apr. 2015, doi: 10.1186/s13071-015-0811-8.
 - [144] A. A. Khan *et al.*, “Local association of Trypanosoma cruzi chronic infection foci and enteric neuropathic lesions at the tissue micro-domain scale,” *PLOS Pathogens*, vol. 17, no. 8, p. e1009864, Aug. 2021, doi: 10.1371/journal.ppat.1009864.
 - [145] G. Nelson *et al.*, “NF-kappaB signalling is inhibited by glucocorticoid receptor and STAT6 via distinct mechanisms,” *J Cell Sci*, vol. 116, no. Pt 12, pp. 2495–2503, Jun. 2003, doi: 10.1242/jcs.00461.
 - [146] R. M. Nissen and K. R. Yamamoto, “The glucocorticoid receptor inhibits NF κ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain,” *Genes Dev*, vol. 14, no. 18, pp. 2314–2329, Sep. 2000.
 - [147] J. W. Pierce *et al.*, “Novel Inhibitors of Cytokine-induced I κ B α Phosphorylation and Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression Show Anti-inflammatory Effects in Vivo*,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 34, pp. 21096–21103, Aug. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.34.21096.
 - [148] J. Lee, M. H. Rhee, E. Kim, and J. Y. Cho, “BAY 11-7082 Is a Broad-Spectrum Inhibitor with Anti-Inflammatory Activity against Multiple Targets,” *Mediators Inflamm*, vol. 2012, p. 416036, 2012, doi: 10.1155/2012/416036.
 - [149] E. O. Petrof *et al.*, “Bacteria-Free Solution Derived from Lactobacillus plantarum Inhibits Multiple NF-KappaB Pathways and Inhibits Proteasome Function,” *Inflammatory bowel diseases*, vol. 15, no. 10, p. 1537, Oct. 2009, doi: 10.1002/ibd.20930.
 - [150] Q. Mu, V. J. Tavella, and X. M. Luo, “Role of Lactobacillus reuteri in Human Health and Diseases,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018, Accessed: Jan. 31, 2024. [Online]. Available: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00757>
 - [151] J. Versalovic, C. Iyer, Y. Ping Lin, Y. Huang, and W. Dobrogosz, “Commensal-derived probiotics as anti-inflammatory agents,” *Microbial Ecology in Health and Disease*, vol. 20, no. 2, pp. 86–93, Jan. 2008, doi: 10.1080/08910600802106491.
 - [152] C. M. Thomas *et al.*, “Histamine Derived from Probiotic Lactobacillus reuteri Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2, p. e31951, Feb. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0031951.
 - [153] X. Han, M. A. Mslati, E. Davies, Y. Chen, J. M. Allaire, and B. A. Vallance, “Creating a More Perfect Union: Modeling Intestinal Bacteria-Epithelial Interactions Using Organoids,” *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, vol. 12, no. 2, pp. 769–782, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.04.010.
 - [154] F. Ghazisaeedi *et al.*, “A virulence factor as a therapeutic: the probiotic Enterococcus

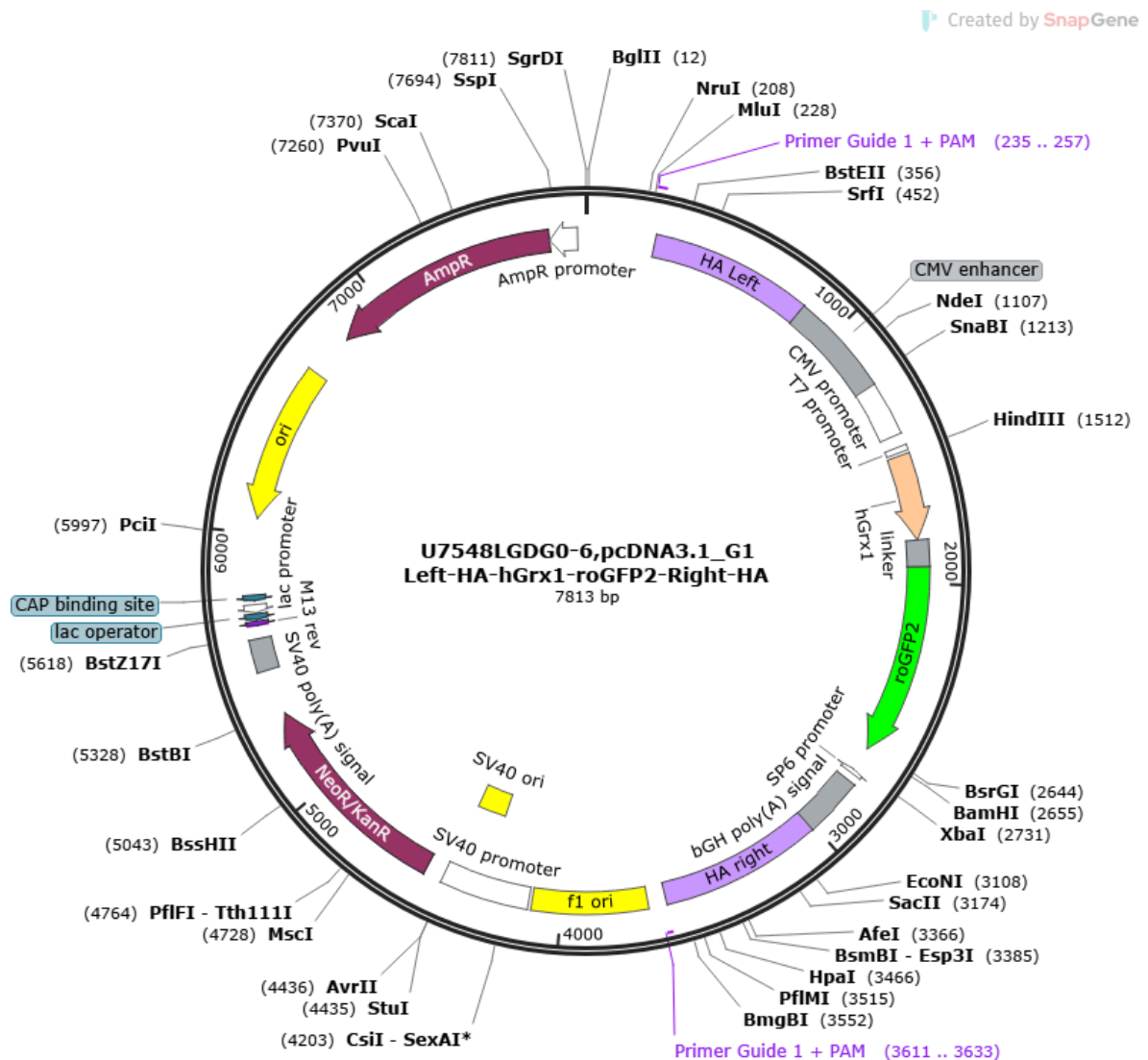
- faecium SF68 arginine deiminase inhibits innate immune signaling pathways," *Gut Microbes*, vol. 14, no. 1, p. 2106105, doi: 10.1080/19490976.2022.2106105.
- [155] A. Nakkarach, H. L. Foo, A. A.-L. Song, N. E. A. Motalib, S. Nitisinprasert, and U. Withayagiat, "Anti-cancer and anti-inflammatory effects elicited by short chain fatty acids produced by *Escherichia coli* isolated from healthy human gut microbiota," *Microb Cell Fact*, vol. 20, p. 36, Feb. 2021, doi: 10.1186/s12934-020-01477-z.
 - [156] G. Tumurkhuu *et al.*, "The inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α and nitric oxide production by *Clostridium perfringens* α -toxin and its relation to α -toxin-induced intracellular ceramide generation," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 299, no. 8, pp. 554–562, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.ijmm.2009.04.003.
 - [157] M. Johannessen, F. Askarian, M. Sangvik, and J. E. Sollid, "Bacterial interference with canonical NF κ B signalling," *Microbiology (Reading)*, vol. 159, no. Pt 10, pp. 2001–2013, Oct. 2013, doi: 10.1099/mic.0.069369-0.
 - [158] Y. Lu *et al.*, "Gut microbiota influence immunotherapy responses: mechanisms and therapeutic strategies," *Journal of Hematology & Oncology*, vol. 15, no. 1, p. 47, Apr. 2022, doi: 10.1186/s13045-022-01273-9.
 - [159] N. M. Breyner, M. Hecht, N. Nitz, E. Rose, and J. L. Carvalho, "In vitro models for investigation of the host-parasite interface - possible applications in acute Chagas disease," *Acta Tropica*, vol. 202, p. 105262, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105262.
 - [160] N. Yoshida, "Trypanosoma cruzi infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity," *Parasitol Int*, vol. 57, no. 2, pp. 105–109, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.parint.2007.12.008.
 - [161] D. Silva-dos-Santos *et al.*, "Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to Trypanosoma cruzi infection and target tissues," *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 11, no. 4, p. e0005507, Apr. 2017, doi: 10.1371/journal.pntd.0005507.
 - [162] L. M. Carvalho *et al.*, "Histopathological changes in the gastrointestinal tract and systemic alterations triggered by experimental oral infection with Trypanosoma cruzi," *Experimental Parasitology*, vol. 218, p. 108012, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.exppara.2020.108012.
 - [163] W. de Souza, T. M. U. de Carvalho, and E. S. Barrias, "Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction," *Int J Cell Biol*, vol. 2010, p. 295394, 2010, doi: 10.1155/2010/295394.
 - [164] A. Pastuła *et al.*, "Three-Dimensional Gastrointestinal Organoid Culture in Combination with Nerves or Fibroblasts: A Method to Characterize the Gastrointestinal Stem Cell Niche," *Stem Cells International*, vol. 2016, p. e3710836, Nov. 2015, doi: 10.1155/2016/3710836.
 - [165] G. Noel *et al.*, "A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Art. no. 1, Mar. 2017, doi: 10.1038/srep45270.
 - [166] N. Chalkidi, C. Paraskeva, and V. Koliarakis, "Fibroblasts in intestinal homeostasis, damage, and repair," *Front Immunol*, vol. 13, p. 924866, Aug. 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.924866.
 - [167] M. D. Brügger and K. Basler, "The diverse nature of intestinal fibroblasts in development, homeostasis, and disease," *Trends in Cell Biology*, vol. 33, no. 10, pp. 834–849, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.tcb.2023.03.007.
 - [168] M. D. Brügger, T. Valenta, H. Fazilaty, G. Hausmann, and K. Basler, "Distinct populations of crypt-associated fibroblasts act as signaling hubs to control colon homeostasis," *PLoS Biol*, vol. 18, no. 12, p. e3001032, Dec. 2020, doi: 10.1371/journal.pbio.3001032.

9. Anexos

9.1. Anexo I: Mapas de plásmidos utilizados como ADN molde

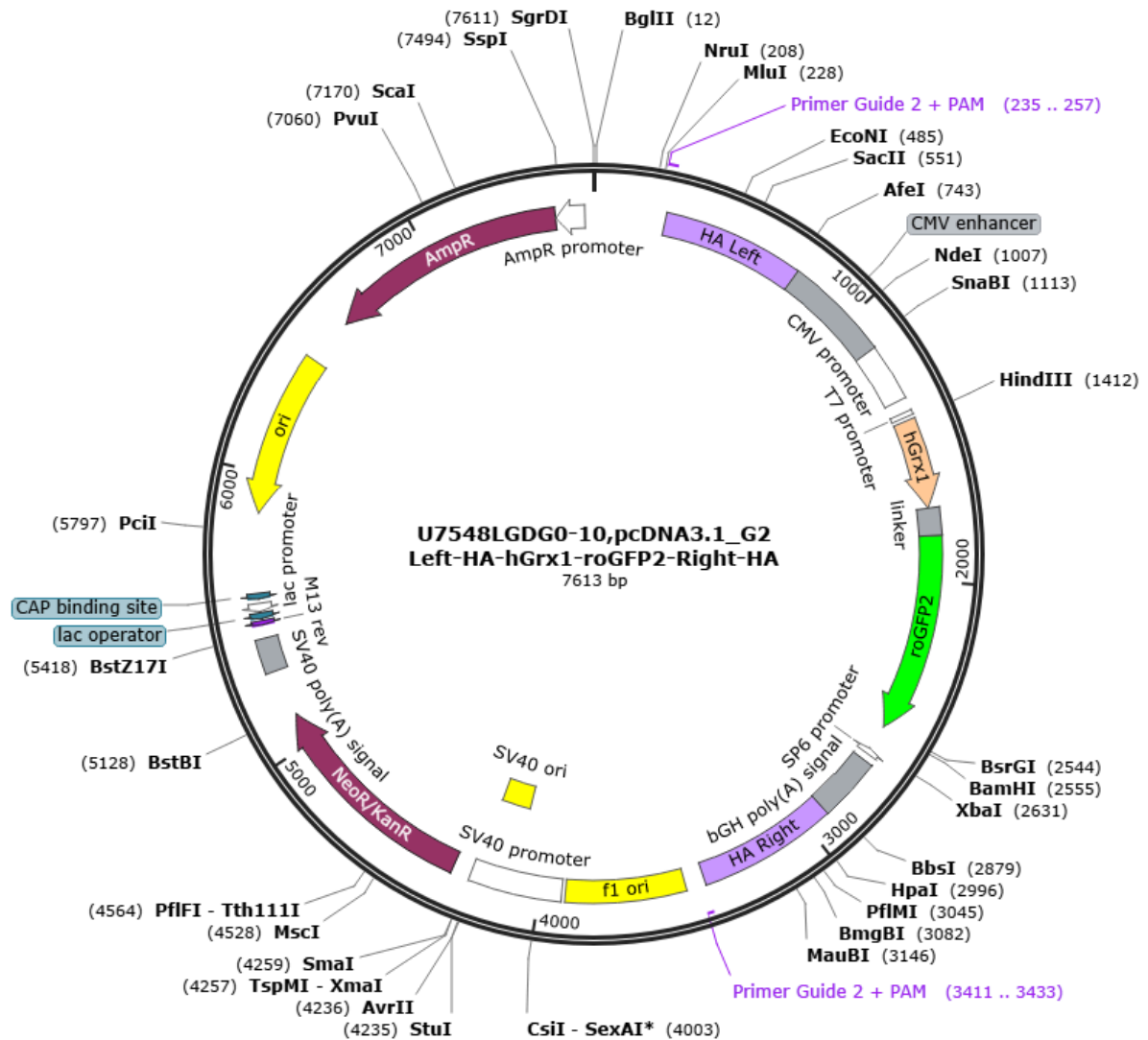
Los plásmidos fueron sintetizados por la empresa Genscript a partir del plásmido pcDNA3.1_hGrx1-roGFP2. Los mapas son visualizados con el programa SnapGene. En todos los casos, se observa en color lila los brazos derecho e izquierdo con homología para el sitio de corte de cada guía (Left & Right HA) flanqueando el inserto de interés.

Mapa del plásmido utilizado para ADN molde con la guía 1



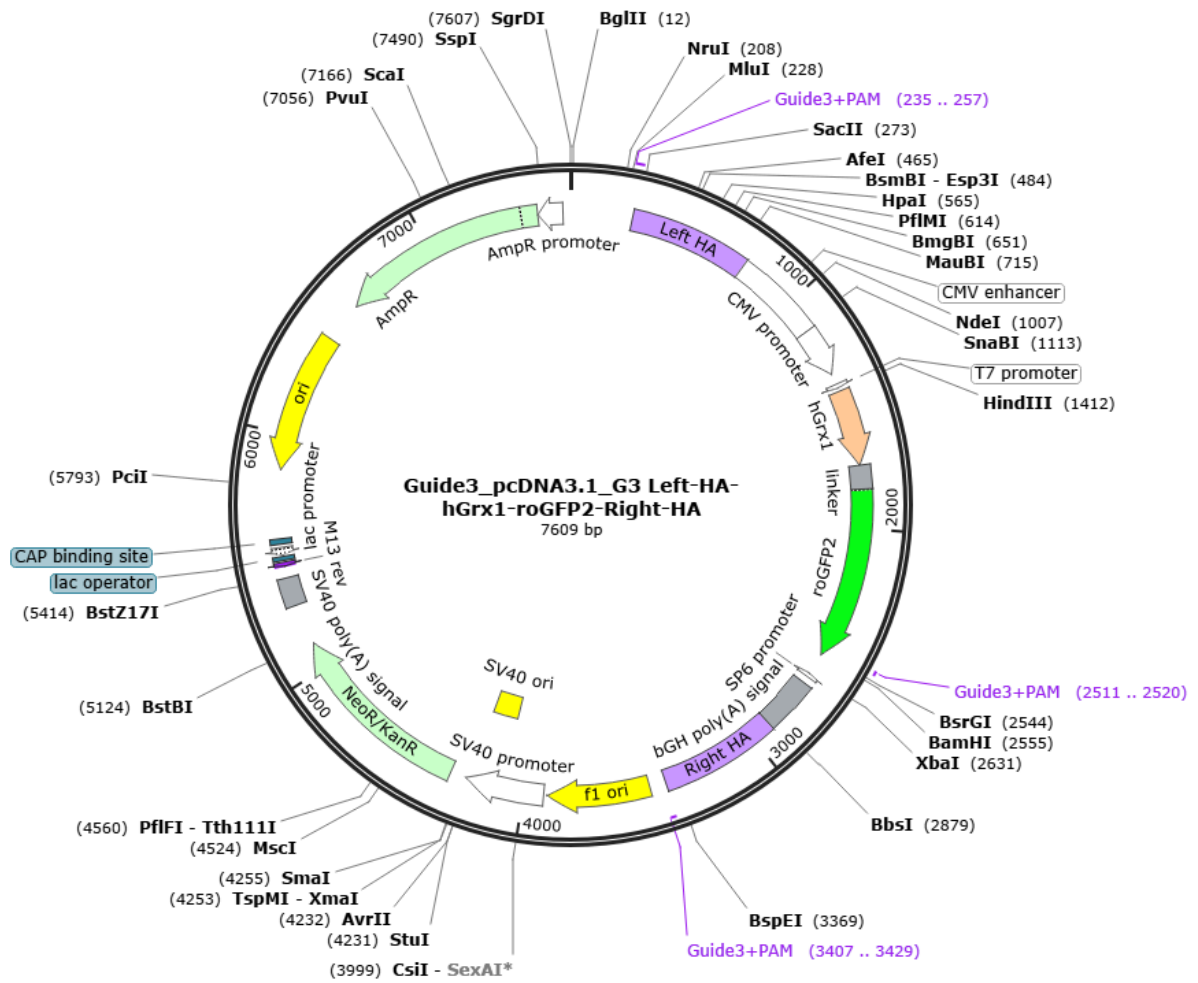
Mapa del plásmido utilizado para ADN molde con la guía 2

Created by SnapGene



Mapa del plásmido utilizado para ADN molde con la guía 3

Created by SnapGene



9.2. Anexo II: Publicación y difusión de resultados

En el marco de esta tesis de doctorado parte de los resultados obtenidos se publicaron dos artículos en revistas internacionales arbitradas:

- **Daghero, H.**, Doffe, F., Varela, B. et al. Jejunum-derived NF- κ B reporter organoids as 3D models for the study of TNF-alpha-induced inflammation. Sci Rep 12, 14425 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18556-3>
- **Daghero, H.**, Pagotto, R., Quiroga, C., Medeiros, A., Comini, M. A., & Bollati-Fogolín, M. (2023). Murine colon organoids as a novel model to study *Trypanosoma cruzi* infection and interactions with the intestinal epithelium. Frontiers in cellular and infection microbiology, 13, 1082524. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1082524>

Parte de los resultados de este trabajo fueron presentados en las siguientes instancias:

Presentaciones orales

- Reunión de la Sociedad Argentina de Protozoología, La Plata, Argentina, Noviembre 2023. Investigating host-pathogen interaction in Chagas disease with a colon-derived organoid model. **Daghero H.**, Pagotto R., Medeiros A., Bollati-Fogolín M., Comini M.
- Ciclo de seminarios del Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, Octubre 2023. Organoides aplicados al estudio de la interacción microorganismo-intestino. **Daghero H.**
- 2do Encuentro del Grupo Interdisciplinario para el descubrimiento de nuevas terapias en el contexto de “Una Salud”, Montevideo, Uruguay, Julio 2023. Organoides intestinales para el abordaje de la enfermedad de Chagas. **Daghero H.**
- Jornada Reemergencia de la enfermedad de Chagas: Diálogo entre la Medicina Clínica y la Medicina Molecular. Montevideo, Uruguay, Mayo 2022. Potencial de los organoides intestinales murinos para el estudio de la enfermedad de Chagas. **Daghero H.**, Medeiros A.

Presentaciones en formato póster:

- Jornadas Científicas del Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay, 2023. Mini-intestinos en el laboratorio: un modelo innovador para el abordaje de enfermedades intestinales. **Daghero H.**, Pagotto R., Medeiros A., Bollati-Fogolín M., Comini M.
- International Society for Stem Cell Research Annual Meeting, San Francisco, EEUU, 2022. Modeling host-parasite interaction in Chagas disease with murine intestinal organoids. **Daghero H.**, Pagotto R., Medeiros A., Quiroga C., Bollati-Fogolín M., Comini M.
- Virtual International Society for Stem Cell Research/JSRM International Symposium. Tokio, Japón, 2021. NF-kB reporter intestinal organoids: a 3D model for studying intestinal inflammation in health and disease K., **Daghero H.**, Doffe F., Bollati-Fogolín M., Pagotto R.

9.3. Anexo III: Financiación

Para el desarrollo del trabajo de esta tesis se contó con la siguientes fuentes de financiación:

- PEDECIBA - Área Biología: alícuotas de estudiante
- ANII: con la beca de posgrado nacional POS_NAC_2019_1_157518 y el Fondo María Viñas FMV_1_2019_1_156213
- Para la realización de la pasantía en el Institut Pasteur París se contó con financiación del Institut Pasteur Montevideo (Beca Paulina Luisi) y Pasteur Network (Beca Calmette-Yersin)
- Además se obtuvieron los siguientes instrumentos para la financiación de los futuros experimentos de organoides con *T. cruzi*: Proyecto Actions Concertées InterPasteuriennes - (ACIP) 2022 MiniguTcruzi: "Intestinal organoid models for studying host-parasite interaction in Chagas disease" y el Proyecto de movilidad Instituto Weizmann-IP Montevideo: "Elucidating host-parasite interaction at single cell level"