

**Universidad Católica de Santa María**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y**  
**Biotechnológicas**  
**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**



**ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN  
ORGANOIDES DE COLON MURINO EXPUESTAS AL MEDIO CONDICIONADO  
L-WRN Y EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE TIAMINA  
(THR1)**

Tesis presentada por la Bachiller:

**Sarmiento Sanchez, Lenny Orana**

Para optar el Título Profesional de

**Químico Farmacéutica**

Asesoras:

**M. Sc. Medina Pérez, Jeaneth  
Marisol**

**H.D.R. PhD Lestavel, Sophie**

**Arequipa – Perú**

**2022**

# DICTAMEN DE APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS. -

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FARMACIA Y BIOQUIMICA**  
**TITULACIÓN CON TESIS**  
**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 04 de Enero del 2022

**Dictamen: 003311-C-EPPyB-2022**

Visto el borrador del expediente 003311, presentado por:

**2014203712 - SARMIENTO SANCHEZ LENNY ORANA**

Titulado:

**ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN ORGANOIDES DE COLON MURINO EXPUESTAS AL MEDIO CONDICIONADO L-WRN Y EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE TIAMINA (THR1)**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

**0737 - PAZ ALIAGA CARLOS EITEL IVAN  
DICTAMINADOR**



**1051 - VILLANUEVA SALAS JOSE ANTONIO  
DICTAMINADOR**



**2782 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY  
DICTAMINADOR**



**AUTORIZACIÓN DE USO DE TEMA – LILLE, FRANCIA. -**



**Unité 1011 : Récepteurs Nucléaires, Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires**  
Dir. Pr Bart STAELS

Sophie LESTAVEL  
Tel : (33) 3 20 97 42 13  
Fax : (33) 3 20 97 42 01  
e.mail : sophie.lestavel@univ-lille.fr

Lenny-Orana SARMIENTO SANCHEZ performed a training period in our laboratory from 1<sup>st</sup> January to 30<sup>th</sup> April 2019.

Our group is interested in the nuclear receptors in the intestine and their role in the control of energy homeostasis. She participated to our experiments using human and mouse intestinal organoids, new organotypic models recently set up in our lab to understand intestinal physiopathology. As principal investigator of this project, I **authorize Lenny-Orana to use the data obtained and write her thesis** entitled "Analysis of proliferation and cellular differentiation of murine colon organoids exposed to the L-WRN conditioning medium and evaluation of the expression of the thiamine receptor (THR1)".

To whom it may concern,

Lille, 23<sup>rd</sup> February 2021

Sophie Lestavel, Professor HDR


INSERM U1011 – Université Lille



INSERM U1011 - Institut Pasteur de Lille - 1 rue du Professeur Calmette - B.P 245 - 59019 Lille Cedex  
INSERM U1011 - Faculté de Médecine - Pôle Recherche - Bâtiment J&K - Boulevard du Professeur Leclercq - 59045 Lille Cedex  
INSERM U1011 - Faculté de Pharmacie - 3 rue du Professeur Lagneau - B.P 83 - 59006 Lille Cedex

## DEDICATORIA

*A Dios, que cuida de mí, guía mi camino y me brinda la oportunidad de lograr cumplir todas mis metas. A la Virgen María, por protegerme siempre ante cualquier adversidad y velar por la salud de toda mi familia.*



*A mis padres, Gleen Abdon Sarmiento Pérez y Mery Luz Sánchez Condori, por su apoyo incondicional, su constante motivación y ejemplo de superación. Por haber confiado en mí, brindarme su amistad y presencia en todos los momentos de mi vida. Por la formación académica, emocional y artística que me brindaron, basándose en principios y valores notables, los cuales siempre me inculcaron y enseñaron con el ejemplo.*

*A toda mi familia, abuelos, tíos, primos y sobrinos, por ser una parte muy importante de mi vida, por motivarme a ser mejor cada día, por compartir momentos alegres conmigo y recalcar me la importancia de la unidad familiar.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres Gleen Sarmiento Pérez y Mery Luz Sanchez, gracias por creer en mí.*

*A la H.D.R. PhD. Sophie Lestavel, por su apoyo y orientación académica, por incorporarme en las actividades que fomentaron mis conocimientos y ampliaron mi visión en la ciencia.*

*A la Mgtr. Jeaneth Medina Pérez, por brindarme todo su apoyo, impulsar la mejora de mi persona en todos los aspectos y por todos sus sabios consejos.*

*Al PhD. José Villanueva Salas, por su amistad y confianza hacia mi persona, por ofrecerme su apoyo incondicional y aconsejarme sabiamente, también por ser quien me inspira a mejorar y me inculca a desarrollar el pensamiento crítico. Le estaré eternamente agradecida por ser el soporte y la mano firme que necesité.*

*A la Mgtr. Julitza Paredes Fuentes y al Mgtr. Carlos E. Iván Paz, por su apoyo y sus valiosas correcciones.*

*Al PhD. Jaime Cárdenas García, al Ing. José Carpio Carpio y todos los docentes de la facultad, por compartir sus experiencias y conocimientos logrando motivarme día a día.*

*Al INSERM 1011 J&K y al Institut Pasteur de Lille, en especial a la estudiante PhD Sarah Ducastel por sus enseñanzas y su valiosa amistad, al estudiante Daniel Sánchez, por ser quien me apoyo incondicionalmente en cada momento, y a todo el equipo.*

*A Philippe Chavatte, por concederme la oportunidad de acceder al INSERM y por su vital apoyo en la gestión del uso de tema como tesis.*

*A Fabrizio Johnson Corrales, por apoyarme y enseñarme lo que es una verdadera amistad.*

*Al laboratorio de investigación Proyecto Mercurio y la UCSM, por ser los lugares donde concreté mis ideales, aprendí a desenvolverme y donde encontré mi vocación.*

*Gracias.*

## RESUMEN

En los últimos años, los organoides han sido considerados como una de las innovaciones revolucionarias del mundo científico, ya que se trata de un gran avance en la investigación biológica y biomédica moderna. El desarrollo del modelo organoide pretende simular la fisiología y procesos bioquímicos de un ser vivo desde una perspectiva molecular hasta un enfoque celular, tisular y orgánico, razón por la cual son denominados como “mini-órganos”. Los organoides intestinales cobran gran importancia en estudios bioquímicos y farmacológicos, debido a que son considerados como modelos 3D que permitirían la evaluación de la eficacia y seguridad de compuestos. El presente estudio pretende lograr la conformación del cultivo organoide de colon expuestas al medio condicionado L-WRN y despliega el análisis de proliferación y diferenciación celular de células madre adultas haciendo uso de biomarcadores de proliferación (Ki67) y de células madre (LGR5); además de la evaluación de la expresión del receptor de tiamina 1 (THR1). La obtención de organoides surgió a partir del aislamiento de criptas intestinales de colon murino C57BL/6J sometidas a un cultivo 3D. Paralelamente, se cultivó otra línea celular denominada “L-WRN” que nos permite la obtención del medio condicionado L-WRN, el cual permitió el cultivo de células madre presentes en los organoides. El análisis de la expresión genética de MKi67, LGR5 y SLC19A2a a partir de ARNm haciendo uso de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) permitió identificar el lote de medio condicionado L-WRN más adecuado para el ensayo. El biomarcador de proliferación Ki67 tuvo gran expresión relativa en el lote 1 con respecto al lote 3, con una diferencia significativa de 0.8255 ( $P < 0.05$ , IC 95%); así también como la expresión del biomarcador de células madre LGR5 fue favorecida por lote *Ancient*, siendo la diferencia significativa más alta con respecto al lote 3, dando por resultado 0.9745 ( $P < 0.05$ , IC 95%). La expresión del gen SLC19A2 para el receptor de tiamina 1 (THR1) estuvo presente en los cuatro grupos de estudio y en mayor proporción en el último lote de medio condicionado L-WRN, el cual obtuvo la diferencia significativa más considerable con respecto al lote *Ancient*, con un valor numérico de -1.794 ( $P < 0.05$ , IC 95%).

**PALABRAS CLAVE:** Organoides, células madre, criptas intestinales, medio condicionado L-WRN, MKi67, LGR5, SLC19A2a.

## ABSTRACT

In recent years, organoids have been considered as one of the revolutionary innovations in the scientific world, as they are a breakthrough in modern biological and biomedical research. The development of the organoid model aims to simulate the physiology and biochemical processes of a living being from a molecular perspective to a cellular, tissue and organelle approach, which is why they are referred to as "mini-organs". Intestinal organoids are of great importance in biochemical and pharmacological studies because they are considered as 3D models that would allow the evaluation of the efficacy and safety of compounds. The present study aims to achieve the conformation of colon organoid culture exposed to L-WRN conditioned medium and deploys the analysis of proliferation and cell differentiation of adult stem cells using proliferation biomarkers (Ki67) and stem cells (LGR5); in addition to the evaluation of thiamine receptor 1 (THR1) expression. The organoids were obtained from the isolation of intestinal crypts from C57BL/6J murine colon subjected to 3D culture. In parallel, another cell line called "L-WRN" was cultured, allowing us to obtain the L-WRN conditioned medium, which allowed the culture of stem cells present in the organoids. Gene expression analysis of MKi67, LGR5 and SLC19A2a from mRNA using real-time quantitative PCR (RT-qPCR) allowed us to identify the most suitable batch of L-WRN conditioned medium for the assay. The proliferation biomarker Ki67 had high relative expression in batch 1 with respect to batch 3, with a significant difference of 0.8255 ( $P < 0.05$ , 95% CI); as well as the expression of the stem cell biomarker LGR5 was favored by batch Ancient, with the highest significant difference with respect to batch 3, resulting in 0.9745 ( $P < 0.05$ , 95% CI). The expression of the SLC19A2 gene for thiamine receptor 1 (THR1) was present in all four study groups and in higher proportion in the last batch of L-WRN conditioned medium, which obtained the most considerable significant difference with respect to the ancient batch, with a numerical value of -1.794 ( $P < 0.05$ , 95% CI).

**KEYWORDS:** Organoids, stem cells, intestinal crypts, L-WRN conditioned medium, MKi67, LGR5, SLC19A2a.

## SOMMAIRE

Ces dernières années, les organoïdes ont été considérés comme l'une des innovations révolutionnaires du monde scientifique, car ils constituent une percée dans la recherche biologique et biomédicale moderne. Le développement du modèle organoïde vise à simuler la physiologie et les processus biochimiques d'un être vivant d'un point de vue moléculaire à une approche cellulaire, tissulaire et organelle, raison pour laquelle on les appelle des "mini-organes". Les organoïdes intestinaux sont d'une grande importance dans les études biochimiques et pharmacologiques, car ils sont considérés comme des modèles 3D qui permettraient d'évaluer l'efficacité et la sécurité des composés. La présente étude vise à réaliser la conformation d'une culture organoïde du côlon exposée au milieu conditionné L-WRN et déploie l'analyse de la prolifération cellulaire et de la différenciation des cellules souches adultes en utilisant des biomarqueurs de prolifération (Ki67) et des biomarqueurs de cellules souches (LGR5); en plus de l'évaluation de l'expression du récepteur 1 de la thiamine (THR1). Les organoïdes ont été obtenus à partir de l'isolement de cryptes intestinales du côlon de souris C57BL/6J soumises à une culture en 3D. En parallèle, une autre lignée cellulaire appelée "L-WRN" a été cultivée, ce qui nous a permis d'obtenir le milieu conditionné L-WRN, lequel a permis la culture des cellules souches présentes dans les organoïdes. L'analyse de l'expression génétique de MKi67, LGR5 et SLC19A2a à partir de l'ARNm par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) nous a permis d'identifier le lot de milieu conditionné L-WRN le plus approprié pour le test. Le biomarqueur de prolifération Ki67 présentait une expression relative élevée dans le lot 1 par rapport au lot 3, avec une différence significative de 0,8255 ( $P < 0,05$ , IC 95 %); de même, l'expression du biomarqueur de cellules souches LGR5 était favorisée par le lot Ancien, avec la différence significative la plus élevée par rapport au lot 3, résultant en 0,9745 ( $P < 0,05$ , IC 95 %). L'expression du gène SLC19A2 du récepteur 1 de la thiamine (THR1) était présente dans les quatre groupes d'étude et dans une proportion plus élevée dans le dernier lot de milieu conditionné L-WRN, qui a obtenu la différence significative la plus considérable par rapport à l'ancien lot, avec une valeur numérique de -1,794 ( $P < 0,05$ , IC 95 %).

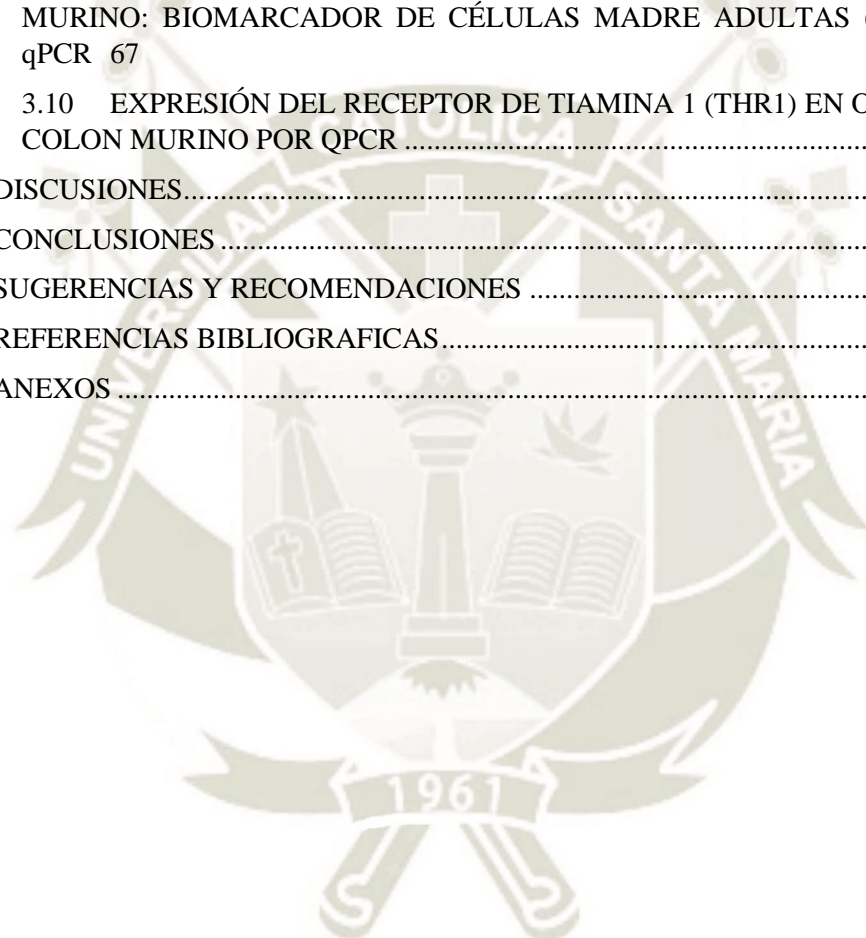
Keyword: Organoïdes, cellules souches, cryptes intestinales, milieu conditionné L-WRN, MKi67, LGR5, SLC19A2a.

## ÍNDICE

DICTAMEN DE APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS. - .....	i
AUTORIZACIÓN DE USO DE TEMA – Lille, Francia. - .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
RESUMEN .....	v
ABSTRACT.....	vi
SOMMAIRE.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
INDICE DE ANEXOS .....	xiii
ABREVIATURAS.....	xiv
OBJETIVOS .....	xvii
HIPÓTESIS.....	xviii
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO .....	1
1.1    El intestino y su rol en el sistema digestivo .....	2
1.1.1    Anatomía macroscópica del intestino .....	2
1.1.2    Anatomía microscópica del intestino.....	3
1.2    Organoides .....	5
1.2.1    Organoides intestinales .....	6
1.2.1.1    Células madre intestinales.....	7
1.2.1.1.1    LGR5 (Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5) 8	
1.2.2    Crecimiento, proliferación y diferenciación de organoides .....	9
1.2.2.1    Vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina/R-espondina .....	10
1.2.2.2    Inhibidor de BMP Noggin.....	13
1.2.3    Marcador de proliferación: Ki-67 .....	13
1.3    Tiamina y sus transportadores celulares .....	14
1.3.1    Generalidades.....	14
1.3.2    Aspectos bioquímicos de Transporte y Metabolismo de Tiamina .....	15
1.3.3    Condiciones adquiridas por deficiencia de Tiamina: Enfermedad Beriberi y Encefalopatía de Wernicke .....	16
1.3.4    Tiamina: Síndromes de disfunción del metabolismo de tiamina por errores genéticos 17	
1.3.5    Tiamina y enfermedades metabólicas: Diabetes mellitus .....	18
1.4    Reacción en cadena de la polimerasa: PCR y RT-PCR .....	20
1.4.1    Fundamento de la RT-qPCR en tiempo real .....	21
1.4.2    Etapas de la PCR.....	21
1.4.2.1    Desnaturalización.....	21
1.4.2.2    Hibridación .....	22

1.4.2.3	Extensión.....	22
1.4.3	Detección de productos amplificados .....	22
1.4.4	Señal de fluorescencia.....	23
1.4.5	Análisis de Resultados .....	23
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....		26
2.1	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	26
2.1.1	Ubicación .....	26
2.1.1.1	Ubicación Geográfica .....	26
2.1.2	Área de Trabajo.....	28
2.1.3	Actividades y Reconocimientos de la U1011 .....	28
2.2	MATERIALES E INSTRUMENTOS .....	29
2.2.1	EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO.....	29
2.2.2	KITS.....	29
2.2.3	MATERIAL BIOLÓGICO .....	29
2.2.4	MATERIAL DE PLÁSTICO.....	29
2.2.5	REACTIVOS .....	30
2.3	MÉTODOS .....	31
2.3.1	PROTOCOLOS EN ANIMALES .....	31
2.3.2	ORGANOIDES INTESTINALES: OBTENCIÓN Y CULTIVO .....	32
2.3.2.1	AISLAMIENTO DE CRIPTAS INTESTINALES PARA LA OBTENCIÓN DE ORGANOIDES INTESTINALES .....	32
2.3.2.2	CULTIVO ORGANOIDE DE CRIPTAS INTESTINALES AISLADAS	33
2.3.2.2.1	<i>Passage</i> de Cultivo de Organoides Intestinales .....	34
2.3.3	CULTIVO CELULAR Y PRODUCCIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO L-WRN	35
2.3.3.1	PRODUCCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO L-WRN .....	36
2.3.4	DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS .....	37
2.3.4.1	Eficiencia por RT-qPCR .....	39
2.3.5	ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL .....	40
2.3.5.1	Extracción y dosaje de ARN.....	40
2.3.5.2	Síntesis de ADNc por retro transcripción .....	41
2.3.5.3	PCR cuantitativa (qPCR) .....	42
2.3.6	Análisis Estadístico.....	42
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....		46
3.1	PROTOCOLO EN ANIMALES: SACRIFICIO MURINO .....	46
3.2	ORGANOIDES INTESTINALES: obtención y cultivo.....	46
3.2.1	AISLAMIENTO DE CRIPTAS INTESTINALES: OBTENCIÓN.....	46
3.2.2	CULTIVO DE ORGANOIDES INTESTINALES DE COLON MURINO..	47
3.3	CULTIVO CELULAR Y PRODUCCION DE MC L-WRN .....	49
3.3.1	PRODUCCIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO L-WRN.....	50
3.4	ORGANOIDES DE COLON MURINO EXPUESTOS A LOS DIFERENTES LOTES DE MEDIO CONDICIONADO L-WRN.....	50

3.5	EXTRACCIÓN Y DOSAJE DE ARN .....	55
3.5.1	DOSAJE DE ARN .....	56
3.6	OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA LOS GENES DE INTERES .....	57
3.6.1	EFICIENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS POR qPCR.....	57
3.7	AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR).....	63
3.8	BIOMARCADOR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (MKI67) POR RT-qPCR	65
3.9	DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN ORGANOIDES DE COLON MURINO: BIOMARCADOR DE CÉLULAS MADRE ADULTAS (LGR5) POR RT-qPCR	67
3.10	EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE TIAMINA 1 (THR1) EN ORGANOIDES DE COLON MURINO POR QPCR .....	69
	DISCUSIONES.....	71
	CONCLUSIONES .....	76
	SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES .....	77
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	78
	ANEXOS .....	85



## ÍNDICE DE FIGURAS

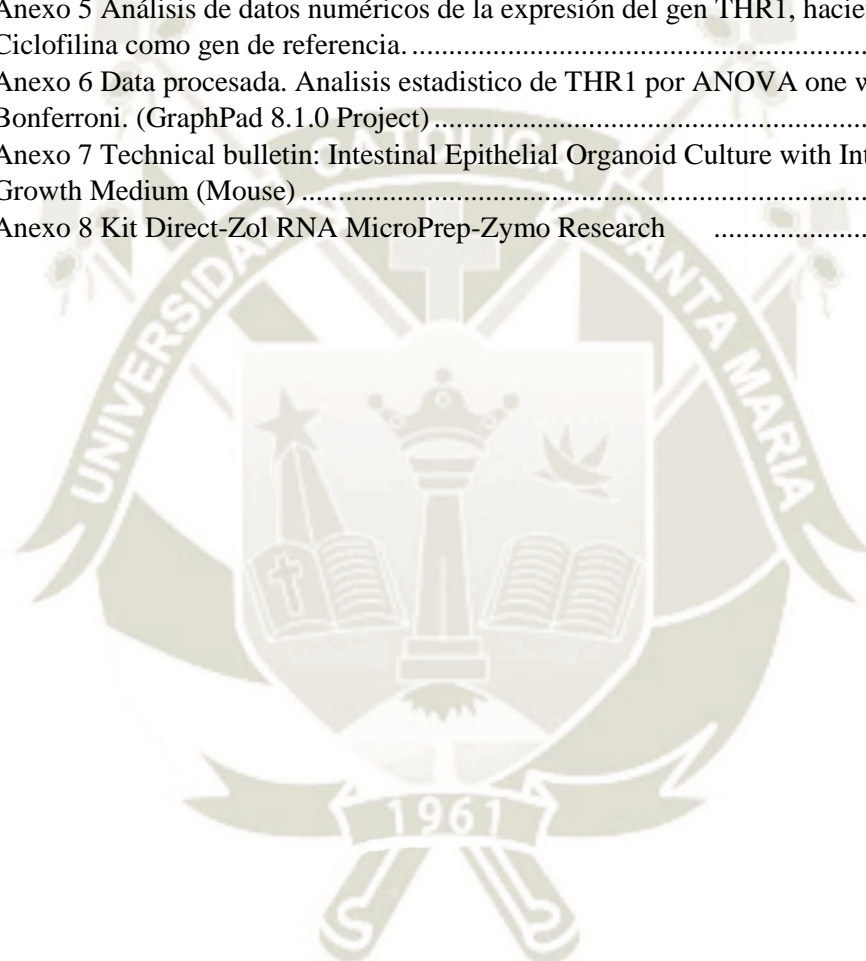
Figura 1 Anatomía microscópica de la Cripta Intestinal.....	4
Figura 2 Organoides intestinales.....	6
Figura 3 Organoides intestinales de ratón relacionados con Wnt.(20) .....	9
Figura 4 La vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina.(20) .....	10
Figura 5 Bucles de retroalimentación de regulación e importancia de la R-espandina.(20)..	11
Figura 6 El nicho de células madre de la cripta intestinal.(20).....	12
Figura 7 Estructura química de tiamina y su forma activa piro fosfatada. (Fuente: Diseño propio bajo la plataforma de Fishersci.com).....	15
Figura 8 Vía de transporte, metabolismo y función de cofactor de la tiamina.(35).....	16
Figura 9 Disfunción metabólica relacionada con el desarrollo de complicaciones diabéticas revertidas con un tratamiento de tiamina a altas dosis.(33) .....	19
Figura 10 Métodos de detección con reporteros no específicos en PCR.(55).....	23
Figura 11 Curva de amplificación en PCR.(55).....	24
Figura 12 Curva de disociación (Curva Melting) para la especificidad de la reacción.(55)..	24
Figura 13 Ubicación geográfica del Laboratorio J&K Inserm, Lille-Francia.....	26
Figura 14 Laboratorio J&K INSERM Lille. Fuente: Google Maps.....	27
Figura 15 Cepa murina C57BL/6J(2).....	31
Figura 16 Kit IntestiCult™ para Organoides murinos.....	32
Figura 17 Cultivo Celular y Producción de Medio Condicionado L-WRN.....	36
Figura 18 Primer-BLAST, especificaciones para el diseño de cebadores.....	38
Figura 19 Primer-BLAST, herramienta de diseño de cebadores.....	38
Figura 21 Fracción N°4 de Criptas intestinales (1mL).....	47
Figura 22 Medio intesticult y medio L-WRN (stock de laboratorio).....	48
Figura 23 Placa de cultivo COSTAR.....	48
Figura 24 Cultivo de Organoides Intestinales Colónicos (Fuente propia).....	49
Figura 25 Células de la línea celular L-WRN (ATCC® CRL-3276™).....	49
Figura 27 Distribución de los grupos de estudio de Organoides intestinales.....	51
Figura 28 Eficiencia de oligonucleótidos para THR1a (SLC19A2v1).....	60
Figura 29 Eficiencia de oligonucleótidos para THR1b (SLC19A2v2).....	61
Figura 30 Eficiencia de oligonucleótidos para THR2 (SLC19A3).....	62
Figura 31 Preparación de la placa de 96 pocillos para RT-qPCR sobre una cama de hielo. .	64
Figura 32 Resultados de la expresión del biomarcador de proliferación Ki67 en Organoides de colon murino por RT-qPCR. Grupos de estudio expuestos a diferentes lotes de Medio Condicionado L-WRN.....	66
Figura 33 Resultados de la expresión del biomarcador de células madre adultas LGR5 en Organoides de colon murino por RT-qPCR. Grupos de estudio expuestos a diferentes lotes de Medio Condicionado L-WRN.....	68
Figura 34 Resultados de la expresión del receptor de tiamina 1 (THR1) en Organoides de colon murino por RT-qPCR. Grupos de estudio expuestos a diferentes lotes de Medio Condicionado L-WRN.....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Errores genéticos vinculados con el metabolismo de Tiamina(37) .....	18
Tabla 8 Composición del Medio de Crecimiento Organoide (MCO).....	33
Tabla 2 Plan de placa: Posición de la muestra diluida en la Q-PCR.....	39
Tabla 3 Plan de Composición del MIX Q-PCR.....	39
Tabla 11 Plan de posición de muestras para la eficacia de oligonucleótidos en RT-qPCR. 40	40
Tabla 4 RT: Cantidades para la preparación del Master Mix .....	41
Tabla 5 RT: Condiciones térmicas de los ciclos. ....	42
Tabla 6 Programación del ciclo de la RT-qPCR.....	42
Tabla 14 Plan de posición de muestras: distribución para el gen de referencia (Ciclofilina) y para el biomarcador de proliferación (Ki67).....	44
Tabla 15 Plan de posición de muestras: distribución para el biomarcador de células madre adultas (LGR5) y para el receptor de tiamina 1 (THTR1) .....	44
Tabla 7 Cálculo del volumen de fracción compuesto por criptas intestinales .....	47
Tabla 9 Crecimiento de Organoides Intestinales Colónicos expuestos a diferentes grupos de Medio Condicionado L-WRN durante 5 días. Fotografías progresivas a x100 bajo un microscopio invertido. Cada fotografía está al lado de su diagrama de opacidad. ....	52
Tabla 10 Dosaje de ARN de Organoides de colon usando el protocolo Direct-zol. Los valores denotan la concentración ( ) y los índices de pureza (260/280) (260/230).....	56
Tabla 12 Diseño de primers en la herramienta bioinformática NCBI-Primer BLAST para los genes de interés. ....	59
Tabla 13 Corrección de la concentración de muestras de ARN de organoides de colon para RT-qPCR. Preparación de las diluciones correspondientes a cada muestra para 0.1g y preparación de blancos.....	65

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Ki67, haciendo uso de la Ciclofilina como gen de referencia. ....	85
Anexo 2 Data procesada. Analisis estadístico de KI67 por ANOVA one way y test de Bonferroni. (GraphPad 8.1.0 Project) .....	86
Anexo 3 Análisis de datos numéricos de la expresión del gen LGR5, haciendo uso de la Ciclofilina como gen de referencia. ....	87
Anexo 4 Data procesada. Analisis estadístico de LGR5 por ANOVA one way y test de Bonferroni. (GraphPad 8.1.0 Project) .....	88
Anexo 5 Análisis de datos numéricos de la expresión del gen THR1, haciendo uso de la Ciclofilina como gen de referencia. ....	89
Anexo 6 Data procesada. Analisis estadístico de THR1 por ANOVA one way y test de Bonferroni. (GraphPad 8.1.0 Project) .....	90
Anexo 7 Technical bulletin: Intestinal Epithelial Organoid Culture with IntestiCult Organoid Growth Medium (Mouse) .....	91
Anexo 8 Kit Direct-Zol RNA MicroPrep-Zymo Research .....	101

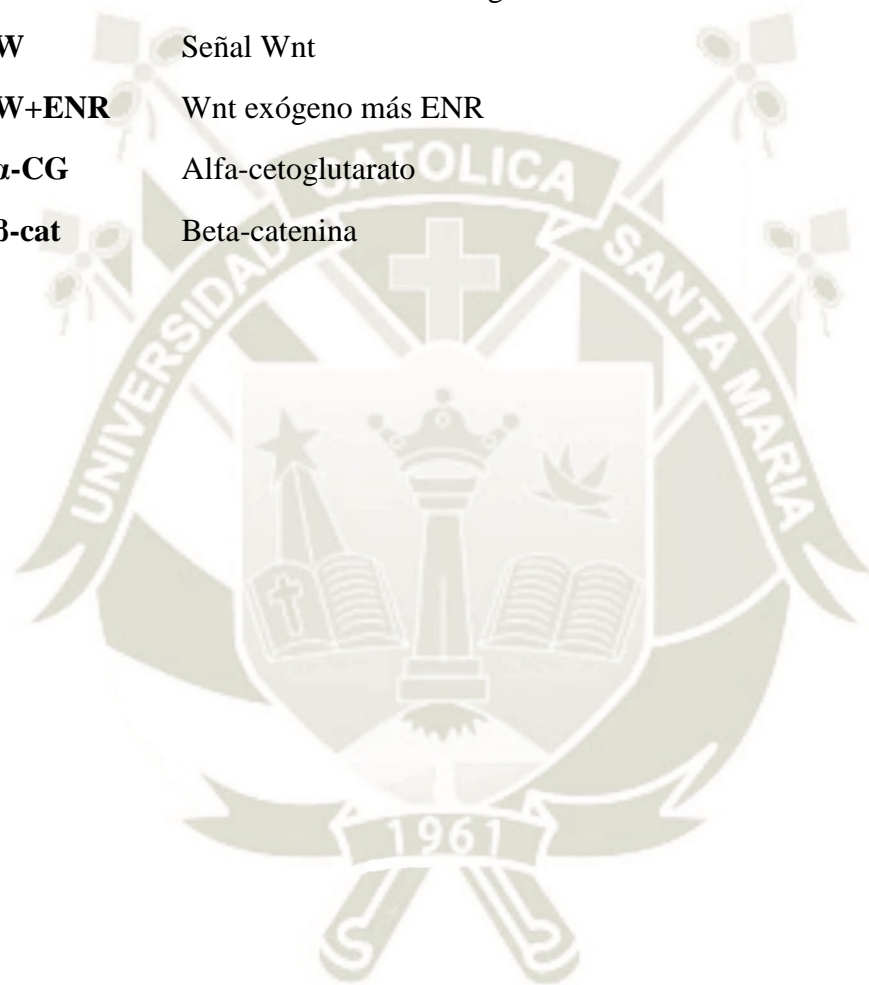


## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BCKDc</b>	$\alpha$ -cadena ramificada deshidrogenasa
<b>BCQDc</b>	Complejo 2-oxo-acido deshidrogenasa de cadena ramificada
<b>BMP</b>	Proteína morfogenética ósea ( <i>Bone morphogenetic protein</i> )
<b>BMP<sub>r</sub>-I</b>	Receptores tipo I de la BMP
<b>BMP<sub>r</sub>-II</b>	Receptores tipo II de la BMP
<b>Buffer</b>	Solución amortiguadora, tampón
<b>CA</b>	Cavidad abdominal
<b>CBC</b>	Células columnares de la base de la cripta
<b>CE</b>	Células epiteliales
<b>Ciclo TCA</b>	Ciclo de ácido tricarbóxico
<b>CK1</b>	Caseína quinasa 1
<b>CMEh</b>	Células madre embrionarias humanas
<b>CMPi</b>	Células madre pluripotentes inducidas
<b>CP</b>	Cavidad pélvica
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleótidos trifosfatados
<b>EGF (FCE)</b>	Factor de crecimiento epidermal ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
<b>EGFr</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>E</b>	EGF
<b>EN</b>	EGF/Noggin
<b>ENR</b>	EGF/Noggin/Rspo
<b>ENR+iWnt</b>	EGF/Noggin/Rspo más inhibición de Wnt
<b>F-6-P</b>	Fructosa 6 fosfato
<b>G</b>	Glucosa
<b>G-6-P</b>	Glucosa 6 fosfato
<b>GA-3-P</b>	Gliceraldehído 3 fosfato

<b>GABA</b>	Acido gamma-aminobutírico
<b>Gremlin 1</b>	Proteína inhibidora e la vía de señalización de TGF- $\beta$
<b>GSK3</b>	Glicógeno sintasa quinasa 3
<b>HACL1</b>	2-hidroxiacil-CoA liasa1
<b>INSERM</b>	<i>Institut national de la santé et de la recherche médicale</i>
<b>ISC</b>	Células madre intestinales ( <i>Intestinal Stem Cells</i> )
<b>KGDH</b>	$\alpha$ -ketoglutarato deshidrogenasa
<b>Ki-67</b>	proteína marcadora de la proliferación
<b>LED</b>	Diodos de emisión de luz
<b>LGR5</b>	Receptor 5 acoplado a la proteína G con repeticiones ricas en leucina ( <i>Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5</i> )
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>OGDHc</b>	Complejo oxoglutarato deshidrogenasa
<b>P</b>	fosforilación
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDH</b>	Piruvato deshidrogenasa
<b>PDHc</b>	Complejo piruvato deshidrogenasa
<b>Primers</b>	Oligonucleótidos, cebadores
<b>R-5-P</b>	Ribosa 5 fosfato
<b>Rspo</b>	R-espondina
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa en tiempo real de la PCR
<b>RT-qPCR</b>	Transcripción reversa en tiempo real de la PCR cuantitativa
<b>Smad</b>	Proteínas que actúan como factores de transcripción, ligado al TGF- $\beta$
<b>SYBR Green</b>	Reportero
<b>T</b>	Tiamina
<b>TCL/LEF</b>	Factor de células T/Factor de unión al potenciador linfático
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta ( <i>Transphormate growth factor Betha</i> )
<b>THR1</b>	Receptor de tiamina 1
<b>THR2</b>	Receptor de tiamina 2

<b>TKase</b>	Trasketolasa
<b>Tm</b>	Temperatura de Melting/ hibridación
<b>TPK1</b>	Tiamina pirofosfoquinasa
<b>TTP</b>	Pirofosfato de tiamina, forma activa
<b>Ub</b>	Ubiquitina
<b>UMR</b>	Unidad mixta de investigación
<b>W</b>	Señal Wnt
<b>W+ENR</b>	Wnt exógeno más ENR
<b><math>\alpha</math>-CG</b>	Alfa-cetogluturato
<b><math>\beta</math>-cat</b>	Beta-catenina



## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL. -**

Conformar un sistema de cultivo organoide de colon murino a través del aislamiento de criptas intestinales ricas en células madre haciendo uso de medios de cultivo preparados durante el trabajo de investigación.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS. -**

- Analizar la proliferación y diferenciación celular en organoides de colon murino expuestas al medio condicionado L-WRN, haciendo uso de biomarcadores de proliferación (MKi67) y de células madre adultas (LGR5) cuantificados por RT-qPCR.
- Identificar el lote del medio condicionado L-WRN que favorece la expresión de la proteína marcadora de la proliferación celular (Ki67) y beneficia la diferenciación de células madre codificadas por el gen LGR5 en organoides colónicos murinos.
- Evaluar la expresión del receptor de tiamina 1 (THR1) codificado por el gen SLC19A2 en organoides de colon murino mediante RT-qPCR.

## HIPÓTESIS

Ya que los organoides de colon murino poseen las características morfológicas y fisiológicas del intestino, simulando un mini órgano *in vitro*, que está en constante renovación celular. Es posible que sea un buen modelo para el estudio de proliferación celular, diferenciación de células madre adultas y expresión de receptores a nivel molecular.





# CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1 EL INTESTINO Y SU ROL EN EL SISTEMA DIGESTIVO

El sistema digestivo del ser vivo es el encargado de procesar los alimentos y/o fármacos, extraer los nutrimentos o compuestos activos y eliminar los residuos (1).

Las funciones del sistema digestivo se pueden clasificar en 5 etapas:

1. **Ingestión.** Etapa que consiste en la administración de los alimentos o fármacos en el cuerpo.
2. **Digestión.** El desdoblamiento de los alimentos o fármacos por acciones motoras y químicas para convertirla en una forma sostenible para el organismo.
3. **Absorción.** La captación de moléculas nutritivas o principios activos en las células epiteliales (CE) del tubo digestivo para ser transportadas a la sangre o linfas.
4. **Compactación.** Absorción de agua y asentar los residuos en lo que serán las heces.
5. **Defecación.** Evacuación de heces.

El aparato digestivo está subdividido anatómicamente en el tubo digestivo y los órganos accesorios. Los órganos accesorios son los dientes, lengua, glándulas salivales, hígado, vesícula biliar y páncreas. El tubo muscular se extiende desde la boca, pasando por la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso y finaliza en el ano (1). Por tanto, es correcto decir que el intestino delgado cumple la importante función de absorción de nutrientes y principios activos; y el intestino grueso, además de cumplir con la función de absorción, también es el órgano encargado de la compactación. Es necesario precisar que la fisiología intestinal en genética humana y murina es similar (2).

#### 1.1.1 Anatomía macroscópica del intestino

El intestino delgado, lugar donde se lleva a cabo la digestión química (en su mayoría gracias al actuar de los ácidos biliares) y la absorción, es la parte más extendida del tubo digestivo midiendo entre 2.7 a 4.5 m de longitud y 2.5 cm de diámetro. Está dividida en: duodeno (25 cm), yeyuno (1 – 1.7 m) e íleon (1.6 – 2.7 m). El intestino

grueso, lugar donde ocurre parte de la absorción y la compactación, mide aproximadamente 1.5 m de longitud y 6.5 cm de diámetro. Está conformado por 4 regiones: ciego, colon, recto y conducto anal (1). En el fondo genético murino C57BL/6 el intestino mide de 35 a 45 cm (2).

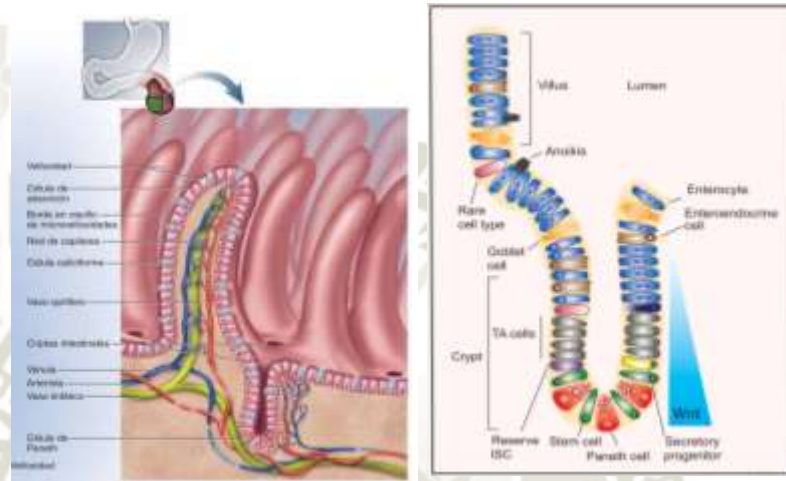
El **colon** está ubicado entre la unión ileocecal y el recto (excluyendo el ciego, el recto y el conducto anal). Esta subdividido en tres regiones: el **colon ascendente** que inicia en la válvula ileocecal y se extiende hacia arriba en el lado derecho de la cavidad abdominal (CA) y da un giro de 90° en el ángulo cólico derecho (hepático), donde se convierte en el **colon transverso** que se encuentra en sentido horizontal a la CA superior donde da un segundo giro de 90° hacia abajo en el ángulo cólico izquierdo (esplénico) para convertirse en el **colon descendente** que se extiende hacia abajo por el lado izquierdo de la CA; y finalmente en la cavidad pélvica (CP), que es más estrecha que la CA, el colon dará un último giro en sentido medial hacia abajo que dará lugar a un segmento en forma de “S” que será denominado como **colon sigmoide** (1).

### 1.1.2 Anatomía microscópica del intestino

El intestino delgado requiere una gran superficie interna para lograr una digestión y absorción eficiente. Es por ello por lo que el tamaño de la superficie de absorción es una característica que distingue a este órgano ya que posee una gran longitud que se multiplica por tres tipos de extensiones o pliegues internos: los **pliegues circulares** (2 en 3), las **vellosidades** (1 en 10) y **microvellosidades** (1 en 20). Estos pliegues y extensiones están distribuidos a lo largo del intestino delgado, siendo el yeyuno el lugar donde se encuentran los pliegues más largos y transversos de hasta 10 mm de alto, denominados como **pliegues circulares**. Las **vellosidades** tienen una morfología similar a la de un dedo pudiendo medir de 0.5 a 1.0 mm de alto, está conformado por 2 principales tipos de células: *enterocitos cilíndricos* y *células calciformes*. Los *enterocitos* a su vez poseen un borde externo en forma rugosa con **microvellosidades** de 1µm de alto (1,3).

En la *Figura 1* se pueden observar las características de la base del intestino delgado, entre los pliegues y vellosidades, se pueden observar un gran número de poros que simulan la apertura de glándulas en forma de tubo las que se denominan las **criptas**

**intestinales (criptas de Lieberkühn).** Estas criptas se pueden diferenciar anatómicamente en 2, según su conformación celular: la mitad superior que está conformada por enterocitos, enteroendocrinos y células calciformes (similar a las vellosidades), y la mitad inferior donde se encuentran los citoblastos en división (multiplicación celular). Dentro de cada cripta intestinal se pueden encontrar un número reducido de *células de Paneth* las cuales son las encargadas de la



segregación de proteínas defensivas contra bacterias invasoras de mucosa (defensinas, lisozimas y fosfolipasas) (1,4).

*Figura 1 Anatomía microscópica de la Cripta Intestinal. A. El lumen intestinal donde se diferencia las vellosidades, microvellosidades y criptas intestinales irrigadas por vasos sanguíneos para la correcta absorción de compuestos. B. Descripción de la conformación celular e identificación de las células madre en el fondo de la cripta (1,3).*

El **intestino grueso** a diferencia del intestino delgado posee la mucosa con un epitelio cilíndrico simple (excepto en la mitad inferior del conducto anal), además de no presentar pliegues ni vellosidades. Sin embargo, las criptas intestinales de colon si estarán presentes con mayor profundidad que las criptas intestinales del intestino delgado, del mismo modo se aprecia mayor cúmulo de células calciformes. El intestino grueso está cubierto por tejido linfático, el cual cumple la función de protección bacteriana (1,3,4).

La importancia de estudiar el intestino se centra en que es el órgano donde se da la digestión y absorción de nutrientes, vitaminas y fármacos. Además de ser el órgano por excelencia que está en constante renovación celular. Estudiar a profundidad la absorción de compuestos en este órgano ha sido de gran ayuda en diversas áreas de la salud para identificar y diagnosticar enfermedades relacionadas a la mala absorción de nutrientes; del mismo modo es de vital importancia en la industria farmacéutica

debido a que es el lugar donde se llevan a cabo los estudios farmacocinéticos y biofarmacéuticos de medicamentos.

## 1.2 ORGANOIDES

Los organoides están siendo un grupo de estudio muy interesante y prometedor en el sector científico de los últimos años, llama la atención cuando diversas publicaciones los describen como *órganos en miniatura (mini-órganos)* (5–7). Un organoide es producto del cultivo de *células madre* con una técnica especial denominada como *cultivo celular 3D*, el cual favorece la conservación de características del entorno de origen permitiéndole a las células específicas de los órganos crecer e interactuar simulando lo que ocurriría *in vivo* (6,8,9).

La organogénesis en el ser humano se lleva a cabo entre la 4ta y 8va semana después de la fecundación, en el proceso se observan dos eventos importantes para la formación de órganos: la *migración* y la *diferenciación celulares*. Estos eventos están establecidos en tiempo y espacio, y pueden ser reproducidos en los organoides (8). Por tanto, para ser catalogados como *organoide* se debe cumplir con 3 características:

1. El *organoide* debe estar constituido por más de un tipo de células del órgano original.
2. El *organoide* debe presentar características específicas del órgano de origen.
3. Las células dentro del *organoide* deben estar organizadas de una manera similar al órgano original.

Los organoides tienen como base estructural a las *células madre*, las cuales son las encargadas de su formación y desarrollo. Las células madre pueden ser diferenciadas en las *células madre embrionarias humanas (CMEh)* y las *células madre pluripotentes inducidas (CMPi)* (8).

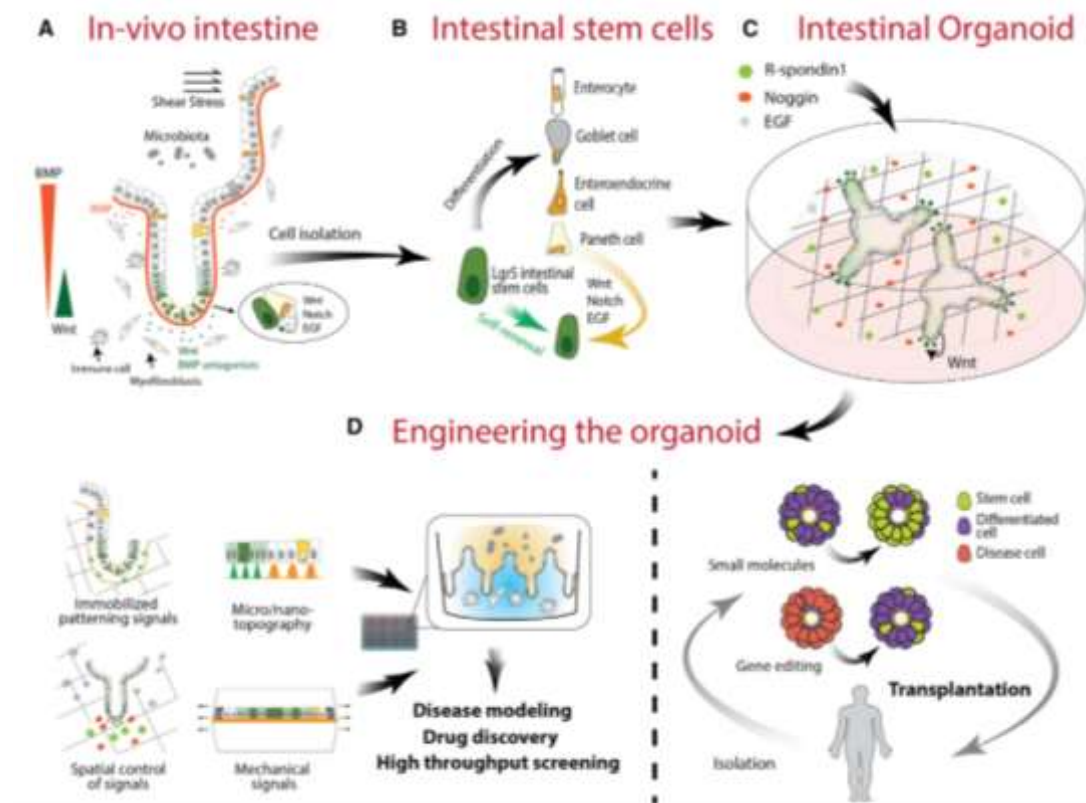


Figura 2 Organoides intestinales. A. Epitelio intestinal en un entorno dinámico de marcadores, señales y células vecinas que favorecen la renovación del tejido e inducen a la regeneración epitelial de células madre Lgr5+. B. Las células madre Lgr5+ son las responsables directas de la producción de células epiteliales diferenciadas, las cuales conformarían el apoyo del nicho fisiológico donde se encuentran las células madre. C. Los cultivos organoides in vitro requieren la presencia de los Factores de Crecimiento proporcionados por el microambiente de células mesenquimales y células madre, siendo denominados Factores exógenos necesarios para los organoides. D. La aplicación de estrategias de ingeniería genética, es el principal promotor de organoides debido a la facilidad para seguir una patología, descubrir o cribar un nuevo fármaco y además se logra la edición específica de genes o tratar una parte para dirigirla a un trasplante con organoides (6).

### 1.2.1 Organoides intestinales

Los organoides intestinales fueron descritos por primera vez en el año 2009 por Sato *et al.*(10) como estructuras multicelulares tridimensionales capaces de recrear la fisiología y morfología exacta de las criptas y vellosidades del epitelio intestinal, además se explica la formación a partir del cultivo de criptas y células madre intestinales (10). La anatomía microscópica del intestino (Apartado 4.2.2) señala que en la mitad inferior de las criptas intestinales se encuentran gran número de citoblastos en división; esto quiere decir que el fondo de las criptas existe una multiplicación celular estimulada por células madre que se convertirán en células especializadas (como: Células epiteliales, Enterocitos, Entero endocrinos, Células calciformes, etc.). Por tanto, la migración celular parte del fondo de la cripta intestinal ascendiendo hasta la cúspide de la vellosidad, confiriéndole al intestino

propiedades regenerativas continuas. La única célula especializada diferenciada que se origina en la cripta intestinal y permanece en la misma son las células de Paneth, sin embargo, estas están ausentes en las criptas colónicas (11).

Los organoides son capaces de recrear la capacidad regenerativa del epitelio intestinal, lo que los convierte en el modelo apropiado para el estudio de diferenciación y proliferación celular, función de transporte y absorción, bioquímica molecular de patologías y terapia genética/regenerativa del intestino (7). En la *Figura 2* se pueden observar varios aspectos de los organoides donde podemos resaltar la ventaja de que el crecimiento depende de la presencia de *células madre intestinales*, es decir, no es necesaria la inmortalización; lo que lo convierte en el modelo de estudio más similar a la fisiología del tejido intestinal *in vivo* (10).

#### **1.2.1.1 Células madre intestinales**

En el intestino, las células madre dan lugar a células progenitoras de los principales tipos celulares que conforman al epitelio intestinal, la maduración de las células diferenciadas desde la base de la cripta intestinal es de 5 a 7 días, por tanto, es correcto decir que el intestino es uno de los órganos con mayor actividad regenerativa. Las CMPi poseen la capacidad regenerativa del epitelio intestinal por completo por más de 4000 veces a lo largo de la vida del ser humano (12).

Diversos estudios proponen que dentro de la cripta intestinal se genera un microambiente llamado “nicho específico”, el cual estaría generado por factores localizados en el fondo de la cripta que tendrían la función de mantener el estado indiferenciado de las células, para luego pasar a un espacio progenitor donde cada célula se especializa en su forma concreta. La estructura de “nicho” no está bien definida, sin embargo, lo que se ha logrado establecer son los marcadores moleculares que expresan específicamente a las células madre intestinales, para las células madre intestinales adultas se utiliza LGR5 (13). En el caso de las células madre intestinales de origen murino, se ha determinado que la *vía de señalización Wnt/Betacatenina* nuclear y otros están implicados en la transcripción del mantenimiento del estado indiferenciado de las células intestinales, dentro de la señalización está incluida también LGR5 (12).

Dentro del nicho también se logra apreciar la importante función del *Factor de Crecimiento Epitelial (FCE)*, el ligando de *Lgr5/R-espondina* que actúa junto a las señales *Wnt*, y los inhibidores *Noggin* para el mantenimiento homeostático de la cripta intestinal (14).

#### 1.2.1.1.1 LGR5 (Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5)

En el intestino, se ha revelado que LGR5 es un importante biomarcador de células madre intestinales adultas (15). El revestimiento intestinal está en una renovación constante y esto se debe a que en la base de la cripta intestinal existe una población de células madre (13). Las células columnares de la base de la cripta (CBC) LGR5+, tiene una superficie basal ancha la cual se encuentra intercalada entre las células de Paneth diferenciadas, su característica resaltante es que poseen muy pocos organelos al igual que poco citoplasma. Las células CBC generan la plétora de células funcionales en el tejido intestinal durante toda la vida de un ser humano adulto. Así mismo, la expresión de LGR5 en el colon se parece fielmente a la del intestino delgado (13,16).

El receptor 5 acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en Leucina (LGR5) como biomarcador de células madre adultas se puede expresar en diversos tejidos (intestino, placenta, médula espinal, cerebro, etc.)(17). Posee la estructura de una proteína humana y es codificada por el gen del mismo nombre LGR5; este receptor pertenece a la clase A (subfamilia A10) de las proteínas receptoras acopladas a la proteína G.(18) El gen LGR5, ubicado en el cromosoma 12 en la posición 12q21.1 en el hombre, está presente en los mamíferos y se encuentra altamente conservado en especies de rata (*Rattus rattus*), ratones (*Mus musculus*) y humano (*Homo sapiens*) (14).

LGR5 forma parte de la señalización Wnt, demostrándose que la coestimulación con R-espondina y Wnt-3 induce una mayor internalización de LGR5 (16). Las proteínas R-espondina interactúa con el dominio extracelular de LGR5, formando el complejo LGR5/R-espondina que actúa uniendo e internalizando ligasas E3 transmembrana (RNF43 y ZNRF3) que son las que regulan negativamente la señalización Wnt por medio de la ubiquitinación de receptores frizzled (17). Es decir, la formación del complejo LGR5/R-espondina potencia la señalización de Wnt (13,14,19).

### 1.2.2 Crecimiento, proliferación y diferenciación de organoides

Durante la última década se han desarrollado muchos estudios para entender el mecanismo biológico por el que se logra la formación de organoides. Se ha llegado a la conclusión que el mantenimiento y perpetuidad de este sistema *in vitro-vivo* es gracias a la conservación de células madre intestinales individuales Lgr5+ (ISC, Intestinal Stem Cells) que poseen la capacidad de *autoorganizarse* en estructuras 3D a partir de una sola célula ISC, dando por resultado la simulación completa de la arquitectura de la cripta-vellosidad, además de una réplica fisiológica del epitelio intestinal (8).

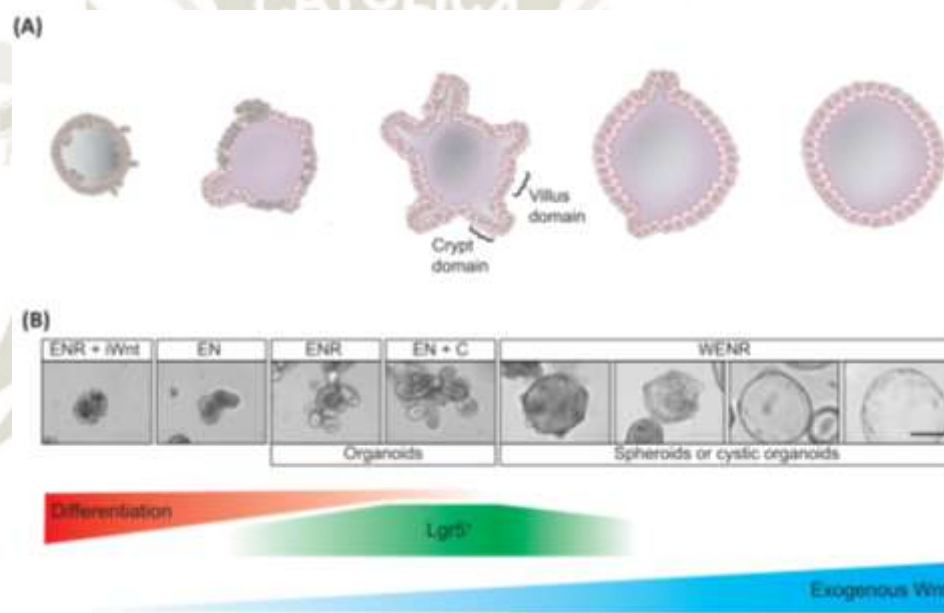
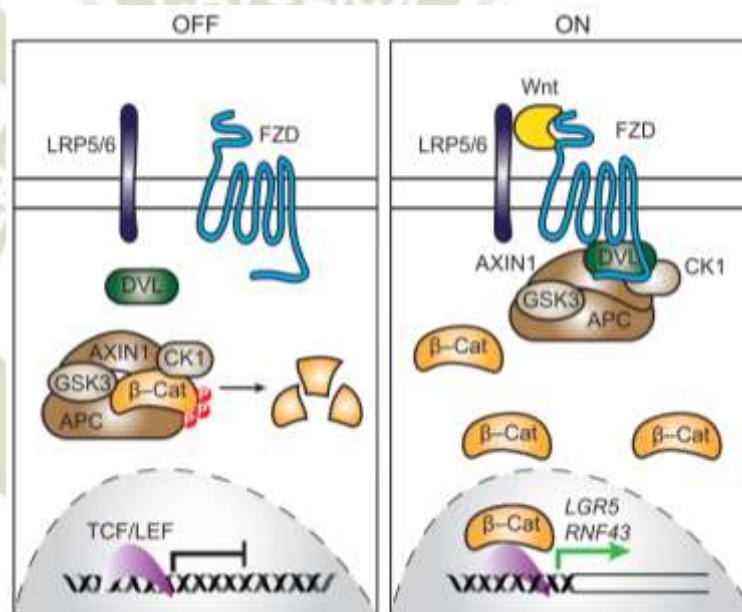


Figura 3 Organoides intestinales de ratón relacionados con Wnt. A. El aumento de la concentración de Wnt sobre la morfología y viabilidad celular de los organoides intestinales pueden observarse progresivamente de izquierda a derecha. Las células muertas están representadas de color gris y las vivas en rosa. B. La observación microscópica de campo claro en organoides intestinales de ratón con diferentes condiciones de cultivo. (Abreviaciones: C, CHIR-99021; EN, EGF/Noggin; ENR+iWnt, EGF/Noggin/Rspo más inhibición de Wnt; WENR, Wnt exógeno más ENR. Observación de barra de escala, 200mm (20).

Lograr desentrañar e identificar las necesidades de este nuevo sistema fue un reto científico en el que fueron necesarios estudios comparativos con sistemas *in vivo* (13). En la Figura 3, se determinan los requerimientos para el mantenimiento homeostático de las ISC conservando además la propiedad de renovación epitelial del intestino, se pueden resumir en un coctel de factores de crecimiento para ISCs que está conformado por el agonista de la vía Wnt *R-espondina*, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el inhibidor de BMP *Noggin* (16,17). A continuación, se explica cada uno de esto componentes:

### 1.2.2.1 Vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina/R-espondina

Los protocolos de cultivo de organoides intestinales sirven de referencia para poder establecer sistemas de cultivo 3D de diferentes tejidos (Colon, hígado, páncreas, estomago, trompas de Falopio, etc.)(21); ya que los organoides originados de estos tejidos van a coincidir en la necesidad de la señalización Wnt, la R-espondina, o ambos, siendo esta la característica compartida para la formación y crecimiento de organoides (13). En la *Figura 4* podemos observar el mecanismo de las vías de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina que es de gran importancia en la preservación de organoides intestinales murinos (20).



*Figura 4* La vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina. (Izquierda) En ausencia de ligandos Wnt, la  $\beta$ -catenina es degradada continuamente a causa del Complejo de Destrucción compuesta por 2 proteínas de andamiaje (AXIN y APC) y 2 proteínas quinasas (GSK3 y CK1). El complejo de destrucción este encargado de captar y fosforilar la  $\beta$ -catenina para la ubiquitinación y posterior degradación proteasomal. (Derecha) La proteína Wnt se une al receptor Frizzled (FZD) y al correceptor LRP5/6 para la estimulación de la formación de un Complejo Receptor Multipotente. La proteína citosólica Dishevelled (DVL) es captada por este complejo receptor, induciendo un mayor reclutamiento de los componentes del Complejo de Destrucción. Por tanto, la  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma de las células activadas por Wnt y además se transloca al núcleo, donde se induce a la transcripción de los genes diana de Wnt (LGR5 y RNF43). Abreviaciones:  $\beta$ -Cat,  $\beta$ -catenina; CK1, Caseína quinasa 1; GSK3, Glicógeno sintasa quinasa 3; P, fosforilación; TCF/LEF, factor de células T/factor de unión al potenciador linfático (20).

Los procesos de formación de tejidos y órganos se efectúan a través de vías de señalización morfogénica donde encontramos a las vías Wnt, las cuales son las encargadas de controlar la adhesión y migración celular en la morfogénesis (17). La señalización Wnt canónica regula la adhesión celular a través de la  $\beta$ -catenina (*Figura 4*), que es un componente de unión celular adherente; además, las vías Wnt

actúan junto a mecanismos controladores de la arquitectura celular influyendo no solo en la adhesión sino también en la migración celular (20). El descubrimiento de estos componentes ha ayudado a interpretar completamente la fisiología molecular, y a su vez descubrir pautas para comprender y determinar un tratamiento en los procesos anormales de la señalización Wnt que pueden conducir al desarrollo de un tumor (13).

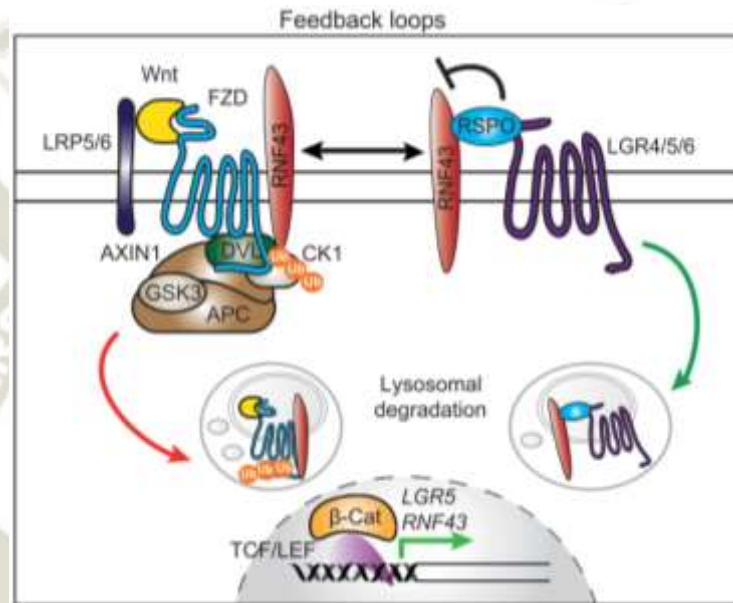


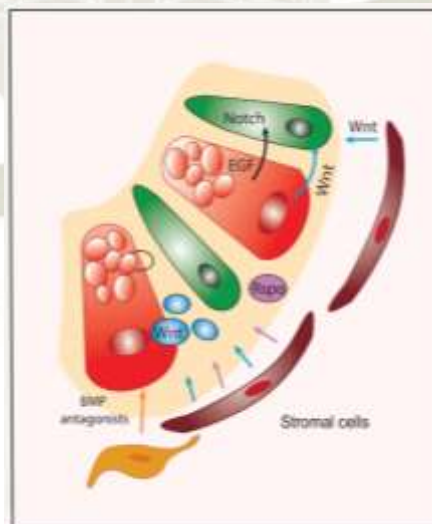
Figura 5 Bucles de retroalimentación de regulación e importancia de la R-espondina. Los genes diana de Wnt (RNF43 y LGR5) son los inductores de los bucles de regulación, RNF43 ubiquitina a FZD y lo distingue para su degradación lisosomal (flecha roja). La proteína R-espondina (Rspo) se une al dominio extracelular de RNF43 y a los receptores LGR4/5/6, conformando el complejo trimérico Rspo/RNF43/LGR. Los LGR y Rspo actúan juntos para mediar en la eliminación de RNF43 de la membrana plasmática, logrando la estabilización de los receptores FZD y potenciando indirectamente la señalización Wnt (flecha verde). Abreviaturas:  $\beta$ -cat,  $\beta$ -catenina; TCF/LEF, factor de células T/factor de unión al potenciador linfático; Ub, ubiquitina (20).

La homeostasis tisular requiere de la participación de la señalización Wnt con el ajuste preciso para desencadenar de manera controlada los diferentes mecanismos celulares para las ISC (mantenimiento, proliferación y especificación), por tanto si la señalización Wnt se ve empobrecida, existe un mecanismo para su autorregulación con R-espondina que esta detallada en la Figura 5, Bucles de retroalimentación (20).

Los organoides intestinales requieren la suplementación con R-espondina ya que es de gran importancia para estimular la gradiente de Wnt que alcanza su máxima función en la base de las criptas intestinales, logrando promover la proliferación de células dentro de la zona de células madre al igual que direccionar a las células en una posición adecuada para que se lleve a cabo su diferenciación (22,23). Por lo

tanto, el complejo Wnt/R-espondina impulsa la formación de criptas *in vitro* y es de vital importancia para la proliferación y diferenciación celular en el nicho de la cripta (24,25). Existe además un mecanismo denominado “ruptura de simetría” durante la formación de organoides, debido a que aparecerá un tipo de células estocástica en el nicho que no se dividirá y llevará a la formación de las Células del Paneth en el fondo de la cripta (1,5,7).

Otro elemento importante en esta vía es el factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor, EGF*) que es un péptido que promueve el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (*Figura 6*), haciendo su función junto a su receptor el cual está presente en la superficie celular (EGFr). Actualmente, la disponibilidad de EGF purificado es de fácil adquisición gracias a la tecnología biotecnológica de recombinación de EGF heterólogo. Hasta hace unos años, la adquisición de este péptido era a través de la centrifugación de la sangre del paciente para obtener el plasma sanguíneo el cual contenía EGF, sin embargo este procedimiento era tedioso y de baja precisión para su dosificación y purificación de la molécula activa (26). En la *Figura 6* se logra observar la participación del EGF en la vía Notch que está ligada a la vía de la señalización Wnt.



*Figura 6 El nicho de células madre de la cripta intestinal. El nicho de las células madre intestinales están compuestas por células del Paneth (rojo) que donan a las ISC (verde) los factores de crecimiento esenciales que son los ligandos Wnt, EGF y los ligandos Notch. Las células mesenquimales que están al rededor del nicho también aportan ligandos Wnt y Rspo adicionales. Los ligandos BMP que antagonizan el mantenimiento son neutralizados por los antagonistas BMP secretados por las células mesenquimales (naranja). Abreviaturas: EGF, Factor de crecimiento epidérmico; Rspo, R espondina; BMP, Proteína morfogenética ósea (20).*

### 1.2.2.2 *Inhibidor de BMP Noggin*

La señalización de la proteína morfogenética ósea (*Bone Morphogenetic Protein, BMP*) es un potente inhibidor de la hiperproliferación del epitelio intestinal. La importancia de BMP epitelial reside en su función de restricción de la expansión de células madre Lgr5+ para la conservación de la homeostasis, y la prevención de la hiper proliferación tisular premaligna (16). La continua renovación del epitelio intestinal propone a un órgano de auto renovación ilimitada, sin embargo, la existencia de esta rápida cinética puede derivar en una hiperproliferación de alto riesgo como la tumorigénesis (27).

La homeostasis del epitelio intestinal está controlada por las señales de estimulación de proliferación (vía Wnt/R-espondina) y del otro lado poseemos a las señales contrapuestas a la proliferación (vía BMP-Noggin) (*Figura 6*) (27). Las BMP forman parte de la superfamilia de ligandos del *Factor de Crecimiento Transformante Beta* (Transformate Growth Factor B, *TGF-β*); la unión de los ligandos BMP a sus receptores tipo II (BMP-RII) conllevan a la fosforilación y la activación consecutiva de los receptores tipo I (BMP-RI). El receptor BMP-RI fosforilado activa R-Smad (Smad1, 5 y 8) cooperando en la formación de complejos Co-Smad (Smad4), permitiendo la translocación en el núcleo para poder regular la expresión genética. Las células mesenquimales presentes en las vellosidades y criptas intestinales segregan los ligandos BMP-II y -IV, por otro lado, los antagonistas de BMP Noggin y Gremlin1 se expresan principalmente en las células mesenquimales de la base de la cripta; dando origen a una gradiente de actividad BMP a lo largo del nicho interno de la cripta-vellosidad intestinal (23,27).

### 1.2.3 **Marcador de proliferación: Ki-67**

La proteína marcadora de la proliferación Ki-67 (codificada por el gen MKI67) es ampliamente utilizada, ya que solo se puede detectar en la parte nuclear de una célula proliferativa; por ejemplo, uno de sus principales usos está relacionado con la investigación del cáncer, permitiendo la evaluación de células proliferativas tumorales. El gen de esta proteína nuclear está involucrado debido a que su función en el mantenimiento de cromosomas mitóticos individuales dispersos en el citoplasma después del desmontaje de la envoltura nuclear, permitiendo la motilidad

cromosómica independiente e interacciones eficientes con el huso mitótico. En 2016, una cita de Cuylen S. et al. propone que Ki-67 forma una barrera de carga estérica y electrostática (como un agente tensoactivo) el cual facilita la dispersión de partículas separadas por fases, evitando que los cromosomas colapsen en una sola masa de cromatina. Sin embargo, la proteína Ki-67 no forma parte de la estructura interna, solo cumple la función de organización de la cromatina (13,16,28).

### 1.3 TIAMINA Y SUS TRANSPORTADORES CELULARES

#### 1.3.1 Generalidades

La tiamina (T) denominada también como vitamina B1, es una molécula hidrosoluble importante en la nutrición humana. El Pirofosfato de Tiamina (TPP) es la forma activa que actúa como cofactor enzimático en el metabolismo energético (29). La tiamina es un compuesto bicíclico con anillos amino pirimidínico y tiazólico unidos por un puente de metileno (*Figura 7*). En el anillo tiazol puede haber dispersión electrónica formando un compuesto amonio cuaternario, además, la cadena lateral presente en el anillo tiazol está compuesta de grupos hidroxilo lo cuales se esterificarán con pirofosfato para dar lugar al derivado que actúa como cofactor activo. La importancia de esta vitamina reside en que puede conducir a una deficiencia de enzimas de las rutas bioquímicas si no está en cantidades suficientes, ocasionando problemas metabólicos energéticos en pacientes que a través de los años tiene más manifestaciones clínicas (30).

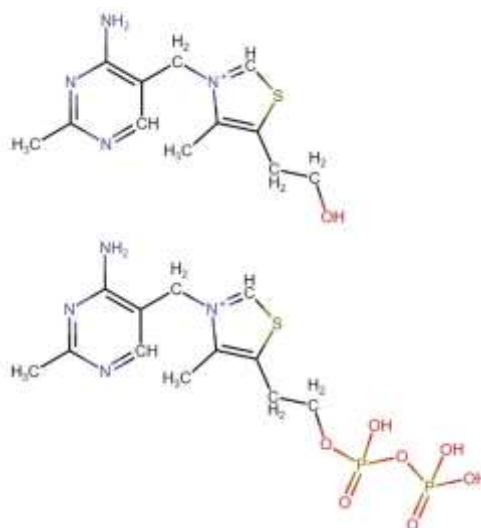


Figura 7 Estructura química de tiamina y su forma activa piro fosfatada. (Fuente: Diseño propio bajo la plataforma de Fishersci.com)

### 1.3.2 Aspectos bioquímicos de Transporte y Metabolismo de Tiamina

La tiamina es absorbida en el intestino a través de dos transportadores, THR1 y THR2 (*Thiamine Transporter 1 – 2*), regidos por los genes SLC19A2 y SLC19A3. Estos transportadores están distribuidos en la mayoría de órganos, pero los niveles difieren en diferentes tejidos y cada uno posee distintas propiedades cinéticas (31,32).

La T en su forma activa cumple la función co-enzimática de promover la reacción de deshidrogenación del piruvato a Acyl CoA por el piruvato deshidrogenasa (PDH) (30,33,34)  $\alpha$ -ketoglutarato deshidrogenasa (KGDH), transketolasa (TKase) y  $\alpha$ -cadena ramificada deshidrogenasa (BCKDC) señaladas en la *Figura 8* de color azul donde se observa la participación en el metabolismo bioquímico y se utilizan para oxidar sus respectivos sustratos de carboxilato (29).

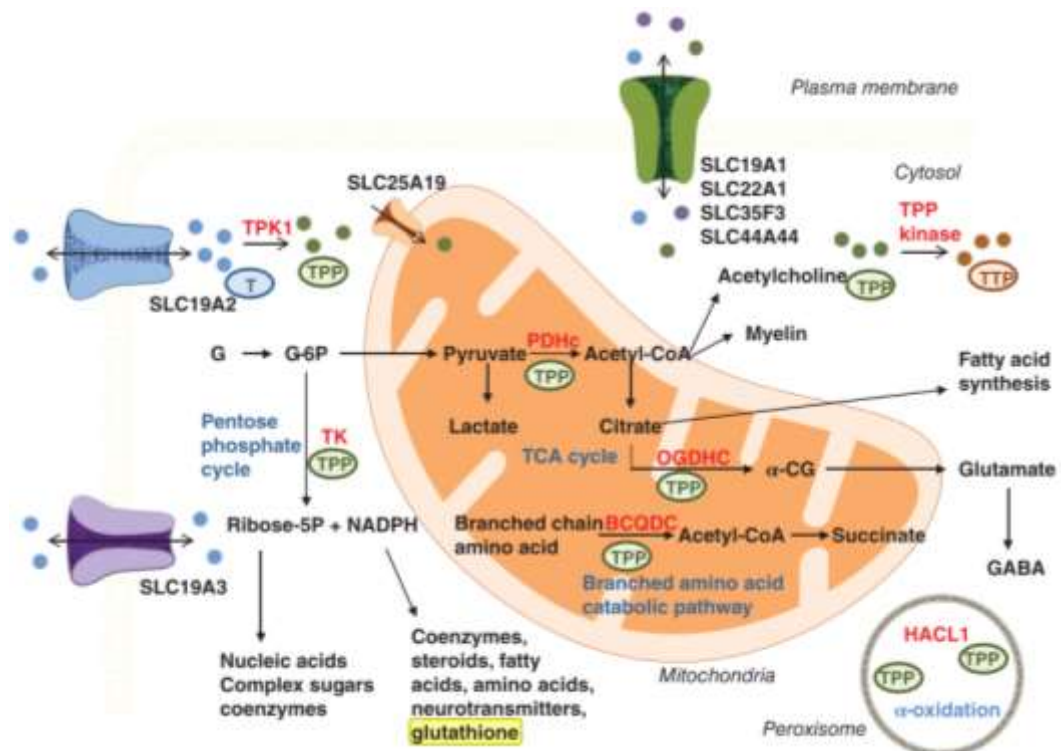


Figura 8 Vía de transporte, metabolismo y función de cofactor de la tiamina. Las diferentes presentaciones de Tiamina están representadas de la siguiente manera: Tiamina libre (T, círculos azules), Tiamina monofosfato (TMP, círculos morados), Tiamina pirofosfato o Tiamina difosfato (TPP, círculos verdes) y Tiamina trifosfato (TTP, círculos marrones). Tiamina se absorbe por difusión pasiva, a altos niveles de concentración o a través de receptores transportadores: SLC19A2 (transportador de tiamina-1, THRI), SLC19A3 (transportador de tiamina-2, THR2), SLC19A1 (transportador de folatos), SLC22A1, SLC35F3 y SLC44A4. Abreviaturas: G, glucosa; G-6P, glucosa-6-fosfato; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; ciclo TCA, ciclo de ácido tricarboxílico;  $\alpha$ -CG, alfa-cetoglutarato; GABA, ácido gamma-aminobutírico (35).

En la Figura 8 se puede apreciar que, en la fase citosólica, la Tiamina libre (T) es fosforilada a Tiamina pirofosfato (TPP) por la TPK1 (Tiamina pirofosfocinasa). El TPP como especie activa de tiamina actúa como cofactor en diferentes rutas metabólicas enzimáticas: en el citosol, TK (transketolasa); en la mitocondria, PDHc (complejo Piruvato deshidrogenasa), OGDHc (complejo oxoglutarato deshidrogenasa), BCQDc (complejo 2-oxoácido deshidrogenasa de cadena ramificada) y en el peroxisoma, HAACL1 (2-hidroxiacil-CoA liasa 1) (35–37).

### 1.3.3 Condiciones adquiridas por deficiencia de Tiamina: Enfermedad Beriberi y Encefalopatía de Wernicke

La deficiencia de T en los humanos y en los animales diseñados tiene consecuencias como neuropatía periférica, debilidad muscular e insuficiencia cardíaca, además de estar relacionado con la edad, características fisiológicas y variaciones biológicas (30). La absorción de la mayoría de las vitaminas implicadas en el cuerpo humano se

produce en el intestino; su absorción está directamente relacionada a la concentración, una alta concentración expuesta en el tejido absorbente produce una a diferencia de una exposición a una baja concentración que conduce a un sistema activo (37–40). Las primeras manifestaciones de una deficiencia de T son: cansancio, apatía, irritabilidad, depresión, somnolencia, desconcentración, anorexia, náuseas y malestar abdominal; que pueden ser síntomas despreciados habitualmente (30,37). Los cuadros clínicos de una deficiencia de T avanzada pueden ser:

La enfermedad de Beriberi tiene dos variantes; Beriberi “seco” causado por una disminución crónica de los requerimientos de T que provoca neuropatía periférica, disminución de motilidad o parálisis de extremidades, fatiga y cansancio extremo y Beriberi “húmedo” que se desarrolla por una deficiencia muy grave ocasionando todos los síntomas mencionados anteriormente y además de un compromiso cardiovascular: Insuficiencia cardíaca bi-ventricular con afectación pulmonar (41,42). El Síndrome de Wernicke-Korsakoff es una enfermedad cerebral descrita por dos estudiosos en psiquiatría que llevan el nombre de la patología. La encefalopatía de Wernicke se caracteriza por somnolencia, irritabilidad y signos oculares (*nistagmo*) que puede conllevar a una oftalmoplejía (41). Por otro lado, el síndrome de Korsakoff incluye amnesia, dificultad de aprendizaje y confabulaciones; la amnesia que se genera es característica debido a que es anterógrada que se evidencia en la dificultad para aprender nuevos nombres, nuevos rostros y acciones o hechos (37,43).

#### **1.3.4 Tiamina: Síndromes de disfunción del metabolismo de tiamina por errores genéticos**

La T es un cofactor importante involucrado en diversas rutas metabólicas celulares (dentro del citosol, mitocondrias o peroxisomas) (29). Es por ello que diversos estudios se han centrado en poder describir los posibles defectos genéticos que pudieran originar el deterioro del transporte y metabolismo de tiamina, lo cual estaría directamente relacionado a una patología metabólica (39,44,45). Un reciente estudio publicado en 2019 por *Anna Marcé-Grau et al.* explica que hasta el momento habría por lo menos 4 defectos genéticos que conducen a diversas enfermedades metabólicas y no metabólicas, del mismo modo surge la propuesta de hacer un diagnóstico precoz de los biomarcadores de T (SLC19A2, SLC19A3, SLC25A19 y

TPK1) (35). En la *Tabla 1* se muestra cada desorden homeostático originado por un defecto en cada biomarcador genético.

*Tabla 1 Errores genéticos vinculados con el metabolismo de Tiamina (37).*

Síndrome de disfunción	Gen	Desorden
Síndrome de disfunción del metabolismo de Tiamina - 1	SLC19A2	Síndrome de Anemia Megaloblástica sensible a tiamina
Síndrome de disfunción del metabolismo de Tiamina - 2	SLC19A3	Tipo de encefalopatía sensible a tiamina o biotina
Síndrome de disfunción del metabolismo de Tiamina – 3	SLC25A19	Microcefalia tipo Amish
Síndrome de disfunción del metabolismo de Tiamina - 4	SLC25A19	Degeneración estriatal bilateral y tipo de polineuropatía progresiva
Síndrome de disfunción del metabolismo de Tiamina - 5	TPK1	Tipo de encefalopatía episódica

El Síndrome de disfunción del metabolismo de Tiamina – 1 (OMIM 249270), también conocido como Síndrome de Royers está relacionada directamente con 3 principales afecciones: Anemia megaloblástica, Diabetes mellitus y Sordera neurosensorial. La relación fenotipo-genotipo está ubicada en el gen SLC19A2 (MIM Gen 603941) en la región 1q24.2 heredada por Arkansas, el número de fenotipo que le corresponde es 249270 (Clave de mapeo de fenotipo 3). El gen SLC19A2 es el que genera el THTR1, que es de nuestro interés en este trabajo (35,46,47).

### 1.3.5 Tiamina y enfermedades metabólicas: Diabetes mellitus

La diabetes es una enfermedad metabólica que en los últimos años ha aumentado el número de incidentes y se considera una de las enfermedades más comunes en los países desarrollados y subdesarrollados, siendo catalogado como un problema de salud pública importante (48). La descripción clínica de la diabetes tiene como característica principal los niveles de glucosa alto en la sangre (hiperglucemia) por un déficit de insulina o por cese de la producción de insulina por parte del páncreas (1). En esta afección se desarrollan complicaciones vasculares gradualmente de 5 a 40 años

después del diagnóstico de la diabetes (33). Hay estrategias para estudiar complicaciones diabéticas, entendiendo el mecanismo bioquímico como la tiamina en altas dosis de terapia previenen el desarrollo de complicaciones microvasculares en las diabetes (49).

Los datos experimentales sugieren que la tiamina y los transportadores de membrana pueden ser anormal en el estado diabético. En la diabetes experimental, una disminución de la tiamina intestinal se ha observado la absorción. La deficiencia mediana de tiamina en los diabéticos puede inducir un aumento en la expresión de THTR1 debido a la disminución de la tiamina (33). Un estudio conexo demostró que el tratamiento con tiamina en los pacientes cirróticos induce una disminución de los niveles de glucosa en la sangre y que la hiperglucemia está relacionada con la resistencia a la insulina y la insuficiente secreción de insulina por parte de las células beta pancreáticas. Desde entonces, se ha sabido que la deficiencia de tiamina puede ser generalizada en la diabetes. Estas afirmaciones sugieren que la deficiencia de tiamina es parte de la función de las células beta pancreáticas (33,49).

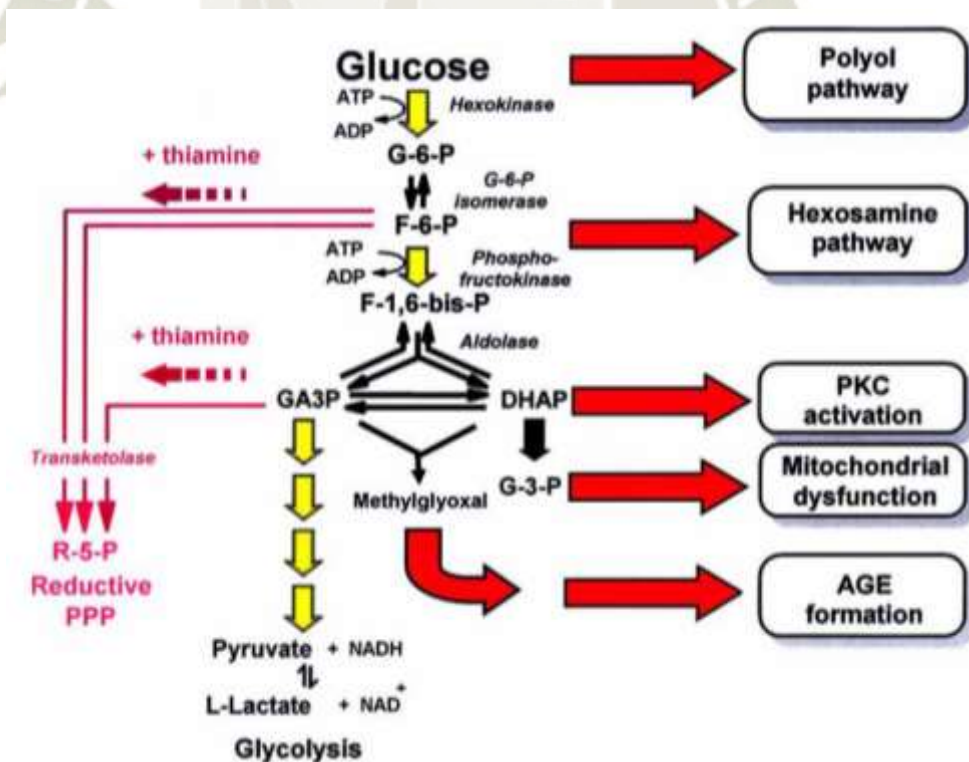


Figura 9 Disfunción metabólica relacionada con el desarrollo de complicaciones diabéticas revertidas con un tratamiento de tiamina a altas dosis (33).

La *Figura 9* muestra el mecanismo de las reacciones bioquímicas de la glucosa con la T como agonista de la fructosa 6-fosfato (F-6-P) y el gliceraldehído 3-fosfato (GA3P) que convierten los sustratos en ribosa 5-fosfato (R-5-P) por la enzima transketolasa para prevenir las complicaciones vasculares en la diabetes. La hiperglucemia es un factor que puede inducir el desarrollo de enfermedades macro o microvasculares, hipertensión y dislipidemia en pacientes diabéticos. El principal mecanismo que se investigó es la disfunción bioquímica que puede producir complicaciones para la glucosa citosólica en las células endoteliales o mesenquimales. La tiamina como factor de prevención de estas complicaciones fue estudiado en varias muestras *in vitro*, en esta oportunidad el estudio se enfoca en los organoides intestinales donde podemos investigar la absorción y el mecanismo de la tiamina en la prevención de las complicaciones (33). Se conocen las propiedades profilácticas de la tiamina en la complicación vascular en la diabetes. Por lo que se recomienda consumirlo en una dieta diaria como una estrategia puede prevenir posibles problemas en el futuro (33,49).

#### **1.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: PCR Y RT-PCR**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la mejor opción para analizar ácidos nucleicos, es además una importante e innovadora herramienta tecnológica de los últimos años (50). Es considerado el método de elección para los estudios genéticos y de biología molecular debido a su alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia además de generar resultados confiables (51). La PCR es una técnica muy utilizada para generar resultados cualitativos; mientras que la PCR en tiempo real, es una técnica que parte del mismo fundamento pero que difiere en los resultados siendo de carácter cuantitativos (51–54). La PCR de transcripción reversa (RT-PCR) en tiempo real es una tecnología de la era genómica dedicada a la detección de ARNm (53).

La importancia de la PCR se centra en que es una reacción enzimática *in vitro* cuya misión es amplificar millones de veces una secuencia específica de ADN. Para la RT-PCR el sustrato a amplificar será el ADN complementario (ADNc), que proviene del ARNm, donde lograremos analizar la expresión del ARNm del gen de interés. La amplificación se lleva a cabo gracias a una enzima denominada como *Polimerasa*

que mediante una catálisis logra sintetizar y copiar fielmente las secuencias genéticas de interés. La PCR como herramienta innovadora se está convirtiendo en una técnica fundamental en el área de salud para la determinación de expresiones genéticas, genotipificación, detección de patógenos (virus, etc.), análisis de mutaciones, entre otros (54,55).

#### **1.4.1 Fundamento de la RT-qPCR en tiempo real**

La PCR en tiempo real tiene por objetivo detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos a través del uso de marcadores fluorescentes en la reacción. El termino *en tiempo real* hace referencia a que es posible detectar los productos amplificados en cada ciclo de la reacción, así mismo, el termino *cuantitativo* se refiere a que se logra estimar la cantidad de ADNc en la muestra. Por otro lado, la nomenclatura varía de acuerdo al sustrato utilizado: si se usa ADN genómico, se denomina de una qPCR; por el contrario, si obtenemos ADNc y luego se hace PCR, será denominado como RT-qPCR (55).

La PCR en tiempo real es el método con más sensibilidad para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. El sistema, aun con una cantidad muy pequeña de sustrato, está diseñado para asegurar una alta especificidad, eficiencia y sensibilidad. Los requerimientos químicos para la PCR en tiempo real normalmente vienen en conjunto dentro de una solución denominada “Super Mix” y está conformado por los siguientes: la enzima, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio ( $Mg^{+}$ ), la solución amortiguadora (buffer) y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados; además el agua que se utiliza debe estar libre de nucleasas. Los oligonucleótidos (primers) diseñados deberán garantizar la especificidad además de generar amplicones de un tamaño específico (entre 100-150pb) para asegurar la eficiencia (55).

#### **1.4.2 Etapas de la PCR**

##### **1.4.2.1 Desnaturalización**

En la etapa de desnaturalización se procede a exponer las cadenas de ADNc a una temperatura de 95°C durante 20 a 30 segundos, el tiempo dependerá de la secuencia

del templado. El resultado de esta etapa será la obtención de las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

#### **1.4.2.2 Hibridación**

Durante la hibridación los primers se alinean al extremo 3' del templado separado en la anterior etapa para hibridar con su secuencia complementaria. El complejo templado-primer es primordial que la temperatura de hibridación ( $T^{\circ}$  Melting,  $T_m$ ) sea la adecuada oscilando entre 50 a 60°C. La estabilidad y especificidad del complejo será eficiente si los primers fueron diseñados correctamente y la temperatura ( $T_m$ ) es la óptima.

#### **1.4.2.3 Extensión**

La etapa final de la PCR es donde la Taq Polimerasa actúa sobre el complejo templado-primer, la enzima tiene una función catalítica de alta velocidad; al agregar los dNTPs complementarios se crearán las cadenas complementarias del ácido nucleico. La extensión de las cadenas será en dirección la síntesis del ADN. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C debido a que es la temperatura en la que la enzima actúa eficientemente. Al finalizar, la formación de los amplicones será determinado por el tamaño dictado por el número de pares de bases (pb).

#### **1.4.3 Detección de productos amplificados**

Durante la PCR en tiempo real se debe llevar a cabo un monitoreo de los productos amplificados conforme transcurre la reacción, la tecnología que ha dado buenos resultados es el uso de sistemas basados en reporteros fluorescentes que pueden ser específicos y no específicos. Los métodos de reporteros no específicos tienen por fundamento el uso de moléculas intercalantes que son afines al ADN de doble hélice y que al ser oxidados se genera una señal de fluorescencia proporcional al número de copias de ADN que se obtiene en PCR. SYBR Green es el reportero más utilizado debido a su bajo costo y a su capacidad de incrementar su fluorescencia hasta 1000 veces (*Figura 11*); sin embargo, su principal desventaja es que podría unirse a cualquier resto de ADN de doble cadena (dímeros de primers), problema que es resuelto si se realiza una “curva de disociación”. Actualmente, los softwares de los termocicladores ofrecen la herramienta de “curva de disociación” al final de la reacción logrando un análisis óptimo (52,55).

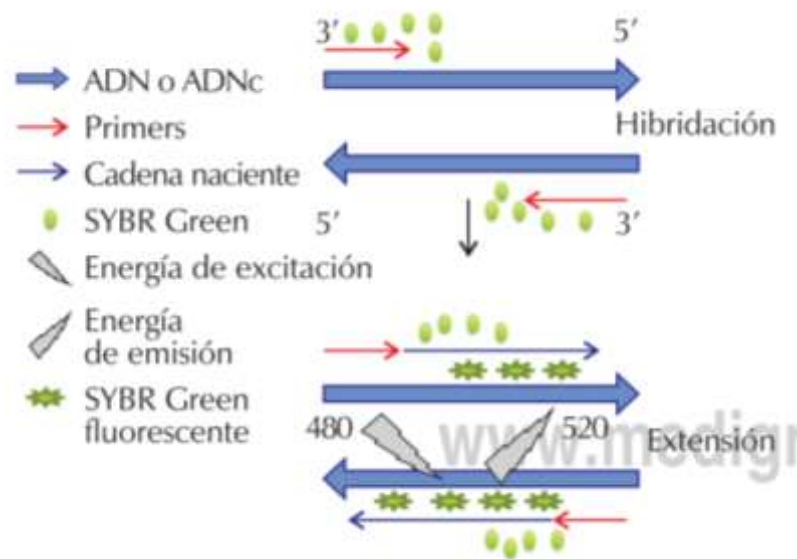


Figura 10 Métodos de detección con reporteros no específicos en PCR. SYBR Green está unido a la doble cadena de ADN. Longitud de onda de excitación a 480 nm y longitud de onda de emisión a 520nm (55).

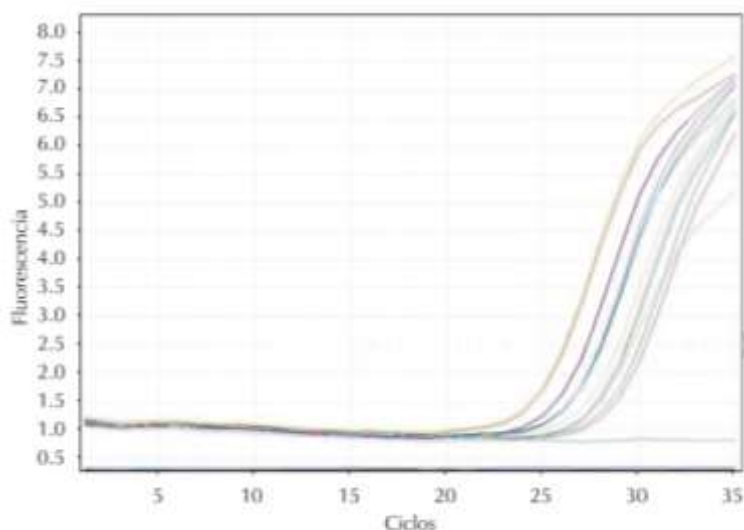
#### 1.4.4 Señal de fluorescencia

Los termocicladores de PCR en tiempo real poseen la tecnología necesaria para la detección de señales de fluorescencia de los productos amplificados en cada ciclo de la reacción pasando por etapas las cuales son: a. Excitar al reportero b. captura de la señal de emisión del reportero c. Analizar cuantitativamente los resultados. Los termocicladores de hoy en día utilizan diferentes fuentes de energía para la excitación: las lámparas de luz, diodos de emisión de luz (LED) y láseres. El proceso se inicia cuando la fuente de energía logra excitar al reportero hasta lograr la señal de emisión del reportero que es recolectada permitiendo el paso de la longitud de onda correspondiente que se dirige a un fotodetector donde se colecta la información de la muestra para que el software del sistema empiece el análisis de resultados. Las velocidades para el aumento o la disminución de la temperatura en cada etapa de la reacción, el número y cantidad de muestra, los kits que se utilizan para la amplificación y los productos consumibles de la reacción son factores que influyen directamente en la cuantificación de la señal de fluorescencia (50,55).

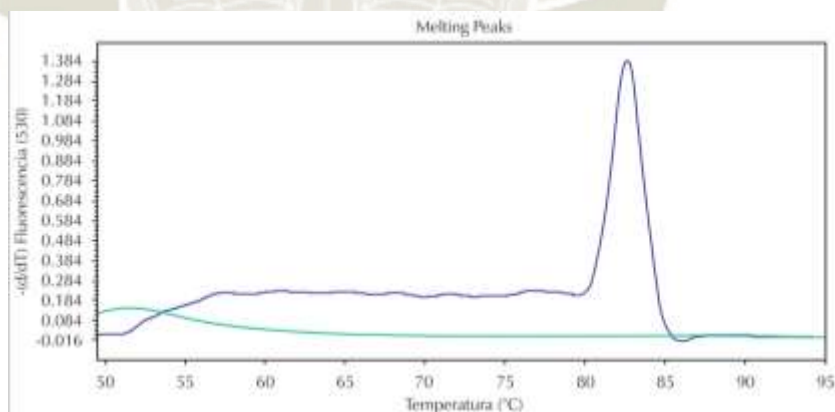
#### 1.4.5 Análisis de Resultados

El análisis de la reacción es el último paso para determinar la cuantificación genética, usualmente los termocicladores están conectados a una computadora que contiene un

software que facilita la generación de las gráficas de datos necesarios para establecer si la reacción fue eficiente y exitosa. Las gráficas que se pueden obtener están representadas en las *Figuras 12 y 13* donde se pueden observar la amplificación que representa el curso y el proceso de la reacción, y la curva de disociación o curva melting que muestra la información sobre la especificidad (53,55).



*Figura 11* Curva de amplificación en PCR. La amplificación es detectada en cada ciclo de la reacción, midiendo la señal de fluorescencia que es proporcional al incremento de ADN (55).



*Figura 12* Curva de disociación (Curva Melting) para la especificidad de la reacción. Se puede observar un único pico que corresponde a la amplificación y la línea de base que representa al control negativo que no amplifica(55).



# **CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

#### 2.1.1 Ubicación

El desarrollo experimental del presente proyecto se llevó a cabo en las inmediaciones del Laboratorio de Investigación J&K del Instituto Nacional de Investigación en Salud y Medicina (*Institut national de la santé et de la recherche médicale*, INSERM); Unidad Mixta de Investigación (UMR) 1011 especializada en Receptores Nucleares, Enfermedades Metabólicas y Cardiovasculares (*Récepteurs Nucléaires, Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires*). Laboratorio asociado de la *Université de Lille, CHU de Lille et Institut Pasteur de Lille* dirigido por PhD Bart STAELS.

Sitio Web: <http://u1011.pasteur-lille.fr/accueil/> | <http://www.egid.fr/accueil/>.

##### 2.1.1.1 Ubicación Geográfica

Boulevard du Professeur Jules Leclercq.

59045 Lille Cedex – Francia



Figura 13 Ubicación geográfica del Laboratorio J&K Inserm, Lille-Francia. Fuente: Google Maps



Figura 14 Laboratorio J&K INSERM Lille. Mapa convencional. Mapa por Satélite. Fotografía del edificio del laboratorio. Fuente: Google Maps

### 2.1.2 Área de Trabajo

El Laboratorio J&K es una Unidad de Investigación Mixta del INSERM asociado a la Universidad de Lille, CHU de Lille y al Instituto Pasteur de Lille. La UMR 1011 se especializa en el estudio de mecanismos biológicos y moleculares que conducen al desarrollo de *Diabetes mellitus* tipo 2 y sus complicaciones cardiovasculares. Actualmente viene desarrollando el estudio de regulación de genes implicados en patologías y las consecuencias probables en caso de una desregulación. El interés principal se centra en factores de transcripción específicos, Receptores nucleares.

Equipo 1: Receptores nucleares en el síndrome metabólico. Dirección a cargo de PhD Bart STAELS y jefatura del equipo a cargo de PhD Sophie LESTAVEL.

### 2.1.3 Actividades y Reconocimientos de la U1011

Los objetivos de investigación del laboratorio se establecen de la siguiente manera:

- Definir a precisión la regulación molecular de receptores nucleares en contexto de la obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares.
- Comprender las funciones de los nuevos receptores nucleares que emergen como reguladores metabólicos.
- Estudiar la contribución del sistema inmunológico en la fisiopatología de la diabetes y enfermedades cardiovasculares.
- Identificar y validar los receptores nucleares y los cofactores asociados a ellos como posibles dianas terapéuticas innovadoras.

La U1011 ha recibido el respaldo del Consejo Europeo de Investigación de Subvenciones Avanzadas con *The Immunobile Project: Ácido biliar, inmunometabolismo, homeostasis de lípidos y glucosa*.

El laboratorio es uno de los cofundadores de *EGID (European Genomic Institute for Diabetes)*, siendo el primer Instituto de Investigación en Francia dedicado específicamente a la diabetes y sus complicaciones. Proyecto lanzado en 2009 con el aporte de los equipos fundadores.

## 2.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS

### 2.2.1 EQUIPOS E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

- Agitador orbital de 5 a 50 rpm (VSOS-Direct Industry).
- Cabina de bioseguridad Clase II A2 (Biobase)
- Cámara de conteo celular Malassez Brand™.
- Centrífuga/agitador vórtex para placas PCR (CVP-2, BioSan).
- Centrífuga termostática (LMC-4200R, BioSan).
- Espectrofotómetro UV-vis (NANODROP ND-1000 Thermo Scientific).
- Lector de microplacas, (Varioskan LUX- Thermo Scientific).
- Microcentrífuga termostática (Microcentrifuge Legend Micro 17 – Thermo Scientific).
- Microscopio inverso de campo luminoso (Oxion).
- Termociclador Mastercycler® Gradiente (Eppendorf) Software: MxPro– Mx3000P (Multiplex Quantitative PCR Systems – Agilent).

### 2.2.2 KITS

- Kit IntestiCult™ Mouse (STEMCELL)
- Kit DIRECT-ZOL Microprep®
- Kit TaqMan Master Mix® para-RT-qPCR

### 2.2.3 MATERIAL BIOLÓGICO

- Epitelio de intestino de la cepa murina C57BL/6J.
- Línea celular L-WRN (ATCC® CRL-3276™), tejido conectivo subcutáneo, areolar y adiposo proveniente de ratón (*Mus musculus*).

### 2.2.4 MATERIAL DE PLÁSTICO

El material con el que se trabajó en el laboratorio es desechable.

- Frasco de vidrio estéril de 500 y 1000 mL.
- Gradilla para tubos y frascos de 15 y 50 mL.
- Matraces de cultivo celular (Nunc EasyFlasks tratados) T75 y T175.
- Micropipetas de 2, 10, 20, 100, 200, 1000  $\mu$ L.
- Micropipetas eléctricas de 1000  $\mu$ L.

- Placas de pocillos múltiples 48 pozos pretratada con tejido conectivo (COSTAR® 3548).
- Placas para incubar células de 96 pozos – PCR (Thermo Scientific).
- Propipetas eléctricas y de pistón.
- Tubos falcon de 15 y 50 mL.
- Tubos eppendorf de 1.5 y 2 mL.
- Tubos eppendorf PCR (200 µL).
- Tira de tapas para la placa de pocillos de PCR.
- Tips para micropipetas.

### 2.2.5 REACTIVOS

- Agua ultrapura grado biología molecular.
- Antibióticos:
  - 10.000 UI Penicilina/10.000 µg Estreptomicina (Gibco).
  - Higromicina B 50 mg/mL (Gibco).
- Albúmina de suero bovino (BSA-STEMCELL).
- Inhibidor selectivo de la vía RHO/ROCK: Y-27632 (STEMCELL)
- Matriz de Corning Matrigel®-356231 GFR y membrana basal libre de rojo de fenol.
- Medio de Eagle modificado de Dubelcco/Mezcla de jamón nutritivo F-12 (DMEM/F-12).
- Medio de Eagle modificado de Dubelcco/Mezcla de jamón nutritivo F-12 con tampón HEPES 15 mM, (DMEM/F-12DMEM/F12 + 15mM HEPES).
- Reactivo de disociación celular suave sin enzimas (Gentle Cell Dissociation Reagent- STEMCELL).
- Solución salina tamponada con fosfato de Dubelcco sin calcio y magnesio, (D-PBS Without Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> - STEMCELL).
- Solución salina tamponada estéril (PBS)
- Suero Fetal Bovino (FBS 10% - STEMCELL).

## 2.3 MÉTODOS

### 2.3.1 PROTOCOLOS EN ANIMALES

El fondo genético murino C57BL/6J (2) fue previamente seleccionado para este estudio con parámetros estándares para el área de investigación de biología cardiovascular, biología del desarrollo, diabetes mellitus y obesidad, la genética, la inmunología, neurobiología e investigación sensorial. (Figura 16) El espécimen murino osciló entre 10 y 14 semanas de edad, alimentados con un régimen estándar a base de cereales (*chow diet, CD*). El cuidado proporcionado en su ritmo de vida establecido fue de un ciclo diario de 12 horas día-noche, además de estar a una temperatura de 20-25 °C y 45-65% de humedad. El bioterio posee un alto nivel de bioseguridad animal y asegura un ambiente favorable para la cepa murina, y se encuentra ubicado en el *Institut Pasteur de Lille*, institución asociada al Laboratorio J&K INSERM 1011. El espécimen murino posee un estado de salud conocido y cumple con la normativa científica interna del INSERM-Francia.



Figura 15 Cepa murina C57BL/6J (2).

La cepa murina fue trasladada al laboratorio J&K 24 horas antes del sacrificio. El ratón fue colocado en un área especial guardando un ayuno de 24 horas, se evita un excesivo estrés en el animal. El sacrificio fue autorizado por el jefe de equipo cumpliendo las exigencias institucionales de la Unión Europea (2012/707/UE) (56) donde se decidió hacer el sacrificio mediante la dislocación cervical previo a una sedación con cloroformo. La técnica para la dislocación cervical consiste en separar el cráneo de la medula espinal aplicando presión sobre la base posterior del cráneo. Esta separación hace que el sistema nervioso central deje de estimular la respiración y los latidos cardiacos, provocando la muerte.

## 2.3.2 ORGANOIDES INTESTINALES: OBTENCIÓN Y CULTIVO

### 2.3.2.1 AISLAMIENTO DE CRIPTAS INTESTINALES PARA LA OBTENCIÓN DE ORGANOIDES INTESTINALES

El aislamiento de criptas intestinales se ejecutó siguiendo las recomendaciones del protocolo estandarizado del laboratorio J&K Inserm 1011 y el boletín técnico de STEMCELL, detallado en el *Anexo 7*, donde utilizaremos el Kit IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse) (*Figura 17*) y Corning® Matrigel® Matrix (24). Inmediatamente después del sacrificio murino, se procedió a la extracción del intestino completo del que se eliminó tejido membranoso, vascular y graso. La zona intestinal de interés pasó por una serie de lavados con PBS frío (2-8 °C). Los segmentos de la parte intestinal cortados longitudinal y transversalmente fueron transferidos a un tubo cónico de 50 mL donde el lavado con PBS frío (2-8°C) fue continuo e intenso con movimientos ascendentes y descendentes (por triplicado) con ayuda de una pipeta durante 15 a 20 veces.



*Figura 16* Kit IntestiCult™ para Organoides murinos.

Para la siguiente etapa se eliminó el sobrenadante de PBS, y se adicionó 25 mL de Gentle Cell Dissociation Reagent (GCDr) para dejarlo durante 15 a 20 minutos a 20 rpm. Posteriormente se descartó el sobrenadante de GCDr, y luego se reconstituyó con 10 mL PBS+ BSA 0.1% frío (2-8°C) mezclando la nueva suspensión con la ayuda de una pipeta (por triplicado). Seguidamente se filtró el nuevo sobrenadante a 70 µm obteniendo la fracción 1, se reconstituyó y repitió el proceso 6 veces continuas, y se obtuvo 6 fracciones. Se centrifugaron las fracciones a 290 g (5089 rpm) por 5 minutos de 2-8 °C y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Finalmente, se adicionó 10 mL de PBS+BSA 0.1% para luego transferirlo a un tubo cónico de 15 mL rotulado correspondiente a las 6 fracciones y se centrifugó a 200 g

(4226 rpm) por 3 minutos a 2-8°C. Los *pellets* obtenidos están constituidos por las criptas intestinales granuladas.

### 2.3.2.2 CULTIVO ORGANOIDE DE CRIPTAS INTESTINALES AISLADAS

Los organoides intestinales fueron obtenidos a partir de las criptas intestinales aisladas, los cuales usan un sistema de cultivo tridimensional (3D) reduciendo la brecha de un sistema *in vitro* de alto rendimiento y estudios *in vivo* en animales de experimentación. El inicio del cultivo organoide parte inmediatamente después de la obtención del *pellet* de criptas intestinales, las 6 fracciones se suspendieron en 10 mL de DMEM/F-12 frío (2-8 °C), se evaluó la calidad de las fracciones bajo un microscopio invertido y se selecciona una fracción con una cantidad moderada de criptas.

Se realizó un conteo de criptas por mL de solución, y se estableció densidades de 500 y 750 criptas en diferentes tubos. Luego se centrifugó a 200 g (4226 rpm) por 5 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante y se adicionó 150 µL de **Medio de Crecimiento Organoide** + 2 µL de Y-27632 a temperatura ambiente (20-25 °C). Seguido del paso anterior, se añadió cuidadosamente 150 µL de Matrigel Matrix (2-8 °C) procurando el mezclado de la nueva suspensión. A continuación, se tomó 50 µL de la suspensión obtenida, se colocó en el centro de un pocillo procurando la formación de un domo. La placa fue previamente precalentada a 37 °C durante 10-15 minutos.

Tabla 2 Composición del Medio de Crecimiento Organoide (MCO)

Medio de Crecimiento Organoide (MCO)	Cantidades
<b>IntestiCult™ + Suplemento 1&amp;2</b>	5000 µL
<b>Medio Condicionado L-WRN MC L-WRN (Stock Lab)</b>	5000 µL
<b>Antibiótico: Penicilina/Estreptomicina (100UI/100 µg)</b>	1000 µL
<b>Total</b>	11000 µL

Finalmente, se agregó 1000  $\mu\text{L}$  de **medio de crecimiento organoide (MCO)**, detallado en la Tabla 8, a temperatura ambiente (20-25  $^{\circ}\text{C}$ ) en cada pocillo utilizado y se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$ . El monitoreo del crecimiento de organoides se realizó a diario haciendo uso del microscopio invertido y el cambio del medio de cultivo se efectuó 3 veces por semana. Los pocillos vacíos fueron llenados con PBS, para así proporcionar una humedad adicional a la placa de cultivo.

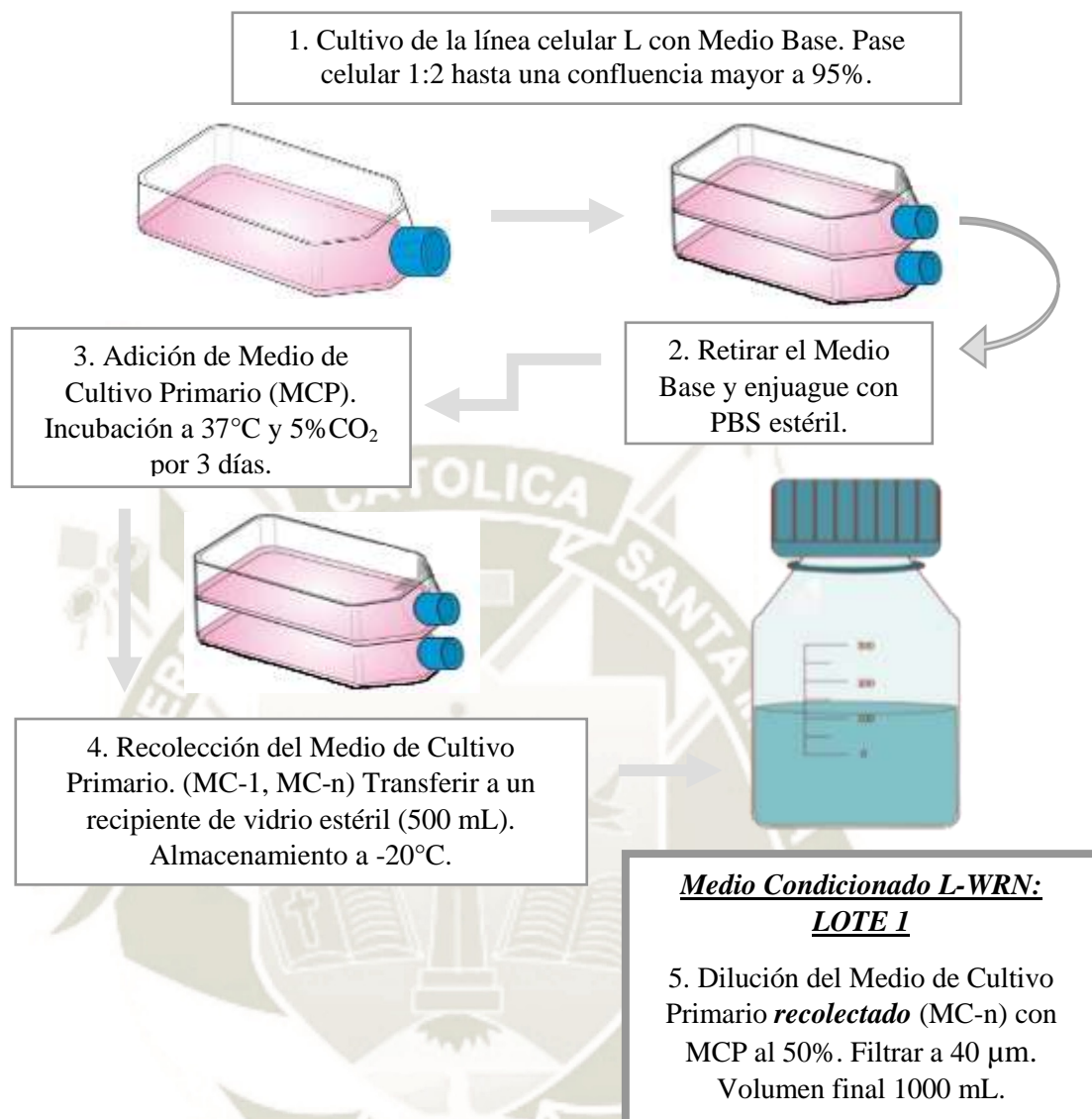
#### 2.3.2.2.1 Passage de Cultivo de Organoides Intestinales

El pase (*Passage*) de organoides intestinales murinos inicia con el retiro del medio de cultivo líquido que está en cada pocillo, se agregó 1000  $\mu\text{L}$  de GCDr en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente (22  $^{\circ}\text{C}$ ) por 60 segundos, logrando el rompimiento del domo de Matrigel de cada pocillo, se reforzó este accionar con movimientos ascendentes y descendentes, que luego se transfirieron de cada grupo de estudio a un tubo cónico de 15 mL y se incubó a temperatura ambiente a 20 rpm por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 290 g (5089 rpm) por 5 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$  y se desechó el sobrenadante. Después del paso anterior, se lavaron los sedimentos del *pellet* con DMEM/F-12+ 15mM HEPES frío (4  $^{\circ}\text{C}$ ), se centrifugó a 200 g (4226 rpm) por 5 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$  y se descartó el sobrenadante. A continuación, se agregó el medio de crecimiento organoide + Matrigel® Matrix en proporción 50:50 a temperatura ambiente y se mezcló con el *pellet* cuidadosamente, se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla resultante y se transfirió en el centro de cada pocillo de una placa Corning® N° 3526 precalentada y se incubó 10 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se añadió 1000  $\mu\text{L}$  de Medio de Crecimiento Organoide preparado a temperatura ambiente (22  $^{\circ}\text{C}$ ) en cada pocillo que tenga domo, y se agregó PBS estéril a los pocillos vacíos. Las condiciones de la incubación del cultivo fueron las siguientes: 37  $^{\circ}\text{C}$  y 5 %  $\text{CO}_2$ ; el monitoreo del crecimiento fue diario y el cambio del medio de crecimiento fue de 3 veces por semana. Mayores detalles se visualizan en el *Anexo 7*. El sistema de cultivo organoide puede pasarse indefinidamente las veces que se crea conveniente.

### 2.3.3 CULTIVO CELULAR Y PRODUCCIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO L-WRN

La línea celular L-WRN (ATCC® CL-3276™, *Mus musculus*, ratón) es la principal fuente para la producción de *Medio Condicionado L-WRN* (*Wnt-3A*, *R-espondina* y *Noggin*) que es utilizado para el cultivo de células madre en tejido de mamíferos para su cultivo se sigue el protocolo del laboratorio J&K Inserm 1011, Lille. El criotubo fue proporcionado por el laboratorio, y tras su estabilización se preparó el medio base para la línea celular L-WRN que debe estar constituido por el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), Suero fetal bovino 10% (FBS) y antibiótico (Higromicina B o Penicilina/Estreptomina).





La producción de los siguientes Lotes (2 y 3) de Medio Condicionado L-WRN, siguen el mismo procedimiento desde el punto N°3.

Figura 17 Cultivo Celular y Producción de Medio Condicionado L-WRN. Explicación gráfica del procedimiento de trabajo con la línea celular L para la Producción de diferentes lotes de MC L-WRN. (Elaboración propia)

### 2.3.3.1 PRODUCCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO L-WRN

La preparación del medio condicionado (MC) se encuentra gráficamente explicado en la *Figura 17*, donde a partir de la línea celular que al llegar a confluencia se procedió a retirar el medio base; y las células se lavaron con PBS para retirar el medio base que pudiera permanecer en el flask. Inmediatamente después se adiciona el medio de cultivo primario que está constituido por DMEM/F12, L-Glutamina, FBS y antibiótico (Penicilina/Estreptomina). Se incubó por 3 días a 37 °C y 5 %

CO<sub>2</sub>. Para la recuperación de todo el medio celular, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos, se recolectó el sobrenadante en una botella de 500 mL y se almacenó el Medio Condicionado L-WRN (MC-1) en un ambiente frío (2-8 °C). Seguidamente, se añadió nuevamente el medio de cultivo primario, y se repitió el procedimiento de incubación a 37 °C y la recolección del segundo medio que se convierte en MC-2 que una vez centrifugado se mezcló con MC-1, y así sucesivamente. La solución final de Medio Condicionado L-WRN, está compuesta de una dilución al 50 % de los Medios Condicionados (MC-n) recolectados y medio de cultivo primario, el cual se filtró a 40 µm. El medio obtenido puede ser almacenado a -20 °C. En este apartado se procuró la producción de 3 lotes de 1000 mL de Medio Condicionado L-WRN obtenidos a partir de la misma línea celular.

#### 2.3.4 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos (también denominados *primers* o cebadores) específicos para los genes de interés SLC19A2 v1 (THR1a), SLC19A2 v2 (THR1b), SLC19A3 (THR2), MKi67 y LGR5 se diseñaron virtualmente y fueron sintetizados por la empresa Sigma. La temperatura de hibridación del cebador (T<sub>m</sub>) que se procuró estuvo entre 57 °C a 63 °C. Los oligonucleótidos se diseñaron y comprobaron virtualmente para corroborar la especificidad, ambos procedimientos efectuados en el software de NCBI-BLAST ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)).

Para el diseño de un par de cebadores, se necesitó identificar el gen de interés que lo codifica (*Gene ID*), para el cual se consideró la especie y la matriz a analizar, a través de la base de datos genéticos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos (NCBI). La recomendación fue tener la ubicación génica exacta de la parte que se desea analizar. Tras la identificación del *Gene ID*, la información genética que se necesitó fue el registro *RefSeq*, una base de datos de secuencias de referencia, que en muchas ocasiones se expresa con el sufijo “NM” (ejemplo: NM\_001276455), para la categoría de una secuencia de referencia para ARNm. Adicionalmente, se necesitó la codificación *FASTA* que nos permitió conocer toda la secuencia genética de pares de bases del gen de interés.

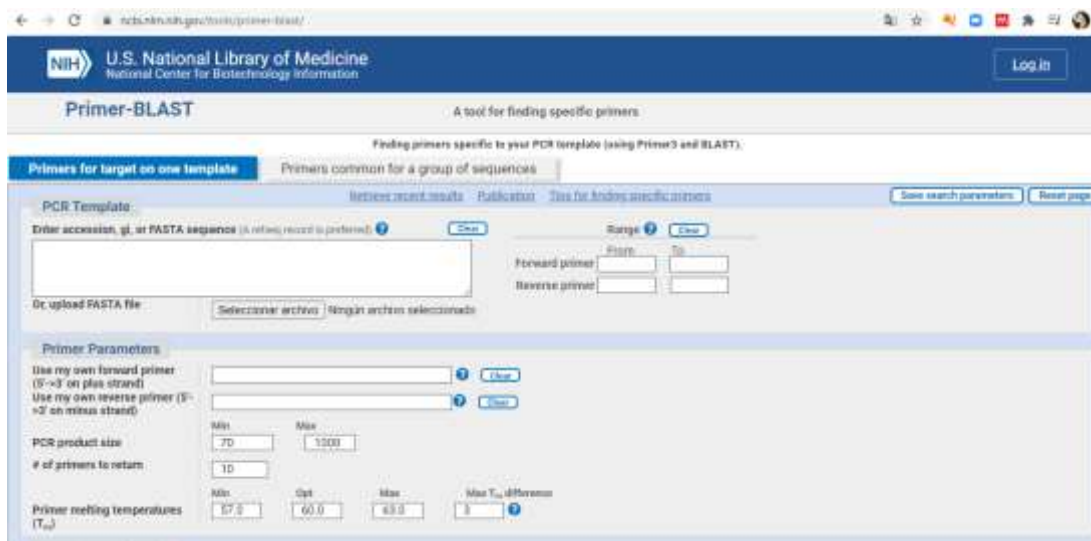


Figura 19 Primer-BLAST, herramienta de diseño de cebadores.

En el portal bioinformático NCBI-BLAST, se ingresó el código *FASTA* o *refseq* de cada gen de interés en la parte de “Plantilla de PCR” y además se especificó el lugar de imprimación, directa e inversa. Se establecieron los parámetros ideales para el diseño del cebador: el tamaño del producto de PCR y la temperatura de fusión del cebador ( $T_m$ ). Para mejorar la especificidad del diseño se optó por seleccionar el “tramo de unión de exón, el cebador debe abarcar una unión exón-exón”. Para



Figura 18 Primer-BLAST, especificaciones para el diseño de cebadores.

culminar, se completó la información en la parte de “parámetros de comprobación de la especificidad del par de cebadores” con un modo de búsqueda *automático*, para una base de datos de ARNm *refseq* y la confirmación de la especie que se utilizó, *Mus musculus*. Finalmente se oprimió el botón de “GET PRIMERS”, se esperan

unos minutos y se obtiene la información de los pares de cebadores que pueden ser usados.

### 2.3.4.1 Eficiencia por RT-qPCR

Después del diseño y comprobación de la especificidad de los cebadores, se realizó la evaluación de la eficiencia de los cebadores. Fue necesario la evaluación a diferentes diluciones de RT (ADNc) a 1/2; 1/5; 1/10; 1/25; 1/50; 1/100 y 1/500 frente al MIX Q-PCR a una proporción de 1:20 que están explicadas a detalle en las *Tablas 2 y 3*. El MIX debe contener 300 nM de *primers*. La dilución de *Rox* debe ser 1/200 (199  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O + 1  $\mu\text{L}$  *Rox*).

Tabla 3 Plan de placa: Posición de la muestra diluida en la Q-PCR.

	<i>Gen de Interés</i>		<i>Dilución de RT</i> (1 $\mu\text{L}$ )			
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>RT</i> ( $\mu\text{L}$ )	<i>Agua</i> ( $\mu\text{L}$ )	<i>RT</i> ( $\mu\text{L}$ ) *	<i>Agua</i> ( $\mu\text{L}$ )
<b>A</b>	1/2	1/2	5	5		
<b>B</b>	1/5	1/5	2	8		
<b>C</b>	1/10	1/10	1	9		
<b>D</b>	1/25	1/25	1	24		
<b>E</b>	1/50	1/50	1*	49*		
<b>F</b>	1/100	1/100			5*	5
<b>G</b>	1/500	1/500			1*	9
<b>H</b>	Blanco	Blanco	-	-	-	-

\*. Refiere a que se toman alícuotas a partir de la dilución.

Tabla 4 Plan de Composición del MIX Q-PCR

<i>MIX</i> (19 $\mu\text{L}$ )	<i>1 Puit</i>	<i>16 + 2 Puit</i>
<i>Mix</i>	10 $\mu\text{L}$	180 $\mu\text{L}$
<i>Oligo 1</i>	0.6 $\mu\text{L}$	10.8 $\mu\text{L}$

<b><i>Oligo 2</i></b>	0.6 $\mu$ L	10.8 $\mu$ L
<b><i>Rox</i></b>	0.14 $\mu$ L	2.52 $\mu$ L
<b><i>EPPI*</i></b>	7.66 $\mu$ L	138 $\mu$ L
	19 $\mu$ L	342 $\mu$ L

Tabla 5 Plan de placa: posición de muestras para la eficacia de oligonucleótidos en qPCR. Representación de diluciones de las muestras descritas en la tabla N°2 del apartado 18.3.4.2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1/2		1/2		1/2							
<b>B</b>	1/5		1/5		1/5							
<b>C</b>	1/10		1/10		1/10							
<b>D</b>	1/25		1/25		1/25							
<b>E</b>	1/50		1/50		1/50							
<b>F</b>	1/100		1/100		1/100							
<b>G</b>	1/500		1/500		1/500							
<b>H</b>	Blanco		Blanco		Blanco							
	<b><i>THR1a</i></b> ( <i>SLC19A2v1</i> )		<b><i>THR1b</i></b> ( <i>SLC19A2v2</i> )		<b><i>THR2</i></b> ( <i>SLC19A3</i> )							

### 2.3.5 ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL

#### 2.3.5.1 Extracción y dosaje de ARN

La preparación de la muestra para una matriz de origen celular es importante para la extracción de ARN. El protocolo del laboratorio J&K Inserm 1011 para la purificación de RNA de organoides utiliza el *Kit Direct-Zol™ RNA MicroPrep - Zymo Research (Anexo 8)*. El método del protocolo asegura la recuperación imparcial de ARN con una alta eficacia y rapidez. El procedimiento consistió en la adición de muestra (células, tejidos, suero, plasma, etc.) previamente tratada en Trizol (TRI Reagent®) sobre una columna Zymo-Spin, luego de un lavado y la elución de ARN. El ARN ya eluido es adecuado para un análisis molecular (RT-qPCR) (57). La calidad de la muestra de ARN se evaluó midiendo la absorbancia a 260 nm, la pureza de ARN se obtiene por la absorbancia 260/280 nm (contaminación proteica) y 260/230 nm (contaminación salina). El equipo que se utilizó fue Nanodrop ND-1000.

El procedimiento de extracción de ARN de organoides empezó con el tratamiento de cada muestra con 100  $\mu\text{L}$  Trizol (TRI Reagent®) sobre cada pocillo de organoides, el grupo de estudio fue transferido y rotulado correctamente en microtubos de 1000  $\mu\text{L}$  para evitar confusiones. Para la purificación de RNA de cada muestra pretratada con Trizol, se le adiciono 100  $\mu\text{L}$  de Etanol y se mezcló vigorosamente. La solución depositó en el tubo colector de la columna Zymo-Spin™ IC, se centrifugó a 10000 g (9449 rpm) por 1 minuto y se transfiere la columna a un nuevo tubo colector.

A continuación, se efectuó el tratamiento de DNasa I, se le adicionó 400  $\mu\text{L}$  de Buffer de lavado RNA a cada columna, se centrifugó a 10000 g por 1 minuto, se adicionó nuevamente 40  $\mu\text{L}$  de Mix DNasa I (5  $\mu\text{L}$  DNase I + 35  $\mu\text{L}$  Buffer de digestión DNA) y se incuba la suspensión a 22°C por 15 minutos. Tras efectuar los procedimientos anteriores, se adicionó a cada columna 400  $\mu\text{L}$  del reactivo de prelavado (Direct-zol™ RNA PreWash), se centrifugó a 10000 g por 1 minuto y se descartan los residuos. Seguidamente, se adicionó a cada columna 700  $\mu\text{L}$  del Buffer de Lavado RNA, se centrifugó a 16000 g por 1 minuto y se transfirió la solución obtenida a un tubo RNasa free. Finalmente, la elución de RNA se completó con la adición de 15  $\mu\text{L}$  de Agua UP DNase/RNase Free sobre la columna y se centrifugo a 16000 g por 1 minuto. El RNA obtenido se almacenó en refrigeración hasta su uso.

### 2.3.5.2 Síntesis de ADNc por retro transcripción

La Retro transcripción (RT) se efectuó sobre 10  $\mu\text{L}$  de RNA en hielo y se adicionó 10  $\mu\text{L}$  del 2X Máster Mix reaccionante conformado por el RT buffer 10X, dNTPs 25X, RT random primers 10X, Multiscribe Reverse Transcriptasa, RNAsin y Agua UP Nuclease-free (Tabla 4). Las condiciones térmicas de los ciclos se dividen en 4 etapas que están explicadas en la Tabla 5 con parámetros de tiempo y temperatura.

Tabla 6 RT: Cantidades para la preparación del Máster Mix

<i>Numero de muestras</i>	<i>1</i>	<i>16 + 4</i>
<b>RT Buffer 10 X</b>	2.0 $\mu\text{L}$	40.0 $\mu\text{L}$
<b>dNTP Mix (100mM) 25X</b>	0.8 $\mu\text{L}$	16.0 $\mu\text{L}$
<b>RT Random primers 10X</b>	2.0 $\mu\text{L}$	40.0 $\mu\text{L}$
<b>Multiscribe reverse transcriptasa</b>	1.0 $\mu\text{L}$	20.0 $\mu\text{L}$

<b>RNAsin</b>	1.0 $\mu$ L	20.0 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O UP Nuclease-free</b>	3.2 $\mu$ L	64.0 $\mu$ L
<b>Total, por Reacción</b>	10 $\mu$ L	200.0 $\mu$ L

Tabla 7 RT: Condiciones térmicas de los ciclos.

<b>Etapa</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Temperatura</b>	25°C	37°C	85°C	4°C
<b>Tiempo</b>	10 minutos	120 minutos	5 segundos	$\infty$

### 2.3.5.3 PCR cuantitativa (qPCR)

La reacción de qPCR se efectuó en el termociclador utilizando como programa MxPro-Mx3000P (Agilent) y como agente intercalante SYBR Green. Los fluoróforos para normalizar las variaciones de fluorescencia no ligadas a la PCR que se recomienda usar es *Rox*. El valor de Ct (*ciclo threshold*) de la reacción de qPCR es determinado en la fase exponencial, en la intersección de la línea de ruido de fondo y la curva de fluorescencia lo que permitió evaluar la expresión de los genes de interés. La expresión de los genes de interés fue moderada por el gen de control, *Ciclofilina*. En la *Figura 18* se observa el Máster Mix de TaqMan™. El procedimiento de la qPCR tuvo un volumen final de 20  $\mu$ L compuesto de 5  $\mu$ L de la RT diluida y 15  $\mu$ L de Máster Mix (Mix + Oligonucleótidos (*primers forward* y *reverse*) + *Rox* (1:200) + H<sub>2</sub>O c.s.p.). Cada grupo de estudio fue analizado por cuadruplicado sobre una placa de 96 pocillos bajo una metodología de determinación cuantitativa relativa.

Tabla 8 Programación del ciclo de la RT-qPCR

<b>Etapa</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Ciclos (40 ciclos)</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Extensión (40 ciclos)</b>
<b>Temperatura</b>	95° C	95° C	60° C	72° C
<b>Tiempo</b>	15 minutos	10 seg	30 seg	15 minutos

### 2.3.6 Análisis Estadístico

Los resultados numéricos que se obtuvieron de las diferentes experiencias se expresaron bajo conceptos estadísticos de media, desviación estándar, etc. La interpretación de las diferencias entre grupos de estudio se efectuó a través de un

*Análisis de Varianza unidireccional (1 factor o 1 vía), y una prueba de comparación múltiple de Bonferroni para evitar los falsos positivos. El análisis estadístico se realizó en el Software GraphPad Prism 8.1.0 Project.*



Tabla 9 Plan de placa: Posición de las muestras sobre una placa de 96 pocillos para Q-PCR.  
Distribución para el gen de referencia (Ciclofilina) y para el biomarcador de proliferación (Ki67).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1		9		Blanco Enz.		1		9		Blanco Enz.	
<b>B</b>	2		10		Blanco ARN		2		10		Blanco ARN	
<b>C</b>	3		11		Blanco qPCR		3		11		Blanco qPCR	
<b>D</b>	4		12				4		12			
<b>E</b>	5		13				5		13			
<b>F</b>	6		14				6		14			
<b>G</b>	7		15				7		15			
<b>H</b>	8		16				8		16			
	<b>Ciclofilina</b>						<b>Ki67</b>					

- Tabla 10 Plan de placa: Posición de las muestras sobre una placa de 96 pocillos para Q-PCR.  
Distribución para el biomarcador de células madre adultas (LGR5) y para el receptor de tiamina 1 (THTR1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1		9		Blanco Enz.		1		9		Blanco Enz.	
<b>B</b>	2		10		Blanco ARN		2		10		Blanco ARN	
<b>C</b>	3		11		Blanco qPCR		3		11		Blanco qPCR	
<b>D</b>	4		12				4		12			
<b>E</b>	5		13				5		13			
<b>F</b>	6		14				6		14			
<b>G</b>	7		15				7		15			
<b>H</b>	8		16				8		16			
	<b>LGR5</b>						<b>THTR1</b>					



# **CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES**

## CAPÍTULO III: RESULTADOS

Los resultados del presente proyecto de investigación están detallados en los siguientes apartados donde se pretende ilustrar el método de conformación de organoides intestinales de colon murino extraídos a partir de la cepa C57BL/6J, interpretar la proliferación y diferenciación celular en organoides expuestos a diferentes lotes de Medio Condicionado L-WRN, además de la evaluación de la expresión del receptor de tiamina (THR1) que es de gran importancia en procesos bioquímicos intestinales.

### 3.1 PROTOCOLO EN ANIMALES: SACRIFICIO MURINO

La cepa murina de *Mus musculus* C57BL/6J que fue proporcionada por el Departamento de Bioseguridad del Animalario del *Institut Pasteur de Lille* cumple con el estado de salubridad adecuado para este proyecto de investigación. El sacrificio murino por dislocación cervical post sedación, se efectuó conservando todas las condiciones que exige la legislación europea. Del espécimen se extrajo la porción de intestino delgado y grueso en su totalidad, 38 cm aproximadamente.

### 3.2 ORGANOIDES INTESTINALES: OBTENCIÓN Y CULTIVO

#### 3.2.1 AISLAMIENTO DE CRIPTAS INTESTINALES: OBTENCIÓN

El aislamiento de criptas intestinales murinas sigue el protocolo detallado en el *Apartado 15.3.2.1* y el *Anexo 4*. La evaluación de la calidad de las fracciones obtenidas se efectuó con la ayuda de un microscopio invertido, para lo cual se tomó 1 mL de cada fracción para ser observadas microscópicamente. Se seleccionó la **Fracción 4** debido a que estaba compuesto de varios tamaños de criptas intestinales con formas geométricas de bordes lisos y con poca cantidad de células individuales que se puede apreciar en la *Figura 21*.

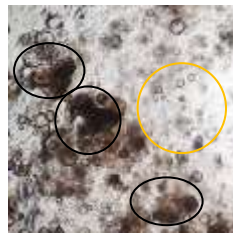


Figura 20 Fracción N°4 de Criptas intestinales (1mL). Los círculos negros demuestran las criptas con formas geométricas y el círculo amarillo denota a las células individuales. Elaboración propia.

Para el conteo de criptas intestinales presentes en la Fracción 4, se tomó 10  $\mu\text{L}$  de la fracción seleccionada y se depositó sobre un portaobjetos de conteo (cámara de Malassez). Con el microscopio invertido, se manifestó la presencia de 17 Criptas intestinales en 10  $\mu\text{L}$  de la Fracción 4. Por tanto, los cálculos estimados para 1000  $\mu\text{L}$  de fracción se establece la presencia de 1700 criptas intestinales aproximadamente. Se desprendieron 2 grupos de estudio de 500 y 750 criptas, cada grupo con 3 pocillos, los cálculos establecen que se debe tomar una alícuota de 294.1  $\mu\text{L}$  y 441.1  $\mu\text{L}$  respectivamente (Tabla 7). Cada alícuota se transfirió a 2 tubos cónicos de 15 mL previamente etiquetados, se centrifugó a 200 g (4226 rpm) por 5 minutos (4 °C) y se desechó el sobrenadante.

Tabla 11 Cálculo del volumen de fracción compuesto por criptas intestinales

Grupos de estudio	Volumen de alícuota
Grupo A (500 criptas)	294.1 $\mu\text{L}$
Grupo B (750 criptas)	441.1 $\mu\text{L}$

### 3.2.2 CULTIVO DE ORGANOIDES INTESTINALES DE COLON MURINO

El *pellet* de criptas de cada tubo fue reconstituido con 50  $\mu\text{L}$  de Medio de Crecimiento Organoides (MCO) a temperatura ambiente (22 °C) y 50  $\mu\text{L}$  de Matrigel® Matrix frío (4 °C) se mezcló cuidadosamente hacia arriba y abajo por 5 veces, evitando la formación de burbujas. La composición del MCO está detallado en la Tabla 2. Durante esta etapa se utilizó el Medio Condicionado L-WRN (MC L-WRN) que el laboratorio poseía en stock.



Figura 21 Medio IntestiCult y medio L-WRN (stock de laboratorio)

Según el apartado 15.3.2.2, para la formación de cúpulas (domo) inicialmente se debe pipetear 50  $\mu\text{L}$ , sin embargo, al notar el tamaño de la cúpula se determinó utilizar solamente la mitad, 25  $\mu\text{L}$  de la suspensión. La placa que se optó por utilizar fue COSTAR® N°3548 de 48 pocillos (Figura 22), que previamente fue precalentada a 37 °C durante 10 minutos. El mismo proceso se efectuó con la suspensión A y B en placas diferentes. Después de obtener la placa sembrada se llevó a incubación por 10 minutos a 37 °C, con la finalidad de fijar el Matrigel®. Finalmente, se añadió 250  $\mu\text{L}$  de MCO + 2.5  $\mu\text{L}$  Y-27632 (1:100) a temperatura ambiente (22 °C) en cada pocillo sembrado; y PBS estéril a los pocillos vacíos. Incubación a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.

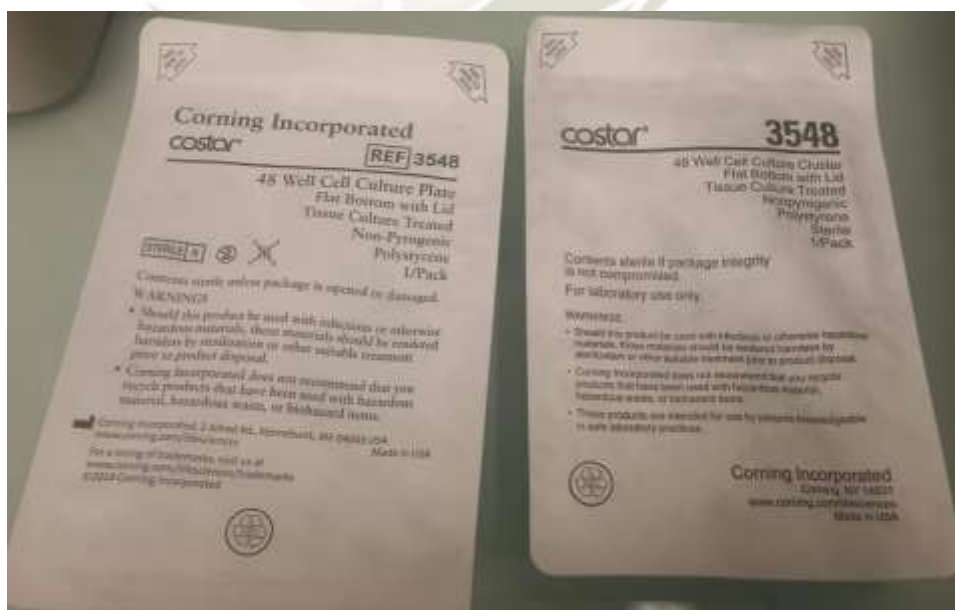


Figura 22 Placa de cultivo COSTAR

Las criptas de colon murino empiezan a desarrollarse hasta el día seis de cultivo, donde se consideró el primer *passage* en proporción 1:2 (Figura 23). El protocolo de *passage* se encuentra detallado en el apartado 18.3.2.2.1. Las siguientes 2 semanas fueron favorables para el crecimiento de organoides colónicos murinos del Grupo A y B donde se realizaron 2 *passages* (cada 7 días) adicionalmente. Para la última semana de cultivo se **seleccionó al grupo A** para que pueda ser expuesto a los diferentes lotes de Medio Condicionado L-WRN producidos en el Laboratorio.



Figura 23 Cultivo de Organoides Intestinales Colónicos (Fuente propia)

### 3.3 CULTIVO CELULAR Y PRODUCCION DE MC L-WRN

El crio-tubo de las células L-WRN (ATCC® CRL-3276™) se descongeló a 37°C, se reconstituyó con Medio Base (DMEM + Higromicina B 0.5mg/mL + FBS10%) en un tubo cónico y se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, se adicionó 30 mL de Medio Base y se transfirió a un matraz de cultivo celular (Flasks) para incubar a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> hasta que llegue a una

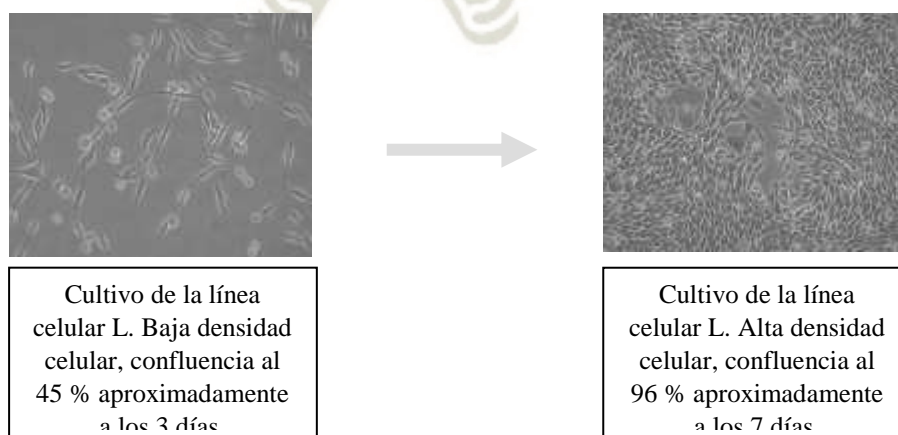


Figura 24 Células de la línea celular L-WRN (ATCC® CRL-3276™).

confluencia de 90 % aproximadamente.

Se realizó el proceso de tripsinación de la línea celular, empezando por retirar el medio de cultivo y adicionar tripsina dejando actuar por 5 minutos a 37 °C para obtener células individuales, neutralizar con Medio Base y transferir a un tubo cónico para centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante para distribuir el *pellet* celular reconstituido con Medio Base en 2 Flasks nuevos. Se incubó a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>, monitoreando la confluencia y el cambio de Medio Base cada 2 o 3 días, observar en la *Figura 25*.

### **3.3.1 PRODUCCIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO L-WRN**

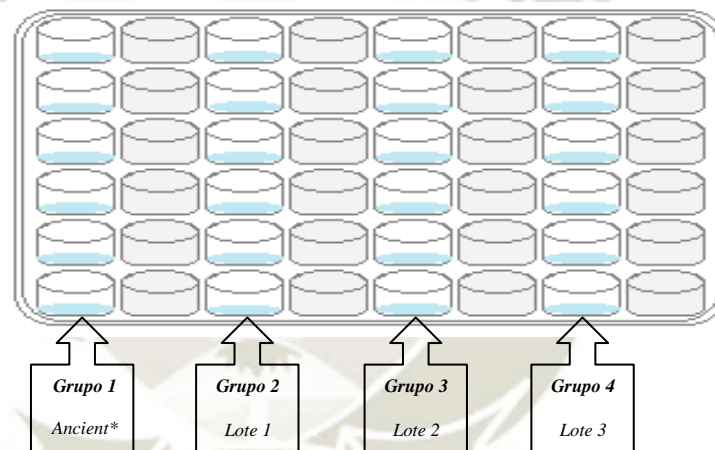
El Medio Condicionado L-WRN se obtuvo a partir de la línea celular L que fue cultivada previamente. Las células L adheridas al matraz de cultivo se encontraban a una confluencia mayor a 95%, se retiró el Medio Base y fueron lavadas con PBS estéril. A continuación, se añadió el Medio de Cultivo Primario (MCP) constituido por DMEM/F12, L-Glutamina, FBS y antibiótico (100UI Penicilina/100 µg Estreptomina por 1000 µL de MCP) y se incubó por 3 días a 37 °C 5 % CO<sub>2</sub>. Se recuperó todo el medio celular para centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos y se recolectó el sobrenadante en una botella de vidrio de 500 mL, esta primera recolección recibió el nombre de MC-1 y se almacenó a 4 °C; se repitió este procedimiento hasta llegar al volumen de la botella (500 mL). La primera botella de Medio Condicionado (500 mL) que se obtuvo se diluyó con el Medio de Cultivo Primario en proporciones iguales, y se filtró por una membrana de 40 µm, la solución obtenida es denominada como *Lote 1* del MC L-WRN, se logró preparar los 3 lotes de MC L-WRN propuestos en el apartado 15.3.3.1.

### **3.4 ORGANOIDES DE COLON MURINO EXPUESTOS A LOS DIFERENTES LOTES DE MEDIO CONDICIONADO L-WRN**

Los organoides de colon murino de la cepa C57BL/6J Wild Type extraídos anteriormente de la porción intestinal rica en criptas intestinales fueron cultivadas con el Kit IntestiCult™ (Medio basal + Suplemento 1&2) y el Medio Condicionado L-WRN que provee de compuestos necesarios para la proliferación y diferenciación celular de los Organoides Intestinales. Por tal motivo es necesaria la evaluación de calidad del Medio Condicionado L-WRN producido en el laboratorio. Por

consiguiente, los Organoides Intestinales fueron expuestos por 1 semana a los 3 Lotes de MC L-WRN recientemente producidos y fueron comparados con el MC L-WRN “Ancient” que había en stock en el laboratorio. Condiciones de cultivo: Incubación a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>.

La exposición de los organoides intestinales de colon a Medio Condicionado L-WRN (MC L-WRN) por una semana fue planificado con 4 Grupos de Estudio: Grupo1, OI frente a MC L-WRN *Ancient*\* (“Antiguo” en francés); Grupo 2, 3 y 4, OI frente a los Lotes 1,2 y 3 de MC L-WRN respectivamente. Cada grupo de estudio estuvo conformado por 4 pocillos de organoides intestinales distribuidos a una placa Costar® de 48 pocillos, *passage*. La distribución de Organoides Intestinales sobre la placa se encuentra detallada en la *Figura 27* donde se procuró un distanciamiento






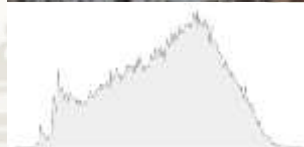




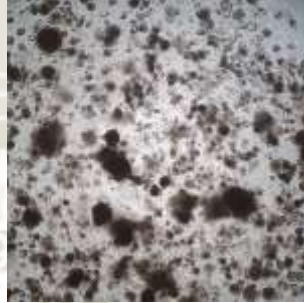

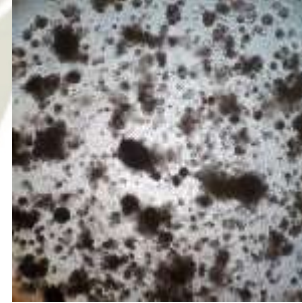

*Figura 25* Distribución de los grupos de estudio de Organoides intestinales de colon frente a MC L-WRN sobre una placa de cultivo de 48 pocillos.

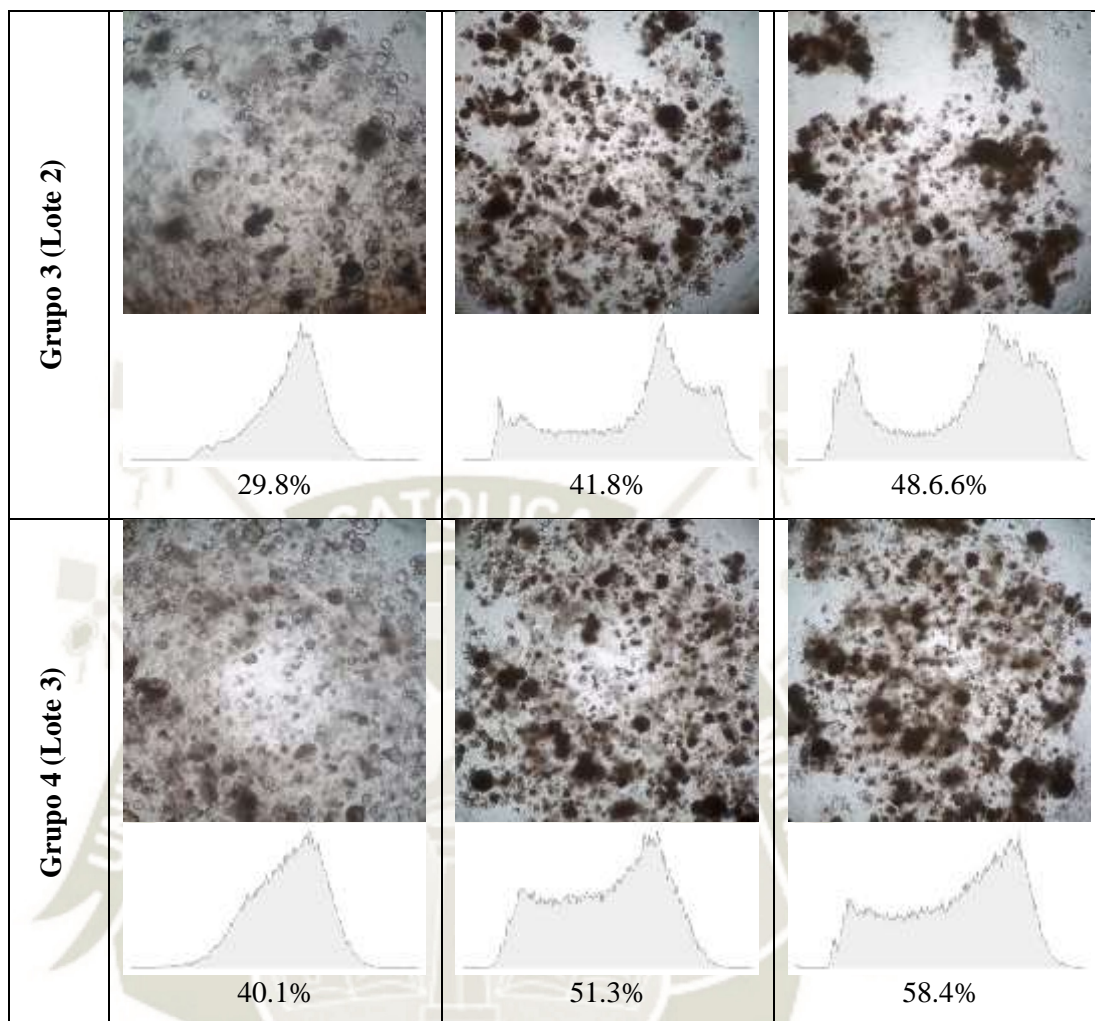
entre grupos de estudio de una columna de pocillos con PBS estéril.

La evaluación del crecimiento de Organoides Intestinales Colónicos de los diferentes grupos de estudio, expuestos a distintos lotes de Medio Condicionado L-WRN, se ejecutó con la monitorización de la opacidad bajo un microscopio invertido a x100. Las fotografías obtenidas durante la evaluación fueron analizadas instantáneamente según su grado de opacidad, generando un histograma que nos permite analizar el crecimiento de organoides. En la *Tabla 9* se plasma el crecimiento progresivo de cada grupo de estudio visualizando las fotografías e histogramas de luminosidad. Los histogramas de luminosidad representan en el eje X, la distribución de sombras y en

el eje Y, el número de píxeles; con estos parámetros generados en el software del microscopio invertido ha sido posible la evaluación de cada fotografía.

*Tabla 12 Crecimiento de Organoides Intestinales Colónicos expuestos a diferentes grupos de Medio Condicionado L-WRN durante 1 semana. Fotografías progresivas a x100 bajo un microscopio invertido. Cada fotografía está al lado de su diagrama de opacidad.*

MC L-WRN	Día 1 (lunes)	Día 3 (miércoles)	Día 5 (viernes)
<b>Grupo 1 (Ancient)</b>	  37.2%	  46.7%	  55.9%
<b>Grupo 2 (Lote 1)</b>	  35.7%	  47.1%	  59.1%



En el grupo de estudio 1, del MC L-WRN *Ancient\**, los histogramas generados permiten observar la tendencia de proliferación y reproducción de este grupo control. El histograma del día 1 (lunes) de cada grupo servirá como referencia para los siguientes días, en el primer grupo se puede visualizar que el primer diagrama tiene un pico triangular con base ancha inclinada ligeramente hacia la derecha. La siguiente fecha, día 3 (miércoles), se avista que el histograma creció horizontal y verticalmente cubriendo la base del eje X, pero conservando la tendencia inicial del primer diagrama.

En este día de estudio se logra visualizar que se generó un pico característico en el extremo izquierdo que no apareció en el día 1. Para culminar, el histograma del día 5 (viernes) obtuvo un crecimiento vertical más pronunciado en la parte central y el lado izquierdo del diagrama. La tendencia de proliferación y reproducción organoide que

se presentó en el grupo de estudio 1, con MC L-WRN *Ancient\**, ha sido interpretado con los histogramas que se describieron anteriormente. Del mismo modo, el porcentaje de opacidad (37.2 %, 46.7 % y 55.9 % respectivamente) arrojado por el software del microscopio refleja que este grupo de estudio logró una tendencia progresiva de crecimiento proliferativo.

El segundo grupo de estudio de organoides intestinales, con MC L-WRN Lote1. Al igual que el grupo anterior, la comparación entre diagramas tomó como referencia al histograma del día 1 de la semana de estudio. El histograma del día 1 (Lunes), está conformado por un pico triangular con una inclinación ligera hacia la derecha, la base del pico es ancha, el siguiente histograma (día 3, Miércoles) guarda relación con respecto al primer diagrama debido se conserva la forma del pico inicial, también se observa el crecimiento en la base del espectro que se desplaza por gran parte del eje horizontal y la elevación del espectro en la parte derecha central del diagrama y en último lugar se tiene al histograma del día 5 (Viernes) que presenta una progresión ascendente del espectro en el lado derecho. Los porcentajes de opacidad de cada histograma del grupo de estudio durante la semana son 35.7 %, 47.1 % y 59.1 % respectivamente para los días 1,3 y 5, pudiendo apreciar un crecimiento proliferativo ascendente.

El tercer grupo de estudio de organoides intestinales, con MC L-WRN Lote 2. De la misma manera que los grupos anteriores, se enfatiza al histograma del primer día como punto de referencia. En el histograma del día 1 (Lunes) se percibe a un pico triangular puntiagudo ubicado en la parte central derecha del espectro, la base esta disipada a lo largo del eje X; el histograma del día 3 (Miércoles) se extiende horizontalmente cubriendo gran parte del eje, el pico del día 1 se percibe superpuesto por un espectro dilatado de manera ascendente que cubre y ensancha al pico inicial, también se observa un patrón de crecimiento extendido por los lados del diagrama; y por último, el histograma del día 5 (Viernes) esta acrecentado verticalmente en los lados del diagrama, dejando la parte central decrecida. Los porcentajes de opacidad de cada histograma son 29.8 %, 41.8 % y 48.6 % para los días 1,3 y 5 que se monitoreó el cultivo.

Para el último grupo de estudio de organoides intestinales, con MC L-WRN Lote 3 se detallan los histogramas comparándolos con el primer histograma. El primer histograma (día 1, lunes) presenta un pico ensanchado ubicado en la parte central, el histograma del día 3 (miércoles) se extiende por el eje horizontal e incrementa su área en la parte central e izquierda considerablemente y, por último, el histograma del día 5 (viernes) tiene una tendencia de ampliación hacia los lados al igual que el grupo 3. Los porcentajes de opacidad de cada histograma para los días 1,3 y 5 de este grupo son 40.1 %, 51.3 % y 58.4 %.

Durante la evaluación de los resultados de este apartado se puede constatar que el crecimiento exponencial de mayor alcance fue por parte del primer y segundo grupo de estudio. El Grupo 1, denominado como el “control” del experimento debido a que es el MC L-WRN en stock con el que se estaba trabajando, presentó un crecimiento estable y proporcional. El Grupo 2, a diferencia del primer grupo tuvo un crecimiento exponencial del primer al tercer día de exposición al MC L-WRN, sin embargo, esta tendencia decreció para el quinto día de exposición al medio.

Los grupos 3 y 4, presentaron un crecimiento lineal y progresivo a grandes escalas, es decir, del primer al tercer día no se observa mucha diferencia, sin embargo, para el 5to día de exposición el crecimiento es notable con respecto al primer día de exposición al medio. Por tanto, es conveniente sugerir que se utilice el primer lote de producción de Medio Condicionado L-WRN para los siguientes ensayos. La necesidad de utilizar la proteína inhibidora de la vía RHO/ROCK (Y-27632) como suplemento para el crecimiento y preservación de células criopreservadas fue de gran importancia, por lo que esta proteína se utilizó en cada etapa como un suplemento adicional.

### 3.5 EXTRACCIÓN Y DOSAJE DE ARN

Culminada la semana de cultivo de Organoides Intestinales de colon expuestos frente a distintos grupos de Medio Condicionado L-WRN, es fundamental la extracción de ARN de los Organoides, el dosaje de ARN y la evaluación de calidad de ARN de cada grupo de estudio. Por tal motivo, se optó por la extracción con el protocolo detallado en el apartado 18.3.6.1, donde se utiliza el *Kit Direct-Zol™ RNA MicroPrep - Zymo Research*. Los resultados de la extracción de RNA expresados en

unidades de concentración (ng/μL) de cada muestra están detallados en la *Tabla 10*. La media aritmética de los valores de concentración de RNA de cada grupo de estudio son 51,603 ng/uL; 36,514 ng/uL; 37,408 ng/uL y 18,750 ng/uL respectivamente. Es necesario constatar que la extracción fue optima debido a que el valor máximo es de 67.843 ng/μL de ARN perteneciente al primer grupo de estudio.

*Tabla 13 Dosaje de ARN de Organoides de colon usando el protocolo Direct-zol. Los valores denotan la concentración ( ) y los índices de pureza (260/280) (260/230)*

	Muestra	Concentración (ng/μL)	Media (ng/μL)	260/280		260/230	
<b>Grupo 1</b>	1	<b>67.843</b>	51.603	1.873	A	1.554	A
	2	<b>42.001</b>		1.894	A	1.376	-
	3	<b>44.264</b>		1.922	A	1.709	A
	4	<b>52.302</b>		1.942	A	1.059	-
<b>Grupo 2</b>	5	<b>44.399</b>	36.514	1.945	A	0.693	-
	6	<b>21.459</b>		2.027	Óp.	0.480	-
	7	<b>36.852</b>		1.997	A	1.780	A
	8	<b>43.346</b>		1.978	A	1.580	A
<b>Grupo 3</b>	9	<b>59.060</b>	37.408	1.971	A	2.086	Óp.
	10	<b>50.563</b>		1.487	-	0.467	-
	11	<b>22.396</b>		1.828	A	0.376	-
	12	<b>17.612</b>		1.842	A	1.060	-
<b>Grupo 4</b>	13	<b>19.383</b>	18.750	1.924	A	0.786	-
	14	<b>25.151</b>		1.929	A	1.479	-
	15	<b>7.272</b>		2.169	Óp.	0.573	-
	16	<b>23.195</b>		2.053	Óp.	0.988	-

Abreviaturas: **Óp.**, Óptima y **A**, Aceptable.

### 3.5.1 DOSAJE DE ARN

El dosaje de ARN de las muestras es un importante procedimiento para la evaluación de la concentración de cada muestra (ng/μL), también están los valores que son útiles para conocer si las muestras tienen un óptimo grado de pureza o si están contaminadas por proteínas (260/280, menor a 1.8) o por sales (260/230, menor a 1.5).

Las diferentes muestras de ARN de organoides de colon fueron analizadas en el equipo Nanodrop ND-1000, donde se utiliza una mínima cantidad de muestra (1 $\mu$ L) para obtener la concentración de la muestra. Del mismo modo, las muestras fueron analizadas a 3 diferentes longitudes de onda (230 nm, 260 nm y 280 nm) para obtener la relación 260/280 y 260/230. Los resultados de esta etapa se encuentran descritos en la *Tabla N°9*.

El índice de pureza (260/280) de RNA nos indica que el 18.75 % de las muestras tienen un grado de pureza Muy Aceptable (Optima), el 75 % de las muestras tiene un grado de pureza Aceptable y solo el 6.25 % de las muestras presenta contaminación por compuestos aromáticos. Por el contrario, el índice de pureza (260/230) establece que el 6.25 % de muestras demostró una pureza Optima y solo el 25 % obtuvo una pureza Aceptable; por lo que es correcto afirmar que las muestras se encontraban contaminadas con sales.

### **3.6 OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA LOS GENES DE INTERES**

A través de la herramienta bioinformática NCBI-Primer BLAST se diseñaron los oligonucleótidos para los genes SLC19A2 v1 (THR1a), SLC19A2 v2 (THR1b) y SLC19A3 (THR2), tomando en consideración las características que un buen cebador o *primer* debe cumplir como son: Temperatura de hibridación ( $T_m$ ) entre 57 °C y 63 °C, contenido promedio de GC entre 50 % y 60 % y una longitud de 18 a 25 pb; además los cebadores deben evitar la formación de *hair-pins* (horquillas) (*Tabla 12*). Los cebadores para los genes MKi67 y LGR5 fueron provistos por el laboratorio J&K debido a que son cebadores estandarizados para el monitoreo de proliferación y diferenciación de células en organoides intestinales. El estudio se redujo al análisis con 3 pares de cebadores, debido a que el diseño de oligonucleótidos para los otros 2 genes no obtuvo buenos resultados en el análisis de eficiencia (*efficacité*).

#### **3.6.1 EFICIENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS POR qPCR**

Para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos diseñados se realizó qPCR. El análisis de *efficacité* (eficiencia) está compuesto por la curva de amplificación, la curva de disociación y la curva estándar, originadas gracias a la reacción de qPCR.

En la validación de los oligonucleótidos se pretende que un único producto sea amplificado, es decir que se observe un solo pico evidente en la curva de disociación, mas no varios picos de otros productos amplificados que denota en un problema de dimerización. En los resultados de este proyecto se visualizó que la amplificación del gen SLC19A2v1 es tardía, con un valor de Ct a partir de 30 (*Figura 27 A*), que se explica en caso no se encuentre gran cantidad de material genético.

Se analizó la curva de disociación, la cual presenta un pico diferenciado para los genes SLC19A2v1 y SLC19A2v2 (*Figura 27B y 28B*), lo cual revela que estos *primers* garantizan que un único producto sea amplificado. Por el contrario, la curva de disociación para el gen SLC19A3 (*Figura 29B*) demostró la existencia de varios productos amplificados dispersos aleatoriamente, razón suficiente para descartar este grupo de cebadores.

Por último, cuando se examinó la curva estándar se determinó la eficiencia de los cebadores calificando este parámetro como óptimo si estaba dentro de 90 a 120%. Sustentando este criterio se descartaron por completo los cebadores para el gen SLC19A2v2 y SLC19A3 (*Figura 28C y 29C*). Se optó por trabajar únicamente con el par de cebadores para el gen SLC19A2v1 (*Figura 27C*) que amplifica selectivamente el Receptor de Tiamina 1 (THR1) con un porcentaje de *efficacité* (eficiencia) de 103.5%.

Tabla 14 Diseño de primers en la herramienta bioinformática NCBI-Primer BLAST para los genes de interés.

Símbolo oficial	Especie	Número NCBI	Nombre del Oligo	Sentido / Antisentido	Ubicación Genética	Tm (°C)	Secuencia	Longitud (pb)
<b>SLC19A2v1</b>	Murina	NM_057087	mTHR1-F	Sentido	928-947	60.92	ACCCAGCAGCTAACC ATCT	100
			mTHR1-R	Antisentido	1027-1009	62.98	GCTTGGGCTCCTCCGGT TC	
<b>SLC19A2v2</b>	Murina	NM_001276455	mTHR1b-F	Sentido	810-829	59.54	TTTTGCTGTGGCCTGGT TTC	104
			mTHR1b-R	Antisentido	913-895	60.08	GCTTGGGCTCCTCCTTG AG	
<b>SLC19A3</b>	Murina	NM_030556	mTHR2-F	Sentido	352-372	60.27	CACCAGCCCAGAGATG ACAAA	104
			mTHR2-R	Antisentido	455-436	59.01	GTTTGTAGCGCAGGTAG TCG	
<b>KI67*</b>	Murina	NM_001081117	Ki67-F	Sentido	253-272	59.96	GCTCACCTGGTCACCAT CAA	90
			Ki67-R	Antisentido	342-320	58.92	TTCAATACTCCTTCCAA ACAGGC	
<b>LGR5*</b>	Murina	NM_010195	Lgr5-F	Sentido	480-499	59.96	AGCGTCTTCACCTCCTA CCT	110
			Lgr5-R	Antisentido	589-568	59.52	GCATTTCCAGCAAGACG TAACT	

\*, Oligonucleótidos estandarizados en el laboratorio J&K Inserm 1011 Lille-Francia.

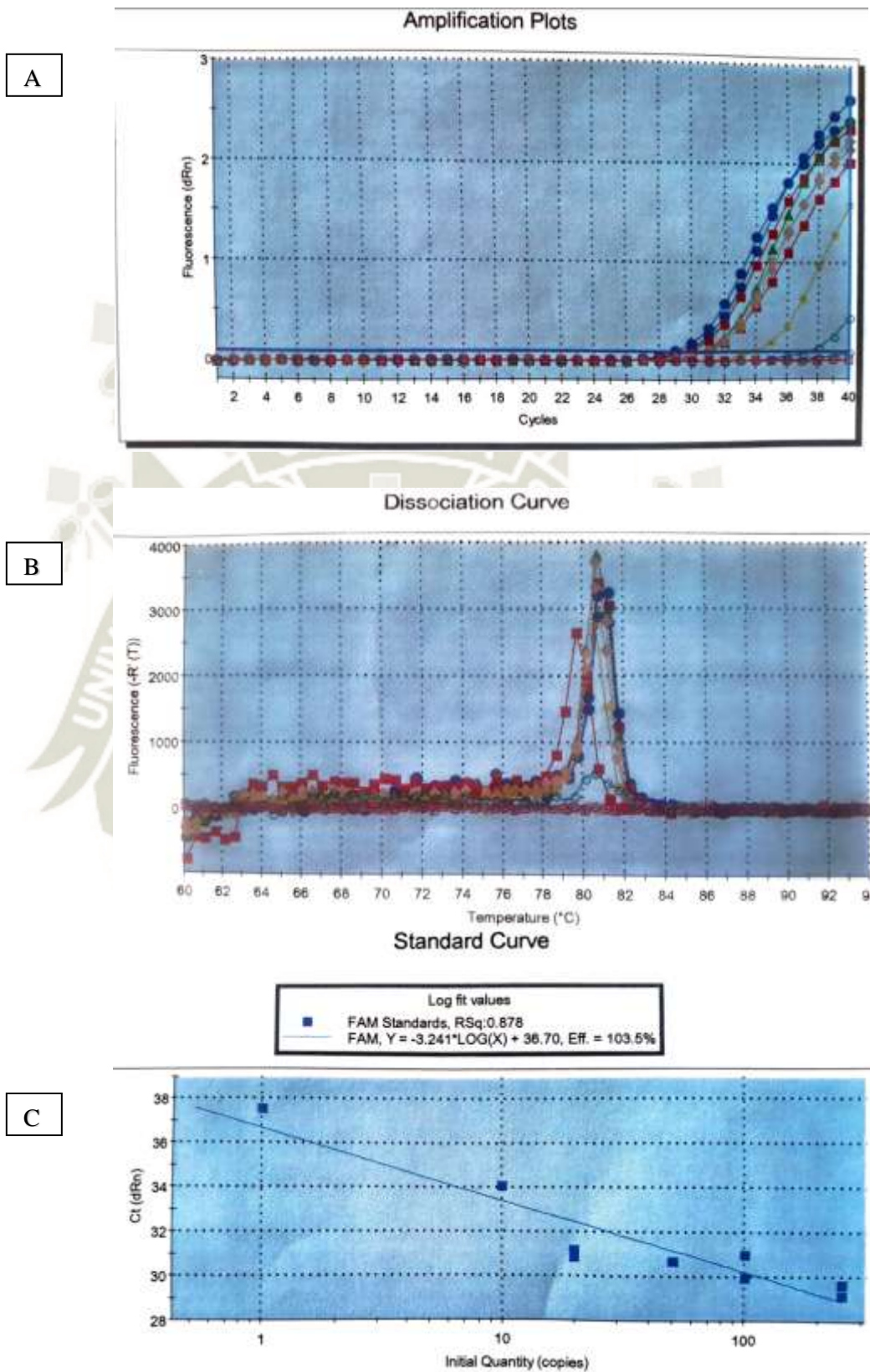


Figura 26 Eficiencia de oligonucleótidos para *THRIa (SLC19A2v1)*. Corrida realizada el 17 de abril de 2019. A. Curva de amplificación. B. Curva de disociación. C. Curva estándar, Eficiencia de 103.5%.

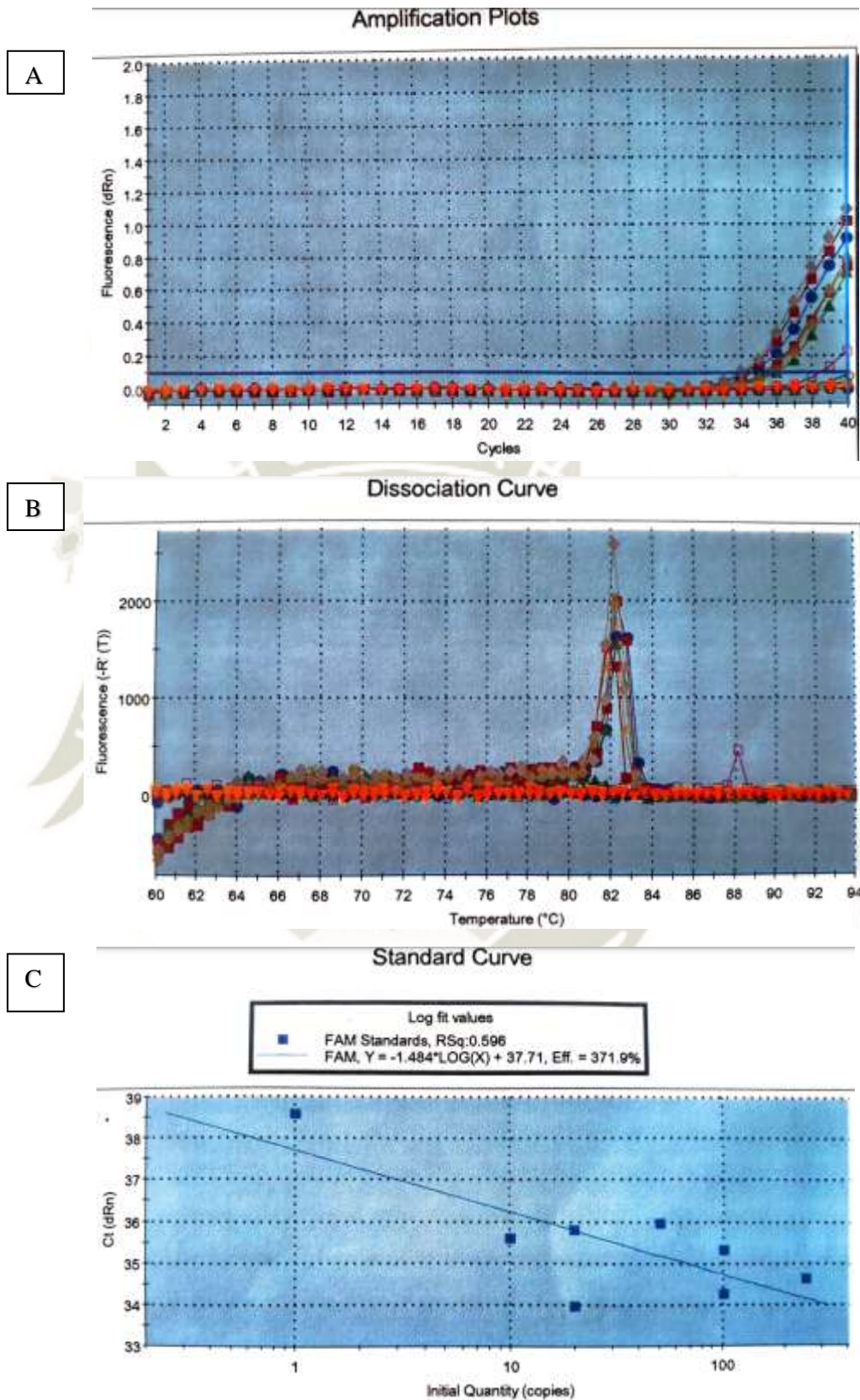


Figura 27 Eficiencia de oligonucleótidos para *THR1b* (*SLC19A2v2*). Corrida realizada el 17 de abril de 2019. A. Curva de amplificación. B. Curva de disociación. C. Curva estándar, Eficiencia de 371.9%.

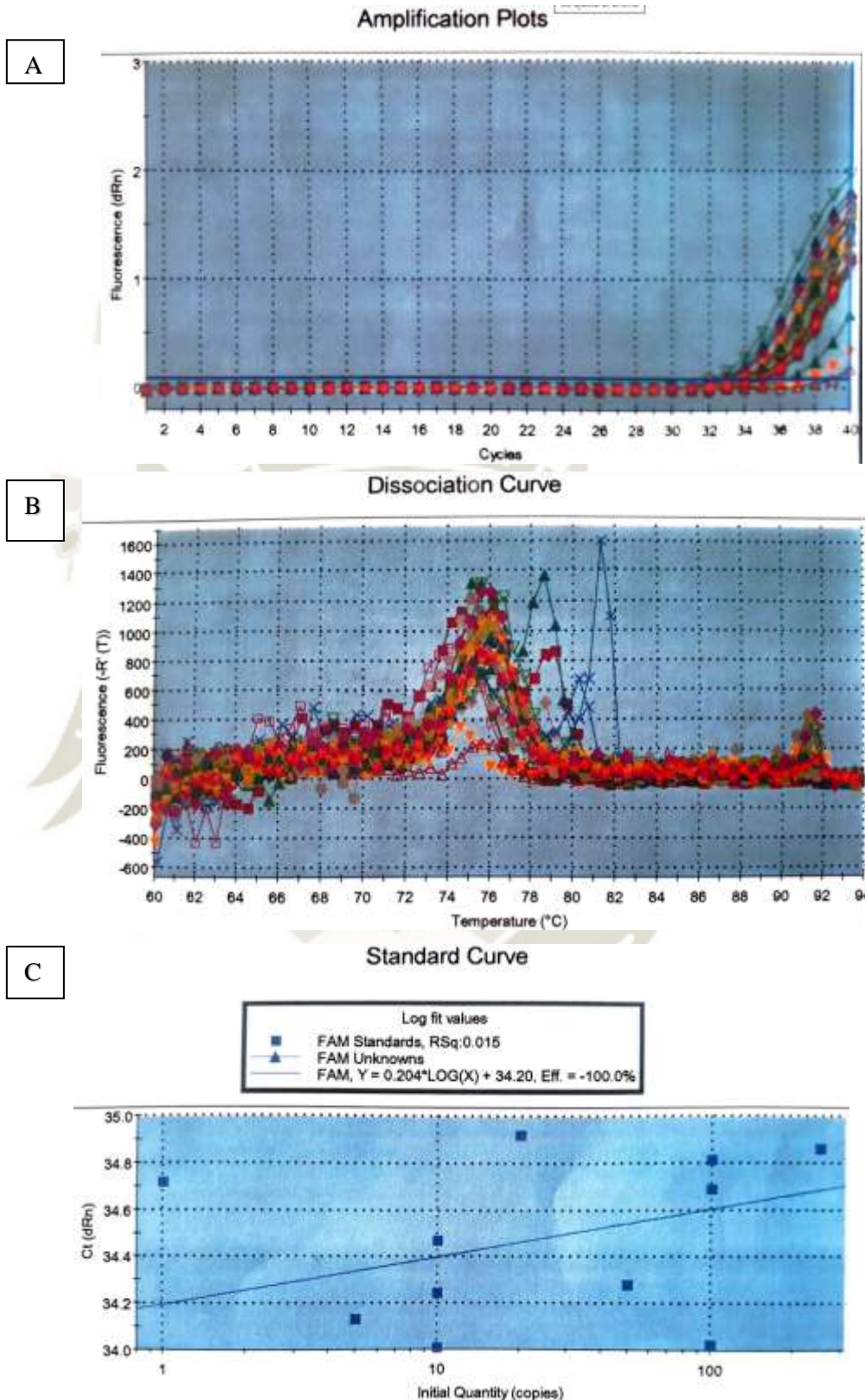


Figura 28 Eficiencia de oligonucleótidos para THR2 (SLC19A3). Corrida realizada el 17 de abril de 2019. A. Curva de amplificación. B. Curva de disociación. C. Curva estándar, Eficiencia de 100.0%.

### 3.7 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-qPCR)

La expresión de los genes de interés para el presente proyecto se efectuó sobre el ARN extraído de organoides de colon murino del fondo genético C57BL/6J que fueron expuestos a diferentes lotes de Medio Condicionado L-WRN. En el proyecto, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) de los diferentes genes de interés se utilizó un gen de referencia, Ciclofilina. Los genes de referencia (*house-keeping*) o genes de control interno, se les caracteriza porque son expresados constantemente en todas las muestras. En el presente proyecto se utilizó Ciclofilina, gen de referencia que se utiliza en el laboratorio para muestras intestinales.

La cantidad de ARN que se utilizó en RT-qPCR es de 0.1 µg, por lo que las muestras fueron corregidas a esta concentración para que puedan ser analizadas correctamente (*Tabla 12*). La preparación de RT-MIX se detalló en el apartado 19.2 con la variación de la cantidad de *puits\** a 20 para cada gen de interés. El protocolo de lanzamiento de la RT-qPCR está explicado en el apartado 19.5 parte con la preparación compuesta por 10 µL de RT-MIX, oligos 0.6 µL (c/u), 0.14 µL Rox (1:200) y H<sub>2</sub>O UP DNasa/RNasa Free c.s.p. 15 µL (1 *puite\**); distribuido en una placa de 96 pocillos (*Tabla 14 y 15*). Todo el procedimiento se efectuó sobre una base de hielo (4 °C) y evitando la luz directa para evitar que las enzimas presentes en los reactivos sufran cambios que puedan afectar los resultados (*Figura 30*).



*Figura 29 Preparación de la placa de 96 pocillos para RT-qPCR sobre una cama de hielo.*



Tabla 15 Corrección de la concentración de muestras de ARN de organoides de colon para RT-qPCR. Preparación de las diluciones correspondientes a cada muestra para 0.1g y preparación de blancos.

Grupo	Muestra	Concentración		RT para 0.1 µg (10µL)	
		ng/µL	µg/µL	V <sub>m</sub> (µL)	V <sub>agua</sub> (µL)
1	1	67.843	0.068	1.47	8.53
	2	42.001	0.042	2.38	7.62
	3	44.264	0.044	2.26	7.74
	4	52.302	0.052	1.91	8.09
2	5	44.399	0.044	2.25	7.75
	6	21.459	0.021	4.66	5.34
	7	36.852	0.037	2.71	7.29
	8	43.346	0.043	2.31	7.69
3	9	59.06	0.059	1.69	8.31
	10	50.563	0.051	1.98	8.02
	11	22.396	0.022	4.47	5.53
	12	17.612	0.018	5.68	4.32
4	13	19.383	0.019	5.16	4.84
	14	25.151	0.025	3.98	6.02
	15	7.272	0.007	10.00	0
	16	23.195	0.023	4.31	5.69
				Blanco Enz.	80
				Blanco ARN	80

### 3.8 BIOMARCADOR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (MKi67) POR RT-QPCR

El objetivo principal del proyecto desarrollado se puede desprender en 2 etapas, este apartado se enfoca en el análisis de proliferación de organoides intestinales de colon murino expuestos a diferentes lotes de Medio Condicionado L-WRN preparado en el laboratorio. El biomarcador de proliferación celular que se utilizó es Ki67 (codificado por el gen MKi67).

El biomarcador de proliferación, Ki67, ha sido evaluado en los 4 grupos de estudio y los resultados se tomaron con respecto al gen de Ciclofilina. Es decir, la obtención de los datos finales se optó por derivar la diferencia de Ct entre el gen de interés y el gen de referencia, este dato fue ajustado estadísticamente para evitar errores dentro del grupo. Por último, los datos finales fueron analizados a través del software estadístico GraphPad Prism 8.1.0 (325) haciendo un análisis de varianza de una sola vía (*ordinary one-way ANOVA*). El análisis estadístico afirmó que el valor de P es  $< 0.0011$  (\*\*), el valor de F que es 10.46 y un R cuadrado de 0.7234; por tal motivo se pudo corroborar la existencia de diferencia significativa entre los grupos. Adicionalmente, se programó una prueba de comparación múltiple (Prueba de Bonferroni) entre los grupos de estudio, con el objetivo de reducir errores estadísticos como que algún dato aparezca erróneamente como estadísticamente

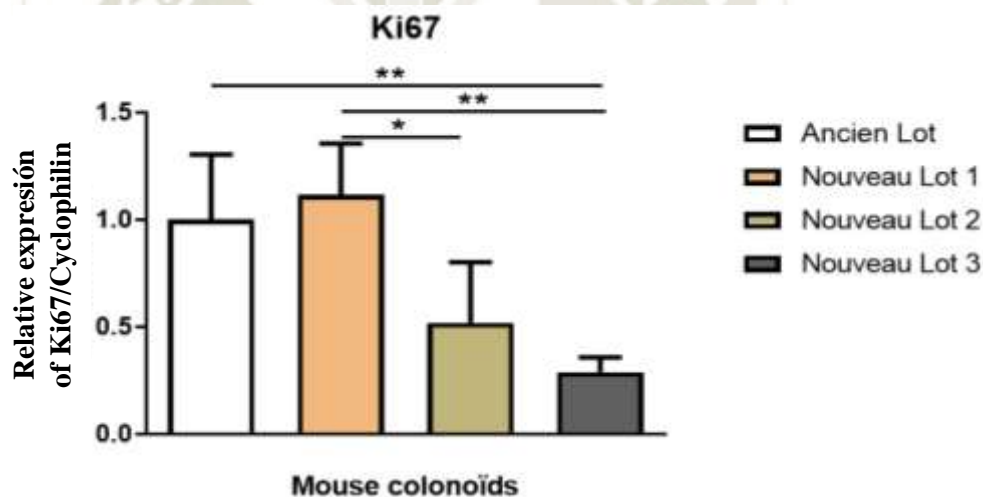


Figura 30 Resultados de la expresión del biomarcador de proliferación Ki67 en Organoides de colon murino por RT-qPCR. Grupos de estudio expuestos a diferentes lotes de Medio Condicionado L-WRN.

significativo ( $P < 0.05$ ).

En la *Figura 31* se aprecian los resultados de la comparación múltiple de Bonferroni, donde se corrobora la existencia de diferencia significativa en 3 oportunidades dentro de los grupos de estudio. En primer lugar, se observa la comparación entre el Grupo 2 (Lote 1) vs. Grupo 4 (Lote 3) (\*\*) donde el valor de diferencia significativa que se le confiere es 0.8255, un valor de *t* igual a 4.822 y finalmente 0.2857 a 1.365 de Intervalo de Confianza al 95%. En segundo lugar, se delimita a la comparación entre el Grupo 1 (*Ancient*) vs. Grupo 4 (Lote 3) (\*\*) donde el valor de diferencia

significativa que se le confiere es 0.7118, un valor de  $t$  igual a 4.157 y finalmente 0.1720 a 1.252 de Intervalo de Confianza al 95%. La última comparación denota entre el Grupo 2 (Lote 1) y Grupo 3 (Lote 2) (\*) donde el valor de diferencia significativa que se le confiere es 0.5953, un valor de  $t$  igual a 3.477 y finalmente 0.05549 a 1.135 de Intervalo de Confianza al 95 %.

Uno de los objetivos específicos del presente proyecto está enfocado en la identificación del lote de medio condicionado L-WRN que favorece la expresión de la proteína marcadora de la proliferación Ki67, haciendo uso del ARNm de organoides de colon murino como matriz de análisis. En la *Figura 31*, se distinguen los resultados gráficamente tras el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante RT-qPCR, donde se perciben a los diferentes grupos de estudio; el grafico de columnas representa la expresión de la proteína Ki67, donde se considera en el eje  $X$  a los diferentes grupos de estudio con organoides de colon murino y en el eje  $Y$  a los niveles relativos de ARNm/Ciclofilina. Visualmente, se logra distinguir la expresión de la proteína Ki67 en el orden de mayor a menor de la siguiente manera: grupo 2, grupo 1, grupo 3 y grupo 4. Por ende, es correcto afirmar que el lote que favoreció en gran medida la expresión de la proteína Ki67 es el grupo 2, haciendo uso del primer lote producido de medio condicionado L-WRN.

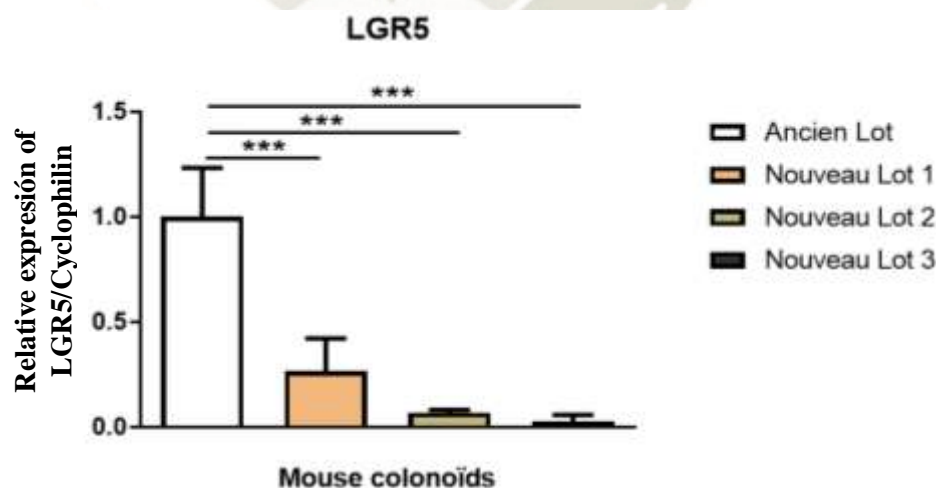
### **3.9 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN ORGANOIDES DE COLON MURINO: BIOMARCADOR DE CÉLULAS MADRE ADULTAS (LGR5) POR RT-QPCR**

El objetivo principal del proyecto desarrollado se puede desprender en 2 etapas, este apartado se enfoca en el análisis de diferenciación de células madre en organoides intestinales de colon murino expuestos a diferentes lotes de medio condicionado L-WRN preparado en el laboratorio. El biomarcador de células madre adultas que se utilizó es LGR5, codificado por el gen con el mismo nombre.

El biomarcador de células madre LGR5, ha sido evaluado en los 4 grupos de estudio y los resultados se tomaron con respecto al gen de ciclofilina. Del mismo modo al apartado anterior, para la obtención de los datos finales se optó por derivar la diferencia de Ct entre el gen de interés y el gen de referencia, este dato fue ajustado

estadísticamente para evitar errores dentro del grupo. Los datos finales fueron analizados a través del software estadístico GraphPad Prism 8.1.0 (325) haciendo un análisis de varianza de una sola vía (*ordinary one-way ANOVA*). Para esta etapa del proyecto, el análisis estadístico afirmó que el valor de P es  $< 0.0011$  (\*\*\*) , el valor de F que es 27.14 y un R cuadrado de 0.9005; por tal motivo se pudo corroborar la existencia de diferencia significativa entre los grupos. También se programó una prueba de comparación múltiple (Prueba de Bonferroni) entre los grupos de estudio ( $P < 0.05$ ).

En la *Figura 32* se avistan los resultados de la comparación múltiple de Bonferroni corroboraron la existencia de diferencia significativa en 3 oportunidades. En primer lugar, se observa la comparación entre el grupo 1 (*Ancient*) vs. grupo 4 (Lote 3) (\*\*\*) donde el valor de diferencia significativa que se le confiere es 0.9745, un valor de *t* igual a 6.967 y finalmente 0.5039 a 1.445 de Intervalo de Confianza al 95%. En segundo lugar, se delimita a la comparación entre el grupo 1 (*Ancient*) vs. grupo 3 (Lote 2) (\*\*\*) donde el valor de diferencia significativa que se le confiere es 0.9330, un valor de *t* igual a 7.563 y finalmente 0.5180 a 1.348 de Intervalo de Confianza al 95%. La última comparación denota entre el Grupo 1 (*Ancient*) y Grupo 2 (Lote 1) (\*\*\*) donde el valor de diferencia significativa que se le confiere es 0.7345, un valor



*Figura 31* Resultados de la expresión del biomarcador de células madre adultas LGR5 en Organoides de colon murino por RT-qPCR. Grupos de estudio expuestos a diferentes lotes de Medio Condicionado L-WRN.

de *t* igual a 6.431 y finalmente 0.3503 a 1.119 de Intervalo de Confianza al 95 %.

Uno de los objetivos específicos de este proyecto busca distinguir el lote de medio condicionado L-WRN que beneficia la diferenciación de células madre que está ligada a la expresión del biomarcador de células madre adultas, LGR5. En la *Figura 32* se aprecia un gráfico de columnas que tiene por intención favorecer la interpretación de los datos estadísticos de la expresión del biomarcador LGR5; en el gráfico se observa el eje *X* que representa a los grupos de estudio conformados por los organoides y el eje *Y* que refiere a los niveles relativos de ARNm/Ciclofilina. En una primera impresión visual se puede definir un orden en la expresión del biomarcador LGR5; en primer lugar, se tiene al grupo 1 (Lote *Ancient* del medio condicionado L-WRN) que denota una clara evidencia de que beneficia la expresión del biomarcador LGR5, posteriormente se tiene al grupo 2 que tiene un grado de influencia relativamente menor con respecto al primer grupo; y para culminar se tienen a los grupos 3 y 4 que muestran una expresión aún menor que el grupo anterior. Por consiguiente, es apropiado alegar que el lote que benefició la expresión del biomarcador de células madre adultas (LGR5) es el lote *Ancient* de medio condicionado L-WRN; y menor proporción, el primer lote de medio condicionado L-WRN recién producido.

### **3.10 EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE TIAMINA 1 (THR1) EN ORGANOIDES DE COLON MURINO POR QPCR**

Uno de los objetivos específicos que se procura desarrollar en el proyecto es evaluar la expresión del receptor de tiamina 1 (THR1) que es codificado por el gen SLC19A2v1. La importancia de la determinación del receptor transportador de tiamina en el intestino se debe a que es el principal órgano de absorción, y la determinación e identificación de estos receptores son el paso inicial para determinar que este nuevo sistema de cultivo celular tiene la capacidad de simular un mini órgano a cabalidad.

El receptor de tiamina 1 (THR1), ha sido evaluado en los 4 grupos de estudio para analizar la expresión genética con respecto al gen de ciclofilina. Análogamente al análisis de los anteriores genes de interés, los datos finales fueron hallados tras el ajuste matemático de derivar la diferencia de Ct entre el gen SLC19A2v1 y el gen ciclofilina, de la misma manera que se corrigieron estadísticamente los datos para

evadir errores. El software estadístico que se encargó del estudio final fue GraphPad Prism 8.1.0 (325), haciendo un análisis de varianza de una sola vía (*ordinary one-*



Figura 32 Resultados de la expresión del receptor de tiamina 1 (THTR1) en Organoides de colon murino por RT-qPCR. Grupos de estudio expuestos a diferentes lotes de Medio Condicionado L-WRN.

way ANOVA). Los resultados del análisis estadístico de esta primera etapa aseveran un valor de P igual a 0.0004 (\*\*\*) que refiere a la existencia de una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ); además de un valor de F igual a 14.04 y un *R cuadrado* igual a 0.7929. Paralelamente se programó la prueba de comparación múltiple de Bonferroni para un análisis estadístico detallado entre grupos de estudio.

En la *Figura 33* se divisan los resultados de la prueba de Bonferroni que aseveran la existencia de diferencia significativa en 3 ocasiones. Inicialmente se visualiza la comparación entre el grupo 1 (*Ancient*) vs. grupo 4 (Lote 3) (\*\*\*) donde se le confiere un valor de diferencia significativa de -1.794, un valor de *t* igual a 5.623 y finalmente -2.818 a -0.7705 de Intervalo de confianza al 95%. En segundo lugar, se denota la comparación entre el grupo 3 (Lote 2) vs. grupo 4 (Lote 3) (\*\*\*) donde se le confiere un valor de diferencia significativa de -1.792, un valor de *t* igual a 5.617 y finalmente -2.816 a -0.7687 de Intervalo de Confianza al 95%. Por último, está la comparación entre el grupo 2 (Lote 1) vs. grupo 4 (Lote 3) (\*\*) donde se le confiere

un valor de diferencia significativa de -1.643, un valor de  $t$  igual a 5.149 y finalmente -2.666 a -0.6192 de Intervalo de Confianza al 95%. Dicho en otra manera, se puede citar que la mayor expresión de THR1 en este apartado se encontró en el cuarto grupo de estudio (Lote 3 de MC L-WRN).

## DISCUSIONES

Esta investigación tuvo la finalidad de conformar un sistema de cultivo organoide de colon murino a partir del aislamiento de criptas intestinales donde se encuentran presentes gran cantidad de células madre. Para aseverar que el cultivo de organoides colónicos fue exitoso fueron necesarios estudios que permitieran analizar la proliferación y diferenciación de células madre, por lo cual se optó por el uso de biomarcadores moleculares específicos como lo son: MKi67 y LGR5 respectivamente, los cuales permiten su análisis por RT-qPCR. Así también, se pretendía evaluar la importancia del medio condicionado L-WRN que provee de los factores necesarios para el crecimiento del cultivo organoide, motivo por el cual se busca identificar el lote de medio condicionado L-WRN que favorece la proliferación y diferenciación de células madre. Adicionalmente, se evaluó la expresión del receptor de tiamina 1 (THR1). A continuación, se discuten los principales hallazgos del presente estudio.

De los resultados obtenidos en esta investigación, se logra esclarecer la primera deducción con respecto a la presencia de células madre en criptas intestinales. Si bien ya se conocía la presencia de las células madre en gran cantidad de tejidos, el aporte que le da las células madre al intestino es su capacidad de autorrenovación. El intestino al ser un órgano que puede estar en constante renovación celular, se trataría del órgano donde se puede encontrar gran cantidad de células madre, característica que puede ser utilizada en diversas áreas de investigación como la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (6,58–60). La manera de visualizar experimentalmente las células madre intestinales adultas es a través de su biomarcador específico LGR5, el cual también es parte de la vía señalización Wnt. De manera general podemos afirmar que el cultivo organoide de colon murino expresa LGR5.

Del mismo modo, según la bibliografía recolectada se puede inferir la necesidad de distintos factores que favorecen el microambiente para el crecimiento y cultivo adecuado de un sistema organoide rico en células madre dentro de los cuales están la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina/R-espondina, el factor de crecimiento y los inhibidores de BMP/Noggin; factores necesarios para mantener la homeostasis de los organoides y que fueron proporcionados de manera experimental gracias al medio condicionado L-WRN. El análisis de lote a lote del MC L-WRN efectuado en el presente estudio tiene como primer enfoque el control de calidad en la preparación continua de los lotes a partir de un mismo cultivo (flask). Los resultados de este análisis los diferenciaremos en 2 subconjuntos: MC L-WRN/MKi67 y MC L-WRN/LGR5.

A partir de los resultados de proliferación, la relación MC L-WRN/MKi67, estadísticamente se demuestra que existe una diferencia significativa de proliferación entre los grupos, y a través de la prueba de Bonferroni se logra determinar que solo en 3 ocasiones existe una diferencia significativa, 2 de ellas involucran el segundo grupo de estudio (Lote 1 de MC L-WRN), siendo este grupo el que mejores resultados obtuvo. Es importante recalcar que los lotes de MC L-WRN producidos recibieron el mismo tratamiento para los 3 lotes producidos, con la única diferencia en el tiempo de cultivo de las células. Según los resultados presentados se reafirma nuevamente una fuerte evidencia de que el cultivo de organoides con MC-L-WRN favorece en gran medida en su proliferación y en general en su crecimiento apropiado, como también se pudo observar en un estudio que se publicó en 2019 por *VanDussen KL* y su equipo, donde evaluaron 14 lotes independientes de MC L-WRN producidos en 5 laboratorios de 3 instituciones y concluyeron que los lotes producidos fueron reproducibles y dieron el primer paso para la validación de la producción de MC L-WRN como un medio que contiene los factores Wnt3a, R espondina y Noggin (WRN), secretados por la línea celular “L”, necesarios para la conservación de las células madre intestinales (61). El aporte de este ensayo nos indica que MC L-WRN recién preparado de la línea celular favorece notablemente el crecimiento de un cultivo organoide rico en células madre epiteliales gastrointestinales, datos que pueden ser favorecedores para la comunidad científica

que se enfoca en los estudios de medicina regenerativa, ingeniería de tejidos, fisiología molecular, etc.

De la misma manera que se evaluó la proliferación en el cultivo organoide descrito anteriormente, se realizó el estudio comparativo con el biomarcador de células madre adultas intestinales (LGR5), lo que dio lugar al modo de comparación del cultivo organoide con MC L-WRN/LGR5. En este contexto se puede observar que existe una diferencia significativa entre los grupos de estudio, y con la prueba de Bonferroni se puede inferir el grupo de estudio que presenta más diferencia con respecto a los otros grupos de estudio fue el grupo 1, conformado por el MC L-WRN “Ancient” que fue el que se poseía en el laboratorio de investigación. Los detalles del modo de preparación de este MC L-WRN fueron descritos en el protocolo que se siguió en este estudio, sin embargo, se desconoce el tiempo exacto en que se preparó el medio pudiendo inferir que fue realizada unos 3 a 6 meses atrás. La observación en esta oportunidad recayó sobre este grupo debido a los resultados obtenidos, los cuales nos indicaban que fue el medio que favoreció en gran medida la expresión del biomarcador LGR5, lo que sugiere que conserva mejor la cantidad de células madre adultas intestinales.

En el mismo contexto, se pudo visualizar que el segundo grupo que mejor favoreció la expresión de LGR5, fue el denominado segundo grupo de estudio conformado por el lote 1 de MC L-WRN. De la misma forma que se discutió la proliferación en párrafos anteriores, se identificó que el lote 1 de MC L-WRN también tuvo un índice de expresión de LGR5 alto en comparación con los otros lotes de MC L-WRN. Así también podemos deducir nuevamente que MC L-WRN favorece la expresión del biomarcador de LGR5 para células madre adultas intestinales. A lo cual se sugiere que el MC L-WRN recién preparado a partir de la línea celular favorece la expresión de LGR5, para células madre adultas intestinales (16,61). Notablemente se puede inferir que estos resultados con diferencia entre grupos, podría ser producto de un estrés celular en la línea celular “L-WRN” sometido a la producción de MC L-WRN de manera continua, lo que abre la posibilidad de repetir el ensayo con un tiempo de “descanso” en la línea células “L-WRN” entre cada producción de los lotes de MC L-WRN.

El enfoque bioquímico de este estudio se enfatizó en evaluar la expresión del receptor de tiamina 1 (THR1), receptor que pertenece a la familia de proteínas transportadoras de solutos (SLC). El interés por estudiar esta proteína surgió a raíz de comprobar si los organoides intestinales de colon podrían poseer la capacidad de absorción de compuestos, por lo que el paso anterior es evaluar si en este nuevo cultivo se encuentra presente los SLC. La dificultad en este apartado fue el correcto diseño de cebadores, de los cuales en este estudio se diseñaron 3 pares de cebadores de los cuales se descartaron 2 debido a un análisis de eficacia desfavorable, el descarte de un mal diseño de cebadores se pudo haber comprobado con un análisis de integridad haciendo uso de electroforesis. Por tal motivo, se presentan las características de estos cebadores, para que puedan ser sometidos a estudios futuros para evaluar su calidad. El par de cebadores seleccionados para THR1, obtuvieron una eficacia del 103%, resultado que fue considerado como favorable para evaluar la expresión de esta proteína.

Los resultados de la expresión de THR1 sobre los diferentes lotes de MC L-WRN denotan de manera general que la expresión de esta proteína está en todos los grupos de estudio y con una gran diferencia significativa para el tercer grupo de estudio (lote 3 MC L-WRN). Existen diversos estudios de esta proteína en tejido intestinal y gástrico, de la bibliografía recolectada se puede deducir que la expresión de esta proteína se encuentra en mayor medida en la porción gástrica, seguida por la porción intestinal (duodeno > yeyuno > íleon > ciego > colon > recto) y finalmente en hígado (62). Por tanto, es correcto afirmar que los estudios de esta proteína estarán enfocados en las porciones intestinales que más expresen la proteína. Sin embargo, en el presente estudio, se enfatizó en evaluar la expresión de esta proteína con la finalidad de proponerlo con un marcador de las SLC que denote indicios de una capacidad de absorción (35,45). Sin embargo, los estudios en la porción colónica son reducidos, de igual forma es sabido que esta proteína transportadora posee diversas funciones, en incluso se podría inferir que también podría estar presente en las células “L-WRN”. Es necesario esclarecer este estudio en organoides solos y en MC L-WRN por separado para evitar los falsos positivos que pudiéramos encontrar, lo cual explicaría su mayor expresión en el tercer grupo de estudio, que podría estar

relacionado a un desprendimiento involuntario de las células “L-WRN” que podrían estar presentes en el medio MC L-WRN.

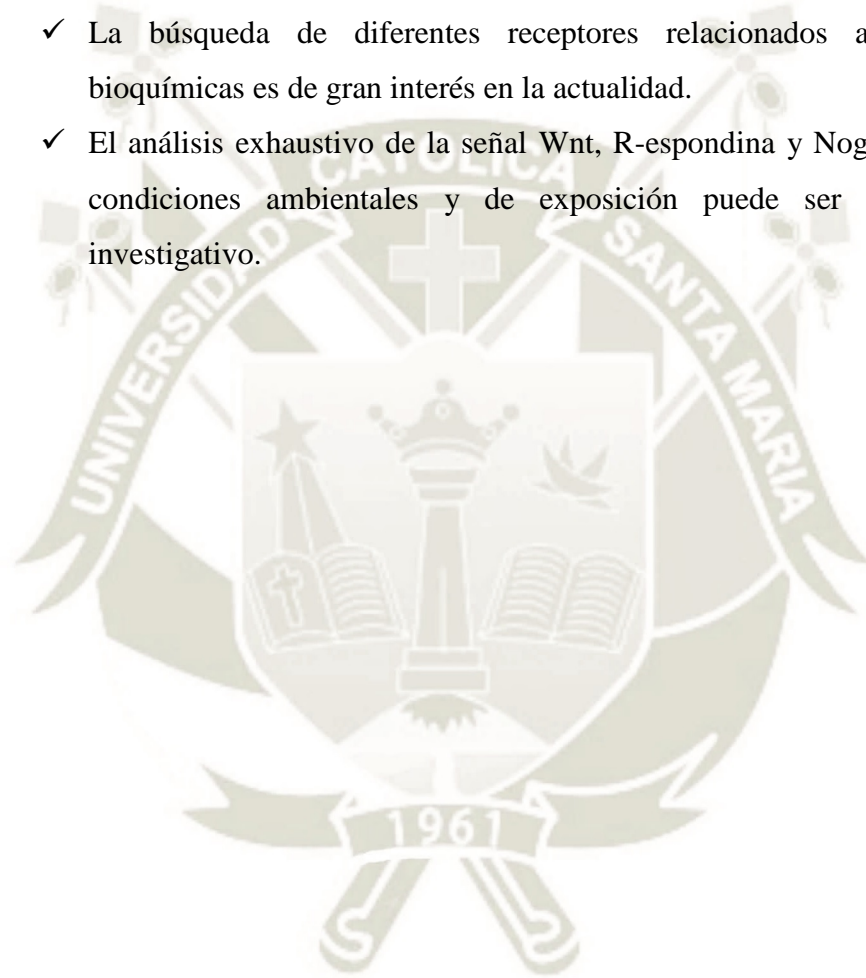
Los grupos de investigación que se enfocan a los estudios con células madre y organoides están actualmente profundizando y expandiendo sus resultados, lo que genero más expectativa en diversos laboratorios que se suman a esta rama de la investigación dadas a sus diversas aplicaciones en distintas áreas (19,60,63–65). Sin duda la expansión de los estudios en células madre serán exhaustivos y cabe la posibilidad de más estudios que esclarezcan más estudios sobre el MC L-WRN sobre técnicas de cultivo, producción y nuevas fuentes o reactivos que favorezcan estos resultados. Así como también las nuevas aplicaciones y el diseño de organoides de distintos tejidos. En este apartado, con una proyección a futuro se presenta como propuesta que se puedan adoptar más procedimientos de control de calidad a los ensayos y/o protocolos operativos en el cultivo de organoides para que puedan ser reproducibles y que su vez logren ser compartidos hacia la comunidad científica con la finalidad de que se extiendan los estudios y publicaciones con estos métodos experimentales. De lograr la implementación de medidas de control de calidad podría mejorar la reproducibilidad de los cultivos *in vitro/in vivo* e indirectamente se evitaría el desperdicio de recursos en toda la comunidad científica.

## CONCLUSIONES

- Se logró la conformación de un sistema de cultivo organoide de colon murino a través del aislamiento de criptas intestinales ricas en células madre haciendo uso del medio condicionado L-WRN recién preparando durante el trabajo de investigación.
- Se analizó la proliferación y diferenciación celular en organoides de colon murino expuestas al medio condicionado L-WRN haciendo uso de biomarcadores de proliferación (MKi67) y de células madre adultas (LGR5) que fueron cuantificados a través de RT-qPCR. La proliferación (MKi67) fue notable y diferenciada en el segundo grupo de estudio con el lote 1 del MC L-WRN; del mismo modo el análisis sobre las células madre (LGR5) demostró una notable diferencia en el primer grupo de estudio compuesto del lote “*Ancient*” del MC L-WRN que se encontraba en stock.
- Se identificó que el MC L-WRN (Lote 1) recién preparado favorece la proliferación de organoides intestinales de colon murino y la expresión de la proteína marcadora de la proliferación Ki67. También se establece que el lote 1 es una potencial alternativa de trabajo para el beneficio de la expresión de células madre adultas (LGR5). Sin embargo, es necesario recalcar que el MC L-WRN (*Ancient*) presentó el mayor grado de influencia en la diferenciación y expresión de las células madre adultas (LGR5) a través de RT-qPCR.
- Se evaluó la expresión del receptor de tiamina 1 (THR1) codificada por el gen SLC19A2v1, haciendo uso de un par de cebadores específicos diseñados con un grado de especificidad y eficacia. En este apartado se puede suponer la presencia de THR1 en todos los grupos de estudio y en mayor proporción en el tercer grupo de estudio a través de un análisis de RT-qPCR.

## SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

- ✓ Para experimentos futuros que busque la utilización de organoides intestinales considerar el uso del medio condicionado L-WRN recién preparado.
- ✓ La evaluación de absorción intestinal en organoides intestinales como nuevo modelo biofarmacéutico.
- ✓ La búsqueda de diferentes receptores relacionados a multifunciones bioquímicas es de gran interés en la actualidad.
- ✓ El análisis exhaustivo de la señal Wnt, R-espondina y Noggin en diferentes condiciones ambientales y de exposición puede ser de gran interés investigativo.



**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Saladin KS, Pineda Rojas E. Anatomía y fisiología la unidad entre forma y función. 1 st. S.A. M-HIE, editor. 2013.
2. Laboratory TJ. C57bl/6j. 2019. p. 1–32.
3. Wolfgang Kuehnel. Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy, Sixth Edition, page: 248. 2003. 543 p.
4. Walker JM. MMB vol.611 Hewitson T.D., Darby I.A. (eds.) Histology Protocols (Humana Press, 2009)(ISBN 1603273441)(225s). Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2009. 1–225 p.
5. Didar TF, Breyner NM, Rahmani S, Su H-M, Verdu EF. Intestinal organoids: A new paradigm for engineering intestinal epithelium in vitro. Biomaterials. 2018;194:195–214.
6. Yin X, Mead BE, Safaee H, Langer R, Karp JM, Levy O. Engineering Stem Cell Organoids. Cell Stem Cell [Internet]. 2016;18(1):25–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.005>
7. Lou Y, Leung AW. Next Generation Organoids for Biomedical Research and Application. Biotechnol Adv [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.10.005>
8. Modèles DES, Avec DO, Imprimante UNE, Organoïdes LES, La I, Lind- C. MODELES D´ORGANES EN 3D. Gen Suisse Foundation. 2015;
9. Harreguy Alfonso MB, Bollati-Fogolín M, Pagotto R. Establecimiento de modelos de epitelio intestinal en tres dimensiones : herramientas potenciales para el estudio del cáncer , la inflamación y el análisis de nuevos fármacos . Universidad ORT Uruguay; 2018.
10. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, Van De Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature [Internet]. 2009;459(7244):262–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07935>

11. Said HM. RECENT ADVANCES IN CARRIER-MEDIATED INTESTINAL ABSORPTION OF WATER-SOLUBLE. 2004;
12. Santana A, Reig JA, Roche E, Vicente N, Arribas MI, Paredes B, et al. Investigación en células madre: aplicaciones potenciales en gastroenterología y hepatología. *Gastroenterol y Hepatol Contin*. 2006;5(2):92–9.
13. Van Der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:241–60.
14. Yin X, Farin HF, Van Es JH, Clevers H, Langer R, Karp JM. Niche-independent high-purity cultures of Lgr5 + intestinal stem cells and their progeny. *Nat Methods*. 2014;11(1):106–12.
15. Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A, Giger S, Bragina ME, Ordóñez-Morán P, et al. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature* [Internet]. 2016;539(7630):560–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature20168>
16. Powell RH, Behnke MS. WRN conditioned media is sufficient for in vitro propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals. *Biol Open*. 2017;6(5):698–705.
17. In JG, Foulke-Abel J, Estes MK, Zachos NC, Kovbasnjuk O, Donowitz M. Human mini-guts: New insights into intestinal physiology and host-pathogen interactions. Vol. 13, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 633–42.
18. NCBI. LGR5 leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 [Internet]. 2019. p. 1–8.
19. Barker N, Van Es JH, Kuipers J, Kujala P, Van Den Born M, Cozijnsen M, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*. 2007;449(7165):1003–7.
20. Merenda A, Fenderico N, Maurice MM. Wnt Signaling in 3D: Recent Advances in the Applications of Intestinal Organoids. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2020;30(1):60–73. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.10.003>

21. Alejandro F, Rangel L. Organoides : una tecnología prometedora. :1–4.
22. Zietek T, Rath E, Haller D, Daniel H. Intestinal organoids for assessing nutrient transport , sensing and incretin secretion [Internet]. Nature Publishing Group. Munich: Nature Publishing Group; 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep16831>
23. Kasendra M, Tovaglieri A, Sontheimer-Phelps A, Jalili-Firoozinezhad S, Bein A, Chalkiadaki A, et al. Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–14.
24. Bulletin T, STEMCELL Technologies. Intestinal Epithelial Organoid Culture with IntestiCult™ Organoid Growth Medium ( Mouse ). 2016. p. 1–12.
25. Astashkina A, Grainger DW. Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments ☆. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2014; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.02.008>
26. Causa E, Vila H. EGF: Innovación y Seguridad. 2014;1–50. Available from: [https://co.fagron.com/sites/default/files/epifactor\\_abril\\_2014\\_0.pdf](https://co.fagron.com/sites/default/files/epifactor_abril_2014_0.pdf)
27. Qi Z, Li Y, Zhao B, Xu C, Liu Y, Li H, et al. BMP restricts stemness of intestinal Lgr5 + stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nat Commun*. 2017;8.
28. NCBI. MKI67 marker of proliferation Ki-67 [ . 2019. p. 1–10.
29. Bioquímica T. Tiamina bioquímica. 2019;1–7.
30. Deulofeu Piquet R. Tiamina, aspectos actuales y utilidad clínica. *Rev Educ Contin en el Lab clínico* [Internet]. 2013;17(3):78–91. Available from: <http://www.seqc.es/download/tema/4/2950/1691691345/785249/cms/tema-8-tiamina-aspectos-actuales-y-utilidad-clinica.pdf/>
31. Said HM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem Soc*. 2011;11(437):357–72.

32. Said HM, Balamurugan K, Subramanian VS, Marchant JS, Expression JSM. Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine. 2019;90822:491–8.
33. Thornalley P. The Potential Role of Thiamine (Vitamin B1) in Diabetic Complications. *Curr Diabetes Rev.* 2005;1(3):287–98.
34. Nabokina SM, Inoue K, Subramanian VS, Valle JE, Yuasa H, Said HM. Molecular Identification and Functional Characterization of the Human Colonic Thiamine Pyrophosphate Transporter \*. 2014;289(7):4405–16.
35. Marcé-Grau A, Martí-Sánchez L, Baide-Mairena H, Ortigoza-Escobar JD, Pérez-Dueñas B. Genetic defects of thiamine transport and metabolism: A review of clinical phenotypes, genetics, and functional studies. *J Inherit Metab Dis.* 2019;42(4):581–97.
36. Said HM. Recent advances in transport of water-soluble vitamins in organs of the digestive system : a focus on the colon and the pancreas. *AJPGI.* 2013;90822(305):G601–10.
37. Singleton CK, Martin PR. Molecular Mechanisms of Thiamine Utilization. *Curr Mol Med.* 2001;1:197–207.
38. Zastre JA, Sweet RL, Hanberry BS, Ye S. Linking vitamin B1 with cancer cell metabolism. 2013;1:1–14.
39. Larkin JR, Zhang F, Godfrey L, Molostvov G, Zehnder D, Rabbani N, et al. Glucose-Induced Down Regulation of Thiamine Transporters in the Kidney Proximal Tubular Epithelium Produces Thiamine Insufficiency in Diabetes. *PLoS One.* 2012;7(12).
40. Nabokina SM, Said HM, Nabokina SM, Said HM. A high-affinity and specific carrier-mediated mechanism for uptake of thiamine pyrophosphate by human colonic epithelial cells A high-affinity and specific carrier-mediated mechanism for uptake of thiamine pyrophosphate by human colonic epithelial cells. *AJPGI.* 2013;303(12):G389–95.
41. Sotomayor M, Zambrano D. Déficit de Tiamina: Beriberi y síndrome de

- Wernicke-Korsakoff. Med. 2008;137-9.
42. De Magalhães SM. Beribéri: doença misteriosa no Brasil Oitocentista. Hist Unisinos. 2014;18(1):158-69.
  43. Grandez-Urbina JA, Fernández-Luque JL, Castañeda-Alarcón D, Cruz-Reyes R, Angulo-Galindo A, Valdivia-Cabrera R. Enfermedad de wernicke korsakoff en hiperémesis gravídica: Presentación de un caso en el hospital hipólito unanue de lima, perú, y revisión de la literatura. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2013;64(3):333-7.
  44. Brown G. Defects of thiamine transport and metabolism. J Inherit Metab Dis. 2014;37(4):577-85.
  45. Said HM, Ortiz A, Subramanian VS, Neufeld EJ, Moyer MPAT, Dudeja PK, et al. Mechanism of thiamine uptake by human colonocytes : studies with cultured colonic epithelial cell line NCM460. AJPGL. 2001;281(281):G144-50.
  46. NCBI. SLC19A2 solute carrier family 19 member 2 [. 2019. p. 1-8.
  47. Id G. SLC19A2 solute carrier family 19 member 2 [. 2019;1-8.
  48. Organizacion Mundial de la Salud. Informe Mundial Sobre la diabetes. 2016;
  49. Thornalley PJ, Ali H Al. High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. Diabetologia. 2007;50:2164-70.
  50. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation ; strategies and considerations. Vol. 6, Genes and Immunity. London; 2005.
  51. Fonslow BR, Stein BD, Webb KJ, Xu T, Choi J, Kyu S, et al. Methods and Applications Guide Introduction to Quantitative PCR Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications Guide [Internet]. Vol. 50, Analysis. 2010. 104 p. Available from:  
[https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical\\_manuals/0/wizard\\_genomic\\_dna\\_purification\\_kit\\_protocol.pdf](https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical_manuals/0/wizard_genomic_dna_purification_kit_protocol.pdf)

52. Fan H, Robetorye RS. Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. Vol. 630, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2010. 199–213 p.
53. Issn I. RT-PCR cuantitativa en tiempo real : una perspectiva. 2019;34(3):1–29.
54. Peccoud J, Peccoud J, D URAC. La PCR quantitative : un nouvel outil pour l'analyse médicale. 9.
55. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reaccion en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *medigraphic* [Internet]. 2013;2:70–8. Available from: <http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1854369>
56. EU Commission. Protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. *J Off l'Union Eur* [Internet]. 2010;Directive(2010/63/UE):1–48. Available from: [https://www.recherche-animale.org/sites/default/files/eu\\_doc1\\_fr.pdf](https://www.recherche-animale.org/sites/default/files/eu_doc1_fr.pdf)
57. Jaffe A. Direct-zol RNA MicroPrep R2060 R2061 R2062 R2063. *Zymo Res.* 2018;(9):1–34.
58. Meneses A, Shneeberger K, Kruiwagen H, Penning L, van Steenbeek F, Burgener I, et al. Intestinal Organoids: Current and Future Applications. *MDPI* [Internet]. 2016;3(31):12. Available from: [chrome-extension://dagcmkpagjllhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fmdpi-res.com%2Fd\\_attachment%2Fvetsci%2Fvetsci-03-00031%2Farticle\\_deploy%2Fvetsci-03-00031.pdf](https://chrome-extension://dagcmkpagjllhakfdhnbomgmjdpkdklff/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fmdpi-res.com%2Fd_attachment%2Fvetsci%2Fvetsci-03-00031%2Farticle_deploy%2Fvetsci-03-00031.pdf)
59. Kuratnik A, Giardina C. Intestinal organoids as tissue surrogates for toxicological and pharmacological studies. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2013;85(12):1721–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.04.016>
60. Barkauskas CE, Chung MI, Fioret B, Gao X, Katsura H, Hogan BLM. Lung organoids: Current uses and future promise. *Dev.* 2017;144(6):986–97.
61. VanDussen KL, Sonnek NM, Stappenbeck TS. L-WRN conditioned medium

for gastrointestinal epithelial stem cell culture shows replicable batch-to-batch activity levels across multiple research teams. *Stem Cell Res* [Internet].

2019;37(March):101430. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101430>

62. Reidling JC, Subramanian VS, Dudeja PK, Said HM. Expression and promoter analysis of SLC19A2 in the human intestine. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2002;1561(2):180–7.
63. Wells JM, Spence JR. How to make an intestine. *Co Biol.* 2014;141:752–60.
64. Gonneaud A, Asselin C, Boudreau F, Boisvert FM. Phenotypic Analysis of Organoids by Proteomics. *Proteomics.* 2017;17(20):1–6.
65. Lindoso RS, Kasai-Brunswick TH, Monnerat Cahli G, Collino F, Bastos Carvalho A, Campos de Carvalho AC, et al. Proteomics in the World of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells* [Internet]. 2019;8(7):703. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/7/703>

# ANEXOS

Anexo 1 Análisis de datos numéricos de la expresión del gen Ki67, haciendo uso de la Ciclofilina como gen de referencia.

Ki67	Ct Ki67	Media Ct	SD Ct	MEDIA Ki67	Ct Cyclo	Media Cyclo	SD Cyclo	MEDIA Cyclo	dCt	Media dCt	ddCt	Potencia (P)	Media P	SD P	P Correccion (P-C)	Media P-C	SD P-C																	
Lote 1: Ancien MC L-WRN	1	28.3	28.15	0.22	27.8388	20.59	20.59	0.00	20.8713	7.555	6.9675	0.588	0.665	1.038	0.315	1.000	0.303																	
		27.99				20.59																												
	2	28.07	28.05	0.03		21.2	20.95	0.35	20.8713	7.1	6.9675	0.133	0.912	1.038	0.315	1.000	0.303																	
		28.03				20.7																												
	3	27.5	27.46	0.06		21.3	20.96	0.49	20.8713	6.5	6.9675	-0.467	1.383	1.038	0.315	1.000	0.303																	
		27.41				20.61																												
	4	27.77	27.71	0.09		20.98	20.99	0.01	20.8713	6.715	6.9675	-0.253	1.191	1.038	0.315	1.000	0.303																	
		27.64				21																												
Lote 2: MC 1	5	28.09	28.19	0.14	28.3013	21.67	21.67	0.01	21.5138	6.525	6.9675	-0.443	1.359	1.156	0.250	1.114	0.241																	
		28.29				21.66																												
	6	28.28	28.33	0.06		22.03	21.67	0.51	21.5138	6.655	6.9675	-0.312	1.242	1.156	0.250	1.114	0.241																	
		28.37				21.31																												
	7	27.83	27.81	0.04		21.21	21.14	0.10	21.5138	6.665	6.9675	-0.303	1.233	1.156	0.250	1.114	0.241																	
		27.78				21.07																												
	8	29.06	28.89	0.25		21.67	21.58	0.13	21.5138	7.305	6.9675	0.338	0.791	1.156	0.250	1.114	0.241																	
		28.71				21.49																												
Lote 3: MC 2	9	29.88	29.69	0.28	31.11	21.87	21.87		23.0414	7.815	6.9675	0.847	0.556	0.538	0.293	0.519	0.283																	
		29.49				No Ct																												
	10	30.04	30.04			22.73	22.91	0.25	23.0414	7.135	6.9675	0.167	0.890	0.538	0.293	0.519	0.283																	
		No Ct				23.08																												
	11	34.14	34.81	0.94		25.31	25.30	0.01	23.0414	9.505	6.9675	2.538	0.172	0.538	0.293	0.519	0.283																	
		35.47				25.29																												
	12	29.39	29.38	0.02		21.49	21.51	0.02	23.0414	7.87	6.9675	0.903	0.535	0.538	0.293	0.519	0.283																	
		29.36				21.52																												
Lote 4: MC 3	13	31.35	31.60	0.35	31.7886	22.32	22.28	0.06	22.5938	9.32	6.9675	2.353	0.196	0.250	0.113	0.241	0.109																	
		31.85				22.24																												
	14	33.91	32.48	2.02		22.48	22.42	0.09	22.5938	10.065	6.9675	3.098	0.117	0.250	0.113	0.241	0.109																	
		31.05				22.35																												
	15	31.84	31.66	0.25		23.18	23.20	0.03	22.5938	8.46	6.9675	1.493	0.355	0.250	0.113	0.241	0.109																	
		31.48				23.22																												
	16	31.04	31.04			22.53	22.48	0.07	22.5938	8.56	6.9675	1.593	0.332	0.250	0.113	0.241	0.109																	
		No Ct				22.43																												
Blanco Enzima	31.59	32.16	0.81		23.87	23.97	0.13																											
32.73	24.06																																	
Blanco ARN	36.52	36.52			28.28	28.02	0.37																											
No Ct	27.76																																	
Blanco QPCR	39.74	39.74			33.51	33.06	0.64																											
	No Ct				32.61																													

Anexo 2 Data procesada. Análisis estadístico de KI67 por ANOVA one way y test de Bonferroni. (GraphPad 8.1.0 Project)

Table Analyzed	Ki67				
One-way analysis of variance					
P value	0.0011				
P value summary	**				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	10.46				
R squared	0.7234				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	1.840	3	0.6134		
Residual (within columns)	0.7035	12	0.05862		
Total	2.544	15			
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Ancien Lot vs Nouveau Lot 1	-0.1138	0.6644	No	ns	-0.6535 to 0.4260
Ancien Lot vs Nouveau Lot 2	0.4815	2.812	No	ns	-0.05826 to 1.021
Ancien Lot vs Nouveau Lot 3	0.7118	4.157	Yes	**	0.1720 to 1.252
Nouveau Lot 1 vs Nouveau Lot 2	0.5953	3.477	Yes	*	0.05549 to 1.135
Nouveau Lot 1 vs Nouveau Lot 3	0.8255	4.822	Yes	**	0.2857 to 1.365
Nouveau Lot 2 vs Nouveau Lot 3	0.2303	1.345	No	ns	-0.3095 to 0.7700

Anexo 3 Análisis de datos numéricos de la expresión del gen LGR5, haciendo uso de la Ciclofilina como gen de referencia.

LGR5		Ct LGR5	Media Ct	SD Ct	MEDIA Ki67	Ct Cyclo	Media Cyclo	SD Cyclo	MEDIA Cyclo	dCt	Media dCt	ddCt	Potencia (P)	Media P	SD P	P Correccion (P-C)	Media P-C	SD P-C
Lote 1: Ancien MC L-WRN	1	29.19	29.11	0.11	29.034	20.59	20.59	0.00	20.871	8.52	8.1625	0.358	0.781	1.020	0.236	0.765	1.000	0.232
		29.03				20.59												
	2	29.43	29.31	0.18		21.2	20.95	0.35		8.355		0.193	0.875					
		29.18				20.7												
	3	29.42	28.95	0.67		21.3	20.96	0.49		7.99		-0.172	1.127					
		28.47				20.61												
	4	28.96	28.78	0.26		20.98	20.99	0.01		7.785		-0.378	1.299					
		28.59				21												
Lote 2: MC-1	5	30.51	31.13	0.87	31.793	21.67	21.67	0.01	21.514	9.46	8.1625	1.298	0.407	0.271	0.159	0.399	0.265	0.156
		31.74				21.66												
	6	33.71	32.38	1.88		22.03	21.67	0.51		10.71		2.548	0.171					
		31.05				21.31												
	7	30.64	30.61	0.05		21.21	21.14	0.10		9.465		1.303	0.405					
		30.57				21.07												
	8	32.77	33.06	0.41		21.67	21.58	0.13		11.48		3.318	0.100					
		33.35				21.49												
Lote 3: MC-2	9	33.98	33.98		34.19	21.87	21.87		23.041	12.11	8.1625	3.948	0.065	0.068	0.014	0.064	0.067	0.014
		No Ct				No Ct												
	10	35.19	34.66	0.76		22.73	22.91	0.25		11.75		3.588	0.083					
		34.12				23.08												
	11	No Ct				25.31	25.30	0.01										
		No Ct				25.29												
	12	33.83	33.83	0.00		21.49	21.51	0.02		12.325		4.163	0.056					
		33.83				21.52												
Lote 4: MC-3	13	No Ct			36.875	22.32	22.28	0.06	22.594		8.1625			0.026	0.032		0.026	0.032
		No Ct				22.24												
	14	No Ct	34.93			22.48	22.42	0.09		12.515		4.353	0.049					
		34.93				22.35												
	15	No Ct				23.18	23.20	0.03										
		No Ct				23.22												
	16	38.82	38.82			22.53	22.48	0.07		16.34		8.178	0.003					
		No Ct				22.43												
Blanco Enzima		No Ct			36.875	23.87	23.97	0.13	22.594		8.1625			0.026	0.032		0.026	0.032
		No Ct				24.06												
Blanco ARN		No Ct				28.28	28.02	0.37										
		No Ct				27.76												
Blanco QPCR		No Ct				33.51	33.06	0.64										
		No Ct				32.61												

Anexo 4 Data procesada. Análisis estadístico de LGR5 por ANOVA one way y test de Bonferroni. (GraphPad 8.1.0 Project)

Table Analyzed	LGR5				
One-way analysis of variance					
P value	< 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	27.14				
R squared	0.9005				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	2.125	3	0.7082		
Residual (within columns)	0.2348	9	0.02609		
Total	2.359	12			
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Ancien Lot vs Nouveau Lot 1	0.7345	6.431	Yes	***	0.3503 to 1.119
Ancien Lot vs Nouveau Lot 2	0.9330	7.563	Yes	***	0.5180 to 1.348
Ancien Lot vs Nouveau Lot 3	0.9745	6.967	Yes	***	0.5039 to 1.445
Nouveau Lot 1 vs Nouveau Lot 2	0.1985	1.609	No	ns	-0.2165 to 0.6135
Nouveau Lot 1 vs Nouveau Lot 3	0.2400	1.716	No	ns	-0.2306 to 0.7106
Nouveau Lot 2 vs Nouveau Lot 3	0.0415	0.2815	No	ns	-0.4545 to 0.5375

Anexo 5 Análisis de datos numéricos de la expresión del gen *THR1*, haciendo uso de la *Ciclofilina* como gen de referencia.

THR1		Ct THR1	Media Ct	SD Ct	MEDIA Ki67	Ct Cyclo	Media Cyclo	SD Cyclo	MEDIA Cyclo	dCt	Media dCt	ddCt	Potencia (P)	Media P	SD P	P Corrección (P-C)	Media P-C	SD P-C
Lote 1: Ancien MC L-WRN	1	29.69	28.86	1.18	28.038	20.59	20.59	0.00	20.871	8.265	7.1663	1.099	0.467	1.105	0.507	0.422	1.000	0.459
		28.02				20.59												
	2	27.69	27.38	0.44		21.2	20.95	0.35		6.43		-0.736	1.666			1.507		
		27.07				20.7												
	3	27.66	28.14	0.67		21.3	20.96	0.49		7.18		0.014	0.991			0.896		
		28.61				20.61												
	4	27.72	27.78	0.08		20.98	20.99	0.01		6.79		-0.376	1.298			1.174		
		27.84				21												
Lote 2: MC 1	5	28.3	28.26	0.06	28.224	21.67	21.67	0.01	21.514	6.59	1.378	-0.576	1.491	1.378	0.150	1.349	1.247	0.136
		28.21				21.66												
	6	28.5	28.27	0.33		22.03	21.67	0.51		6.595		-0.571	1.486			1.344		
		28.03				21.31												
	7	28.03	27.86	0.25		21.21	21.14	0.10		6.715		-0.451	1.367			1.237		
		27.68				21.07												
	8	28.53	28.52	0.01		21.67	21.58	0.13		6.94		-0.226	1.170			1.058		
		28.51				21.49												
Lote 3: MC 2	9	28.57	28.50	0.11	29.522	21.87	21.87	0.01	23.041	6.625	1.199	-0.541	1.455	1.199	0.643	1.317	1.085	0.582
		28.42				No Ct												
	10	29.3	29.30			22.73	22.91	0.25		6.395		-0.771	1.707			1.544		
		No Ct				23.08												
	11	No Ct	34.42			25.31	25.30	0.01		9.12		1.954	0.258			0.234		
		34.42				25.29												
	12	28.1	28.21	0.16		21.49	21.51	0.02		6.705		-0.461	1.377			1.246		
		28.32				21.52												
Lote 4: MC 3	13	27.58	27.64	0.08	28.653	22.32	22.28	0.06	22.594	5.36	2.098	-1.806	3.497	2.098	1.244	3.164	1.898	1.125
		27.7				22.24												
	14	30.08	28.84	1.76		22.48	22.42	0.09		6.42		-0.746	1.677			1.518		
		27.59				22.35												
	15	No Ct				23.18	23.20	0.03										
		No Ct				23.22												
	16	28.29	29.49	1.69		22.53	22.48	0.07		7.005		-0.161	1.118			1.012		
		30.68				22.43												
Blanco Enzima		No Ct	36.66			23.87	23.97	0.13										
Blanco ARN		34.43				34.43												
		No Ct	27.76															
Blanco QPCR		No Ct				33.51	33.06	0.64										
		No Ct				32.61												

Anexo 6 Data procesada. Análisis estadístico de THRI por ANOVA one way y test de Bonferroni. (GraphPad 8.1.0 Project)

Table Analyzed	THTR1				
One-way analysis of variance					
P value	0.0004				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	14.04				
R squared	0.7929				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	7.352	3	2.451		
Residual (within columns)	1.920	11	0.1745		
Total	9.272	14			
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Ancien Lot vs Nouveau Lot 1	-0.1513	0.5120	No	ns	-1.099 to 0.7964
Ancien Lot vs Nouveau Lot 2	-0.001750	0.005924	No	ns	-0.9494 to 0.9459
Ancien Lot vs Nouveau Lot 3	-1.794	5.623	Yes	***	-2.818 to -0.7705
Nouveau Lot 1 vs Nouveau Lot 2	0.1495	0.5061	No	ns	-0.7982 to 1.097
Nouveau Lot 1 vs Nouveau Lot 3	-1.643	5.149	Yes	**	-2.666 to -0.6192
Nouveau Lot 2 vs Nouveau Lot 3	-1.792	5.617	Yes	***	-2.816 to -0.7687



## TECHNICAL BULLETIN

# Intestinal Epithelial Organoid Culture with IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse)

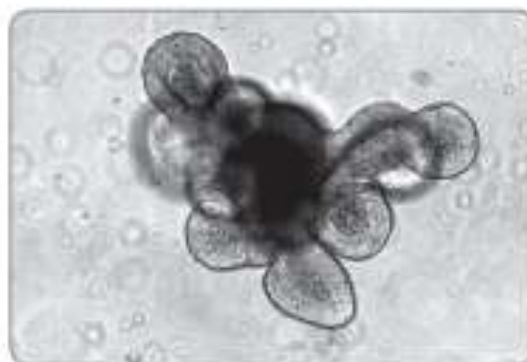
## Introduction

The use of three-dimensional (3D) culture systems continues to increase, due in large part to their potential to facilitate basic research into multicellular biological mechanisms and precision medicine, as well as to bridge the gap between traditional *in vitro* high-throughput screens and *in vivo* studies during drug development.<sup>1,2</sup> Adoption of 3D culture systems has been driven by growing recognition that organotypic cultures can provide a more physiologically relevant *in vitro* model than traditional monolayer culture techniques.<sup>3,4</sup> In the intestinal epithelial organoid culture system, intestinal stem cells recapitulate both the self-renewal capacity and differentiation hierarchy observed in the adult intestine *in vivo* (Figure 1). In addition to exhibiting all of the known cell types present in the adult intestinal epithelium, intestinal organoids are characterized by a crypt-villus organization, epithelial polarization and functional lumen,<sup>5,6</sup> which together make this culture system a powerful tool for investigating intestinal biology and the properties of intestinal stem cells.<sup>7,8</sup> Intestinal organoids are also being explored for potential contributions to regenerative medicine, as organoids have been demonstrated to incorporate into the colon of chemically injured mice to form segments of colon that are morphologically indistinguishable from the surrounding epithelium.<sup>9</sup> Intestinal organoids have been successfully co-cultured with both bacterial and immune cells, providing a model to study cell-to-cell interactions between epithelial tissues and the immune system.<sup>10,11</sup> As well, mouse intestinal organoids are amenable to genetic manipulations using the CRISPR-Cas system and infection with retroviruses and lentiviruses.<sup>12</sup>

This Technical Bulletin provides step-by-step instructions for the isolation, culturing, passaging and cryopreservation of mouse small intestinal and colonic crypts using IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse) and Corning® Matrigel® Matrix.

### Aliquoting & Storage of IntestiCult™ Organoid Growth Medium

Complete medium can be stored at 2° - 8°C for up to two weeks. To avoid repeated freeze-thaw cycles, aliquot complete medium into appropriate volumes and freeze at -20°C for up to three months. Do not re-freeze aliquots once thawed.



**Figure 1.** Light microscope visualization (10X) of a mouse intestinal epithelial organoid after five days of culture

## Protocol

### Section 1: Isolation of Mouse Intestinal Crypts

1. On the day of crypt isolation, remove the bottle of IntestiCult™ Basal Medium from the refrigerator and place on the bench-top to warm to room temperature (15 - 25°C). Remove the vials of IntestiCult™ Supplement 1 and Supplement 2 from the freezer and leave them to thaw at room temperature (15 - 25°C). Pipette up and down to mix Supplement 1 and 2 thoroughly.

**Note:** Once thawed, use immediately.

2. Make the complete medium by adding 5 mL of Supplement 1 and 5 mL of Supplement 2 to the bottle of Basal Medium. Replace the cap and mix the medium well by inverting the bottle several times.
3. The medium must equilibrate to room temperature (15 - 25°C) before use. You will require 12 mL of complete medium to initiate organoid cultures in 12 individual culture wells (four wells for each of three plating densities) using crypts isolated from murine small intestine or colon following this protocol.
4. Immediately before use, add desired antibiotics to the complete IntestiCult™ Organoid Growth Medium. We recommend 50 µg/mL gentamicin or 100 units/100 µg per mL penicillin/streptomycin.



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

TOLL FREE PHONE 1 800 541 2122 | PHONE 416 675 2121 | INFO@STEMCELL.COM | TECHSUPPORT@STEMCELL.COM

FOR GLOBAL CONTACT DETAILS VISIT OUR WEBSITE

- Prepare the additional media and reagents required for this procedure. Thaw 500  $\mu$ L Corning® Matrigel® Matrix by placing the vial on ice. We recommend Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, Phenol Red-Free (Corning® Product #356231). Place 500 mL PBS without magnesium or calcium (Catalog #37350), 100 mL PBS supplemented with 0.1% bovine serum albumin (BSA), and 25 mL DMEMF-12 with 15 mM HEPES (Catalog #36254) on ice. Place Gentle Cell Dissociation Reagent (Catalog #07174) at room temperature (15 - 25°C). Pre-warm a tissue culture (TC)-treated 24-well culture plate (Corning® Product #3526) in an incubator at 37°C for at least 30 minutes.

**Note:** To ensure ideal Matrigel® dome architecture for organoid culture use tissue culture-treated plates.



**Figure 2.** Isolation of mouse intestine: (A) removal of external membranes and fat from mouse intestine; (B) harvested mouse intestinal segment after removal of external membranes.

- Sacrifice a mouse according to applicable ethical regulations and harvest 20 cm of small intestine proximal to the stomach. Use pointed forceps to remove any membrane, blood vessels and fat from the exterior of the intestine (Figure 2). Place the intestinal segment into a 10 cm dish containing 5 mL cold (2 - 8°C) PBS.

**For Colon:** The following protocol can be performed using the colon from one mouse; however, due to the high degree of variability between new users, it is suggested to use the colon from two or three mice to ensure a greater seeding density when performing the protocol for the first time.

Harvest 3 - 6 cm of colon per sacrificed mouse; be sure to cut the colon a few millimeters below the caecum and a few millimeters above the rectum to prevent the introduction of excessive toxins and waste into the culture. Note, stem cell density is greatest in the proximal colon; therefore excising more tissue near the rectum will not significantly increase the number of crypts.

- Gently flush the intestinal segment with 1 mL cold (2 - 8°C) PBS by inserting a 1 mL pipette tip into one of the open ends of the intestine.



**Figure 3.** Preparatory steps for mouse intestinal segment: (A) cutting open intestinal segment; (B) washing intestinal segment with cold PBS.

**Attention: Pre-wet pipettes and pipette tips**

Throughout the procedure you will need to pre-wet pipettes and pipette tips before manipulating intestinal pieces or crypts to prevent the tissue from sticking to the wall of the pipette.

**Attention: Be aware of centrifugation speeds**

Throughout this procedure both 200 x g and 250 x g centrifugation speeds are used frequently.



## Intestinal Epithelial Organoid Culture with IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse)



**Figure 4. Washing steps for mouse intestinal pieces**

(A) Intestinal pieces settled in bottom of tube, (B) intestinal pieces following aspiration of supernatant, (C) wash supernatants from first (left) and 20th (right) wash.

8. Using small scissors, cut the intestinal section open lengthwise (Figure 3A) and open such that the lumen of the intestine is facing up. Use a micropipette to gently wash the intestinal sheet with 1 mL cold (2 - 8°C) PBS three times (Figure 3B).
9. Transfer the intestinal segment to a clean 10 cm dish containing 15 mL of fresh, cold (2 - 8°C) PBS. Using forceps, move the intestinal segment through the clean buffer to rinse thoroughly.
10. Add 15 mL cold (2 - 8°C) PBS to a 50 mL conical tube. Using forceps, hold the washed intestine by one end over the tube. Starting from the bottom of the intestine, use scissors to cut the intestine into 2 mm pieces, allowing these pieces to fall into the buffer in the tube.
11. Pre-wet a 10 mL serological pipette with PBS and use it to gently pipette the intestinal pieces up and down three times.
12. Let the pieces settle by gravity (approximately 30 seconds; Figure 4A) and then gently aspirate off the supernatant, leaving enough liquid to just cover the pieces of tissue (Figure 4B).
13. Add 15 mL fresh cold (2 - 8°C) PBS and repeat the rinsing procedure by pipetting the suspended tissue pieces up and down three times using a pre-wetted 10 mL serological pipette.
14. Using the same pipette, repeat steps 12 - 13 another fifteen to twenty times, or until the supernatant is clear (Figure 4C).  
**For Colon:** In contrast to the small intestine, when isolating colon crypts the supernatant typically becomes clear after only three to five washes with cold (2 - 8°C) PBS. Despite this appearance, colonic pieces should be washed fifteen times with cold PBS before proceeding to the next step.
15. Remove the supernatant, resuspend the tissue pieces in 25 mL room temperature (15 - 25°C) Gentle Cell Dissociation Reagent and incubate at room temperature (15 - 25°C) for 15 minutes on a rocking platform at 20 rpm.  
**For Colon:** Increase incubation time to 20 minutes.
16. Let the tissue segments settle by gravity for approximately 30 seconds. Gently pipette off and discard the supernatant, leaving enough liquid to just cover the pieces of tissue.
17. Resuspend the tissue pieces in 10 mL cold (2 - 8°C) PBS containing 0.1% BSA and pipette up and down three times. Wait for the majority of the intestinal pieces to settle to the bottom (approximately 30 seconds).
18. Using the same pipette, gently remove the supernatant and filter it through a 70 µm filter, collecting the filtrate in a fresh 50 mL conical tube. Discard the filter and label the filtrate "Fraction 1". Place this fraction aside on ice.

19. Repeat steps 17 - 18 three times to generate fractions 2 - 4.

**For Colon:** Due to the persistence of debris and waste in the murine colon, an additional one or two fractions might be required. Generate the first four fractions, then plate 1 mL of each into a separate well in a 6-well plate and inspect under a bright field microscope at 4X. If fractions 3 and 4 have a high proportion of thin fibrous material, repeat steps 17 - 18 to generate fractions 5 and 6. If fractions 3 and 4 look clean, continue to centrifugation step 20. Proceed to step 20 after any additional fractions have been collected.

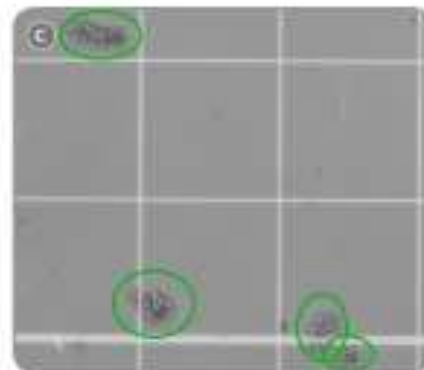
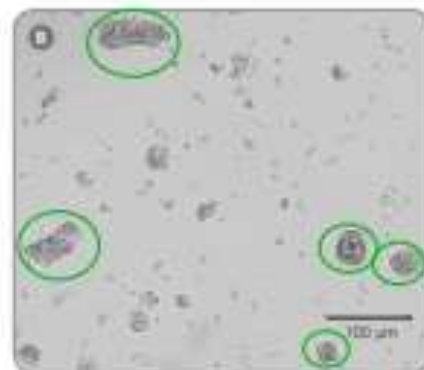
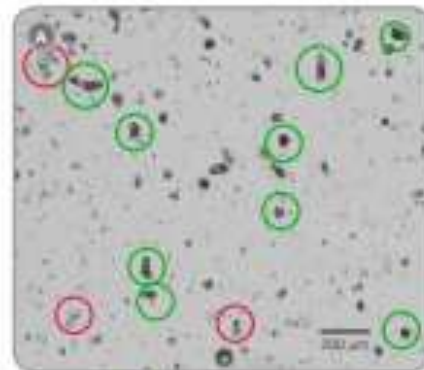
20. Centrifuge the fractions at 200 x g for five minutes at 2 - 8°C. Carefully pour off and discard the supernatants, retaining the pellet in each tube.
21. Resuspend each of the pellets in 10 mL cold (2 - 8°C) PBS buffer containing 0.1% BSA. Transfer each suspension to a fresh 15 mL conical tube labeled with the appropriate fraction number.
22. Centrifuge the four fractions at 200 x g for three minutes at 2 - 8°C. Gently pour off the supernatants. The pelleted intestinal crypts will remain in the tubes.

## Section 2: Organoid Culture from Isolated Mouse Intestinal Crypts

1. Resuspend crypt fractions in 10 mL cold (2 - 8°C) DMEM/F12.
2. Add 1 mL of each fraction to individual wells of a 6-well plate and assess the quality of the fractions using an inverted microscope (these samples can be added back to their respective fractions after evaluation). Select one or two fraction(s) that are enriched for intestinal crypts to carry forward for organoid culture. Crypts desirable for culture can be of various sizes, typically rectangular or circular in shape with relatively smooth edges, and resemble small, folded sections of an epithelial monolayer (Figure 5A and 5B). Fractions with higher concentrations of villi, single cells or debris are not suitable for organoid culture. Fractions 3 and 4 often exhibit the greatest enrichment for desirable crypts.

### Example: Crypt Fraction Volume Calculations

Crypts counted in 10  $\mu$ L aliquot: 15  
 $15 \times 100 =$  approximately 1,500 crypts per mL in fraction  
 Volumes to centrifuge in step 4:  
 0.33 mL for 500 crypts  
 1.0 mL for 1,500 crypts  
 2.0 mL for 3,000 crypts



**Figure 5. Assessing isolated intestinal crypt fractions prior to culture.**  
 Light microscope visualizations of intestinal crypt fractions (1 mL in well of 6-well plate) (A) Fraction 2 at 20X magnification; (B) Fractions 3 and 4 combined at 10X magnification; (C) light microscope visualization of intestinal crypt fraction (10  $\mu$ L on hemacytometer) appropriate for organoid culture. Intestinal crypts circled in green are suitable for organoid culture and should be used to determine crypt concentration in the fraction. Red circles indicate villi, fragments of tissue or debris not suitable for organoid culture.

## Intestinal Epithelial Organoid Culture with IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse)

- Using a pre-wetted pipette tip, take a 10  $\mu$ L sample of the selected fraction(s) and deposit on a glass slide or hemacytometer. Using an inverted microscope, count the number of crypts in the aliquot (Figure 5C). Do not count single cells or large, multi-layered tissue fragments. Multiply by 100 to estimate the number of crypts per mL in that fraction.
- Calculate the volume of the selected fraction(s) containing approximately 500, 1500 and 3000 crypts. Transfer the required volumes to three separate, labeled 15 mL conical tubes and centrifuge at 200  $\times$  g and 2 - 8°C for five minutes. Carefully pipette off and discard the supernatant.
- Add 150  $\mu$ L room temperature (15 - 25°C) complete IntestiCult™ Organoid Growth Medium to the pellet in each tube. Do not use cold medium.



**Figure 5. Matrigel® domes**

Photos of domes containing crypts suspended in a 1:1 mixture of Matrigel® Matris and IntestiCult™ Organoid Growth Medium taken from (A) above and (B) the side.

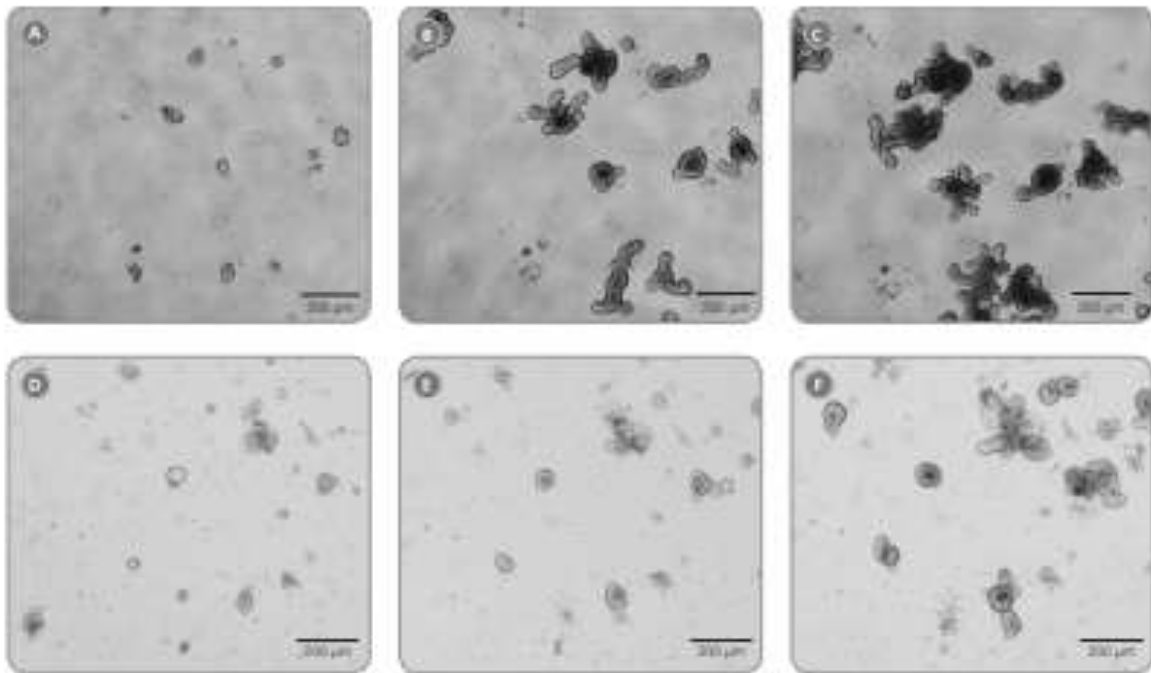
- Add 150  $\mu$ L undiluted Matrigel® Matris to each tube. Using the same pipette tip, carefully pipette up and down ten times to resuspend the pellet. Avoid introducing bubbles.
  - Carefully pipette 50  $\mu$ L of the 500-crypt suspension into the center of each of four wells of the pre-warmed 24-well plate. To prevent bubbles when plating, dispense to the first stop of the pipette. The samples should form domes in the center of each well (Figure 6). Repeat for the 1500-crypt and 3000-crypt suspensions for a total of 12 wells.
- Note:** Work quickly as the Matrigel® will begin to acidify.
- Place the plate at 37°C for 10 minutes to set the Matrigel®. Be careful not to disturb the domes when transferring the plate to the incubator.
  - Add 750  $\mu$ L room temperature (15 - 25°C) complete IntestiCult™ Organoid Growth Medium to each well by pipetting the medium gently down the sidewall of the well. Do not pipette the medium directly onto the domed cultures.
  - Add sterile PBS to any unused wells to ensure proper hydration of the cultures.
  - Place the lid on the culture plate and incubate at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

- Monitor cultures for organoid growth. Typically, crypts form spherical structures after about three hours of incubation (Figure 7A). After two to four days of incubation, small intestinal organoids typically begin to bud (Figure 7B), and complex, multi-lobed structures form at day five to seven (Figure 7C).

**For Colon:** (Unlike the murine small intestine, organoid growth is slower when using colon crypts. By day two small cystic organoids will begin to appear (Figure 7D), and grow in size between days three and seven (Figure 7E). Between days seven and 10 colonic organoids can develop budding structures, though less defined than those of organoids from the small intestine (Figure 7F).)

- Fully exchange the culture medium three times per week by carefully aspirating the existing liquid medium, keeping the pipette tip at the edge of the well bottom. Replace with 750  $\mu$ L fresh, room temperature (15 - 25°C) complete IntestiCult™ Organoid Growth Medium.
- Passage organoid cultures using a 1:6 split ratio after seven to 10 days of culture to avoid over-growth and excessive accumulation of debris within the organoid lumen. Proceed to Section 3 for the passaging protocol.

**For Colon:** Passage organoid cultures using a 1:2 split ratio seven to 10 days after plating, or when the density reaches 150 organoids per well.



**Figure 7.** A timescale of organoid cultures from small intestine and colon after plating and incubation.

Light microscope visualizations of intestinal crypts cultured in droplets of 1:1 Matrigel<sup>®</sup> Matrix and IntestiCult<sup>™</sup> Organoid Growth Medium are shown following incubation at 37°C and 3% CO<sub>2</sub> for small intestine at (A) Day 1 (B) Day 3 and (C) Day 7, and colon at (D) Day 1 (E) Day 3 and (F) Day 7.

### Section 3: Passaging Mouse Intestinal Organoids

1. On the day of passaging, remove the previously prepared complete IntestiCult<sup>™</sup> Organoid Growth Medium from fridge or freezer and leave to warm to room temperature (15 - 25°C). The medium must be warmed to room temperature before use. You will require 4 mL of complete medium per well to be passaged; if you do not have complete medium prepared, please refer to Section 1, steps 1 and 2, of this protocol.
2. Add desired antibiotics to the IntestiCult<sup>™</sup> Organoid Growth Medium (once thawed). We recommend 50 µg/mL gentamicin or 100 units/100 µg per mL penicillin/streptomycin.
3. Prepare the additional media, buffers and reagents that will be required during the procedure: Thaw 150 µL Matrigel<sup>®</sup> Matrix (Corning<sup>®</sup> Product #356231) per well to be passaged on ice. Also place Gentle Cell Dissociation Reagent (Catalog #07174) and 10 mL DMEM/F-12 with 15 mM HEPES (Catalog #36254) per well to be passaged on ice. Place the required number of TC-treated 24-well culture plates (Corning<sup>®</sup> Product #3526) at 37°C to pre-warm for 30 minutes.
4. Carefully remove the liquid culture medium from each of the wells to be passaged without disturbing the organoid-containing Matrigel<sup>®</sup> dome.

## Intestinal Epithelial Organoid Culture with IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse)

5. Add 1 mL Gentle Cell Dissociation Reagent on top of the exposed dome in each well and incubate at room temperature (15 - 25°C) for one minute.
6. Pre-wet a 1000 µL pipette tip with the Gentle Cell Dissociation Reagent in the well, and use it to break up the dome and organoids by pipetting up and down approximately twenty times.
7. Use the same pipette tip to transfer the suspension to a 15 mL conical tube. Rinse the culture well with an additional 1 mL Gentle Cell Dissociation Reagent and add this to the 15 mL tube.
8. Repeat steps 6 and 7 for each well to be passaged.
9. Incubate the 15 mL tubes at room temperature (15 - 25°C) on a rocking platform at 20 rpm for 10 minutes.
10. Centrifuge the tubes at 200 x g and 2 - 8°C for five minutes, then gently pour off and discard the supernatant.
11. Wash the pellets by resuspending in 10 mL cold (2 - 8°C) DMEMF-12 using a pre-wetted 10 mL serological pipette, centrifuging at 200 x g at 2 - 8°C for five minutes, then gently pipetting off as much DMEMF-12 as possible without disturbing the pellet and discarding the supernatant.
12. Add 150 µL room temperature (15 - 25°C) complete IntestiCult™ Organoid Growth Medium to the pellet in each tube. Add 150 µL undiluted Matrigel® Matrix to each tube and pipette up and down ten times to resuspend the pellet. Avoid introducing bubbles.
13. For each tube, pipette 50 µL of the medium/Matrigel® suspension into the center of each of four wells of a pre-warmed 24-well plate to form domes in the center of each well.
14. Place the lid on the culture plate and incubate at 37°C for 10 minutes to set the Matrigel®.
15. Gently add 750 µL room temperature (15 - 25°C) complete IntestiCult™ Organoid Growth Medium to each well by pipetting the medium gently down the sidewall of the well. Do not pipette the medium directly onto the domed cultures.
16. Add sterile PBS to any unused wells.
17. Place the lid on the culture plate and incubate at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.
18. Exchange the culture medium three times per week by carefully aspirating the existing liquid medium, keeping the pipette tip at the edge of the well bottom. Replace with 750 µL fresh, room temperature (15 - 25°C) complete IntestiCult™ Organoid Growth Medium.

Using this culture system, organoids can be passaged indefinitely.

### Section 4: Cryopreservation of Mouse Intestinal Organoids

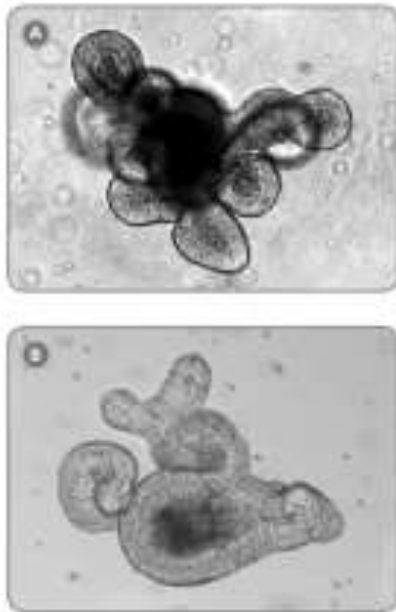
This protocol describes freezing and thawing the recommended 200 organoids per cryovial. For optimal results, cryopreservation is best performed when organoids are mature.

**Note:** Intestinal organoids are suitable for cryopreservation after two passages from primary culture or frozen; however, for best results organoids that are mature and expressing multiple buds should be used. Organoids from small intestine reach maturity between five to seven days of culture (Figure 8A). Colonic organoids mature more slowly, with less defined budding, reaching maturity between seven to 10 days of culture (Figure 8B).

1. Prepare all media and reagents required for this protocol. Place PBS without magnesium or calcium (Catalog #37350), DMEMF-12 with 15 mM HEPES (Catalog #36254) and CryoStar® CS10 (Catalog #07930) to cool on ice. Retrieve the plate containing the organoids to freeze.
2. Using an inverted microscope, count the number of mature organoids found in each well. Combine the contents of multiple wells as needed to achieve 200 organoids in each cryovial.
3. Remove the IntestiCult™ Organoid Growth Medium from each well containing organoids. Replace it with 1 mL of cold (2 - 8°C) PBS.
4. Break up the Matrigel® Matrix by pipetting up and down ten to twenty times with a PBS-wetted 1000 µL pipette tip. Transfer suspensions containing 200 organoids, combining wells if necessary, to a single 15 mL conical tube.
5. Wash each well with 1 mL of cold (2 - 8°C) PBS by pipetting up and down five times with a pre-wetted 1000 µL pipette tip and transfer to the 15 mL conical tube.
6. Pellet the organoids by centrifuging at 200 x g for five minutes at 2 - 8°C. Remove and discard the supernatant, being careful not to disturb the organoid pellet.
7. Wash the organoid pellet by resuspending in 7 to 10 mL of cold DMEMF-12 with 15 mM HEPES. Gently flick the tube, or gently pipette the contents, to help break down the pellet if needed. Centrifuge the suspension at 200 x g for five minutes at 2 - 8°C then carefully remove and discard the supernatant.
8. Resuspend the organoid pellet in cold (2 - 8°C) CryoStar® CS10 freezing medium using 1 mL of freezing medium per cryovial of 200 organoids.
9. Using the same pipette tip, move the organoids suspended in CryoStar® CS10 to a labeled cryovial. Place the cryovial in a freezing container with 500 mL of isopropyl alcohol, or in an IPA-free freezing container.

10. Transfer the freezing container to a  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer for 24 hours then transfer the cryovial to liquid nitrogen ( $-195^{\circ}\text{C}$ ) for long-term storage. Intestinal organoids can be stored at  $-195^{\circ}\text{C}$  for six months. Long-term storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  is not recommended.

**Note:** Work quickly to avoid prolonged exposure of non-frozen organoids to CryoStor<sup>®</sup> CS10.



**Figure 8.** Light microscope visualization (10X) of mature intestinal organoids cultured in droplets of 1:1 Matrigel<sup>®</sup> Matrix and IntestiCult<sup>™</sup> Organoid Growth Medium and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . (A) Small intestinal organoid after five days of culture and (B) colon organoids after 10 days of culture.

## Section 5: Thawing of Mouse Intestinal Organoids

1. Thaw  $120\ \mu\text{L}$  of Matrigel<sup>®</sup> Matrix (Corning<sup>®</sup> Product #356231) on ice and let previously prepared complete IntestiCult<sup>™</sup> Organoid Growth Medium warm to room temperature ( $15 - 25^{\circ}\text{C}$ ). You will need  $3.1\ \text{mL}$  of complete media for four wells of a 24-well plate. If you do not have any prepared IntestiCult<sup>™</sup> complete media refer to steps 1 - 4 in Section 1 of this protocol. Place a 24-well TC-treated plate (Corning<sup>®</sup> Product #3526) in a  $\text{CO}_2$  incubator at  $37^{\circ}\text{C}$  to warm for 30 minutes.
2. Combine  $2\ \text{mL}$  of 25% BSA stock solution with  $48\ \text{mL}$  of DMEM/F-12 with  $15\ \text{mM}$  HEPES (Catalog #36254) in a  $50\ \text{mL}$  conical tube to generate a DMEM/F-12 washing solution containing 1% BSA. Leave at room temperature ( $15 - 25^{\circ}\text{C}$ ) for the duration of this protocol. The washing solution can be stored at  $2 - 8^{\circ}\text{C}$  for up to six months.
3. To a  $15\ \text{mL}$  conical tube, add  $2\ \text{mL}$  of DMEM/F-12 with 1% BSA solution at room temperature ( $15 - 25^{\circ}\text{C}$ ).

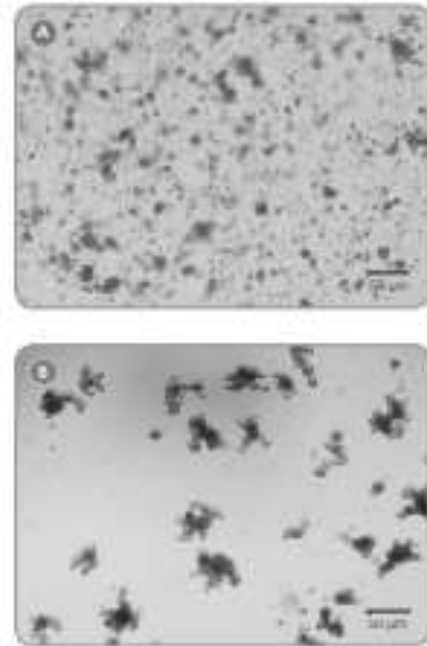
**Note:** Cells should be transferred to this tube immediately after thawing to avoid significant reduction in viability.

4. Retrieve and thaw the frozen organoids by placing the cryovial in a  $37^{\circ}\text{C}$  water bath. Thawing is complete when the freezing medium becomes liquid, at which point the organoids will be visible at the bottom of the tube. Thawing at  $37^{\circ}\text{C}$  should take between 2 and 2.5 minutes; over-warming the medium may affect the growth efficacy of the organoids in culture.
5. Wipe the outside of the cryovial with 70% ethanol or isopropanol before opening. Add  $1\ \text{mL}$  of DMEM/F-12 with 1% BSA solution directly to the cryovial using a  $1000\ \mu\text{L}$  pipette. Mix the contents of the cryovial by pipetting up and down four times. Immediately transfer the contents of the cryovial to the  $15\ \text{mL}$  conical tube containing  $2\ \text{mL}$  of DMEM/F-12 with 1% BSA solution using a pre-washed  $1000\ \mu\text{L}$  pipette tip.
6. Wash the cryovial two more times with  $1\ \text{mL}$  of DMEM/F-12 with 1% BSA solution and transfer to the conical tube. Be sure to wash the entire inner surface area of the cryovial, including the inside of the lid.
7. Wash the organoids to remove the CryoStor<sup>®</sup> CS-10 by centrifuging the organoid suspension at  $200 \times g$  for five minutes at  $2 - 8^{\circ}\text{C}$ . Carefully remove and discard the supernatant. Avoid introducing bubbles. If bubbles are present after centrifugation, carefully aspirate to remove the bubbles first, prior to aspirating the body of the supernatant.

## Intestinal Epithelial Organoid Culture with IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse)

- Using a 200  $\mu$ L pipette tip, resuspend the organoids by adding 100  $\mu$ L of room temperature (15 - 25°C) complete IntestiCult™ Organoid Growth Medium.
- Add 100  $\mu$ L of Matrigel® using a 200  $\mu$ L pipette tip. Mix the suspension by pipetting up and down five to ten times to ensure a consistent density and viscosity throughout the sample. Avoid introducing bubbles.
- Using a pre-wetted 200  $\mu$ L pipette tip, add 50  $\mu$ L of the organoid suspension to four wells of the pre-wetted 24-well plate such that it forms a dome in the center of the each well. When plating, dispense to the first stop of the pipette to avoid introducing bubbles. Incubate the organoids at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 10 minutes to allow the Matrigel® to solidify.
- Add 750  $\mu$ L of room temperature (15 - 25°C) complete IntestiCult™ Organoid Growth Medium to each well containing a Matrigel® dome by pipetting the medium gently down the wall of the well. Do not pipette directly onto the domed cultures.
- Add sterile PBS to any unused wells.
- Place the lid on the culture plate and incubate at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Exchange the media three times per week.
- For the best results, passage the previously frozen organoids two times after thawing. After thawing, organoid growth will be slow. Organoids should be ready for passaging between five and seven days of culture after thawing, and five days after each passage. Typical organoid growth characteristics should be restored after one passage from frozen (Figure 9).

**Note:** It is not recommended to expose organoids to consecutive freeze-thaw cycles.



**Figure 9.** Intestinal organoid cultures from previously frozen organoids as visualized by light microscopy

Thawed intestinal organoids were cultured in doses of 1:1 Matrigel® Matrix and IntestiCult™ Organoid Growth Medium and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. (A) Passage 0, Day 5; (B) Passage 1, Day 6.

# Intestinal Epithelial Organoid Culture with IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse)

## Product Information

PRODUCT	QUANTITY	CATALOG #
IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse)	1 Kit (100 mL Complete Medium)	00005
Gentle Cell Dissociation Reagent	100 mL	07174
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) Without Calcium and Magnesium	500 mL	37350
DMEM/F12 with 15 mM HEPES	500 mL	36254
Matrigel® GFR and Phenol Red-Free Basement Membrane Matrix	50 mL	(Corning®) 356231
CryoStor® CS10	100 mL	07900
Bovine Serum Albumin (BSA)	—	—
Costar® 24 Well Clear TC-Treated Multiple Well Plates, Individually Wrapped, Sterile	50 plates	(Corning®) 3526
Thermo Scientific™ Nunc™ Biobanking and Cell Culture Cryogenic 1.8 mL Tubes	450 Tubes	(Thermo Fisher®) 12-565-167N
Falcon® 70µm Cell Strainer	50 strainers	(Corning®) 352060

For more information, please visit [www.intesticult.com](http://www.intesticult.com) or contact our Technical Support Department at [techsupport@STEMCELL.com](mailto:techsupport@STEMCELL.com).

## References

1. Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165(7):1586-97, 2016
2. Lancaster MA & Knizich JA. Organogenesis in a Dish: Modeling Development and Disease Using Organoid Technologies. *Science* 345(6194):1247125, 2014
3. Sato T et al. Single Lgr5+ Stem Cells Build Crypt-Villus Structures in Vitro Without a Mesenchymal Niche. *Nature* 459(7244):262-5, 2009
4. Sato T et al. Paneth Cells Constitute the Niche for Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Crypts. *Nature* 469(7330):415-8, 2011
5. Yu S et al. Functional Engraftment of Colon Epithelium Expanded in Vitro from a Single Adult Lgr5+ Stem Cell. *Nat. Med.* 18(4):618-23, 2012
6. Farin H et al. Paneth Cell Extrusion and Release of Antimicrobial Products is Directly Controlled by Immune Cell-derived IFN-γ. *J Exp Med* 211(7):1393-1405, 2014
7. Nozaki K et al. Co-culture with Intestinal Epithelial Organoids Allows Efficient Expansion and Multi-Analysis of Intraepithelial Lymphocytes. *J Gastroenterol* 51(3):206-13, 2016
8. Schwank G et al. Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell* 13(6):655-6, 2013
9. Koo BK et al. Controlled Gene Expression in Primary Lgr5 Organoid Cultures. *Nat. Methods* 8(1): 81-3, 2011

Copyright © 2016 by STEMCELL Technologies, Inc. All rights reserved including graphics and images. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientific History Symbols, and IntestiCult are trademarks of STEMCELL Technologies. Corning Inc., Costar and Falcon are registered trademarks of Corning Inc. All other trademarks are the property of their respective holders. Any use of trademarks herein is made for identification only to ensure that the information provided by STEMCELL and its suppliers is correct. It does not constitute endorsement by or the warranty or responsibility of our organization.

IntestiCult™ Organoid Growth Medium is a product and a registered trademark of Corning Inc. and its subsidiaries. All other trademarks and registered trademarks are the property of their respective holders.



# INSTRUCTION MANUAL

## Direct-zol™ RNA MicroPrep

Catalog Nos. R2060, R2061, R2062, & R2063

### Highlights

- Quick, spin column purification of high-quality (DNA-free) total RNA **directly** from TRIZOL®, TRI Reagent® and other acid-guanidinium-phenol based reagents (RNAzol®, QIAzol®, TriPure™, TriSure™, etc.).
- Bypasses phase separation and precipitation procedures, for non-biased recovery of miRNA.

### Contents

Product Contents .....	1
Specifications .....	1
Product Description .....	2
Buffer Preparation .....	3
Protocols	
Cells, Tissue, Tough-to-Lyse Samples .....	3
Biological Liquids, Reaction Clean-up .....	4
Appendices .....	5
Ordering Information .....	6

Satisfaction of all Zymo Research products is guaranteed. If you are dissatisfied with this product please call 1-888-882-9882.

Integrity of kit components is guaranteed for up to one year from date of purchase. Reagents are routinely tested on a lot-to-lot basis to ensure they provide the highest performance and reliability.

\* TRIzol<sup>®</sup>, RNAzol<sup>®</sup>, QIAzol<sup>®</sup>, TriPure<sup>™</sup>, TriSure<sup>™</sup> and all other acid-guanidinium-phenol reagents.

## Product Contents

Direct-zol <sup>™</sup> RNA MicroPrep Kit Size (Preps)	R2060 (50)	R2061 (50)	R2062 (200)	R2063 (200)
TRI Reagent <sup>®</sup>	-	50 ml	-	200 ml
Direct-zol <sup>™</sup> RNA PreWash <sup>†</sup> (concentrate)	40 ml	40 ml	160 ml	160 ml
RNA Wash Buffer <sup>‡</sup> (concentrate)	12 ml	12 ml	48 ml	48 ml
DNase I <sup>§</sup> (lyophilized)	1	1	4	4
DNA Digestion Buffer	4 ml	4 ml	16 ml	16 ml
DNase/RNase-Free Water	4 ml	4 ml	10 ml	10 ml
Zymo-Spin <sup>™</sup> IC Columns	50	50	200	200
Collection Tubes	100	100	400	400
Instruction Manual	1	1	1	1

**Storage Temperature** - Store all kit components (i.e., buffers, columns) at room temperature. TRI Reagent<sup>®</sup> is provided with catalog numbers R2061 and R2063 only.

<sup>†</sup> Before use, add 10 ml and 40 ml ethanol (95-100%) to the 40 ml and 160 ml Direct-zol<sup>™</sup> RNA PreWash concentrate, respectively.

<sup>‡</sup> Add 48 ml 100% ethanol (52 ml 95% ethanol) to the 12 ml RNA Wash Buffer concentrate or 192 ml 100% ethanol (208 ml 95% ethanol) to the 48 ml RNA Wash Buffer concentrate before use.

<sup>§</sup> Prior to use, reconstitute the lyophilized DNase I as indicated on the vial prior to use. Store frozen aliquots.

## Specifications

- **Sample Sources** - Any sample stored and preserved in TRI Reagent<sup>®</sup>, TRIzol<sup>®</sup> or similar\* (animal cells, tissue, bacteria, yeast, biological fluids, and *in vitro* processed RNA (e.g., transcription products, DNase-treated or labeled RNA)).
- **Sample Inactivation** - TRI Reagent<sup>®</sup> (provided with R2061, R2063 only) inhibits RNase activity and inactivates viruses and other infectious agents.
- **RNA Size** - RNAs  $\geq 17$  nucleotides.
- **RNA Purity** -  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ ,  $A_{260}/A_{330} > 1.8$ . Complete removal of DNA can be accomplished using an *in-column* DNase I digestion (page 4).
- **RNA Recovery** - The RNA binding capacity of the Zymo-Spin<sup>™</sup> IC Column is ~10  $\mu$ g.
- **Compatibility** - TRIzol<sup>®</sup>, RNAzol<sup>®</sup>, QIAzol<sup>®</sup>, TriPure<sup>™</sup>, TriSure<sup>™</sup> and similar acid-guanidinium-phenol based reagents can be used in place of TRI Reagent<sup>®</sup>.  
Also, compatible with samples in Trizol<sup>®</sup> that contain chloroform, 1-bromo-3-chloropropane (BCP), or 4-bromobenzic acid (BAN), the aqueous phase of phase-separated samples (page 5), and samples stored in RNAlater<sup>™</sup> (page 5).
- **RNA Storage** - RNA eluted with DNase/RNase-Free Water (provided) can be stored at  $-70$  °C. The addition of RNase inhibitors is highly recommended for prolonged storage.
- **Equipment Needed** - Microcentrifuge.

This product is for research use only and not intended for use in diagnostic procedures.

Follow applicable federal, state, and local regulations for chemical waste disposal.

\*Trademarks of Zymo Research Corporation. Other trademarks: TRI Reagent<sup>®</sup>, TRIzol<sup>®</sup> and RNeasy<sup>®</sup> (Molecular Research Center, Inc.); QIAzol<sup>®</sup> (Qiagen GmbH); TriPure<sup>™</sup> (Roche, Inc.); TriSure<sup>™</sup> (Sigma Ltd.); RNAlater<sup>™</sup> (Ambion, Inc.); Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.).

## ZYMO RESEARCH CORP.

Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (888) 882-9882 • Fax: (949) 266-9452 • info@zymoresearch.com • www.zymoresearch.com

## Product Description



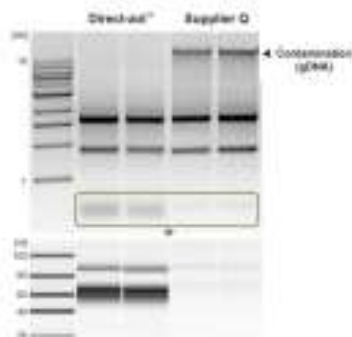
The **Direct-zol™ RNA MicroPrep** provides a streamlined method for the purification of up to 10 µg (per prep) of high-quality RNA **directly** from samples in TRI Reagent® or similar<sup>1</sup>. Total RNA, including small RNAs (17-200 nt), is effectively isolated from a variety of sample sources (cells, tissues, serum, plasma, blood, biological liquids, etc.).

Isolation of RNA by conventional phase separation was shown<sup>2</sup> to selectively enrich for some species of miRNA, leading to bias in downstream analysis. The **Direct-zol™** method assures unbiased recovery of small RNAs including miRNA (see below).

The procedure is easy. Simply apply a prepared sample in TRI Reagent® directly to the **Zymo-Spin™ IC Column** and then spin, wash, and elute the RNA. No phase separation, precipitation, or post-purification steps are necessary. The eluted RNA is high quality and suitable for subsequent molecular manipulation and analysis (including RT-PCR, transcription profiling, hybridization, sequencing etc.).

**The entire procedure typically takes only 7 minutes.**

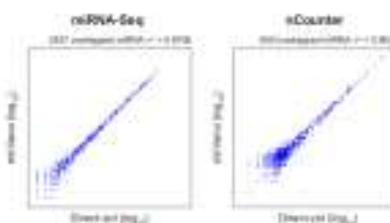
### Efficient Recovery of Small & Large RNAs



(Top) High quality broad size-range DNA-free RNA is purified from human epithelial cells using the Direct-zol™ procedure compared to a preparation from Supplier Q (1% agarose/TAE gel).

(Bottom) Small RNAs are efficiently recovered with the Direct-zol™ procedure. However, this is not the case with Supplier Q's prep (Bioanalyser, Small RNA Chip).

### Non-biased miRNA Recovery



**Micro-RNA isolation using Direct-zol™ RNA kits is not biased.** The data show RNA purified from TRIzol® samples using the Direct-zol™ RNA MiniPrep compared to a method known to be unbiased (miRvana™, Ambion). Micro-RNA analysis was performed using miRNA-seq (MISEq™, Illumina) and direct hybridization assay (sCounter™, Nanosting).

For assistance, please contact Zymo Research Technical Support at 1-888-882-9682 or e-mail [tech@zymoresearch.com](mailto:tech@zymoresearch.com).

#### Note:

<sup>1</sup> TRIzol®, RNAzol®, QIAzol®, Trizol®, Trisure™ and all other acid-guanidinium-phenol reagents.

<sup>2</sup> Kim et al (2012) Molecular Cell 46(5):893-895

ZYMO RESEARCH CORP.

Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (888) 882-9682 • Fax: (949) 266-9452 • [info@zymoresearch.com](mailto:info@zymoresearch.com) • [www.zymoresearch.com](http://www.zymoresearch.com)

Ensure RNA isolation is performed in an RNase-free environment.

#### Notes:

<sup>1</sup> RNAzol<sup>®</sup>, QIAzol<sup>®</sup>, TriPure<sup>™</sup>, TriSure<sup>™</sup> and all other acid-guanidinium-phenol reagents.

<sup>2</sup> Squisher<sup>™</sup> homogenizers, H1001, H1002, H1004.

<sup>3</sup> ZR BeatingBead Lysis Tubes, S8002 and FastPrep<sup>®</sup>-24, S8005.

## Buffer Preparation

- ✓ Add 10 ml or 40 ml ethanol (85-100%) to the 40 ml or 160 ml Direct-zol<sup>™</sup> RNA PreWash concentrate, respectively.
- ✓ Add 48 ml 100% ethanol (52 ml 95% ethanol) to the 12 ml RNA Wash Buffer concentrate or 192 ml 100% ethanol (208 ml 95% ethanol) to the 48 ml RNA Wash Buffer concentrate.

## Protocol

This protocol consists of two parts: (I) Sample Preparation and (II) RNA Purification.

The following guidelines are provided for processing various sample types in TRI Reagent<sup>®</sup>, TRIzol<sup>®</sup> or similar<sup>1</sup> acid-guanidinium-phenol reagents prior to spin column purification of the RNA.

RNA yield can vary with sample types, organism, quality and treatment of the starting material. To ensure complete lysis and homogenization of a sample, use a sufficient amount of TRI Reagent<sup>®</sup> or similar. For detailed processing information, refer to the TRI Reagent<sup>®</sup> product manual (or manufacturer's instructions for the reagent used).

### (I) Sample Preparation

Perform all steps at room temperature and centrifugation at 10,000-16,000 x g for 30 seconds, unless specified.

#### Cells

Lyse cells<sup>\*</sup> directly in a culture dish<sup>\*\*</sup> or resuspend pelleted cells in an appropriate volume (see table below) of TRI Reagent<sup>®</sup> and mix thoroughly. Proceed to RNA Purification (page 4).

Animal	Bacterial	Yeast	Add TRI Reagent <sup>®</sup>
≤ 10 <sup>6</sup>	-	-	100 μl
≤ 10 <sup>8</sup>	≤ 10 <sup>6</sup>	≤ 10 <sup>7</sup>	300 μl

<sup>\*</sup> For cell suspensions, add 3 volumes of TRI Reagent<sup>®</sup> to 1 volume of cell suspension.

<sup>\*\*</sup> For direct lysis in a dish, add 100 μl for each cm<sup>2</sup> of culture surface area.

#### Tissue

Lyse tissue (≤ 5 mg) sample in 300 μl of TRI Reagent<sup>®</sup> and homogenize<sup>2,3</sup>. To remove particulate debris from homogenized tissue, centrifuge and transfer the supernatant into an RNase-free tube. Proceed to RNA Purification (page 4).

Note: Sample should not exceed 10% of the TRI Reagent<sup>®</sup> volume used for homogenization.

#### Tough-to-Lyse Samples (Cells and Tissue)

Tough-to-lyse samples (*i.e.*, gram-positive bacteria, yeast, fungi, animal tissue, plant, etc.) can be homogenized in TRI Reagent<sup>®</sup> with a mortar/pestle, dounce, tissue grinder, or bead beating with a high-speed homogenizer<sup>3</sup> prior to RNA Purification (page 4).

#### ZYMO RESEARCH CORP.

Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (888) 882-9682 • Fax: (949) 266-9452 • info@zymoresearch.com • www.zymoresearch.com

Add 3 volumes TRI Reagent<sup>®</sup> to each liquid sample, (3:1; see table below) and mix thoroughly for 5 minutes. To remove particulate debris, centrifuge and transfer the supernatant into an RNase-free tube. Proceed to RNA Purification (below).

Blood, Plasma, Serum, Semen, CSF, Buffy coat, Body fluids, etc.	Add TRI Reagent <sup>®</sup>
100 $\mu$ l	300 $\mu$ l

### Reaction Clean-Up

For clean-up of enzymatic reactions, add 3 volumes TRI Reagent<sup>®</sup> to each liquid sample, (3:1; see table below) and mix thoroughly. Proceed to RNA Purification (below).

In vitro transcription, DNase I digestion, Labeling reaction, etc.	Add TRI Reagent <sup>®</sup>
100 $\mu$ l	300 $\mu$ l

## (II) RNA Purification

Perform all steps at room temperature and centrifugation at 10,000-16,000 g for 30 seconds, unless specified.

1. Add an equal volume ethanol (95-100%) to a sample lysed in TRI Reagent<sup>®</sup> or similar<sup>1</sup> and mix thoroughly.
2. Transfer the mixture into a Zymo-Spin<sup>™</sup> IC Column<sup>2</sup> in a Collection Tube and centrifuge. Transfer the column into a **new** collection tube and discard the flow-through.
 

Recommended: DNase I treatment (in-column)<sup>3</sup>

(D1) Add 400  $\mu$ l RNA Wash Buffer to the column and centrifuge.

(D2) In an RNase-free tube, add 5  $\mu$ l DNase I (8 U/ $\mu$ l)<sup>4</sup>, 35  $\mu$ l DNA Digestion Buffer and mix<sup>5</sup>. Add the mix directly to the column matrix.

(D3) Incubate at room temperature (20-30°C) for 15 minutes. Proceed to step 3.
3. Add 400  $\mu$ l Direct-zol<sup>™</sup> RNA PreWash<sup>6</sup> to the column and centrifuge. Discard the flow-through and repeat this step.
4. Add 700  $\mu$ l RNA Wash Buffer<sup>6</sup> to the column and centrifuge for 2 minutes to ensure complete removal of the wash buffer. Transfer the column carefully into an RNase-free tube.
5. To elute RNA, add 15  $\mu$ l of DNase/RNase-Free Water directly to the column matrix and centrifuge.

Alternatively, for highly concentrated RNA use 20  $\mu$ l elution.

RNA<sup>6</sup> can be used immediately or stored frozen at  $\leq -70^{\circ}\text{C}$ .

Up to 100  $\mu$ l of biological liquid per prep can be processed without having to reload the spin column.

#### Notes:

<sup>1</sup> TRIzol<sup>®</sup>, RNAzol<sup>®</sup>, QIAzol<sup>®</sup>, TriPure<sup>™</sup>, TriSure<sup>™</sup> and all other acid-guanidinium-phenol reagents.

<sup>2</sup> To process samples >700  $\mu$ l, reload the column and repeat Step 2 (or use a vacuum manifold, centrifuge the column and proceed with the protocol).

<sup>3</sup> Prior to use, reconstitute the lyophilized DNase I as indicated on the vial. Store frozen aliquots.

<sup>4</sup> Mix by gentle inversion.

<sup>5</sup> Unit definition – one unit increases the absorbance of a high molecular weight DNA solution at a rate of 0.001 A<sub>260</sub> units/ml of reaction mixture at 25°C.

<sup>6</sup> Before use, add ethanol to the buffer concentrate (Buffer Preparation, page 3).

<sup>7</sup> For complete removal of PCR (RT) inhibitors from plant, soil and fecal samples, use the Dm5Step<sup>™</sup> PCR Inhibitor Removal Kit, D6030.

#### ZYMO RESEARCH CORP.

Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (888) 882-9682 • Fax: (949) 266-9452 • info@zymoresearch.com • www.zymoresearch.com

## Appendices

### RNA extraction from samples stored in DNA/RNA Shield™

Add 3 volumes TRI Reagent® to each sample homogenate in DNA/RNA Shield™ (3:1) and mix thoroughly. To remove particulate debris, centrifuge (12,000 x g for 1 minute) and transfer the supernatant into an RNase-free tube. Proceed to RNA Purification (page 4).

#### Notes:

<sup>1</sup> For detailed processing information, refer to the TRI Reagent® product manual (or manufacturer's instructions for the reagent used).

<sup>2</sup> Alternatively, the aqueous phase can be processed with the RNA Clean & Concentrator kit, R1015.

<sup>3</sup> Different cells may react differently to centrifugation forces and it is recommended to test the pelleting procedure with non-valuable samples first. Diluting RNAlater™ by 50% with cold PBS reduces solution density allowing for lower forces during cell pelleting.

### RNA purification from aqueous phase after TRI Reagent® extraction

For samples that have already been phase separated in TRI Reagent® or similar<sup>1</sup>, simply transfer the aqueous phase<sup>2</sup> containing RNA into an RNase-free tube. Add an equal volume ethanol (95-100%) to the aqueous phase (1:1) and mix thoroughly. Proceed to RNA Purification (page 4, step 2).

### RNA extraction from samples stored in RNAlater™

#### Cells

Pellet cells<sup>3</sup> at up to 5,000 x g and remove the RNAlater™ (supernatant) prior to RNA extraction. Then lyse the cell pellet in TRI Reagent® (Sample Preparation, page 3).

*Note:* To extract RNA from cells without reagent removal, use 10 volumes of TRI Reagent® per sample volume. Proceed to phase separation and process the aqueous phase. Simply transfer the aqueous phase containing RNA into an RNase-free tube. Then add an equal volume ethanol (95-100%) to the aqueous phase (1:1) and mix thoroughly. Proceed to RNA Purification (page 4, step 2).

#### Tissue

Remove tissue from RNAlater™ using forceps. Eliminate any excess reagent or crystals that may have formed and proceed immediately with extraction in TRI Reagent® (Sample Preparation, page 3).

#### ZYMO RESEARCH CORP.

Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (888) 882-9682 • Fax: (949) 266-9452 • info@zymoresearch.com • www.zymoresearch.com

**Ordering Information**

Product Description	Catalog No.	Kit Size
<b>Direct-zol™ RNA MicroPrep</b> (TRI Reagent® <i>not</i> included)	R2060	50 preps.
	R2062	200 preps.
<b>Direct-zol™ RNA MicroPrep</b> (supplied with TRI Reagent®)	R2061	50 preps.
	R2063	200 preps.

Individual Kit Components	Catalog No.	Amount
<b>TRI Reagent®</b>	R2050-1-50	50 ml
	R2050-1-200	200 ml
<b>Direct-zol™ RNA PreWash</b> (concentrate)	R2050-2-40	40 ml
	R2050-2-160	160 ml
	R1003-3-6	6 ml
<b>RNA Wash Buffer</b> (concentrate)	R1003-3-12	12 ml
	R1003-3-24	24 ml
	R1003-3-48	48 ml
	C1004-50	50
<b>Zymo-Spin™ IC Columns</b>	C1004-250	250
	C1001-50	50
<b>Collection Tubes</b>	C1001-500	500
	C1001-1000	1000
	W1001-1	1 ml
<b>DNase/RNase-Free Water</b>	W1001-4	4 ml
	W1001-6	6 ml
	W1001-10	10 ml
	W1001-30	30 ml
	<b>DNase I</b> (lyophilized) (250 U supplied with DNA Digestion Buffer, 4 ml)	E1010

**ZYMO RESEARCH CORP.**

Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (888) 852-9682 • Fax: (949) 286-9452 • [info@zymoresearch.com](mailto:info@zymoresearch.com) • [www.zymoresearch.com](http://www.zymoresearch.com)