



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS**  
**UNIDAD ZACATENCO**  
**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

# **Establecimiento de cultivos tridimensionales para el estudio de la giardiasis**

**TESIS**

QUE PRESENTA

**M. EN C. KARLA BERENICE ACOSTA VIRGEN**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE  
**INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DR. ADOLFO MARTÍNEZ PALOMO (CINVESTAV-DIPM)**  
**DRA. MARTHA ESPINOSA CANTELLANO (CINVESTAV-DIPM)**

Este trabajo se realizó en el laboratorio 1 de Biología Celular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), bajo la codirección del Dr. Adolfo Martínez Palomo y de la Dra. Martha Espinosa Cantellano.

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca de doctorado otorgada para la realización de este trabajo (No. de becario: 585129/CVU:706801).

Asimismo, agradezco el financiamiento otorgado para este trabajo, a través de los siguientes proyectos:

- Dr. Adolfo Martínez-Palomo, Proyecto SEP-Cinvestav (2018) con número de solicitud 172, titulado “Desarrollo de organoides intestinales para el estudio de la giardiasis”, en la modalidad A Proyectos de Investigación.
- M. en C. Karla Berenice Acosta Virgen, Conacyt-Beca de movilidad-2018 en el extranjero, (No. 291250).
- M. en C. Karla Berenice Acosta Virgen, Apoyo para estancia de Investigación, Comité de Becas Cinvestav, (2018).
- Dra. Martha Espinosa Cantellano, Proyecto Conacyt-FORDECYT-PRONACES/ 2558586/2020, titulado “Desarrollo de un modelo tridimensional de duodeno humano mexicano para el estudio de enfermedades infecciosas intestinales” correspondiente a la convocatoria Ciencia de Frontera, (2019).
- M. en C. Karla Berenice Acosta Virgen, Apoyo Extraordinario, Comité de Becas Cinvestav, (2021).

## **Asesores**

### *Internos*

**Dra. Bibiana Chávez Munguía**

(Depto. Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav)

**Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi**

(Depto. Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestav)

### *Interno- Cinvestav*

**Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño**

(Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Cinvestav)

### *Externos*

**Dr. Francisco Javier Torres López**

(Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI)

**Dr. Antonio Eusebio Lazcano Araujo**

(Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México)

*“We all move forward when we recognize how resilient and striking the women around us are”.*

Rupi Kaur

## Agradecimientos

Este trabajo fue desarrollado gracias al apoyo invaluable de muchas personas e instituciones que respaldaron cada una de las decisiones tomadas durante mis estudios de doctorado.

Quiero agradecer al Cinvestav, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado. Por todo el proceso de aprendizaje que viví en esta institución y por permitirme conocer a personas maravillosas durante el tiempo que llevo aquí.

Al Dr. Adolfo Martínez Palomo, por aceptarme en su laboratorio y por darme siempre la confianza y las oportunidades para desarrollar plenamente mis ideas. Por estar siempre al pendiente de mi desarrollo profesional y por compartir su enorme experiencia y sus sabios consejos conmigo. ¡Gracias, mi querido Dr. Adolfo!

A la Dra. Martha Espinosa por aceptar ser mi codirectora desde la maestría. Por apoyar mis decisiones e impulsar mis capacidades. Gracias también por ayudarme a aterrizar mis ideas y por enriquecer mi trabajo con sus correcciones tan precisas. ¡Gracias, Dra. Martha!

A la Dra. Bibiana Chávez por todo el tiempo que compartimos, cada día desde muy tempranito. Por todas sus enseñanzas, por la confianza y el cariño que siempre me ha brindado y por estar muy cerca de mi desarrollo profesional y personal. ¡Gracias, Dra. Bibi!

A la Dra. Gabriela Vallejo Flores por compartir todos sus conocimientos y experiencias para el desarrollo y mantenimiento de cultivos tridimensionales, por todas las aventuras dentro y fuera del MPI y por su apoyo incondicional, aún con la distancia. ¡Gracias, Gaby!

Agradezco también a mis asesores, internos y externos, Dr. Víctor Tsutsumi, Dr. Gerardo Contreras y Dr. Javier Torres por abrirme las puertas de sus laboratorios y por siempre tener disponibilidad de revisar mi trabajo y de compartir sus experiencias y conocimientos conmigo.

A mi querido Dr. Toño Lazcano por ser mi asesor desde la maestría y por siempre tener la disposición y el cariño para enriquecer mi trabajo y por apoyarme incondicionalmente.

A la Dra. Lorena Gutiérrez por su infinita paciencia y por siempre apoyar mis ideas e iniciativas. Por siempre tener tiempo para todos los estudiantes y por brindarme siempre las palabras de aliento que necesitaba escuchar, sobre todo en los momentos más difíciles. ¡Gracias, Dra. Lore!

Mi total agradecimiento a las personas que laboran en el Cinvestav y que me apoyaron durante la realización y conceptualización de los procedimientos experimentales de este trabajo, principalmente:

A la Bióloga Lizbeth Iliana Salazar Villatoro, por su apoyo técnico para la elaboración y mantenimiento de los medios de cultivo, así como el procesamiento de las muestras para los diferentes experimentos desarrollados en esta tesis. Además, agradezco tu maravillosa amistad y que siempre estés al pendiente de mí, dentro y fuera del laboratorio. Gracias por trabajar, reír y llorar conmigo. Por ser parte de mi red de apoyo y de mi familia elegida. Eres una colaboradora excepcional y una amiga invaluable. Te quiero muchísimo, mi Lizilla.

Al Dr. Daniel Talamás Lara, por su apoyo técnico para la observación de las muestras de microscopía confocal y la elaboración de las imágenes del manuscrito de esta tesis y de otras colaboraciones desarrolladas en conjunto. Gracias también por tantas risas y enojos,

las inolvidables reuniones en el depa y por todos los momentos compartidos contigo y con Eli. Los quiero mucho.

A la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio, por los cursos de capacitación que nos brindaron y por el apoyo en el cuidado y manejo de los ratones utilizados para este proyecto. En particular, agradezco al Dr. Jorge Fernández y a la MVZ. Antonieta López López por su disponibilidad y atención a nuestras solicitudes.

A la M. en C. Karla Montserrat Gil Becerril, por su apoyo técnico para el procesamiento de los tejidos y la observación de las muestras en su laboratorio. Por siempre tener tiempo para apoyarme y por tantas experiencias que hemos compartido juntas.

A la M. en C. Brenda Yazmín Vargas Hernández y al M. en C. Leandro Alberto Núñez Muñoz del laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Depto. de Biotecnología y Bioingeniería, por su apoyo en la conceptualización y desarrollo de los análisis de PCR. ¡Gracias, Bren y Leo!

A la Dra. Beatriz Xoconostle y al Dr. Roberto Ruiz Medrano, por permitirme desarrollar mis análisis moleculares en sus laboratorios y por permitirme colaborar con ustedes en el proyecto COVID.

A la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabólica del Cinvestav por las facilidades otorgadas, en particular al M. en C. Emmanuel Ríos Castro por su asesoramiento y apoyo técnico para el procesamiento y análisis de las muestras enviadas a espectrometría de masas.

A mis compañer@s y amig@s del laboratorio 1, que siempre estuvieron ahí para apoyarme, escucharme y hacerme reír mucho: Liz, Dani, Hugo, Paty, Anel, Gaby, Vale, Leo, Ranfe, Juju, Miguel y Oli.

A las secretarías del DIPM. En especial a mis queridas Judith Escobedo, Irma Miranda, Clara Castelán y Martha Aguilar, por su apoyo técnico durante mi doctorado y por sacarme de tantos apuros. ¡Gracias!

A mis alumnos Gaby, Leo y Miriam por la confianza que me tuvieron para dirigir sus maravillosos proyectos, pero, sobre todo, por su comprensión y por no enojarse tanto (creo) cuando ando en mil cosas y olvido lo que teníamos planeado. Los quiero mucho.

A la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, principalmente a la enfermera Julia Uribe Madrid por el apoyo para la recepción de las muestras de duodeno humano, y a la Dra. Guadalupe Cárdenas por su apoyo para el cultivo de las líneas celulares productoras de factores de crecimiento.

También agradezco a mi red de apoyo: Liz, Marce, Sandy, Nikte, Pau, Meli, Itzelita, Gaby y a las chicas del grupo violeta, por su cariño y confianza.

A mis amig@s, que siempre, de alguna manera, están ahí para mí: Silvano (mae), HugoJesús, Itzelita (caracol), Alicia, Gaby Azul, Marce, Moneen y Manuel (Chuchito, sin ti esos experimentos no habrían salido). Los quiero muchísimo.

A Revoluciones por llegar a mi vida y permitirme desarrollar mi pasión por la divulgación científica. Gracias a Meli por crear este espacio y a Pau y Joce, porque las cuatro juntas hacemos un equipo maravilloso. Gracias por su tiempo, comprensión y por su hermosísima amistad, chicas. Las adoro.

## Dedicatorias

Quiero dedicar este trabajo a las personas más importantes en mi vida, a quienes agradezco su amor, comprensión, paciencia y apoyo incondicional para que yo pudiera realizar este trabajo. A quienes han estado conmigo y para mí durante mi desarrollo personal y profesional.

A mis padres, Rosa y Fernando y a mi hermano Fer, que son mi más grande motivación y orgullo. A los tres, les agradezco que apoyen cada una de mis decisiones, que siempre me acompañen y, sobre todo, agradezco que han entendido y aguantado mis ausencias, enojos, frustraciones y que, con su infinito amor, han estado siempre para mí. Los amo con todo mi corazón.

A mis abuelas, Ofelia y Rosita, que siempre han sido para mí, símbolo de mujeres fuertes e inigualables. Gracias por todo lo que hicieron por ambas familias sin esperar nada a cambio.

A mi tía Goyita, que se fue sin poder ver cómo terminaba esta etapa, en la que me echó tantas porras. Gracias, tía por darme tu cariño y atención desde que era una niña. Por el amor y la entrega hacia nosotros y por esa forma tan única de ser. Te quiero y extraño, siempre.

A mi familia Peralta-Ángeles, que me han adoptado y arropado con todo su amor. A mamá Mago y papá Juan, por quererme como una más de sus hijas. A mis hermanas-cuñadas y cuñado, por su cariño, apoyo y por tantas cosas bonitas que compartimos junt@s. A mis sobrinos, por estar ahí y permitirme verlos crecer y aprender tanto de ustedes. Los adoro a todos.

Y finalmente y no menos importante, a ti mi Betin, que en estos 10 años no has soltado mi mano. Agradezco y valoro infinitamente tu maravilloso amor y tu inagotable paciencia. Gracias por siempre tener las palabras adecuadas para levantarme el ánimo, por hacerme reír todos los días, todo el día. Por las experiencias tan maravillosas que hemos compartido y por aguantar, más que cualquier otra persona en el mundo, mis enojos y frustraciones. Gracias por apoyar todas mis decisiones y por ayudarme a construir y desarrollar cada una de las fases (buenas y malas) de este y otros proyectos, siempre a mi lado. Gracias a ti y a nuestro Tycho (que llegó en el momento que más lo necesitábamos a darnos todo su amor y a darle muchos giros bonitos a nuestras vidas), por esta maravillosa familia que hemos construido y por estar siempre ahí, para mí. Te amo, mi guapo.

Índice	
<b>Asesores</b>	<a href="#"><u>3</u></a>
<b>Agradecimientos</b>	<a href="#"><u>5</u></a>
<b>Dedicatorias</b>	<a href="#"><u>7</u></a>
<b>Resumen</b>	<a href="#"><u>11</u></a>
<b>Abstract</b>	<a href="#"><u>12</u></a>
<b>Lista de figuras</b>	<a href="#"><u>13</u></a>
<b>Lista de tablas</b>	<a href="#"><u>15</u></a>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<a href="#"><u>16</u></a>
<b>Introducción</b>	<a href="#"><u>17</u></a>
<b>Generalidades del intestino delgado</b>	<a href="#"><u>17</u></a>
<i>Duodeno</i>	<a href="#"><u>17</u></a>
<i>Yeyuno</i>	<a href="#"><u>18</u></a>
<i>Íleon</i>	<a href="#"><u>19</u></a>
<b>Estructura del epitelio del intestino delgado</b>	<a href="#"><u>19</u></a>
Poblaciones celulares y renovación de células madre en el intestino	<a href="#"><u>20</u></a>
<i>Células madre</i>	<a href="#"><u>21</u></a>
<i>Células absorbentes</i>	<a href="#"><u>22</u></a>
<i>Enterocitos</i>	<a href="#"><u>22</u></a>
<i>Células M</i>	<a href="#"><u>22</u></a>
<i>Células secretoras</i>	<a href="#"><u>24</u></a>
<i>Células de Paneth</i>	<a href="#"><u>24</u></a>
<i>Células caliciformes</i>	<a href="#"><u>24</u></a>
<i>Células enteroendócrinas</i>	<a href="#"><u>24</u></a>
<i>Células Tuft</i>	<a href="#"><u>25</u></a>
<i>Moco</i>	<a href="#"><u>25</u></a>
<i>Microbiota intestinal</i>	<a href="#"><u>26</u></a>
<b>Cultivos tridimensionales</b>	<a href="#"><u>27</u></a>
<i>Células primarias y células madre</i>	<a href="#"><u>27</u></a>
<i>Matrices</i>	<a href="#"><u>29</u></a>
<i>Medios de cultivo enriquecidos</i>	<a href="#"><u>29</u></a>
<b>Tipos de cultivos tridimensionales</b>	<a href="#"><u>31</u></a>
<i>Generalidades sobre organoides</i>	<a href="#"><u>35</u></a>
<i>Organoides intestinales</i>	<a href="#"><u>37</u></a>
<i>Relevancia de los organoides durante la pandemia de Covid 19</i>	<a href="#"><u>40</u></a>
<i>Monocapas derivadas de organoides y su aplicación en el estudio de infecciones</i>	<a href="#"><u>43</u></a>
<b>Antecedentes</b>	<a href="#"><u>48</u></a>
<i>Generalidades sobre Giardia intestinalis y giardiasis</i>	<a href="#"><u>48</u></a>
<i>Ensamblajes genotípicos de Giardia</i>	<a href="#"><u>50</u></a>



<i>Patogenia de la giardiasis</i>	<a href="#">51</a>
<b>Modelos de estudio aplicados para estudiar la giardiasis</b>	<a href="#">54</a>
<i>Modelos 2D (Líneas celulares)</i>	<a href="#">54</a>
<i>Modelos in vivo</i>	<a href="#">56</a>
<b>Justificación</b>	<a href="#">58</a>
<b>Hipótesis</b>	<a href="#">58</a>
<b>Objetivos</b>	<a href="#">59</a>
<i>General</i>	<a href="#">59</a>
<i>Específicos</i>	<a href="#">59</a>
<b>Materiales y métodos</b>	<a href="#">60</a>
<i>Líneas celulares para producción de medios condicionados</i>	<a href="#">60</a>
<i>Descongelación y cultivo de líneas celulares</i>	<a href="#">60</a>
<i>Producción de sobrenadantes de los factores de crecimiento</i>	<a href="#">61</a>
<i>Test de actividad de sobrenadantes Wnt3a y R-spond</i>	<a href="#">62</a>
<i>Extracción de células madre intestinales</i>	<a href="#">63</a>
<b>Desarrollo de organoides</b>	<a href="#">65</a>
<i>Pase celular de organoides (splitting)</i>	<a href="#">65</a>
<i>Establecimiento de monocapas derivadas de organoides en ALI</i>	<a href="#">67</a>
<b>Caracterización de organoides: Identificación de marcadores</b>	<a href="#">68</a>
<b>epiteliales</b>	
<i>Extracción de ARN</i>	<a href="#">68</a>
<i>Síntesis de ADNc</i>	<a href="#">69</a>
<i>PCR punto final</i>	<a href="#">70</a>
<i>qRT-PCR</i>	<a href="#">71</a>
<b>Inmunofluorescencia de marcadores para microscopía confocal</b>	<a href="#">72</a>
<i>Procesamiento de tejido</i>	<a href="#">72</a>
<i>Procesamiento de organoides</i>	<a href="#">73</a>
<i>Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión</i>	<a href="#">74</a>
<b>Cultivo de <i>Giardia intestinalis</i></b>	<a href="#">75</a>
<b>Infección de monocapas derivadas de organoides en ALI</b>	<a href="#">75</a>
<b>Preparación de muestras para espectrometría de masas</b>	<a href="#">76</a>
<b>Resultados</b>	<a href="#">78</a>
<i>Establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo para criptas intestinales</i>	<a href="#">78</a>
<i>Producción de sobrenadantes de factores de crecimiento y test de actividad</i>	<a href="#">78</a>
<i>Extracción de criptas intestinales y desarrollo inicial de organoides duodenales humanos</i>	<a href="#">82</a>
<i>Desarrollo de monocapas derivadas de organoides humanos en ALI</i>	<a href="#">87</a>
<i>Extracción de criptas duodenales de ratón</i>	<a href="#">90</a>

<i>Establecimiento de organoides duodenales murinos</i>	<a href="#"><u>93</u></a>
<i>Caracterización de organoides duodenales murinos</i>	<a href="#"><u>96</u></a>
<i>Establecimiento de monocapas derivadas de organoides murinos en ALI</i>	<a href="#"><u>106</u></a>
<i>Infección de monocapas derivadas de organoides murinos con G. intestinalis</i>	<a href="#"><u>109</u></a>
<i>Análisis preliminar de las proteínas inducidas después de la infección de monocapas derivadas de organoides</i>	<a href="#"><u>116</u></a>
<b>Discusión</b>	<a href="#"><u>122</u></a>
<b>Conclusiones</b>	<a href="#"><u>143</u></a>
<b>Referencias</b>	<a href="#"><u>145</u></a>
<b>Material suplementario 1</b>	<a href="#"><u>171</u></a>
<b>Material suplementario 2</b>	<a href="#"><u>174</u></a>
<b>Apéndice</b>	<a href="#"><u>178</u></a>
Lista de publicaciones realizadas durante el doctorado	<a href="#"><u>178</u></a>

## Resumen

Los cultivos tridimensionales son una de las herramientas biotecnológicas más novedosas para el estudio de enfermedades infecciosas y degenerativas, incluyendo el cáncer. Uno de los ejemplos más destacados de estos modelos son los organoides, cultivos tridimensionales derivados de células madre adultas que, al ser inducidas por factores de crecimiento específicos, se reorganizan y diferencian de forma similar al tejido de origen. Los organoides intestinales son un modelo de cultivo donde el lumen intestinal se encuentra en la parte interna del modelo, por lo que son un sistema cerrado, que dificulta la interacción directa con protistas parásitos; por lo que una alternativa es inducir la formación de cultivos polarizados, denominados monocapas derivadas de organoides, que cuando son desarrollados en un sistema de interfase aire-líquido, son capaces de secretar moco. La giardiasis es la principal causa de diarrea ocasionada por protistas parásitos, particularmente en niños, producida por *Giardia intestinalis*. Hasta ahora, la giardiasis se había estudiado empleando líneas celulares y modelos animales, que no reproducen completamente las características de la infección en el humano. Recientemente, los cultivos tridimensionales intestinales han sido utilizados para el estudio de interacciones entre los epitelios y varios parásitos, entre ellos la *G. intestinalis*; no obstante, los modelos tridimensionales que se han desarrollado carecen de linajes productores de moco, por lo que no reflejan las barreras que el parásito debe traspasar para establecerse en el epitelio intestinal del hospedero. El objetivo de este proyecto es establecer las condiciones de cultivo de organoides duodenales, tanto murinos como humanos, y desarrollarlos en cultivos de monocapas derivadas de organoides en el sistema de interfase aire-líquido para estudiar las etapas iniciales de la infección causada por *G. intestinalis in vitro*.

## Abstract

Three-dimensional cultures are one of the most innovative biotechnological tools for the study and modeling of infectious and degenerative diseases, including cancer. Organoids are three-dimensional cultures derived from adult stem cells, capable of reorganizing and differentiating into the tissue of origin when induced by specific growth factors and can even give rise to polarized cultures in an air-liquid interface, capable of secreting mucus. Giardiasis is a multifactorial diarrheal disease with cosmopolitan distribution; however, the pathophysiology of this infection is not completely understood. Historically, giardiasis has been studied using cell lines and animal models that do not fully reflect the interaction of the parasite with the small intestinal epithelia. Recently, three-dimensional intestinal cultures have been used for modeling interactions between epithelia and parasites, including giardiasis; nonetheless, these models do not produce mucus, and thus do not reproduce the barriers encountered by the parasite when establishing the infection. The aim of this project is to study the initial stages of infection caused by *Giardia intestinalis in vitro* by establishing optimal culture conditions to grow murine and human duodenal organoids, and by further developing organoid-derived monolayer cultures in an air-liquid system that will be infected with the parasite.

## Lista de figuras

1. Capas de la pared del tracto gastrointestinal
2. Estructura del intestino delgado
3. Capa de moco en el intestino delgado
4. Características de los medios de cultivo enriquecidos para el crecimiento de organoides
5. Modelos tridimensionales organizados de menor a mayor complejidad y representatividad de los tejidos
6. Biobanking de organoides y sus aplicaciones
7. Representación esquemática de los organoides intestinales
8. Representación gráfica del sistema de cultivo en ALI
9. *Giardia intestinalis*: Trofozoíto, Quiste y Ciclo de vida
10. Procedimiento para la extracción de criptas a partir de tejido
11. Distribución de medios en geles de poliacrilamida para análisis de espectrometría de masas
12. Test de actividad del sobrenadante Wnt3a en la línea celular reportera HEK-293t
13. Test de actividad del sobrenadante Rspo-1 en la línea celular reportera HEK-293t
14. Extracción de células madre de biopsias duodenales de pacientes
15. Seguimiento del crecimiento de los organoides humanos del paciente 9GB273, durante los primeros nueve días del cultivo
16. Cortes finos de organoides humanos teñidos con azul de Toluidina
17. Organoides humanos al día 9 observados por MET
18. Monocapas derivadas de organoides humanos cultivados en ALI observados por MET
19. Comparación entre los modelos de cultivo establecidos para las células madre duodenales humanas
20. Fraccionamiento del duodeno para diferentes procesamientos
21. Monitoreo de organoides duodenales murinos durante la primera semana
22. Monitoreo de organoides duodenales murinos durante el test de medios (primera semana)
23. Monitoreo de organoides duodenales murinos durante el test de medios (última semana).
24. Organoides duodenales murinos observados por MET
25. PCR punto final para marcadores epiteliales (Tejido en comparación con organoides)
26. PCR punto final para marcadores (Comparación entre diferentes pases)
27. Análisis de marcadores epiteliales por qRT-PCR
28. Identificación de villina-1 y E-caderina en organoides murinos
29. Identificación de Muc-2 y ocludina en organoides murinos
30. Identificación de  $\beta$ -catenina en organoides murinos

31. Splitting de organoides murinos para sembrarse en los filtros cubiertos con matrigel y colágeno

32. Monocapas derivadas de organoides duodenales murinos

33. Test de medios para los trofozoítos de *G. intestinalis* antes de infectar las células duodenales

34. Gráficas de porcentaje de viabilidad y crecimiento de trofozoítos de *G. intestinalis* en diferentes medios de cultivo antes de infectar las células duodenales

35. Infección de monocapas derivadas de organoides duodenales infectadas con trofozoítos de *G. intestinalis*

36. Formación de huecos en la monocapa después de la infección con trofozoítos de *G. intestinalis*

37. Infección de *G. intestinalis* en monocapas derivadas de organoides murinos

38. Daño en la monocapa derivada de organoides, tras la infección con *G. intestinalis*

39. Daño en las células epiteliales de la monocapa derivada de organoides, tras la infección con *G. intestinalis*

40. Trofozoítos de *G. intestinalis* recuperados de las monocapas derivadas de organoides después de 24 h de infección

41. Esquema de trabajo para espectrometría de masas

42. Perfil proteico de los medios evaluados para espectrometría de masas

43. Comparación de los sistemas en Transwell utilizados para el estudio de ODM y *G. intestinalis*

## Lista de tablas

1. Comparación de las medidas de las secciones del intestino delgado entre humano y ratón
2. Marcadores epiteliales específicos para las poblaciones celulares del intestino delgado
3. Clasificación de las células madre de acuerdo con su capacidad de diferenciación
4. Clasificación de las células madre de acuerdo con su origen
5. Clasificación de los modelos tridimensionales
6. Especies del género *Giardia* y ensamblajes genéticos de *G. intestinalis*
7. Principales factores de virulencia de *G. intestinalis* identificados tras la interacción con células intestinales
8. Características de las líneas celulares utilizadas para la producción de medios condicionados
9. Combinación de medios utilizados para la prueba de actividad de los sobrenadantes de Wnt3a y Rspo-1
10. Primers utilizados para la identificación de marcadores epiteliales murinos
11. Diagnóstico de las endoscopias realizadas a los pacientes donadores de biopsias
12. Composición de los medios de cultivo para el test de medios de cultivo para organoides duodenales murinos
13. Composición de los medios utilizados para el establecimiento de la infección en células polarizadas en ALI
14. Resultados del análisis de espectrometría de masas identificados para *G. intestinalis*
15. Marcadores de poblaciones celulares del intestino delgado
16. Comparación de las monocapas derivadas de organoides utilizadas para estudiar a *G. intestinalis in vitro*

## Lista de abreviaturas

- **++ medio:** medio Advanced F12 suplementado con HEPES (1%) y Glutamax (1.2%).
- **+++ medio:** medio ++ suplementado con suero fetal bovino (5%)
- **ALK5:** Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  type I receptor kinase
- **BMI1:** Polycomb complex protein BMI-1
- **BMP:** Bone morphogenetic protein
- **Chga:** Cromogranina A
- **DCLK1:** Doublecortin Like Kinase 1
- **DTT:** 1,4-Dithiothreitol
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- **EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid
- **EGF:** Epidermal Growth Factor
- **ECM:** Extra-cellular matrix
- **FGF:** Fibroblast Growth Factors
- **GALT:** Gut-associated Lymphoid Tissue
- **GP2:** Glycoprotein 2
- **Hopx:** Homeodomain-only protein homeobox
- **ISC:** Intestinal Stem Cells
- **LRIG1:** Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1
- **LGR<sup>5+</sup>:** Leucine-rich-repeat-containing G-protein-coupled receptor 5
- **Lyz1:** Lisozima 1
- **mTORC1:** mechanistic target of rapamycin complex 1
- **Muc2:** Mucina 2
- **ODM:** Organoid-derived monolayers
- **PBS:** Phosphate Buffered Saline
- **PFA:** Paraformaldehído
- **Rspo-1:** Proteína R-spondin
- **SBA:** Suero Bovino Adulto
- **SFB:** Suero Fetal Bovino



# Introducción

## Generalidades del intestino delgado

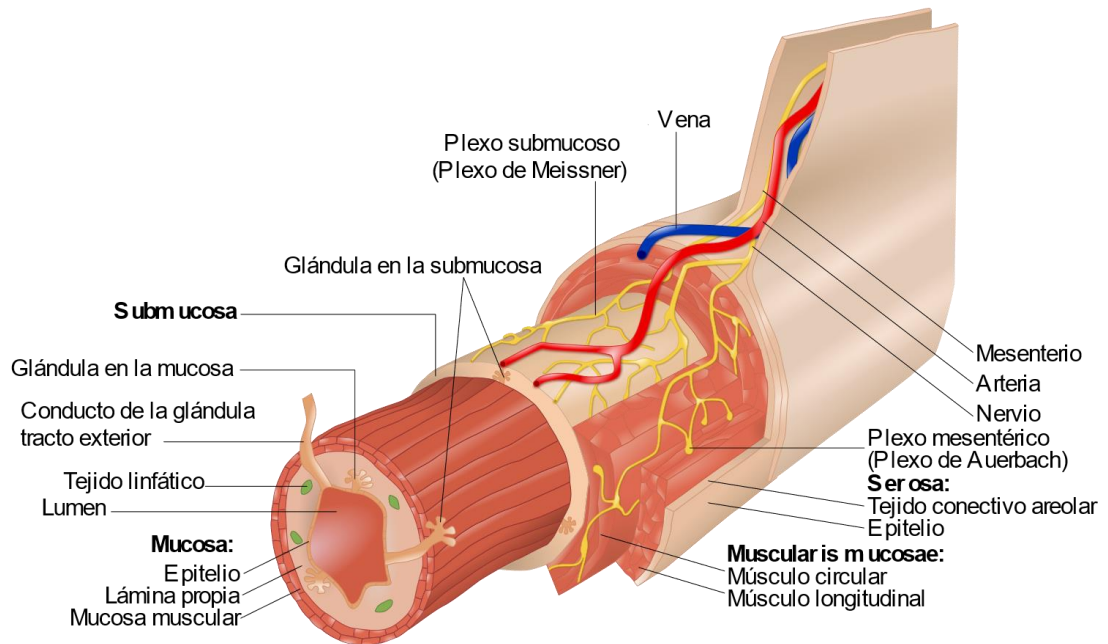
El intestino delgado es la parte más larga del tubo gastrointestinal, mide aproximadamente seis metros de largo en humanos y 43 cm en el ratón (Tabla 1). Conecta el píloro con el intestino grueso y está dividido en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon, sitios donde ocurren principalmente los procesos de digestión de alimentos y absorción de agua (Casteleyn et al., 2010; Ross & Wojciech, 2014).

**Tabla 1. Comparación de las medidas de las secciones del intestino delgado entre humano y ratón**

Sección	Humano (m)	Ratón (cm)
Duodeno	0.25	7
Yeyuno	2.5	32.5
Íleon	3.5	4.3

### *Duodeno*

El término duodeno deriva del latín “*Duodenum*” que significa “doce o dos más diez”, haciendo referencia al hecho de que la primera parte del tubo intestinal equivale a doce dedos de longitud, en animales. El duodeno, la primera región del intestino delgado, tiene una localización extra e intraperitoneal, conectando el estómago con el yeyuno. La pared duodenal está compuesta por la túnica serosa o peritoneal, la capa subserosa, la capa muscular externa, la capa submucosa y la capa mucosa (Barat et al., 2017; Jayaraman et al., 2001). La mucosa está formada por el epitelio de revestimiento, la lámina propia y la muscular de la mucosa o muscularis mucosae (Fig. 1). Los plegamientos de la mucosa forman las vellosidades o villi y las criptas o glándulas de Lieberkühn (Barat et al., 2017; Jayaraman et al., 2001).



**Fig. 1 Capas de la pared del tracto gastrointestinal<sup>1</sup>**

El duodeno tiene un papel crucial en la absorción y digestión de los nutrientes que provienen de los alimentos. El quimo, la masa homogénea resultante de la digestión por las enzimas pancreáticas y las secreciones provenientes del hígado y la vesícula biliar, continúa solubilizándose en el duodeno durante el proceso digestivo, por medio de disacáridos y peptidasas localizadas en el glicocálix de las microvellosidades, resultando en la ruptura de carbohidratos y proteínas en monosacáridos y aminoácidos, respetivamente, para su absorción. Además, el duodeno también tiene un importante papel en la neutralización de los ácidos gástricos (Glasgow & Rollins, 2008; Ross & Wojciech, 2014).

### *Yeyuno*

El yeyuno es la región intermedia del intestino delgado que está localizada entre el duodeno y el íleon.

<sup>1</sup> Imagen tomada de De Goran, Layers of the GI Tract english.svg, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=90946919>

El yeyuno está constituido de un epitelio columnar simple, que se distingue de las otras regiones del intestino delgado por la ausencia de las glándulas de Brunner (presentes en el duodeno) y de placas de Peyer (presentes en el íleon). Las funciones de esta zona son la digestión de nutrientes (por amilasas y proteinasas) y la absorción de nutrientes lipofílicos (Glasgow & Rollins, 2008; Ross & Wojciech, 2014).

### *Íleon*

Esta región es el sitio de mayor absorción de nutrientes, principalmente de vitamina B12, grasas y sales biliares. Una característica que distingue esta sección es la presencia de las placas de Peyer, que forman parte del GALT (del inglés *Gut-associated lymphoid Tissue*), que junto con las células M, tienen un papel inmunológico crucial en el proceso de presentación de antígenos (Glasgow & Rollins, 2008; Juan et al., 1996; Ross & Wojciech, 2014).

## **Estructura del epitelio del intestino delgado**

La polaridad del epitelio está dada por las uniones estrechas intercelulares, que constituyen la primera barrera de permeabilidad y confieren, entre otros, un papel protector contra patógenos. Las interacciones celulares se llevan a cabo mediante uniones intra- e intercelulares, como las uniones estrechas (*tight junctions*), los desmosomas y los nexus (*gap junctions*) (Shen, 2012; Sugita et al., 2020).

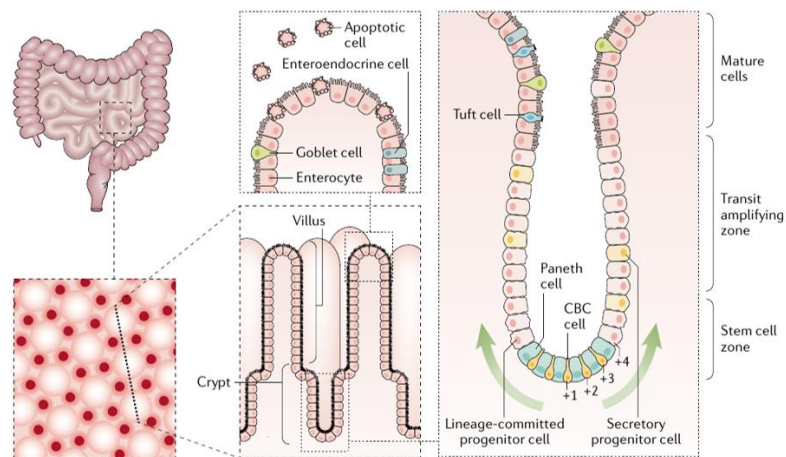
La polaridad epitelial establece un lado basolateral y uno apical, actuando como un sistema dinámico que regula la estructura celular y la homeostasis fisiológica en los tejidos. Asimismo, las proteínas de polaridad celular interactúan con vías de señalización que regulan el crecimiento y la proliferación celular. Las células epiteliales tienen una composición diferente de proteínas y lípidos, que son necesarios para llevar a cabo el transporte direccional de nutrientes y desechos entre los dos lados del epitelio (Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012)

En los epitelios las uniones estrechas están constituidas por varias proteínas, entre las que destacan las claudinas, las ocludinas, las tricelulinas, las proteínas de la zónula ocludens y moléculas de adhesión (Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012; Pearce et al., 2018; Sugita et al., 2020).

### *Poblaciones celulares y renovación de células madre en el intestino delgado*

El epitelio del intestino delgado está formado por millones de vellosidades, protrusiones de la pared intestinal con forma “de dedo”, en cuya parte más profunda se encuentran las criptas, constituidas por una capa heterogénea de células (Fig. 2) (Gehart & Clevers, 2019; Van Der Heijden & Vermeulen, 2019).

Las unidades cripta-vellosidad están constituidas por poblaciones celulares bien definidas. La base columnar de la cripta (del inglés *Crypt base columnar CBC*) está localizada en el fondo, donde se encuentran principalmente las células madre, en continua división, que dan lugar a las células tránsito-amplificadoras, que se transforman en células epiteliales maduras, clasificadas en dos linajes: las absorbentes (enterocitos y células M) y las secretoras (células de Paneth, células caliciformes, entero-endócrinas y células Tuft), según se observa en la figura 2 (Gehart & Clevers, 2019; Van Der Heijden & Vermeulen, 2019).



**Fig. 2 Estructura del intestino delgado**  
(Tomado de Gehart y Clevers, 2019)

Existen marcadores específicos de las distintas poblaciones intestinales (Tabla 2). Cada tipo celular tiene su propia capacidad de autorrenovación, funciones en el nicho celular, dinámica celular y capacidades de diferenciarse. Alrededor del 80% del epitelio del intestino delgado está compuesto por enterocitos y los demás linajes celulares están menos representados. Las células secretoras de moco (células caliciformes) comprenden entre el 5 y el 10%; por su parte, las células secretoras de hormonas (células enteroendócrinas) y las quimiosensoras (células Tuft) representan cada una únicamente el 1% del total de las poblaciones celulares. Asimismo, las células secretoras (células de Paneth) corresponden al 5% y producen los factores de crecimiento en la cripta intestinal para las células madre intestinales, que representan sólo el 1% del total celular en la cripta (Barker et al., 2008; Montgomery & Breault, 2008; Umar, 2010).

#### *Células madre*

La renovación de los tejidos es esencial para mantener la homeostasis de los epitelios. Para el intestino delgado, la renovación en el epitelio intestinal murino ocurre cada cinco o seis días y cada siete días en el intestino delgado humano, aproximadamente. Este proceso de renovación ocurre en las criptas y es regulado por las células madre (Stem cells), rodeadas y protegidas por las células de Paneth. La homeostasis del epitelio intestinal tiene un impacto directo en el fenotipo, actividad, potencialidad y funcionalidad de las células madre (Barky, 2017; Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012).

En la mayoría de los tejidos adultos, el mantenimiento de la polaridad se basa en la presencia de células madre polarizadas, que se autorrenovan mediante divisiones celulares simétricas. Los genes que controlan la polaridad de las células epiteliales, también se encargan de regular la orientación de los husos mitóticos, así como la simetría de las divisiones celulares en las células madre (Barker et al., 2008; Van Der Heijden & Vermeulen, 2019).

Cada cripta contiene de cuatro a seis células madre diferentes. Existen dos modelos opuestos sobre la identidad de esas células madre: el modelo “posición +4” y el modelo “zona célula madre”. El primer modelo describe que las células madre intestinales están localizadas en la posición +4 con relación al fondo de la cripta, con tres células Paneth intercaladas entre cada célula madre. El segundo modelo las ubica en la base columnar de la cripta que distingue una población de células madre intercaladas con las células Paneth (Gehart & Clevers, 2019; Goldring et al., 2017; Takeda et al., 2011; Wells & Spence, 2014).

### Células absorbentes

#### *Enterocitos*

Son células epiteliales polarizadas, altamente especializadas para el transporte de sustancias desde la luz intestinal al sistema circulatorio. En humanos, los enterocitos constituyen una superficie de absorción de 30m<sup>2</sup>, que corresponde al 80% de la superficie del epitelio intestinal. Las principales funciones de los enterocitos son el intercambio de iones, agua, azúcar, vitaminas y péptidos, la reabsorción de sales biliares y la secreción de IgA (Zimmer et al., 2016; Ziv & Bendayan, 2000; Zwicker & Agellon, 2013).

#### *Células M*

Las células M (*Microfold*) son enterocitos especializados, localizados en el epitelio intestinal cubriendo los nódulos linfáticos o las placas de Peyer, que contienen un gran número de células B, células T y células mononucleares. Además de las funciones en la absorción, tienen un importante papel en el reconocimiento de antígenos microbianos y su interacción con el GALT (Gehart & Clevers, 2019; Ohno, 2015).

**Tabla 2. Marcadores epiteliales específicos para las poblaciones celulares del intestino delgado**

<b>Clasificación</b>	<b>Población celular</b>	<b>Marcadores epiteliales específicos</b>	<b>Referencias</b>
Células madre	CBC	Lgr5 <sup>+</sup> , Sox9	(Barker et al., 2007, 2008; Barker, Huch, Kujala, van de Wetering, et al., 2010; Becker et al., 2008; Gehart & Clevers, 2019; Roche et al., 2015; Van Landeghem et al., 2012)
	Células +4	Bmi1, Tert, Hopx, Lrig1	(Breault et al., 2008; Gehart & Clevers, 2019; Montgomery et al., 2011; Sangiorgi & Capecchi, 2008; Takeda et al., 2011)
Absorbentes	M cell	Glicoproteína 2 (GP2)	(Ohno, 2015; Ross & Wojciech, 2014)
	Enterocitos	Villina 1	(Arango et al., 2012; R. M. Ezzell et al., 1989; Robert M. Ezzell et al., 1992; Pierzchalska et al., 2012)
Secretorias	Células Paneth	Lisozima 1	(von Furstenberg et al., 2011; Zhong et al., 2015)
	Células Caliciformes	Muc2	(Garg et al., 2007; Van Klinken et al., 1999; Y. Zhou et al., 2015)
	Enteroendócrinas	Chga	(Zółtowska et al., 1998)
	Células Tuft	DCLK1	(François Gerbe et al., 2009; Westphalen et al., 2014)

## Células secretoras

### *Células de Paneth*

El linaje de secreción inicia con las células de Paneth, descritas en el siglo XIX por Joseph Paneth; se localizan en el fondo de la cripta, rodeando, protegiendo y nutriendo el nicho de las células madre mediante la secreción de factores de crecimiento. Las células Paneth tienen vesículas retractiles en la parte apical que secretan lisozimas,  $\alpha$ -defensinas y otras glicoproteínas. Además, estas células tienen un papel crucial en la regulación de la microbiota residente en el intestino (Gehart & Clevers, 2019; Ross & Wojciech, 2014; Sailaja et al., 2016; Y. Zhou et al., 2015).

### *Células caliciformes (Goblet cells)*

Son responsables de la producción de la capa de moco que recubre el epitelio intestinal. Las células caliciformes crean una capa que protege y recubre la parte apical del epitelio moco, constituido principalmente por mucinas (Gehart & Clevers, 2019; McGuckin et al., 2011; Ross & Wojciech, 2014).

### *Células enteroendócrinas*

Las células enteroendócrinas secretan las hormonas: somatostatina, histamina, colecistoquinina, secretina, motilina y polipéptidos gástricos. Además, están involucradas en la peristalsis intestinal (Gehart & Clevers, 2019; Noah et al., 2011; Ross & Wojciech, 2014).

### *Células Tuft*

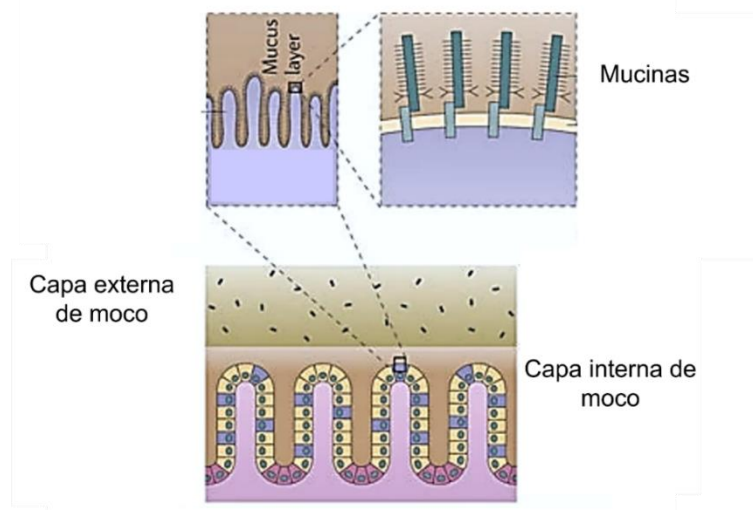
Menos del 0.4% de las células intestinales son células Tuft. Están localizadas en la zona de tránsito-amplificación, cerca del villi. Como células quimiosensoras, sus principales funciones están relacionadas a la defensa antimicrobiana y antiparasitaria (Gehart & Clevers, 2019; F. Gerbe & Jay, 2016; Ross & Wojciech, 2014).



## Moco

El moco intestinal es un gel hidratado y viscoso, que forma una capa de 150 a 300µm de grosor, que recubre el epitelio del intestino delgado. La viscosidad del moco es una propiedad crucial para la óptima absorción de nutrientes, difusión de macromoléculas y secreciones gastrointestinales (Glasgow & Rollins, 2008; McGuckin et al., 2011).

La barrera de moco está constituida de dos capas: 1) una capa interna estéril, que es mucho más delgada en el intestino delgado debido a las funciones de absorción, y 2) una capa externa no estéril, donde residen las bacterias comensales y patógenos oportunistas (Fig. 3). En el intestino delgado, el moco está compuesto de mucinas secretadas (Muc1, Muc2, Muc3A, Muc3B, Muc4, Muc12, Muc13, Muc15, Muc16 y Muc17), agentes antimicrobianos ( $\alpha$ -defensinas, catelicidinas, lisozimas, angiogenina 4, lectinas, fosfolipasa secretada A2, proteínas de unión a lipopolisacáridos, colectinas e histatinas) e inmunoglobulinas antimicrobianas específicas (IgA secretada, IgG e IgM) (Corfield et al., 2001; Y. S. Kim & Ho, 2010; McGuckin et al., 2011).



**Fig. 3 Capa de moco en el intestino delgado**  
(Modificado de McGuckin et al., 2011)

El moco representa el primer mecanismo de defensa en contra de los patógenos, es una dinámica y compleja barrera compuesta de mucinas, principalmente mucina 2 (Muc 2) secretada por las células caliciformes.

Las mucinas de la superficie celular son esenciales en la protección ante organismos comensales y patógenos que residen en el tracto intestinal; su presencia evita la penetración de los patógenos al epitelio (Corfield et al., 2001; Cornick et al., 2015; McGuckin et al., 2011).

A nivel inmunológico el moco tiene una relevancia importante como reservorio de péptidos antimicrobianos secretados por las células de Paneth y de inmunoglobulinas producidas por las células B en la lámina propia. La mucosa epitelial responde dinámicamente al daño y a los cambios bioquímicos durante las infecciones, manteniendo la homeostasis en las dos capas de moco, que continuamente son desplazadas por la peristalsis intestinal. La pérdida de continuidad de la capa de moco permite la invasión de parásitos intestinales que pueden colonizar el intestino, o de bacterias comensales, que pueden causar inflamación crónica que favorecen la formación de úlceras o de cáncer, por lo que la integridad de la capa de moco es crucial para la salud del tracto intestinal (Camilleri, 2019; Fu et al., 2011; McGuckin et al., 2011; Van der Sluis et al., 2006; Vancamelbeke & Vermeire, 2017).

### *Microbiota intestinal*

La microbiota del intestino humano está estimada entre  $10^{13}$  y  $10^{14}$  microorganismos, responsables de la comunicación con el hospedero por medio de biomoléculas, intercambio de nutrientes y mecanismos epigenéticos. La identificación de las distintas poblaciones presentes en el intestino delgado son blanco de numerosos estudios actualmente, ya que se les ha relacionado con la salud e integridad intestinal. Cambios en la composición de la microbiota producen alteraciones en el tracto gastrointestinal causando daño, favoreciendo el establecimiento de infecciones y alterando la respuesta inmune del organismo. El microbioma puede predecir la salud mucosal, siendo un potencial marcador para alteraciones de diversa índole (Gu et al., 2013; Hattori et al., 2020; S. Kim & Jazwinski, 2018; Sender et al., 2016).

## **Cultivos tridimensionales**

Los cultivos primarios, las líneas celulares y los modelos animales han sido utilizados durante décadas en la investigación biomédica para reproducir las condiciones de los tejidos humanos en los laboratorios. Sin embargo, estos modelos no representan la complejidad estructural y la funcionalidad de los tejidos. Durante los últimos 15 años estos modelos han sido reemplazados paulatinamente por los cultivos tridimensionales, que representan con mucho mayor fidelidad la complejidad, integridad, funcionalidad, linaje genético y otras características de los tejidos (Y. Liu & Chen, 2018; Shamir & Ewald, 2014; Torras et al., 2018).

La idea de desarrollar cultivos tridimensionales partió de la necesidad de mimetizar las condiciones naturales de los tejidos, creando complejas estructuras tridimensionales que permitan la formación de gradientes bioquímicos, resultando en crecimiento celular direccionado, formando complejos y arreglos compartimentalizados con características casi idénticas o muy cercanas a las del tejido que se quiere representar (Charwat & Egger, 2018; Torras et al., 2018).

Los modelos tridimensionales se distinguen de los cultivos 2D en varias características: 1) incorporan más de un tipo celular, ya que utilizan células primarias o células madre que son capaces de diferenciarse en diferentes linajes; 2) las células son crecidas en un soporte o matriz extracelular externa, 3) requieren factores de crecimiento esenciales para la proliferación y diferenciación celular y 4) permiten el establecimiento de interacciones célula-célula y célula-matriz, resultando en una mejor representación del microambiente fisiológico del tejido de origen (Arora, 2013; Charwat & Egger, 2018; Henschler, 2018; Torras et al., 2018).

### *Células primarias y células madre*

La posibilidad de utilizar células primarias y células madre, directamente extraídas de tejidos vivos para el desarrollo y crecimiento de tejidos con características muy similares al tejido de origen abrió nuevas avenidas para estudiar la fisiopatología de numerosas enfermedades (O'Brien S., Park Y., Azarin S., 2018). Las células madre pueden ser clasificadas: 1) de acuerdo con su potencial de diferenciación y 2) de acuerdo con su origen, según se detalla en las Tablas 3 y 4.

**Tabla 3. Clasificación de las células madre de acuerdo con su capacidad de diferenciación**  
(Modificado de Singh et al., 2016 y Barky, 2017)

Tipo	Descripción	Referencia
Totipotenciales	Capaces de dar lugar a cualquier tipo de célula	(Cauffman et al., 2009)
Pluripotenciales	Células embrionarias que pueden ser diferenciadas en cualquier tipo celular	(Ralston & Rossant, 2010)
Multipotenciales	Células que únicamente pueden dar lugar a células del tipo de tejido del que son extraídas	(Preston et al., 2003)
Unipotenciales	Células madre adultas que pueden producir solo un tipo celular	(Singh et al., 2016)
Oligopotenciales	Células que pueden diferenciarse solo en algunos tipos, como células linfoides o mieloides	(Singh et al., 2016)

**Tabla 4. Clasificación de las células madre de acuerdo con origen**  
(Modificado de Singh et al., 2016 y Barky, 2017)

Grupo	Tipo	Nombre (en inglés)	Origen
Origen	Embrionario	<i>Embryonic Stem Cells</i> (ESCs)	Derivados de blastocistos
		<i>Embryonic Germ</i> (EG)	Tomadas de estadios tardíos durante el desarrollo de células embrionarias
	Fetales	<i>Fetal stem cells</i> (FSC)	Células que provienen de fetos en ciertos estadios de desarrollo
	Recién nacido	<i>Umbilical cord stem cells</i>	Directamente extraídas de cordón umbilicales
		Wharton's jelly	De células madre mesenquimales
	Adulto	De tejido adulto: <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs), <i>Hematopoietic stem cells</i> (HSCs), <i>Neural Stem Cells</i> (NSCs), <i>Intestinal stem cells</i> (ISCs), <i>Epidermal stem cells</i> (ESC), <i>Hepatic stem cells</i> (HSCs), <i>Pancreatic stem cells</i>	

## *Matrices*

Las matrices son estructuras de soporte que favorecen el crecimiento de las células en tercera dimensión; son esenciales para mantener vivas las células madre adultas, para conservar las características del cultivo como adherencia, migración, proliferación y diferenciación celular, además de permitir las interacciones entre las células y en algunas ocasiones, fungir como la matriz extracelular externa. Con este propósito, las matrices están elaboradas con diferentes materiales: cerámicas (fosfato tricálcico o hidroxiapatita), polímeros sintéticos (poliestireno, ácido poli-L-láctico o ácido poli glicólico), y polímeros naturales (colágeno o matrigel) (Charwat & Egger, 2018).

El matrigel ha revolucionado los cultivos de células *in vitro*, tanto en dos (2D) como en tres dimensiones (3D). Es una matriz extracelular derivada del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm, enriquecida con componentes de membrana basal, como laminina y entactina, que semeja la complejidad del microambiente extracelular de los tejidos celulares. Es de consistencia líquida a 4°C, pero cambia de estado rápidamente a un gel sólido, con sólo una diferencia de uno o dos grados (Hughes et al., 2010; Kleinman & Martin, 2005).

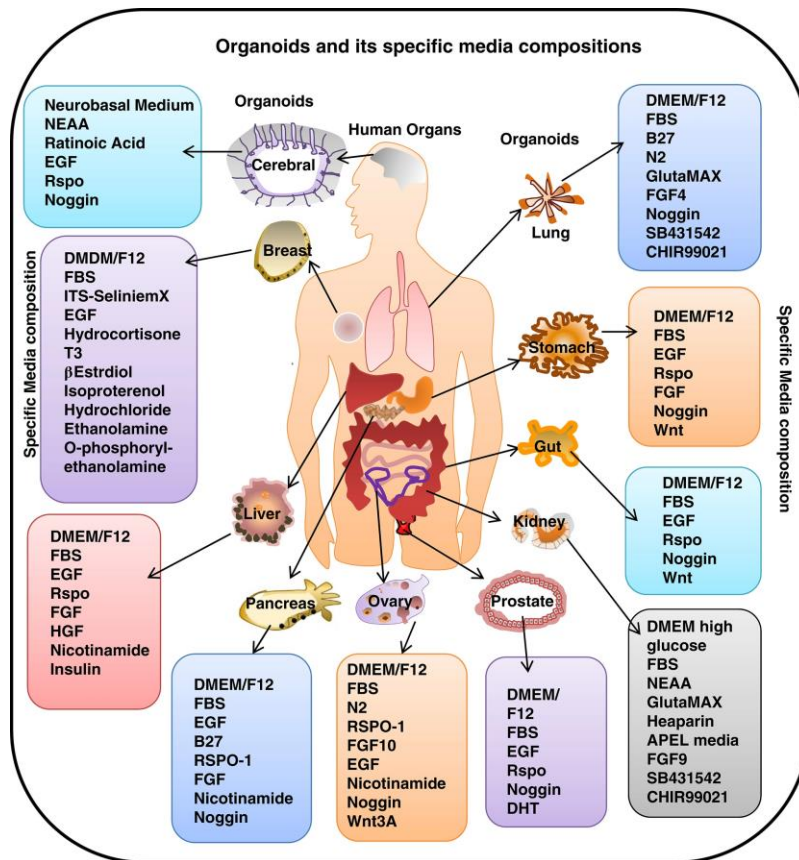
## *Medios de cultivo enriquecidos*

Tal como ocurre en el cultivo de las líneas celulares, en los cultivos tridimensionales el medio basal contiene componentes mínimos para el crecimiento de las células *in vitro*, que proveen recursos energéticos como glucosa, sales inorgánicas, aminoácidos y vitaminas (usualmente *Eagle's Minimum Essential Medium*), suplementado con suero fetal bovino y antibióticos (generalmente penicilina y estreptomicina). Sin embargo, los modelos tridimensionales dependen de la adición de factores de crecimiento altamente específicos (Eagle, 1955; Henschler, 2018; Urbischek et al., 2018).

En los cultivos tridimensionales, los factores de crecimiento están relacionados con las vías de señalización involucradas en el crecimiento, proliferación y diferenciación de las células madre. En el cultivo de organoides derivados de células madre adultas para los diferentes órganos del cuerpo humano, ya se han identificado los principales factores de crecimiento que son requeridos (Fig. 4)(Kaushik et al., 2018).

En el nicho intestinal se producen varios ligandos y factores de crecimiento que son esenciales para las células madre intestinales, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los ligandos Notch y la proteína Wnt3a. Estos factores mantienen vivas a las células madre y, además, promueven su proliferación y diferenciación. Algunos de los componentes esenciales para el desarrollo de organoides intestinales son los ligandos de Wnt, la proteína R-spo1, que potencializa la vía Wnt, o el factor Noggin, que inhibe la diferenciación de algunos componentes de la vía BMP (Sato, van Es, et al., 2011; Urbischek et al., 2018).

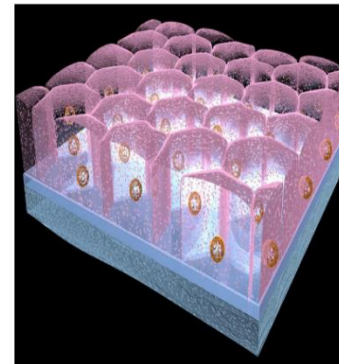
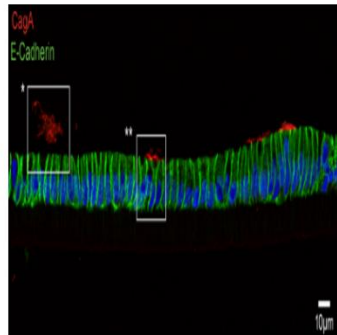
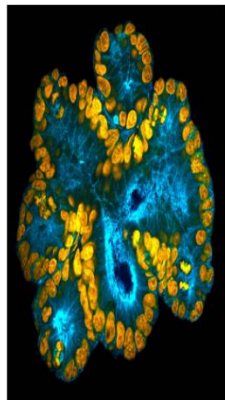
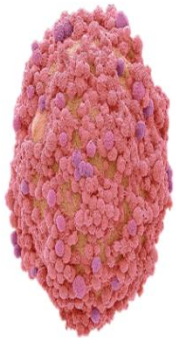
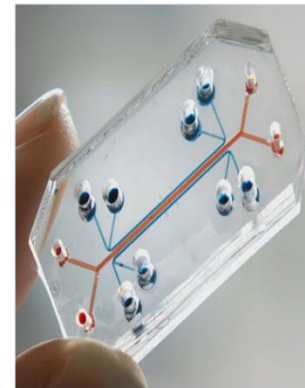
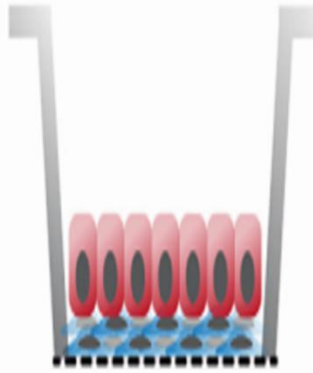
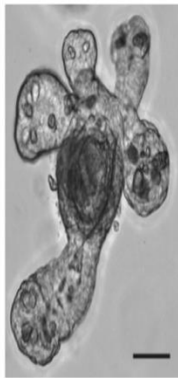
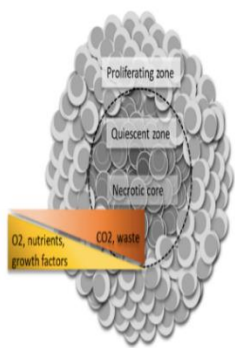
La actividad de todas las células del nicho intestinal, donde residen las células madre adultas, permite el establecimiento de un gradiente de Wnt que alcanza su punto máximo en la parte inferior de la cripta, donde impulsa la autorrenovación y la proliferación de las células madre intestinales, y que disminuye progresivamente hacia las partes superiores de la cripta, para permitir la diferenciación celular (Kabiri et al., 2014; Merenda et al., 2020; Nikolova et al., 2007)



**Fig. 4 Características de los medios de cultivo enriquecidos para el crecimiento de organoides**  
(Tomado de Kaushik et al., 2018)

### Tipos de modelos tridimensionales

Los modelos tridimensionales pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo celular, la matriz extracelular empleada, la funcionalidad o el tejido de origen (Fig. 5) (Dutton et al., 2019; Hashemzadeh, 2019; Y. Liu & Chen, 2018). Los principales modelos desarrollados hasta ahora tienen distintas aplicaciones y ofrecen ventajas y desventajas que se resumen en la Tabla 5.



Menor

Relevancia biológica

Mayor

Menor

Complejidad

Mayor

**Fig. 5 Modelos tridimensionales de menor a mayor complejidad y representatividad de los tejidos:**  
 Esferoides, Organoides, Monocapas derivadas de organoides, órganos en un chip y Bioimpresión.  
 Tomado y modificado de Yoon et al., 2012; Manolo et al., 2013 y Yakaverts et al., 2019



**Tabla 5. Clasificación de los modelos tridimensionales**

<b>Modelo de cultivo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Aplicaciones</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Referencias</b>
Autoorganizados	Esferoides	Estudio de tumores sólidos <i>in vivo</i> Plataforma de pruebas farmacológicas Comparación fenotípica y de expresión génica de tumores Cocultivos	Heterogeneidad celular Estructuras 3D compactas Reproducción de comunicación física y señalización observada en tumores Tienen límites de difusión de nutrientes	Poca uniformidad en tamaño y composición celular Resistencia farmacológica No hay superficie de adherencia No se pueden cultivar por mucho tiempo	(Costa et al., 2016; Katt et al., 2016; Mehta et al., 2012)
	Organoides	Estudios de desarrollo Organogénesis <i>in vivo</i> Medicina personalizada <i>Biobanking</i> Pruebas farmacológicas Descubrimiento de neo antígenos Edición génica Cáncer Modelado de enfermedades Infecciones Cocultivos	Múltiples tipos celulares Cultivos de largo plazo Mantenimiento de linaje genético Estructuras complejas Alta organización Paciente-específicos	Alta variabilidad Alto costo Limitación en la obtención de muestras No hay vascularización Ausencia de componentes estromales Suero fetal bovino añade más variabilidad Difícil acceso a la parte del lumen intestinal	(Almeqdadi et al., 2019; Clevers, 2016; Foley, 2017; Torras et al., 2018)
Sistemas de monocapas		Autorrenovación Estudios de diferenciación Cocultivos Estudios de transcritosis, secreción, función de barrera, producción de iones y hormonas Interacciones patógeno-hospedero Pruebas farmacológicas Absorción de metabolitos	Autoorganización provee de acceso a ambos lados (apical y basolateral) en el epitelio Morfología polarizada Monocapa impermeable contigua	Epitelio de corta vida Suelen necesitar células alimentadoras ( <i>Feeder cells</i> ) No reproducen interacciones complejas	(Boccellato et al., 2018; Dutton et al., 2019; Hillenbrand et al., 2010; Holly & Smith, 2018; Noel et al., 2017; Scott et al., 2016; Thorne et al., 2018)

**Tabla 5. Clasificación de los modelos tridimensionales (continuación)**

Micro ingeniería	Réplicas micro estructuradas	Migración unidireccional y ensayos de diferenciación Estudios de gradientes químicos Respuesta inmunológica Comportamiento de células madre	Modulación de la permeabilidad y fuerzas contráctiles Replicación de la arquitectura de los tejidos <i>in vivo</i>	Costo muy alto No hay vascularización No hay movimiento	(Dutton et al., 2019; Yuli Wang et al., 2018; Yuli Wang, Gunasekara, Attayek, et al., 2017; Yuli Wang, Gunasekara, Reed, et al., 2017)
	Sistemas micro y macro fluidicos	Aplicación de fuerzas mecánicas al epitelio Aplicación de flujo entre las capas de células Estudio de función de barrera, metabolismo y respuesta inmunológica Comportamiento multicelular a larga distancia	Cocultivos con otros modelos 3D Recreación de epitelios compartimentalizados y vascularizados Fuerzas contráctiles Recreación muy cercana a las condiciones <i>in vivo</i>	Alto costo Se requieren aditamentos manufacturados Se requiere una gran cantidad de tejido	(Kasendra et al., 2018, 2020; Sontheimer-Phelps et al., 2019; Torras et al., 2018; Workman et al., 2018)
	Bioimpresión	Trasplantes Reconstrucción de la red vascular Ingeniería de tejidos Medicina regenerativa Cáncer	Estructura tridimensional geoméricamente bien definida Alta tasa de supervivencia de células impresas Posible incorporar y manipular células individuales Posible incorporar otros cultivos 3D	Excesivamente caros Requiere equipo altamente especializado Uso limitado alrededor del mundo Poco probable de implementar aún en el cuerpo humano	(Derakhshanfar et al., 2018; Dutton et al., 2019; Mandrycky et al., 2016; Murphy & Atala, 2014; Ozbolat et al., 2016; Radhakrishnan et al., 2020; W. Zhu et al., 2016)

## **Generalidades sobre organoides**

Desde su origen, se han propuesto diferentes definiciones de organoides:

Hans Clevers (2016), líder de grupo de la primera publicación sobre organoides como modelo tridimensional de cultivo, describe:

“Un organoide es definido como una estructura tridimensional crecida a partir de células madre; consiste en tipos celulares específicos de un órgano que se autoorganizan a través de la clasificación celular y el compromiso de linaje espacialmente restringido.”

Lancaster y Knoblich (2014), se refiere a estos modelos como:

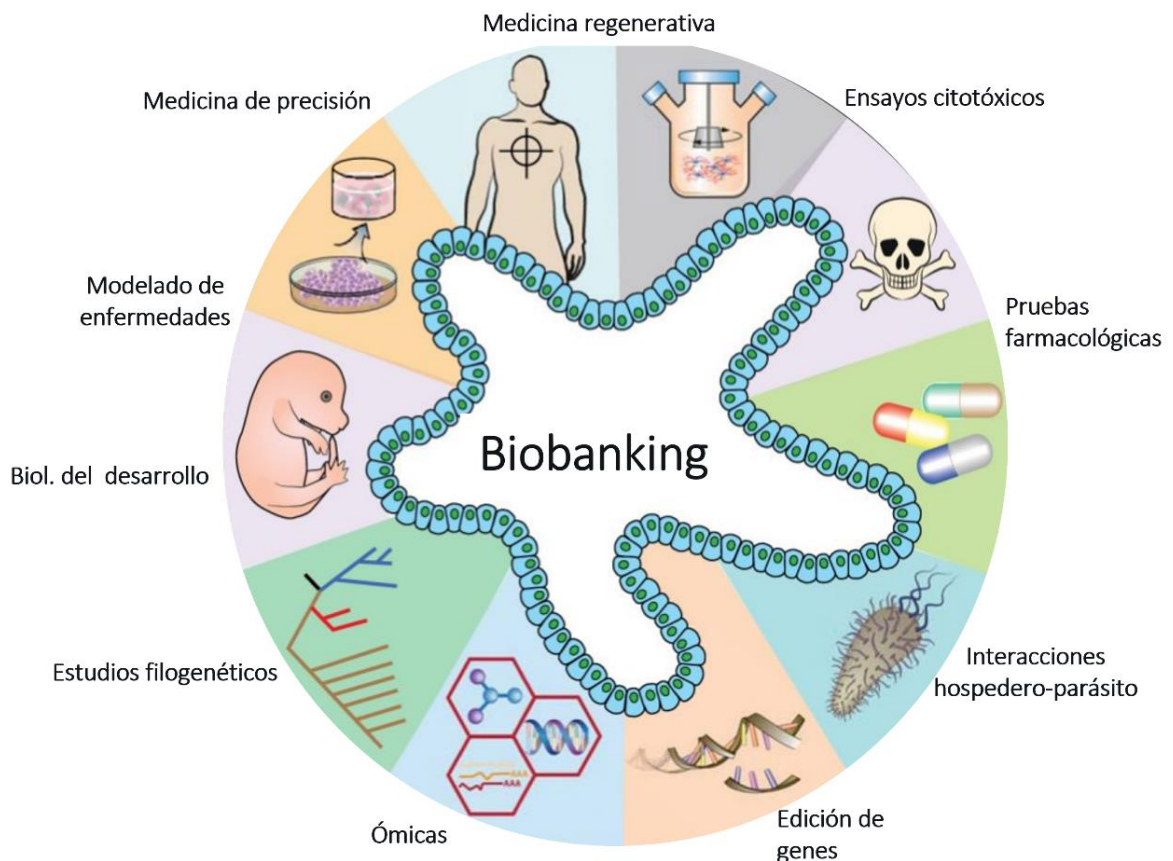
“Modelos que contienen diferentes tipos celulares que se desarrollan a partir de células madre u órganos progenitores y se autoorganizan mediante clasificación celular y se restringen espacialmente a un linaje específico, de manera similar a los procesos *in vivo*”.

Shamir y Ewald (2014) comentan:

“Varios subcampos usan estos términos indistinta o claramente; por ejemplo, en el campo de la biología de la glándula mamaria, el término organoides se refiere a explantes primarios de conductos epiteliales en geles de matriz extracelular 3D (ECM). Por el contrario, en estudios de biología intestinal, los organoides pueden referirse a derivados clonales de células madre epiteliales primarias que se cultivan sin mesénquima o pueden referirse a cocultivos epitelio-mesenquimales que se derivan de células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas”.

La definición de organoides incluye algunos elementos clave: son órgano-específicos, autoorganizados, restringidos al linaje de células madre del que derivan y son crecidos en una matriz extracelular externa (Clevers, 2016; Gjorevski et al., 2016; Lancaster & Knoblich, 2014; Shamir & Ewald, 2014; Simian & Bissell, 2017).

Se han establecido organoides de casi todos los órganos del cuerpo humano. Los bancos biológicos (*Biobanking*) de organoides humanos, tanto de personas sanas como de enfermos de varios padecimientos han sido particularmente relevantes (Fig. 6) (Corró et al., 2020). El potencial del cultivo de organoides no sólo aplica para células humanas o de ratón. Hasta ahora, se han establecido organoides de pollo (Beaumont et al., 2021; J. Li et al., 2018), perro (Chandra et al., 2019; Elbadawy et al., 2019), cerdo (Beaumont et al., 2021; Sakib et al., 2019), chimpancé (Pollen et al., 2019), gato (Kruitwagen et al., 2017), rata (Isshiki et al., 2017; Takiishi et al., 2017), conejo (Beaumont et al., 2021; Mussard et al., 2020), bovinos (Töpfer et al., 2019), incluso de las glándulas productoras de veneno en serpientes (Post et al., 2020) o de murciélago (J. Zhou et al., 2020).



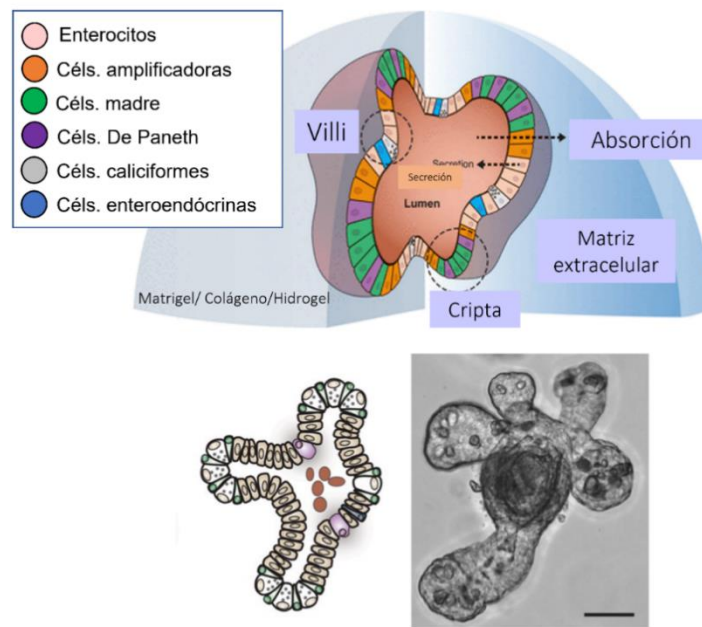
**Fig. 6 Biobanking de organoides y sus aplicaciones**  
Tomado y modificado de Corró et al., 2020

## ***Organoides intestinales***

Se han desarrollado organoides del tracto gastrointestinal a partir de la extracción de células madre de estómago, intestino delgado y colon; estos órganos se caracterizan por tener una tasa de renovación rápida y una gran capacidad de diferenciación (Meneses et al., 2016).

El primer modelo de organoides intestinales fue desarrollado por Sato y cols. (2009), quienes generaron organoides epiteliales (enteroides) con criptas y epitelio en forma de vellosidades. En este modelo se logró por primera vez aislar células madre intestinales que expresan el receptor acoplado a proteína G ( $Lgr5^+$ ), mismas que fueron sembradas en Matrigel, permitiendo que se establecieran las características del nicho intestinal en tercera dimensión (Fig. 7) (Kleinman & Martin, 2005; Sato et al., 2009).

En los organoides intestinales están representados todos los tipos de poblaciones celulares del epitelio del que originan, incluyendo las células madre, células amplificadoras, enterocitos absorbentes, células caliciformes, células enteroendócrinas y células de Paneth (Fig. 7) (Angus et al., 2020; Schuijers et al., 2015).



**Fig. 7 Representación esquemática de los organoides intestinales**  
Tomado y modificado de Dutton et al., 2019 y Stange et al., 2011

En particular, las células madre intestinales tienen la capacidad generar unidades de cripta-vellosidad, bajo condiciones de cultivo óptimas. Asimismo, poseen la capacidad de autorrenovarse en cultivos *in vitro* a largo plazo y pueden diferenciarse en todos los tipos de células intestinales (Angus et al., 2020; Barker, 2014; Barker, Huch, Kujala, Wetering, et al., 2010; Sato, van Es, et al., 2011; Tian et al., 2011).

El tipo celular en que se diferenciarán las células en cultivo está determinado por la exposición a diferentes factores de crecimiento que se adicionan al medio de cultivo, los cuales son representación de los factores intrínsecos que se producen en el nicho intestinal (Urbischek et al., 2019; Wallach & Bayrer, 2017).

En condiciones *in vitro*, los factores como Noggin y Gremlin inhiben la proteína morfogenética ósea (BMP, del inglés *Bone Morphogenetic Protein*), induciendo la diferenciación celular. Por otra parte, la diferenciación de las células de la cripta ocurre en respuesta a la relación de gradientes inversos entre las vías de señalización Wnt y BMP. Las concentraciones de Wnt son más altas en la base de la cripta, por lo que su requerimiento será mayor en los primeros días de cultivo a medida que las células ascienden hacia la luz intestinal; por el contrario, la concentración de BMP aumenta a medida que disminuye la concentración de Wnt, lo que induce la diferenciación en las células ascendentes. Lo anterior muestra la estrecha relación que existe entre las vías de señalización que ocurren en los sistemas naturales y su óptima representación *in vitro* con los factores de crecimiento que son adicionados al medio de cultivo (Angus et al., 2020; Barker, 2014; Barker et al., 2008; Qi et al., 2017; Schuijers et al., 2015).

Por otra parte, Rspo-1 es una proteína de secreción que en el epitelio intestinal se expresa en los fibroblastos subepiteliales; tiene un rol esencial en las vías de señalización de las criptas, ya que se une al receptor Lgr5<sup>+</sup>, lo que suprime la degradación de los receptores Wnt y potencia la activación de Wnt (Hao et al., 2012; Ootani et al., 2009; Wallach & Bayrer, 2017).

Noggin, una glicoproteína secretada que funciona como antagonista de BMP, es un producto mesenquimal que regula la diferenciación intestinal. Se ha demostrado que el Noggin es esencial para el mantenimiento de cultivos de organoides intestinales, ya que sin él, los organoides pierden la expresión de Lgr5<sup>+</sup> y dejan de proliferar, evitando que se establezca un cultivo de largo término (Sato et al., 2009; Urbischek et al., 2018).

Otro factor requerido en los cultivos de organoides, es el factor de crecimiento epidérmico (EGF del inglés *Epidermal Growth Factor*), que es necesario para la supervivencia de las células epiteliales y el cultivo a largo plazo (Abud et al., 2021; Sato, Stange, et al., 2011).

Dado que los medios de cultivo requieren la adición de Wnt de manera exógena, es necesario añadir inhibidores de componentes de la vía Wnt para suprimir la diferenciación de ciertos linajes celulares y permitir la diferenciación de otras poblaciones celulares. Uno de los inhibidores utilizados, es el inhibidor de TGF- $\beta$  (particularmente ALK 4/5/7 como A83-01 o SB431542). La inhibición de TGF- $\beta$  es necesaria sobre todo para el cultivo de células intestinales humanas, debido a una mayor sensibilidad a la vía BMP/TGF- $\beta$ , en la que TGF- $\beta$  inhibirá la proliferación celular impulsada por WNT (Sato & Clevers, 2013; Wallach & Bayrer, 2017).

Por su parte, el inhibidor selectivo de la proteína cinasa coiled-coil asociada a Rho (del inglés *Rho-associated coiled-coil containing protein Kinase*) mejora la supervivencia de las células madre, después de la disociación de los organoides en células individuales al prevenir la anoikis<sup>2</sup> (Meng et al., 2018; Watanabe et al., 2007). Adicionalmente, los medios de cultivo de organoides duodenales tanto de humano como de ratón, requieren de manera estándar N-acetil-L-cisteína (es un antioxidante que elimina directamente las especies reactivas de oxígeno y es una fuente de cisteína en la generación del antioxidante glutatión).

---

<sup>2</sup> Es una forma de muerte celular programada que ocurre en las células dependientes del anclaje cuando se desprenden de la matriz extracelular circundante (Taddei et al., 2012).

La nicotianamina (promueve la supervivencia y diferenciación celular), B27 y N2 (cocteles comerciales que apoyan el crecimiento de organoides y ayudan en el mantenimiento de la viabilidad a largo plazo), gastrina (promueve la proliferación de células del tracto gastrointestinal, algunos autores sugieren que su uso se puede evitar), antibióticos (preferentemente penicilina-estreptomicina) (Almeqdadi et al., 2019; Kaushik et al., 2018; Merker et al., 2016).

### ***Relevancia de los organoides durante la pandemia de Covid-19***

La pandemia de la Covid-19 que hasta marzo de 2022 registró 462,685,660 de casos positivos, 6,057,218 de muertes confirmadas y 10,736,326,329 vacunas administradas alrededor del mundo<sup>3</sup>, requirió la implementación de herramientas biotecnológicas para el estudio, monitoreo y entendimiento de las características funcionales y el tropismo celular del virus, así como la descripción de su patogénesis en múltiples órganos del humano (Tran et al., 2022).

Los organoides representaron una de las herramientas más útiles, incluso para el desarrollo de vacunas. Al inicio de la pandemia, los organoides del tracto respiratorio, del tracto gastrointestinal y del sistema circulatorio fueron los principales modelos implementados para la investigación de los mecanismos de infección del SARS-CoV-2<sup>4</sup> (Clevers, 2020; Mallapaty, 2020).

El virus SARS-Cov-2 tiene la versatilidad de infectar múltiples órganos, lo cual está relacionado con la diversidad de síntomas que se presentan durante la infección. La expresión del receptor ACE-2<sup>5</sup> en distintos tipos celulares es una de las razones de la alta capacidad infectiva del virus (Esakandari et al., 2020; Pascarella et al., 2020).

---

<sup>3</sup> Con información de *Johns Hopkins University*, 2022: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>

<sup>4</sup> Del inglés *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

<sup>5</sup> Receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2)



Múltiples grupos de investigación alrededor del mundo han utilizado los bancos de organoides para generar nuevos conocimientos acerca de la Covid-19 con la finalidad de contribuir al entendimiento de esta infección.

Cuando comenzó la pandemia, las investigaciones se centraron en las características genómicas, la filogenéticas y sobre la evolución del SARS-CoV-2; no obstante, conforme pasaba el tiempo, se evidenció la urgente necesidad de analizar las consecuencias clínicas por las que esta infección multisistémica estaba causando tantas muertes alrededor del mundo, por lo que las investigaciones se volcaron hacia el análisis de los mecanismos de entrada celular, el tropismo celular, la respuesta de la célula huésped a la infección y el desarrollo de vacunas y medicamentos para tratar la infección, aunado a la necesidad de implementar modelos preclínicos más fidedignos (Tran et al., 2022).

A continuación, se resumen algunos tipos de organoides utilizados para estudiar al virus SARS-CoV-2 y la Covid-19.

#### *Sistema respiratorio*

Muchos de los síntomas de la Covid-19 involucran procesos inflamatorios en el tracto respiratorio, por lo que los organoides de pulmones y bronquios han permitido estudiar la dinámica de infección del virus en dichos órganos, con un mejor entendimiento de la biología del virus y la patogénesis de la infección; además, han sido utilizados como plataforma para probar medicamentos contra el virus (Devaux et al., 2020; Elbadawi & Efferth, 2020; Salahudeen et al., 2020; Tindle et al., 2020).

#### *Tracto gastrointestinal*

La primera publicación que utilizó organoides humanos para el estudio de la infección por SARS-Cov-2 fue utilizando organoides intestinales. Se ha evidenciado la versatilidad del virus SARS-CoV-2 de infectar los enterocitos, no sólo en organoides humanos, sino también en organoides de murciélago. La diarrea es uno de los síntomas más prevalentes en pacientes con Covid-19, por ello, los modelos gastrointestinales han sido utilizados para obtener información

acerca de las alteraciones intestinales causadas por el virus (Zhao et al., 2021; J. Zhou et al., 2020).

### *Sistema nervioso*

Los daños más graves de trastornos neurológicos causados por la Covid-19 al Sistema Nervioso Central (SNC) incluyen convulsiones, encefalopatía y enfermedad cerebrovascular. Usando organoides de cerebro, neuronas y plexo coroides ha sido posible analizar el neurotropismo del SARS-CoV-2. Estos modelos han mostrado la muerte neuronal, neuroinvasión celular y neurotoxicidad del virus. En conjunto, los organoides del sistema nervioso derivados de células madre pluripotenciales, tanto de humano como de ratón, representan una plataforma sólida para estudiar los mecanismos de propagación neurológica del virus. Debido a la proximidad del tejido mucoso, endotelial y nervioso, así como las terminaciones nerviosas olfatorias y sensoriales, se facilita la entrada del virus al SNC, lo que podría estar relacionado con la pérdida de olfato y gusto en muchos de los pacientes; algunos investigadores señalan que, en el futuro, el desarrollo de organoides o cultivos tridimensionales multisistémicos, podrían ayudar a entender los mecanismos de infección en estas regiones del SNC. El cultivo de organoides respiratorios se han desarrollado además en modelos de ALI o en cultivos de chips microfluídicos (Bullen, 2020; Jacob et al., 2020; Mao & Jin, 2020; Ramani et al., 2020; Song et al., 2020; Tran et al., 2022; Zhang et al., 2020).

### *Sistema circulatorio, riñones e hígado*

La Covid-19 es una enfermedad multisistémica. Además de los daños a los órganos del sistema respiratorio y del tracto gastrointestinal se ha observado que la fisiopatología del virus también incluye daños en hígado, páncreas, corazón y riñones. Las células madre pluripotenciales humanas obtenidas de los órganos antes mencionados han permitido el establecimiento de organoides de cardiomiocitos, hepatocitos y de colangiocitos, que podrán ayudar describir los mecanismos de daño que ocasiona el virus en estos tejidos en el humano (Allison, 2020; Schmidt et al., 2015; Yijin Wang et al., 2020; Xia et al., 2020).

## Ojo

Uno de los mecanismos de entrada del virus es mediante la superficie ocular, que incluye la córnea, la esclerótica y el limbo, regiones que expresan el receptor ACE-2. Para confirmar que estos tejidos eran realmente susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, se establecieron cultivos de organoides a partir de células aisladas de regiones oculares de donantes sanos e infectadas con SARS-CoV-2. Las células del limbo fueron el tejido ocular primario más susceptible a la infección por este virus. Asimismo, se han desarrollado organoides de retina y cultivos tridimensionales de ojo completo, los cuales han sido esenciales para establecer que el ojo es una vía de transmisión (Ahmad Mulyadi Lai et al., 2021; Eriksen et al., 2021; Makovoz et al., 2020; Moghbelli et al., 2020; Tran et al., 2022)

## **Monocapas derivadas de organoides y su aplicación en el estudio de infecciones**

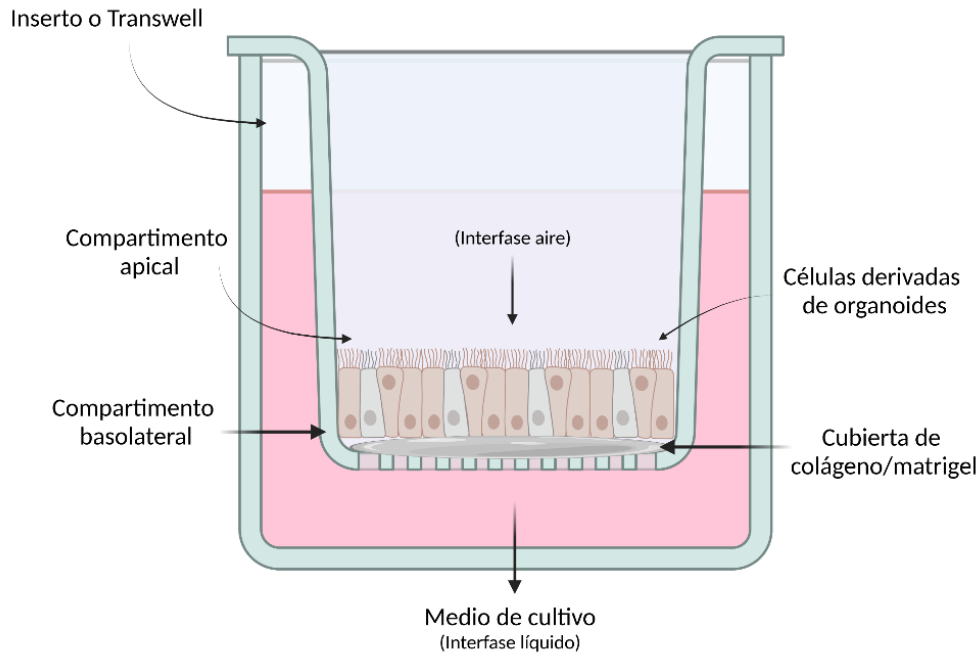
Los modelos de cultivo polarizados han sido utilizados para el estudio de la patogénesis de diversas infecciones, principalmente usando líneas celulares crecidas sobre cámaras tipo Transwell. Recientemente se han desarrollado cultivos derivados de células madre sobre estas cámaras para representar de manera más precisa los epitelios y poder recrear un microambiente más efectivo para el estudio de infecciones *in vitro* (Cevallos Porta et al., 2016; F. Liu et al., 2010; Obert et al., 2000; J. Zhou et al., 2017).

Los cultivos de monocapas derivadas de organoides, conocidos como ODM (del inglés *Organoid-derived Monolayers*), utilizan células individuales provenientes de organoides que son separadas el día del pase celular. Las ODM tienen una polaridad definida y características de integridad de barrera por la presencia de complejos de uniones apicales (Kardia et al., 2021).

Por su similitud con el epitelio intestinal, permiten el estudio de la diferenciación y la comunicación celular, así como la polaridad celular de manera similar a los cultivos en dos dimensiones (2D) (Bardenbacher et al., 2019; Holthaus, Kraft, et al., 2021; Yano et al., 2017)

La principal limitación de las ODM es el corto periodo de tiempo que sobreviven las células en el cultivo, teniendo un impacto directo en la baja tasa de diferenciación, ausencia de linajes celulares secretores o la muerte rápida de las células una vez iniciado el cultivo. Una manera de revertir lo anterior, es la implementación de los sistemas de cultivo en una interfase aire-líquido, mejor conocidos como sistemas ALI, por su nomenclatura en inglés “*Air-liquid Interface culture*” (Figura 8).

En este sistema las células son sembradas sobre un filtro poroso cubierto de uno o varios componentes de matriz extracelular (generalmente de matrigel o colágeno), a los que se les adiciona medios de cultivo enriquecidos. Al inicio, el medio de cultivo se coloca sobre la parte apical de las células recién sembradas y después de tres días, este medio es removido, dejando la parte apical de las células expuestas al aire. El compartimiento basolateral es el que permite el intercambio de nutrientes del medio de cultivo hasta las células por medio de la membrana porosa, hasta que alcanza su completa confluencia que, dependiendo del tipo de células, puede tardar entre 6 y 14 días (Bhowmick et al., 2018; Boccellato et al., 2018; DiMarco et al., 2014; Soriano et al., 2021; H. Wang et al., 2018).



**Fig. 8 Representación gráfica del sistema de cultivo en ALI**  
Elaborado en BioRender<sup>6</sup>

Tanto las ODM como los sistemas en ALI tienen requerimientos que suponen un gran reto para los grupos de investigación, como el uso de un gran número de células madre para iniciar los cultivos, el desarrollo y adquisición de los componentes de los medios de cultivo específicos que impactan directamente en las características intrínsecas del modelo, así como la adecuada proliferación, migración, adhesión y supervivencia de las células, por lo que establecerlos y aplicarlos en los laboratorios es una gran aportación (Bhowmick et al., 2018; Holthaus, Delgado-Betancourt, et al., 2021).

Las aplicaciones más representativas de este modelo son la caracterización biológica de los epitelios, pruebas farmacológicas, ensayos de toxicidad y el modelamiento de infecciones causadas por patógenos (Carlson et al., 2008; Chen & Schoen, 2019; Dijkhoff et al., 2021; Öhlinger et al., 2019; Ootani et al., 2009; Pell et al., 2021; Soriano et al., 2021).

<sup>6</sup> BioRender.com

## **Sistemas de cultivo en ALI para el estudio de infecciones**

Debido a las ventajas que ofrecen los sistemas de cultivo en ALI y los organoides, Boccellato y colaboradores (2018) desarrollaron monocapas en un sistema aire-líquido utilizando células humanas derivadas de diferentes regiones del estómago, para el modelamiento de la infección causada por la bacteria *Helicobacter pylori*. Al reproducir el microambiente fisiológico de la mucosa gástrica y con la capacidad de producir moco, tal como lo hace el epitelio estomacal, decidieron denominarlos “mucosoides”. Este modelo, además de ser permisible a la infección por las bacterias, muestra una respuesta inflamatoria, por lo que representa un modelo efectivo para el estudio de infecciones en cultivos de largo término, incluyendo las implicaciones inmunológicas de la infección (Boccellato et al., 2018).

Las infecciones virales han sido ampliamente estudiadas en los sistemas de monocapas en interfase aire-líquido, principalmente aquellas que afectan a los tractos digestivo y respiratorio, como las causadas por los virus de influenza (IAV), rinovirus (RV), virus Nipah (NiV), virus de Epstein-Barr (EBV) e incluso el SARS-CoV-2 (Cui et al., 2019; Escaffre et al., 2016; Ling et al., 2020; Meliopoulos et al., 2020; Pei et al., 2020; Vanderheiden et al., 2020).

Actualmente, existen pocos trabajos que usan células derivadas de organoides crecidas en monocapas para el estudio de infecciones parasitarias. Wilke y colaboradores (2020) desarrollaron monocapas derivadas de esferoides a partir de células madre intestinales de ratón, crecidas sobre sistemas Transwell en un cultivo ALI, para analizar el complejo ciclo de vida del parásito *Cryptosporidium parvum in vitro*. En este modelo, los autores muestran protocolos muy detallados para el cultivo de células madre epiteliales de ratón que pueden ser crecidas y diferenciadas por largo tiempo, utilizando células alimentadoras (*Feeder cells*) como una monocapa extra para el aporte de nutrientes a las células madre y que además, son permisibles a la infección (Wilke et al., 2019).

Holthaus y colaboradores (2020) desarrollaron monocapas derivadas de organoides (ODM) para investigar los mecanismos involucrados en la fisiopatología causada por *Giardia intestinalis*, utilizando células derivadas de intestino humano. Sus ODM tienen un compartimento apical y uno basolateral, que simula el epitelio intestinal, incluso en sus características electrofisiológicas y propiedades de barrera. Asimismo, expresan marcadores epiteliales específicos de múltiples linajes del epitelio, como células de Paneth, células caliciformes y células enteroendócrinas. Las monocapas infectadas con el parásito muestran cambios electrofisiológicos por ruptura de la barrera epitelial (Holthaus, Kraft, et al., 2021).

En otra publicación, Holthaus y colaboradores (2021) resumieron y optimizaron múltiples protocolos para células madre derivadas de humano, ratón, cerdo y pollo para el desarrollo de monocapas derivadas de organoides (ODM) en el estudio de infecciones causadas por parásitos, particularmente *G. intestinalis* y *Toxoplasma gondii*.

Los autores muestran las múltiples aplicaciones para ODM multiespecies, que presentan las características del epitelio del intestino delgado, capaces de replicar la infección *in vitro* de las etapas tempranas de estos dos parásitos, de manera individual e incluso en cocultivos (Holthaus, Delgado-Betancourt, et al., 2021).

## Antecedentes

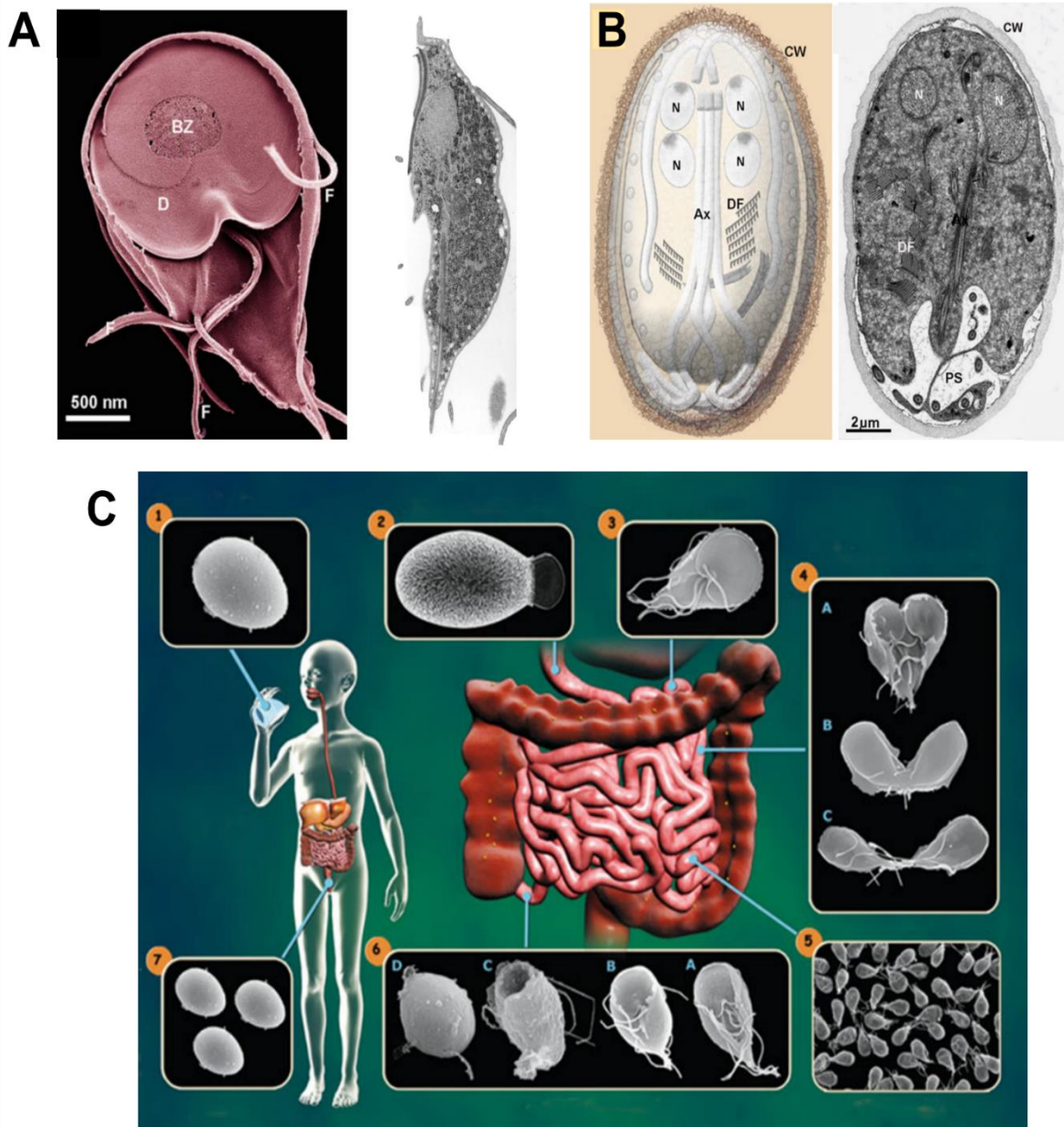
### ***Generalidades de Giardia intestinalis y giardiasis***

Las parasitosis intestinales son un grave problema de salud en los países en vías de desarrollo. Una de estas infecciones es la giardiasis, producida por el enteroparásito *Giardia intestinalis* (Sin. *G. lamblia*, *G. duodenalis*) que es un importante agente causal de diarrea a nivel mundial (Adam, 2001; CDC, 2013; Wolfe, 1992). En México, país endémico para la infección, se desconoce con certeza el número de personas que la padecen (Cedillo-Rivera et al., 2009; Dirección General de Epidemiología, 2018).

La giardiasis es una infección cosmopolita incluida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la lista de enfermedades tropicales desatendidas, por estar presente principalmente en lugares con acceso restringido a agua potable y poca regulación sanitaria (Savioli et al., 2006). La OMS estima que al menos uno de cada siete niños son portadores de *G. intestinalis* en países donde la infección es endémica (CDC, 2013; Wolfe, 1992).

La transmisión de este parásito ocurre mediante la ingesta de quistes presentes en agua o alimentos contaminados, que desenquistan en el intestino delgado, cada quiste dando lugar a cuatro trofozoítos. Éstos se adhieren a las microvellosidades del epitelio intestinal. Los trofozoítos son la fase móvil del parásito (Fig. 9A), por lo que migran al colón, en donde se induce el enquistamiento; los quistes resultantes (Fig. 9B) son eliminados medio por la materia fecal (Fig. 9C) (Adam, 2001; Benchimol et al., 2022; CDC, 2013; Esch & Petersen, 2013).





**Fig. 9 *Giardia intestinalis* a) Trofozoíto, B) Quiste, c) Ciclo de vida**

1) La infección comienza con la ingestión de quistes, 2) el pH ácido y las enzimas gástricas del estómago provocan un reorganización de la pared del quiste, iniciando el proceso de desenquistamiento, 3) el quiste se diferencia en trofozoítos, 4) en el intestino delgado, el trofozoíto se divide por fisión binaria (a-c) y (5) se une a células epiteliales intestinales, 6) el pH básico y la presencia de sales biliares en el íleon inducen la diferenciación de quistes de trofozoítos (a-d) (enquistamiento), 7) los quistes se liberan en las heces y pueden infectar nuevo huésped. Tomado de Benchimol et al., 2022.

La giardiasis es una infección autolimitante en la mayoría de los casos y cuenta con tratamientos efectivos. Sin embargo, pueden presentarse cuadros con complicaciones a largo plazo, especialmente en niños, como disminución de peso o malabsorción de grasas, lactosa, vitaminas, etc., que incluso han llegado a desarrollar deficiencias cognitivas o de crecimiento (Buret et al., 2015).

### **Ensamblajes genotípicos de *Giardia***

El género *Giardia* pertenece a la Clase Metamonada, Orden Diplomonadida, Familia Hexamitidae y Subfamilia Giardiinae; incluye seis especies (Tabla 6), todas parásitas del intestino delgado de vertebrados. El género *Giardia* y otros miembros de los diplomonadidos son considerados los organismos eucariontes más antiguos, pues presentan muchas similitudes con las bacterias y se consideran un “eslabón perdido” entre procariontes y eucariontes (Kabnick & Peattie, 1991; Jingyan Li, 1995).

**Tabla 6. Especies del género *Giardia* y ensamblajes genéticos de *G. intestinalis***  
(Modificado de Adam, 2001, Heyworth, 2016 y Benchimol et al., 2022)

<b>Especie</b>		<b>Hospedero</b>
<i>G. agilis</i>		Anfibios
<i>G. muris</i>		Roedores
<i>G. ardeae</i>		Garzas
<i>G. psittaci</i>		Aves psitácidas
<i>G. microti</i>		Ratones y ratas almizcleras
<i>G. intestinalis</i> (syn. <i>G. duodenalis</i> , <i>G. lamblia</i> )		Mamíferos, incluido <i>Homo sapiens</i>
Ensamble	A	Humano, perro, gato, ganado, alpaca, ciervo, hurón, cerdo, castor, chinchilla, jaguar, caballo, marsupiales, oveja, cabra, buey almizclero, primates no humanos, cetáceos, focas, león marino, alce, reno, pollo, gaviota
	B	Humano, ganado, perro, gacela, venado, caballo, castor, rata almizclera, chinchilla, hurón, conejo, marsupiales, cuy, primates no humanos, pollo, oveja, focas, cerdo, león marino, avestruz, delfín, marsopa, gaviota
	C	Perro, canguro, ganado, cerdo, cetáceos
	D	Perro, chinchilla, canguro, ganado, cetáceos, zorro
	E	Bovino, ovino, porcino, alpaca, cabra, caballo, yak, zorro, venado, gato
	F	Gato, cetáceos, cerdo
	G	Ratones, ratas
	H	Foca gris, gaviota

Mediante la aplicación de herramientas moleculares se han descrito ocho genotipos de *G. intestinalis*, nombrados de la A-H, de acuerdo con el hospedero que infectan o del que son aislados. Sólo los ensamblajes genéticos A y B son capaces de infectar al humano (Adam, 2001; Heyworth, 2016).

### *Patogenia de la giardiasis*

El protista *G. intestinalis* es un parásito no invasivo, por lo que el epitelio intestinal es el principal punto de contacto entre el parásito y su hospedero. Se ha descrito que la giardiasis produce acortamiento de las microvellosidades, producto de la inhibición de enzimas presentes en la superficie del villi. Lo anterior, implica que hay disrupción del epitelio por la ruptura de las uniones estrechas presentes en las células epiteliales. También, se ha visto que el parásito aumenta la apoptosis de los enterocitos, contribuyendo a la disfunción del epitelio (Beatty et al., 2017; Einarsson et al., 2016; Ortega-Pierres & Argüello-García, 2019).

Los cuadros diarreicos típicos de la infección son producto del aumento de la permeabilidad intestinal que se produce tras la presencia del parásito, así como de la hipersecreción de iones y el aumento del peristalsis intestinal. Además, la presencia del parásito causa hiperplasia de las criptas intestinales y un aumento en la producción de moco, dificultando al parásito para establecerse en el epitelio (Einarsson et al., 2016).

Aún existe controversia en torno a la idea de que los ensamblajes genéticos A y B del parásito pudieran ser especies distintas, lo que contribuye a la falta de información sobre si la patogenicidad o las capacidades inmunomoduladoras del parásito dependen del ensamblaje genético o del tipo de cepa aislada de pacientes. Gracias a la investigación del genoma del parásito, se han identificado un pequeño número de factores de virulencia de *G. intestinalis*, que se han clasificado en cinco grupos principales: moléculas tipo toxinas, enzimas del metabolismo energético, proteínas de superficie ricas en cisteína, cisteína proteasas y tenascinas, resumidos en la tabla 7 (Ortega-Pierres & Argüello-García, 2019).

Las proteínas del disco ventral, las lectinas de superficie y las proteínas variantes de superficie (VSP, del inglés *variant-specific surface protein*) son otros elementos que han sido considerados como factores de virulencia. Aunque los factores antes mencionados pueden contribuir indirectamente a la progresión de la infección en el huésped, los factores directamente involucrados en la patogenia y fisiopatología de *G. intestinalis* siguen bajo caracterización (Ma'ayeh et al., 2015, 2017; Ortega-Pierres & Argüello-García, 2019).

**Tabla 7. Principales factores de virulencia de *Giardia intestinalis* identificados tras la interacción con células intestinales.** <sup>7</sup>

Modificado y adaptado de Ortega-Pierres y Argüello-García, 2019.

Tipo de factor	Proteína	ID de proteína	Receptor (es) propuestos	Rol propuesto en la patología de la giardiasis
Moléculas tipo toxina	CRP136/VSP188	GL50803_137613	Receptor de endotelina A	Aumento en la peristalsis
	ESP58	Desconocido	Receptor de Gangliósido M1	Pérdida de agua y electrolitos
Enzimas del metabolismo energético	Enolasa	GL50803_11118	Plasminógeno	Daño en células epiteliales
	FBPA	GL50803_11043	Desconocido	Modulación de sistema inmune
	PGM	GL50803_8822	Desconocido	Desconocido
	OCT	GL50803_10311	Arginina	Reconocimiento antigénico
			Linfocitos T	Competencia por arginina
			Células dendríticas	Disminución de la proliferación de enterocitos
			Mastocitos	Disminución de la Proliferación
	Aumento de TNF- $\alpha$ ; disminución de IL-10, CD83 y CD86			
Liberación de IL-6 y TNF- $\alpha$				
Proteínas de superficie ricas en cisteína	HCMP TMK-like	GL50803_113319	Cinasa extracelular	Alteración de la señalización celular
	Grupo 2 de HCMP	GL50803_9620	Receptor EGF	Evasión de la respuesta inmune
	HCMP EGF-like	GL50803_113531	Desconocido	Disminución de la proliferación de enterocitos
	HCMP	GL50803_12063	Desconocido	Evasión de la respuesta inmune
	VSP9B10A/VSP88	GL50803_101074	Igual que las cisteína proteasas	Similar a cisteínas proteasas
Cisteína proteasas	Giardipaina-1	GL50803_14019	MUC2, Villina, Claudin-1 y -4, Ocludina, Cadherina-E, $\beta$ -Catenina, Inmunoglobulinas, Defensinas, Quimiocinas, microbiota intestinal.	Daño en células epiteliales
	CP16160	GL50803_16160		Alteración de la capa mucosa
	CP16779	GL50803_16779		Atrofia en las microvellosidades intestinales
				Atrofia en las uniones estrechas. Deterioro de la respuesta inmune innata y adaptativa
				Disbiosis de la microbiota
				Apoptosis de enterocitos.
				Liberación de citocinas proinflamatorias
Tenascinas	Tenascina C	GL50803_8687	Receptor del factor de crecimiento epidérmico	Separación de enterocitos provocando una translocación bacteriana y respuesta inflamatoria

<sup>7</sup>Tomado de tesis de licenciatura en desarrollo (Rodríguez-Pérez, 2022).

## Modelos de estudio aplicados en la giardiasis

La biología celular del parásito *G. intestinalis* ha sido ampliamente estudiada mediante el uso de microscopía óptica convencional, confocal y electrónica de barrido o de transmisión; así como por biología molecular (Monali et al., 2012; Müller et al., 2007; Silva et al., 2016). Por su parte, el estudio de la infección ha sido abordado principalmente analizando la patogénesis del parásito, la respuesta inmune del hospedero en líneas celulares o en modelos animales, principalmente roedores. Sin embargo, recientemente se han comenzado a cuestionar las implicaciones que podría tener la microbiota del hospedero durante la infección. Estas tres perspectivas de estudio han sido abordadas mediante la implementación de estudios *in vitro* e *in vivo*.

### *Modelos 2D (Líneas celulares)*

Los estudios de las interacciones huésped-parásito son importantes para comprender los mecanismos que las células epiteliales inducen tras la interacción con el parásito y para conocer los mecanismos de patogenicidad de la cepa de parásito infectante utilizada (Ma'ayeh et al., 2018).

El estudio de la interacción entre *Giardia* spp. y células intestinales ha sido ampliamente explorado, principalmente usando parásitos axénicos en contacto con líneas celulares como *Int-407* (del inglés normal *rat small intestine epithelial cells*, que sintetizan fibronectina y colágena), *Caco-2* (del inglés *heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma*), *IEC-6* (del inglés, *Rat small intestine epithelial*) o *MDCK* (Allain et al., 2017; Evans-Osses et al., 2017; Fink & Singer, 2017; Mohammadi et al., 2015) .

La interacción entre trofozoítos de *G. intestinalis* con líneas celulares inicialmente fue difícil de establecer en los laboratorios, debido a la baja tasa de viabilidad tanto del parásito como de las células epiteliales cuando se cultivaban juntos (Nash, 2019).

Utilizando cultivos axénicos del parásito en medio TYI-S33, con o sin adición de bilis bovina, fue posible desarrollar modelos de cocultivos entre trofozoítos de *Giardia* spp. con células Caco-2, principalmente en cámaras Transwell que imitan la polarización del epitelio intestinal hasta por 21 días (Kraft et al., 2017).

Actualmente, la implementación de líneas celulares para el estudio de la giardiasis *in vitro* se ha utilizado para el análisis de las propiedades electrofisiológicas de las monocapas, principalmente el análisis de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Asimismo, se han estudiado los cambios en la permeabilidad celular tras la evaluación del cambio en la abundancia y la localización de las proteínas que componen las uniones estrechas. En sistemas de cocultivos, también ha sido posible evaluar la respuesta de citocinas y quimiocinas para caracterizar el efecto de la infección (Bartelt & Sartor, 2015).

Una constante en la implementación de los modelos *in vitro* para el análisis de infección por trofozoítos de *Giardia* spp., son las variaciones en el diseño experimental de los modelos de cultivo. Lo anterior se debe principalmente a la falta de estandarización de los métodos experimentales de cada laboratorio, las cepas o aislados de *Giardia* spp. utilizadas, los medios de cultivo empleados e incluso hasta los equipos implementados. Continuamente se ha sugerido que se requiere una mejor estandarización de los protocolos experimentales, con la finalidad de ofrecer modelos de cultivo *in vitro* que puedan ser fácilmente replicados en diferentes laboratorios y brindar resultados más robustos que enriquezcan el conocimiento generado tras el uso de las líneas celulares para el estudio de la giardiasis (Kraft et al., 2017).

### *Modelos in vivo*

Mediante diferentes modelos animales de rata, ratón, perro, conejo y jerbo (Astiazarán-García et al., 2000; Meyer et al., 1984; O'Handley & Olson, 2006; Roberts-Thomson et al., 1976; Silva et al., 2016) se ha contribuido en el estudio de la giardiasis. El modelo en jerbo ha sido el más exitoso porque es el que semeja más fielmente la enfermedad en el ser humano; Astiazarán y cols. (2000) demostraron que la giardiasis experimental aguda altera las vellosidades intestinales independientemente del origen de las cepas (sintomático o asintomático) afectando el estado nutricional y el desarrollo de los jerbos (Astiazarán-García et al., 2000).

Se ha descrito la capacidad que tienen diferentes cepas de *Giardia* de perturbar la diversidad microbiana, impactando directamente en la homeostasis de la microbiota intestinal y dando como resultado disbiosis microbiana. En el lumen intestinal suelen coexistir múltiples organismos que forman parte de la flora intestinal; durante la infección por *Giardia* spp. en un modelo de ratón se ha observado que existe relación entre la susceptibilidad a la infección por este parásito y la composición de la microbiota nativa de los hospederos (Buret et al., 2015; Fink & Singer, 2017).

La variabilidad en los resultados también se ha visto reflejada en los modelos *in vivo*. Por ejemplo, algunos otros autores, utilizando el mismo modelo animal, sugieren una potencial capacidad invasiva del parásito, mientras que otros autores descartan esta posibilidad (Martínez-Gordillo et al., 2014; Reynoso-Robles et al., 2015; Shukla & Sidhu, 2011).

El uso de modelos animales *in vitro* e *in vivo* ha permitido estudiar la giardiasis desde varias perspectivas, sin embargo, debido a las limitaciones de ambos modelos, aún quedan muchas preguntas por responder sobre la infección; por ejemplo, aún se desconoce por qué a veces se presenta cuadros sintomáticos y otras asintomáticos, o bien, cuáles son los factores que determinan una infección a largo plazo (Robertson et al., 2010).



Algunas de los hallazgos más importantes que se han tenido tras el uso de modelos *in vitro* e *in vivo* se enlistan a continuación:

- Las infecciones por *Giardia* spp. inducen apoptosis tanto en modelos experimentales *in vivo* como *in vitro* (Chin et al., 2002)
- *Giardia* spp. detiene el ciclo celular cuando está en contacto con líneas celulares (Stadelmann et al., 2012)
- Los trofozoítos de *Giardia* spp. interfieren con los mecanismos de transporte activo de la mucosa del intestino delgado (Anand et al., 1980)
- *Giardia* spp. y las células huésped secretan los mismos tipos de proteínas metabólicas cuando están en cocultivos, lo que indica la competencia por adquirir los nutrientes (Ma'ayeh et al., 2017)
- Cuando *Giardia* spp. interactúa con líneas celulares deslocaliza las uniones estrechas, principalmente claudina-1 y ocludina (Humen et al., 2011)
- La microbiota intestinal juega un papel importante durante las *infecciones in vitro* e *in vivo* (Allain et al., 2017)
- Se requieren más estudios *in vitro* e *in vivo* para confirmar los mecanismos de patogenicidad cuando ocurren infecciones mixtas y para estudiar la importancia del poli parasitismo intraespecífico en la giardiasis (Koh et al., 2013)
- Las microvesículas liberadas por *G. intestinalis* alteran la respuesta huésped-patógeno *in vitro* (Evans-Osses et al., 2017)
- Las alteraciones de la microbiota inducidas por *Giardia* spp. promueven la invasión bacteriana, resultando en apoptosis epitelial, la alteración de las uniones estrechas y la translocación bacteriana a través de la barrera epitelial intestinal (Beatty et al., 2017)
- Los trofozoítos de *Giardia* spp. deterioran la integridad de la barrera mucosa al agotar el moco producido por las células caliciformes y mediante la degradación de las mucinas del huésped, en un forma dependiente de cisteína proteasas (Allain et al., 2017; Cotton et al., 2014).
- Los mecanismos responsables de la alteración y de la ruptura de la barrera intestinal causadas por *Giardia* spp., ya sea a nivel de la microbiota, la mucosidad o del epitelio, son indispensables para el desarrollo de nuevas estrategias para la intervención clínica de la giardiasis (Allain et al., 2017).

## Justificación

La diarrea es una disfunción intestinal que puede ser provocada por agentes virales (p.e. rotavirus), bacterianos (p.e. *Escherichia coli*) e incluso parásitos, como *Giardia intestinalis*. Este padecimiento sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en infantes en algunos países en vía de desarrollo. Particularmente, en los casos de giardiasis que se mantienen por largos periodos de tiempo, puede haber daños irreversibles que pueden afectar el desarrollo y capacidades cognitivas en los niños que la padecen. La giardiasis ha sido estudiada principalmente utilizando modelos 2D (líneas celulares) y modelos animales, sugiriendo que el parásito induce acortamiento de las vellosidades intestinales o daño en las uniones estrechas, hechos que podrían explicar el síndrome de malabsorción intestinal. Sin embargo, ningunos de los modelos mencionados recrea fidedignamente el microambiente de la giardiasis.

Los cultivos tridimensionales, como los organoides o las monocapas derivadas de organoides, son sistemas de cultivo que pueden reflejar de mejor manera el microambiente intestinal *in vitro*. Después de muchos años de usar líneas celulares y modelos animales, se necesita un mejor sistema para el estudio de la giardiasis *in vitro*. Modelos que incorporan células madre intestinales, tanto de humano como de ratón, crecidas en el sistema de cultivo de interfase aire-líquido, pueden representar una mejor opción para el estudio de la giardiasis *in vitro*.

## Hipótesis

Los organoides duodenales desarrollados a partir de células madre adultas contienen los distintos tipos celulares del epitelio de origen y se puede inducir su diferenciación en monocapas derivadas de organoides intestinales, tanto de humano como de ratón, representando una plataforma fidedigna para recrear las condiciones intestinales de la giardiasis experimental *in vitro*.

# Objetivos

## *General*

Desarrollar y establecer cultivos tridimensionales para el estudio de las etapas tempranas de la giardiasis experimental *in vitro*.

## *Específicos*

1. Establecer las condiciones óptimas de cultivo para el desarrollo de cultivos tridimensionales
2. Desarrollar organoides duodenales de humano y de ratón
3. Establecer monocapas derivadas de organoides humanos y de ratón en la interfase aire-líquido
4. Infectar las monocapas derivadas de organoides con trofozoítos de *G. intestinalis*
5. Caracterizar la infección por *G. intestinalis* en monocapas derivadas de organoides en la interfase aire-líquido

## Materiales y Métodos

### Líneas celulares para producción de medios condicionados (Wnt3a y Rspo-1)

Los medios condicionados fueron utilizados como base para la elaboración de los medios de cultivo de organoides. En la literatura, se han reportado diferentes líneas celulares productoras de los factores de crecimiento Wnt3a y Rspo-1 para la preparación de medios condicionados. Para este trabajo utilizamos las líneas HEK-293<sup>8</sup> (HEK-293-Wnt3a y HEK-293-Rspo-1) para la producción de dichos factores y la línea HEK-293-t para probar los sobrenadantes. En la tabla 8, se resumen las características de cada una de las líneas utilizadas.

**Tabla 8. Características de las líneas celulares utilizadas para la producción de medios condicionados<sup>9</sup>**

<b>Características/Línea</b>	<b>HEK-293-Wnt</b>	<b>HEK-293-Rspo-1</b>
Gen	Wnt3a	Rspo1
Antibiótico de resistencia	Geneticina o zeocina	Zeocina
Origen	Ratón	Ratón

### Descongelación y cultivo de líneas celulares

Para descongelar las líneas celulares HEK-293 (HEK-293-t, HEK-293-Wnt y HEK-293-Rspo-1), cada criovial se mantuvo por 1 minuto en baño María. Después de descongeladas, las células se resuspendieron en 5 ml de medio de descongelación (Medio DMEM suplementado con 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 20% de suero fetal bovino) y se centrifugaron durante cinco minutos a 1500 rpm a 4°C.

<sup>8</sup> Amablemente donados por la Dra. Gabriela Vallejo-Flores y el Dr. Thomas Meyer del *Max Planck Institute for Infection Biology*

<sup>9</sup> Las condiciones enlistadas en la tabla 8, corresponden a las líneas amablemente donadas para este proyecto

Los sobrenadantes se descartaron y la pastilla celular se resuspendió en medio completo (Medio DMEM suplementado con 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino) y se sembró en cajas de cultivo de 25 cm<sup>3</sup>, que se mantuvieron en una incubadora a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de 48h, una vez que alcanzaron 80% de confluencia, las células se lavaron en dos ocasiones con PBS estéril; una vez descartado el PBS, se añadió 1 ml de tripsina (1X) y se mantuvieron a 37°C durante 5 minutos hasta que todas las células estuvieran despegadas. Las células tripsinizadas se colocaron en un tubo de vidrio con 5 ml de medio +++ (ver material suplementario 1) y se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm. La pastilla celular fue distribuida en nuevas cajas de cultivo, dependiendo del número de células (1x10<sup>6</sup> para cajas de 25cm<sup>3</sup> o 3x10<sup>6</sup> para cajas de 75cm<sup>3</sup>) en medio completo. El medio de cultivo fue reemplazado cada tres días.

Las células HEK-293t se mantuvieron en cultivo únicamente hasta realizar el test de actividad, mientras que las células HEK-293-Wnt y HEK-293-Rspo-1 se expandieron como se describe a continuación.

### **Producción de sobrenadantes de los factores de crecimiento: WNT3a y R-spo-1**

Una vez que las líneas celulares (Wnt3a o Rspo-1) se mantuvieron en cultivo por dos o tres pases, se expandieron a 10 cajas de cultivo de 75cm<sup>3</sup> y se cultivaron en medio de cultivo de selección (125 µg/ml de zeocina añadida a medio DMEM suplementado con 2mM de glutamina, 1mM de piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino) durante tres días.

Pasados los tres días, el medio viejo fue descartado y se añadió medio fresco sin zeocina. El cambio de color rojo a amarillo/naranja, indica un cambio de pH, resultado de que los factores de crecimiento (Wnt3a o R-spond-1) están siendo secretados al medio.

Se recuperó el sobrenadante de cada caja (~30/40 ml) en tubos Falcon de 50ml; los tubos se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante fue recuperado, filtrado a través de membranas de 0.22µm, y congelado a -20°C hasta su uso. Cada vez que se recuperó el sobrenadante, se reemplazó con medio nuevo fresco y se repitió el procedimiento anterior por 21 días, hasta que las células comienzan a despegarse o hasta que la tonalidad del sobrenadante tornó completamente a una tonalidad amarilla.

Cada colecta de sobrenadante fue mezclada en vasos de precipitados estériles de 1 l y filtrado en esterilidad por última vez, antes de dividirse en alícuotas de 10 ml en tubos estériles, que fueron mantenidas a -20°C hasta su uso. Sólo una alícuota de cada factor fue mantenida a 4 °C para realizar la prueba de actividad.

### **Test de actividad de sobrenadantes de WNT3a y R-spond**

En placas de 24 pozos se sembraron 1x10<sup>5</sup> células HEK-293t por pozo en medio completo y se mantuvieron a 37°C en una incubadora con 5% CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, el medio fue descartado y se agregó medio fresco suplementado con combinaciones crecientes de Wnt o Rspo-1, como se muestra en la tabla 9. La placa de cultivo se mantuvo a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante toda la noche.

**Tabla 9. Combinación de medios utilizados para la prueba de actividad de los sobrenadantes de Wnt y Rspo-1**

<b>Factor</b>	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>	<b>40%</b>	<b>50%</b>
<b>Wnt</b>	225µl CM <sup>10</sup>	200µl CM	175µl CM	150µl CM	125 µl CM
	+ 25 µl Wnt	+ 50 µl Wnt	+ 75 µl Wnt	+ 100 µl Wnt	+ 125 µl Wnt
<b>R-spond</b>	225µl CM	200µl CM	175µl CM	150µl CM	125 µl CM
	+ 25 µl R-spond	+ 50 µl R-spond	+ 75 µl R-spond	+ 100 µl R-spond	+ 125 µl R-spond

<sup>10</sup> CM: Medio de cultivo completo (Medio DMEM suplementado con 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato de sodio y 10% de suero fetal bovino)

Al día siguiente, el medio se descartó y las células se lavaron con PBS estéril en dos ocasiones. Después, las células se fijaron con PFA al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de la fijación, las células se lavaron con PBS y se incubaron con PBS+ Hoechst (1:1000) durante 15 minutos. La placa se lavó nuevamente con PBS y se mantuvo a 4°C, cubierta de la luz, hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia. La intensidad de fluorescencia se analizó utilizando el software Fiji<sup>11</sup>.

## **Extracción de células madre intestinales**

### *Biopsias de tejido duodenal humano*

Se obtuvieron biopsias de duodeno de cuatro pacientes que acudieron a endoscopías de rutina. Los pacientes firmaron un consentimiento informado para la utilización de sus biopsias para este proyecto, con número de autorización 2008-785-001<sup>12</sup>, avalado por el Comité Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Las biopsias se transportaron del hospital General Regional 1 “Dr. Mac Gregor Sánchez Navarro” del IMSS a nuestro laboratorio, en una solución de transporte (Medio DMEM suplementado con un coctel de antibióticos: 1.25 µl/ml anfotericina B, 50ug/ml gentamicina y 1% penicilina/estreptomicina) y en hielo hasta su disección.

---

<sup>11</sup> Software Fiji (Schindelin et al., 2012)

<sup>12</sup> Correspondiente al proyecto titulado: Infección, inflamación y cáncer: estudio para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y la identificación de biomarcadores de riesgo, pronóstico y prevención, a cargo del Dr. Javier Torres López.

### *Tejido de ratón*

Ratones hembra de la cepa CD1(ICR) se obtuvieron de la UPEAL (Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio) del Cinvestav, de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y de los Animales de Laboratorio (CICUAL) bajo el número 0318-21<sup>13</sup>. Los ratones se transportaron al laboratorio, donde se les aplicó la dislocación cervical como método eutanásico. El duodeno (3cm de tejido) fue extraído y mantenido en PBS con antibióticos hasta su disección.

El cuarto de cultivo se limpió cuidadosamente y se aplicó luz UV por al menos 15 minutos antes de comenzar los procedimientos, para establecer condiciones de máxima esterilidad. Antes de comenzar, una alícuota de matrigel se colocó sobre hielo para asegurar su descongelación durante el procesamiento del tejido (proveniente de biopsias o de tejido de ratón); el medio de cultivo enriquecido se preparó y se mantuvo a 37°C para estar listo al terminar el procedimiento.

En el gabinete de bioseguridad, al tejido se le hicieron lavados con PBS suplementado con antibióticos, al menos 1h con cambios constantes cada 10 minutos. Una vez terminados los lavados, el tejido duodenal (cada biopsia menor a 0.5 cm o el duodeno de ratón de aprox. 3 cm) se cortó en partes muy pequeñas, y se colocó en 5ml de solución quelante (ver modo de preparación en material suplementario 1) en un tubo de 10 ml, en rotación dentro de la incubadora a 37°C durante 45 minutos. Después, 5ml medio +++ precalentado a 37°C, fue adicionado a cada tubo y los tubos se centrifugaron durante 5 minutos 1500 rpm/4°C. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente y nuevo medio +++ fue añadido al tubo para resuspender la pastilla.

En la parte superior de un tubo falcon de 50 ml, se colocó un colador celular (*cell-strainer*) de 70µm; con una pipeta de 5 ml, el contenido celular fue pasado cuidadosamente por el strainer y el tejido fue macerado con delicadeza utilizando

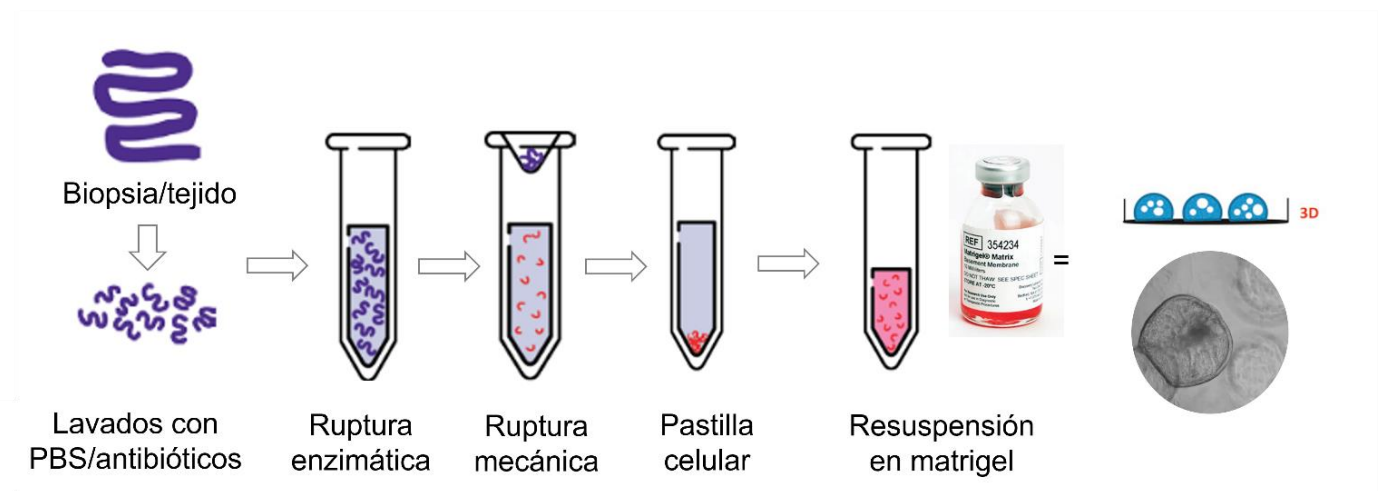
---

13 Correspondiente al Proyecto titulado: Establecimiento y caracterización de cultivos duodenales tridimensionales murinos, de la Dra. Martha Espinosa Cantellano.



el émbolo de una jeringa de 3ml; con nuevo medio +++, se lavó el contenido del tubo con la finalidad de obtener la mayor cantidad de tejido y pasarlo a través del colador celular. El tubo falcon de 50 ml, que contenía el enriquecido celular, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 4°C.

La pastilla se resuspendió en 100-150µl de matrigel líquido; se distribuyeron gotas de 40µl en los pozos de una placa de 24 pozos. La gotas de matrigel se dejaron polimerizar en la incubadora a 37° C, de 10 a 15 minutos. Las gotas de matrigel se cubrieron con 500 µl de medio de organoides (humano o ratón), y la placa se mantuvo a 37°C en la incubadora con 5% de CO<sub>2</sub>, durante 5-6 días hasta el día del pase celular; el medio de cultivo enriquecido se reemplazó por medio fresco cada tercer día (Figura 10).



**Fig. 10 Procedimiento para la extracción de criptas a partir de tejido**  
(Modificado de Schlaermann et al., 2016)

## Desarrollo de organoides

### ***Pase celular de organoides (Splitting)***

Después de cinco o seis días (en ratón) y siete días (humano), dependiendo del tamaño y estado de maduración de los organoides, se realizó el pase celular. En condiciones de esterilidad y dentro del gabinete de bioseguridad, se eliminó el

medio de cultivo viejo y se añadieron 500µl de medio ++ frío, por pozo y con la punta de la micropipeta se despegó en su totalidad la gota de matrigel que contenía los organoides y se resuspendió por pipeteo en el medio frío. Todas las gotas de matrigel que contenían los organoides, se pasaron a un tubo falcon de 15ml y el tubo se centrifugó a 1500 rpm, a 4°C durante 5 minutos.

El medio ++ fue desechado y la pastilla se resuspendió en 300 µl de TryPLE Express Enzyme (ThermoFisher,12604013) (previamente calentado a 37°C) por cada gota despegada y se incubó durante 10 minutos a 37°C para que ocurriera la disociación enzimática. Dicha reacción se detuvo añadiendo 5 ml de medio +++. Las estructuras tridimensionales se disociaron por pipeteo, utilizando una pipeta Pasteur estéril, cuya punta debió cerrarse previamente por calor hasta obtener un orificio muy fino<sup>14</sup>. Una vez disociados en células individuales, se tomó una alícuota de 10 µl para realizar el conteo en cámara de Neubauer.

Después, el tubo que contenía las células se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y la pastilla celular se resuspendió en matrigel líquido (se colocaron  $5 \times 10^4$  células por cada 40 µl de matrigel en cada pozo de una placa de 24 pozos). Las gotas de matrigel se cubrieron con 500 µl de medio de organoides fresco (de humano o ratón, según sea el caso), mismo que se reemplazó cada tres días, hasta el día del pase celular. En el caso de los organoides murinos, el cultivo de largo término se estableció durante 10 pases consecutivos.

---

<sup>14</sup> Las pipetas deben estar estériles. El procedimiento para cerrar la punta debe hacerse dentro del gabinete de bioseguridad utilizando un mechero.

## **Establecimiento de monocapas derivadas de organoides en ALI para células duodenales humanas y de ratón**

### *Preparación de filtros de politetrafluoroetileno*

En condiciones de esterilidad, se colocaron los filtros con ayuda de pinzas de punta fina y se distribuyeron en placas de 24 pozos. Para el recubrimiento, se realizaron los cálculos de acuerdo con número de filtros requeridos. Se preparó ácido acético al 0.2 M (como se describe en el material suplementario 1). En cada filtro, se colocaron 100  $\mu$ l de solución de recubrimiento (1.5  $\mu$ l de matrigel + 1.5  $\mu$ l de colágeno tipo IV + 98.5  $\mu$ l de 0.02M de ácido acético) y se dejó incubar a 37°C durante 1h. Después, con PBS estéril precalentado a 37°C, los filtros se lavaron tres veces, tanto en la parte apical como en la parte basolateral, removiendo cuidadosamente cada filtro, utilizando unas pinzas estériles. Hasta su uso, los filtros se mantuvieron con 100  $\mu$ l de PBS estéril a 4°C<sup>15</sup>.

### *Siembra de células primarias en los filtros recubiertos*

Las células epiteliales individuales se obtienen en el día de pase celular (*Splitting*), explicado anteriormente. Las células individuales se resuspendieron en medio de cultivo ALI (ver componentes en material suplementario). Se consideraron  $3 \times 10^5$  células por inserto recubierto, que se colocan en la parte apical de cada filtro en 250  $\mu$ l de medio de cultivo enriquecido para ALI. Asimismo, se añadieron 500  $\mu$ l de medio de cultivo ALI alrededor de cada filtro y la placa se mantuvo a 37°C durante los días necesarios hasta llegar a la confluencia.

### *Inicio y mantenimiento del cultivo ALI*

Después de tres días de cultivo, el medio dispuesto en la parte apical fue removido y el medio de la parte basolateral fue reemplazado por medio ALI fresco.

Cada tres días, se revisaron los filtros y para ver si hay producción de moco, mismo que se tuvo que remover para evitar contaminación.

---

<sup>15</sup> Los filtros recubiertos se pueden mantener hasta 1 semana a 4°C.

El cultivo fue monitoreado todos los días en un microscopio invertido para descartar contaminación. En el caso de las células de ratón, los filtros estuvieron confluentes a los 10 días, y las células de humano a los 13 días. Una vez confluentes, los filtros estuvieron listos para ser infectados o procesados para su caracterización.

## **Caracterización de organoides: Identificación de marcadores epiteliales**

### ***Extracción de ARN***

El tejido duodenal se incluyó directamente en 500µl de Trizol. En el caso de los organoides, las gotas de matrigel al día del pase celular, se incluyeron directamente en Trizol. Primero, el medio de cultivo se descartó y la gota de matrigel se resuspendió en 500µl de Trizol y se recuperó en un tubo Eppendorf por cada gota de matrigel. Cada tubo se agitó vigorosamente con ayuda de un vórtex por algunos segundos y se mantuvo a -80°C hasta el proceso de extracción de RNA.

Por cada tubo Eppendorf con 500 µl de Trizol, se añadieron 170 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente, para después dejarse en incubación por tres minutos a temperatura ambiente. Después, los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C; la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo al que se añadieron 250 µl de isopropanol y se mezcló por inversión seis veces, para posteriormente incubarse durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para continuar con el proceso de extracción, se empleó el kit de *RNeasy Mini kit* (50) (Qiagen, 74104). El líquido se transfirió a una columna superpuesta en un tubo de colecta y se centrifugó durante un minuto a 13000 rpm a 4°C.

El contenido del tubo colector fue descartado y se añadieron 700 µl de amortiguador RW1 en la parte superior de la columna y se centrifugó nuevamente. Después, se repitió el paso anterior, pero añadiendo 600 µl de amortiguador RPE y se centrifugó en las mismas condiciones.

Finalmente, el último paso de lavado se realizó añadiendo 250 µl de buffer RPE y se centrifugó por dos minutos a 13000 rpm a 4°C.

El contenido del tubo colector se descartó y se centrifugó la columna destapada, a la máxima velocidad de la centrífuga a 4°C durante un minuto. Para la elución del RNA, se añadieron 50 µl de agua libre de DNA/RNAsas. El ARN resultante se cuantificó utilizando el equipo Qubit o Nanodrop, según la disponibilidad de los equipos y las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

### ***Síntesis de ADNc***

Se sintetizó ADNc usando SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, 11752050). Cada muestra se preparó conforme a las recomendaciones del fabricante y considerando 2µl de RNA para obtener 50 µl de ADNc por cada muestra.

Las reacciones se ajustaron a 20µl, de los cuales 10 µl corresponden al 2X RT Reaction Mix, 2 µl al RT Enzyme Mix, 6 µl de agua DEPC- libre de RNAsas y los 2 µl del RNA de la muestra correspondiente.

Una vez preparadas las reacciones se mezclaron y colocaron en el termociclador, donde se incubaron a 25°C por 10 minutos, después a 50°C por 30 minutos y posteriormente a 85°C por 5 minutos, para después retirar e incubar en hielo y agregar 1 µl de RNAsas H e incubar a 37°C durante 20 minutos. Las muestras se mantuvieron en hielo si se realiza inmediatamente los siguientes experimentos, de lo contrario, las muestras de cDNA se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para los ensayos de PCR, tanto punto final como para PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), se diseñaron primers específicos para marcadores epiteliales, utilizando el software Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) con la configuración predeterminada para el experimento de qPCR. Los marcadores epiteliales utilizados fueron: SOX-9 (células madre, número de acceso de *Genbank* 20682), PCNA (células proliferativas, número de

acceso de *Genbank* 18538), Villin-1 (microvellosidades, número de acceso de *Genbank* 22349, EPCAM (enterocitos maduros, número de acceso de *Genbank* 17075), y GAPDH como gen endógeno (número de acceso de *Genbank* 14433) (Tabla 10).

**Tabla 10. Primers utilizados para la identificación de marcadores epiteliales murinos**

Población celular	Nombre del gen	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)
Células madre	<i>SOX9</i>	Fw-TCCCCGCAACAGATCTCCTA Rv-AGGTGGAGTAGAGCCCTGAG	157
Proliferativas	<i>PCNA</i>	Fw-TGCACGTATATGCCGAGACC Rv-CCAAGCTCTCCACTTGCAGA	96
Enterocitos maduros	<i>EPCAM</i>	Fw-CCTGAGAGTGAACGGAGAGC Rv-GACACCACCACAATGACAGC	132
Microvellosidades	<i>Villin 1</i>	Fw-TCCTGGCTATCCACAAGACC Rv-CTCTCGTTGCCTTGAACCTC	169
Endógeno	<i>GAPDH</i>	Fw-GGCAAATTCAACGGCACAGT Rv-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA	164

### **PCR en punto final**

Para los ensayos de PCR punto final se utilizó el kit TaKaRa Taq™ Hot Start Version (Code No. R007A). Cada muestra se preparó conforme a las recomendaciones del fabricante y considerando 1µl de ADNc para obtener 12.5 µl de volumen por reacción. Los ensayos se realizaron por triplicado y se agregó un control no relacionado (NTC)<sup>16</sup> por cada set de triplicados.

Cada reacción 1X contiene: 1.25 µl de Buffer TaKaRa 10X, 2 µl de dNTP´s (10 µM), 1 µl de primer Forward, 1 µl de primer Reverse, 0.05 µl de enzima TaKaRa, 6.2 µl de agua libre de RNAsas y 1 µl de ADNc por cada reacción.

Las condiciones de PCR fueron las recomendadas por el fabricante, que corresponden a 30 ciclos de 98°C/10 segundos, 55°C/30 segundos y 72°C/1 minuto.

<sup>16</sup> NTC: *No Template Control*

Una vez terminados los ciclos, las muestras se colocaron en hielo para su posterior corrida electroforéticas. Se prepararon geles de acrilamida al 2% a los que se les agregó bromuro de etidio, en los que se corrieron las muestras a 90 V por 40-45 minutos. Posteriormente se observaron en el fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (BIO-RAD).

Las muestras se corrieron por triplicado para cada experimento y se adicionó un control negativo no relacionado (NTC) para cada uno de los ensayos.

### **qRT-PCR**

La qRT-PCR se realizó utilizando *Maxima SYBR Green / ROX (Thermo Scientific™, K0221)* en el *StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems (Thermo Fisher)* siguiendo las especificaciones del fabricante.

Cada reacción (1X) contiene 12.5 µl de Maxyma SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), 10 µl de agua libre de RNAsas, 0.75 µl de primer Forward, 0.75 µl de primer Reverse y 1 µl de ADNc [100 ng/ µl].

Los experimentos se realizaron por triplicado para los tres diferentes estadios organoides y se compararon con el tejido duodenal. Finalmente, la expresión relativa se calculó utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde los niveles de expresión en muestras de organoides se normalizaron utilizando el valor de tejido como 1.

## ***Inmunofluorescencia de marcadores epiteliales para microscopía confocal***

### *Procesamiento de tejido*

Las muestras de tejido duodenal (humano o de ratón) se fijaron en paraformaldehído al 4% y se mantuvieron a 4°C hasta el proceso de parafinización. Las muestras se colocaron en casetes de histología, mismos que se procesaron de la siguiente forma:

Sustancia	Tiempo
70% EtOH	1h
80% EtOH	1h
90% EtOH	1h
100% EtOH	1h
Isopropanol	1h
Xilol I	1h
Xilol II	1h
Parafina I	1h
Parafina II	1h - ∞

Después de la parafinización, los bloques de parafina se mantuvieron a 4°C o en una superficie fría hasta su polimerización y se almacenaron a temperatura ambiente. De los bloques de parafina, se realizaron secciones de 5 mm de espesor y se montaron sobre portaobjetos revestidos con silane<sup>17</sup>-acetona. Los portaobjetos se silanizan en una solución de silane al 4% en acetona sumergidos durante 5 minutos; se lavan con agua bidestilada en dos tiempos de 5 minutos y se dejan secar hasta su uso.

Las laminillas de las muestras de tejido se desparafinaron en xilol y después se deshidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100% a 50%) y se lavaron dos veces con agua bidestilada.

Después de las etapas de lavado, los portaobjetos se transfirieron a cámaras con solución de recuperación de antígeno precalentado (“*antigen retrieval*”, base Tris 10 mM, solución EDTA 1 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 9.0) durante 30 min, como se describe a continuación.

---

<sup>17</sup> Tris(2-methoxyethoxy) (vinyl)silane (Sigma,175587)



Sustancia	Tiempo (minutos)
Xilol 1	10
Xilol 2	10
100% EtOH	5
90% EtOH	5
70% EtOH	5
50% EtOH	5
Agua Milliq	5 (dos veces)
antigen retrieval	30

Después de los pasos de lavado, los portaobjetos se bloquearon con suero de burro al 5% + SFB al 1% en PBS durante 1 h. Los anticuerpos primarios se aplicaron a la sección de tejido diluidos en solución de bloqueo y se incubaron durante la noche a 4 ° C (los anticuerpos utilizados y las diluciones se explican en el material suplementario 1).

Los portaobjetos se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios mezclados con Hoechst, durante 1h a temperatura ambiente (Thermo Scientific, 62249) y se montaron en mowiol<sup>18</sup> (Sigma-Aldrich, 81381). Las muestras teñidas se observaron en un microscopio confocal LSM700 (Carl Zeiss, Alemania).

#### *Procesamiento de organoides*

De las muestras de organoides en día de *splitting*, se fijó una gota de matrigel en 500µl de PFA al 4% en un tubo Eppendorf durante 1h y se centrifugaron a 1500 rpm a temperatura ambiente durante dos minutos. El sobrenadante se eliminó, las muestras fijadas se mantuvieron en PBS a 4°C hasta su procesamiento.

Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 2 minutos para concentrar los organoides fijados en el fondo del tubo, el PBS se retiró cuidadosamente y se añadieron 500 µl de solución de bloqueo (suero de burro al 5% + SFB al 1% en PBS) durante 1h. Los tubos se centrifugaron en las mismas condiciones y la muestra se dividió en tubos de 600 µl (alrededor de 20 µl por tubo).

---

<sup>18</sup> Las alícuotas de mowiol deben mantenerse a -20°C hasta su uso y descongelarse en baño María antes de comenzar el proceso de lavados del anticuerpo primario para asegurar que esté listo para usarse al momento de montar la muestra.

A cada tubo se añadió el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (dilución 1:100) y se mantuvo a 4°C toda la noche. Al día siguiente, los tubos se centrifugaron y se realizaron lavados con PBS, y después, se añadió el anticuerpo secundario (100 µl/ en dilución 1:200 en PBS + Hoechst 1:400) y se incubó durante 45 minutos.

Después, se realizaron dos rondas de centrifugación y lavados con PBS, y las muestras se montaron en portaobjetos con mowiol. Las muestras teñidas se mantuvieron a -20°C y cubiertas de la luz hasta su observación en un microscopio confocal LSM700 (Carl Zeiss, Alemania).

### **Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión**

Fragmentos del tejido de origen o muestras de organoides (en el día de splitting) se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0.1M y se post-fijaron con tetróxido de osmio al 1% en la misma solución amortiguadora. Posteriormente, se realizó el proceso de deshidratación con concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 90 y 100%), seguido de un tratamiento con óxido de propileno.

Las muestras se sometieron a un proceso de preinclusión, que se realizó utilizando óxido de propileno en combinación con resina (2: 1, 1: 1 y 1: 2) y después, las muestras se incluyeron en resina pura; la polimerización se llevó a cabo a 60 °C durante toda la noche.

Finalmente, se hicieron cortes ultrafinos (50–100 nm) utilizando un ultra microtomo; los cortes se recuperaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo al 5% durante 20 min y citrato de plomo durante 2 min, para ser observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-1011.

## **Cultivo de *Giardia intestinalis***

Trofozoítos de *G. intestinalis* de la cepa IMSS:1 se cultivaron en medio TYI-S33 (Keister, 1983) (Material suplementario 1) complementado con 10% de suero bovino adulto, 10% de vitaminas de Diamond (Sigma, 58980C) y 1% de penicilina-estreptomicina (Thermofisher, 1514022). Para el pase celular, una vez que alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento, los trofozoítos se despegaron colocando el tubo de cultivo en hielo durante 15 minutos, y se centrifugaron a 1500 rpm durante cinco minutos y se sembraron en 13 ml de medio de cultivo en tubos estériles de borosilicato.

## **Infección de monocapas derivadas de organoides en ALI con de *G. intestinalis***

Los organoides murinos se disociaron en el día de pase celular (Splitting) y  $3 \times 10^5$  células individuales se sembraron en los filtros recubiertos de colágeno/matrigel, resuspendidos en 500µl de medio ALI en la parte apical de los filtros. Los cultivos se mantuvieron a 37°C; en el tercer día, el medio de la parte apical se removió y el de la parte basolateral fue reemplazado con medio fresco. Las monocapas se observaron completamente confluentes al día diez de haber iniciado el ALI.

Los trofozoítos de *G. intestinalis* se crecieron hasta alcanzar su fase logarítmica. Se colocaron en una proporción 3:1 (tres trofozoítos por cada célula epitelial), se añadieron en una combinación de medios (ver sección de resultados) en la parte apical de cada monocapa confluyente y se mantuvieron en interacción durante 24 h, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de la incubación, el medio de la parte apical se recuperó en un tubo Eppendorf, se centrifugó y el sobrenadante se guardó a -20°C para su posterior análisis.

La pastilla celular y el filtro que contenía la monocapa infectada se fijaron en glutaraldehído para su posterior observación por microscopía electrónica de transmisión.

### **Preparación de muestras para espectrometría de masas**

Después de 24 h de infección, el medio que fue recuperado de la parte apical de los filtro fue colocado en un tubo Eppendorf y guardado a -80° C hasta su uso. Una vez descongelado, el medio de infección se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 5 minutos, para separar restos celulares que hayan quedado en el sobrenadante. La pastilla se desechó y el sobrenadante se corrió en geles de poliacrilamida.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% para el análisis del perfil de proteínas por electroforesis unidimensional. Se corrieron muestras de medios de cultivo más la muestra recuperada después de la infección del cultivo ALI con trofozoítos de *G. intestinalis* (24h), como se muestra en la Fig. 11.

Los geles se corrieron durante 45 minutos a 90 V y las bandas correspondientes al medio de cultivo de *G. intestinalis*, al medio de cultivo de ALI y al medio de 24 h de infección se cortaron para su envío a la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del Cinvestav, donde fueron procesados y analizados en el equipo MS Synapt G2Si, por el M. en C. Emmanuel Ríos Castro.

Gel 1					Gel 2				
C1	C2	C3	C4	C5	C1	C2	C3	C4	C5
Marcador de peso molecular	Medio de <i>G. intestinalis</i> complementado	Medio de ALI de ratón	Medio de ALI 1:1 Medio de <i>G. intestinalis</i> complementado	Medio recuperado de la infección (24 h)	Marcador de peso molecular	Medio de <i>G. intestinalis</i> complementado	Medio de ALI de ratón	Medio de ALI 1:1 Medio de <i>G. intestinalis</i> complementado	Medio recuperado de la infección (24 h)

**Fig. 11 Distribución de medios en geles de poliacrilamida para análisis de espectrometría de masas**  
 Abreviaturas: ALI: *Air-Liquid Interface*; C: Carril

## Resultados

### **Establecimiento de las condiciones óptimas para el cultivo de criptas intestinales**

#### *Producción de sobrenadantes de los factores de crecimiento Wnt 3A y R-spo1 y test de actividad*

Las líneas celulares HEK-293Wnt3a y HEK-293R-spo1 se cultivaron como se describe en la sección de materiales y métodos. Se recuperó un total del 800ml de sobrenadante de Wnt3a y 1l de sobrenadante R-spond. Cada lote fue distribuido en alícuotas de 10ml que se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Para el ensayo de actividad de los sobrenadantes, se descongeló la línea celular HEK-293t (línea celular reportera) y se cultivó en cajas de 25cm<sup>3</sup> durante dos semanas, para mantener el cultivo mientras los lotes de sobrenadantes estaban listos. La noche anterior al test, las células se tripsinizaron y se distribuyeron en placas de 24 pozos para obtener el 80% de confluencia por pozo y poder realizar el test.

El medio de cultivo en el que se sembraron las células fue descartado, se añadieron concentraciones crecientes (10%, 30%, 30%, 40% y 50%) de los sobrenadantes de Wnt3a o R-spond en cada pozo (Tabla 9) y se incubó la placa durante toda la noche a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, los medios de cultivo se descartaron y las células se fijaron con PFA al 4% y los núcleos se tiñeron con Hoechst. Las placas se observaron por microscopía de epifluorescencia y la intensidad de fluorescencia fue cuantificada mediante el software Fiji<sup>19</sup>.

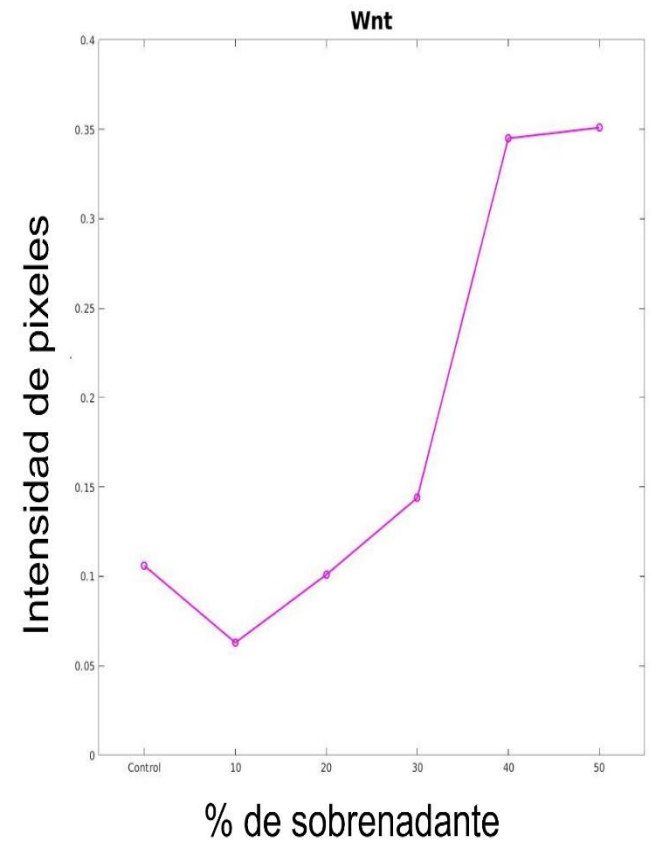
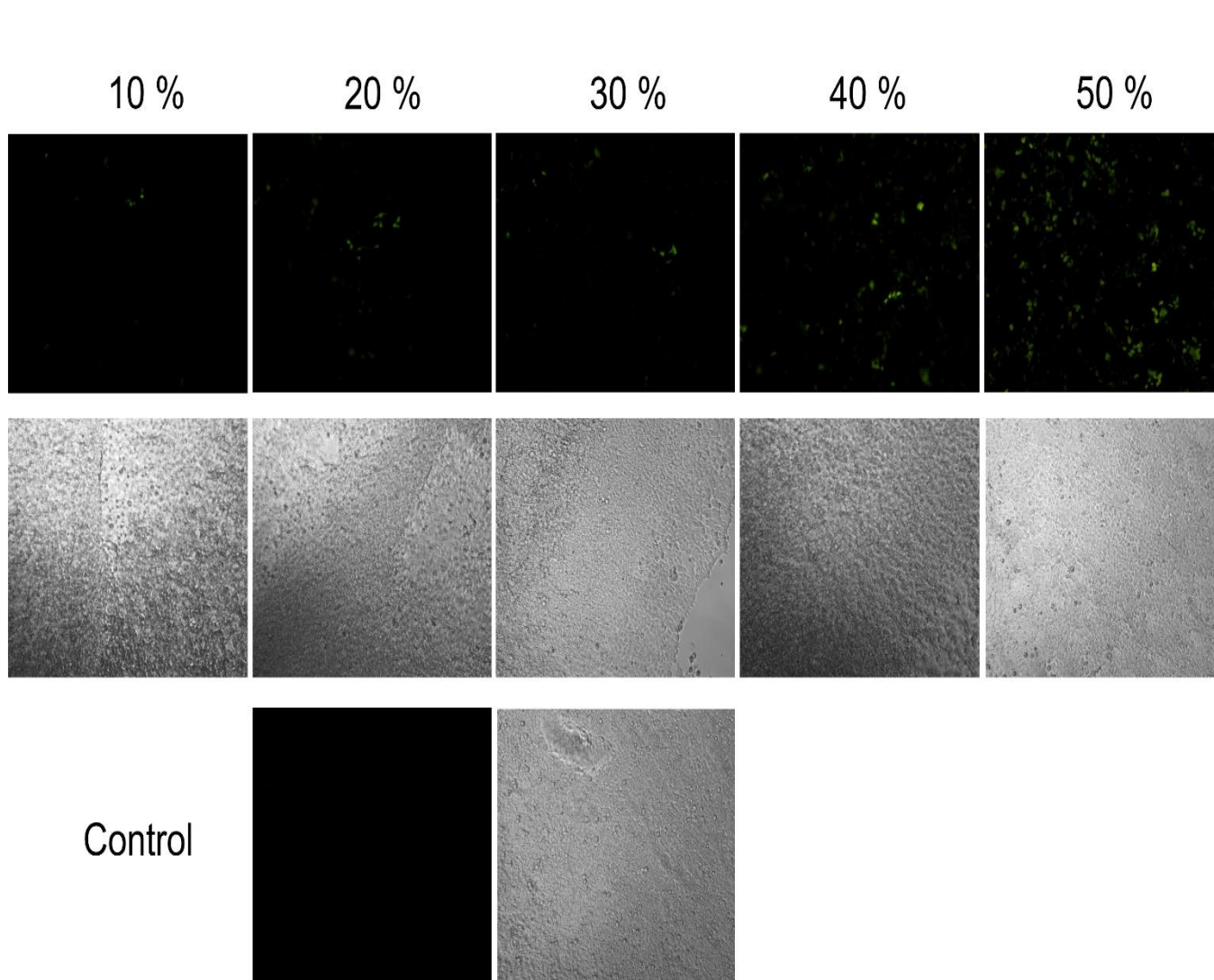
La actividad del sobrenadante de Wnt fue incrementando exponencialmente, reportando la mejor actividad cuando el sobrenadante se usa al 50% en la línea celular reportera (Fig. 12).

---

<sup>19</sup> Software Fiji (Schindelin et al., 2012).

Por otra parte, la actividad del sobrenadante R-spond-1 mostró actividad desde el 10%, sin embargo, la actividad muestra un decremento entre el 30% y el 40% de concentración, incrementando drásticamente cuando se usa al 50% sobre la línea celular reportera. La menor actividad entre las concentraciones de 30-40% podría deberse a la ausencia de células en la zona cuantificada (Fig. 13).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se consideró utilizar el sobrenadante de Wnt3a al 50% y entre 10 y 30% de sobrenadante de R-spond1 para la elaboración del medio condicionado para el desarrollo de organoides duodenales murinos y humanos.



**Fig. 12 Test de actividad del sobrenadante Wnt en la línea celular reportera HEK-293t**



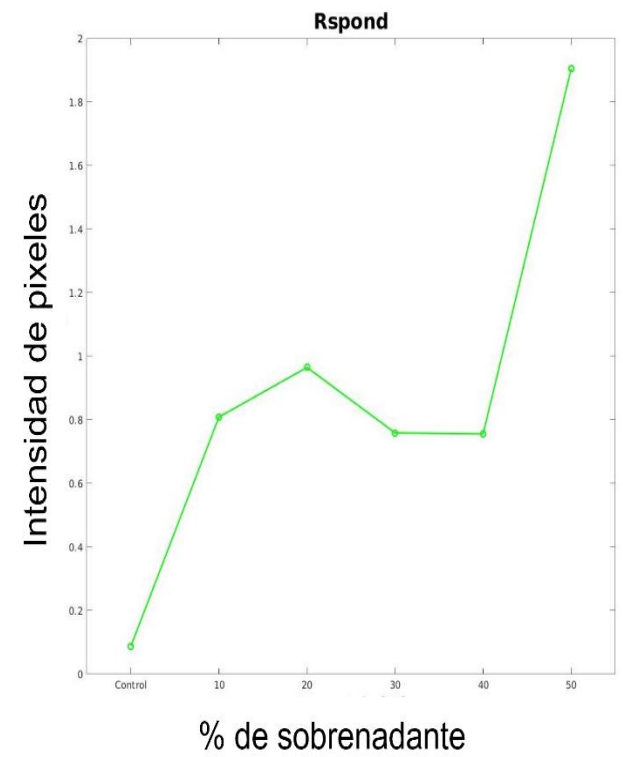
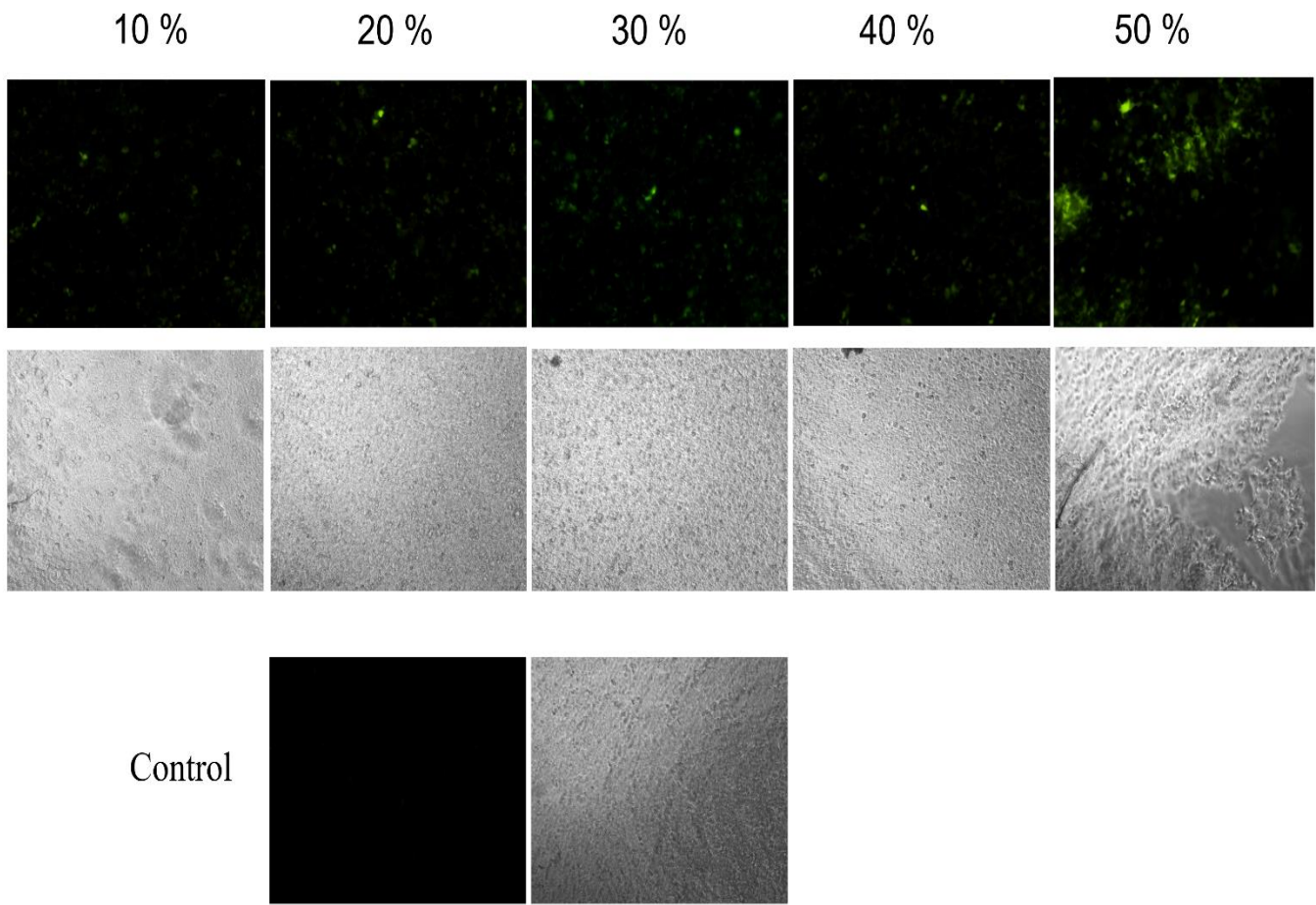


Fig. 13 Test de actividad del sobrenadante Rspo-1 en la línea celular reportera HEK-293

## Extracción de criptas intestinales humanas y desarrollo inicial de organoides duodenales humanos

Se obtuvieron biopsias duodenales de cuatro pacientes que asistieron a una endoscopia diagnóstica, al Hospital General Regional 1 “Dr. Mac Gregor Sánchez Navarro”, de la ciudad de México, bajo el proyecto autorizado con número de registro 2008-785-001<sup>20</sup>. Para la toma y uso experimental de las muestras, se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes. Los estudios histológicos de las muestras se realizaron por el personal médico del hospital, cuyos resultados se resumen en la tabla 11.

**Tabla 11. Diagnóstico de las endoscopias realizadas a los pacientes donadores de biopsias**

Número de identificación	Sexo	Edad	Diagnóstico
9GB273	F	44	Gastropatía erosiva leve de cuerpo y antro con componente biliar. Pólipos fúndicos con apariencia hiperplásica. Bulbo duodenitis erosiva leve.
9GB274	M	40	Hernia hiatal por deslizamiento. Pólipos gástricos con apariencia hiperplásica.
9GB275	F	42	Hernia hiatal por deslizamiento. Gastropatía crónica en cuerpo y erosiva leve en antro con componente biliar
9GB276	M	71	Esofagitis química media. Gastropatía crónica moderada de antro y áreas sugestivas de metaplasia intestinal en región prepilórica

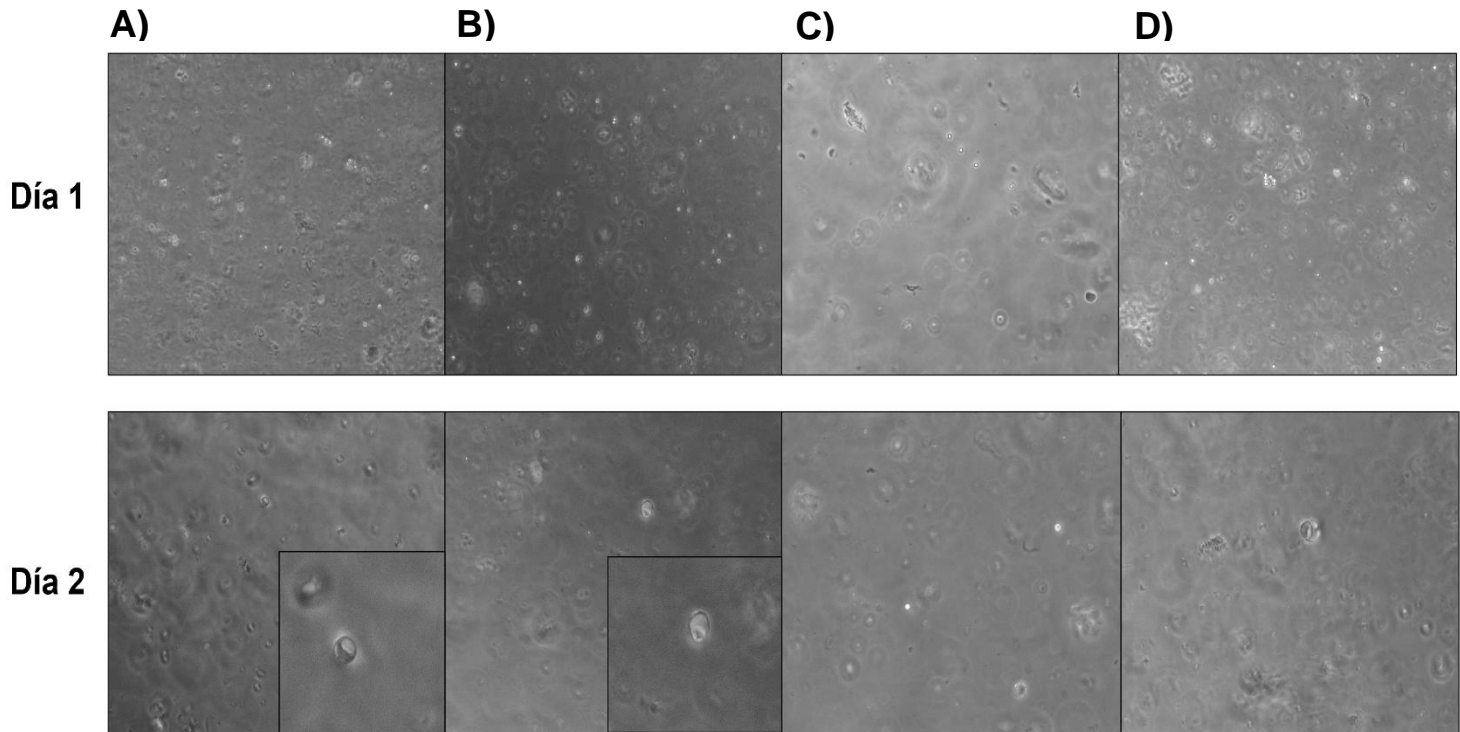
Antes de comenzar el cultivo de organoides humanos, se realizó una revisión en la literatura de los medios de cultivo reportados para organoides humanos duodenales, para poder elegir los componentes del medio en el que creceríamos las células madre provenientes de las muestras de pacientes.

Decidimos utilizar un medio de cultivo enriquecido para organoides humanos con base en WNR (Wnt/Noggin/Rspon1) (Ver componentes del medio en material suplementario 1).

---

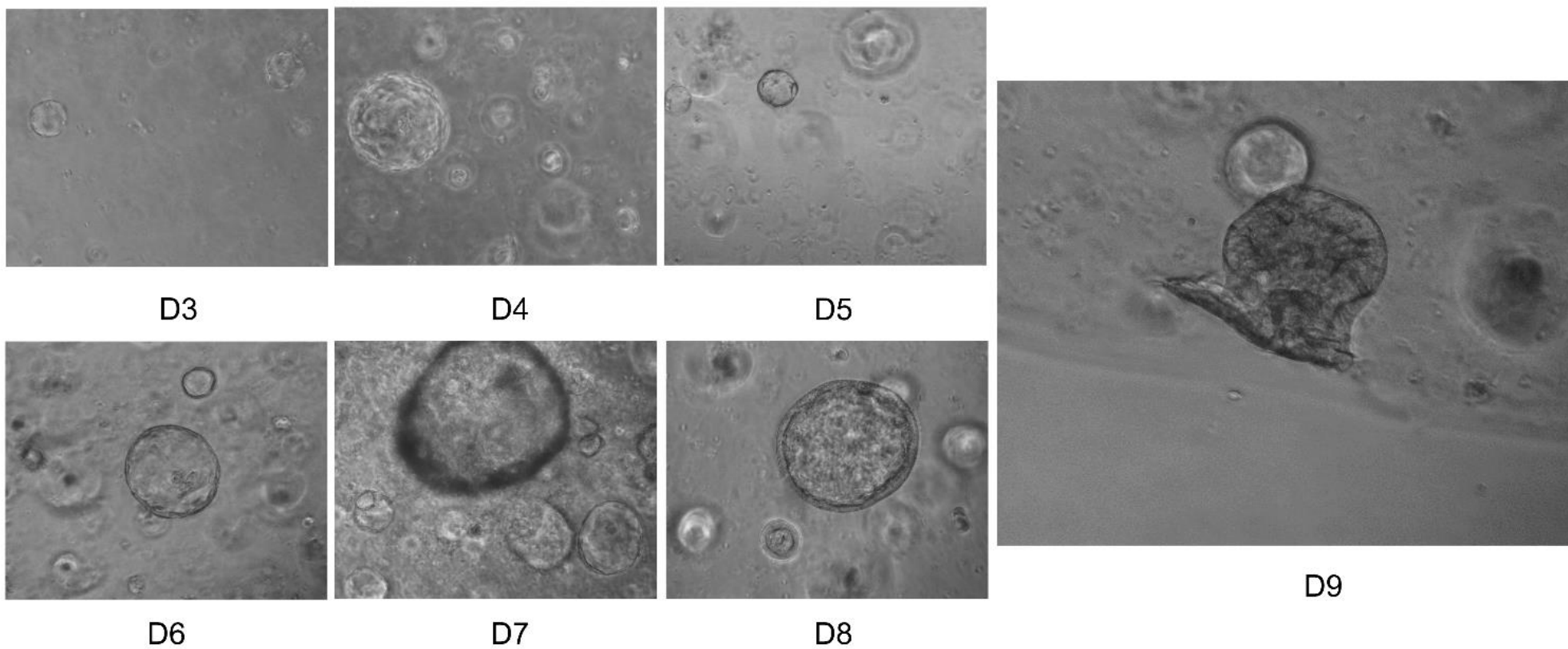
<sup>20</sup> Correspondiente al proyecto titulado: Infección, inflamación y cáncer: estudio para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y la identificación de biomarcadores de riesgo, pronóstico y prevención, del Dr. Javier Torres López.

Las células madre se extrajeron de las biopsias duodenales y se indujo su diferenciación en organoides (Fig. 14).



**Fig. 14 Extracción de células madre de biopsias duodenales de pacientes a) 9GB273, b) 9GB274, c) 9GB275 and, d) 9GB276**

Durante nueve días, se indujo la diferenciación celular de las células madre extraídas de biopsias en organoides duodenales, utilizando medio enriquecido de cultivo. Sólo las células madre del paciente 9GB273 respondieron a las condiciones de crecimiento de organoides durante los nueve días (Fig. 15), pero sobrevivieron únicamente tres pases celulares, es decir, alrededor de 21 días en cultivo, por lo que no se logró establecer el cultivo de organoides humanos de largo plazo, pero sí las etapas iniciales del cultivo, que se caracterizarían más adelante.



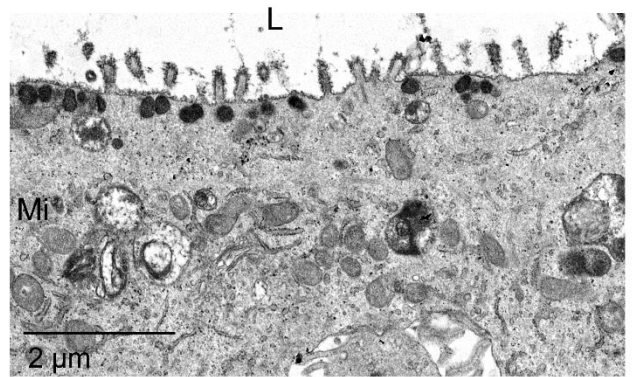
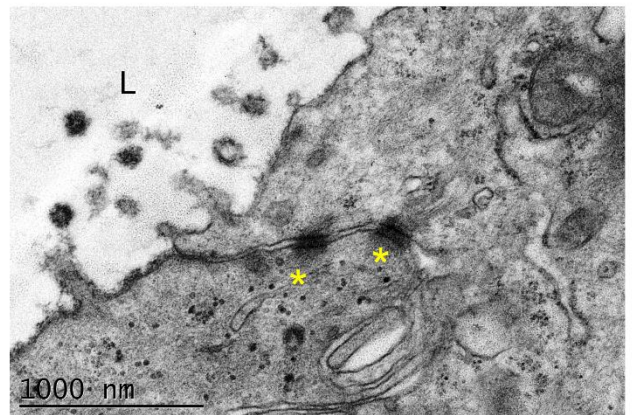
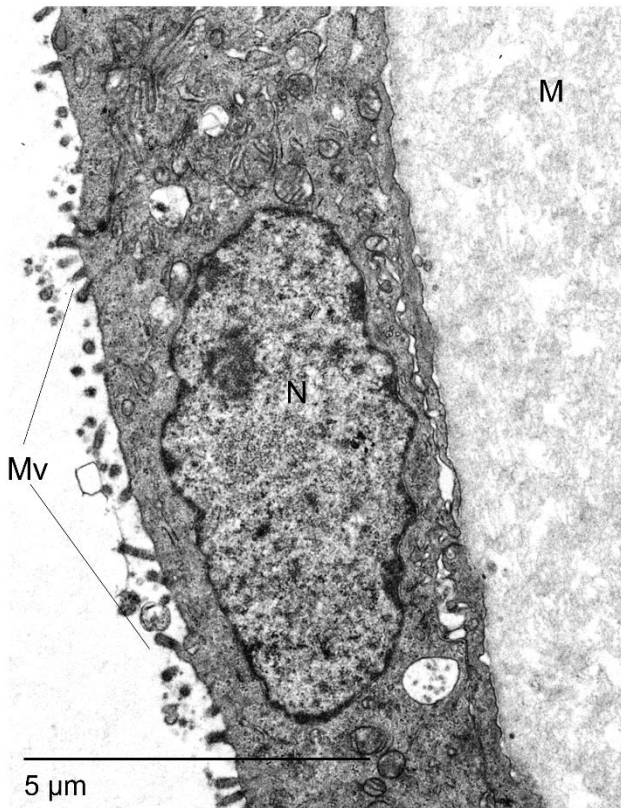
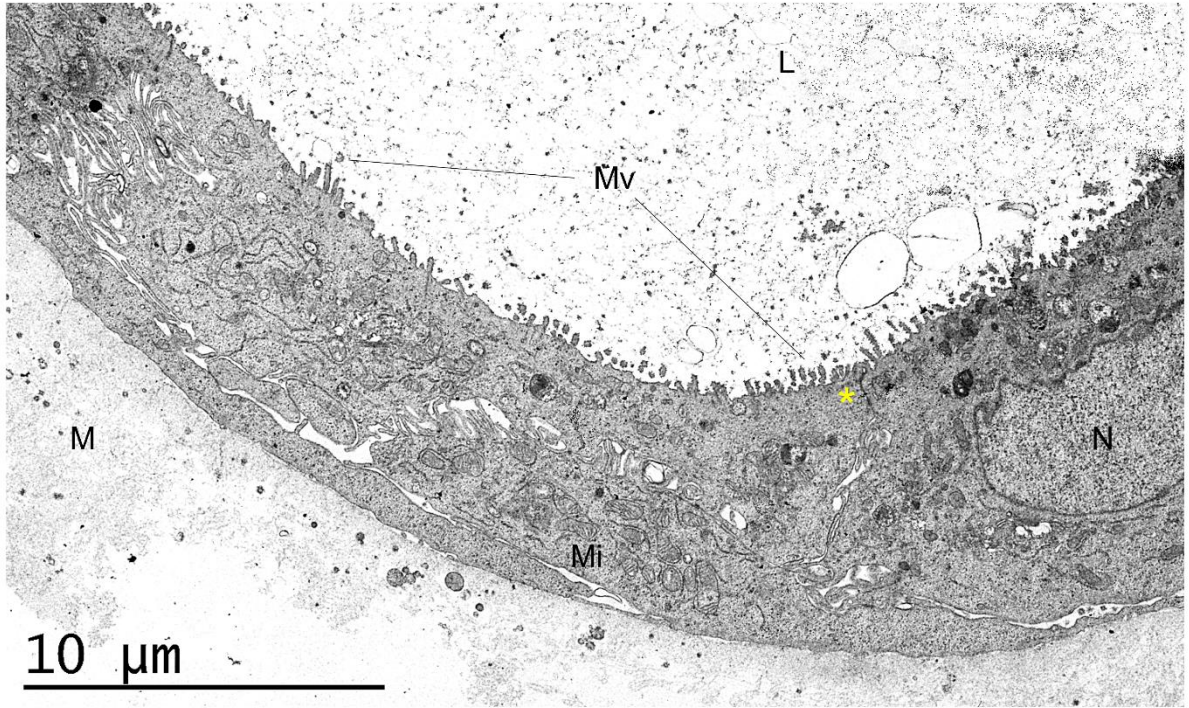
**Fig. 15 Seguimiento del crecimiento de los organoides humanos del paciente 9GB273, durante los primeros nueve días del cultivo**

Secciones ultrafinas de los organoides duodenales humanos desarrollados se observaron y analizaron por microscopía de luz y electrónica de transmisión, y se compararon con el tejido de origen del cual se extrajeron. Los organoides muestran una estructuración multicelular, con la luz intestinal en la parte interna del modelo y morfología similar al tejido de origen (Fig. 16).



**Fig. 16 Cortes finos de organoides humanos teñidos con azul de Toluidina**

Por microscopía electrónica de transmisión, fue posible apreciar a detalle la composición estructural de los organoides desarrollados. Además de confirmar la presencia tipos celulares anatómicamente distintos, se observaron estructuras externas como las microvellosidades, así como algunas estructuras celulares internas como núcleos, mitocondrias, interdigitaciones, uniones estrechas y algunos cuerpos vesiculares (Fig. 17).



**Fig. 17 Organoides humanos al día 9 observados por MET.**

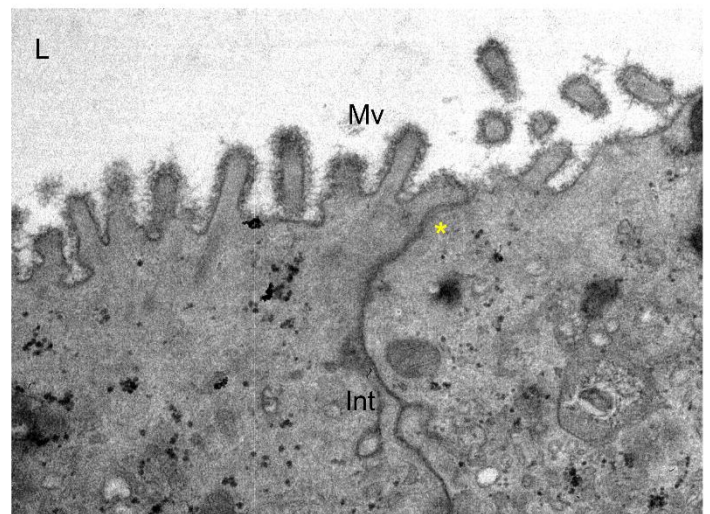
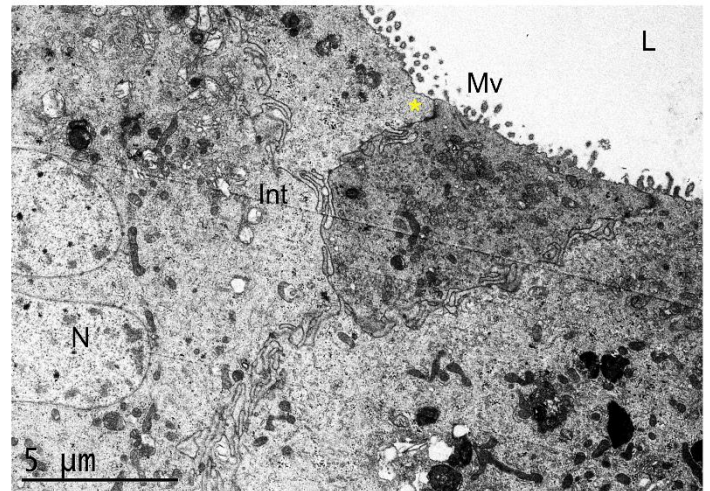
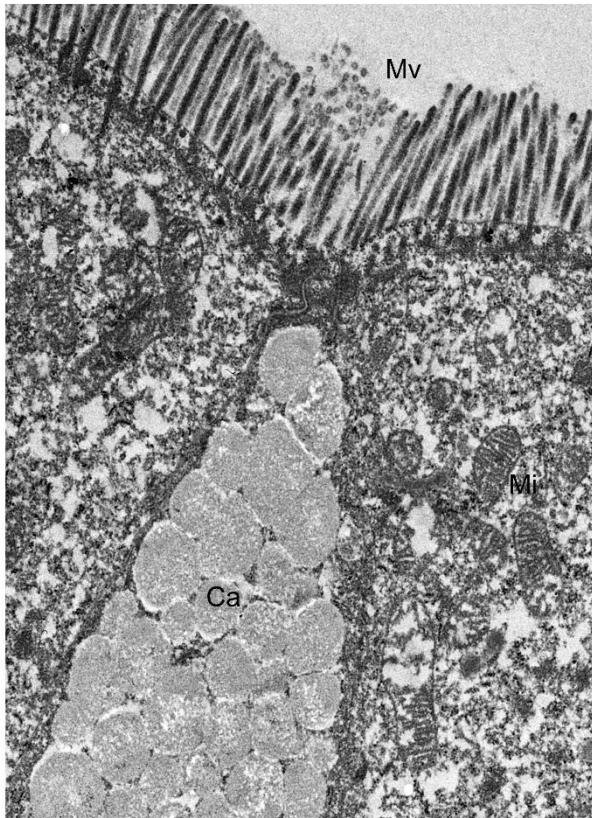
Abreviaturas: M: Matrigel, Mi: Mitocondrias, Mv: Microvellosidades, N: núcleos L: Lumen, \*: Uniones estrechas

## **Desarrollo de monocapas derivadas de organoides humanos en interfase aire-líquido (ALI)**

Después del pase celular número dos, se realizó la expansión del cultivo de organoides. En el día de pase celular (día 7), los organoides se disociaron y expandieron para desarrollar más gotas de matrigel en el cultivo, para incrementar el número de organoides y, por ende, de células individuales y poder desarrollar el cultivo ALI (*Air-liquid interface*) en el siguiente pase celular. Alrededor de  $3 \times 10^5$  células individuales suspendidas en 500µl medio ALI se sembraron en la parte apical de filtros recubiertos con matrigel/colágeno; también, se añadieron 500µl de medio ALI en la parte basolateral del inserto. Las células en los filtros crecieron durante 13 días hasta lograr el 100% de confluencia, por lo que, en ese día, se fijaron y procesaron para su análisis por MET.

Las monocapas derivadas de organoides duodenales humanos crecidas en el sistema ALI muestran una sólida estructuración y polarización celular, con predominancia de la morfología celular tipo enterocito (*Enterocyte-like*), que presenta microvellosidades en la parte apical y compartimentalización celular interna, semejante a como ocurre en el tejido de origen (Fig. 18). Por MET, se pudieron apreciar células caliciformes, interdigitaciones celulares y uniones estrechas, así como algunos organelos celulares como núcleos y mitocondrias.

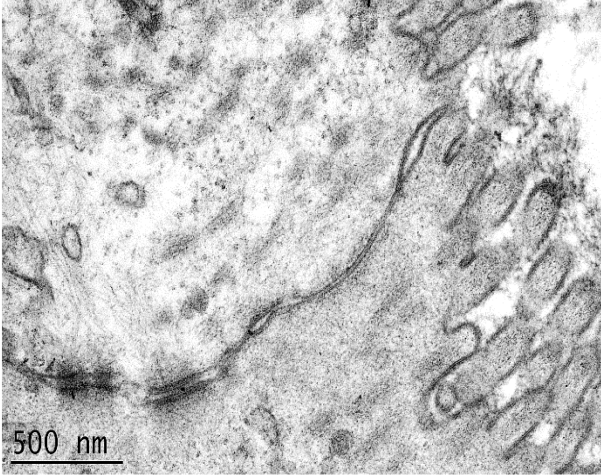
Desafortunadamente, las células duodenales de humano no lograron sobrevivir en cultivo por más de tres pases, pero se lograron establecer las condiciones iniciales de cultivo y se pudo hacer la comparación entre el cultivo de organoides, la monocapa derivada de organoides y el tejido de origen, todos provenientes del mismo paciente (Fig. 19).



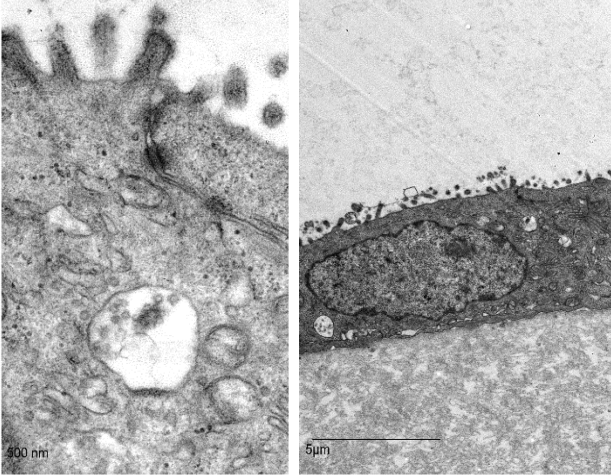
**Fig. 18 Monocapas derivadas de organoides humanos cultivados en ALI observados por MET.** Abreviaturas: Ca: Células caliciformes, Int: Interdigitaciones celulares, Mi: Mitocondrias, Mv: Microvellosidades, N: núcleos L: Lumen, \*: Uniones estrechas



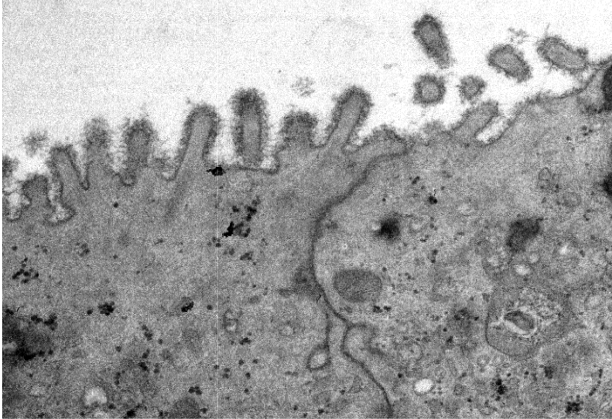
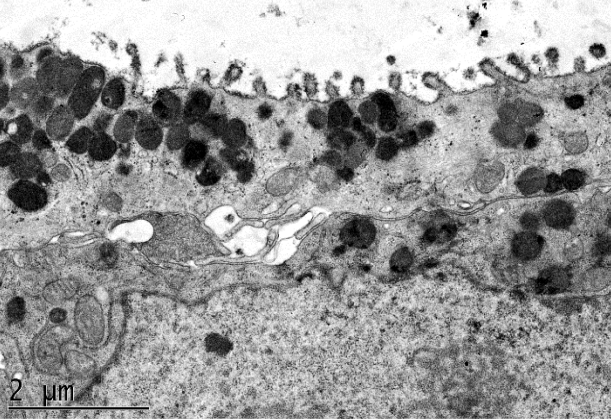
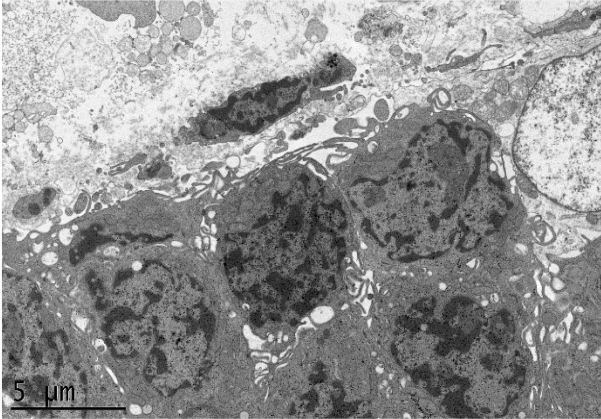
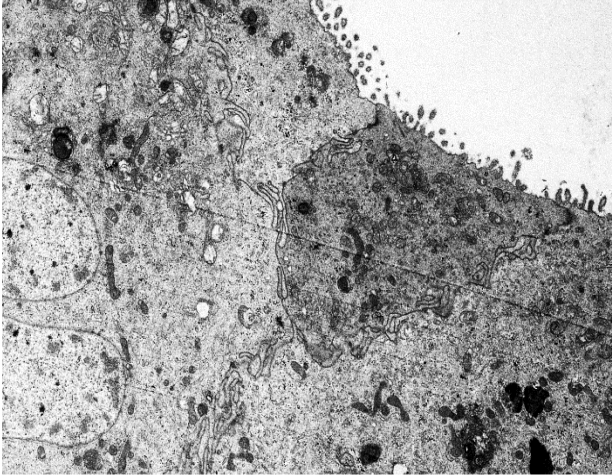
Biopsia



Organoides



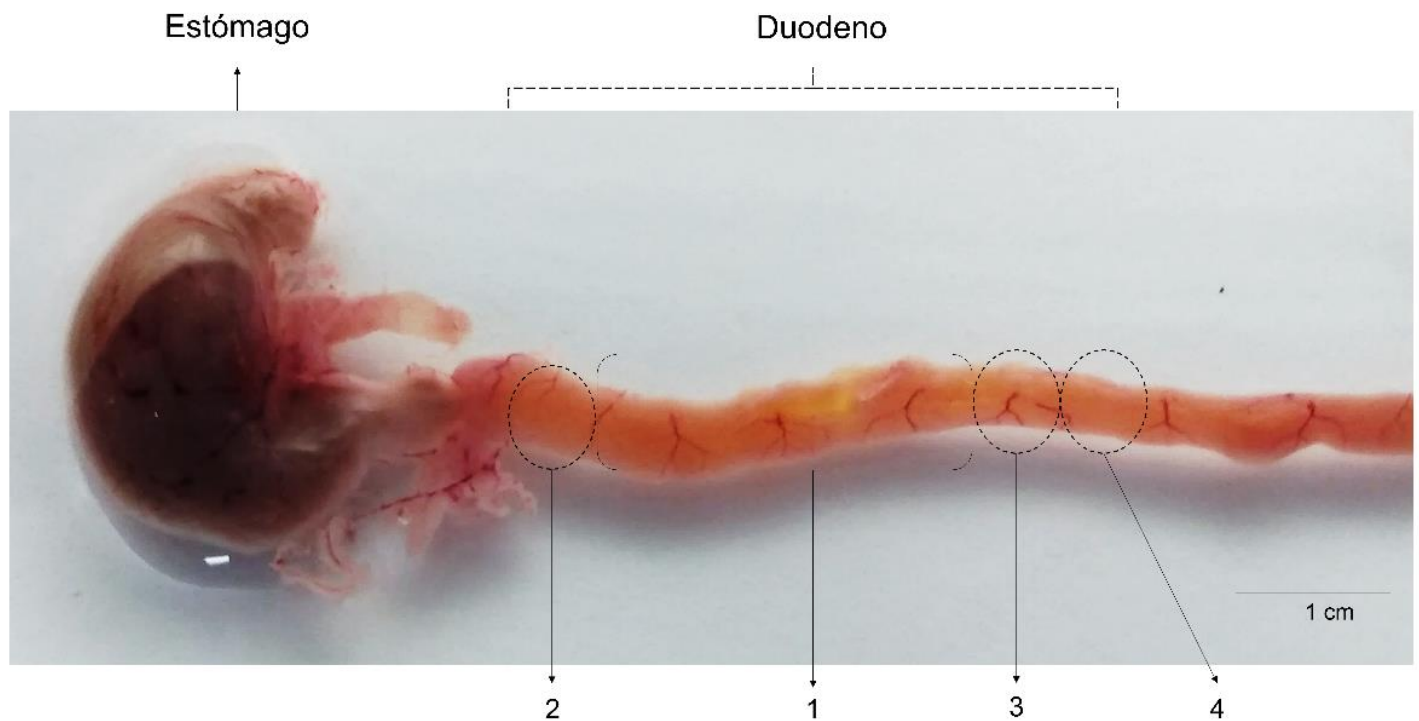
Monocapa derivada de organoides en ALI



**Fig. 19 Comparación entre los modelos de cultivo establecidos para las células madre duodenales humanas: Tejido de origen, organoides y monocapa derivada de organoides humanos en ALI**

## Extracción de criptas duodenales de ratón

Ratones hembra de la cepa CD1 se sacrificaron mediante dislocación cervical. El intestino delgado fue removido en condiciones de esterilidad; la porción del duodeno fue seccionada en cuatro partes, para sus diferentes procesamientos: 1) para la extracción de criptas, 2) directamente fijados en PFA 4% para ensayos de inmunofluorescencia, 3) directamente fijados en glutaraldehído para MET y 4) directamente preservados en Trizol para ensayos de PCR punto final y qRT-PCR (Fig. 20).



**Fig. 20 Fraccionamiento del duodeno para los diferentes procesamientos**

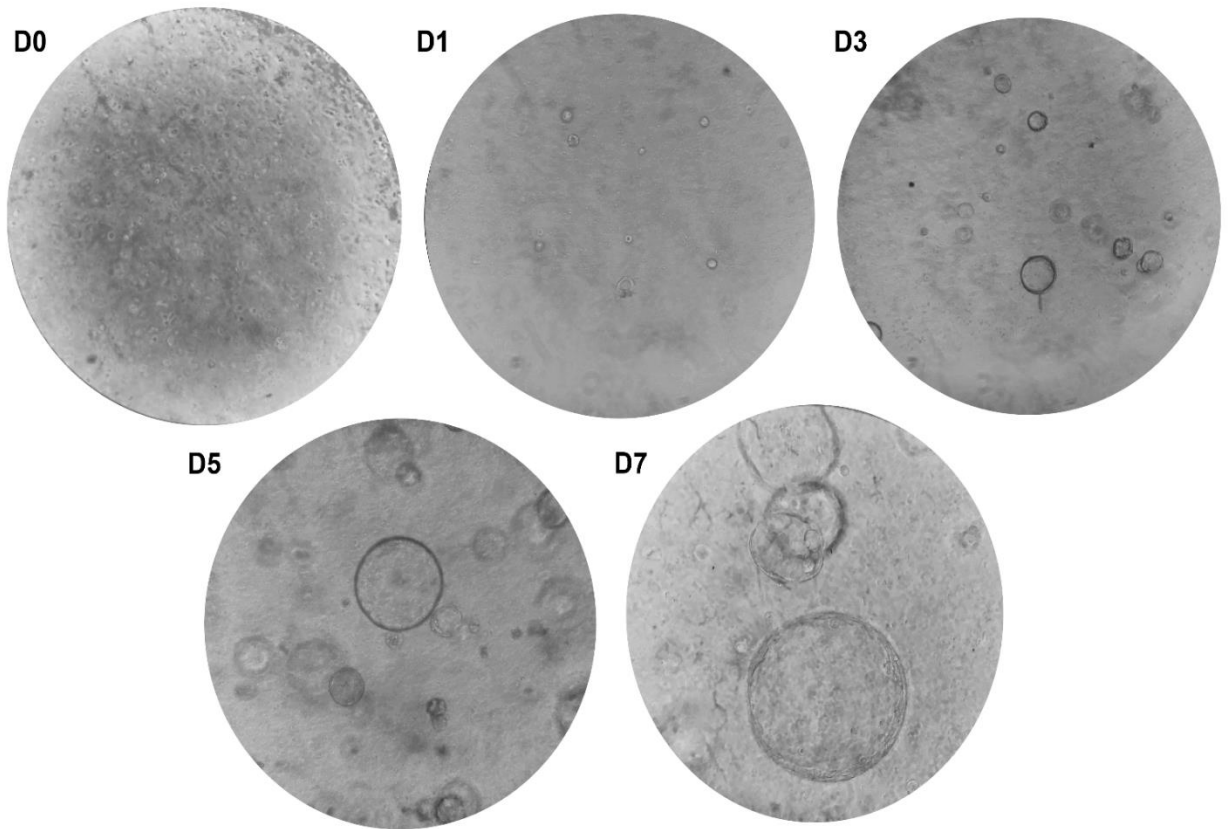
1) Extracción de criptas, 2) fijado en glutaraldehído (para MET), 3) fijado en PFA (para microscopía confocal), 4) preservado en Trizol (para análisis de PCR punto final y qRT-PCR).

Las células madre se extrajeron de aproximadamente 1cm de tejido de ratón y fueron crecidas en gotas de matrigel. Para la extracción de las células madre adultas, es necesario tener condiciones de extrema esterilidad y trabajar los procedimientos como se indican en los materiales y métodos para evitar que las células mueran.

Al día cero (Fig. 21-D0), las células son casi imperceptibles por microscopía de luz convencional, sin embargo, conforme van pasando los días, es posible ver cómo van creciendo los organoides y se puede ir monitoreando el cultivo, tal como se observa en la figura 21.

Los organoides se desarrollaron a partir de células madre en medio de cultivo enriquecido y se monitorearon cada 24h por seis días durante la primera semana, hasta el día del pase celular. El pase celular se realizó cada cinco o seis días y el medio de cultivo fue reemplazado cada tercer día. Cuando no se realiza el pase celular, se pueden desarrollar organoides completamente diferenciados, como el que se observa en la figura 21 B.

**A)**



**B)**



**Fig. 21 Monitoreo de organoides duodenales murinos**

A) Desarrollo durante la primera semana, B) Organoide completamente diferenciado

## Establecimiento de organoides duodenales de ratón

Las condiciones de cultivo se practicaron durante una fase de aprendizaje y estandarización en una estancia de investigación en el *Max Planck Institute for Infection Biology* en Berlín, Alemania. En México, el cultivo de organoides de ratón se estableció durante 10 pases consecutivos, alrededor de 70 días, sin que las células murieran.

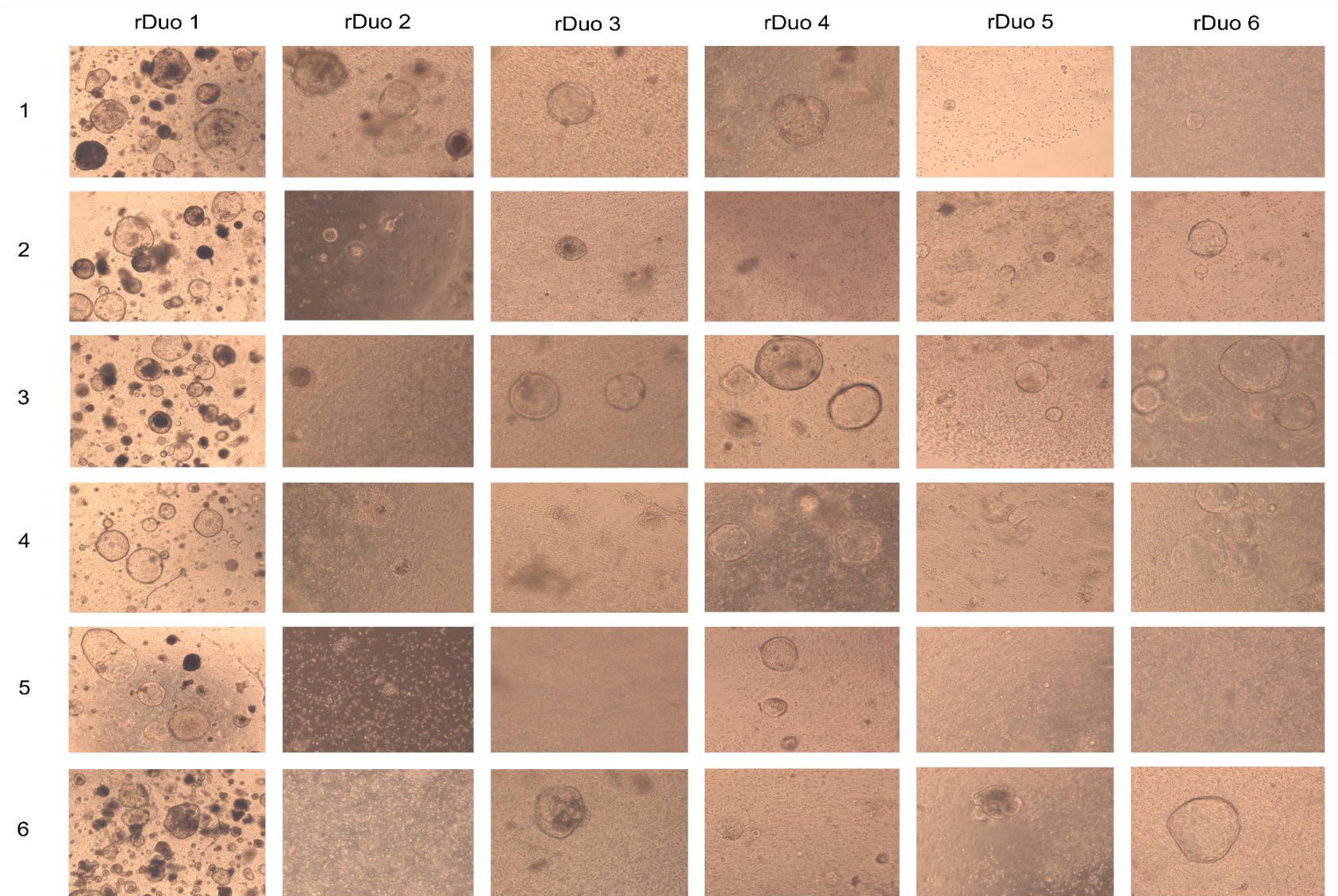
Se realizó un test de medios de cultivos, donde se probaron seis combinaciones de medio de organoides (Tabla 12) en seis diferentes muestras de ratones durante seis pases celulares (rDuo1-rDuo6) (Fig. 22 y 23). Las diferentes combinaciones de medios de cultivo tenían variaciones únicamente en la presencia o ausencia de los factores Wnt3a, R-spo1 y en el tipo de EGF y Noggin utilizados, es decir, si era de ratón o de humano. El resto de los componentes del medio eran los mismos: Medio ++ suplementado con B27, N2, Nic, Rhoc Inhibitor, Nac, FGF, A83-01, Gastrin y Penicilina/Estreptomicina.

El medio número tres (con base en Wnt 50% y R-spond-1 10%, señalado abajo en color amarillo) resultó ser el medio de cultivo ideal para el crecimiento de organoides duodenales de ratón, debido a que fue donde se pudieron observar mayor número de organoides y en mejores condiciones, por al menos cinco semanas consecutivas, que fue el tiempo que duró el ensayo.

**Tabla 12. Composición de los medios de cultivo para el test de medios de cultivo para organoides duodenales murinos**

<b>Medio</b>	<b>Combinación de componentes</b>
1	Medio Wnt 50%, R-spond-1 50%, EGF y Noggin murino
2	Sin Wnt, R-spond-1 50%, EGF y Noggin murino
3	Medio Wnt 50%, R-spond-1 10%, EGF y Noggin murino
4	Medio Wnt 50%, R-spond-1 30%, EGF y Noggin murino
5	Sin Wnt, R-spond-1 30%, EGF y Noggin murino
6	Medio Wnt 50%, R-spond-1 50%, EGF y Noggin humano

La base de todos los medios fue Medio ++ suplementado con B27, N2, Nic, Rhoc Inhibitor, Nac, FGF, A83-01, Gastrin y Penicilina/Estreptomicina.



**Fig. 22 Monitoreo de organoides duodenales murinos durante el test de medios (primera semana)**

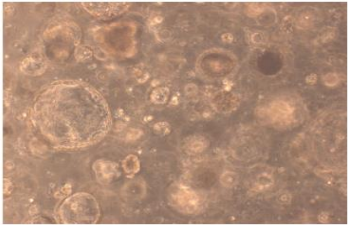
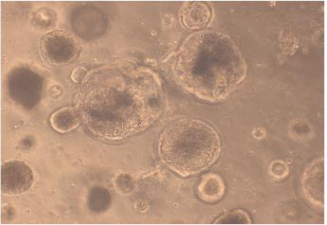
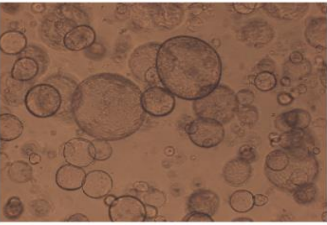
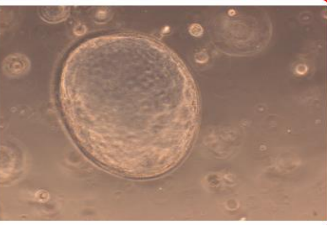
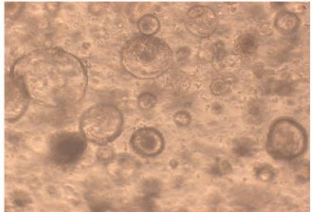
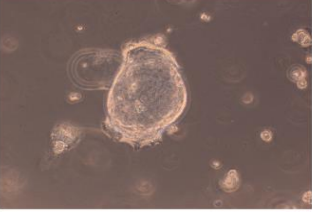
	rDuo 1	rDuo 2	rDuo 3	rDuo 4	rDuo 5	rDuo 6
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3						
4	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—
6		—	—		—	—

Fig. 23 Monitoreo de organoides duodenales murinos durante el test de medios (última semana)

## **Caracterización de organoides duodenales de ratón**

Una vez que se establecieron las condiciones de cultivo para el crecimiento de organoides duodenales murinos, se definieron tres etapas de cultivo para la caracterización del modelo tridimensional: Pase temprano (Pt, del pase 1 al 3), Pase intermedio (Pi, del pase 4 al 6) y Pase final (Pf, del pase 7 en adelante).

Para la caracterización del cultivo de organoides, gotas de matrigel en día de pase celular (splitting), se fijaron en glutaraldehído, en Trizol y en PFA al 4%, para todos los pases (temprano, intermedio y final), como se realizó para el tejido del que derivaron las células madre. Lo anterior para su procesamiento para realizar los ensayos de microscopía electrónica de transmisión, PCR punto final, qRT-PCR y microscopía confocal.

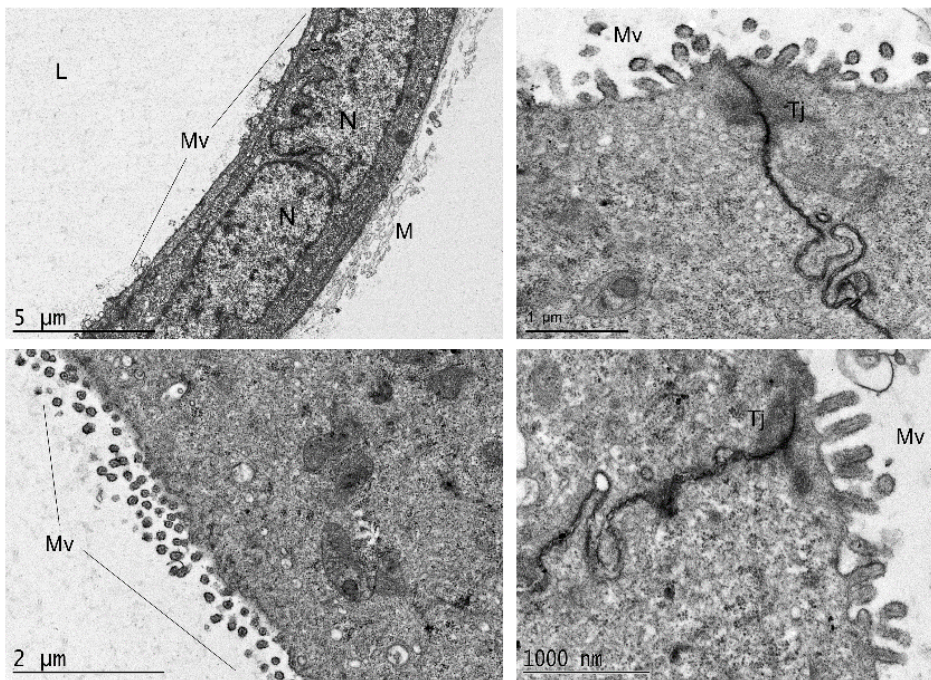
### *Microscopía electrónica de transmisión*

Se realizaron cortes finos de organoides y se observaron en el microscopio electrónico de transmisión. Se observó una sólida estructuración del cultivo tridimensional en el matrigel, donde células de diferentes linajes se pudieron observar. Los organoides duodenales desarrollados tienen el lumen intestinal en la parte interna del modelo, región en la que se pudieron apreciar las microvellosidades típicas de las células intestinales maduras. De la región interna, se observó la típica estructuración intracelular con núcleos, retículo endoplásmico, mitocondrias y también, estructuras relacionadas con la comunicación celular, como las interdigitaciones celulares y las uniones estrechas (Fig. 24).

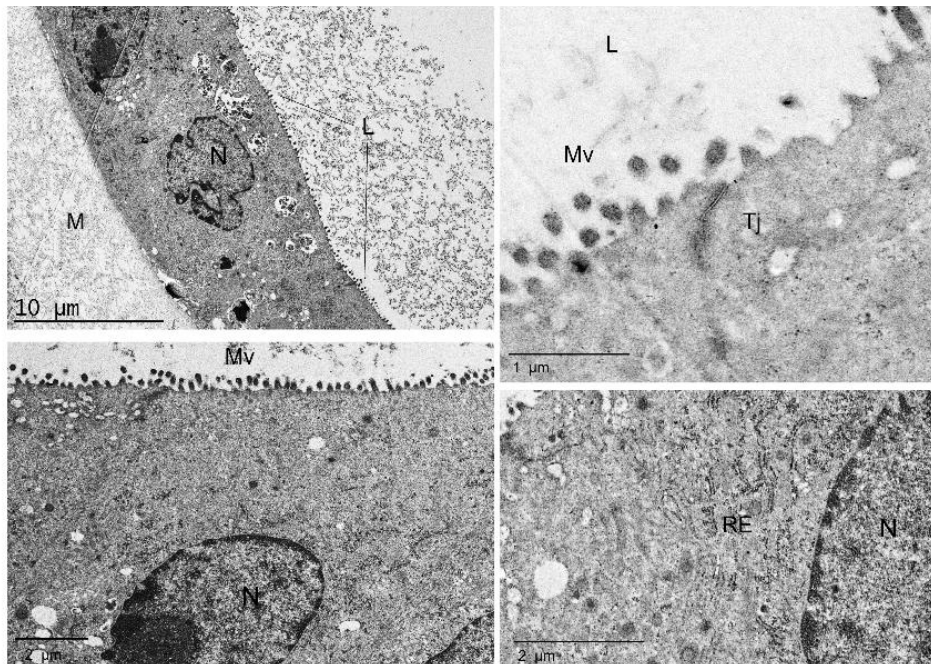
La comparación de la morfología interna de los organoides duodenales murinos, se realizó para los tres tipos de pases planteados, temprano, intermedio y final, observándose en todos ellos una morfología similar y constante en todas las fases del cultivo de largo término desarrollado.



A)



B)



C)

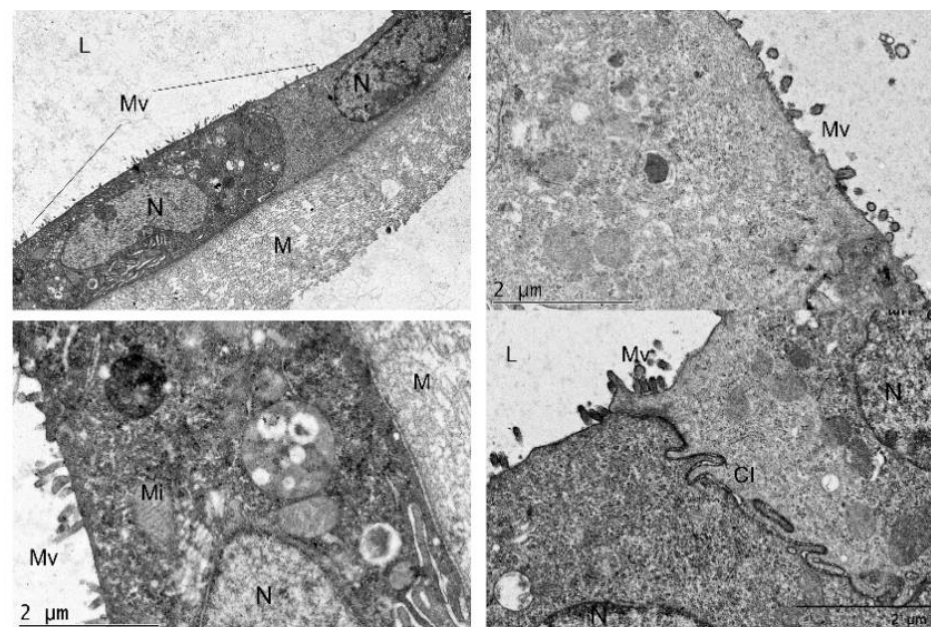


Fig. 24 Organoides duodenales murinos a) Pase temprano, b) pase intermedio y c) pase final

### *PCR punto final y qRT-PCR*

Los marcadores de poblaciones celulares se analizaron en los organoides en los tres pases establecidos (temprano, intermedio y final) y se compararon con el tejido del cual originaron. Cinco marcadores se analizaron por PCR punto final: SOX-9 (para células madre), PCNA (células proliferativas), EPCAM y villina-1 (enterocitos maduros) y un control endógeno (GAPDH).

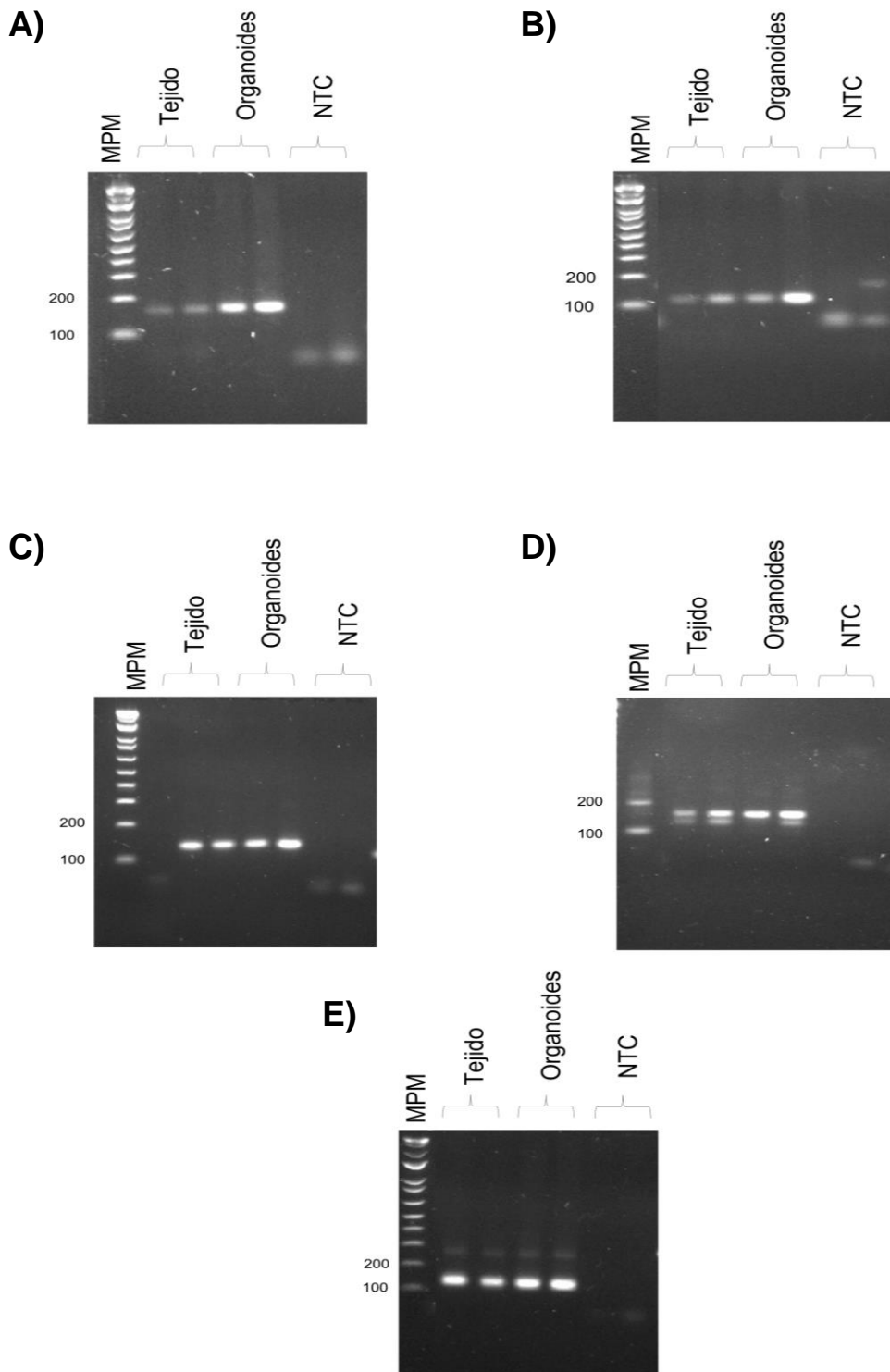
Se realizaron PCR en punto final para dos análisis; el primero fue para analizar la expresión de los marcadores, en el peso molecular esperado (Tabla 10), comparando organoides en cualquier pase de cultivo contra el tejido de origen. Aquí se pudo verificar que los primers diseñados funcionan correctamente y los fragmentos amplifican de manera similar en las muestras que se compararon (Fig. 25).

En el segundo análisis, se realizaron ensayos de PCR punto final de los marcadores elegidos, pero esta vez comparando los organoides a diferentes pases de cultivo (temprano, intermedio y final) con el tejido de origen, para evaluar que se estuvieran expresando los marcadores aún después del paso de las semanas de cultivo. Como se observa en la Fig. 26, los marcadores se expresan de manera uniforme para los diferentes pases de cultivo comparados, y de igual forma al tejido de origen.

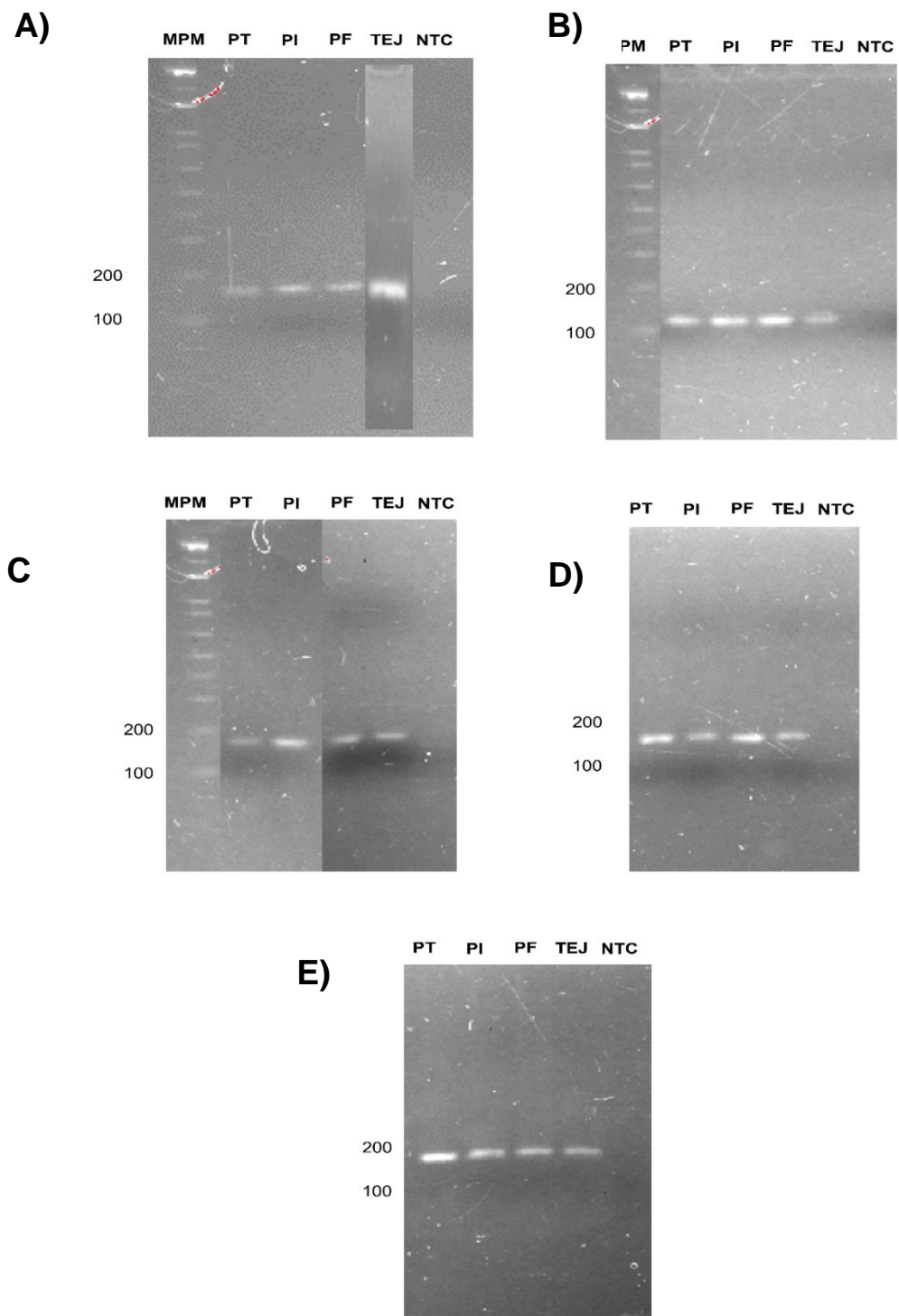
Finalmente, cada marcador fue analizado por qRT-PCR. Las muestras de RNA se procesaron utilizando el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, 11752050) para la producción de cDNA para su análisis por qPCR por triplicado y en experimentos independientes. La expresión relativa obtenida para cada marcador y cada etapa de crecimiento de organoides, fue realizada en dos experimentos independientes (R1 y R2).

Por ensayos de qPCR se observó que los enterocitos maduros se expresaron mejor en los organoides en etapas tardías de cultivo, determinado por la expresión de EPCAM (Fig. 27 A). Mientras que las células proliferativas se expresaron en mayor proporción en los organoides en la etapa intermedia de

crecimiento, denotado por la expresión del gen PCNA (27 B). Además, se observó que la expresión de las células madre y de microvellosidades es mayor en los organoides en fase temprano, debido a que la expresión del marcador SOX 9 y del gen de Villina 1, fueron mayores en esa etapa del cultivo de organoides (Fig. 27 C y D). En todos los ensayos de qRT-PCR los resultados del tejido de origen se normalizaron con valor a 1 y se utilizó el gen GAPDH como marcador endógeno.

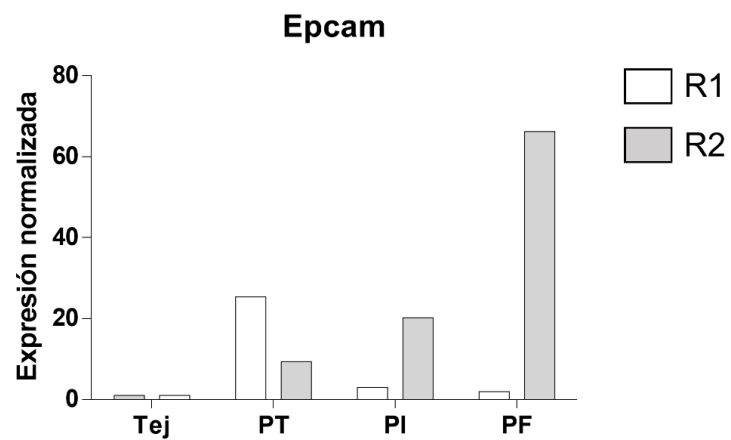


**Fig. 25 PCR punto final para marcadores epiteliales (Tejido en comparación con organoides)**  
 A) Sox9, B) PCNA, C) PCNA, D) Villina-1 y E) GAPDH

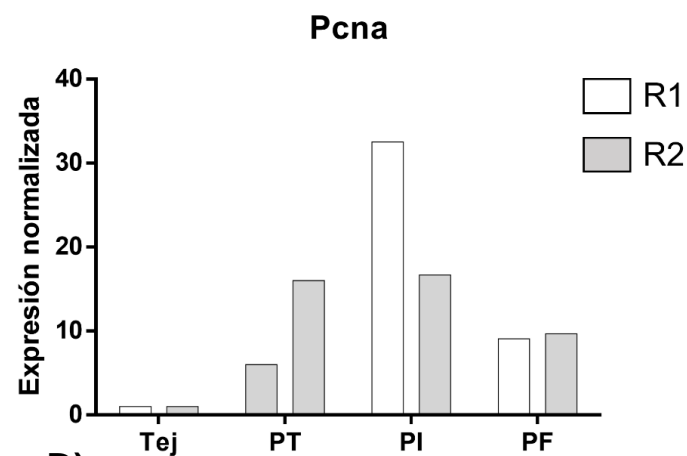


**Fig. 26 PCR punto final para marcadores epiteliales (comparación entre organoides en diferente etapa de cultivo)**  
 A) SOX 9, B) PCNA, D) Villina-1, E) GAPDH

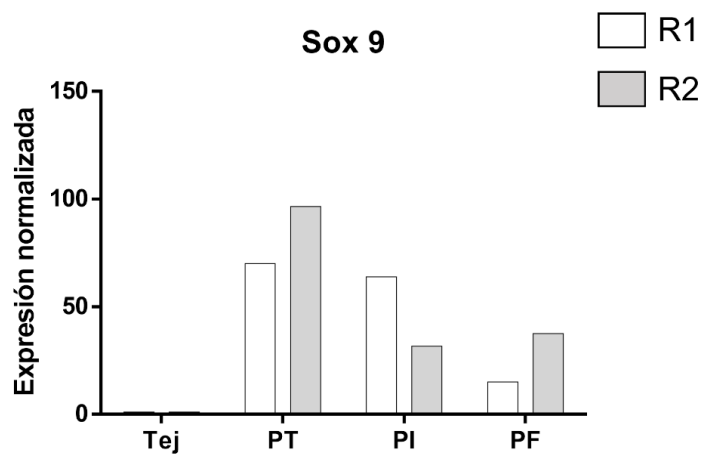
A)



B)



C)



D)

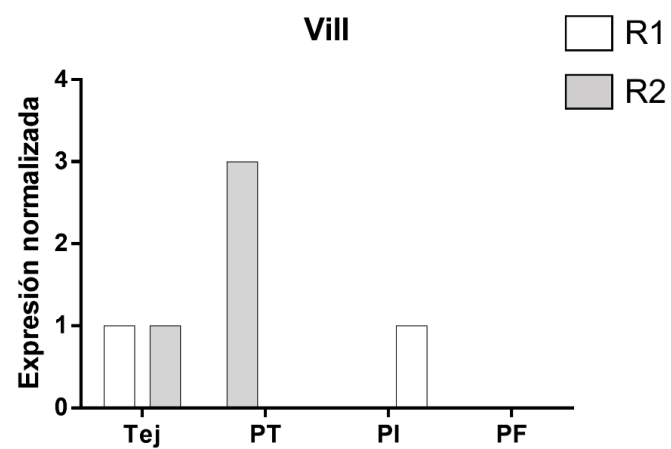


Fig. 27 Análisis de marcadores epiteliales por qRT-PCR

### *Microscopía confocal*

Para complementar la caracterización de los organoides por medio de marcadores epiteliales, se identificaron proteínas típicas de poblaciones celulares intestinales, así marcadores de uniones estrechas.

Las microvellosidades se identificaron por medio de la proteína Villina-1, la cual se puede observar en la periferia del tejido intestinal (28 A), que corresponde a la zona de las vellosidades, situación similar a lo que ocurre en los organoides, donde es posible apreciar la expresión de la proteína en la parte externa del modelo tridimensional, resaltada en color verde (Fig. 28 D).

Asimismo, la proteína de uniones estrechas E-caderina se observa formando una red estructural en el tejido (28 B) y de igual manera en el organoide (Fig. 28 E). Tanto en el tejido de origen como en el organoide duodenal murino es posible apreciar la colocalización de las proteínas Villina-1 y E-cadherina en las imágenes superpuestas (Fig. 28 C y F).

Por otra parte, la presencia de células caliciformes fue confirmada mediante la identificación de la proteína de secreción Muc-2, cuya distribución en el tejido de origen se encuentra en la parte externa de las microvellosidades, debido a que es una proteína de secreción (Fig. 29-A). En el caso de los organoides, también se encuentra en la parte externa del modelo, lo que sugiere coincidir con lo encontrado en el tejido de origen (Fig. 29 D).

Además, se identificó a la proteína ocludina, presente en la uniones estrechas, tanto en el tejido de origen como en los organoides duodenales (Fig. 29-B y E). Se pudo observar también la localización en conjunto de las proteínas ocludina y Muc-2 en el Merge (Fig. 29 C y F).

Otra proteína que se pudo identificar en los organoides murinos fue la proteína  $\beta$ -catenina, la cual forma parte de los mecanismos de adhesión célula-célula, mediando la interacción entre cadherinas y actina y tiene una distribución núcleo-citoplásmica como se puede apreciar en la figura 30.

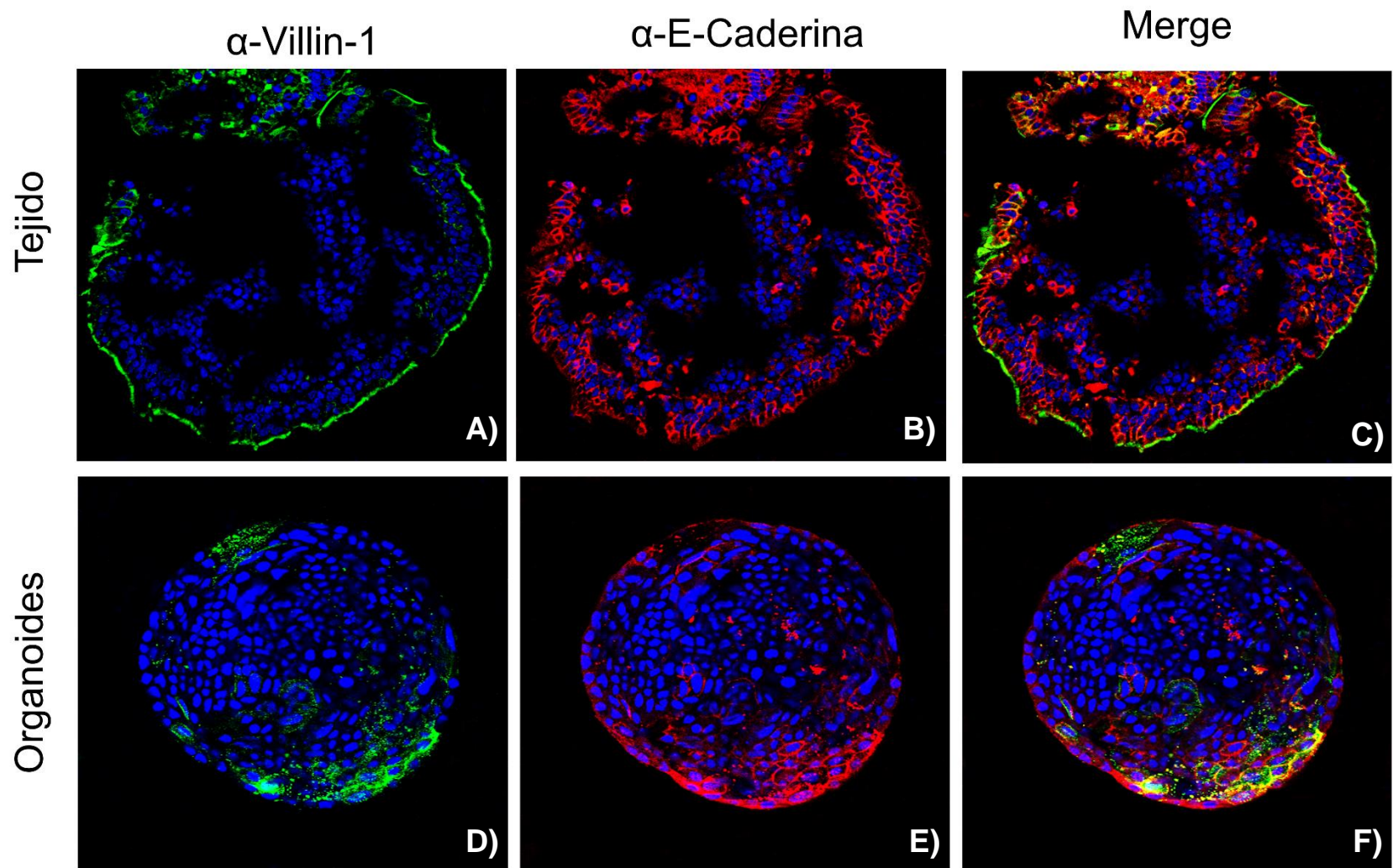


Fig. 28 Identificación de villina-1 y E-caderina en organoides murinos



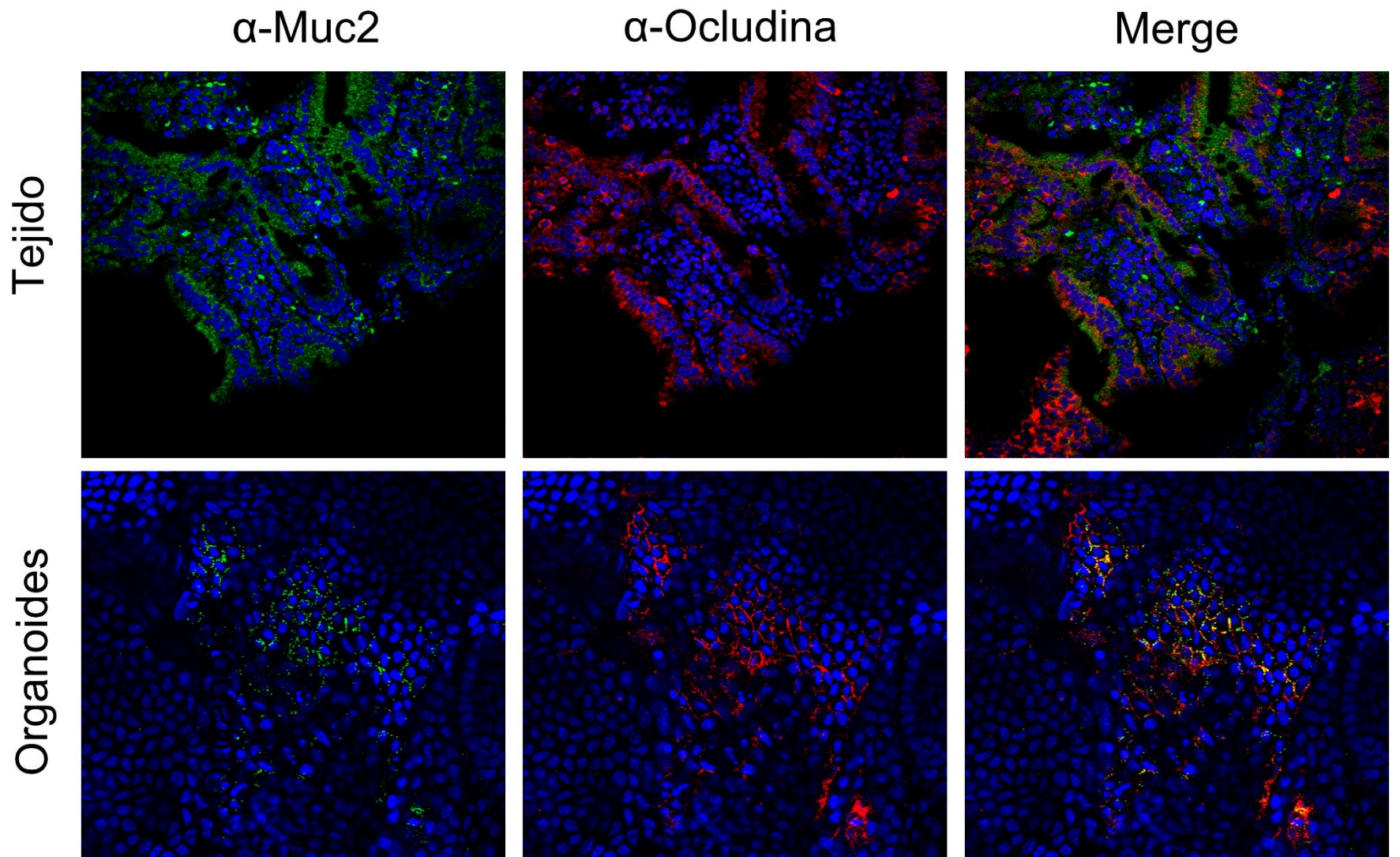
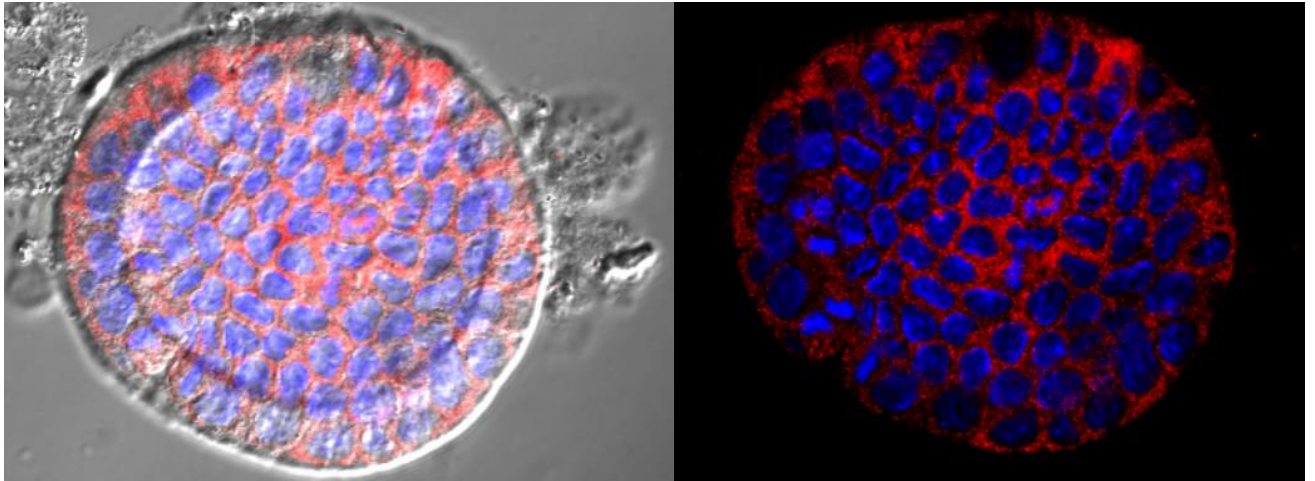


Fig. 29 Identificación de mucina-2 y ocludina en organoides murinos

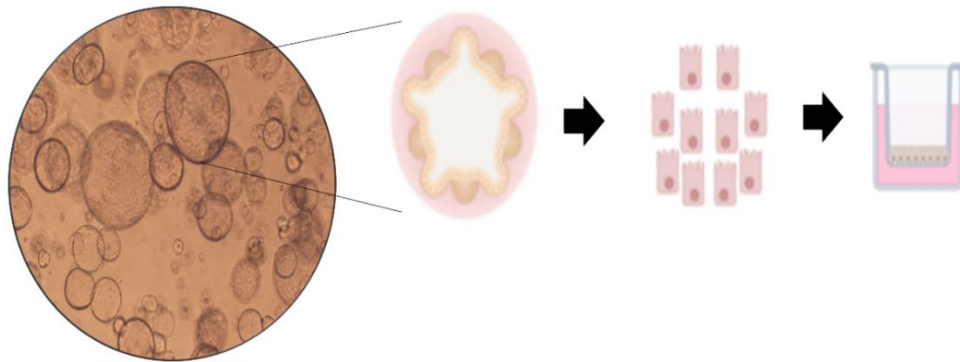


**Fig. 30 Identificación de  $\beta$ -catenina en organoides murinos**

### **Establecimiento de monocapas derivados de organoides murinos en interfase aire-líquido (ALI)**

Una vez que los organoides murinos se establecieron y se caracterizaron, se expandieron durante los pases intermedios y finales (pase 5 a 7) para poder incrementar el número de células individuales y poder establecer un cultivo en interfase aire-líquido. Las gotas de matrigel en el día de pase celular (*splitting*) se disociaron y sembraron en filtros recubiertos con una mezcla de matrigel y colágeno (Fig. 31).

Alrededor de 300,000 células se sembraron en cada filtro, suspendidas en 500  $\mu$ l de medio de cultivo ALI (ver la composición en el material suplementario 1). Al tercer día de haber sembrado las células, el medio de la parte apical se removió para el inicio del cultivo ALI, que fue mantenido durante 10 días hasta que se obtuvo la monocapa completamente polarizada (Fig. 32 A).

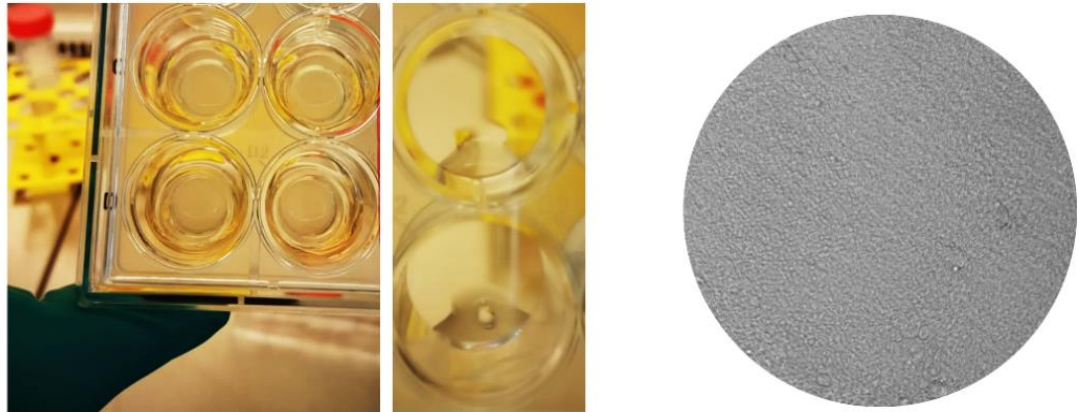


**Fig. 31 Splitting de organoides murinos para sembrarse en los filtros cubiertos con matrigel y colágeno.**

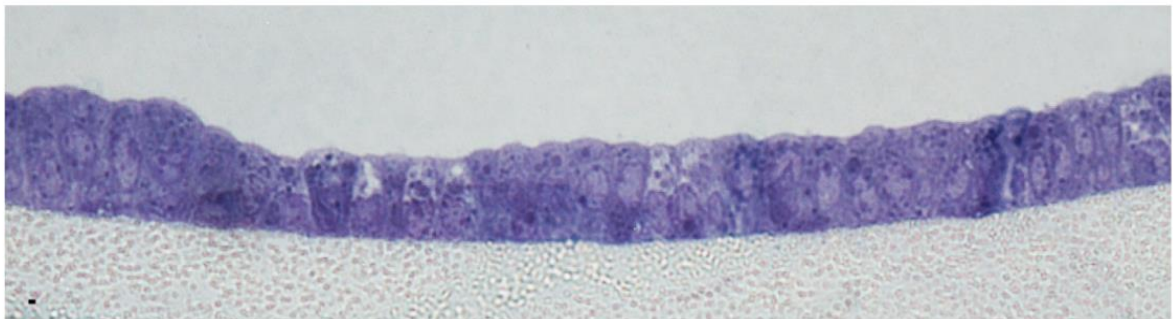
Las monocapas derivadas de organoides murinos se analizaron por microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión. Las células produjeron alrededor de 20  $\mu\text{l}$  de moco (Fig. 32 A), lo cual es una cualidad de los cultivos derivados de organoides en ALI y exhibieron una polarización bien definida, que fue observada por microscopía de luz en cortes semifinos teñidos con azul de Toluidina (Fig. 32B).

Por MET, se pudieron observar predominantemente células con apariencia de enterocito, también denominadas “*enterocyte-like*”, con la presencia de microvellosidades en la parte apical y estructuras celulares típicas de las células duodenales (Fig. 32 C). Una vez que las condiciones de cultivo de monocapas derivadas de organoides en el sistema ALI fueron establecidas y que las monocapas fueron verificadas por MET, estaban listas para establecer la infección.

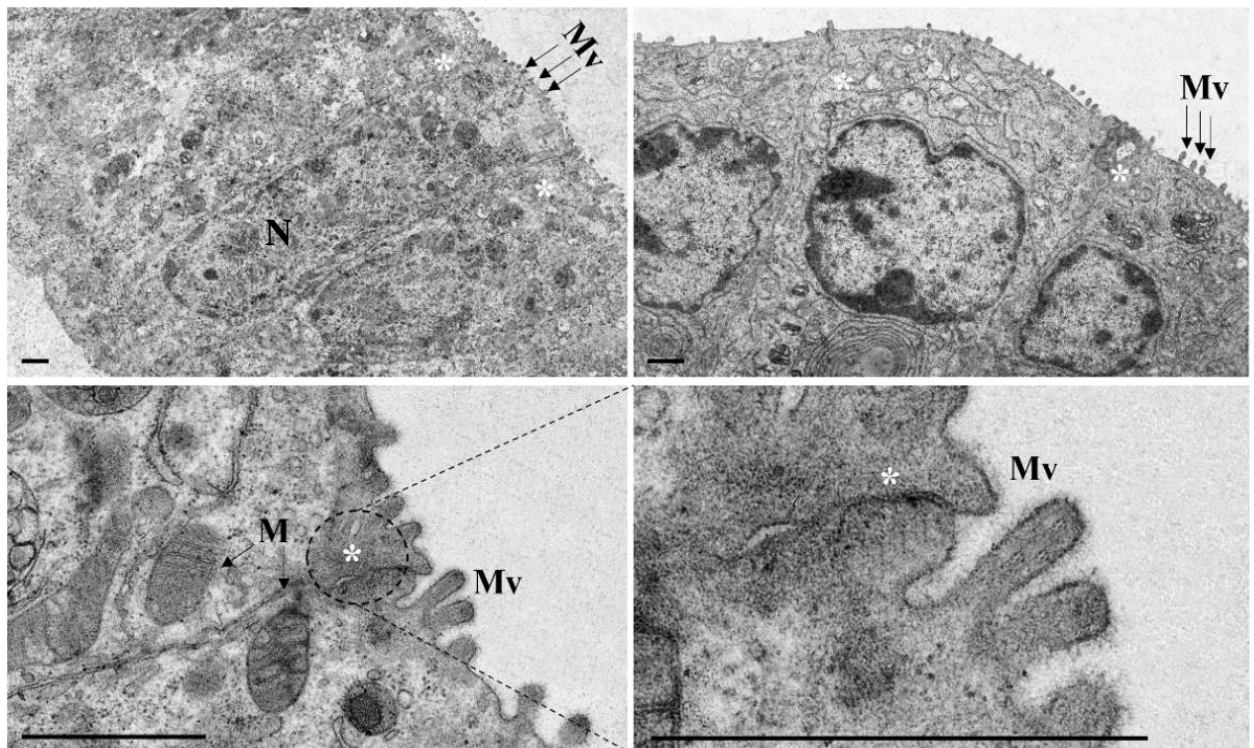
A)



B)



C)



**Fig. 32 Monocapas derivadas de organoides duodenales murinos**  
Abreviaturas: M: Mitocondrias, Mv: microvellosidades, N: Núcleo, \*: Uniones estrechas

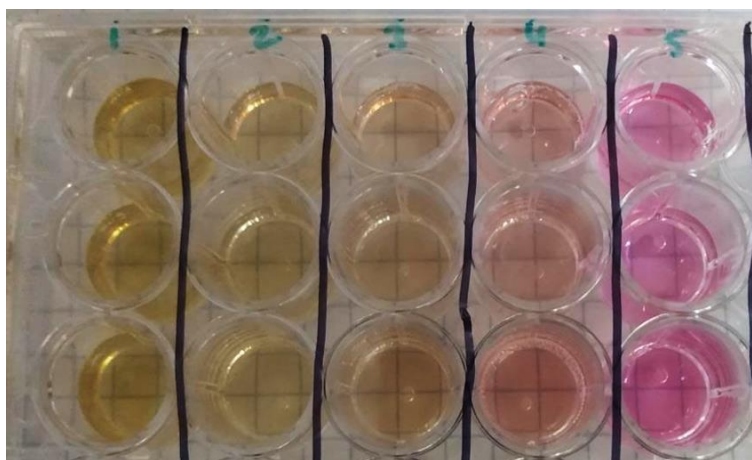
## Infección de monocapas derivadas de organoides murinos en ALI con trofozoítos de *G. intestinalis*

Después de la caracterización de la monocapa, las células derivadas de organoides duodenales murinos en el sistema ALI, se infectaron durante 24h con trofozoítos del parásito *G. intestinalis* de la cepa IMSS:1, derivada de un paciente sintomático de giardiasis.

Previo a infectar las células polarizadas, se realizó un ensayo de viabilidad y crecimiento del parásito en cinco combinaciones de medio de cultivo (Tabla 13). Por triplicado, se sembraron 100,000 trofozoítos por pozo en placas de cultivo de 24 pozos (Fig. 33) y se cultivaron por 24 y 48 horas.

**Tabla 13. Composición de los medios utilizados para el establecimiento de la infección en células polarizadas en ALI**

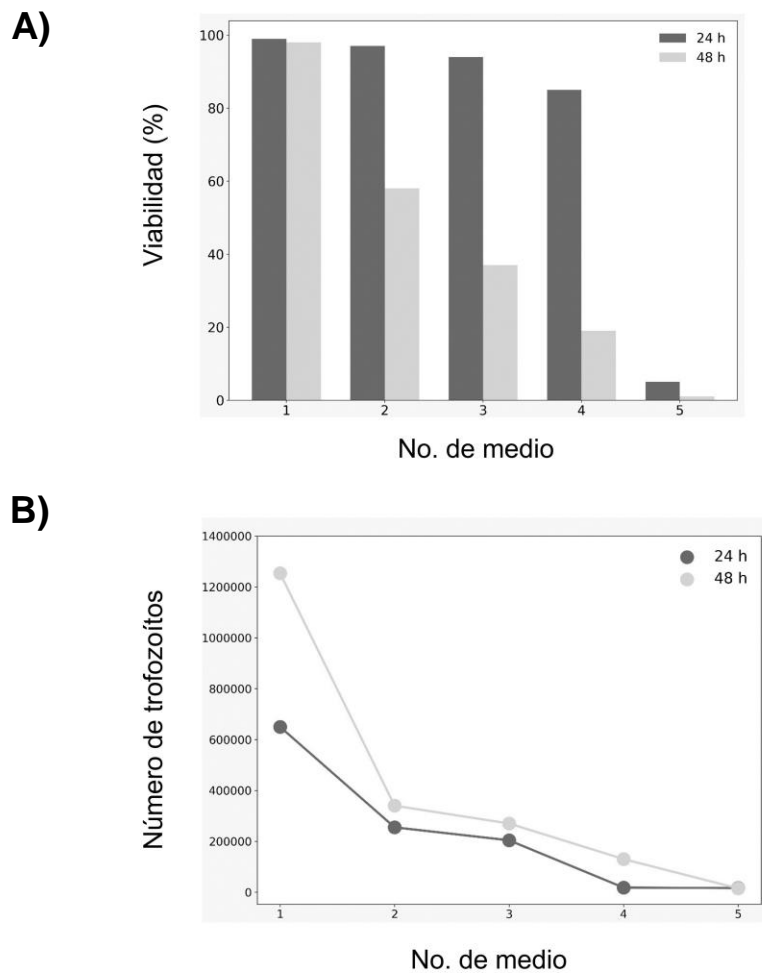
Medio	Proporción	Composición
1	100%	Medio TYI-S33 <i>G. intestinalis</i>
2	2:1	Medio <i>G. intestinalis</i> / medio ALI murino
3	1:1	Medio <i>G. intestinalis</i> / medio ALI murino
4	1:2	Medio <i>G. intestinalis</i> / medio ALI murino
5	100%	Medio ALI murino



**Fig. 33 Test de medios para los trofozoítos de *G. intestinalis* antes de infectar las células duodenales**

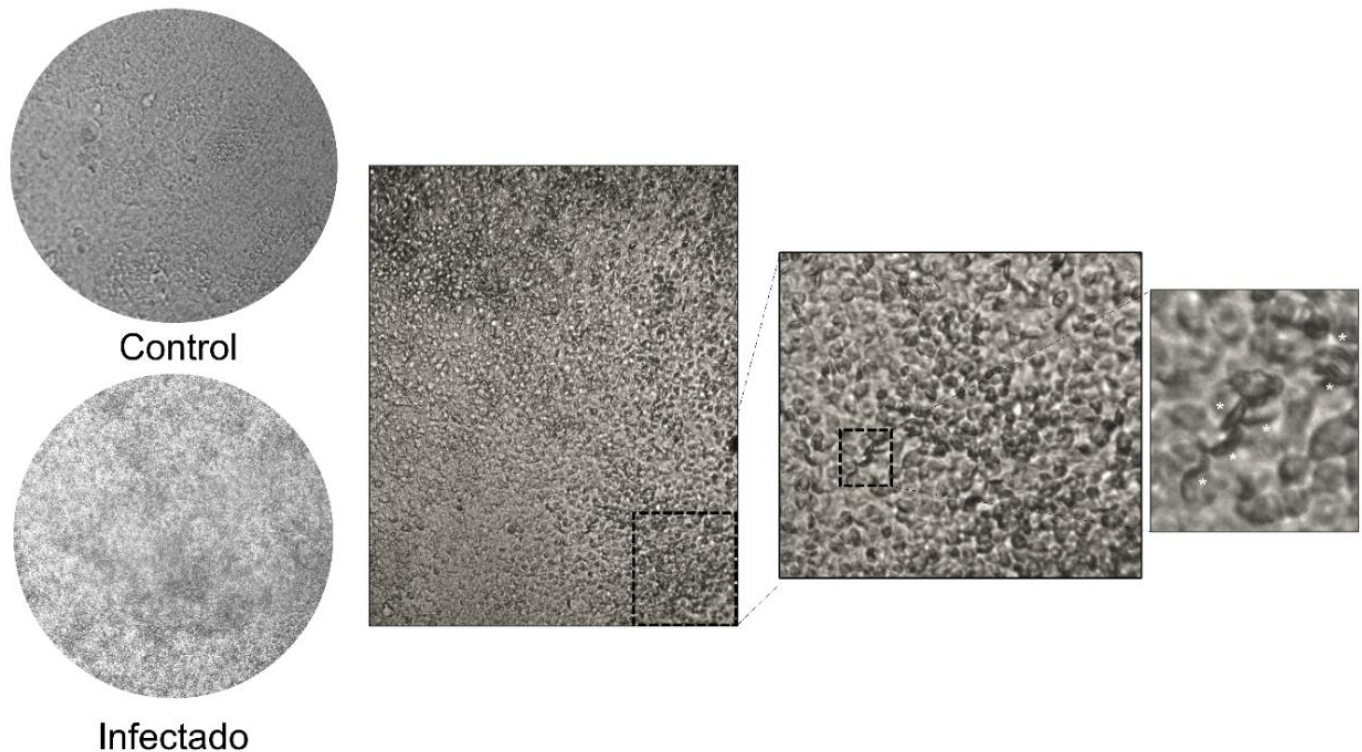
La combinación número tres que corresponde a la proporción 1:1 entre el medio de cultivo de *G. intestinalis* y el medio ALI, fue elegida para el establecimiento de la infección en las células duodenales, debido a que no existieron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de viabilidad, ni al número de trofozoítos (Fig. 34 A y B, respectivamente).

Además, la combinación que corresponde a 50% para cada uno de los medios, no comprometería ni al parásito ni a las células epiteliales. La infección se estableció únicamente por 24 horas, debido a que, a las 48 horas, el porcentaje de viabilidad y el número de trofozoítos tuvieron un decremento significativo (Fig. 34 A y B).



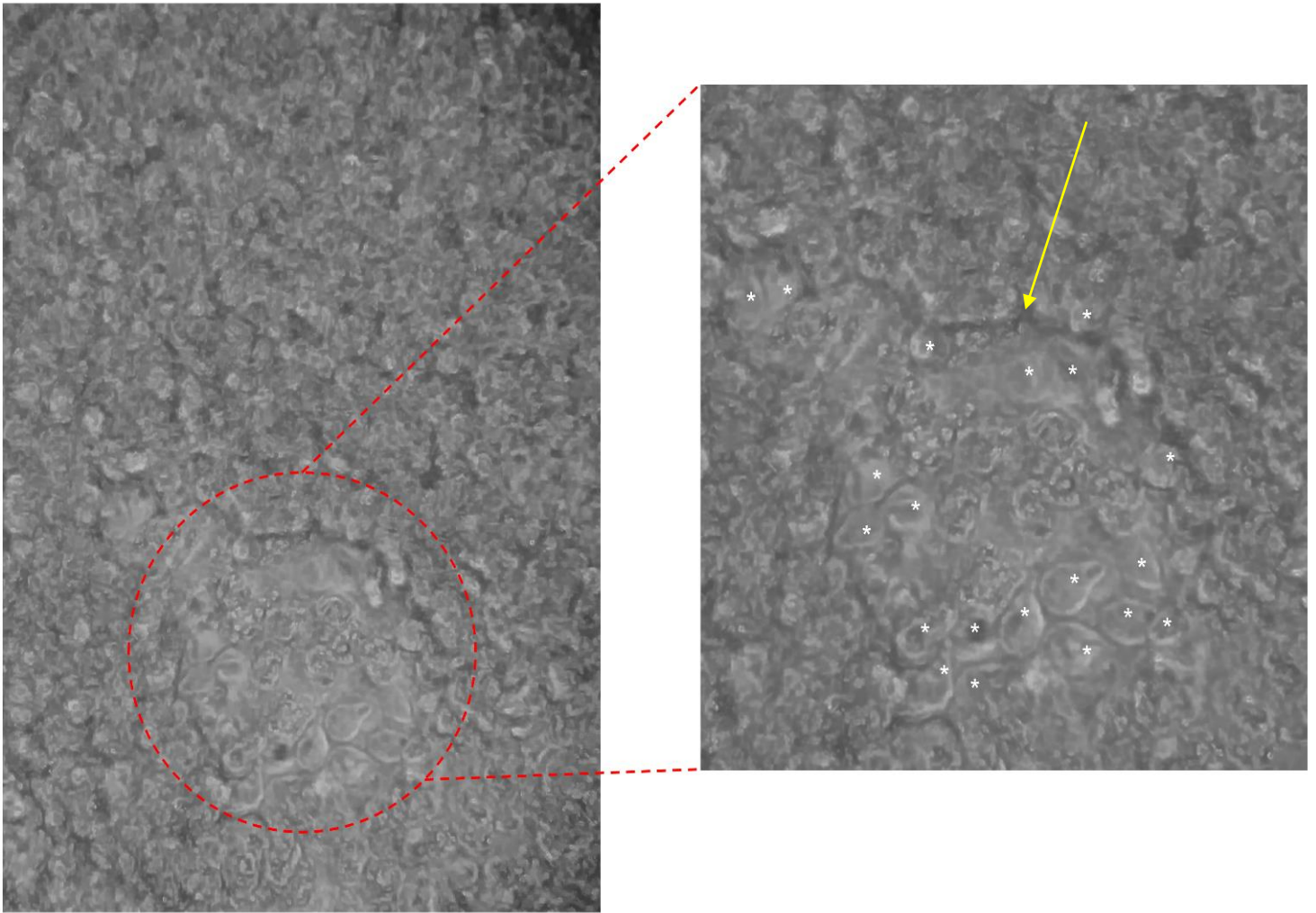
**Fig. 34 Gráficas de porcentaje de viabilidad y crecimiento de trofozoítos de *G. intestinalis* en diferentes medios de cultivo antes de infectar las células duodenales**

Una vez que se eligió el medio de cultivo para el establecimiento de la infección, se sembraron tres trofozoítos por cada célula epitelial (proporción 3:1), resuspendidos en 500  $\mu$ l del medio número 3 (Tabla 13), sobre la parte apical de monocapas derivadas de organoides duodenales murinos que llevaban 10 días en cultivo ALI. La infección se realizó por 24h a 37°C (Fig. 35).



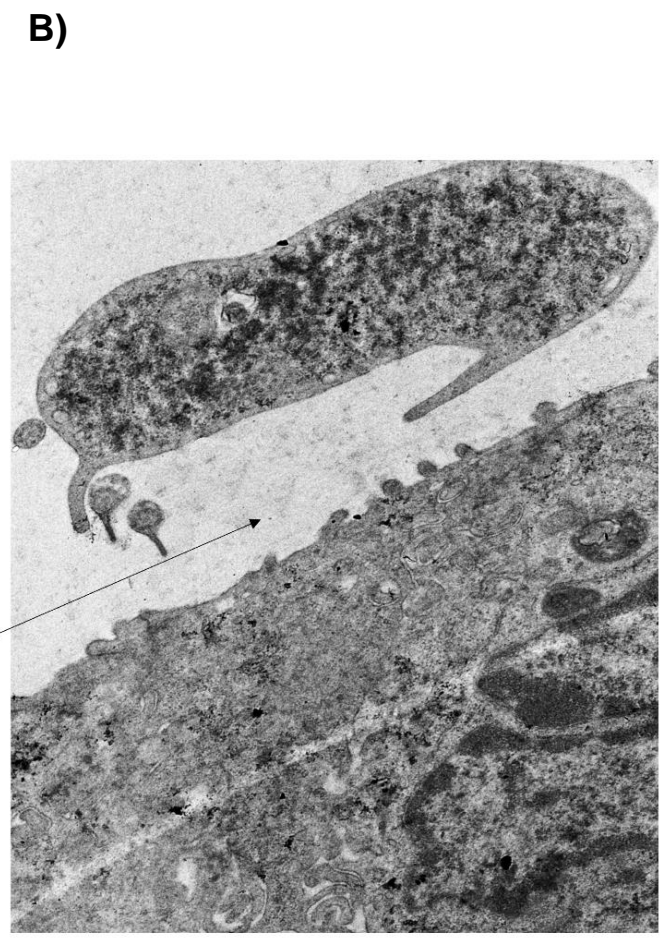
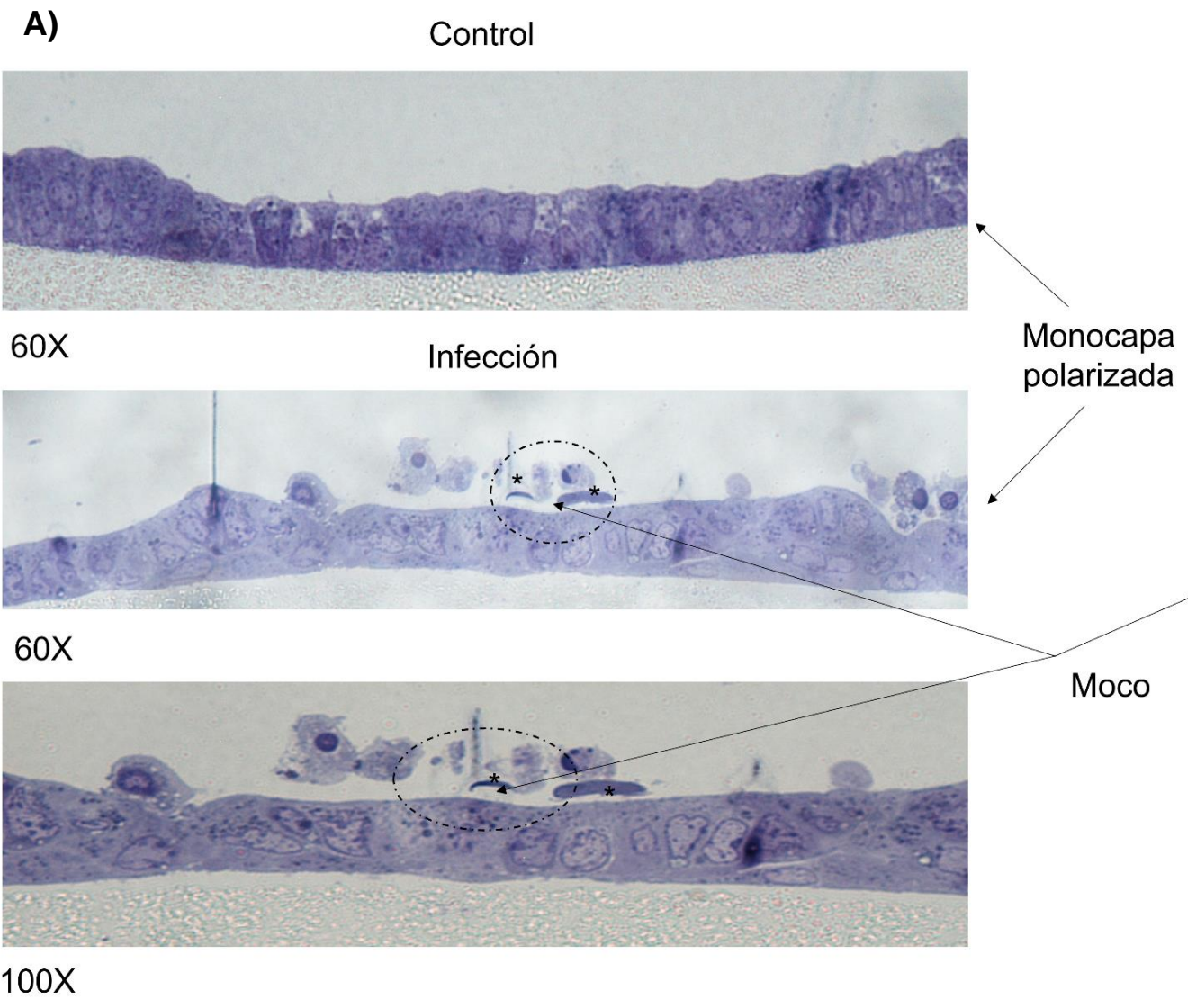
**Fig. 35 Infección de monocapas derivadas de organoides duodenales infectadas con trofozoítos de *G. intestinalis***

Cambios morfológicos en la monocapa y en el parásito se observaron después de 24h de infección. Una vez que se retiró el medio de infección que contenía a los parásitos, se analizaron las monocapas derivadas de organoides. Primero, por microscopía convencional, se observó una clara alteración de la monocapa de células duodenales y la formación de huecos en la parte apical de la monocapa, que se observan resaltados en la Fig. 36.



**Fig. 36 Formación de huecos en la monocapa después de la infección con trofozoítos de *G. intestinalis***  
(Trofozoítos resaltados con asteriscos blancos y el hueco con flecha amarilla)



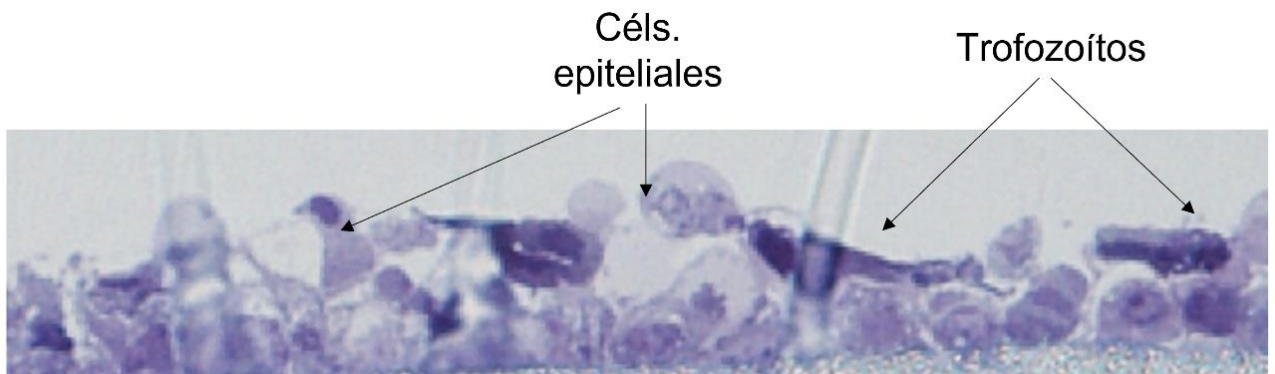


**Fig. 37** Infección de *G. intestinalis* en monocapas derivadas de organoides murinos

Posteriormente, las monocapas tanto en condiciones sin infectar como infectadas, se procesaron para su análisis por microscopía electrónica de transmisión. Se realizaron cortes semifinos que fueron teñidos con azul de Toluidina y se observó la polarización de la monocapa en ambas condiciones (Fig. 37 A).

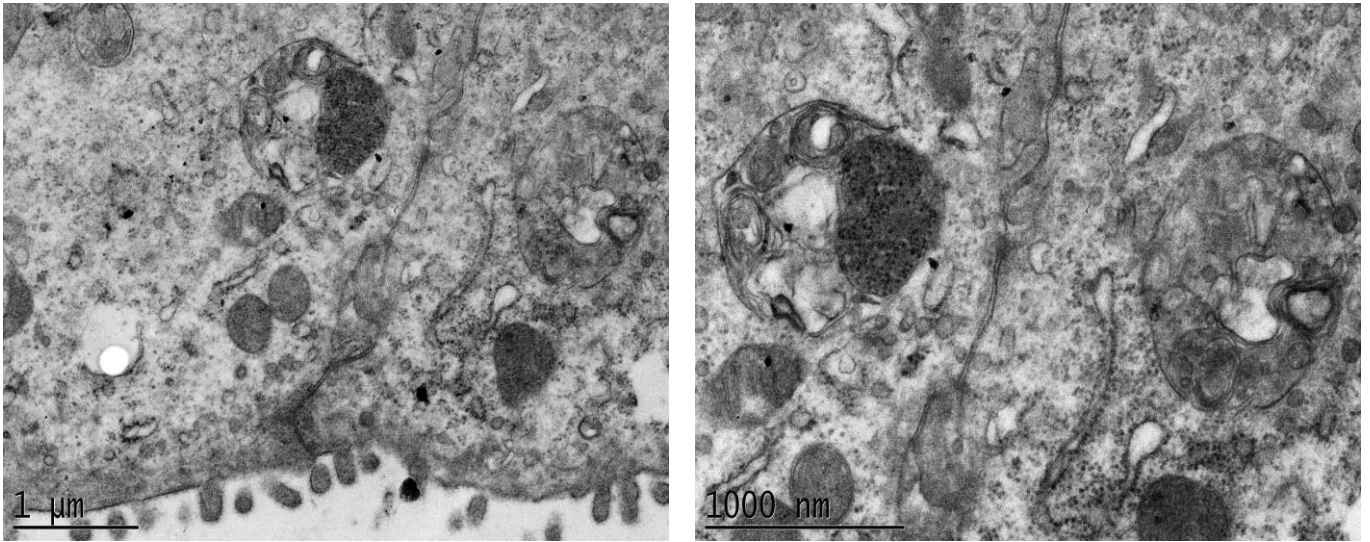
En las monocapas derivadas de organoides infectadas, los trofozoítos de *Giardia intestinalis* se adhieren a la monocapa, sin embargo, también se pudo apreciar que muchos de ellos quedan “flotando” por encima de las células epiteliales, lo que podría sugerir la presencia de moco, que es una de las barreras que el parásito tiene que superar para poder adherirse a las células (Fig. 37 A y B).

En comparación con la monocapa control, en las células infectadas se puede apreciar una aparente desorganización y desprendimiento de células por la presencia del parásito (Fig. 38).



**Fig. 38** Daño en la monocapa derivada de organoides, tras la infección con *G. intestinalis*

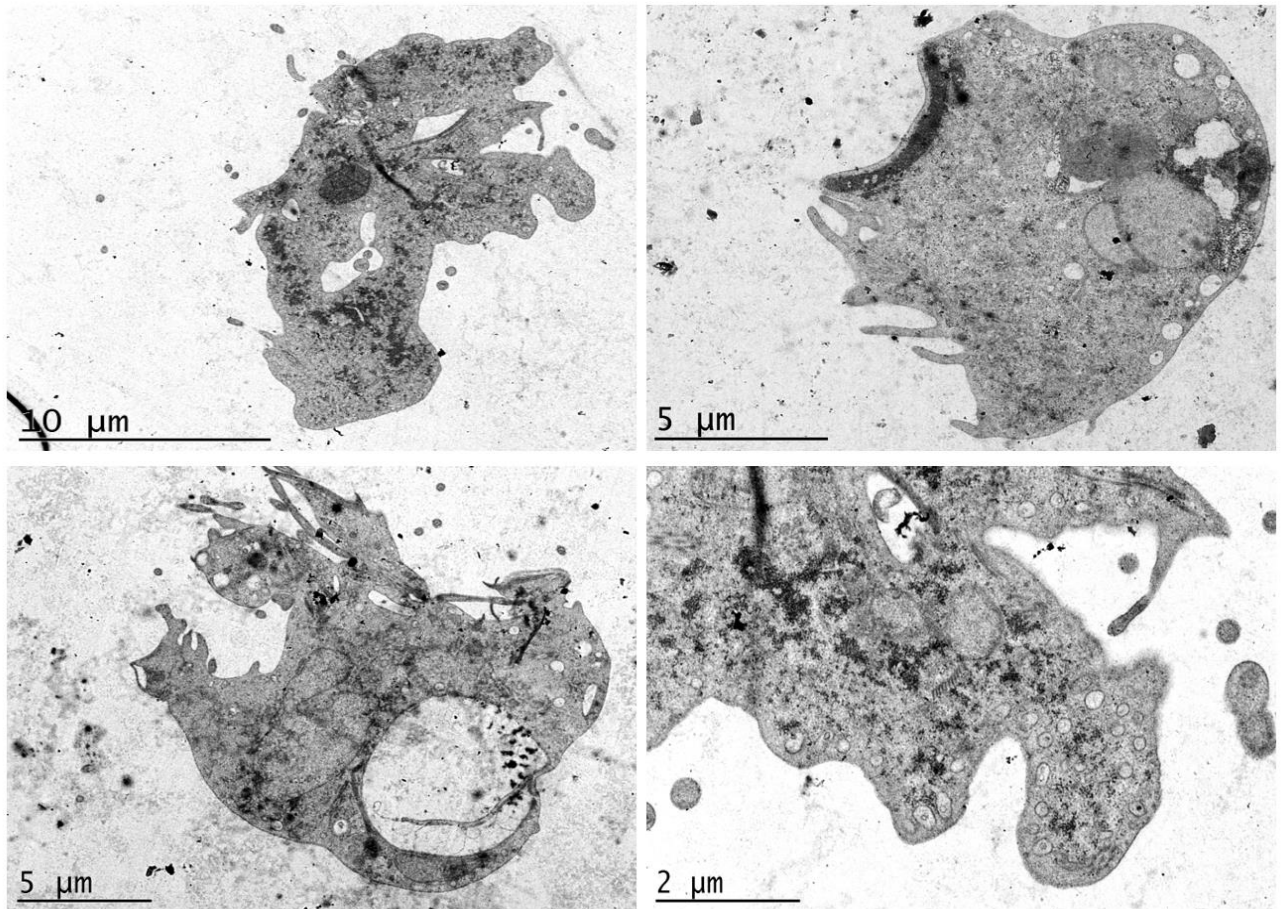
Por MET, fue posible apreciar el daño en la organización interna de las células epiteliales tras la infección. Asimismo, se observó un desarreglo de la monocapa, así como un evidente desprendimiento de las células epiteliales (Fig. 39).



**Fig. 39 Daño en las células epiteliales de la monocapa derivada de organoides, tras la infección con *G. intestinalis***

Después de la infección, se recuperó el medio en el que los trofozoítos se añadieron a las células epiteliales y se centrifugó para observar la pastilla celular por microscopia electrónica de transmisión. Tras su paso por las monocapas, algunos trofozoítos sufren un daño morfológico muy aparente (Fig. 40).

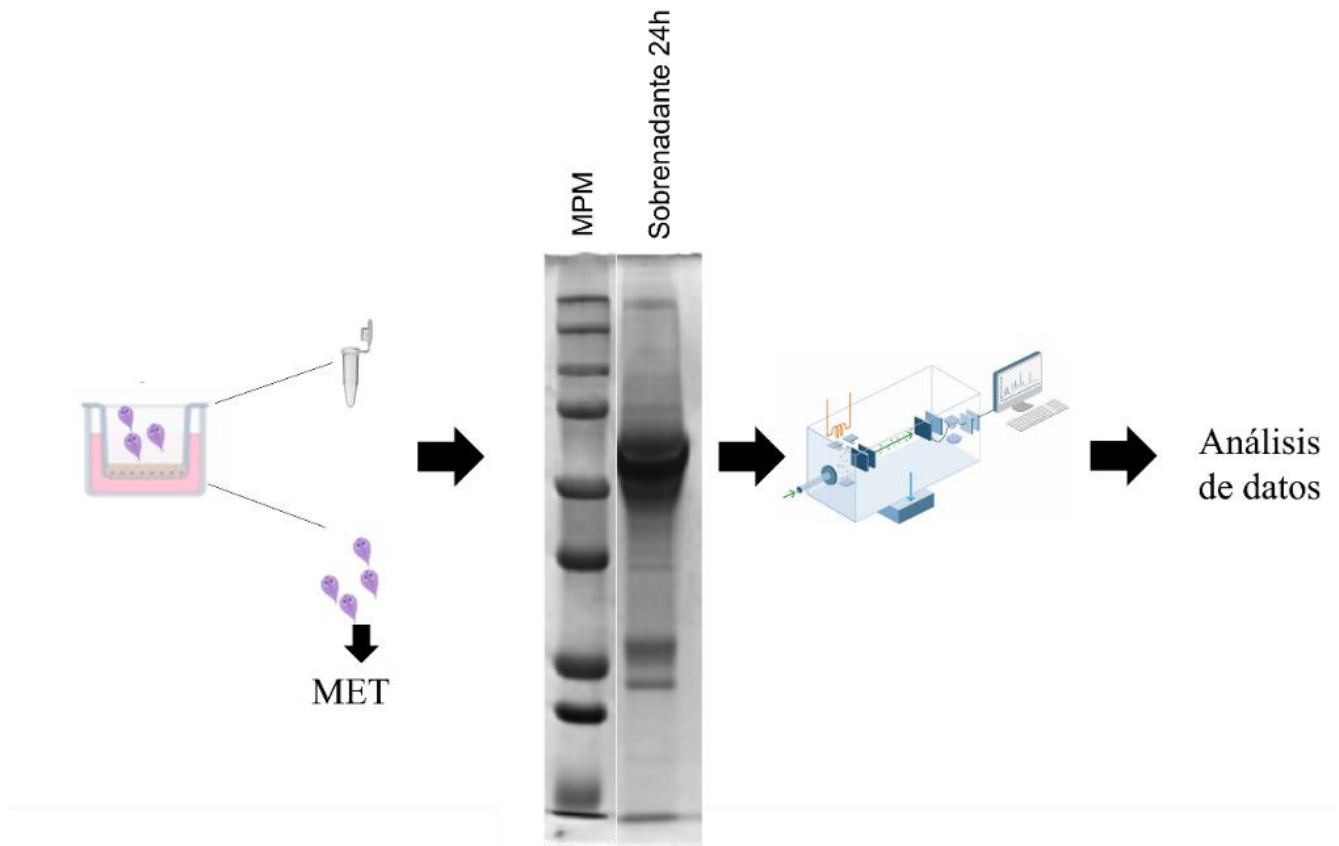
Los trofozoítos se observan ensanchados y fue posible apreciar algunas vesículas apoptóticas. Además, en algunos parásitos se observa la formación de vesículas similares a las que aparecen en el proceso de enquistamiento *in vitro*, lo que pudiera sugerir que, bajo estas condiciones experimentales, se podría estar induciendo dicho proceso.



**Fig. 40 Trofozoítos de *G. intestinalis* recuperados de las monocapas derivadas de organoides después de 24 h de infección.**

### **Análisis preliminar de las proteínas inducidas después de la infección de monocapas derivadas de organoides con trofozoítos de *G. intestinalis***

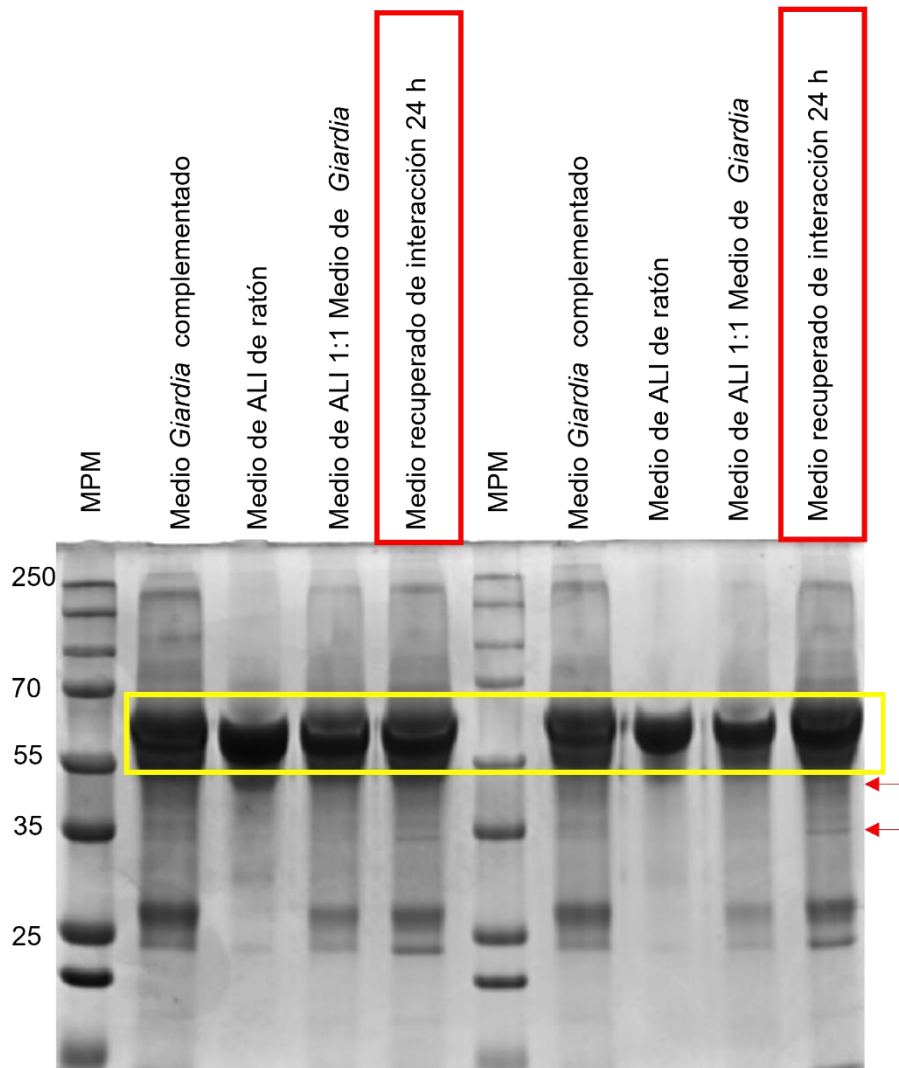
El sobrenadante recuperado después de la infección de las monocapas fue analizado por la técnica de espectrometría de masas (Fig. 41). El sobrenadante fue sometido a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%, que fue teñido con azul de Coomassie, para observar el perfil de proteínas. Algunas bandas se cortaron para ser analizadas en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del LANSE, en el Cinvestav.



**Fig. 41 Esquema de trabajo para espectrometría de masas**

Para el desarrollo de este experimento, se corrieron diferentes medios de cultivo: medio de cultivo de *G. intestinalis* complementado con cuero bovino adulto, medio de cultivo de ALI de ratón, combinación de medios en proporción 1:1 del medio del parásito y del medio ALI y, por último, el medio recuperado de la parte apical del filtro tras la infección de las monocapas derivadas de organoides con trofozoítos del parásito.

Lo anterior con la finalidad de poder comparar los perfiles proteicos en las mismas condiciones de electroforesis y poder evaluar si los perfiles eran apropiados para su análisis por espectrometría de masas (Fig. 42).



**Fig. 42 Perfil proteico de los medios evaluados para espectrometría de masas**

En el perfil de proteínas, realizado por duplicado (Fig. 42), fue posible apreciar que hay una marca muy abundante de albúmina, que se encuentra en el peso de 67kDa (recuadro amarillo); esta proteína es un indicativo de la presencia de componentes del medio que pudieran obstruir la detección de la señal de proteínas resultantes de la interacción entre el parásito y las células derivadas de organoides. A pesar de ello, las bandas correspondientes al medio recuperado de la infección fueron cortadas y enviadas para su análisis por espectrometría de masas.

Cabe señalar, que aun con la presencia de proteínas provenientes del medio, fue posible detectar proteínas que únicamente aparecen en el perfil de corrida de los medios recuperados tras la infección, señalados en la figura 41 con flechas rojas, por lo que este primer experimento nos daría un panorama preliminar de la infección en este modelo.

Los carriles correspondientes a la interacción entre el parásito y las células epiteliales fueron cortados y procesados por el encargado del espectrómetro de masas, quien a su vez cortó las secciones del gel, en cuatro porciones más pequeñas para poderlas ingresar al equipo de espectrometría. En total, recibimos 16 archivos de Excel, correspondientes a las lecturas del equipo de las bandas recortadas del perfil proteico en bruto y la comparación de nuestros resultados con las bases de datos correspondientes.

Para el análisis de los datos, se nos recomendó seguir la cronología que se describe a continuación, con la finalidad de depurar los archivos y quedarnos con la información más relevante:

1. En cada archivo de Excel, poner un filtro y empezar a filtrar por columnas.
2. La primer columna que se filtró fue "protein. AutoCurate" y se eligieron únicamente aquellas que son verdes (mayor a 95% de confiabilidad). Las amarillas son de 50-95% y rojas abajo de 50%, por lo que se descartaron
3. Después, se filtró la columna de "protein. top3MatchedPeptideIntenSum" y se eliminaron todas aquellas proteínas que con valor "0" ya que estas son proteínas que comparten péptidos con alguna ya identificada pero no tiene algún péptido único para asegurar que esté correcta la identificación (posibles isoformas).
4. Después, se filtra la columna "protein. dataBaseType" y consideraron únicamente las asignadas como "Regular", ya que las "Reversed" refieren a falsos positivos.
5. Al final las proteínas que quedan filtradas se copiaron en un archivo de Excel nuevo y corresponde a las proteínas identificadas y curadas.

Después de realizar el análisis recomendado, los resultados del espectrómetro se compararon con la base de datos del parásito y con la base de datos de *Bos taurus*, para identificar las proteínas que pudieran pertenecer al medio de infección. También se compararon con la base de datos de *Mus musculus*, para identificar las proteínas expresadas por las células epiteliales. En la tabla 14 se muestran los resultados depurados para la comparación de los datos obtenidos de la interacción con la base de datos de *G. intestinalis*.

**Tabla 14. Resultados del análisis de espectrometría de masas identificados para *G. intestinalis***

<b>Número de acceso</b>	<b>Descripción de la proteína</b>
A0A644F4V1_GIAIC	Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_0060606 PE=4 SV=1
A0A644F3T1_GIAIC	Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_004708 PE=4 SV=1
A0A644F276_GIAIC	Kinase_ NEK OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_0041369 PE=4 SV=1
A8BX07_GIAIC	Cathepsin B OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_16160 PE=3 SV=1
A8BVM3_GIAIC	Cathepsin B OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_0016779 PE=3 SV=1
A8BTG7_GIAIC	Cathepsin B OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_0014019 PE=3 SV=1
A0A644F4Y3_GIAIC	Cathepsin B OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_0016160 PE=3 SV=1
A8BKU9_GIAIC	Uncharacterized protein OS=Giardia intestinalis (strain ATCC 50803 / WB clone C6) OX=184922 GN=GL50803_0016926 PE=4 SV=1



El análisis de espectrometría de masas revela la presencia de 46 proteínas de *B. Taurus* y 70 proteínas de *M. musculus* (ver tablas en material suplementario 2) en el sobrenadante de las monocapas infectadas por *G. intestinalis* durante 24 h.

En cambio, se identificaron únicamente ocho proteínas del parásito, de las cuales sólo se identifica a la cinasa NEK (A0A644F276\_GIAIC) y a la catepsina B; el resto se refieren como proteínas no caracterizadas. Estos resultados preliminares nos ayudan a establecer los parámetros que hay que corregir en futuros experimentos, como la purificación de los sobrenadantes por medio de columnas, para identificar más proteínas provenientes del parásito.

## Discusión

Los cultivos celulares bidimensionales (2D) son una plataforma sencilla, rápida y accesible para la realización de experimentos *in vitro*, en comparación con los modelos *in vivo*. Sin embargo, no replican de manera fehaciente las características de los epitelios, lo cual limita la interpretación de los resultados obtenidos (Baker & Chen, 2012; Kapałczyńska et al., 2016).

Los cultivos tridimensionales son una de las herramientas biotecnológicas más novedosas para el estudio y modelado de enfermedades infecciosas y degenerativas. Su complejidad estructural y variedad celular están íntimamente relacionadas con la función biológica que puedan representar *in vitro* (Clevers, 2016).

La clave del éxito de estos modelos fue la implementación de protocolos para el aislamiento de células madre adultas, así como la identificación de los factores de crecimiento indispensables para su crecimiento e inducción a diferenciarse durante largos periodos de tiempo (Alhaque et al., 2018; Sato et al., 2009).

Aunado a ello, el uso de matrices o *scaffolds* como soporte para el crecimiento de las células en una tercera dimensión (Hughes et al., 2010; Panek et al., 2018) tienen un impacto directo en la viabilidad, migración, proliferación, adherencia y diferenciación. Si bien existen muchos tipos de matrices, destacan por su utilidad las cerámicas, polímeros sintéticos o naturales, pero sobre todo, las que derivan de componentes de matriz extracelular, siendo el matrigel el “estándar de oro” para el desarrollo de cultivos tridimensionales (Charwat & Egger, 2018; Hughes et al., 2010).

Para el desarrollo en tres dimensiones, debe lograrse un complejo balance entre las condiciones de cultivo (factores de crecimiento y medios de cultivo), la matriz que le dará soporte al tejido (principalmente matrigel y colágeno), y por

supuesto, las células a partir de las cuales se desarrollará el cultivo 3D (Baker & Chen, 2012; Gjorevski et al., 2016; Sakalem & Ribeiro-Paes, 2018).

Actualmente existe una gran cantidad de modelos tridimensionales (Fig. 5 y Tabla 5), que se han ido sofisticando al introducir variaciones en el número y concentración de requerimientos esenciales, lo que ha permitido optimizar su funcionamiento y aplicación (Alhaque et al., 2018).

Uno de los ejemplos más destacados de estos modelos son los organoides derivados de células madre adultas, que al ser inducidas por factores de crecimiento específicos, son capaces de organizarse, renovarse y diferenciarse de forma similar al tejido de origen (Clevers, 2016; Lu et al., 2021; Sato, Stange, et al., 2011). La elección de los factores de crecimiento es uno de los puntos clave, ya que aportarán los recursos nutricionales que serán adicionados al medio de cultivo enriquecido, lo que permitirán crecer y mantener las células madre adultas *in vitro* (Almeqdadi et al., 2019; Kaushik et al., 2018).

Existe amplia literatura sobre los medios de cultivo más exitosos para el establecimiento de los cultivos de organoides de distintos tipos celulares humanos y de otros animales (Fig. 4). La composición de los medios de cultivo es específica para cada tipo celular y para cada organismo, y su selección se basa en las principales vías de señalización involucradas en el crecimiento, diferenciación y proliferación de las células en los tejidos de origen. Por ejemplo, para los cultivos de organoides del sistema nervioso, el medio base es conocido como neuro basal, el cual debe ser enriquecido con aminoácidos no esenciales, ácido retinoico, factor de crecimiento epidérmico (EGF), Rspo-1 y Noggin; mientras que el medio para el desarrollo de organoides de intestino, se basa en medio DMEM/F12 enriquecido con EGF, Rspo-1, Noggin y Wnt (Almeqdadi et al., 2019; Kaushik et al., 2018).

La composición final de los medios enriquecidos puede variar dependiendo de los requerimientos de las células (células de humano o de ratón, por ejemplo), el tipo de muestra (biopsias o resección de tejido) y las condiciones de trabajo de cada laboratorio, lo que incrementa la variabilidad entre réplicas experimentales. Por lo anterior, la fase de estandarización de reactivos y optimización de los

cultivos es crucial para obtener resultados robustos y reproducibles, ya que pequeñas modificaciones en la elaboración de los medios enriquecidos o cambios en los protocolos pueden afectar directamente la tasa de diferenciación de la células, su composición o incluso, que los cultivos mueran (Holthaus, Delgado-Betancourt, et al., 2021; Urbischek et al., 2019).

Para este trabajo doctoral, la fase de estandarización se realizó durante una estancia de un año en el *Max Planck Institute for Infection Biology* en Berlín, Alemania, bajo la dirección del Dr. Thomas Meyer y la Dra. Gabriela Vallejo. En el Instituto se trabajó con proyectos relacionados con el establecimiento de modelos 3D para el estudio de cáncer gástrico producido por la bacteria *H. pylori*. Además, se aprendió sobre el desarrollo de modelos de mucosoides duodenales, utilizados para el análisis de la respuesta inmunológica que despierta la infección con la bacteria. La incursión en ambos proyectos sirvió para el entrenamiento en el desarrollo y establecimiento de cultivos 3D para el estudio de infecciones.

Asimismo, durante la estancia de investigación se estandarizaron las condiciones iniciales de cultivo para células duodenales tanto de ratón como de humano, con base en la combinación de métodos previamente publicados. Dichas condiciones, fueron aplicadas en nuestro laboratorio una vez terminado el proceso de entrenamiento (Boccellato et al., 2018; Sato et al., 2009; Sato, Stange, et al., 2011; Schlaermann et al., 2016).

Para los medios de cultivo enriquecidos, decidimos utilizar los factores de crecimiento: EGF, involucrado en la proliferación celular (Abud et al., 2021), FGF para el mantenimiento de la autorrenovación de las células madre adultas (Boonekamp et al., 2019; Gehart & Clevers, 2019), el inhibidor de TGF- $\beta$ , ALKL-4, esencial durante la diferenciación y proliferación de células epiteliales (Kardia et al., 2021), Noggin, involucrado en el mantenimiento de la “stemness”, previniendo la diferenciación a corto plazo (Gehart & Clevers, 2019), *Rock Inhibitor*, indispensable para el mantenimiento de los cultivos de largo término y protección de las células madre después de su extracción (Gehart & Clevers, 2019; Kardia et al., 2021).

Los factores previamente mencionados, se añadieron a un medio condicionado elaborado con sobrenadantes de Wnt y Rspo-1, que son esenciales para el mantenimiento de células madre después de su extracción, así como para la inducción de diferenciación celular (de Lau et al., 2012; Gehart & Clevers, 2019; Kardia et al., 2021; J. Li et al., 2018; Middendorp et al., 2014; Powell & Behnke, 2017; Schlaermann et al., 2016).

La producción de sobrenadantes que contienen los factores de crecimiento Wnt, Rspo-1, Noggin o los tres factores en conjunto (WNR) ayudan a reducir los costos durante las etapas iniciales del establecimiento de los cultivos tridimensionales. Para la producción de estos factores, se expanden y cultivan las líneas celulares productoras de los mismos. Los factores se recuperan en el sobrenadante, que es purificado y probado antes de su adición a los cultivos tridimensionales (Figs. 12 y 13).

Una desventaja del uso de medios condicionados es que aumenta la variabilidad en los resultados, principalmente al cambiar de un lote de producción a otro; sin embargo, su utilización es cada vez mayor debido que son significativamente más baratas que los factores de crecimiento purificados que pueden ser adquirido de manera comercial (Holthaus, Delgado-Betancourt, et al., 2021; Kardia et al., 2021; Powell & Behnke, 2017; VanDussen et al., 2019).

Una de las ventajas de los sobrenadantes que contienen factores de crecimiento, es que cada lote puede servir para diversos cultivos, como en este proyecto, donde un solo lote de medio condicionado de Wnt (-700ml) y un lote de sobrenadante de Rspo-1 (-800ml) fueron suficientes para el crecimiento de organoides duodenales humanos, cultivo ALI humano, cultivo de organoides duodenales murinos de largo término y el desarrollo de monocapas derivadas de organoides en ALI, con y sin infección con el parásito.

La actividad de los sobrenadantes producidos fue cuantificada mediante la intensidad de fluorescencia, utilizando una línea celular reportera (HEK-293t).

Se probaron ambos sobrenadantes de manera independiente, mostrando que, el sobrenadante de Wnt3a, tiene una mayor actividad cuando se utiliza al 50% en el medio (Fig. 12), mientras que el que corresponde a Rspo-1, presenta una mayor actividad desde porcentajes muy bajos, como el 10%, por lo que se decidió usar esos porcentajes para los medios de cultivos de organoides a desarrollar. Estas características de los sobrenadantes, ya habían sido probadas y utilizadas por otros autores (Levin et al., 2020; Schlaermann et al., 2016; Yi Wang et al., 2019)

Teniendo las condiciones de cultivo establecidas en los laboratorios, es posible desarrollar diferentes tipos de cultivos tridimensionales. En este trabajo, primero desarrollamos organoides duodenales humanos a partir de biopsias tomadas a cuatro pacientes. Solamente de una de las biopsias pudieron extraerse células madre adultas que soportaron las condiciones de cultivo establecidas y estandarizadas, logrando así que se diferenciaron en organoides duodenales (Figs. 14 y 15).

Desafortunadamente, los organoides duodenales humanos sólo se mantuvieron durante tres pases, equivalentes a 21 días en cultivo. Este resultado fue muy alentador, ya que, como se ha descrito, existen numerosas variables que dificultan el desarrollo de organoides y en nuestro caso tuvimos éxito en el primer intento. Aunque no pudo establecerse un cultivo de largo término, se lograron definir las condiciones iniciales de cultivo para desarrollar organoides que exhiben características muy similares a los organoides duodenales reportados en la literatura (Figs. 16-19) (Dye et al., 2019; Kasendra et al., 2018; Sato, Stange, et al., 2011).

A partir de estos organoides se establecieron monocapas derivadas de organoides, crecidas en el sistema de *Air-liquid interface* (ALI) que muestran polarización y compartimentalización similares al tejido del que originaron, características que se corroboraron mediante microscopía electrónica de transmisión (Figs. 16-19).

Ambos desarrollos, organoides duodenales humanos y monocapas derivadas de organoides duodenales humanos en el sistema ALI, representan los primeros cultivos de este tipo de muestras provenientes de pacientes mexicanos.

Por otra parte, se establecieron cultivos de organoides duodenales de ratón. Estos cultivos han sido ampliamente desarrollados y caracterizados en la literatura, en particular, los organoides murinos que derivan de células madre adultas. En el caso de las células madre intestinales, ha sido ampliamente estudiada la capacidad que tienen de generar unidades de cripta-vellosidad, bajo condiciones de cultivo óptimas, aptitudes que han sido explotadas para el desarrollo de cultivos tridimensionales *in vitro* a largo plazo. Lo anterior, debido a que conservan las características intrínsecas de las poblaciones nativas del intestino y que además, pueden diferenciarse en todos los tipos de células intestinales (Angus et al., 2020; Barker, 2014; Barker, Huch, Kujala, Wetering, et al., 2010; Sato, van Es, et al., 2011; Tian et al., 2011).

Para el establecimiento de los organoides duodenales de ratón, se obtuvieron células madre adultas de ratones CD1, mismas que fueron diferenciadas en organoides (Fig. 21). Inicialmente, se realizó una prueba de medios de cultivos, donde se probaron y combinaron los diferentes componentes esenciales de medios previamente reportados, para evaluar en cuál combinación se desarrollaban de mejor manera nuestros organoides murinos (Tabla 12).

La elección de las combinaciones probadas para este ensayo fue realizada con base en lo publicado por diversos autores (Sato, Stange, et al., 2011; Schlaermann et al., 2016; Urbischek et al., 2019). Bajo nuestras condiciones de cultivo, el medio con base en Wnt 50% y R-spond-1 10%, resultó ser el medio de cultivo ideal para el crecimiento de organoides duodenales de ratón, condiciones que fueron monitoreadas por al menos cinco semanas consecutivas (Figs. 22 y 23). Una vez establecidas estas condiciones de cultivo, se procedió con la caracterización del modelo tridimensional por diferentes métodos.

Una manera de confirmar la presencia de poblaciones nativas en los organoides es mediante la identificación de marcadores epiteliales. En los organoides de intestino delgado se han utilizado diversos marcadores para todas las poblaciones que conforman esta porción del intestino delgado; por ejemplo, para la identificación de células madre se ha usado Lgr5, Olfm4+, CD24+ o SOX9 (Barker et al., 2008; Becker et al., 2008; Formeister et al., 2009; Gracz et al., 2010; Pierzchalska et al., 2012; Roche et al., 2015; Sato et al., 2009; Sato, van Es, et al., 2011; van der Flier et al., 2009).

Las células proliferativas han sido representadas principalmente mediante la identificación de antígeno nuclear de proliferación celular o PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Gonzalez et al., 2013), mientras que la expresión de EPCAM (del inglés *epithelial cell adhesion molecule*) está restringida a la expresión de epitelios con enterocitos maduros (Trzpis et al., 2007) y la villina 1 es el marcador típico de filamentos de actina microviliares, localizados en la parte apical del intestino delgado en los enterocitos maduros (Yuli Wang, Gunasekara, Reed, et al., 2017; West et al., 1988). En este trabajo identificamos las poblaciones típicas del intestino delgado en los organoides duodenales murinos utilizando la secuencia de los siguientes marcadores por PCR punto final y por qPCR (Tabla 15).

**Tabla 15 Marcadores de poblaciones celulares del intestino delgado**

<b>Población</b>	<b>Marcadores</b>	<b>Marcador utilizado en este trabajo</b>	<b>Referencias</b>
Células madre	Lgr5, Olfm4+, CD24+, SOX9	SOX-9	González et al., 2013, Mori-Akiyama et al., 2007
Células proliferativas	PCNA	PCNA	González et al, 2013
Enterocitos maduros	EPCAM, villina 1	EPCAM, villina 1	Trzpis et al., 2007, West et al., 1988



Como parte de la caracterización de los organoides murinos establecidos en este trabajo, se realizaron análisis de PCR punto final para confirmar la expresión de diferentes marcadores epiteliales intestinales, tanto en el tejido de origen, como en los organoides desarrollados, verificando que los productos obtenidos durante la corrida se encontraran en el peso molecular esperado (Fig. 25). Adicionalmente, se comparó la expresión de los marcadores entre los organoides desarrollados durante los distintos pases de cultivo establecidos (pase temprano, pase intermedio y pase final), mismos que también se compararon con el tejido de origen (Fig. 26).

Independientemente de las etapas tempranas, intermedias o tardías del cultivo, en todos los organoides se identificaron los productos de amplificación de los distintos marcadores celulares con el peso esperado, lo que confirmó la presencia de los tipos celulares característicos del duodeno.

Para conocer la expresión relativa de cada marcador, se extrajo el RNA de los organoides en las distintas etapas de crecimiento, se sintetizó cDNA y se analizó por qPCR. Los resultados reflejan el proceso de maduración de las tres etapas de crecimiento, ya que, como era de esperar, la expresión de células madre fue mayor en los organoides de pase temprano, mientras que las células proliferativas fueron más abundantes en la etapa intermedia de crecimiento y los enterocitos maduros predominaron en los organoides en etapas tardías de cultivo.

Como primera barrera de selección, las células epiteliales tienen un papel fundamental, tanto estructural como funcional, en la defensa contra patógenos (Shen, 2012; Sugita et al., 2020). La polaridad celular y las funciones epiteliales de barrera son originadas por la presencia de un sistema de uniones intercelulares denominados complejos de unión. Los complejos de unión están formados por la asociación de tres tipos de uniones intercelulares: las uniones estrechas (también conocidas como uniones ocluyentes o *tight junctions*), las uniones de adherencia (forman cinturones de adhesión) y los desmosomas y hemidesmosomas.

Particularmente, las uniones estrechas tienen un papel relevante para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular en los tejidos, con la formación de las caras apical y basolateral, actuando como un sistema dinámico que regula la estructura, proliferación y diferenciación celular, así como la expresión génica, lo que influye directamente en la homeostasis y fisiología de los tejidos (Guttman & Finlay, 2009; Vancamelbeke & Vermeire, 2017; Volynets et al., 2016; Zihni et al., 2016).

En el epitelio intestinal, la impermeabilidad se basa en la presencia de complejos intercelulares de unión formados a nivel apical por uniones estrechas (*Tight junctions*), uniones adherentes (AJ) y desmosomas, todos ellos interactuando con las proteínas del citoesqueleto (Guttman & Finlay, 2009). Las claudinas son proteínas fundamentales de las uniones estrechas, ya que constituyen una barrera en la membrana que impide la migración de lípidos y proteínas transmembranales desde el compartimento apical al basolateral, siendo un elemento clave en la polaridad de los enterocitos (Zihni et al., 2016).

Por las razones expuestas, la polaridad del epitelio intestinal y su función de barrera debe poder ser reproducido en los cultivos tridimensionales, para utilizarlos como modelos fidedignos que representen las características de los tejidos *in vitro*. Se ha reportado que los cultivos derivados de células madre, como los organoides o las monocapas derivadas de organoides, tienen polaridad celular y características de barrera, tal como ocurre en los tejidos epiteliales (Bardenbacher et al., 2019; Yano et al., 2017).

En este trabajo se confirmó que los organoides duodenales desarrollados expresaron: E-caderina, como representante de las uniones adherentes (Fig. 28), ocludina un marcador típico de las uniones estrechas (Fig. 29) y  $\beta$ -catenina (Fig. 30), proteína involucrada en la adhesión célula-célula. Estos marcadores son indispensables para las funciones de barrera y la permeabilidad mucosal en los tejidos de vertebrados (Chelakkot et al., 2017).

Una desventaja de los organoides es que la cara apical de las células está internalizada en el modelo, lo que dificulta su acceso para cualquier tipo de estudio que requiera interacción con el equivalente al lumen intestinal, como se muestra en los organoides humanos y murinos desarrollados en este trabajo (Figs. 15 y 21 respectivamente).

Para contrarrestar esta desventaja, las células obtenidas de los organoides se han trasladado a cultivos bidimensionales de monocapas desarrolladas sobre membranas Transwell, recibiendo el nombre de monocapas derivadas de organoides (del inglés *Organoid-derived monolayers*), que pueden ser cultivadas además en sistemas especiales como el de interfase aire-líquido (ALI, del inglés *Air-liquid interface*). Una de las ventajas más destacables de los cultivos ALI es la polarización en caras apical y basolateral, resultando en un modelo donde el lumen intestinal queda expuesto, lo que permite la interacción directa con patógenos o fármacos (Upadhyay & Palmberg, 2018; H. Wang et al., 2018).

Las infecciones virales han sido comúnmente estudiadas utilizando los cultivos de monocapas en sistemas ALI, particularmente las producidas por rotavirus en el tracto gastrointestinal, o las del virus de la Influenza tipo A (IAV), los rinovirus (IAV), virus Nipah (NiV), el virus Epstein-Barr (EBV) y recientemente, el virus SARS-CoV 2 en el tracto respiratorio (Cui et al., 2019; Escaffre et al., 2016; Meliopoulos et al., 2020; Sasaki et al., 2021; Xu et al., 2020; Yang et al., 2020; N. Zhu et al., 2020).

Para modelar la infección producida por *H. pylori*, Boccellato y colaboradores (2018) desarrollaron monocapas epiteliales polarizadas en cultivo ALI de glándulas humanas derivadas del antro gástrico. Por su capacidad de producir moco, las denominaron “mucosoides” (*Mucosoid culture*) (Boccellato et al., 2018).

Este modelo reprodujo exitosamente el microambiente fisiológico de la mucosa gástrica, que resultó permisible a la infección por la bacteria y respondió con una evidente respuesta inflamatoria tras la infección (Boccellato et al., 2018).

El modelo de mucosoides es una sólida plataforma para cultivos de largo término que brinda la posibilidad de analizar la estructuración de las células madre adultas y su diferenciación en epitelios maduros, la comunicación celular, y provee un microambiente propicio para el estudio de infecciones, pruebas de fármacos e incluso la interacción con células del sistema inmune (cocultivos) (Boccellato et al., 2018; Traulsen et al., 2021; Wölffling et al., 2021).

Las monocapas derivadas de organoides se han utilizado en el estudio de los parásitos, principalmente protistas y helmintos. Wilke y colaboradores (2019) fueron los primeros en desarrollar cultivos de células epiteliales de ratón que pueden crecer y diferenciarse por largo tiempo utilizando además, células alimentadoras, que proveen nutrientes adicionales para la supervivencia de la monocapa y que pueden utilizarse para reproducir con detalle el ciclo de vida de *C. parvum in vitro* (Wilke et al., 2019). A partir de estos cultivos se iniciaron nuevas plataformas para estudiar infecciones parasitarias *in vitro* (Bhalchandra et al., 2020).

Por su importancia epidemiológica, por mucho tiempo se han buscado modelos para estudiar la infección causada por *G. intestinalis*. Recientemente, Holthaus y colaboradores (2021) establecieron cultivos de monocapas derivadas de organoides con propiedades electrofisiológicas y de barrera similares a la mucosa duodenal, usando tejido duodenal humano para estudiar la infección causada por *G. intestinalis in vitro*. En su modelo, reportan una disfunción de la barrera intestinal con alteraciones en el transporte de iones, seguidas de ruptura del complejo de unión estrecha y pérdida de la integridad epitelial (Holthaus, Kraft, et al., 2021).

Asimismo, en otra publicación Holthaus y colaboradores, optimizaron las condiciones de cultivo para el desarrollo de ODM de diversas especies, incluyendo humano, ratón, cerdo y pollo, para el estudio de la infección por *G. intestinalis* y *T. gondii*, evidenciando que son plataformas muy útiles para el modelado de infecciones parasitarias (Holthaus, Delgado-Betancourt, et al., 2021).

En 2017, Allain y colaboradores realizaron una revisión bibliográfica y describieron el conocimiento hasta ese momento de cómo los trofozoítos de *Giardia* spp. deben enfrentarse a una triple barrera formada por la microbiota, el moco y el epitelio duodenal para establecer la infección. Como barrera física y química, el moco representa uno de los principales obstáculos para que el parásito se establezca sobre el epitelio (Allain et al., 2017). La ausencia de linajes secretores en las monocapas derivadas de organoides, como las células caliciformes resulta una desventaja para el modelado de la giardiasis *in vitro*.

En el presente estudio, utilizando células derivadas de organoides murinos, desarrollamos monocapas en un sistema de cultivo ALI, capaces de producir moco (Figs. 32 y 37), combinando diversas condiciones de cultivo reportadas en la literatura (Boccellato et al., 2018; Holthaus, Kraft, et al., 2021; Kardia et al., 2021; Powell & Behnke, 2017).

Nuestras monocapas estuvieron completamente confluentes a los 10 días de haber iniciado el cultivo ALI. Las monocapas formaron un epitelio polarizado y hermético, capaz de producir moco y expresando características morfológicas, como la compartimentalización celular y la presencia de uniones estrechas, que semejan el epitelio de origen (Figs. 32, 35 y 37).

Estas características permitieron contar con un cultivo apropiado para la infección por trofozoítos de *G. intestinalis* y analizar la interacción entre el parásito, el moco y el epitelio, tal como sugiere la literatura que podría ocurrir durante la infección en el humano (Fig. 37) (Allain et al., 2017). En la tabla 16 comparamos y resumimos los modelos actuales que utilizan monocapas derivadas de organoides para estudiar la infección por *G. intestinalis in vitro*, incluyendo lo publicado por Nash (2019) y los resultados obtenidos en el presente estudio.

Una de las condiciones más importantes para el establecimiento de los organoides es el medio de cultivo; para el caso de los modelos comparados, en lo que respecta a los organoides intestinales desarrollados en cada estudio (Tabla 16), el medio de cultivo se basa en el medio condicionado L-WNR, la única diferencia entre nuestro sistema, en comparación con los otros modelos, es el porcentaje de Rspo1, que fue del 20% para Holthaus y colaboradores (2021a y 2021b)<sup>21</sup> y de 30% en el presente trabajo. No obstante, consideramos que la variación es mínima y no influye en la composición de las poblaciones celulares de los organoides intestinales.

Los modelos comparados utilizan los métodos de RT-qPCR (para la evaluación de la expresión relativa de genes endógenos), las inmunofluorescencias y microscopía confocal (para la expresión y localización de proteínas endógenas y estructurales), y el uso de microscopía electrónica de transmisión (para visualizar la morfología de las células), como técnicas estándar para la caracterización de organoides intestinales (Tabla 16).

Respecto al desarrollo de monocapas derivadas de organoides, nuestro trabajo difiere de los de Holthaus (2021a y 2021b)<sup>14</sup> en el tipo de sistema de cultivo. En sus sistemas, el compartimento apical del Transwell siempre permanece en contacto directo con líquido, que puede ser el medio de cultivo de las células epiteliales o bien, el medio de cultivo del parásito, de la misma forma que el compartimento basolateral, es decir, se trata de un sistema de interfase líquido-líquido (Figura 43 A).

Por otra parte, en nuestro modelo, el compartimento apical está expuesto al aire después de 3 días de haber sembrado las células epiteliales, creando un modelo de interfase aire-líquido, donde los nutrientes dispuestos en el medio provienen únicamente del compartimento basolateral (Figura 43-B). En nuestro sistema las células se alimentan por absorción, lo que permite promueve la formación de moco, tal como ocurre en el intestino delgado (Chen & Schoen, 2019).

---

<sup>21</sup> 2021a (Holthaus, Kraft, et al., 2021); 2021b (Holthaus, Delgado-Betancourt, et al., 2021).

En el contexto de la infección, la principal diferencia entre estos sistemas es el medio de cultivo aplicado para la infección. En los trabajos de Holthaus y colaboradores (2021a y 2021b)<sup>22</sup> utilizaron un medio de cultivo para sus ODM con 50 % de WRN (suplementado con 10  $\mu$ M Y-27632) en el lado basolateral y en el compartimento apical agregaron medio TYI-S-33 la noche anterior a la infección para acondicionar las células epiteliales previo a la exposición con los parásitos, como sugiere (Nash, 2019). En el sistema ALI que proponemos en este trabajo, las células epiteliales soportan 24 h de interacción con *G. intestinalis*, sin que las células epiteliales necesiten la exposición previa al medio TYI-S-33, probablemente por la presencia de la secreción de moco por parte de las células epiteliales, tal como ocurre en la infección de manera natural. Lo anterior, representa dos formas de abordar la interacción *in vitro* sin comprometer a las células epiteliales ni a los trofozoítos del parásito.

Bajo nuestras condiciones experimentales, además pudimos apreciar la formación de huecos sobre la monocapa una vez que los parásitos fueron retirados 24 h después de haber iniciado la interacción. Esta situación, ya había sido reportada en nuestro laboratorio algunos años atrás, después de la interacción de trofozoítos de *G. intestinalis* con células MDCK, donde se apreció que el parásito deja áreas circulares desprovistas de microvellosidades (Fig. 36) (Chávez et al., 1986). Para complementar el análisis de la infección de las monocapas derivadas de organoides con los trofozoítos de *G. intestinalis*, se analizó el medio en el que interaccionaron durante 24 h por espectrometría de masas; no obstante, este análisis solo se llevó a cabo una vez.

El análisis por espectrometría de masas de las proteínas expresadas por las células epiteliales nos da un panorama preliminar de lo que está ocurriendo tras 24 horas de infección, entre el parásito y las células epiteliales, en un sistema de cultivo ALI.

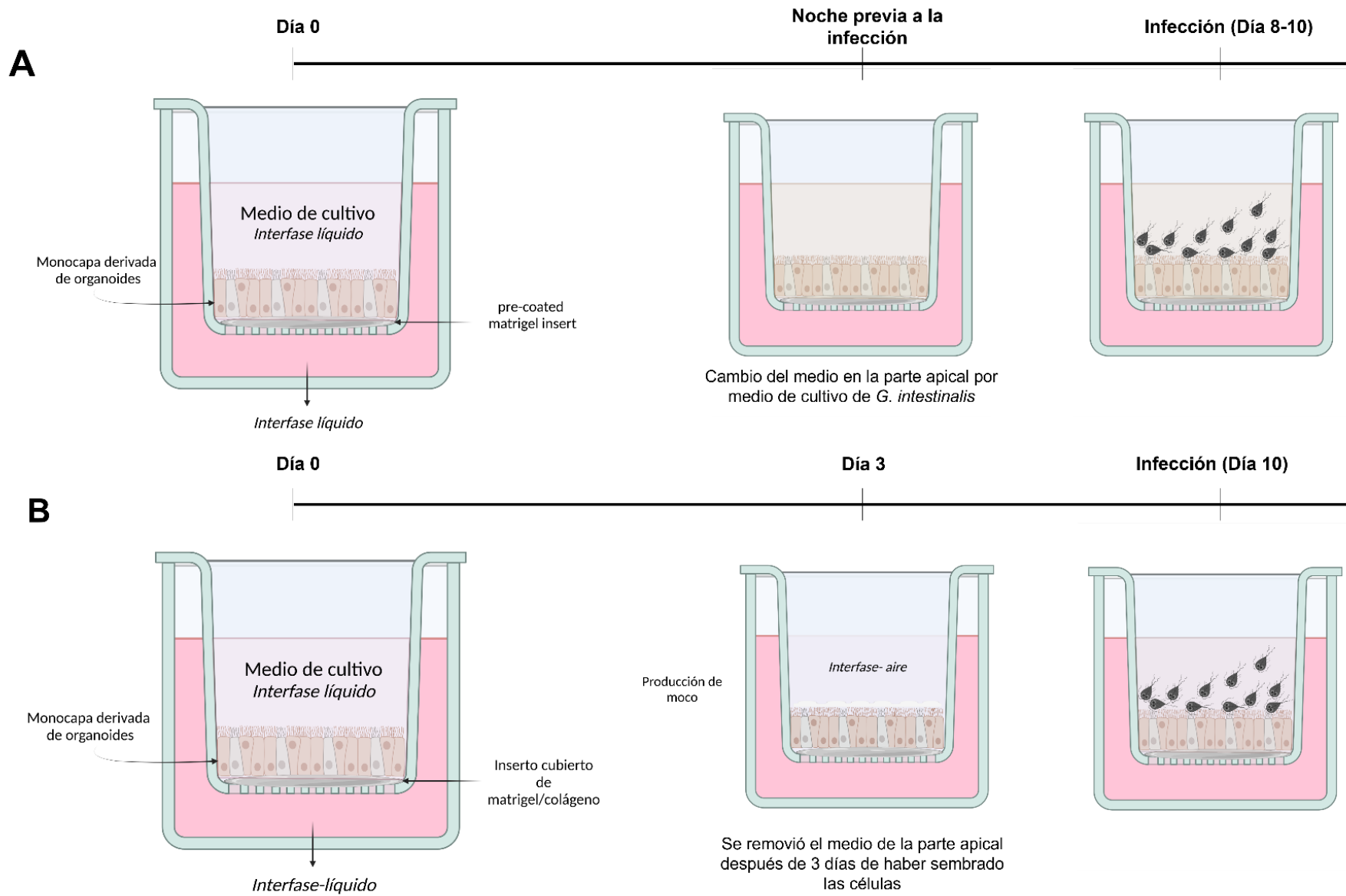
---

<sup>22</sup> 2021a (Holthaus, Kraft, et al., 2021); 2021b (Holthaus, Delgado-Betancourt, et al., 2021).

Aunque muchas proteínas que están siendo expresadas durante la interacción con las células epiteliales aún aparecen como proteínas sin caracterizar, los resultados señalan la expresión de ocho proteínas del parásito, de las cuales dos tienen funciones conocidas: la catepsina B y la cinasa NEK (Tabla 12).

Las catepsinas o cisteína proteasas de catepsina son proteínas que contienen un sitio activo de cisteína y un residuo de histidina. Se clasifican como cisteína proteasas del clan CA y se subdividen en superfamilias de catepsina B (catB) o catepsina L (catL). En algunos protistas, las catepsina-*like* son esenciales para los mecanismos de virulencia y patogenicidad, como es el caso de *Leishmania donovani* y *Entamoeba histolytica* (Kissoon-Singh et al., 2011; Somanna et al., 2002; Turk et al., 2012). En el genoma de *G. intestinalis* están codificados varios genes para catB-*like* y catL-*like*. Sin embargo, estas proteasas aún se encuentran bajo caracterización, por lo que su rol en la infección ha sido poco descrito. Hasta ahora, se ha establecido que las catepsina-*like* de *G. intestinalis* pudieran participar en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento. En particular, se ha reportado que la catepsina B degrada la interleucina 8 (CXCL8) lo que resulta en un proceso de quimiotaxis inducida por neutrófilos (Cotton et al., 2014).





**Fig. 43** Comparación de los sistemas en Transwell utilizados para el estudio de ODM y *G. intestinalis*

**Tabla 16 Comparación de las monocapas derivadas de organoides utilizadas para estudiar a *G. intestinalis in vitro***

<b>Características/ Artículo</b>	<b>Nash, 2019</b>	<b>Holthaus <i>et al</i>, 2021 (Feb)</b>	<b>Holthaus <i>et al</i>, 2021(Nov)</b>	<b>Presente estudio</b>
<b>Línea celular/Tipo de organoide</b>	Caco-2 Cos-7 Tumor rectal de ratón (RIT)	Pollo ( <i>Gallus gallus</i> ) Humano *Ratón (C57/Bl6) Cerdo ( <i>Sus scrofa</i> )	Humano	Ratón (CD1)
<b>Medio de cultivo de los organoides</b>	NA	Medio L-WRN condicionado suplementado con 20% de Rspo1, Noggin, EGF murino, Nac, Nic, A83-01 y SB202190	Medio L-WRN condicionado suplementado con 20% de Rspo1, Noggin, EGF murino, Nac, Nic, A83-01 y SB202190	Medio Advanced DMEM/F12 suplementado con 50% de medio condicionado de Wnt y 30% R-spond, suplementado con B27, N2, Noggin murino, FGF-10, Nac, Nic, A83-01 y SB202190
<b>Caracterización de organoides</b>	NA	Microscopía confocal RT-qPCR	Microscopía confocal RT-qPCR	Microscopía confocal RT-qPCR MET
<b>Tipo de monocapas</b>	Líneas celulares de mamíferos	Monocapa derivada de organoides	Monocapa derivada de organoides	Monocapa derivada de organoides
<b>Tipo de monocapas en Transwell</b>	Inserto tipo Transwell Costar 3450 (24 mm Diámetro y membrana de poliéster con poro de 0.4 µm)	Inserto tipo Transwell con membrana de poliéster con poro de 0.33 cm o de policarbonato con poro de 0.6 cm	Inserto tipo Transwell con membrana de poliéster con poro de 0.33 cm o de policarbonato con poro de 0.6 cm	Inserto tipo Transwell de 12 mm de politetrafluoroetileno con poro de 0.4 µm
<b>Recubrimiento del Transwell</b>	No	Matrigel diluido en medio DMEM Advanced DMEM/F12	Matrigel	Combinación de 1% colágeno y 2% de matrigel
<b>Número de células epiteliales</b>	1X10 <sup>4</sup> células Cos2 y RIT 2 X10 <sup>4</sup> células Caco2	3 × 10 <sup>5</sup> células por cm <sup>2</sup> en cada filtro	Dos gotas de 50 µl Matrigel por cada inserto Transwell con un área de 0.6 cm <sup>2</sup>	3x10 <sup>5</sup> células por inserto
<b>Tipo celular predominante en la monocapa</b>	Caco-2: células epitelial Cos-7: fibroblasto Tumor rectal de ratón (RIT)	Tipo enterocito	Tipo enterocito	Tipo enterocito
<b>Tipo de sistema de monocapa</b>	Líquido-líquido	Líquido-líquido	Líquido-líquido	Aire-Líquido
<b>¿La monocapa produce moco?</b>	No	No	No	Sí

**Tabla 14 Comparación de las monocapas derivadas de organoides utilizadas para estudiar a *G. intestinalis in vitro* (continuación)**

<b>Medio de cultivo para las células epiteliales (dispuesto en el lado basolateral)</b>	Medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor	Medio ODM precalentado suplementado con medio WRN condicionado al 50 % y complementado con 10 µM de Y-27632	medio de diferenciación (medio de organoides sin WRN-CM, A83- 01 y SB202190)	Medio de cultivo ALI completo requiere 50 % de medio Wnt3A condicionado y un 25 % de medio R-spondin1 condicionado; suplementado con EGF murino, Noggin murino FGF-10, Nic, SB202190, A83-01, Y-27632
<b>Días de cultivo de las monocapas</b>	Entre 5 y 6 días hasta alcanzar entre 60 y 100% de confluencia	Entre 8 y 10 días	Entre 8 y 10 días	10 días
<b>¿Las células epiteliales en el Transwell fueron incubadas con medio TYI-S-33 antes de la infección?</b>	Sí	Sí	Sí	No
<b>Cepa de <i>Giardia</i> utilizada</b>	Cepa Wb	Cepa <i>G. duodenalis</i> WB6 (ATCC 50803)	Cepa <i>G. duodenalis</i> WB6 (ATCC 50803)	Cepa <i>G. intestinalis</i> IMSS-3
<b>Dosis infectiva (# de trofozoítos)</b>	10,000 trofozoítos por filtro	3 trofozoítos por células epitelial	MOI 10 parásitos	3 trofozoítos por células epitelial
<b>Medio de infección (dispuesto en la parte apical)</b>	Medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor y	TYI-S-33	TYI-S-33	50% medio de TYI + 50% medio de ALI
<b>Tiempo de infección</b>	24h	12, 24, 36, 48 h	12, 24, 36, 60 y 72 h	24h
<b>Análisis de la infección</b>	Resistencia Eléctrica Transepitelial Observaciones en microscopía de luz	Resistencia Eléctrica Transepitelial Microscopía Confocal	Resistencia Eléctrica Transepitelial Trazador de fluoresceína Permeabilidad a iones (sodio y cloruro) Análisis de cisteína proteinasas secretadas Perfiles transcriptómicos	Observaciones en microscopía de luz y Microscopía Electrónica de Transmisión Espectrometría de masas
Abreviaturas: Nac: N-acetil-L-cisteína; NA: No Aplica, Nic: Nicotinamida; ODM: <i>organoid derived monolayer</i> *Para el caso de Holthaus, Delgado-Betancourt, et al., 2021, sólo se consideran las características de las ODM de ratón				

Mediante el uso de líneas celulares, de manera experimental, se demostró que las catepsinas-*like* del clan CA del parásito, inducen la degradación y redistribución de la villina durante la interacción de trofozoítos con células Caco-2, lo que sugiere un papel importante para estas proteínas en el contexto fisiopatológico de la infección (Buret et al., 2015; Cotton et al., 2014).

En este trabajo, identificamos a la catepsina-B (Tabla 12) después de la interacción de trofozoítos con células epiteliales de origen murino, lo que sugiere que, la catepsina B podría ser uno de los principales factores de virulencia que el parásito está utilizando para el establecimiento de la infección (Bhargava et al., 2015).

Por otra parte, *G. intestinalis* tiene el kinoma<sup>23</sup> central más pequeño conocido de cualquier eucariota que se puede cultivar *in vitro*. Estas proteínas tienen un papel importante en la remodelación de la morfología durante el proceso de desenquistamiento; asimismo, algunas cinasas se localizan en estructuras exclusivas del citoesqueleto del parásito, lo que pudiera estar relacionado con la alta especificidad funcional. Se ha demostrado que las cinasas de *G. intestinalis* juegan un papel importante en la virulencia y patogenicidad del parásito, por lo que su caracterización representa la mejor forma para la identificación de blancos terapéuticos (Manning et al., 2011).

Más del 70% del kinoma de *G. intestinalis* pertenece a la familia de las cinasas Nek. En particular, la cepa *Giardia* WB tiene 198 cinasas Nek, lo que representa alrededor del 3,7% del proteoma completo del parásito (Manning et al., 2011). En este trabajo, se identificó a la cinasa NEK (A0A644F276\_GIAIC), que por las características de las Nek descritas para el parásito, podía estar involucrada en los cambios morfológicos que sufre el parásito tras el contacto con las células epiteliales y la posible inducción del proceso de enquistamiento que se observó por MET (Fig. 40).

---

<sup>23</sup> Kinoma: Del inglés *Kinome*, se refiere al conjunto de proteínas cinasas presentes en el genoma de un organismo.

Respecto a los resultados totales obtenidos en espectrometría de masas, para el parásito son muy reducidos en comparación con la gran cantidad de proteínas que se obtuvieron al realizar la comparación con la base de datos del hospedero (*Mus musculus*) y de las proteínas identificadas del suero (*Bos taurus*), lo que nos indica que el modelo desarrollado tiene imperfecciones y que las condiciones para la caracterización de la infección por este método, se tienen que optimizar, principalmente eliminando las proteínas del medio, como la albúmina.

Tras muchos años de estudio de la fisiopatología de *Giardia* spp. aún no se han encontrado modelos óptimos para representar y desarrollar la infección *in vitro*. Los modelos duodenales descritos aquí, que involucran células derivadas de organoides en un sistema de cultivo de interfase aire-líquido, semejan el microambiente duodenal: una monocapa completamente polarizada, compuesta por diferentes tipos celulares y con organización celular del tejido nativo *in vitro*, con la capacidad de producir moco.

Estas características, que pueden ser comparadas con la organización de las células duodenales humanas, representan un modelo mucho más robusto para estudiar diferentes aspectos de la giardiasis, como la interacción del trofozoíto con la triada microbiota-moco-epitelio, daños en la microvellosidades y la respuesta inmune por parte de las células humanas durante la infección. Muchas preguntas que no han sido resueltas debido a la ausencia de modelos de cultivo apropiados podrán finalmente ser respondidas.

Si bien nuestro modelo ha mostrado su utilidad para estudiar las etapas tempranas de la infección por *G. intestinalis*, puede ser optimizado para establecer cultivos tardíos. El trabajo ofrece además diversas perspectivas, como son la caracterización más detallada de la monocapas derivadas de organoides con y sin infección, análisis de la infección por *G. intestinalis* en el modelo duodenal humano en ALI, análisis transcriptómico de la infección en monocapas derivadas de organoides duodenales y comparación de la expresión utilizando diferentes cepas del parásito.

El modelo duodenal murino descrito en esta tesis que utiliza monocapas derivadas de organoides en un sistema de interfase aire-líquido *in vitro*, se asemeja al entorno duodenal, con una composición celular similar a la del tejido nativo. Después de muchos años de usar líneas celulares y modelos animales, se requiere una mejor comprensión de la giardiasis y se necesitan modelos de cultivo más precisos y novedosos.

Todo el conocimiento sobre el desarrollo de monocapas derivadas de organoides y el desarrollo de cultivos tridimensionales para el estudio de la infección por *G. intestinalis*, se puede transferir y aplicar a células humanas duodenales para analizar más a fondo diferentes aspectos de esta infección, como el papel del moco para el establecimiento de los trofozoítos, el daño ocasionado a las microvellosidades, la respuesta inmune del huésped y sobre todo, para responder algunas preguntas sobre el fisiopatología de esta infección que seguimos sin resolver .

## Conclusiones

- Se produjeron los factores de crecimiento Wnt3A y Rspo-1 en los sobrenadantes de células HEK-293Wnt y HEK-293R-spond, respectivamente.
- Se elaboraron medios de cultivos condicionados para el crecimiento y diferenciación de organoides duodenales humanos y murinos.
- Se desarrollaron por primera vez cultivos tridimensionales a partir de células madre adultas derivadas de pacientes mexicanos, particularmente organoides duodenales y monocapas derivadas de organoides.
- Se lograron establecer las condiciones óptimas de cultivo para el desarrollo de organoides duodenales murinos.
- Los organoides duodenales murinos pueden cultivarse por largo tiempo (10 pases) en un medio dependiente de factores de crecimiento (Wnt, Rspo-1, EGF y Noggin)
- Los organoides duodenales tienen características estructurales similares al tejido de origen en términos de estructura y diversidad celular: células madre, proliferadoras, epiteliales maduras y de microvellosidades.
- Se desarrollaron monocapas derivadas de organoides duodenales murinos en el sistema de cultivo ALI (*Air-liquid Interface*).
- Las monocapas derivadas de organoides duodenales murinos poseen células polarizadas, secretoras de moco, presentan confluencia al día 10 y comparten estructuras similares al tejido de origen.
- Los organoides pueden ser inducidos a diferenciarse en mucosoides duodenales, por lo que representan una herramienta que simula de mejor manera los epitelios intestinales *in vitro*.
- Por espectrometría de masas, identificamos proteínas del parásito (catepsina B y cinasas) involucradas en la evasión de la respuesta inmune del parásito y su patogenicidad.

- Los monocapas derivadas de organoides duodenales murinos o humanos son un buen modelo para analizar las etapas iniciales de la interacción huésped-parásito en la giardiasis experimental.
- Los modelos tridimensionales desarrollados en este trabajo son excelentes plataformas de cultivo que pueden ser utilizadas para el análisis de otras infecciones *in vitro*, así como para estudiar enfermedades del intestino delgado como la enfermedad celíaca, la enfermedad de Crohn y cáncer.



## Referencias

- Abud, H. E., Chan, W. H., & Jardé, T. (2021). Source and Impact of the EGF Family of Ligands on Intestinal Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.685665>
- Adam, R. D. (2001). Biology of Giardia lamblia. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 14, Issue 3, pp. 447–475). <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
- Ahmad Mulyadi Lai, H. I., Chou, S.-J., Chien, Y., Tsai, P.-H., Chien, C.-S., Hsu, C.-C., Jheng, Y.-C., Wang, M.-L., Chiou, S.-H., Chou, Y.-B., Hwang, D.-K., Lin, T.-C., Chen, S.-J., & Yang, Y.-P. (2021). Expression of Endogenous Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Organoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1320. <https://doi.org/10.3390/ijms22031320>
- Alhaque, S., Themis, M., & Rashidi, H. (2018). Three-dimensional cell culture: From evolution to revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1750). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0216>
- Allain, T., Amat, C. B., Motta, J. P., Manko, A., & Buret, A. G. (2017). Interactions of Giardia sp. with the intestinal barrier: Epithelium, mucus, and microbiota. *Tissue Barriers*, 5(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1274354>
- Allison, S. J. (2020). SARS-CoV-2 infection of kidney organoids prevented with soluble human ACE2. In *Nature Reviews Nephrology*. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0291-8>
- Almeqdadi, M., Mana, M. D., Roper, J., & Yilmaz, Ö. H. (2019). Gut organoids: Mini-tissues in culture to study intestinal physiology and disease. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 317(3), C405–C419. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00300.2017>
- Anand, B. S., Kumar, M., Chakravarti, R. N., Sehgal, A. K., & Chhuttani, P. N. (1980). Pathogenesis of malabsorption in Giardia infection: an experimental study in rats. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(5), 565–569. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(80\)90139-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(80)90139-X)
- Angus, H. C. K., Butt, A. G., Schultz, M., & Kemp, R. A. (2020). Intestinal Organoids as a Tool for Inflammatory Bowel Disease Research. *Frontiers in Medicine*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00334>
- Arango, D., Al-Obaidi, S., Williams, D. S., Dopeso, H., Mazzolini, R., Corner, G., Byun, D. S., Carr, A. A., Murone, C., Tgel, L., Zeps, N., Aaltonen, L. A., Iacopetta, B., & Mariadason, J. M. (2012). Villin expression is frequently lost in poorly differentiated colon cancer. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.006>

- Arora, M. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*.  
<https://doi.org/10.13070/mm.en.3.175>
- Astiazarán-García, H., Espinosa-Cantellano, M., Castaón, G., Chávez-Munguía, B., & Martínez-Palomo, A. (2000). Giardia lamblia: Effect of infection with symptomatic and asymptomatic isolates on the growth of gerbils (Meriones unguiculatus). *Experimental Parasitology*, 95(2), 128–135.  
<https://doi.org/10.1006/expr.2000.4514>
- Baker, B. M., & Chen, C. S. (2012). Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. In *Journal of Cell Science*.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.079509>
- Barat, M., Dohan, A., Dautry, R., Barral, M., Boudiaf, M., Hoeffel, C., & Soyer, P. (2017). Mass-forming lesions of the duodenum: A pictorial review. In *Diagnostic and Interventional Imaging*.  
<https://doi.org/10.1016/j.diii.2017.01.004>
- Bardenbacher, M., Ruder, B., Britzen-Laurent, N., Schmid, B., Waldner, M., Naschberger, E., Scharl, M., Müller, W., Günther, C., Becker, C., Stürzl, M., & Tripal, P. (2019). Permeability analyses and three dimensional imaging of interferon gamma-induced barrier disintegration in intestinal organoids. *Stem Cell Research*, 35, 101383. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101383>
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 19–33. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>
- Barker, N., De Wetering, M. Van, & Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. In *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1674008>
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H. J., van Es, J. H., Sato, T., Stange, D. E., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., van den Brink, S., Korving, J., Abo, A., Peters, P. J., Wright, N., Poulsom, R., & Clevers, H. (2010). Lgr5+ve Stem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro. *Cell Stem Cell*.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.013>
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., Wetering, M. Van De, Snippert, H. J., & Es, J. H. Van. (2010). Supplemental Information in the Stomach and Build Long-Lived Gastric Units In Vitro. *Cell Stem Cell*.
- Barker, N., Van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., Van Den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., & Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
- Barky, A. (2017). Stem Cells, Classifications and their Clinical Applications. *Am J Pharmacol Ther*.
- Bartelt, L. A., & Sartor, R. B. (2015). Advances in understanding Giardia:

- determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Reports*, 7. <https://doi.org/10.12703/P7-62>
- Beatty, J. K., Akierman, S. V., Motta, J.-P., Muise, S., Workentine, M. L., Harrison, J. J., Bhargava, A., Beck, P. L., Rioux, K. P., McKnight, G. W., Wallace, J. L., & Buret, A. G. (2017). *Giardia duodenalis* induces pathogenic dysbiosis of human intestinal microbiota biofilms. *International Journal for Parasitology*, 47(6), 311–326. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.11.010>
- Beaumont, M., Blanc, F., Cherbuy, C., Egidy, G., Giuffra, E., Lacroix-Lamandé, S., & Wiedemann, A. (2021). Intestinal organoids in farm animals. *Veterinary Research*, 52(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00909-x>
- Becker, L., Huang, Q., & Mashimo, H. (2008). Immunostaining of Lgr5, an intestinal stem cell marker, in normal and premalignant human gastrointestinal tissue. *TheScientificWorldJournal*. <https://doi.org/10.1100/tsw.2008.148>
- Benchimol, M., Gadelha, A. P. R., & de Souza, W. (2022). *Cell Biology of the Life Cycle of Giardia intestinalis* (pp. 465–539). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-80682-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-80682-8_11)
- Bhalchandra, S., Lamisere, H., & Ward, H. (2020). Intestinal organoid/enteroid-based models for *Cryptosporidium*. *Current Opinion in Microbiology*, 58, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.10.002>
- Bhargava, A., Cotton, J. A., Dixon, B. R., Gedamu, L., Yates, R. M., & Buret, A. G. (2015). *Giardia duodenalis* Surface Cysteine Proteases Induce Cleavage of the Intestinal Epithelial Cytoskeletal Protein Villin via Myosin Light Chain Kinase. *PLOS ONE*, 10(9), e0136102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136102>
- Bhowmick, R., Derakhshan, T., Liang, Y., Ritchey, J., Liu, L., & Gappa-Fahlenkamp, H. (2018). A Three-Dimensional Human Tissue-Engineered Lung Model to Study Influenza A Infection. *Tissue Engineering - Part A*, 24(19–20), 1468–1480. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0449>
- Boccellato, F., Woelffling, S., Imai-Matsushima, A., Sanchez, G., Goosmann, C., Schmid, M., Berger, H., Morey, P., Denecke, C., Ordemann, J., & Meyer, T. F. (2018). Polarised epithelial monolayers of the gastric mucosa reveal insights into mucosal homeostasis and defence against infection. *Gut*, gutjnl-2017-314540. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314540>
- Boonekamp, K. E., Kretzschmar, K., Wiener, D. J., Asra, P., Derakhshan, S., Puschhof, J., López-Iglesias, C., Peters, P. J., Basak, O., & Clevers, H. (2019). Long-term expansion and differentiation of adult murine epidermal stem cells in 3D organoid cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(29), 14630–14638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715272116>
- Breault, D. T., Min, I. M., Carlone, D. L., Farilla, L. G., Ambruzs, D. M., Henderson, D. E., Algra, S., Montgomery, R. K., Wagers, A. J., & Hole, N. (2008).

Generation of mTert-GFP mice as a model to identify and study tissue progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804800105>

- Bullen, C. K. (2020). Infectability of Human BrainSphere Neurons Suggests Neurotropism of SARS-CoV-2\*. *ALTEX*. <https://doi.org/10.14573/altex.2006111>
- Buret, A. G., Amat, C. B., Manko, A., Beatty, J. K., Halliez, M. C. M., Bhargava, A., Motta, J.-P., & Cotton, J. A. (2015). Giardia duodenalis: New Research Developments in Pathophysiology, Pathogenesis, and Virulence Factors. *Current Tropical Medicine Reports*, 2(3), 110–118. <https://doi.org/10.1007/s40475-015-0049-8>
- Camilleri, M. (2019). Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. In *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318427>
- Carlson, M. W., Alt-Holland, A., Egles, C., & Garlick, J. A. (2008). Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin. In *Current Protocols in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1909s41>
- Casteleyn, C., Rekecki, A., Van Der Aa, A., Simoens, P., & Van Den Broeck, W. (2010). Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. *Laboratory Animals*. <https://doi.org/10.1258/la.2009.009112>
- Cauffman, G., De Rycke, M., Sermon, K., Liebaers, I., & Van De Velde, H. (2009). Markers that define stemness in ESC are unable to identify the totipotent cells in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/den351>
- CDC. (2013). *CDC - Giardia*. CDC. <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html>
- Cedillo-Rivera, R., Leal, Y. A., Yépez-Mulia, L., Gómez-Delgado, A., Ortega-Pierres, G., Tapia-Conyer, R., & Muñoz, O. (2009). Seroepidemiology of giardiasis in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Cevallos Porta, D., López, S., Arias, C. F., & Isa, P. (2016). Polarized rotavirus entry and release from differentiated small intestinal cells. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.09.010>
- Chandra, L., Borchering, D. C., Kingsbury, D., Atherly, T., Ambrosini, Y. M., Bourgois-Mochel, A., Yuan, W., Kimber, M., Qi, Y., Wang, Q., Wannemuehler, M., Ellinwood, N. M., Snella, E., Martin, M., Skala, M., Meyerholz, D., Estes, M., Fernandez-Zapico, M. E., Jergens, A. E., ... Allenspach, K. (2019). Derivation of adult canine intestinal organoids for translational research in gastroenterology. *BMC Biology*, 17(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0652-6>
- Charwat, V., & Egger, D. (2018). *The Third Dimension in Cell Culture: From 2D to 3D Culture Formats*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74854-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74854-2_5)

- Chávez, B., Knaippe, F., Gonzalez-Mariscal, L., & Martínez-Palomo, A. (1986). *Giardia lamblia*: Electrophysiology and ultrastructure of cytopathology in cultured epithelial cells. *Experimental Parasitology*, *61*(3), 379–389. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(86\)90194-3](https://doi.org/10.1016/0014-4894(86)90194-3)
- Chelakkot, C., Ghim, J., Rajasekaran, N., Choi, J.-S., Kim, J.-H., Jang, M. H., Shin, Y. K., Suh, P.-G., & Ryu, S. H. (2017). Intestinal Epithelial Cell-Specific Deletion of PLD2 Alleviates DSS-Induced Colitis by Regulating Occludin. *Scientific Reports*, *7*(1), 1573. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01797-y>
- Chen, S., & Schoen, J. (2019). Air-liquid interface cell culture: From airway epithelium to the female reproductive tract. *Reproduction in Domestic Animals*, *54*, 38–45. <https://doi.org/10.1111/rda.13481>
- Chin, A. C., Teoh, D. A., Scott, K. G.-E., Meddings, J. B., Macnaughton, W. K., & Buret, A. G. (2002). Strain-Dependent Induction of Enterocyte Apoptosis by *Giardia lamblia* Disrupts Epithelial Barrier Function in a Caspase-3-Dependent Manner. *Infection and Immunity*, *70*(7), 3673–3680. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3673-3680.2002>
- Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>
- Clevers, H. (2020). COVID-19: organoids go viral. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0258-4>
- Corfield, A. P., Carroll, D., Myerscough, N., & Probert, C. S. (2001). Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. In *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. <https://doi.org/10.2741/a684>
- Cornick, S., Tawiah, A., & Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. In *Tissue Barriers*. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.982426>
- Corrò, C., Novellasdemunt, L., & Li, V. S. W. (2020). A brief history of organoids. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *319*(1), C151–C165. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>
- Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. In *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>
- Cotton, J. A., Bhargava, A., Ferraz, J. G., Yates, R. M., Beck, P. L., & Buret, A. G. (2014). *Giardia duodenalis* Cathepsin B Proteases Degrade Intestinal Epithelial Interleukin-8 and Attenuate Interleukin-8-Induced Neutrophil Chemotaxis. *Infection and Immunity*, *82*(7), 2772–2787. <https://doi.org/10.1128/IAI.01771-14>
- Cui, T., Theuns, S., Xie, J., & Nauwynck, H. J. (2019). Porcine rotavirus mainly infects primary porcine enterocytes at the basolateral surface. *Veterinary*

Research. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0728-x>

- de Lau, W. B. M., Snel, B., & Clevers, H. C. (2012). The R-spondin protein family. *Genome Biology*, 13(3), 1–10. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-3-242>
- Derakhshanfar, S., Mbeleck, R., Xu, K., Zhang, X., Zhong, W., & Xing, M. (2018). 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. In *Bioactive Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.008>
- Devaux, C. A., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2020). ACE2 receptor polymorphism: Susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome. In *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* (Vol. 53, Issue 3, pp. 425–435). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.04.015>
- Dijkhoff, I. M., Petracca, B., Prieux, R., Valacchi, G., Rothen-Rutishauser, B., & Eeman, M. (2021). Cultivating a Three-dimensional Reconstructed Human Epidermis at a Large Scale. *Journal of Visualized Experiments*, 171. <https://doi.org/10.3791/61802>
- DiMarco, R. L., Su, J., Yan, K. S., Dewi, R., Kuo, C. J., & Heilshorn, S. C. (2014). Engineering of three-dimensional microenvironments to promote contractile behavior in primary intestinal organoids. *Integr. Biol.*, 6(2), 127–142. <https://doi.org/10.1039/C3IB40188J>
- Dirección General de Epidemiología. (2018). *Boletín Epidemiológico. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información*. 35(13), 64.
- Dutton, J. S., Hinman, S. S., Kim, R., Wang, Y., & Allbritton, N. L. (2019). Primary Cell-Derived Intestinal Models: Recapitulating Physiology. In *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.001>
- Dye, F. S., Larraufie, P., Kay, R., Darwish, T., Rievaj, J., Goldspink, D. A., Meek, C. L., Middleton, S. J., Hardwick, R. H., Roberts, G. P., Percival-Alwyn, J. L., Vaughan, T., Ferraro, F., Challis, B. G., O'Rahilly, S., Groves, M., Gribble, F. M., & Reimann, F. (2019). Characterisation of proguanylin expressing cells in the intestine – evidence for constitutive luminal secretion. *Scientific Reports*, 9(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52049-0>
- Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.122.3168.501>
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016). An up-date on Giardia and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>
- Elbadawi, M., & Efferth, T. (2020). Organoids of human airways to study infectivity and cytopathy of SARS-CoV-2. In *The Lancet Respiratory Medicine*. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30238-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30238-1)

- Elbadawy, M., Usui, T., Mori, T., Tsunedomi, R., Hazama, S., Nabeta, R., Uchide, T., Fukushima, R., Yoshida, T., Shibutani, M., Tanaka, T., Masuda, S., Okada, R., Ichikawa, R., Omatsu, T., Mizutani, T., Katayama, Y., Noguchi, S., Iwai, S., ... Sasaki, K. (2019). Establishment of a novel experimental model for muscle-invasive bladder cancer using a dog bladder cancer organoid culture. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/cas.14118>
- Eriksen, A. Z., Møller, R., Makovoz, B., Uhl, S. A., TenOever, B. R., & Blenkinsop, T. A. (2021). SARS-CoV-2 infects human adult donor eyes and hESC-derived ocular epithelium. *Cell Stem Cell*, *28*(7), 1205-1220.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.04.028>
- Esakandari, H., Nabi-Afjadi, M., Fakkari-Afjadi, J., Farahmandian, N., Miresmaeili, S. M., & Bahreini, E. (2020). A comprehensive review of COVID-19 characteristics. In *Biological Procedures Online*. <https://doi.org/10.1186/s12575-020-00128-2>
- Escaffre, O., Borisevich, V., Vergara, L. A., Wen, J. W., Long, D., & Rockx, B. (2016). Characterization of Nipah virus infection in a model of human airway epithelial cells cultured at an air-liquid interface. *Journal of General Virology*. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000441>
- Esch, K. J., & Petersen, C. A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(1), 58–85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>
- Evans-Osses, I., Mojoli, A., Monguió-Tortajada, M., Marcilla, A., Aran, V., Amorim, M., Inal, J., Borràs, F. E., & Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro. *European Journal of Cell Biology*, *96*(2), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.01.005>
- Ezzell, R. M., Chafel, M. M., & Matsudaira, P. T. (1989). Differential localization of villin and fimbrin during development of the mouse visceral endoderm and intestinal epithelium. *Development*.
- Ezzell, Robert M., Leung, J., Collins, K., Chafel, M. M., Cardozo, T. J., & Matsudaira, P. T. (1992). Expression and localization of villin, fimbrin, and myosin I in differentiating mouse F9 teratocarcinoma cells. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90195-M](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90195-M)
- Fink, M. Y., & Singer, S. M. (2017). The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends in Parasitology*, *33*(11), 901–913. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.001>
- Foley, K. E. (2017). Organoids: A better in vitro model. *Nature Methods*, *14*(6), 559–562. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4307>
- Formeister, E. J., Sionas, A. L., Lorange, D. K., Barkley, C. L., Lee, G. H., & Magness, S. T. (2009). Distinct SOX9 levels differentially mark stem/progenitor populations and enteroendocrine cells of the small intestine epithelium. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver*

- Physiology*, 296(5), G1108–G1118. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00004.2009>
- Fu, J., Wei, B., Wen, T., Johansson, M. E. V., Liu, X., Bradford, E., Thomsson, K. A., McGee, S., Mansour, L., Tong, M., McDaniel, J. M., Sferra, T. J., Turner, J. R., Chen, H., Hansson, G. C., Braun, J., & Xia, L. (2011). Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI45538>
- Garg, P., Ravi, A., Patel, N. R., Roman, J., Gewirtz, A. T., Merlin, D., & Sitaraman, S. V. (2007). Matrix Metalloproteinase-9 Regulates MUC-2 Expression Through Its Effect on Goblet Cell Differentiation. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.048>
- Gehart, H., & Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>
- Gerbe, F., & Jay, P. (2016). Intestinal tuft cells: Epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. In *Mucosal Immunology*. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.68>
- Gerbe, François, Brulin, B., Makrini, L., Legraverend, C., & Jay, P. (2009). DCAMKL-1 Expression Identifies Tuft Cells Rather Than Stem Cells in the Adult Mouse Intestinal Epithelium. In *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.06.072>
- Gjorevski, N., Sachs, N., Manfrin, A., Giger, S., Bragina, M. E., Ordóñez-Morán, P., Clevers, H., & Lutolf, M. P. (2016). Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature20168>
- Glasgow, R. E., & Rollins, M. D. (2008). Stomach and duodenum. In *Surgery: Basic Science and Clinical Evidence: Second Edition*. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-68113-9\\_46](https://doi.org/10.1007/978-0-387-68113-9_46)
- Goldring, C., Antoine, D. J., Bonner, F., Crozier, J., Denning, C., Fontana, R. J., Hanley, N. A., Hay, D. C., Ingelman-Sundberg, M., Juhila, S., Kitteringham, N., Silva-Lima, B., Norris, A., Pridgeon, C., Ross, J. A., Young, R. S., Tagle, D., Tornesi, B., van de Water, B., ... Park, B. K. (2017). Stem cell-derived models to improve mechanistic understanding and prediction of human drug-induced liver injury. In *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.28886>
- Gonzalez, L. M., Williamson, I., Piedrahita, J. A., Blikslager, A. T., & Magness, S. T. (2013). Cell Lineage Identification and Stem Cell Culture in a Porcine Model for the Study of Intestinal Epithelial Regeneration. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066465>
- Gracz, A. D., Ramalingam, S., & Magness, S. T. (2010). Sox9 expression marks a subset of CD24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(5), G590–G600. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00470.2009>



- Gu, S., Chen, D., Zhang, J. N., Lv, X., Wang, K., Duan, L. P., Nie, Y., & Wu, X. L. (2013). Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074957>
- Guttman, J. A., & Finlay, B. B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(4), 832–841. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.028>
- Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., Mao, X., Ma, Q., Zamponi, R., Bouwmeester, T., Finan, P. M., Kirschner, M. W., Porter, J. A., Serluca, F. C., & Cong, F. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature*, 485(7397), 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature11019>
- Hashemzadeh, A. H. (2019). Comparison between Three-Dimensional Spheroid and Two-Dimensional Monolayer in A549 Lung Cancer and PC9 Normal Cell Lines under Treatment of Silver Nanoparticles. In *Modares Journal of Biotechnology*.
- Hattori, S., Nakamura, M., Yamamura, T., Maeda, K., Sawada, T., Mizutani, Y., Yamamoto, K., Ishikawa, T., Furukawa, K., Ohno, E., Honda, T., Kawashima, H., Ishigami, M., Hirooka, Y., & Fujishiro, M. (2020). The microbiome can predict mucosal healing in small intestine in patients with Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1007/s00535-020-01728-1>
- Henschler, R. (2018). *Cell Culture Media*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74854-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74854-2_3)
- Heyworth, M. F. (2016). *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016013>
- Hillenbrand, B., Günzel, D., Richter, J. F., Höhne, M., Schreier, E., Schulzke, J. D., & Mankertz, J. (2010). Norovirus non-structural protein p20 leads to impaired restitution of epithelial defects by inhibition of actin cytoskeleton remodelling. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. <https://doi.org/10.3109/00365521.2010.483013>
- Holly, M. K., & Smith, J. G. (2018). Adenovirus Infection of Human Enteroids Reveals Interferon Sensitivity and Preferential Infection of Goblet Cells. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.00250-18>
- Holthaus, D., Delgado-Betancourt, E., Aebischer, T., Seeber, F., & Klotz, C. (2021). Harmonization of Protocols for Multi-Species Organoid Platforms to Study the Intestinal Biology of *Toxoplasma gondii* and Other Protozoan Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.610368>
- Holthaus, D., Kraft, M. R., Krug, S. M., Wolf, S., Müller, A., Betancourt, E. D., Schorr, M., Holland, G., Knauf, F., Schulzke, J.-D., Aebischer, T., & Klotz, C. (2021). Dissection of Barrier Dysfunction in Organoid-Derived Human Intestinal Epithelia Induced by *Giardia duodenalis*. *Gastroenterology*.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.022>

- Hughes, C. S., Postovit, L. M., & Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>
- Humen, M. A., Pérez, P. F., & Liévin-Le Moal, V. (2011). Lipid raft-dependent adhesion of *Giardia intestinalis* trophozoites to a cultured human enterocyte-like Caco-2/TC7 cell monolayer leads to cytoskeleton-dependent functional injuries. *Cellular Microbiology*, *13*(11), 1683–1702.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01647.x>
- Isshiki, H., Arimura, Y., Nagaishi, K., Kawakami, K., Onodera, K., Yamashita, K., Naishiro, Y., Fujimiya, M., Imai, K., & Shinomura, Y. (2017). Establishment of a refined culture method for rat colon organoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.142>
- Jacob, F., Pather, S. R., Huang, W.-K., Wong, S. Z. H., Zhou, H., Zhang, F., Cubitt, B., Chen, C. Z., Xu, M., Pradhan, M., Zhang, D. Y., Zheng, W., Bang, A. G., Song, H., de A Torre, J. C., & Ming, G.-L. (2020). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Cells and Brain Organoids Reveal SARS-CoV-2 Neurotropism. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*.  
<https://doi.org/10.1101/2020.07.28.225151>
- Jayaraman, M. V., Mayo-Smith, W. W., Movson, J. S., Dupuy, D. E., & Wallach, M. T. (2001). HELPING THE GASTROINTESTINAL SURGEON CT of the Duodenum: An Overlooked Segment Gets Its Due 1. In *RadioGraphics*.
- Juan, F., Luis, T., & Gladis, A. (1996). Histología normal del intestino delgado. Normal histology of small bowel. In *Rev Med Hered*.
- Kabiri, Z., Greicius, G., Madan, B., Biechele, S., Zhong, Z., Zaribafzadeh, H., Edison, Aliyev, J., Wu, Y., Bunte, R., Williams, B. O., Rossant, J., & Virshup, D. M. (2014). Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development*, *141*(11), 2206–2215.  
<https://doi.org/10.1242/dev.104976>
- Kabnick, K., & Peattie, D. (1991). *Giardia*: A Missing Link between Prokaryotes and Eukaryotes. *American Scientist*, *79*(1), 1–10.
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2016). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different. *Archives of Medical Science*, *14*(4), 910–919.
- Kardia, E., Frese, M., Smertina, E., Strive, T., Zeng, X.-L., Estes, M., & Hall, R. N. (2021). Culture and differentiation of rabbit intestinal organoids and organoid-derived cell monolayers. *Scientific Reports*, *11*(1), 5401.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84774-w>
- Kasendra, M., Luc, R., Yin, J., Manatakis, D. V., Kulkarni, G., Lucchesi, C., Sliz, J.,

- Apostolou, A., Sunuwar, L., Obrigewitch, J., Jang, K. J., Hamilton, G. A., Donowitz, M., & Karalis, K. (2020). Duodenum intestine-chip for preclinical drug assessment in a human relevant model. *ELife*.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.50135>
- Kasendra, M., Tovaglieri, A., Sontheimer-Phelps, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Bein, A., Chalkiadaki, A., Scholl, W., Zhang, C., Rickner, H., Richmond, C. A., Li, H., Breault, D. T., & Ingber, D. E. (2018). Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Scientific Reports*.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21201-7>
- Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., & Searson, P. C. (2016). In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>
- Kaushik, G., Ponnusamy, M. P., & Batra, S. K. (2018). Current Status of 3-D Organoids as Pre-Clinical Models. *Stem Cells*.
- Keister, D. B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90120-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90120-7)
- Kim, S., & Jazwinski, S. M. (2018). The Gut Microbiota and Healthy Aging: A Mini-Review. In *Gerontology*. <https://doi.org/10.1159/000490615>
- Kim, Y. S., & Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. In *Current Gastroenterology Reports*.  
<https://doi.org/10.1007/s11894-010-0131-2>
- Kissoon-Singh, V., Mortimer, L., & Chadee, K. (2011). *Entamoeba histolytica* Cathepsin-Like Enzymes (pp. 62–83). [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8414-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8414-2_5)
- Kleinman, H. K., & Martin, G. R. (2005). Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. In *Seminars in Cancer Biology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>
- Koh, W. H., Geurden, T., Paget, T., O’Handley, R., Steuart, R. F., Thompson, R. C. A., & Buret, A. G. (2013). *Giardia duodenalis* Assemblage-Specific Induction of Apoptosis and Tight Junction Disruption in Human Intestinal Epithelial Cells: Effects of Mixed Infections. *Journal of Parasitology*, 99(2), 353–358.  
<https://doi.org/10.1645/GE-3021.1>
- Kraft, M. R., Klotz, C., Bucker, R., Schulzke, J.-D., & Aebischer, T. (2017). *Giardia’s* Epithelial Cell Interaction In Vitro: Mimicking Asymptomatic Infection? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 421.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00421>
- Kruitwagen, H. S., Oosterhoff, L. A., Vernooij, I. G. W. H., Schrall, I. M., van Wolferen, M. E., Bannink, F., Roesch, C., van Uden, L., Molenaar, M. R.,

- Helms, J. B., Grinwis, G. C. M., Verstegen, M. M. A., van der Laan, L. J. W., Huch, M., Geijssen, N., Vries, R. G., Clevers, H., Rothuizen, J., Schotanus, B. A., ... Spee, B. (2017). Long-Term Adult Feline Liver Organoid Cultures for Disease Modeling of Hepatic Steatosis. *Stem Cell Reports*.  
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.015>
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. In *Science*.  
<https://doi.org/10.1126/science.1247125>
- Levin, G., Koga, B. A. A., Belchior, G. G., Carreira, A. C. O., & Sogayar, M. C. (2020). Production, purification and characterization of recombinant human R-spondin1 (RSPO1) protein stably expressed in human HEK293 cells. *BMC Biotechnology*, 20(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-0600-0>
- Li, J., Li, J., Zhang, S. Y., Li, R. X., Lin, X., Mi, Y. L., & Zhang, C. Q. (2018). Culture and characterization of chicken small intestinal crypts. *Poultry Science*.  
<https://doi.org/10.3382/ps/pey010>
- Li, Jingyan. (1995). Characterization of Giardia cell nucleus: Its implication on the nature and origin of the primitive cell nucleus. *Cell Research*, 5(1), 115–124.  
<https://doi.org/10.1038/cr.1995.11>
- Ling, K. M., Garratt, L. W., Gill, E. E., Lee, A. H. Y., Agudelo-Romero, P., Sutanto, E. N., Iosifidis, T., Rosenow, T., Turvey, S. E., Lassmann, T., Hancock, R. E. W., Kicic, A., & Stick, S. M. (2020). Rhinovirus Infection Drives Complex Host Airway Molecular Responses in Children With Cystic Fibrosis. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01327>
- Liu, F., Li, G., Wen, K., Bui, T., Cao, D., Zhang, Y., & Yuan, L. (2010). Porcine small intestinal epithelial cell line (IPEC-J2) of rotavirus infection as a new model for the study of innate immune responses to rotaviruses and probiotics. *Viral Immunology*. <https://doi.org/10.1089/vim.2009.0088>
- Liu, Y., & Chen, Y.-G. (2018). 2D- and 3D-Based Intestinal Stem Cell Cultures for Personalized Medicine. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells7120225>
- Lu, T., Cao, Y., Zhao, P., Shen, S., & Xi, Y. (2021). Organoid: a powerful tool to study lung regeneration and disease. *Cell Regeneration*, 10(1), 21.  
<https://doi.org/10.1186/s13619-021-00082-8>
- Ma'ayeh, S. Y., Knörr, L., Sköld, K., Garnham, A., Ansell, B. R. E., Jex, A. R., & Svärd, S. G. (2018). Responses of the Differentiated Intestinal Epithelial Cell Line Caco-2 to Infection With the Giardia intestinalis GS Isolate. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00244>
- Ma'ayeh, S. Y., Knörr, L., & Svärd, S. G. (2015). Transcriptional profiling of Giardia intestinalis in response to oxidative stress. *International Journal for Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.07.005>

- Ma'ayeh, S. Y., Liu, J., Peirasmaki, D., Hörnaeus, K., Bergström Lind, S., Grabherr, M., Bergquist, J., & Svärd, S. G. (2017). Characterization of the *Giardia intestinalis* secretome during interaction with human intestinal epithelial cells: The impact on host cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006120>
- Makovoz, B., Moeller, R., Zebitz Eriksen, A., TenOever, B. R., & Blenkinsop, T. A. (2020). SARS-CoV-2 Infection of Ocular Cells from Human Adult Donor Eyes and hESC-Derived Eye Organoids. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3650574>
- Mallapaty, S. (2020). Mini organs reveal how the coronavirus ravages the body. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-01864-x>
- Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D. H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. In *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
- Manning, G., Reiner, D. S., Lauwaet, T., Dacre, M., Smith, A., Zhai, Y., Svard, S., & Gillin, F. D. (2011). The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. *Genome Biology*, *12*(7), R66. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-7-r66>
- Mao, X. Y., & Jin, W. L. (2020). iPSCs-Derived Platform: A Feasible Tool for Probing the Neurotropism of SARS-CoV-2. In *ACS Chemical Neuroscience*. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.0c00512>
- Martin-Belmonte, F., & Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *12*(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/nrc3169>
- Martínez-Gordillo, M. N., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Montijo-Barrios, E., & Ponce-Macotela, M. (2014). Intraepithelial giardia intestinalis: a case report and literature review. *Medicine*. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000277>
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(4), 265–278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2538>
- Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>
- Meliopoulos, V., Cherry, S., Wohlgemuth, N., Honce, R., Barnard, K., Gauger, P., Davis, T., Shult, P., Parrish, C., & Schultz-Cherry, S. (2020). Primary swine respiratory epithelial cell lines for the efficient isolation and propagation of influenza A viruses. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.01091-20>
- Meneses, A. M. C., Schneeberger, K., Kruitwagen, H. S., Penning, L. C., van

- Steenbeek, F. G., Burgener, I. A., & Spee, B. (2016). Intestinal organoids- Current and future applications. *Veterinary Sciences*, 3(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/vetsci3040031>
- Meng, Y., Ren, Z., Xu, F., Zhou, X., Song, C., Wang, V. Y. F., Liu, W., Lu, L., Thomson, J. A., & Chen, G. (2018). Nicotinamide Promotes Cell Survival and Differentiation as Kinase Inhibitor in Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 11(6), 1347–1356. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.10.023>
- Merenda, A., Fenderico, N., & Maurice, M. M. (2020). Wnt Signaling in 3D: Recent Advances in the Applications of Intestinal Organoids. *Trends in Cell Biology*, 30(1), 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.10.003>
- Merker, S. R., Weitz, J., & Stange, D. E. (2016). Gastrointestinal organoids: How they gut it out. *Developmental Biology*, 420(2), 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.08.010>
- Meyer, E. A., Erlandsen, S. L., & Radulescu, S. (1984). *Animal Models for Giardiasis in Giardia and Giardiasis* (S. L. Erlandsen & E. A. Meyer (eds.)). Plenum Press.
- Middendorp, S., Schneeberger, K., Wiegerinck, C. L., Mokry, M., Akkerman, R. D. L., Wijngaarden, S., Clevers, H., & Nieuwenhuis, E. E. S. (2014). Adult Stem Cells in the Small Intestine Are Intrinsically Programmed with Their Location-Specific Function. *STEM CELLS*, 32(5), 1083–1091. <https://doi.org/10.1002/stem.1655>
- Moghbelli, H., Ellithy, K., Eslami, Z., Vartanian, R., Wannous, D., El Ghamrawy, A., Basha, O., Fayad, A., Qaraqe, M., Nicola, S., Damásio, January, R., By, U., Sprott, D., Banking, P., Accountholders, B. B., Draft, D., Details, B., Name, F., ... Nathan, G. J. (2020). SARS-CoV-2 INFECTS HUMAN GUT ENTEROCYTES. *Block Caving – A Viable Alternative?*
- Mohammadi, R., Hosseini-Safa, A., Ehsani Ardakani, M. J., & Rostami-Nejad, M. (2015). The relationship between intestinal parasites and some immune-mediated intestinal conditions. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 8(2), 123–131.
- Monali, R. N., Lall, N., Basak, S., & Mallick, S. K. (2012). Proteomic analysis of the ventral disc of *Giardia lamblia*. *Journal of Clinical and Diagnostics Research*, 6(9), 1492–1494. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-41>
- Montgomery, R. K., & Breault, D. T. (2008). Small intestinal stem cell markers. *Journal of Anatomy*, 213(1), 52–58. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.00925.x>
- Montgomery, R. K., Carlone, D. L., Richmond, C. A., Farilla, L., Kranendonk, M. E. G., Henderson, D. E., Baffour-Awuah, N. Y., Ambruzs, D. M., Fogli, L. K., Algra, S., & Breault, D. T. (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1013004108>

- Müller, J., Sterk, M., Hemphill, A., & Müller, N. (2007). Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *60*(2), 280–287. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm205>
- Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. In *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Mussard, E., Pouzet, C., Helies, V., Pascal, G., Fourre, S., Cherbuy, C., Rubio, A., Vergnolle, N., Combes, S., & Beaumont, M. (2020). 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*. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101980>
- Nash, T. E. (2019). Long-Term Culture of *Giardia lamblia* in Cell Culture Medium Requires Intimate Association with Viable Mammalian Cells. *Infection and Immunity*, *87*(11). <https://doi.org/10.1128/IAI.00639-19>
- Nikolova, T., Wu, M., Brumbarov, K., Alt, R., Opitz, H., Boheler, K. R., Cross, M., & Wobus, A. M. (2007). WNT-conditioned media differentially affect the proliferation and differentiation of cord blood-derived CD133+ cells in vitro. *Differentiation*. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00119.x>
- Noah, T. K., Donahue, B., & Shroyer, N. F. (2011). Intestinal development and differentiation. In *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.09.006>
- Noel, G., Baetz, N. W., Staab, J. F., Donowitz, M., Kovbasnjuk, O., Pasetti, M. F., & Zachos, N. C. (2017). A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep45270>
- O'Brien S., Park Y., Azarin S., H. W. (2018). Cell Culture Bioprocess Technology: Biologics and Beyond. *Cell Culture Technology. Learning Materials in Biosciences*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74854-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74854-2_1)
- O'Handley, R. M., & Olson, M. E. (2006). Giardiasis and Cryptosporidiosis in Ruminants. In *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* (Vol. 22, Issue 3, pp. 623–643). <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.07.002>
- Obert, G., Peiffer, I., & Servin, A. L. (2000). Rotavirus-Induced Structural and Functional Alterations in Tight Junctions of Polarized Intestinal Caco-2 Cell Monolayers. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.10.4645-4651.2000>
- Öhlinger, K., Kolesnik, T., Meindl, C., Gallé, B., Absenger-Novak, M., Kolb-Lenz, D., & Fröhlich, E. (2019). Air-liquid interface culture changes surface properties of A549 cells. *Toxicology in Vitro*, *60*(January), 369–382. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.06.014>

- Ohno, H. (2015). Intestinal M cells. In *Journal of Biochemistry*.  
<https://doi.org/10.1093/jb/mvv121>
- Ootani, A., Li, X., Sangiorgi, E., Ho, Q. T., Ueno, H., Toda, S., Sugihara, H., Fujimoto, K., Weissman, I. L., Capecchi, M. R., & Kuo, C. J. (2009). Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nature Medicine*, *15*(6), 701–706. <https://doi.org/10.1038/nm.1951>
- Ortega-Pierres, M. G., & Argüello-García, R. (2019). *Giardia duodenalis*: Role of secreted molecules as virulent factors in the cytotoxic effect on epithelial cells (pp. 129–169). <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.07.003>
- Ozbolat, I. T., Peng, W., & Ozbolat, V. (2016). Application areas of 3D bioprinting. In *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.006>
- Panek, M., Grabacka, M., & Pierzchalska, M. (2018). The formation of intestinal organoids in a hanging drop culture. *Cytotechnology*, *70*(3), 1085–1095. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0194-8>
- Pascarella, G., Strumia, A., Piliago, C., Bruno, F., Del Buono, R., Costa, F., Scarlata, S., & Agrò, F. E. (2020). COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. In *Journal of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.1111/joim.13091>
- Pearce, S. C., Al-Jawadi, A., Kishida, K., Yu, S., Hu, M., Fritzky, L. F., Edelblum, K. L., Gao, N., & Ferraris, R. P. (2018). Marked differences in tight junction composition and macromolecular permeability among different intestinal cell types. *BMC Biology*, *16*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0481-z>
- Pei, L., Gao, X., Liu, W., Feng, X., Zhao, Z., & Lai, Y. (2020). Lapiferin protects against H1N1 virus-induced pulmonary inflammation by negatively regulating NF-κB signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20209183>
- Pell, T. J., Gray, M. B., Hopkins, S. J., Kasproicz, R., Porter, J. D., Reeves, T., Rowan, W. C., Singh, K., Tvermosegaard, K. B., Yaqub, N., & Wayne, G. J. (2021). Epithelial Barrier Integrity Profiling: Combined Approach Using Cellular Junctional Complex Imaging and Transepithelial Electrical Resistance. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*, *247255522110130*. <https://doi.org/10.1177/24725552211013077>
- Pierzchalska, M., Grabacka, M., Michalik, M., Zyla, K., & Pierzchalski, P. (2012). Prostaglandin E2 supports growth of chicken embryo intestinal organoids in Matrigel matrix. *BioTechniques*. <https://doi.org/10.2144/0000113851>
- Pollen, A. A., Bhaduri, A., Andrews, M. G., Nowakowski, T. J., Meyerson, O. S., Mostajo-Radji, M. A., Di Lullo, E., Alvarado, B., Bedolli, M., Dougherty, M. L., Fiddes, I. T., Kronenberg, Z. N., Shuga, J., Leyrat, A. A., West, J. A., Bershteyn, M., Lowe, C. B., Pavlovic, B. J., Salama, S. R., ... Kriegstein, A. R. (2019). Establishing Cerebral Organoids as Models of Human-Specific Brain Evolution. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.017>



- Post, Y., Puschhof, J., Beumer, J., Kerckamp, H. M., de Bakker, M. A. G., Slagboom, J., de Barbanson, B., Wevers, N. R., Spijkers, X. M., Olivier, T., Kazandjian, T. D., Ainsworth, S., Iglesias, C. L., van de Wetering, W. J., Heinz, M. C., van Ineveld, R. L., van Kleef, R. G. D. M., Begthel, H., Korving, J., ... Clevers, H. (2020). Snake Venom Gland Organoids. *Cell*, *180*(2), 233-247.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.038>
- Powell, R. H., & Behnke, M. S. (2017). WRN conditioned media is sufficient for in vitro propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals. *Biology Open*, *6*(5), 698–705. <https://doi.org/10.1242/bio.021717>
- Preston, S. L., Alison, M. R., Forbes, S. J., Direkze, N. C., Poulson, R., & Wright, N. A. (2003). The new stem cell biology: Something for everyone. In *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*. <https://doi.org/10.1136/mp.56.2.86>
- Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, X., Yang, X., Xie, W., Li, B., Han, J.-D. J., & Chen, Y.-G. (2017). BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nature Communications*, *8*(1), 13824. <https://doi.org/10.1038/ncomms13824>
- Radhakrishnan, J., Varadaraj, S., Dash, S. K., Sharma, A., & Verma, R. S. (2020). Organotypic cancer tissue models for drug screening: 3D constructs, bioprinting and microfluidic chips. In *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.03.002>
- Ralston, A., & Rossant, J. (2010). The genetics of induced pluripotency. In *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0024>
- Ramani, A., Müller, L., Ostermann, P. N., Gabriel, E., Abida-Islam, P., Müller-Schiffmann, A., Mariappan, A., Goureau, O., Gruell, H., Walker, A., Andrée, M., Hauka, S., Houwaart, T., Dilthey, A., Wohlgemuth, K., Omran, H., Klein, F., Wiczorek, D., Adams, O., ... Gopalakrishnan, J. (2020). SARS-CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/emboj.2020106230>
- Reynoso-Robles, R., Ponce-Macotela, M., Rosas-López, L. E., Ramos-Morales, A., Martínez-Gordillo, M. N., & González-Maciel, A. (2015). The invasive potential of *Giardia intestinalis* in an in vivo model. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep15168>
- Roberts-Thomson, I. C., Stevens, D. P., Mahmoud, A. A., & Warren, K. S. (1976). Giardiasis in the Mouse: An Animal Model. *Gastroenterology*, *71*(1), 57–61. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(76\)80097-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(76)80097-2)
- Robertson, L. J., Hanevik, K., Escobedo, A. A., Mørch, K., & Langeland, N. (2010). Giardiasis - why do the symptoms sometimes never stop? *Trends in Parasitology*, *26*(2), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.11.010>
- Roche, K. C., Gracz, A. D., Liu, X. F., Newton, V., Akiyama, H., & Magness, S. T. (2015). SOX9 Maintains Reserve Stem Cells and Preserves Radioresistance in Mouse Small Intestine. *Gastroenterology*.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.004>

- Rodríguez-Pérez, M. E. (2022). *Caracterización bioinformática de la arginina deiminasa como factor de virulencia multifuncional de Giardia intestinalis. En desarrollo*. Instituto Politécnico Nacional.
- Ross, M. H. P. (deceased), & Wojciech, P. (2014). Histology and Text Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. In *Psychological Science*.
- Sailaja, B. S., He, X. C., & Li, L. (2016). The regulatory niche of intestinal stem cells. *Journal of Physiology*, *594*(17), 4827–4836. <https://doi.org/10.1113/JP271931>
- Sakalem, M. E., & Ribeiro-Paes, J. T. (2018). New methodologies for old problems: Tridimensional gastrointestinal organoids and guts-on-a-chip. In *Journal of Coloproctology*. <https://doi.org/10.1016/j.jcol.2017.10.002>
- Sakib, S., Uchida, A., Valenzuela-Leon, P., Yu, Y., Valli-Pulaski, H., Orwig, K., Ungrin, M., & Dobrinski, I. (2019). Formation of organotypic testicular organoids in microwell culture. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz053>
- Salahudeen, A. A., Choi, S. S., Rustagi, A., Zhu, J., O, S. M. de la, Flynn, R. A., Margalef-Català, M., Santos, A. J. M., Ju, J., Batish, A., Unen, V. van, Usui, T., Zheng, G. X. Y., Edwards, C. E., Wagar, L. E., Luca, V., Anchang, B., Nagendran, M., Nguyen, K., ... Kuo, C. J. (2020). Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in long-term human distal lung organoid cultures. *BioRxiv*.
- Sangiorgi, E., & Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.165>
- Sasaki, M., Kishimoto, M., Itakura, Y., Tabata, K., Intaruck, K., Uemura, K., Toba, S., Sanaki, T., Sato, A., Hall, W. W., Orba, Y., & Sawa, H. (2021). Air-liquid interphase culture confers SARS-CoV-2 susceptibility to A549 alveolar epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *577*, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.09.015>
- Sato, T., & Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: Mechanism and applications. In *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1234852>
- Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., Van Es, J. H., Van Den Brink, S., Van Houdt, W. J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P. D., & Clevers, H. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, *141*(5), 1762–1772. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts.

*Nature*, 469(7330), 415–418. <https://doi.org/10.1038/nature09637>

- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., Van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Savioli, L., Smith, H., & Thompson, A. (2006). Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative.' *Trends in Parasitology*, 22(5), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.015>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlaermann, P., Toelle, B., Berger, H., Schmidt, S. C., Glanemann, M., Ordemann, J., Bartfeld, S., Mollenkopf, H. J., & Meyer, T. F. (2016). A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307949>
- Schmidt, H., Zalyte, R., Urnavicius, L., Carter, A. P., Ge, J., Li, W., Zhao, Q., Li, N., Chen, M., Zhi, P., Li, R., Gao, N., Xiao, B., Yang, M., Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S. H., Barford, D., ... From, A. (2015). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature14853>
- Schuijers, J., Junker, J. P., Mokry, M., Hatzis, P., Koo, B.-K., Sasselli, V., van der Flier, L. G., Cuppen, E., van Oudenaarden, A., & Clevers, H. (2015). Ascl2 Acts as an R-spondin/Wnt-Responsive Switch to Control Stemness in Intestinal Crypts. *Cell Stem Cell*, 16(2), 158–170. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.12.006>
- Scott, A., Rouch, J. D., Jabaji, Z., Khalil, H. A., Solorzano, S., Lewis, M., Martín, M. G., Stelzner, M. G., & Dunn, J. C. Y. (2016). Long-term renewable human intestinal epithelial stem cells as monolayers: A potential for clinical use. *Journal of Pediatric Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.02.074>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Shamir, E. R., & Ewald, A. J. (2014). Three-dimensional organotypic culture: Experimental models of mammalian biology and disease. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3873>
- Shen, L. (2012). Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1258(1), 9–18. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06613.x>

- Shukla, G., & Sidhu, R. K. (2011). Effect of *Giardia duodenalis* in protein malnourished and renourished mice. *Central European Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.2478/s11536-011-0078-1>
- Silva, R. K. N. R., Pacheco, F. T. F., Martins, A. S., Menezes, J. F., Costa-Ribeiro, H., Ribeiro, T. C. M., Mattos, J. A. P., Oliveira, R. R., Soares, N. M., & Teixeira, M. C. A. (2016). Performance of microscopy and ELISA for diagnosing *Giardia duodenalis* infection in different pediatric groups. *Parasitology International*, 65(6), 635–640. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.08.012>
- Simian, M., & Bissell, M. J. (2017). Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>
- Singh, V. K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N., & Chandra, R. (2016). Describing the stem cell potency: The various methods of functional assessment and in silico diagnostics. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00134>
- Somanna, A., Mundodi, V., & Gedamu, L. (2002). Functional Analysis of Cathepsin B-like Cysteine Proteases from *Leishmania donovani* Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25305–25312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203034200>
- Song, E., Zhang, C., Israelow, B., Lu-Culligan, A., Prado, A. V., Skriabine, S., Lu, P., Weizman, O.-E., Liu, F., Dai, Y., Szigeti-Buck, K., Yasumoto, Y., Wang, G., Castaldi, C., Heltke, J., Ng, E., Wheeler, J., Alfajaro, M. M., Levavasseur, E., ... Iwasaki, A. (2020). Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.25.169946>
- Sontheimer-Phelps, A., Hassell, B. A., & Ingber, D. E. (2019). Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. In *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0104-6>
- Soriano, L., Khalid, T., O'Brien, F. J., O'Leary, C., & Cryan, S.-A. (2021). A Tissue-Engineered Tracheobronchial In Vitro Co-Culture Model for Determining Epithelial Toxicological and Inflammatory Responses. *Biomedicines*, 9(6), 631. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060631>
- Stadelmann, B., Merino, M. C., Persson, L., & Svärd, S. G. (2012). Arginine Consumption by the Intestinal Parasite *Giardia intestinalis* Reduces Proliferation of Intestinal Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 7(9), e45325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045325>
- Sugita, K., Soyka, M. B., Wawrzyniak, P., Rinaldi, A. O., Mitamura, Y., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2020). Outside-in hypothesis revisited. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 125(5), 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.05.016>
- Taddei, M., Giannoni, E., Fiaschi, T., & Chiarugi, P. (2012). Anoikis: an emerging

- hallmark in health and diseases. *The Journal of Pathology*, 226(2), 380–393.  
<https://doi.org/10.1002/path.3000>
- Takeda, N., Jain, R., LeBoeuf, M. R., Wang, Q., Lu, M. M., & Epstein, J. A. (2011). Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1213214>
- Takiishi, T., Fenero, C. I. M., & Câmara, N. O. S. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. In *Tissue Barriers*. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>
- Thorne, C. A., Chen, I. W., Sanman, L. E., Cobb, M. H., Wu, L. F., & Altschuler, S. J. (2018). Enteroid Monolayers Reveal an Autonomous WNT and BMP Circuit Controlling Intestinal Epithelial Growth and Organization. *Developmental Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.024>
- Tian, H., Biehs, B., Warming, S., Leong, K. G., Rangell, L., Klein, O. D., & de Sauvage, F. J. (2011). A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature*, 478(7368), 255–259.  
<https://doi.org/10.1038/nature10408>
- Tindle, C., Fuller, M., Fonseca, A., Taheri, S., Ibeawuchi, S.-R., Beutler, N., Claire, A., Castillo, V., Hernandez, M., Russo, H., Duran, J., Alexander, L. E. C., Tipps, A., Lin, G., Thistlethwaite, P. A., Chattopadhyay, R., Rogers, T. F., Sahoo, D., Ghosh, P., & Das, S. (2020). Adult Stem Cell-derived Complete Lung Organoid Models Emulate Lung Disease in COVID-19. *BioRxiv*.
- Töpfer, E., Pasotti, A., Telopoulou, A., Italiani, P., Boraschi, D., Ewart, M. A., & Wilde, C. (2019). Bovine colon organoids: From 3D bioprinting to cryopreserved multi-well screening platforms. *Toxicology in Vitro*. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104606>
- Torras, N., García-Díaz, M., Fernández-Majada, V., & Martínez, E. (2018). Mimicking epithelial tissues in three-dimensional cell culture models. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00197>
- Tran, B. M., Deliyannis, G., Hachani, A., Earnest, L., Torresi, J., & Vincan, E. (2022). Organoid Models of SARS-CoV-2 Infection: What Have We Learned about COVID-19? *Organoids*, 1(1), 2–27.  
<https://doi.org/10.3390/organoids1010002>
- Traulsen, J., Zagami, C., Daddi, A. A., & Boccillato, F. (2021). Molecular modelling of the gastric barrier response, from infection to carcinogenesis. In *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* (Vols. 50–51, p. 101737). Bailliere Tindall Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2021.101737>
- Trzpis, M., McLaughlin, P. M. J., De Leij, L. M. F. H., & Harmsen, M. C. (2007). Epithelial cell adhesion molecule: More than a carcinoma marker and adhesion molecule. In *American Journal of Pathology* (Vol. 171, Issue 2, pp. 386–395). American Society for Investigative Pathology Inc.

<https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070152>

- Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., & Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.10.002>
- Umar, S. (2010). Intestinal Stem Cells. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), 340–348. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0130-3>
- Upadhyay, S., & Palmberg, L. (2018). Air-liquid interface: Relevant in vitro models for investigating air pollutant-induced pulmonary toxicity. In *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy053>
- Urbiscek, M., Rannickmae, H., Foets, T., Ravn, K., Hyvönen, M., & de la Roche, M. (2018). Organoid culture media containing growth factors of defined cellular activity. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/422923>
- Urbiscek, M., Rannikmae, H., Foets, T., Ravn, K., Hyvönen, M., & de la Roche, M. (2019). Organoid culture media formulated with growth factors of defined cellular activity. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42604-0>
- van der Flier, L. G., Haegebarth, A., Stange, D. E., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2009). OLFM4 Is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology*, 137(1), 15–17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.035>
- Van Der Heijden, M., & Vermeulen, L. (2019). Stem cells in homeostasis and cancer of the gut. In *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0962-x>
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., Büller, H. A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I. B., & Einerhand, A. W. C. (2006). Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>
- Van Klinken, B. J. W., Einerhand, A. W. C., Duits, L. A., Makkink, M. K., Tytgat, K. M. A. J., Renes, I. B., Verburg, M., Büller, H. A., & Dekker, J. (1999). Gastrointestinal expression and partial cDNA cloning of murine Muc2. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.1.g115>
- Van Landeghem, L., Santoro, M. A., Krebs, A. E., Mah, A. T., Dehmer, J. J., Gracz, A. D., Scull, B. P., McNaughton, K., Magness, S. T., & Lund, P. K. (2012). Activation of two distinct Sox9-EGFP-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00519.2011>

- Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*, *11*(9), 821–834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Vanderheiden, A., Ralfs, P., Chirkova, T., Upadhyay, A. A., Zimmerman, M. G., Bedoya, S., Aoued, H., Tharp, G. M., Pellegrini, K. L., Manfredi, C., Sorscher, E., Mainou, B., Lobby, J. L., Kohlmeier, J. E., Lowen, A. C., Shi, P.-Y., Menachery, V. D., Anderson, L. J., Grakoui, A., ... Suthar, M. S. (2020). Type I and Type III Interferons Restrict SARS-CoV-2 Infection of Human Airway Epithelial Cultures. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.00985-20>
- VanDussen, K. L., Sonnek, N. M., & Stappenbeck, T. S. (2019). L-WRN conditioned medium for gastrointestinal epithelial stem cell culture shows replicable batch-to-batch activity levels across multiple research teams. *Stem Cell Research*, *37*, 101430. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101430>
- Volynets, V., Rings, A., Bárdos, G., Ostaff, M. J., Wehkamp, J., & Bischoff, S. C. (2016). Intestinal barrier analysis by assessment of mucins, tight junctions, and  $\alpha$ -defensins in healthy C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Tissue Barriers*, *4*(3), e1208468. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1208468>
- von Furstenberg, R. J., Gulati, A. S., Baxi, A., Doherty, J. M., Stappenbeck, T. S., Gracz, A. D., Magness, S. T., & Henning, S. J. (2011). Sorting mouse jejunal epithelial cells with CD24 yields a population with characteristics of intestinal stem cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00453.2010>
- Wallach, T. E., & Bayrer, J. R. (2017). Intestinal Organoids: New Frontiers in the Study of Intestinal Disease and Physiology. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *64*(2), 180–185. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001411>
- Wang, H., He, L., Liu, B., Feng, Y., Zhou, H., Zhang, Z., Wu, Y., Wang, J., Gan, Y., Yuan, T., Wu, M., Xie, X., & Feng, Z. (2018). Establishment and comparison of air-liquid interface culture systems for primary and immortalized swine tracheal epithelial cells. *BMC Cell Biology*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12860-018-0162-3>
- Wang, Yi, Chiang, I.-L., Ohara, T. E., Fujii, S., Cheng, J., Muegge, B. D., Ver Heul, A., Han, N. D., Lu, Q., Xiong, S., Chen, F., Lai, C.-W., Janova, H., Wu, R., Whitehurst, C. E., VanDussen, K. L., Liu, T.-C., Gordon, J. I., Sibley, L. D., & Stappenbeck, T. S. (2019). Long-Term Culture Captures Injury-Repair Cycles of Colonic Stem Cells. *Cell*, *179*(5), 1144-1159.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.015>
- Wang, Yijin, Liu, S., Liu, H., Li, W., Lin, F., Jiang, L., Li, X., Xu, P., Zhang, L., Zhao, L., Cao, Y., Kang, J., Yang, J., Li, L., Liu, X., Li, Y., Nie, R., Mu, J., Lu, F., ... Zhao, J. (2020). SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *Journal of Hepatology*, *73*(4), 807–816. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.002>

- Wang, Yuli, Gunasekara, D. B., Attayek, P. J., Reed, M. I., DiSalvo, M., Nguyen, D. L., Dutton, J. S., Lebhar, M. S., Bultman, S. J., Sims, C. E., Magness, S. T., & Allbritton, N. L. (2017). In Vitro Generation of Mouse Colon Crypts. *ACS Biomaterials Science and Engineering*.  
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00368>
- Wang, Yuli, Gunasekara, D. B., Reed, M. I., DiSalvo, M., Bultman, S. J., Sims, C. E., Magness, S. T., & Allbritton, N. L. (2017). A microengineered collagen scaffold for generating a polarized crypt-villus architecture of human small intestinal epithelium. *Biomaterials*.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.03.005>
- Wang, Yuli, Kim, R., Gunasekara, D. B., Reed, M. I., DiSalvo, M., Nguyen, D. L., Bultman, S. J., Sims, C. E., Magness, S. T., & Allbritton, N. L. (2018). Formation of Human Colonic Crypt Array by Application of Chemical Gradients Across a Shaped Epithelial Monolayer. *CMGH*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.10.007>
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., & Sasai, Y. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 25(6), 681–686.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1310>
- Wells, J. M., & Spence, J. R. (2014). How to make an intestine. *Development (Cambridge)*. <https://doi.org/10.1242/dev.097386>
- West, A. B., Isaac, C. A., Carboni, J. M., Morrow, J. S., Mooseker, M. S., & Barwick, K. W. (1988). Localization of villin, a cytoskeletal protein specific to microvilli, in human ileum and colon and in colonic neoplasms. *Gastroenterology*, 94(2), 343–352. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(88\)90421-0](https://doi.org/10.1016/0016-5085(88)90421-0)
- Westphalen, C. B., Asfaha, S., Hayakawa, Y., Takemoto, Y., Lukin, D. J., Nuber, A. H., Brandtner, A., Setlik, W., Remotti, H., Muley, A., Chen, X., May, R., Houchen, C. W., Fox, J. G., Gershon, M. D., Quante, M., & Wang, T. C. (2014). Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer-initiating cells. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI73434>
- Wilke, G., Funkhouser-Jones, L. J., Wang, Y., Ravindran, S., Wang, Q., Beatty, W. L., Baldrige, M. T., VanDussen, K. L., Shen, B., Kuhlenschmidt, M. S., Kuhlenschmidt, T. B., Witola, W. H., Stappenbeck, T. S., & Sibley, L. D. (2019). A Stem-Cell-Derived Platform Enables Complete Cryptosporidium Development In Vitro and Genetic Tractability. *Cell Host and Microbe*.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.05.007>
- Wolfe, M. S. (1992). Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(1), 93–100.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.5.1.93>
- Wölffling, S., Daddi, A. A., Imai-Matsushima, A., Fritsche, K., Goosmann, C.,



- Traulsen, J., Lisle, R., Schmid, M., Reines-Benassar, M. del M., Pfannkuch, L., Brinkmann, V., Bornschein, J., Malfertheiner, P., Ordemann, J., Link, A., Meyer, T. F., & Boccellato, F. (2021). EGF and BMPs Govern Differentiation and Patterning in Human Gastric Glands. *Gastroenterology*, *161*(2), 623-636.e16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.04.062>
- Workman, M. J., Gleeson, J. P., Troisi, E. J., Estrada, H. Q., Kerns, S. J., Hinojosa, C. D., Hamilton, G. A., Targan, S. R., Svendsen, C. N., & Barrett, R. J. (2018). Enhanced Utilization of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Intestinal Organoids Using Microengineered Chips. *CMGH*. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.12.008>
- Xia, S., Wu, M., Chen, S., Zhang, T., Ye, L., Liu, J., & Li, H. (2020). Long Term Culture of Human Kidney Proximal Tubule Epithelial Cells Maintains Lineage Functions and Serves as an Ex vivo Model for Coronavirus Associated Kidney Injury. *Virologica Sinica*. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00253-y>
- Xu, L., Liu, J., Lu, M., Yang, D., & Zheng, X. (2020). Liver injury during highly pathogenic human coronavirus infections. In *Liver International* (Vol. 40, Issue 5, pp. 998–1004). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/liv.14435>
- Yang, L., Han, Y., Nilsson-Payant, B. E., Gupta, V., Wang, P., Duan, X., Tang, X., Zhu, J., Zhao, Z., Jaffré, F., Zhang, T., Kim, T. W., Harschnitz, O., Redmond, D., Houghton, S., Liu, C., Naji, A., Ciceri, G., Guttikonda, S., ... Chen, S. (2020). A Human Pluripotent Stem Cell-based Platform to Study SARS-CoV-2 Tropism and Model Virus Infection in Human Cells and Organoids. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.06.015>
- Yano, T., Kanoh, H., Tamura, A., & Tsukita, S. (2017). Apical cytoskeletons and junctional complexes as a combined system in epithelial cell sheets. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1405*(1), 32–43. <https://doi.org/10.1111/nyas.13432>
- Zhang, B. Z., Chu, H., Han, S., Shuai, H., Deng, J., Hu, Y. fan, Gong, H. rui, Lee, A. C. Y., Zou, Z., Yau, T., Wu, W., Hung, I. F. N., Chan, J. F. W., Yuen, K. Y., & Huang, J. D. (2020). SARS-CoV-2 infects human neural progenitor cells and brain organoids. In *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0390-x>
- Zhao, X., Li, C., Liu, X., Chiu, M. C., Wang, D., Wei, Y., Chu, H., Cai, J.-P., Hau-Yee Chan, I., Kak-Yuen Wong, K., Fuk-Woo Chan, J., Kai-Wang To, K., Yuen, K. Y., & Zhou, J. (2021). Human Intestinal Organoids Recapitulate Enteric Infections of Enterovirus and Coronavirus. *Stem Cell Reports*, *16*(3), 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.02.009>
- Zhong, X. Y., Yu, T., Zhong, W., Li, J. Y., Xia, Z. S., Yuan, Y. H., Yu, Z., & Chen, Q. K. (2015). Lgr5 positive stem cells sorted from small intestines of diabetic mice differentiate into higher proportion of absorptive cells and Paneth cells in vitro. *Development Growth and Differentiation*. <https://doi.org/10.1111/dgd.12226>

- Zhou, J., Li, C., Liu, X., Chiu, M. C., Zhao, X., Wang, D., Wei, Y., Lee, A., Zhang, A. J., Chu, H., Cai, J. P., Yip, C. C. Y., Chan, I. H. Y., Wong, K. K. Y., Tsang, O. T. Y., Chan, K. H., Chan, J. F. W., To, K. K. W., Chen, H., & Yuen, K. Y. (2020). Infection of bat and human intestinal organoids by SARS-CoV-2. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0912-6>
- Zhou, J., Li, C., Zhao, G., Chu, H., Wang, D., Yan, H. H. N., Poon, V. K. M., Wen, L., Wong, B. H. Y., Zhao, X., Chiu, M. C., Yang, D., Wang, Y., Au-Yeung, R. K. H., Chan, I. H. Y., Sun, S., Chan, J. F. W., To, K. K. W., Memish, Z. A., ... Yuen, K. Y. (2017). Human intestinal tract serves as an alternative infection route for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Science Advances*. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4966>
- Zhou, Y., Rychahou, P., Wang, Q., Weiss, H. L., & Evers, B. M. (2015). TSC2/mTORC1 signaling controls Paneth and goblet cell differentiation in the intestinal epithelium. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.588>
- Zhu, N., Wang, W., Liu, Z., Liang, C., Wang, W., Ye, F., Huang, B., Zhao, L., Wang, H., Zhou, W., Deng, Y., Mao, L., Su, C., Qiang, G., Jiang, T., Zhao, J., Wu, G., Song, J., & Tan, W. (2020). Morphogenesis and cytopathic effect of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelial cells. *Nature Communications*, 11(1), 3910. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17796-z>
- Zhu, W., Ma, X., Gou, M., Mei, D., Zhang, K., & Chen, S. (2016). 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. In *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.03.014>
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(9), 564–580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>
- Zimmer, K. P., de Laffolie, J., Barone, M. V., & Naim, H. Y. (2016). Endozytose in Enterozyten. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. <https://doi.org/10.1007/s10354-016-0448-z>
- Ziv, E., & Bendayan, M. (2000). Intestinal absorption of peptides through the enterocytes. In *Microscopy Research and Technique*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(20000515\)49:4<346::AID-JEMT3>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(20000515)49:4<346::AID-JEMT3>3.0.CO;2-B)
- Zółtowska, A., Stepiński, J., Kuczkowski, J., Kamiński, M., Cynowska, B., & Kruszewski, W. (1998). Epithelial-Mesenchymal Cell Interactions and Participation of the Neuroendocrine Markers in Tumor Development. Immunohistochemical Study. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*.
- Zwicker, B. L., & Agellon, L. B. (2013). Transport and biological activities of bile acids. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.012>

## Material Suplementario 1

- **Medio ++**

Material	Cantidad (ml)	Marca	Número de catálogo
DMEM Advance F12	200	Thermofisher	12634028
Hepes (1M)	2.4	Gibco	15630080
Glutamax (100X)	2	Gibco	35050-061

- **Medio +++**

Medio ++ suplementado con Suero Fetal Bovino (Biological Industries BI/ 04-001-1ACS)

- **Solución quelante (5X)**

Material	Molaridad (nM)	g (500 ml)	Número de catálogo
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28	1.97	P5655
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40	2.7	255793-10G
NaCl	480	14	S9888-1Kg
KCl	8	0.3	P9541-500G
Sucrosa	220	37.5	S7903-1KG
D-Sorbitol	274	25	S1876-1KG
Todos de la marca Sigma Aldrich			

- **Solución quelante de trabajo (1X)**

Material	Para 250 ml	Marca	Número de catálogo
Agua Milli Q	200 ml	-	-
5x solución quelante	50 ml	-	-
DTT (0.5M)	64.75 µl	Sigma Aldrich	D0632-5G
EDTA	5.5 ml		ED2SS-500G

- **Preparación de 0.2 M de ácido acético para recubrir filtros de matrigel /colágeno**

-Stock (0.2 M)

- Tomar 0.571 ml de ácido acético y disolver en 50 ml de agua mili-Q
- Filtrar con membrana de 0.22 en condiciones de esterilidad y mantener a 4°C (Puede ser mantenido por muchos meses, siempre y cuando esté en esterilidad)

-Solución de trabajo (0.02 M)

Tomar ácido acético 0.2M (stock) y diluir 1:10 con agua mili-Q estéril. Preparar al momento de usar y sólo la cantidad necesaria. Mantener en hielo mientras se usa.

- **Composición de medio de cultivo de organoides (humano)**

Componentes	Concentración	Marca	Número de catálogo
Wnt 3a	50%	-	-
R-spond-1	25%	-	-
Medio ++	35 %	-	-
B27	2%	Gibco	17504044
N2	1%	Gibco	17502048
Penicilina/estreptomicina	1%	Gibco- Thermo Fisher	15140-122
Nicotinamida	10 mM	Calbiochem	481907
Y-27632 RHO/ROCK pathway inhibitor	1 mM	Stemcell technologies	72304
N-Acetil-L-cisteína	1.25 mM	Sigma	A9165-25G
EGF (h)	20 ng/ml	Invitrogen	BMS320
Noggin (h)	150 ng/ml	Peptotech	120-10C
FGF (h)	150 ng/ml	Peptotech	100-26
A 83-01	2 mM	Calbiochem	HY-10432
Gastrina	10 nM	Calbiochem	5-23-2301
Adaptado de(Sato, Stange, et al., 2011; Schlaermann et al., 2016)			

- **Composición de medio de cultivo de organoides (ratón)**

Componentes	Concentración	Marca	Número de catálogo
Wnt 3 <sup>a</sup> (sobrenadante)	50%	-	-
R-spond-1 (sobrenadante)	10%	-	-
Medio ++	35 %	-	-
B27	2%	Gibco	17504044
N2	1%	Gibco	17502048
Penicilina/estreptomicina	1%	Gibco- Thermo Fisher	15140-122
Nicotinamida	10 mM	Calbiochem	481907
Y-27632 RHO/ROCK Pathway Inhibitor	1 mM	Stemcell technologies	72304
N-Acetil-L-cisteína	1.25 mM	Sigma	A9165-25G
EGF (r)	20 ng/ml	Invitrogen	PMG8043
Noggin (r)	150 ng/ml	Peptotech	250-38
FGF	150 ng/ml	Peptotech	100-26
A 83-01	2 mM	Calbiochem	HY-10432
Gastrina	10 nM	Calbiochem	5-23-2301
Adaptado de (Sato, Stange, et al., 2011; Schlaermann et al., 2016)			

- **Composición del medio de cultivo ALI**

Componentes	Concentración	Marca	Número de catálogo
Wnt 3a (sobrenadante)	50%	-	-
R-spond-1 (sobrenadante)	25%	-	-
Medio ++	20%	-	-
B27	2%	Gibco	17504044
N2	1%	Gibco	17502048
Penicilina/estreptomicina	1%	Gibco- Thermo Fisher	15140-122
Nicotinamida	10 mM	Calbiochem	481907
Y-27632 RHO/ROCK Pathway Inhibitor	1 mM	Stemcell technologies	72304
EGF (r o h)	20 ng/ml	Invitrogen	PMG8043
Noggin (r o h)	150 ng/ml	Peprtech	250-38
FGF	150 ng/ml	Peprtech	100-26
Alkl	2 mM	Calbiochem	HY-10432
Gastrina	10 nM	Calbiochem	5/23/2301

Adaptado de: (Boccellato et al., 2018; Holthaus, Kraft, et al., 2021; Wilke et al., 2019)

- **Composición del medio TYI-S33 para *G. intestinalis* (Keister, 1983)**

Componentes	g	Marca	Número de catálogo
Peptona Biotriptasa	10	BD	252606
Bilis bovina	0.25	Sigma	B8381-100G
Extracto de levadura	5	BD	211929
Dextrosa	5	J.T Baker	1916-01
Cloruro de sodio	1	J.T Baker	JT3624-19
L-cisteína	1	Sigma Aldrich	C7352-10MG
Ácido L-ascórbico	0.05	J.T Baker	B581-05
Fosfato de potasio monobásico	0.3	Merck	4873
Fosfato de potasio dibásico	0.5	J.T Baker	3252-01
Citrato férrico	0.0115	Sigma Aldrich	F-5879
Suero bovino adulto	10%	Microlab	SU-146
Penicilina/estreptomicina	1%	Gibco- Thermo Fisher	15140-122

- **Lista de anticuerpos utilizados para las inmunofluorescencias**

Antígeno	Host	Marca	Número de catálogo
<b>Anticuerpos primarios</b>			
Mucina-2	anti-ratón	Abcam	11197
Villina-1	anti-conejo		130751
E-caderina	anti-ratón		231303
Occludin	anti-conejo	Invitrogen	PA5-30230
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
Alexa flour 488 donkey	anti-ratón	Thermo Fisher	A21202
Alexa flour 488 donkey	anti-conejo		A21206
Alexa fluor 647 donkey	anti-ratón		A31571
Alexa fluor 647 donkey	anti-conejo		A31573

## Material Suplementario 2

Resultados del análisis de espectrometría de masas identificados para <i>Mus musculus</i>	
Número de acceso	Descripción de la proteína
Q6GQT1	Alpha-2-macroglobulin-P
P32261	Antithrombin-III
Q00623	Apolipoprotein A-I
D3YX85	Arf-GAP with SH3 domain_ ANK repeat and PH domain-containing protein 2
A2AHC3	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1
E9QKK1	Centromere-associated protein E
E9Q9M0	Centrosomal protein of 290 kDa
E9Q9B8	Clusterin (Fragment)
P01027	Complement C3
G3X9R0	Cylicin_ basic protein of sperm head cytoskeleton 1
Q01320	DNA topoisomerase 2-alpha
E9PW83	Family with sequence similarity 184_ member A
Q75N62	GTPase IMAP family member 8
P08730-2	Isoform 2 of Keratin_ type I cytoskeletal 13
P02535-3	Isoform 3 of Keratin_ type I cytoskeletal 10
P02535-3	Isoform 3 of Keratin_ type I cytoskeletal 10
C4P6S0-2	Isoform 4 of Sperm head and tail associated protein
B1AQ77	Keratin 15_ isoform CRA_a
E9Q0F0	Keratin 78
E9Q1Z0	Keratin 90
A2A513	Keratin_ type I cytoskeletal 10
P08730	Keratin_ type I cytoskeletal 13
Q61781	Keratin_ type I cytoskeletal 14
Q9QWL7	Keratin_ type I cytoskeletal 17
Q6IFX2	Keratin_ type I cytoskeletal 42
P04104	Keratin_ type II cytoskeletal 1
Q3TTY5	Keratin_ type II cytoskeletal 2 epidermal
Q922U2	Keratin_ type II cytoskeletal 5
Q922U2	Keratin_ type II cytoskeletal 5
Q3UV11	Keratin_ type II cytoskeletal 6B
Q9R0H5	Keratin_ type II cytoskeletal 71
Q6NXH9	Keratin_ type II cytoskeletal 73
Q6IFZ9	Keratin_ type II cytoskeletal 74
A0A2I3BQN1	NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1
P70670	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha_ muscle-specific form
F6XZA4	NF-kappa-B inhibitor-interacting Ras-like protein 2 (Fragment)

Q501J6	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17
D3YXR5	Protein PML
O88978	Protein tilB homolog
Q8C898	RIKEN cDNA C130026I21 gene
P07724	Serum albumin
A2ANL9	Teneurin-1
J3KMH5	Transport and Golgi organization protein 1 homolog
A0A2R8VHP3	Uncharacterized protein
A0A2R8VHP3	Uncharacterized protein
F8VPM9	Zinc finger protein 40

<b>Resultados del análisis de espectrometría de masas identificados para <i>Bos taurus</i></b>	
Número de acceso	Descripción de la proteína
ADIPO_BOVIN	Adiponectin
ALBU_BOVIN	Albumin
A0A140T897_BOVIN	Albumin
A1AT_BOVIN	Alpha-1-antiproteinase
FETUA_BOVIN	Alpha-2-HS-glycoprotein
A2MG_BOVIN	Alpha-2-macroglobulin
A0A3Q1NG86_BOVIN	Alpha-S1-casein
A0A644EZ15_GIAIC	Ankyrin repeat protein 3
ANT3_BOVIN	Antithrombin-III
APOA1_BOVIN	Apolipoprotein A-I
APOD_BOVIN	Apolipoprotein D
Q1RMT5_BOVIN	Armadillo repeat containing X-linked 2
G3X6N3_BOVIN	Beta-1 metal-binding globulin
A0A3Q1LRP5_BOVIN	C3/C5 convertase
A0A3Q1M3W0_BOVIN	Calmodulin regulated spectrin associated protein 1
CO3_BOVIN	Complement C3
CO4_BOVIN	Complement C4 (Fragments)
G3N0V2_BOVIN	Cytokeratin-1
FETUB_BOVIN	Fetuin-B
A0A3Q1MKX8_BOVIN	Gc-globulin
F1N5M2_BOVIN	Gc-globulin
HBBF_BOVIN	Hemoglobin fetal subunit beta
HBB_BOVIN	Hemoglobin subunit beta
HEMO_BOVIN	Hemopexin
M0QVY0_BOVIN	IF rod domain-containing protein
F1MUJ2_BOVIN	IF rod domain-containing protein

A0A3Q1LWV8_BOVIN	Ig-like domain-containing protein
A0A3Q1LT19_BOVIN	Ig-like domain-containing protein
A0A3Q1M1Z4_BOVIN	Ig-like domain-containing protein
A0A3Q1LT19_BOVIN	Ig-like domain-containing protein
F1MLW7_BOVIN	Ig-like domain-containing protein
Q3SYR8_BOVIN	Immunoglobulin J chain
A0A3Q1LK49_BOVIN	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2
G3MZ71_BOVIN	Keratin 2
K1C10_BOVIN	Keratin_type I cytoskeletal 10
F1MC11_BOVIN	Keratin_type I cytoskeletal 14
M0QVZ6_BOVIN	Keratin_type II cytoskeletal 5
A0A3Q1MKC8_BOVIN	Keratin_type II cytoskeletal 7
K2C75_BOVIN	Keratin_type II cytoskeletal 75
A0A3Q1LSV1_BOVIN	Keratin_type II cytoskeletal 75
K2C80_BOVIN	Keratin_type II cytoskeletal 80
F1MEN5_BOVIN	Lymphocyte expansion molecule
AOCX_BOVIN	Primary amine oxidase_liver isozyme
F71F1_BOVIN	Protein FAM71F1
HP20_BOVIN	Protein HP-20 homolog
E1BJG2_BOVIN	Radial spoke head 6 homolog A
A0A3Q1MRK0_BOVIN	Rho GTPase-activating protein 10 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ARHGAP10 PE=4 SV=1
E1BLA5_BOVIN	Rho guanine nucleotide exchange factor 33
TRFE_BOVIN	Serotransferrin
TRFE_BOVIN	Serotransferrin
SPA31_BOVIN	Serpin A3-1
SPA32_BOVIN	Serpin A3-2
SPA35_BOVIN	Serpin A3-5
A0A0A0MP92_BOVIN	Serpin A3-7
A0A0A0MP92_BOVIN	Serpin A3-7
G8JKW7_BOVIN	Serpin A3-7
A0A0A0MPA0_BOVIN	SERPIN domain-containing protein
TTHY_BOVIN	Transthyretin
A0A3Q1M4K3_BOVIN	Ubiquitin-like domain-containing protein
A0A3Q1NH68_BOVIN	Uncharacterized protein
A0A3Q1MCP0_BOVIN	Uncharacterized protein
A0A3Q1LPG0_BOVIN	Uncharacterized protein
A0A3Q1N3I9_BOVIN	Uncharacterized protein
A0A3Q1M3L6_BOVIN	Uncharacterized protein
F1MZ96_BOVIN	Uncharacterized protein



G3N0S9_BOVIN	Uncharacterized protein
F1N160_BOVIN	Uncharacterized protein
D3KHM4_GIAIC	Uncharacterized protein
A8B2W0_GIAIC	Uncharacterized protein
VTDB_BOVIN	Vitamin D-binding protein

## Apéndice

### Lista de publicaciones realizadas durante el doctorado

#### *Aceptadas*

- Talamás-Lara D, Lagunes-Guillen A, Chávez-Munguía B, Salazar-Villatoro L, **Acosta-Virgen K**, Omaña-Molina M, Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. (2022). *Acanthamoeba castellanii*: Effect of neuroactive substances on trophozoite migration. *Exp Parasitol.* 10:108245. doi: 10.1016/j.exppara.2022.108245.
- Espinosa-Cantellano M, Chávez-Munguía B, Talamás-Lara D, **Acosta-Virgen K**, Martínez-Palomo A. (2022). *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* In: de Souza, W. (eds) Lifecycles of Pathogenic Protists in Humans. *Microbiology Monographs*, vol 35. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-80682-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-80682-8_10).
- Núñez-Muñoz L, Marcelino-Pérez G, Calderón-Pérez B, Pérez-Saldívar M, **Acosta-Virgen K**, González-Conchillos H, Vargas-Hernández B, Olivares-Martínez A, Ruiz-Medrano R, Roa-Velázquez D, Morales-Ríos E, Ramos-Flores J, Torres-Franco G, Peláez-González D, Fernández-Hernández J, Espinosa-Cantellano M, Tapia-Sidas D, Ramírez-Pool JA, Padilla-Viveros A, Xoconostle-Cázares B. (2021). Recombinant Antigens Based on Non-Glycosylated Regions from RBD SARS-CoV-2 as Potential Vaccine Candidates against COVID-19. *Vaccines* (Basel). 20;9(8):928. doi: 10.3390/vaccines9080928.
- Talamás-Lara D, **Acosta-Virgen K**<sup>24</sup>, Chávez-Munguía B, Lagunes-Guillén A, Salazar-Villatoro L, Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Golgi apparatus components in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* after monensin treatment. *Microsc Res Tech.* 84(8):1887-1896. doi: 10.1002/jemt.23745.

---

<sup>24</sup> Talamás-Lara y Acosta-Virgen comparten coautoría como primeros autores.

- Talamás-Lara D, Rosales-Encina JL, Chávez-Munguía B, **Acosta-Virgen K**, Hernández-Ramírez VI, Salazar-Villatoro L, Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A, Talamás-Rohana P. (2020) *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Morphological and Behavioral Differences Induced by Fibronectin through GTPases Activation and Actin-Binding Proteins. *J Eukaryot Microbiol.*;67(4):491-504. doi: 10.1111/jeu.12797.
- **Acosta-Virgen K**, Chávez-Munguía B, Talamás-Lara D, Lagunes-Guillén A, Martínez-Higuera A, Lazcano A, Martínez-Palomo A, Espinosa-Cantellano M. (2018). *Giardia lamblia*: Identification of peroxisomal-like proteins. *Exp Parasitol.*191:36-43. doi: 10.1016/j.exppara.2018.06.006.

#### *Enviadas*

**Acosta-Virgen K**, Vallejo-Flores G, Salazar-Villatoro LI, Talamás-Lara D, Vargas-Hernández B., Chávez-Munguía B, Torres J, Martínez-Palomo A, Espinosa-Cantellano M. (2022). Early stages of *Giardia intestinalis* infection in a murine duodenal organoid-derived monolayer on an air-liquid interface System.

#### *En elaboración*

**Acosta-Virgen K**, Vallejo-Flores G, Salazar-Villatoro LI, Vargas-Hernández B., Torres J, Martínez-Palomo A, Espinosa-Cantellano M. (2022). Organoid-derived monolayer of human duodenal Mexican patients to study *G. intestinalis* infection.