

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**Establecimiento de modelos de epitelio intestinal
en tres dimensiones: herramientas potenciales para
el estudio del cáncer, la inflamación y el análisis
de nuevos fármacos.**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

María Belén Harreguy Alfonso – 165587

Tutores: Mariela Bollati-Fogolín y Romina Pagotto

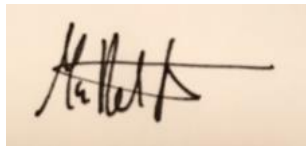
2018

Declaración de autoría

Yo María Belén Harreguy, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba mi trabajo de finalización de carrera;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

María Belén Harreguy 1/3/2018

A handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature is stylized and appears to read 'María Belén Harreguy'.

Dedicatoria

“No hay en nuestras vidas cómplice más hermoso que el abuelo; en él tenemos a un padre, a un maestro y a un amigo”

Leticia Yamashiro

Para mi abuelo.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutoras la Dra. Mariela Bollati-Fogolín y la Dra Romina Pagotto por el apoyo y la ayuda durante la realización de este proyecto.

Además, me gustaría agradecer a todas mis compañeras de la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo por la ayuda, tanto en la ciencia como en la vida, así también como al personal de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del mencionado instituto por su apoyo en este proyecto.

También muchas gracias al tribunal de corrección de tesis, conformado por la Dra Cristina Touriño y la Magíster Inés Tiscornia por dedicar su tiempo a leer y corregir este trabajo.

Finalmente les quiero agradecer a mis amigas, a mis padres y mi hermano y a mis abuelos que me brindaron su amor y apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera académica.

Resumen

El epitelio intestinal desempeña dos funciones cruciales: actúa como barrera previniendo la entrada al organismo de sustancias nocivas y, a su vez, es el responsable de la absorción de nutrientes, agua y electrolitos del lumen intestinal. Alteraciones en la funcionalidad de este tejido pueden llevar al desarrollo de varios desórdenes, procesos inflamatorios, infecciones o cáncer. Por lo tanto, es fundamental contar con modelos apropiados que permitan estudiar los mecanismos involucrados en las diferentes patologías y avanzar en el desarrollo de nuevas terapias y drogas.

Los modelos de cultivo celular tradicionales, en los que se emplean células cultivadas en monocapas, ofrecen un sistema de evaluación simple, rápido, económico, reproducible y contribuyen a reducir el empleo de animales. Sin embargo, al ser sistemas en dos dimensiones, carecen de la capacidad de recrear las interacciones celulares que tienen lugar en un tejido *in vivo*, lo que limita su poder predictivo.

El objetivo general de este proyecto consistió en generar y caracterizar modelos reporteros *in vitro* del epitelio intestinal empleando sistemas de cultivo en tres dimensiones, con el fin de contar con modelos cuya complejidad se asemeje más a los sistemas vivos. Para ello se estableció un protocolo de cultivo en 3D de la línea celular reportera HT-29-NF- κ B-hrGFP y se comparó la capacidad de respuesta de los esferoides generados con la de un cultivo en monocapa (2D).

Como otra alternativa 3D, se planteó el uso de células madre pluripotentes inducidas para su posterior diferenciación a organoides intestinales. En esta parte del trabajo se obtuvieron y caracterizaron células madres pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de fibroblastos murinos de un modelo transgénico reportero para la actividad del factor de transcripción Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B). Los clones obtenidos fueron caracterizados por medio de la evaluación de la expresión de marcadores de pluripotencia y la generación de cuerpos embrionarios.

Los resultados obtenidos demostraron una diferencia en la capacidad de respuesta de la línea celular reportera obteniéndose una menor sensibilidad a un estímulo pro inflamatorio en los esferoides comparado con su contraparte en monocapa. Por otra parte, fue posible obtener iPSC, las cuales expresaron los marcadores de pluripotencia (Nanog, Oct-3/4, Sox2 y SSEA-1) y fueron capaces de generar cuerpos embrionarios. En cuanto a la función reportera, sin embargo, no fue posible detectar una respuesta de activación del NF- κ B frente a un estímulo pro inflamatorio en iPSC, aunque sí en cuerpos embrionarios, lo que sugiere que este factor se encontraría inactivo en los estadios más indiferenciados.

Palabras clave: esferoides, cultivos 3D, células madre, inflamación

Índice

| | | |
|---------|--|----|
| 1- | Introducción | 11 |
| 1.1- | Epitelio Intestinal | 11 |
| 1.2- | Cultivos en tres dimensiones..... | 12 |
| 1.3- | Cultivo de esferoides celulares y línea celular HT-29 | 13 |
| 1.4- | Organoides intestinales y células madre pluripotentes inducidas (iPSC) | 14 |
| 1.5- | El factor de transcripción NF- κ B y su relevancia a nivel intestinal..... | 15 |
| 2- | Objetivos | 18 |
| 3- | Metodología | 19 |
| 3.1- | Reactivos generales | 19 |
| 3.2- | Modelos experimentales: | 19 |
| 3.2.1- | Líneas celulares | 19 |
| 3.2.2- | Fibroblastos murinos | 19 |
| 3.3- | Mantenimiento de la línea celular HT-29-NF- κ B-hrGFP | 20 |
| 3.3.1- | Expansión de la línea celular | 20 |
| 3.3.2- | Tripsinización de células | 20 |
| 3.3.3- | Criopreservación y descongelamiento de células | 20 |
| 3.3.4- | Recuento celular y evaluación de viabilidad con Azul de Tripán | 20 |
| 3.4- | Cultivo de Esferoides..... | 21 |
| 3.4.1. | Metodologías usadas para la obtención de esferoides..... | 21 |
| 3.4.2. | Recuento celular y determinación de la viabilidad por citometría de flujo..... | 21 |
| 3.4.3- | Ensayos reporteros para la activación de NF- κ B en la línea celular HT-29-NF- κ B-hrGFP crecida en 2D y 3D. | 22 |
| 3.5 | Obtención y caracterización de iPSC a partir de fibroblastos murinos..... | 22 |
| 3.5.1.- | Cultivo primario de fibroblastos murinos embrionarios y adultos | 22 |
| 3.5.2.- | Producción de partículas lentivirales | 23 |
| 3.5.3- | Inactivación de MEF por tratamiento con mitomicina C..... | 23 |
| 3.5.4.- | Transducción de MEF y MAF derivados de BALB/c NF- κ B-RE-luciferase..... | 24 |
| 3.5.5- | Selección, amplificación y criopreservación de iPSC | 24 |
| 3.5.6.- | Formación de cuerpos embrionarios..... | 24 |
| 3.5.7- | Caracterización de las iPSC NF- κ B-RE-luciferase obtenidas | 25 |
| 3.6- | Análisis por microscopía de fluorescencia | 27 |
| 3.7- | Análisis por citometría de flujo | 27 |
| 3.8- | Análisis estadístico | 28 |
| 4- | Resultados..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 4.1- Establecimiento del cultivo en 3D de la línea celular reportera HT-29-NF- κ B-hrGFP y evaluación de su respuesta frente a estímulos inflamatorios | 29 |
| 4.1.1- Optimización del cultivo en 3D..... | 29 |
| 4.1.2- Ensayos reporteros para evaluar la activación de NF- κ B en cultivos en 2D y 3D..... | 32 |
| 4.2- Generación y caracterización de iPSC a partir de fibroblastos murinos derivados del ratón transgénico BALB/c NF- κ B-RE-luciferase, para su posterior reprogramación a células del epitelio intestinal..... | 35 |
| 4.2.1- Obtención de las iPSC | 35 |
| 4.2.2. Caracterización de las iPSC | 36 |
| 4.2.3. Generación de cuerpos embrionarios..... | 39 |
| 4.2.4- Ensayos reporteros para evaluar la activación de NF- κ B en iPSC, CE y MEF..... | 41 |
| 5-Discusión | 42 |
| 5.1- Establecimiento del cultivo en 3D de la línea celular reportera HT-29-NF- κ B-hrGFP y evaluación de su respuesta frente a estímulos inflamatorios | 42 |
| 5.2- Generación y caracterización de iPSC a partir de fibroblastos murinos del ratón BALB/c NF- κ B-RE-luciferase, para su posterior reprogramación a células del epitelio intestinal. | 44 |
| 6- Conclusión..... | 48 |
| 7- Referencias | 50 |

Abreviaturas

(v/v): volumen/volumen

(p/v): peso/volumenADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BSA: del inglés, Bovine Serum Albumin

c-Myc: del inglés, Cellular Myc

CE: Cuerpos Embrionarios

CF: Citometria de Flujo

DMEM: del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC50: del inglés, Effective Concentration 50

EDTA: ácido Etilendiamino Tetraacético

FSC: del inglés, Forward-Scattered light

GFP: del inglés, Green Fluorescent Protein

GFP⁺: GFP positiva (s)

IF: Imnuofluorescencia

IP: Ioduro de Propidio

iPSC: del inglés, induced Pluripotent Stem Cell

Klf4: del inglés, Kruppel-like factor 4

KOSR: del ingles, Knock Out Serum Replacement

LIF: del inglés, Leukemya Inhibiting Factor

MAF: del inglés, Mouse Adult Fibroblast

MEF: del inglés, Mouse Embyonic Fibroblast

mESC: del ingles, Mouse Embryonic Stem Cell

NF- κ B: del inglés, Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

Oct-3/4:del inglés, octamer-binding transcription factor 3/4

PCR: del inglés, Polymerase Chain Reaction

P/E: Penicilina/Estreptomicina

PFA: Paraformaldehído

Sox2: del inglés, sex determining region Y-box 2

SSC: del inglés, Side-Scattered light

SFB: Suero fetal bovino

TNF- α : del inglés, Tumor Necrosis Factor – α

1- Introducción

1.1- Epitelio Intestinal

El epitelio intestinal desempeña varias funciones cruciales, entre ellas: actúa como barrera previniendo la entrada al organismo de sustancias nocivas como antígenos, toxinas y microorganismos, es el responsable de la absorción de nutrientes, agua y electrolitos del lumen intestinal e interactúa con la microbiota local contribuyendo a la modulación del sistema inmune y a la defensa frente a microorganismos patógenos. Alteraciones en la funcionalidad de este tejido pueden llevar al desarrollo de varios desórdenes, como procesos inflamatorios, infecciones, diabetes o cáncer (1-4).

Este tejido está constituido por una sola capa de células epiteliales intestinales. El epitelio intestinal consiste en cuatro linajes celulares principales que surgen de un progenitor de células madre pluripotentes. Éstos incluyen los enterocitos, que conforman la mayoría de las células epiteliales intestinales, las células caliciformes que producen mucus, las células enteroendócrinas, que producen hormonas especializadas en el aparato gastrointestinal, y las células de Paneth, que son las principales productoras de péptidos antimicrobianos (**Figura 1**) (5).

Las células madre intestinales primeramente descritas por Spence y colaboradores, están localizadas en la base de las criptas de Lieberkuhn, son las responsables de generar las distintas estirpes celulares que forman el epitelio y de mantener este tejido en constante regeneración; en humanos adultos por ejemplo, el epitelio intestinal se renueva cada 5 días (6-8). Células madres con características similares también se encuentran fuera del intestino delgado, en el colon, que también posee criptas pero con una morfología más aplanada (6). Estas características convierten al intestino en un sistema ideal para el estudio de mecanismos de proliferación celular y diferenciación, patologías como cáncer o procesos inflamatorios. Por ejemplo, en enfermedades como el Síndrome del Colon irritable, estudiar la interacción entre la falla de regeneración del epitelio y su relación con la población de células madre puede ser clave para entender y potencialmente tratar estas enfermedades (8).

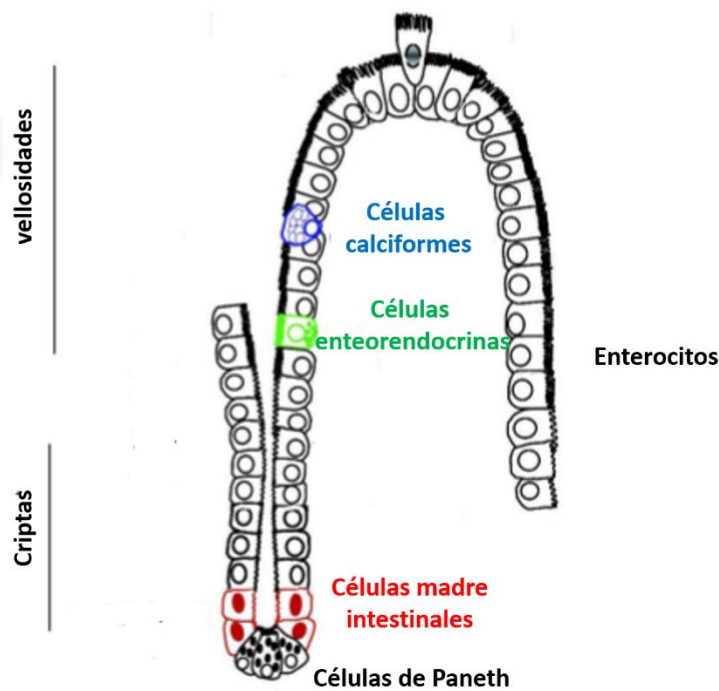


Figura 1. Linajes celulares del epitelio intestinal. El epitelio intestinal consiste de 4 linajes celulares que provienen de un mismo progenitor, las células madre intestinales. Estos incluyen los enterocitos, las células calciformes, las células de Paneth y las enteroendocrinas. Tomado y modificado de Yu et al. WJGP 2012(5).

1.2- Cultivos en tres dimensiones

Si bien los modelos animales han sido y siguen siendo ampliamente utilizados (9,10) y cuentan con la ventaja de reflejar directamente lo que sucede en el organismo vivo, son costosos, consumen mucho tiempo, presentan variabilidad entre individuos y están sujetos a debates éticos.

Por su parte, los modelos *in vitro* tradicionales que emplean el cultivo de células en dos dimensiones (2D), constituyen en muchos casos una alternativa al uso de animales. Son herramientas económicas y reproducibles, que permiten obtener resultados en un tiempo reducido, como lo demuestran los numerosos trabajos realizados utilizando líneas celulares tumorales derivadas del epitelio intestinal (11-13). Sin embargo, el crecimiento de células en 2D no permite recrear la complejidad estructural ni las interacciones celulares que tienen lugar en un organismo vivo, limitando su poder predictivo (14,15).

En cambio, los cultivos en tres dimensiones (3D), intentan recrear la arquitectura espacial, las funciones mecánicas y la diversidad celular propias del órgano, generando un microambiente fisiológicamente más relevante, lo que los convierte en herramientas más apropiadas a la hora de simular sistemas celulares complejos. Al respecto, estudios recientes basados en cultivos 3D han descrito que las células crecidas bajo este sistema poseen características morfológicas y fisiológicas más parecidas a las células *in vivo* (16-18).

La implementación de modelos 3D pretende reducir la brecha entre los cultivos celulares en 2D y el tejido vivo, mejorando la correlación de los resultados obtenidos en estudios *in vitro* con los *in vivo*. Dentro de las metodologías de cultivo en 3D, el uso de células agregadas en

esferoides multicelulares es una técnica sencilla y útil. Se han desarrollado varios métodos a lo largo de los años para generar esferoides, como el crecimiento de esferoides sobre una matriz, la integración de esferoides en una matriz, placas microestructuradas, placas de baja adherencia, gota colgante, levitación magnética e impresión 3D magnética (19).

Es importante mencionar que en la actualidad la industria farmacéutica enfrenta una crisis de productividad. A pesar de la creciente inversión en investigación y desarrollo farmacéutico, el desarrollo exitoso de nuevos medicamentos se está desacelerando. Este fenómeno se ha observado en los Estados Unidos, donde la tasa de presentación de nuevas aplicaciones de medicamentos ha mostrado una tendencia descendente en la última década. No es sorprendente que la inversión necesaria por cada nueva droga exitosa haya aumentado a un estimado de US\$ 800 millones o más. Este costo es impulsado por la alta tasa de fracaso clínico, que se estima en 70% -90% de los candidatos. El creciente porcentaje de fracasos clínicos en etapa tardía, ahora ~ 50% de los compuestos probados en ensayos de fase 3, es de particular preocupación (20). Por este motivo, fallar al comienzo de las fases pre clínicas, permite que el costo de las moléculas abandonadas en el cribado permanezca relativamente bajo, es decir, cuanto más temprano esté el proceso de desarrollo y se rechace un compuesto, menor impacto económico tendrá para la compañía que financia su desarrollo. Por lo tanto, es necesario mejorar los métodos de testeo *in vitro* basados en células para una predicción más informada de la eficacia y seguridad de los fármacos candidatos, y de ese modo descartar aquellos compuestos que no cumplan ciertos requisitos, mientras se priorizan los candidatos prometedores (21).

1.3- Cultivo de esferoides celulares y línea celular HT-29

Los esferoides celulares son agregados heterogéneos de células proliferantes, quiescentes y necróticas, que mantienen una arquitectura tridimensional y funciones tejido-específicas (22). Son un modelo atractivo para el estudio de tumores ya que recapitulan las características de las células tumorales *in vivo*, en lo que respecta a su cinética de crecimiento, heterogeneidad celular, vías de señalización y expresión génica (23,24).

Las células de tumores en crecimiento están expuestas a condiciones microambientales variables debido a un suministro vascular no homogéneo, lo que conduce al desarrollo de regiones localizadas en tumores con baja concentración de oxígeno, baja concentración de glucosa y pH ácido extracelular debido a la acumulación de productos del metabolismo como el ácido láctico. Como resultado, las células en estas regiones están expuestas a diferentes niveles de hipoxia, anoxia y acidosis. Los esferoides multicelulares derivados de líneas de cáncer presentan una morfología similar a los tumores sólidos que conduce a limitaciones de difusión para moléculas pequeñas como la glucosa y el oxígeno, creando así subpoblaciones heterogéneas de células de proliferación activa, así como células quiescentes, hipóxicas y necróticas (25).

Entre los modelos de epitelio intestinal humano más ampliamente usados se encuentra la línea celular HT-29. Las ventajas que presenta su uso es que son fáciles de obtener y mantener, tienen alta viabilidad y alta tasa metabólica. Además, su grado de diferenciación y polarización puede ser modulado *in vitro* dependiendo de las condiciones de cultivo. En presencia de glucosa 25 mM, las células crecen en monocapa no polarizada; mientras que cuando los carbohidratos se agotan, comienzan a diferenciarse y a adquirir las características

morfológicas de las células epiteliales absorbentes o las células caliciformes organizadas en una monocapa polarizada(26).

Teniendo en cuenta que la línea antes mencionada proviene de un adenocarcinoma colorectal, y que la capacidad de formar esferoides es una característica común de células cancerosas, se plantea como una promisoriosa posibilidad el uso de la misma para establecer un modelo 3D por generación de esferoides celulares. Estos modelos permitirían estudiar con una mejor aproximación que los sistemas en 2D distintos aspectos de la fisiología del cáncer, como pueden ser procesos inflamatorios, estrés oxidativo, metabolismo celular e hipoxia. Incluso considerando las similitudes metabólicas de tumores *in vivo* y esferoides celulares, estos últimos podrían emplearse para estudios de cribado de alto impacto de nuevas drogas antitumorales.

1.4- Organoides intestinales y células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

Los organoides de epitelio intestinal son estructuras multicelulares tridimensionales que recrean la morfología y fisiología de criptas y vellosidades del epitelio intestinal adulto. En el año 2009, Sato y col. (27) describieron por primera vez los cultivos tridimensionales de organoides intestinales a partir del cultivo de criptas y células madre intestinales.

Dado que poseen la capacidad regenerativa del epitelio intestinal y pueden dar origen a los distintos tipos celulares del epitelio, los organoides intestinales constituyen un modelo muy apropiado para el estudio de procesos como diferenciación celular, función de transporte, interacciones huésped-hospedador, patologías intestinales e incluso terapia regenerativa (28-30). Cuentan con la ventaja de ser fáciles de establecer y, a diferencia de las líneas celulares, como su crecimiento depende de la presencia de células madre intestinales, no necesitan inmortalizarse, permitiendo contar con un modelo más cercano a la fisiología del tejido *in vivo*.

Las células madre se definen en base a 2 características principales, la capacidad de autorrenovarse y la capacidad de diferenciarse. Es decir, que pueden experimentar divisiones celulares en las que al menos una de las células hijas es nuevamente una célula madre y tienen el poder de dar lugar a una progenie diferenciada.

Todos los mamíferos se derivan de una sola célula madre, la célula madre totipotente. Durante la embriogénesis, las células madre experimentan una especificación que da lugar primero al endodermo extraembrionario o a las células de la masa celular interna (MCI), que son pluripotentes y ya no totipotentes, ya que no pueden dar lugar a tipos de células extraembrionarias. Luego, las células en el ICM se diferencian secuencialmente a células epiblasto, ectodermo primitivo, seguido de la creación de ectodermo definitivo, endodermo definitivo y mesodermo y finalmente células madre específicas de tejido. Con cada paso adicional de diferenciación, las células se vuelven cada vez más limitadas en su capacidad de diferenciación, de modo que las células madre presentes en los tejidos de las tres capas germinales solo pueden generar células de ese tejido pero ya no las células de otros tejidos dentro de la misma capa germinal o las otras capas germinales. Por lo tanto, estas células se denominan multipotentes(31).

Debido a su capacidad de diferenciarse en la tres capas germinales, el campo de las células madre pluripotentes es ampliamente estudiado en la medicina por sus posibles aplicaciones en las terapias regenerativas.

Las células madre pluripotentes inducidas o iPSC (por sus siglas en inglés: induced Pluripotent Stem Cell) surgieron en el 2006 como una alternativa al uso de células madre embrionarias humanas, cuyo uso aún está sujeto a debate ético. El grupo de Takahashi y Yamanaka fue el primero que generó iPSC a partir de fibroblastos murinos por medio de la expresión de 4 factores de transcripción característicos del estado de pluripotencialidad: *octamer-binding transcription factor 3 y 4*(Oct-3/4), *Sex determining region Y-box 2* (Sox2), *cellular Myc* (c-Myc) y *Kruppel-like factor 4* (Klf4). De esta manera, células somáticas lograron ser reprogramadas a un estado similar al embrionario, con un perfil de expresión génica, modificaciones epigenéticas y tasas de proliferación similares a las de células madre embrionarias (32) .

Las iPSC pueden ser diferenciadas a tejido intestinal a través de una serie de pasos que imitan los principales procesos de su desarrollo, incluyendo la diferenciación a endodermo, la morfogénesis intestinal, el desarrollo, el crecimiento y la homeostasis. Cada uno de estos pasos está regulado por la expresión de factores característicos que deben ser suministrados a las iPSC a lo largo de su proceso de diferenciación (33). El proceso de diferenciación requiere del cultivo de iPSC con varios factores de crecimiento durante varios días. Los factores implicados involucran principalmente la Activina A para inducir la diferenciación a endodermo, *Fibroblast growth factor 4* (FGF4) y *Wnt family member 3A* (Wnt3a) para inducir la diferenciación a intestino y la morfogénesis y finalmente el cultivo en una matriz como matrigel con R-spondina1, Nogina y *Epidermal Growth Factor* (EGF)para promover el crecimiento intestinal y la polarización (34).

Si bien el cultivo de organoides intestinales obtenidos a partir del propio órgano se usa rutinariamente para estudios relacionados al epitelio intestinal, la técnica tiene sus limitaciones. Por ejemplo, no son fáciles de manipular genéticamente y es difícil generar cantidades suficientes para realizar estudios de cribado (35). Es por esta razón que la generación de organoides a partir de iPSC surge como una posible alternativa (36), ya que cuenta con la ventaja de que se pueden obtener mayores cantidades de organoides, poblaciones más homogéneas y facilita el uso de técnicas que introduzcan modificaciones genéticas de interés.

1.5- El factor de transcripción NF- κ B y su relevancia a nivel intestinal

El factor de transcripción NF- κ B es un regulador de respuestas inflamatorias e inmunes en la mayoría de los sistemas del organismo. La familia de factores de transcripción de NF- κ B consiste de cinco miembros en células de mamífero: p65 (RELA), REL, RELB, p50 y p52, los cuales pueden formar homodímeros o heterodímeros (37). El factor inactivo se localiza en el citosol formando un complejo con la proteína inhibitoria I κ B. En respuesta a ciertos estímulos, la proteína I κ B es fosforilada por la I κ B quinasa (IKK) y degradada, permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo e induciendo la transcripción de genes específicos vinculados con citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (**Figura 2**) (38).

En el intestino, la señalización NF- κ B tiene diversas funciones que gobiernan las respuestas inmunes protectoras y destructivas. Estos efectos pueden ser beneficiosos o dañinos dependiendo del tipo de respuesta celular involucrada y el nivel de activación de NF- κ B, entre otras cosas. Mientras que la activación excesiva de NF- κ B en células inmunes ha sido identificada como uno de los principales contribuyentes de la inflamación intestinal, estudios recientes han indicado que la señalización NF- κ B en el epitelio intestinal sería necesaria para mantener la homeostasis del órgano (37-39).

Se ha reportado que NF- κ B juega un papel dual en la inflamación crónica: por un lado, la activación NF- κ B induce inflamación y daño tisular, pero por otro lado la inhibición de la señalización NF- κ B también puede alterar la homeostasis inmune, desencadenando inflamación y causando enfermedades. Se encontró que NF- κ B se activa en las mucosas intestinales de pacientes con síndrome de Colon Irritable, mientras que la inhibición farmacológica de NF- κ B disminuye la inflamación intestinal en modelos de colitis ulcerosa en ratones. Además, la administración de oligonucleótidos antisentido a p65 o un péptido que se une a NEMO, modulador esencial NF-kappa-B (NEMO) también conocido como inhibidor de la subunidad gamma kappa-B del factor nuclear gamma (IKK- γ), redujo la gravedad de la inflamación de colon en modelos murinos inducidos químicamente y en el modelo de colitis ulcerosa.

Por otro lado, los ratones que carecen de NEMO específicamente en células epiteliales intestinales desarrollaron colitis crónica severa caracterizada por ulceración epitelial, expresión elevada de mediadores proinflamatorios e infiltración de células inmunes(40).

Sin embargo, los mecanismos que determinan si la activación de NF- κ B tendrá consecuencias beneficiosas o patogénicas son mayormente desconocidos(40). Por este motivo sería muy relevante contar con un modelo en 3D intestinal reportero para NF- κ B que nos permita estudiar y entender los mecanismos moleculares y celulares por los cuales NF- κ B ejerce sus funciones opuestas y la función de esta vía en varias patologías intestinales y el cáncer.

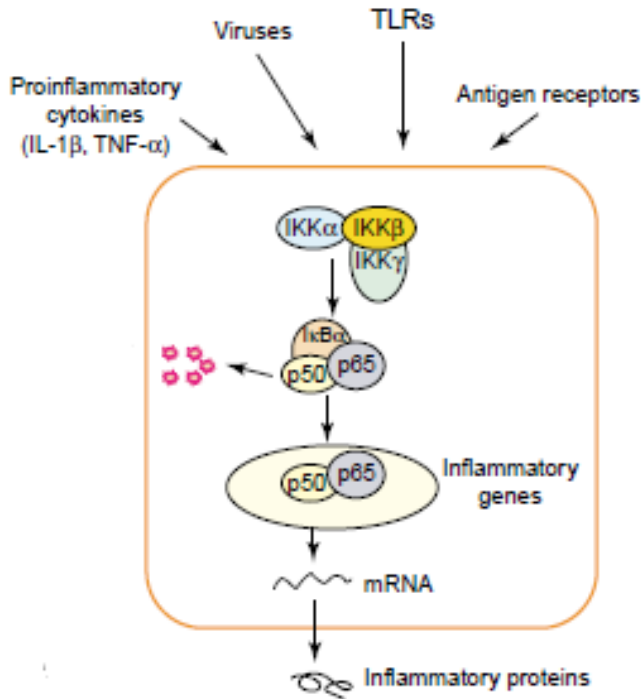


Figura 2. Vía de activación canónica de NF-κB. Activación del factor de activación NF-κB frente a un estímulo pro inflamatorio. Extraído de Bonizzini y col, 2004. (37)

En el intestino sano, el sistema inmunitario de la mucosa asegura el equilibrio entre los mediadores pro y antiinflamatorios y, por lo tanto, permite una defensa eficaz contra los patógenos luminales al mismo tiempo que previene una reacción inmune contra la enorme cantidad de antígenos inofensivos (componentes de alimentos o bacterias no patógenas). En ambas entidades del Síndrome del Colon Irritable (enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa), este equilibrio inmunológico se ve gravemente afectado y se desplaza hacia un estado proinflamatorio. La inflamación crónica de la mucosa en esta enfermedad es causada por la hiperactivación de las células inmunes efectoras, que producen altos niveles de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (41). En relación al cáncer, si bien observaciones han sugerido un papel de la activación inapropiada de NF-κB en la proliferación celular, la transformación y el desarrollo de tumores, también se ha propuesto que la activación de NF-κB en las células inmunes puede contribuir a la inmunidad antitumoral (42).

Todos estos motivos indican que NF-κB es un objetivo ideal para el desarrollo de nuevas terapias. Por lo tanto es importante contar con herramientas para comprender la patogenia de las enfermedades inflamatorias, autoinmunes y neoplásicas, y poder identificar nuevos fármacos que inhiban la activación de NF-κB. Estos estudios pueden ser realizados en un modelo reportero para la activación de esta vía como se propone en el presente trabajo.

2- Objetivos

El objetivo general de este proyecto consistió en generar y caracterizar modelos *in vitro* reporteros para la activación del factor de transcripción NF- κ B del epitelio intestinal cuya complejidad se asemeje más a los sistemas vivos. Para ello se optó por desarrollar técnicas que involucren directa o indirectamente el uso de los cultivos en 3D.

- OBJETIVO 1: Establecimiento y caracterización de esferoides a partir de la línea celular HT-29-NF- κ B-hrGFP, derivada de un adenocarcinoma humano colorrectal y reportera para la activación del factor de transcripción NF- κ B.

Objetivos específicos:

- Optimizar el protocolo de generación de esferoides celulares
 - Comparar la actividad reportera de los esferoides obtenidos con un sistema tradicional en 2D
- OBJETIVO 2: Generar y caracterizar iPSC a partir de fibroblastos murinos derivados de los ratones transgénicos BALB/c NF- κ B-RE-luciferase, para su posterior reprogramación a células del epitelio intestinal.

Objetivos específicos:

- Generar iPSC por reprogramación de fibroblastos murinos empleando el plásmido STEMCCA y un vector lentiviral
- Evaluar la pluripotencialidad de los clones iPSC obtenidos mediante el análisis de expresión de genes de pluripotencia y la formación de cuerpos embrionarios
- Evaluar la activación de NF- κ B en las iPSC generadas

3- Metodología

3.1- Reactivos generales

Las sales que se utilizaron para la preparación de soluciones, Tripsina/EDTA, Penicilina/Estreptomicina (P/S), Tampón fosfato salino sin calcio ni magnesio (PBS), Dimetilsulfóxido (DMSO), Paraformaldehído (PFA), Tween 20, Seroalbúmina bovina (BSA), Ioduro de propidio (IP), el reactivo Hoechst 33342, colagenasa, DNAsa I, gelatina para cultivo, Beta-mercaptoetanol y la citoquina recombinante humana Factor de Necrosis Tumoral – α (TNF- α) fueron adquiridos a Sigma (Argentina)

El LIF, del inglés *Leukemya Inhibitory Factor* se obtuvo a partir de medio de cultivo condicionado de células HEK productoras de LIF, cedidas por el Dr Werner Müller, The University of Manchester.

El medio de cultivo para células DMEM (del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium), RPMI 1640 (del inglés, Roswell Park Memorial Institut), el Suero Fetal Bovino (SFB), los aminoácidos no esenciales y el Knock Out Serum Replacement (KOSR) se adquirieron de Life Technologies (Estados Unidos), al igual que el reactivo transfectante Lipofectamine 2000. El material plástico estéril utilizado en cultivo se obtuvo de Corning, las placas de 96 pocillos negras para medición de luciferasa y el azul de tripán, también se obtuvieron de SIGMA. El kit para medición de Luciferasa (*Luciferase Assay System*) se obtuvo de PROMEGA (Estados Unidos).

3.2- Modelos experimentales:

3.2.1- Líneas celulares

La línea celular HT-29-NF- κ B-hrGFP, derivada de un adenocarcinoma humano colorrectal y reportera para la activación del factor de transcripción NF- κ B, fue previamente desarrollada y establecida en la Unidad de Biología Celular (43). La misma fue cultivada a 37°C en una atmósfera húmeda controlada con 5% de CO₂. Como medio de cultivo se utilizó DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB (medio completo).

La línea celular HEK 293T (ATCC® CRL-11268), derivada de células de riñón embrionarias humanas fue utilizada para la producción de partículas lentivirales. La misma fue cultivada a 37°C en una atmósfera húmeda controlada con 5% de CO₂. Como medio de cultivo se utilizó DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB (medio completo).

3.2.2- Fibroblastos murinos

Los fibroblastos murinos se obtuvieron del ratón transgénico BALB/c NF- κ B-RE-luciferase el cual expresa el gen de la luciferasa bajo tres elementos de respuesta a NF- κ B(44). Los protocolos con animales llevados a cabo fueron aprobados por el comité de ética del IP Mont (Aval CEUA N° de Reg.006-16: Establecimiento de cultivos primarios de diferentes orígenes).

3.3. Mantenimiento de la línea celular HT-29-NF- κ B-hrGFP

3.3.1- Expansión de la línea celular

La expansión de la población celular se llevó a cabo sembrando las células en frascos de 25 o 75 cm² en medio completo, renovándolo cada 4 días. Antes de llegar a confluencia, 1 vez por semana, las células se despegaron de las superficies de cultivo con tripsina y se pasaron a un nuevo frasco. Cada lote de células se mantuvo en cultivo durante un período de tiempo limitado (3 meses). Pasado este período, se descongeló un nuevo criotubo del banco celular de trabajo para la propagación celular y la posterior utilización de las células en los diferentes ensayos.

3.3.2- Tripsinización de células

Las células fueron separadas de la superficie de cultivo mediante un tratamiento con tripsina (tripsinización). Para ello, se aspiró el medio de cultivo y se lavó la monocapa celular con PBS estéril. Posteriormente, se agregó 0,5 a 1 mL de solución de tripsina/EDTA y la misma se dejó actuar durante 3 min a 37°C. Se verificó mediante visualización al microscopio la separación de las células de la superficie de cultivo y se agregó medio completo para inactivar la tripsina. Una alícuota de la suspensión celular se utilizó para el recuento en cámara de Neubauer, previa tinción con azul de tripán 0,5% p/v, y se eligió la densidad de siembra apropiada según la superficie de cultivo a utilizar.

3.3.3- Criopreservación y descongelamiento de células

Para la criopreservación, se tripsinizaron células en fase de crecimiento exponencial, se contaron las células y se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en el medio de congelación (10 % v/v DMSO y 90 % v/v SFB) a razón de 3×10^6 células en 1,5 mL. Los criotubos fueron almacenados a -80°C utilizando un sistema de enfriamiento progresivo de 1°C por minuto (Nalgene) y a las 24h se transfirieron a nitrógeno líquido.

El descongelamiento de cada lote de células se llevó a cabo en forma rápida, para maximizar la supervivencia celular. Cada tres meses se retiró un criotubo del tanque de nitrógeno líquido y se lo llevó a un baño a 37 °C durante aproximadamente 2 min, agitándolo hasta descongelamiento total de su contenido. Posteriormente, la suspensión celular se transfirió a un tubo falcon conteniendo 10 mL de medio de mantenimiento, termostatizado a 37°C y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 mL de medio de mantenimiento, se realizó el recuento y la determinación de la viabilidad de las células recuperadas. Finalmente, las células fueron sembradas en frascos de 25 o 75 cm², según la demanda de células a utilizar en los diferentes ensayos.

3.3.4- Recuento celular y evaluación de viabilidad con Azul de Tripán

Se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer empleando diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular de la muestra. La concentración de células viables se determinó empleando el método de exclusión con Azul de Tripán en el cual sólo las células muertas incorporan el colorante ya que está comprometida la integridad de la membrana plasmática. Las muestras fueron incubadas con una solución de Azul de Tripán 0,5 % p/v en PBS y sembradas en la cámara.

3.4- Cultivo de Esferoides

3.4.1. Metodologías usadas para la obtención de esferoides

Para la generación de esferoides se utilizaron distintas densidades celulares iniciales: 3500, 7000, 15000, 30000 y 60000 células/pocillo empleando dos métodos: el de crecimiento en placas de baja adherencia (MBA) y el método de la gota colgante (MGC).

En el MBA, los pozos de una placa de 96 pocillos fueron cubiertos con 50 µl de agarosa 1,5% p/v estéril, previo al sembrado de las células, con el objeto de reducir la adherencia de la placa. En el método MGC, las células fueron sembradas en gotas de 25 µl sobre la tapa de una placa de 96 pocillos. Posteriormente, la tapa fue invertida sobre la placa y las gotas fueron incubadas durante 48 h luego de las cuales se transfirieron a los pocillos (previamente tratados con agarosa) en un volumen final de 200 µl. En todos los casos las células fueron incubadas a 37°C con 5% CO₂.

Los esferoides se mantuvieron en cultivo sin realizar cambio de medio durante 4 días, luego de los cuales fueron utilizados o se les renovó el medio para utilizarlos a los 7 días.

Los esferoides fueron observados al microscopio y fotografiados para efectuar análisis de tamaño y circularidad. El análisis de imágenes fue realizado con el *software* Image J. La circularidad se calculó como el cociente de las medidas del diámetro mayor y el diámetro menor del esferoide, siendo el valor igual 1 correspondiente a un círculo perfecto.

El método MBA fue el utilizado para los subsiguientes estudios.

3.4.2. Recuento celular y determinación de la viabilidad por citometría de flujo

Los esferoides fueron removidos de la placa de cultivo e incubados con 50 µl de tripsina por 10 min para su disgregación. En los casos en que se utilizaron células cultivadas en un sistema 2D (monocapa tradicional), se les agregó 25 µl de tripsina por pocillo. En ambos casos, luego de inactivar la tripsina con medio completo, las células fueron lavadas y centrifugadas durante 5 min a 260 g.

Para el recuento celular, las células fueron resuspendidas en el volumen apropiado de PBS BSA 1% p/v y analizadas con el citómetro analítico BD Accuri™ C6 (BD biosciences), el cual permite realizar recuentos absolutos directos. Para ello se determinó el número de eventos adquiridos en 100µl de muestra y en base a ese dato se calculó el número total de células por mL de muestra.

La viabilidad celular también se evaluó por citometría de flujo (ver 3.7.) por exclusión del intercalante de ADN IP. Para ello, se agregó a la muestra una solución de IP 250 µg/mL en una relación 1/100 v/v, justo antes del momento de la adquisición.

3.4.3- Ensayos reporteros para la activación de NF-κB en la línea celular HT-29-NF-κB-hrGFP crecida en 2D y 3D.

Las células fueron sembradas en dos densidades diferentes (1.5×10^4 y 3×10^4 cél/pocillo) utilizando el MBA y la monocapa tradicional (2D). Al cuarto día de siembra (una vez formados los esferoides en el caso del cultivo en 3D) se agregó el estímulo pro inflamatorio, TNF-α en distintas concentraciones (desde 0,01 a 1000 ng/mL). Se evaluaron dos tiempos diferentes de estimulación: 24 h, correspondiente al tiempo óptimo de estimulación estipulado para cultivos en 2D (43) y 72 h para asegurarnos de que la respuesta obtenida fuera la máxima posible. Finalizada la incubación, se evaluó la activación de la vía NF-κB por medio de la producción de la proteína verde fluorescente (GFP). Se determinó por citometría de flujo el porcentaje de células GFP positivas y esos datos se utilizaron para obtener una curva dosis respuesta. Utilizando la aproximación a la ecuación de Hill, se estimó el parámetro EC50 (del inglés, Effective Concentration 50), definido como la concentración del compuesto a la cual se obtiene un 50% de la respuesta máxima, para fines comparativos.

3.5 Obtención y caracterización de iPSC a partir de fibroblastos murinos

3.5.1.- Cultivo primario de fibroblastos murinos embrionarios y adultos

Para la obtención de fibroblastos murinos embrionarios (MEF), se sacrificó una hembra preñada BALB/c NF-κB-RE-luciferase, entre los días 13.5 y 14.5 de preñez y se extrajeron los cuernos uterinos. Los mismos fueron lavados rápidamente en etanol 70% v/v y posteriormente colocados en PBS. Bajo condiciones de esterilidad, se procedió a separar cada embrión de la placenta, el saco vitelino y se removieron los órganos rojos y la cabeza. Luego el tejido fue lavado nuevamente con PBS y con la ayuda de un bisturí, se cortó en pequeños trozos hasta que fuera posible pipetear el material disgregado.

El tejido fue transferido a un tubo Falcon conteniendo 1 mL de 0.05% tripsina/EDTA y 200 KU/embrión de Dnasa I. Los tubos fueron incubados por 15 min a 37°C deteniendo la incubación cada 5 minutos para disgregar -con pipeta. Una vez transcurrido este tiempo, la tripsina fue inactivada con 1 volumen de medio MEF (DMEM, 10% v/v SFB, 1X Penicilina/Estreptomicina) y los tubos fueron centrifugados a 300 g durante 5 minutos.

Luego de la centrifugación se procedió a resuspender las células en medio MEF y sembrar entre 3 y 4 embriones por botella T-150 cm² previamente tratadas con gelatina 0.2%. Una vez que las células llegaron a un 80% de confluencia, las mismas fueron levantadas con tripsina para su criopreservación en tanque de nitrógeno o sembradas para su uso como capa alimentadora y/o la generación de iPSC.

Para la obtención de los fibroblastos murinos adultos (MAF) ratones de 6-8 semanas de edad fueron sacrificados por asfixia con CO₂. Se recuperaron las puntas de cola y trozos de oreja, se cortaron en trozos de 1 cm los cuales fueron colocados en placas de cultivo e incubadas en

medio MEF por 5 días. Las células que migraron fuera del explanto (fibroblastos) fueron transferidas a nuevas placas y mantenidas en medio MEF hasta que alcanzaron el 80% de confluencia, momento en el que fueron congelados para su posterior uso.

3.5.2.- Producción de partículas lentivirales

Para la obtención de partículas lentivirales se utilizó un sistema de tercera generación, en la que se emplean 3 plásmidos por separados para obtener las partículas virales y el plásmido de interés (*backbone*). En este caso se utilizaron los plásmidos Pspax2 (Addgene#12259) para el empaquetamiento, pMD2G para la envoltura y los plásmidos m-STEMCCA m-cherry y/o m-STEMCCA c-myc como *backbone* (cedidos gentilmente por Gustavo Mostoslavsky, Boston University and Boston Medical Center, Estados Unidos) (45). Se sembraron 1×10^6 células HEK293T en DMEM 10% (v/v) SFB en una placa de 6 pocillos 24 h antes de la transfección. Transcurridas 24 h se realizó la transfección usando el método de lipofección (Lipofectamine 2000), de acuerdo a los datos especificados por el fabricante. La concentración total de ADN utilizada para cada pocillo fue de 2,5 μg , de los cuales 1,51 μg correspondieron al *backbone*; 0,6 μg de Pspax2 y 0,39 μg de pMD2G.

Las células se incubaron durante toda la noche en estufa a 37°C con 5% CO₂. Al día siguiente se descartó el medio de cultivo y se renovó por DMEM suplementado con 10% (v/v) SFB. A las 24 h se recuperó el medio de cultivo en un tubo de 50 mL (fracción que contiene partículas lentivirales) y se renovó el medio nuevamente. A las 24 h se volvió a recuperar este medio y se unió a la fracción del día anterior. Posteriormente este medio conteniendo las partículas lentivirales fue centrifugado, filtrado por una malla de 45 μm y almacenado en alícuotas en freezer -80 hasta su uso posterior.

Para realizar la titulación viral, se sembraron 7×10^4 células HEK 293T por pocillo en una placa de 48 pocillos y se incubaron por 48 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron incubadas con distintas diluciones de las partículas virales conteniendo el plásmido m-STEMMCA m-cherry (1/10; 1/100; 1/1000; 1/10000) en presencia de polibreno (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco sin polibreno. Una vez transcurridas 72 h de incubación, se analizó el porcentaje de células m-cherry positivas por citometría de flujo, utilizando el equipo BD FACSAria Fusion (BD Biosciences) y los láseres de 488 nm y 561nm. Teniendo en cuenta que se recomienda utilizar un título que produzca entre 1 – 20 % de células transducidas, se decidió utilizar una dilución de 1/10 del stock de partículas lentivirales para la reprogramación de fibroblastos, la cual produjo un 8% de células positivas para m-cherry.

Para la manipulación de las partículas lentivirales se trabajó con cubre tónicas descartables y doble guante en una cabina de seguridad biológica tipo 2. Tanto la cabina como los materiales usados fueron descontaminados con Virkon[®] S (Bayer) al 1% p/v luego de su uso, y se dejó un ciclo de 30 minutos de UV antes del siguiente usuario. Todos los materiales que estuvieron en contacto con las partículas lentivirales fueron inactivados durante al menos 48 h con una solución de Virkon[®] S 1% p/v.

3.5.3- Inactivación de MEF por tratamiento con mitomicina C

Con el fin de generar un banco de células alimentadoras de iPSC, se sembraron MEFs en botellas de cultivo previamente gelatinizadas (gelatina 0.2% p/v). Una vez alcanzado el 90% de confluencia se reemplazó el medio de cultivo de fibroblastos por medio MEF con mitomicina C a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó por 2-3 h en estufa a 37°C con

5% CO₂. Transcurrido este tiempo, se realizaron varios lavados con PBS, las células se resuspendieron en medio de congelación (DMSO 10% v/v SFB 90% v/v) y se guardaron en nitrógeno líquido hasta su futuro uso para el cultivo de iPSC.

3.5.4.- Transducción de MEF y MAF derivados de BALB/c NF-κB-RE-luciferase

Se sembraron MEF y MAF derivados de BALB/c NF-κB-RE-luciferase a una concentración de 1×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos previamente gelatinizada. Al día siguiente, las células fueron transducidas con las partículas virales portando el plásmido m-STEMCCA c-myc (45) (dil 1/10) en medio MEF suplementado con polibreno en una concentración final de 8 µg/mL. Las placas se centrifugaron a 700 g por 45 minutos y se incubaron durante toda la noche en estufa a 37°C con 5% CO₂.

Al día siguiente se reemplazó el medio de cultivo por medio completo para iPSC (DMEM, 15% v/v KOSR, 1 x Penicilina-Estreptomicina, 0.1 mM Betamercaptoetanol, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 1 mL de medio condicionado con LIF). El medio de cultivo fue renovado cada 2 días. Para el caso de los MAF, luego de transcurrida 1 semana, las células fueron despegadas con tripsina y sembradas sobre una capa de MEF mitomicinados (capa alimentadora). Luego de aproximadamente 10 días se comenzaron a observar colonias. El medio se cambió cada 48 h hasta la obtención de las iPSC.

3.5.5- Selección, amplificación y criopreservación de iPSC

El día anterior a la selección de colonias iPSC para su amplificación, se preparó una placa de 96 pocillos previamente gelatinizada con MEF mitomicinados para usar como capa alimentadora y se incubó en estufa durante toda la noche. El procedimiento de aislamiento de colonias se realizó fuera del flujo laminar, para lo que fue necesario desinfectar la zona de trabajo con etanol 70%, evitar corrientes de aire y extremar medidas de protección (usar cofia, guantes y barbijo) para evitar contaminaciones.

Las placas conteniendo las colonias de iPSC fueron retiradas de la estufa y los pocillos lavados con PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺. Bajo el microscopio se aislaron manualmente las colonias cuyo tamaño ocupaba un campo 10 x del microscopio con la ayuda de una aguja y un tip de 20 µL. Una vez levantadas, cada colonia fue disgregada con 15 µl de tripsina, resuspendida en 200 µL medio iPSC y sembrada en un pocillo de una placa de 96 pocillos conteniendo los MEF mitomicinados.

El medio de cultivo fue cambiado diariamente y una vez que las colonias crecieron, pero antes de que empezaran a diferenciarse, las mismas fueron levantadas con tripsina y transferidas a una placa de cultivo de mayor superficie, conteniendo la capa alimentadora de MEF. Una vez alcanzada la amplificación a un pocillo de una placa de 6 pozos, se procedió a la criopreservación de los clones. Para ello, las células fueron despegadas con 0.05% p/v tripsina/EDTA, neutralizadas con medio, centrifugadas y resuspendidas en medio de congelación (90% v/v SFB + 10% v/v DMSO). Por cada pocillo se produjeron 2 crioviales, que se guardaron en un tanque de nitrógeno líquido.

3.5.6.- Formación de cuerpos embrionarios

Las iPSC se sembraron en placas de Petri de 10 cm de diámetro de baja adherencia, a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células en 10 mL de medio para iPSC sin el agregado de LIF y se incubaron a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente, se renovó el medio para lo cual las células fueron centrifugadas a 180 g durante 5 min, y el sobrenadante descartado. A partir de entonces, el medio se renovó cada 3 días durante 20 días.

Los cuerpos embrionarios (CE) obtenidos se caracterizaron por citometría de flujo e inmunofluorescencia (ver sección 3.6 y 3.7) utilizando anticuerpos específicos para la detección de células características de las tres capas germinales: anti actina de músculo liso (sc-53015 Santa Cruz) para mesodermo, anti β 3-tubulina (sc-58888, Santa Cruz) para ectodermo y anti-alfa fetoproteína (AFP) (sc-8399 Santa Cruz) para endodermo.

3.5.7- Caracterización de las iPSC NF- κ B-RE-luciferase obtenidas

Luego de obtenidos los clones, se procedió a caracterizar las iPSC por inmunofluorescencia, citometría de flujo y RT-PCR. Además, se evaluó la respuesta de activación de NF- κ B frente a TNF- α .

3.5.7.1.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se extrajo ARN de clones de iPSC generados a partir de MEF y de MAF, de una línea de células madres embrionarias murinas (mESC) JM8A (control positivo) y de los MEF utilizados como capa alimentadora, utilizando el kit comercial *RNeasy* (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para la retro transcripción se utilizó 1 μ g de ARN de cada muestra, previamente tratado con DNasa I (*DNase I Amplification kit*, Invitrogen) para eliminar el ADN contaminante. Para la retro transcripción se utilizó la retro transcriptasa M-MLV-RT (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenido el ADN copia, se procedió a realizar la PCR para distintos marcadores de pluripotencia utilizando *primers* específicos para cada gen (**Tabla 1**). El gen de la enzima Glicerinaldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como control de interno (*house keeping gene*). Las condiciones de corrida fueron para GAPDH, Nanog y Oct4: 95°C 5 minutos/ 35 ciclos x (95°C 30 segundos, 55°C 30 segundos y 72°C 1minuto) / 72°C 5 minutos y 4°C 1 minuto. Para el gen Sox2 las condiciones de ciclado fueron las mismas exceptuando la temperatura de *annealing* que fue de 60°C en vez de 55°C. Los resultados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa 3% o 1,5% p/v, dependiendo del tamaño del amplicón esperado.

Tabla 1. Primers utilizados para la reacción de PCR.

| Gen | Secuencia Primer (5'-3') | Tamaño del producto (bp) | Genbank Número acceso |
|--------------|---|--------------------------|-----------------------|
| Nanog | F: CAGGTGTTTGAGGGTAGCTC R: CGGTTTCATCATGGTACAGTC | 223 | AY278951.1 |
| Sox2 | F: CGCCCAGTAGATTGCACA R: CCCTCACATGTGCGACAG | 107 | NM_011443.4 |
| Oct4 | F: GTTGGAGAAGGTGGAACCAA R: CTCCTTCTGCAGGGCTTTC | 61 | NM_013633 |
| GAPDH | F: TGTTCTACCCCCAATGTGT R: TGTGAGGGAGATGCTCAGTG | 396 | NM_001289726.1 |

3.5.7.2.- Inmunofluorescencia (IF)

Las células (iPSC y CE de 20 días) fueron sembradas sobre vidrios circulares previamente gelatinizados (y cubiertos con la capa alimentadora de MEF para el caso de las iPSC). Luego de 48 h de cultivo, las mismas fueron fijadas por 15 minutos con PFA 4% y lavadas. Cuando fue apropiado (marcadores intracelulares) las células fueron permeabilizadas con PBS/Tween 0.2% por 30 minutos y luego bloqueadas con PBS/BSA 2% por 1 h. Finalmente se agregaron los anticuerpos primarios indicados en las figuras en la dilución correspondiente (ver **Tabla 2**) en PBS/BSA 2% p/v y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS y se agregó el anticuerpo secundario conjugado a Alexa Flúor 488 en una dilución de 1/1000 en PBS/BSA 2%. Luego de 1 h de incubación se lavó el anticuerpo secundario y los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342 en una concentración de 5µg/mL por 10 minutos. Las imágenes fueron adquiridas en microscopio de epifluorescencia y procesadas con el software Image J.

3.5.7.3.- Inmunomarcación para análisis por citometría de flujo(CF)

Las iPSC fueron despegadas de la superficie de cultivo y los CE fueron disgregados con tripsina hasta formar una suspensión monocelular. Las células fueron centrifugadas y fijadas en 1mL de PFA 4% por 15 min, centrifugadas 5 min a 260 g y luego lavadas con PBS. Posteriormente las células fueron permeabilizadas (cuando fue apropiado por el tipo de marcador usado) y bloqueadas en PBS/BSA 2% por 1h. Una vez finalizado el bloqueo las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 200µL de la correspondiente dilución del anticuerpo (ver **Tabla 2**) en PBS/BSA 2% e incubadas toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se procedió a lavar las células 3 veces con PBS y se agregaron 250 µL de la solución conteniendo una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario conjugado a Alexa Flúor 488. Transcurrida 1 h de incubación, las células fueron lavadas 3 veces y finalmente resuspendidas en PBS/BSA 2% para ser analizadas por citometría de flujo, según se especifica en sección 3.7.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados y respectivas diluciones de trabajo.

| Anticuerpo | Dilución (CF e IF) | Catálogo* | Permeabilización |
|---------------------|--------------------|-----------|------------------|
| β 3 tubulina | 1/50 | Sc-58888 | Si |
| Actina músculo liso | 1/50 | Sc-53015 | Si |
| AFP proteína | 1/50 | Sc-8399 | Si |
| SSE-A1 | 1/100 | Sc-21792 | No |
| Nanog | 1/50 | Sc-374103 | Si |
| Oct-3/4 | 1/50 | Sc-5279 | Si |

* Todos los anticuerpos empleados son de Santa Cruz

3.5.8- Ensayos reporteros para la activación de NF- κ B en MEF, iPSC y CE

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos (3×10^4 cél/pocillo) y 48 h después fueron estimuladas con 25 ng/mL de TNF- α por 24 h. La cantidad de luciferasa expresada fue medida en función de la cantidad de luz producida en presencia de su sustrato específico D-luciferina. Para ello se utilizó el kit comercial *Luciferase Assay System* (Promega), según especificaciones del fabricante. Brevemente, las células fueron lisadas y posteriormente a cada pocillo se le agregó 50 μ L del reactivo de luciferasa. Inmediatamente después la placa fue introducida en un lector de luminiscencia (LUMIstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Alemania) y se realizó la lectura de luz de cada pocillo. Por cada tratamiento se reservaron 4 pocillos para realizar recuento celular por citometría de flujo con el equipo BD Accuri™ C6 (usando el mismo protocolo descrito en secciones previas) a fin de normalizar los valores de luz obtenidos. Los valores de luz obtenidos fueron comparados con células sin estimular.

3.6- Análisis por microscopía de fluorescencia

En los casos que se requirió se utilizó un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, el cual se encuentra equipado con filtros de excitación de 360-370 nm, 470 – 495 nm, 530-550 nm, 300-400 nm y campo claro. Se utilizaron los filtros de excitación de 360-370nm para Hoechst y 470 – 495 nm para GFP y Alexa Fluor 488. Las imágenes fueron adquiridas con el *software* Micromanager y analizadas con el *software* Image J

3.7- Análisis por citometría de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo, BD Accuri™ C6 equipado con dos láseres, 488 nm y 640 nm. Se definió la región de análisis en el gráfico SSC (del inglés, Side-Scattered light) vs FSC (del inglés, Forward-Scattered light) (granularidad vs tamaño celular), donde se excluyeron

los detritos celulares. Además, se excluyeron los dobletes mediante el gráfico de Ancho de pulso vs FSC. Para realizar las adquisiciones, se colectaron 10000 eventos en la región de singuletes. La fluorescencia emitida por la GFP fue adquirida en el detector FL1, mientras que para el IP se utilizó el detector FL2. Los distintos parámetros fluorescentes fueron evaluados mediante gráficos biparamétricos (gráficos de puntos). En cada experimento se utilizaron como controles células sin fluorescencia (para determinar la población negativa) y células marcadas con un solo fluorocromo (para realizar la compensación de la superposición espectral en los casos que se usó doble marcación con GFP e IP). Para la adquisición de datos se empleó el software BD AccuriTM C6 y el programa FlowJo vX.0.7 para su posterior análisis.

3.8- Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm el desvío estándar (SD) de dos o tres experimentos independientes, en los que cada condición fue realizada por triplicado, con la excepción de aquellos casos donde se especifique otra condición. Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando el test de t (en los casos que se compararon dos grupos) o ANOVA (para comparación de más de dos grupos), asumiendo una distribución normal. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas que presentaron un valor $P < 0.05$. Tanto el análisis estadístico como el ajuste al modelo de dosis respuesta fueron realizados con el programa Graph Pad Prism v5.

4- Resultados

4.1- Establecimiento del cultivo en 3D de la línea celular reportera HT-29-NF- κ B-hrGFP y evaluación de su respuesta frente a estímulos inflamatorios

4.1.1- Optimización del cultivo en 3D

Con el objetivo de determinar la densidad celular inicial apropiada para la formación de esferoides se sembraron $0,35 \times 10^4$; $0,70 \times 10^4$; $1,5 \times 10^4$; $3,0 \times 10^4$ y $6,0 \times 10^4$ células por cavidad de una placa de 96 pocillos utilizando la metodología de baja adherencia (MBA) y de la gota colgante (MGC), según se describió en Metodología (sección 3.4.1.). En la **Figura 3** se muestran imágenes de los esferoides obtenidos a los 4 y 7 días de crecimiento, con ambos métodos de siembra.

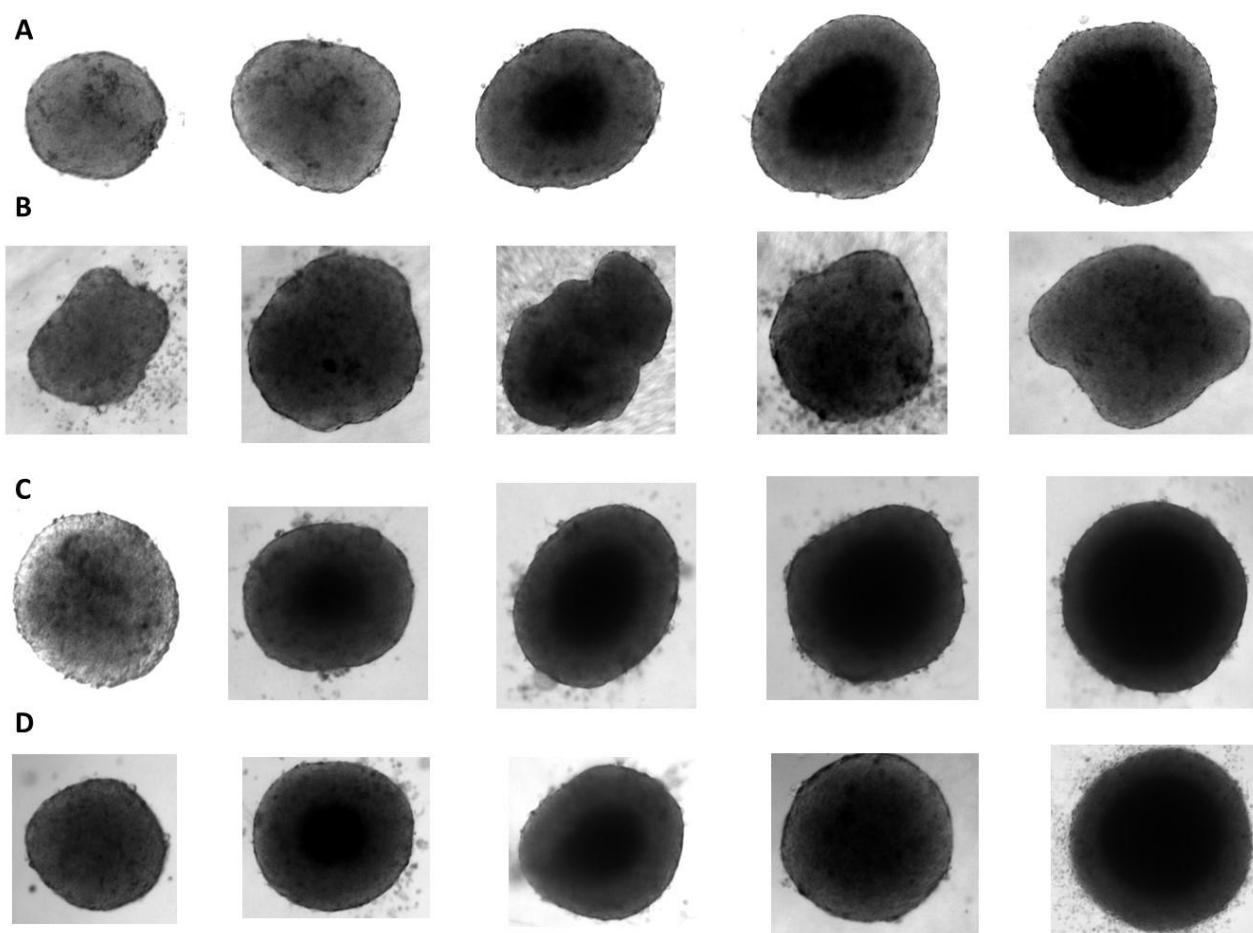


Figura 3. Esferoides de la línea celular HT-29-pNF- κ B-hrGFP. Las células fueron sembradas mediante MBA (A y C) o MGC (B y D) y observados al microscopio óptico a los 4 (A y B) y 7 días (C y D) post siembra. En cada caso, de izquierda a derecha se muestran imágenes representativas de esferoides de $0,35 \times 10^4$; $0,70 \times 10^4$; $1,5 \times 10^4$; $3,0 \times 10^4$ y $6,0 \times 10^4$ células iniciales por pocillo. Aumento 40x.

Como parte de la caracterización de los esferoides, a partir de las imágenes obtenidas, se procedió a calcular el diámetro y la circularidad de los mismos.

Tomando como ejemplo los valores de densidad celular inicial extremos ($0,35 \times 10^4$ y $6,0 \times 10^4$ células/pocillo) se observó que para ambos métodos se obtuvieron esferoides de mayor diámetro cuando se utilizó una densidad celular inicial mayor, independientemente del tiempo de incubación (4 o 7 días) empleado (**Tabla 3**).

Tabla 3. Diámetros de esferoides (μm) alcanzados al cabo de 4 y 7 días de cultivo.

| Densidad celular inicial (células/pocillo) | MBA | | MGC | |
|---|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | 4 días | 7 días | 4 días | 7 días |
| $0,35 \times 10^4$ | $430,00 \pm 1,94$ | $429,30 \pm 0,26$ | $388,50 \pm 23,45$ | $425,90 \pm 46,35$ |
| $0,70 \times 10^4$ | $537,30 \pm 12,99$ | $633,30 \pm 5,81$ | $667,90 \pm 123,94$ | $567,70 \pm 47,56$ |
| $1,5 \times 10^4$ | $666,30 \pm 0,99$ | $717,20 \pm 0,11$ | $468,10 \pm 333,50$ | $616,30 \pm 9,46$ |
| $3,0 \times 10^4$ | $753,20 \pm 0,95$ | $791,90 \pm 6,19$ | $455,40 \pm 154,40$ | $544,90 \pm 222,60$ |
| $6,0 \times 10^4$ | $944,10 \pm 28,68$ | $822,30 \pm 29,47$ | $825,10 \pm 124,80$ | $864,90 \pm 50,70$ |

Con respecto a la circularidad de los esferoides, en el MBA no se observaron diferencias significativas a los dos tiempos analizados (4 y 7 días) y la circularidad se mantuvo en valores cercanos a 1 (**Figura 4**). En cuanto a los resultados obtenidos con el MGC, si bien a los 7 días no se observaron diferencias significativas en cuanto a circularidad en comparación con el MBA, a los 4 días los esferoides generados con esta metodología mostraron bordes irregulares y valores de circularidad más alejados de 1, sugiriendo una menor reproducibilidad de los experimentos con este método bajo las condiciones evaluadas.

A partir de estos resultados, se optó por el empleo del MBA para la generación de cultivos en 3D. En cuanto al tiempo de formación de esferoides, se seleccionó 4 días, ya que, si bien los parámetros de circularidad y diámetro no variaron con respecto a los de 7 días, como los ensayos de transactivación para NF- κ B pueden requerir hasta 72 h de incubación, la elección de esferoides de 4 días permite reducir los tiempos del ensayo, lo cual adquiere mayor relevancia en el marco del posible empleo de este protocolo para técnicas de cribado de compuestos.

Para determinar el número óptimo de células, se comparó la viabilidad de los esferoides obtenidos por el MBA con un sistema en cultivo 2D (monocapa celular). Para ello, se sembraron dos densidades celulares iniciales diferentes: 3×10^4 y 6×10^4 células/pocillo y se dejó crecer por 4 días. Se procedió a realizar un cambio de medio y cultivar 72 h adicionales, momento en el cual se evaluó la viabilidad celular en los cultivos 2D y 3D.

Como se observa en la **Figura 5**, la viabilidad de los esferoides obtenidos a partir de una densidad inicial de 6×10^4 células fue significativamente menor a la de su contraparte en 2D (3D: $71,9 \pm 15,2\%$ y 2D: $85,3 \pm 9,6\%$). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre los sistemas de cultivo generados a partir de una densidad celular inicial

menor (2D: $75,3 \pm 6,4\%$ y 3D: $85,9\% \pm 8,1$), por lo que, para los subsiguientes ensayos, se estableció trabajar con un número inicial de células igual a 3×10^4 células/esferoide o pocillo.

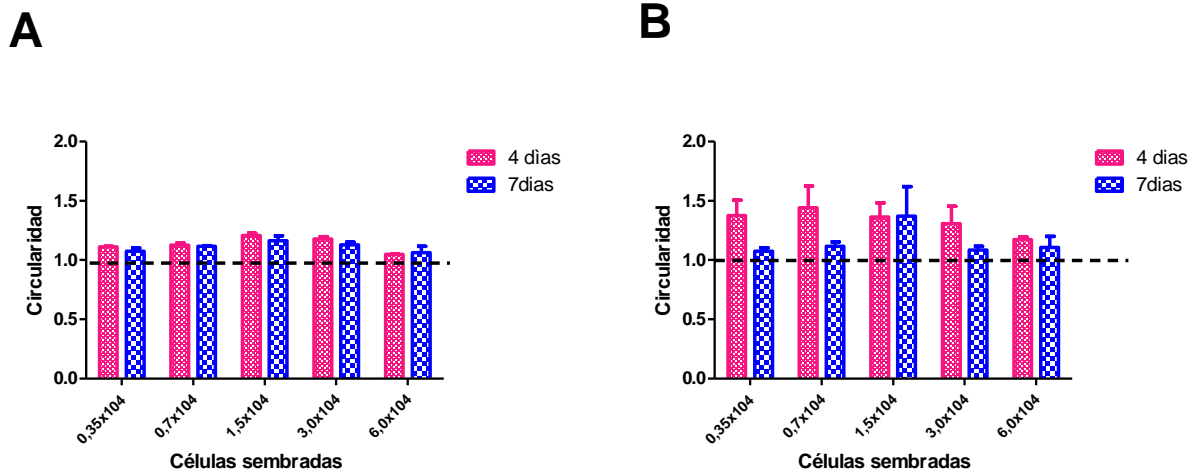


Figura 4. Circularidad de los esferoides a partir del análisis de imágenes. Los esferoides fueron sembrados utilizando la técnica MBA (A) y MGC (B). A los 4 y 7 días de cultivo, se evaluó la circularidad como parámetro indicador de la esfericidad.

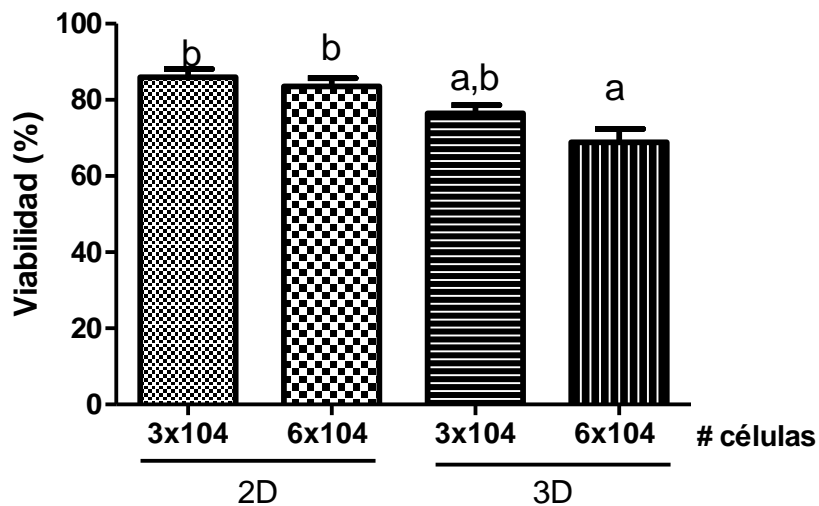


Figura 5. Comparación de la viabilidad celular entre cultivos 2D y 3D. Las células fueron crecidas durante 4 días en sistemas 2D y 3D. Al cuarto día se les renovó el medio y 72 h más tarde fueron disgregadas con tripsina y su viabilidad fue estimada por tinción con IP y evaluada por citometría de flujo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

4.1.2- Ensayos reporteros para evaluar la activación de NF- κ B en cultivos en 2D y 3D

Para comparar la actividad reportera de la línea HT-29-NF- κ B-hrGFP en 2D y 3D, las células fueron sembradas a una densidad inicial de 3×10^4 células/pocillo y al cuarto día de crecimiento, las células fueron incubadas con el estímulo pro inflamatorio TNF- α en distintas concentraciones, durante 24 y 72 h. La **Figura 6** muestra imágenes de microscopía de epifluorescencia de células HT-29-NF- κ B-hrGFP provenientes de cultivos en 2D y 3D, estimuladas con 100 ng/mL TNF- α .

En cuanto a la caracterización de la respuesta en cultivos 2D y 3D, las células crecidas como esferoides celulares mostraron un EC50 mayor que las células obtenidas en 2D, tanto a 24 h (valores de EC50 de $7,1 \pm 0,45$ nM y $2,2 \pm 0,14$ nM para 3D y 2D, respectivamente) como a 72 h (valores de EC50 de $5,4 \pm 2,4$ nM y $1,1 \pm 0,33$ nM para cultivos 3D y 2D, respectivamente). Con respecto a la respuesta máxima obtenida, si bien a 24 h no hubo diferencias en el porcentaje de células GFP positivas entre ambos tipos de cultivo ($77,8 \pm 3,0\%$ y $78,1 \pm 12,7\%$ para 2D y 3D, respectivamente), al cabo de 72 h, la respuesta máxima alcanzada por los esferoides fue menor que la obtenida con las células crecidas en monocapa ($70,6 \pm 8,0\%$ y $96,4 \pm 2,4\%$ para 3D y 2D, respectivamente). Estas diferencias observadas fueron estadísticamente significativas (**Figura 7**).

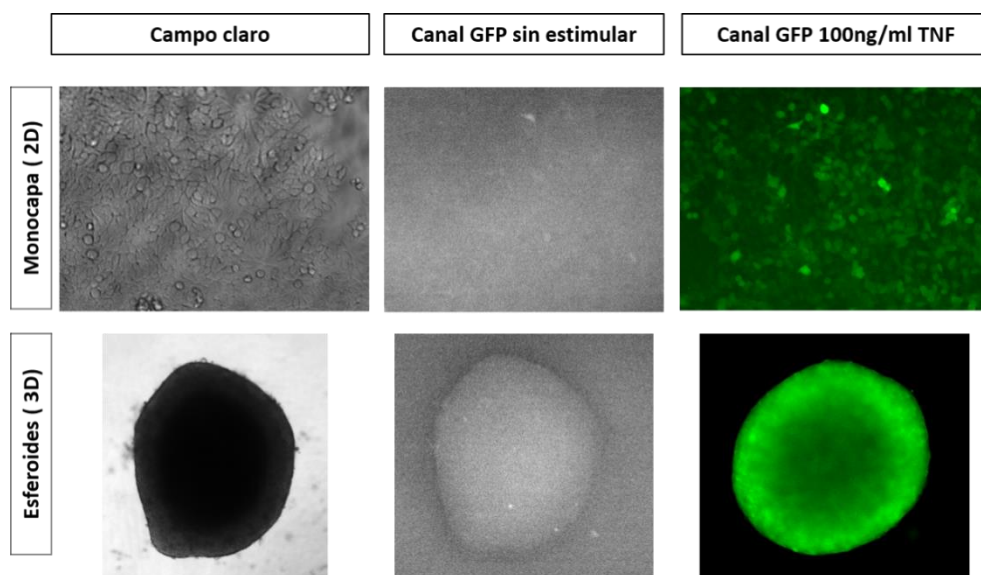


Figura 6. Activación de NF- κ B en cultivos en 2D y 3D evaluados por microscopía de epifluorescencia. Los esferoides (aumento 40X) y la monocapa (aumento 100X) fueron estimulados durante 24 h con 100 ng/mL de TNF- α .

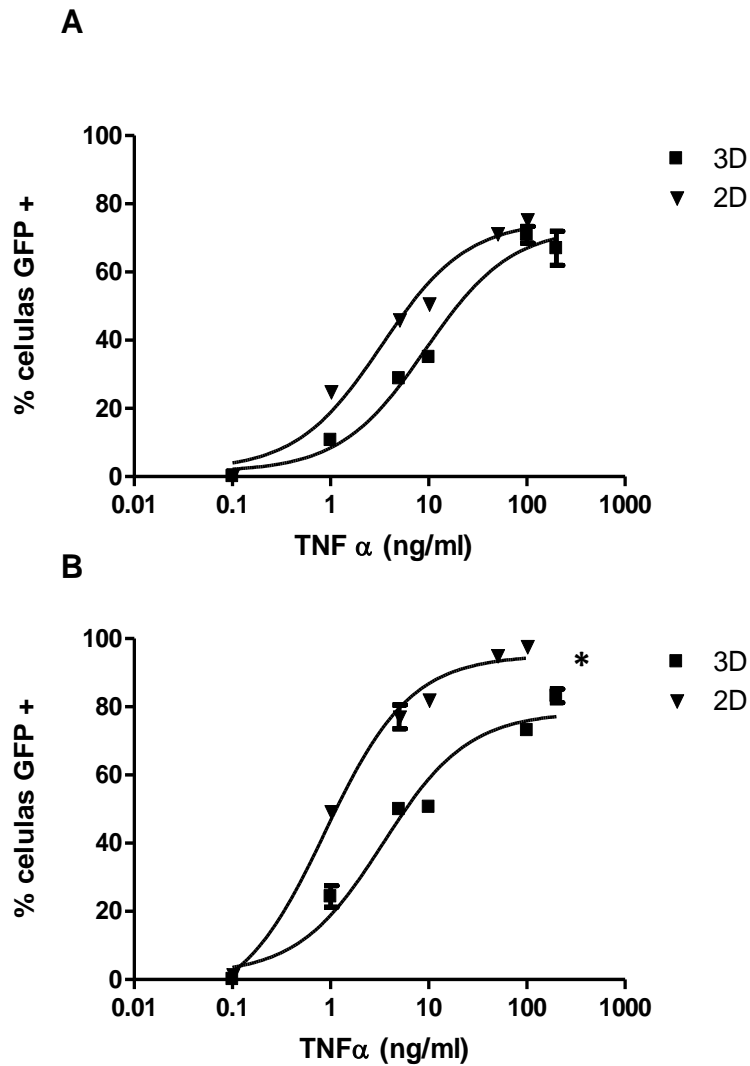


Figura 7. Respuesta de la línea celular reportera HT-29-NF- κ B-hrGFP frente a un estímulo inflamatorio. Las células fueron estimuladas con distintas concentraciones de TNF α por 24 (A) o 72 h (B) en cultivos 2D y 3D. El grado de activación de la vía NF- κ B fue medido como el porcentaje de células GFP $^{+}$. Diferencias significativas fueron observadas entre los tratamientos a las 72 h.* $p < 0.05$

En un sistema en 2D, todas las células están expuestas de la misma manera al medio y a las señales presentes en él. Por el contrario, en los esferoides las células se encuentran distribuidas en una arquitectura tridimensional, y no todas tienen el mismo acceso al medio que las circunda. El factor de difusión, en este caso, puede ser clave al momento de evaluar una respuesta.

Para evaluar si la diferencia en la respuesta observada en el sistema 3D podría deberse a una menor difusión del estímulo a través del esferoide celular, se procedió a repetir los ensayos de estimulación empleando esferoides de menor tamaño (1.5×10^4 células por pocillo), asumiendo que en éstos la difusión se vería menos afectada.

Como se observa en la **Figura 8** los resultados obtenidos fueron similares a los hallados para esferoides de mayor tamaño, tanto a 24 como a 72 h de incubación, sugiriendo que las diferencias observadas en las respuestas podrían estar influenciadas por otros factores que se analizarán en detalle en la discusión.

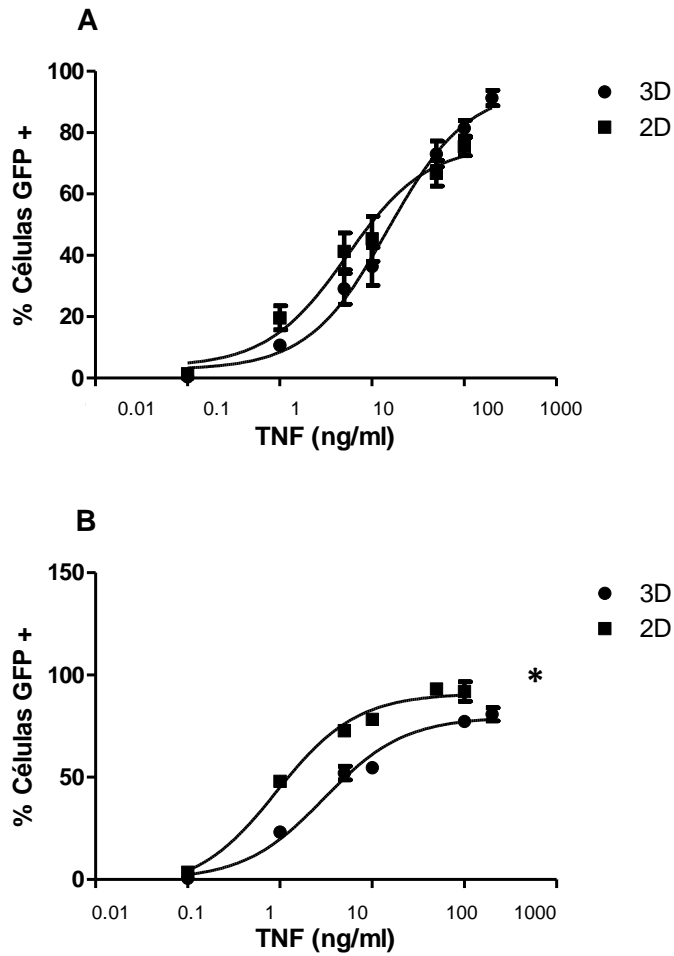


Figura 8. Respuesta de la línea celular reportera HT-29-NF- κ B-hrGFP a un estímulo inflamatorio empleando esferoides de tamaño pequeño (1.5×10^4 células / pocillo). Las células fueron estimuladas con distintas concentraciones de TNF α durante 24 (A) o 72 h (B) en cultivos 2D y 3D. El grado de activación de la vía NF- κ B fue medido como porcentaje de células GFP $^+$. Diferencias significativas fueron observadas entre los tratamientos a 72 h.* $p < 0.05$

4.2- Generación y caracterización de iPSC a partir de fibroblastos murinos derivados del ratón transgénico BALB/c NF- κ B-RE-luciferase, para su posterior reprogramación a células del epitelio intestinal.

4.2.1- Obtención de las iPSC

Las iPSC fueron generadas a partir de MAF y MEF de ratones reporteros para NF- κ B, empleando el plásmido m-STEMCCA c-myc y un vector lentiviral, de acuerdo a lo especificado en la sección Metodología. El tiempo necesario para la reprogramación, evaluado como el momento en el que se comenzaron a observar las primeras colonias de iPSC, fue menor para los MEF (7-10 días post traducción) comparado con los MAF (15-20 días post traducción). Dichas colonias se comenzaron a visualizar como conjuntos de células redondeados y con bordes bien definidos como se ilustra en la **Figura 9B**.

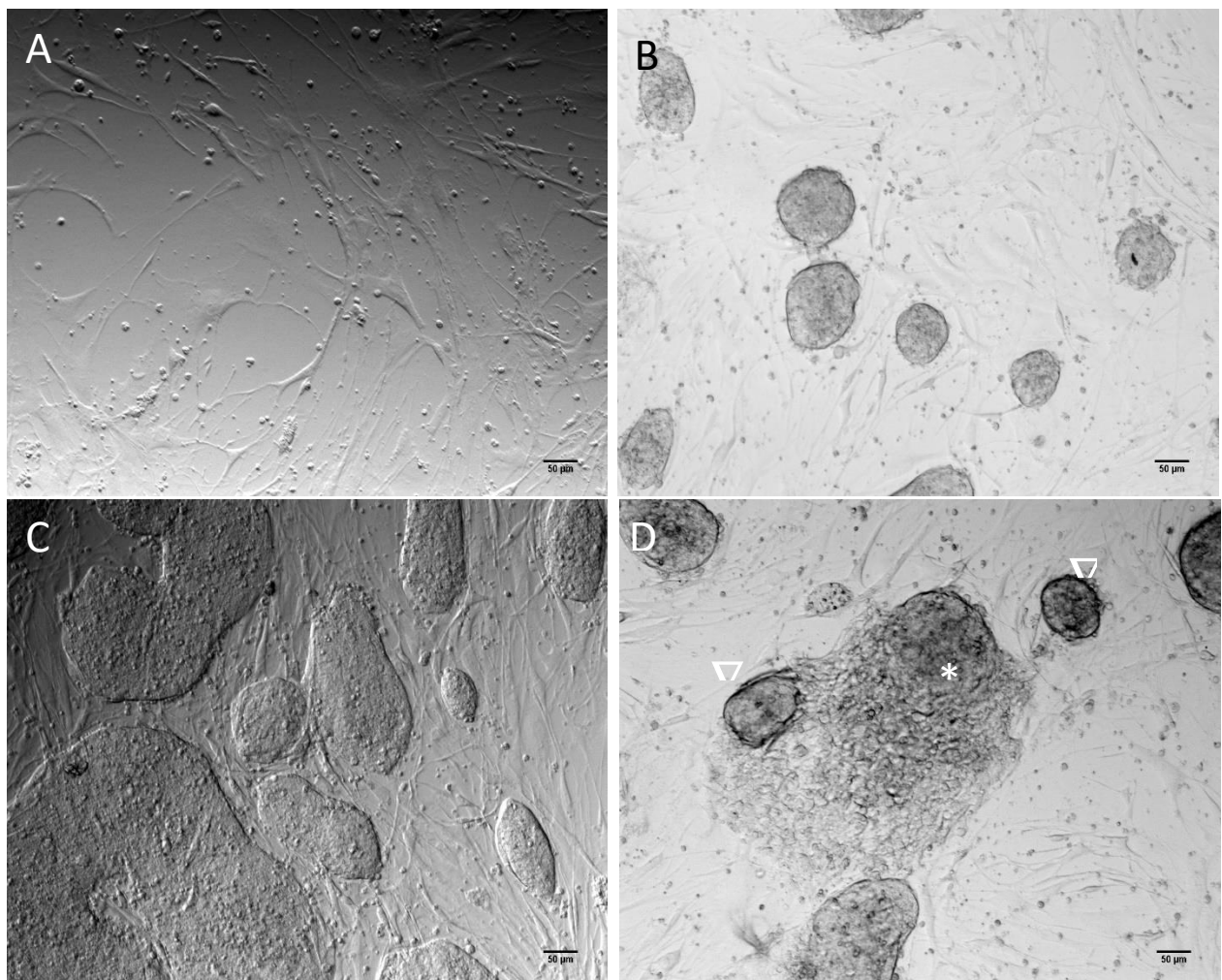


Figura 9. Colonias de iPSC observadas al microscopio óptico. A) MEF mitomicinados, utilizados como capa alimentadora de las iPSC; **B)** Colonias pequeñas de iPSC generadas a partir de MEF NF- κ B-RE-luciferase, a pocos días de emerger luego de la reprogramación; **C)** Colonias iPSC del tamaño apropiado para ser propagadas individualmente; **D)** Colonia diferenciada (*), rodeada de colonias más pequeñas, aún no diferenciadas (∇). La escala representa 50 μ m.

Aquellas colonias con bordes bien definidos y sin signos de diferenciación (**Figura 9C**) fueron aisladas manualmente en forma individual cuando su tamaño alcanzó al menos el 50% de la superficie del campo observado con un objetivo de 10X. Las mismas fueron expandidas sobre una capa alimentadora de MEF mitomicinados con el fin de obtener clones, los cuales posteriormente fueron criopreservados y caracterizados, como se describe a continuación.

4.2.2. Caracterización de las iPSC

Como primer paso, se evaluó la expresión de genes marcadores de pluripotencia (Sox2, Oct-3/4 y Nanog) a partir de ARNm extraído de los clones mediante la técnica de RT-PCR (**Figura 10**). La selección de estos genes como marcadores de pluripotencia responde al hecho de que su expresión es necesaria para mantener el estado de pluripotencialidad de las células madre (46,47). Todos los clones de iPSC evaluados mostraron expresión de estos genes característicos de células madres pluripotentes, a nivel de ARN mensajero. En cuanto a los MEF, se observó la expresión de Sox2 y en menor medida Nanog, probablemente asociados a su estadio embrionario (48). La línea celular JM8A, derivada de células madre embrionarias murinas, fue utilizada como referencia de célula madre pluripotente.

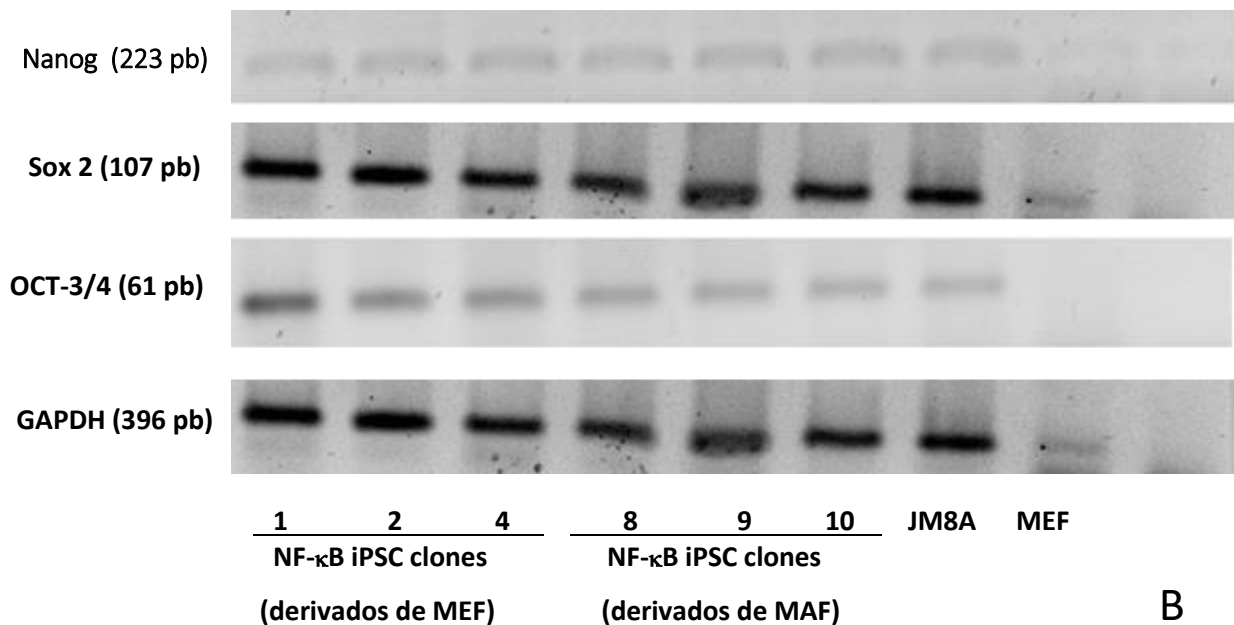


Figura 10. Expresión de marcadores de pluripotencia evaluados por RT-PCR. Se extrajo ARN de diferentes clones de iPSCs, MEF y la línea mESC JM8A. El ARN se retrotranscribió y los genes Oct-3/4, Sox2 y Nanog fueron amplificados por PCR. El gen de GAPDH se utilizó como control de interno (*house keeping gene*)

Posteriormente se procedió a estudiar, a nivel de proteínas, la presencia de alguno de estos genes empleando la técnica de inmunofluorescencia. Se realizó la marcación para los factores de transcripción Oct-3/4 y Nanog y la proteína SSEA-1, la cual se emplea como marcador de superficie específico para células en estadios embrionarios. Los núcleos fueron marcados con Hoechst 33342. Como se puede observar en la **Figura 11**, todos los clones analizados mostraron marcación positiva para las proteínas estudiadas, reforzando los resultados

obtenidos mediante RT-PCR. Asimismo, los MEF utilizados como capa alimentadora en el cultivo de iPSC no mostraron marcación para las proteínas analizadas.

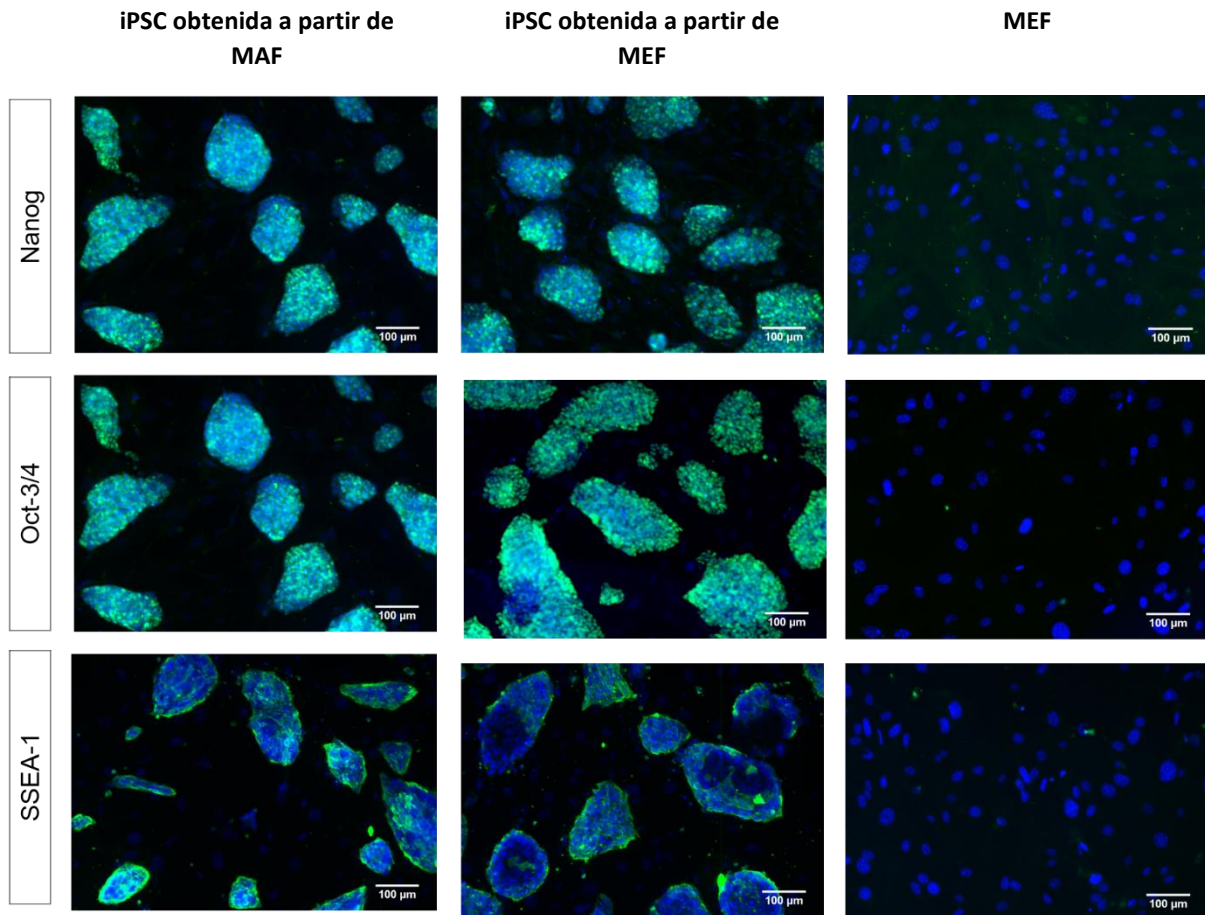


Figura 11. Expresión de marcadores de pluripotencia detectados por inmunofluorescencia. Clones de iPSC fueron marcados con anticuerpos anti Nanog, Oct-3/4 y SSEA1 (verde). Los núcleos fueron marcados con Hoechst 3342 (azul). La escala representa 100μm.

Los cultivos de iPSC suelen presentar algún grado de diferenciación espontánea, debido por ejemplo, al sobrecrecimiento de algunas de las colonias que lo forman. Para cuantificar el porcentaje de células indiferenciadas (pluripotentes) presentes en las poblaciones de iPSC, se evaluó la expresión positiva para el marcador SSEA-1, por citometría de flujo (**Figura 12**).

En la **Tabla 4** se resumen los porcentajes de células SSEA-1 positivas obtenidas para los diferentes clones de iPSC. Como se puede observar, este marcador fue expresado por todos los clones evaluados, en un valor promedio de $71,0 \pm 6,1$ % de toda la población analizada.

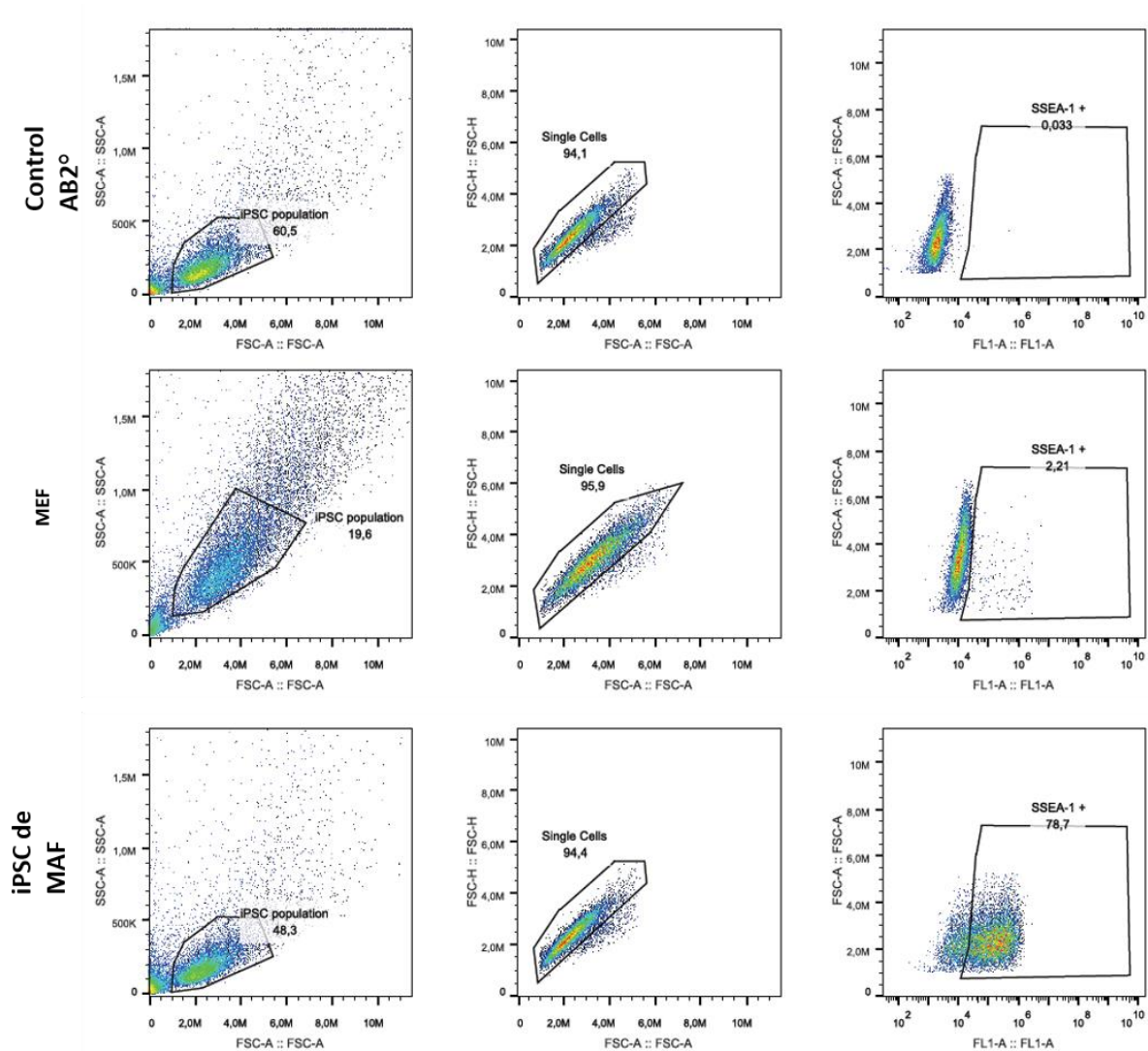


Figura 12. Expresión del marcador de pluripotencia SSEA-1 analizado por citometría de flujo. Las células fueron disgregadas, fijadas en PFA 4% e incubadas con un anticuerpo primario anti SSEA-1, dicha unión fue detectado mediante un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor. La presencia de la proteína SSEA-1 fue evaluada por citometría de flujo. En la figura se observan diagramas de puntos representativos obtenidos para MEF, un clon de iPSC derivadas de MAF y el control de anticuerpo (AB2°). En la primer columna se muestra FSC vs SSC, en la segunda columna la exclusión de dobletes y en la tercera FSC vs FL-1.

Tabla 4. Evaluación de la expresión de la proteína de superficie SSEA-1, utilizada como marcador de pluripotencia, en iPSC.

| Población | iPSC-MEF | | iPSC-MAF | | | | Control | |
|-----------|----------|--------|----------|--------|--------|---------|---------|------|
| | clon 1 | clon 2 | clon 4 | clon 8 | clon 9 | clon 10 | MEF | Ab |
| % SSEA-1+ | 68,6 | 62,1 | 67,2 | 78,7 | 74 | 73,7 | 2,2 | 0,03 |

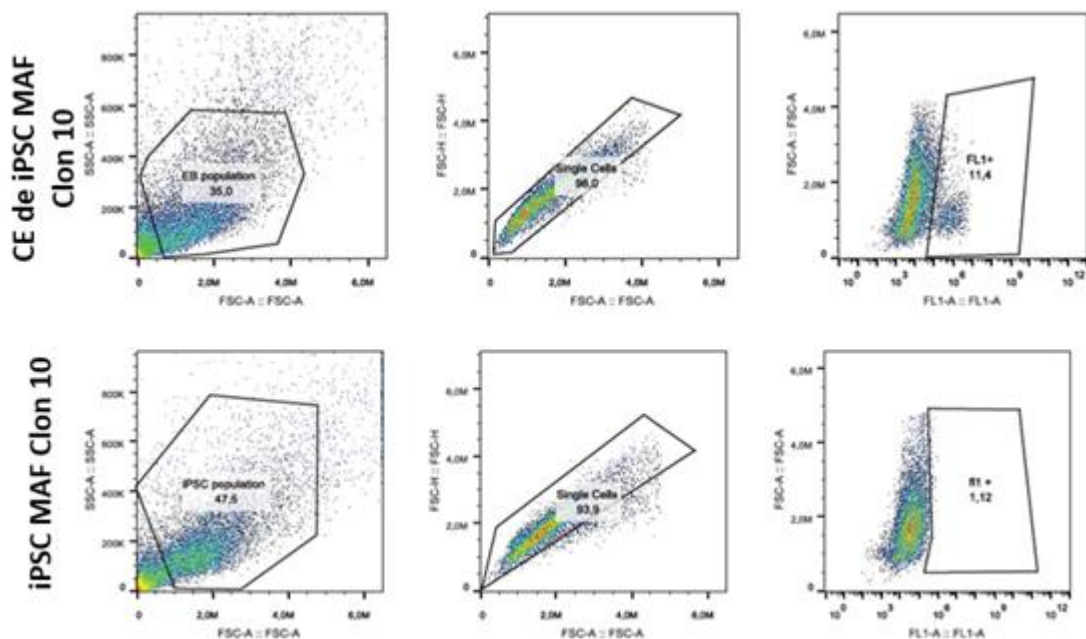
4.2.3. Generación de cuerpos embrionarios

Los CE son agregados tridimensionales de células madre pluripotentes que, cultivadas en ausencia de LIF, pueden diferenciarse estocásticamente en las tres capas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo). El cultivo de cuerpos embrionarios es una metodología ampliamente utilizada para probar el potencial de diferenciación de las iPSC utilizando una metodología *in vitro* (49).

En esta etapa del trabajo se evaluó la capacidad de las iPSC para generar CE y diferenciarse a células de los tres estratos germinales. Los CE fueron cultivados durante 20 días en suspensión empleando medio de células madre sin el agregado de LIF y posteriormente fueron fijados. La expresión de los marcadores correspondientes a los tres estratos germinales fue evaluada por CF e IF, conforme a lo detallado en Metodología.

Dos de los anticuerpos (AFP proteína y actina del músculo liso) no pudieron ser evaluados ya que dieron marcación inespecífica, tanto en CF como en IF (dato no mostrado). En cuanto a la marcación para β 3-tubulina, los CE mostraron porcentajes de células β 3-tubulina positivas mayores a los clones iPSC del cual derivaron, aunque en porcentajes variables, desde 1.1 % a un 18.7 % (**Figura 13**). Por su parte, el hallazgo de células con morfología de neuronas y marcación positiva para β 3-tubulina en preparados de CE apoya fuertemente los resultados antes mencionados (**Figura 14**).

A



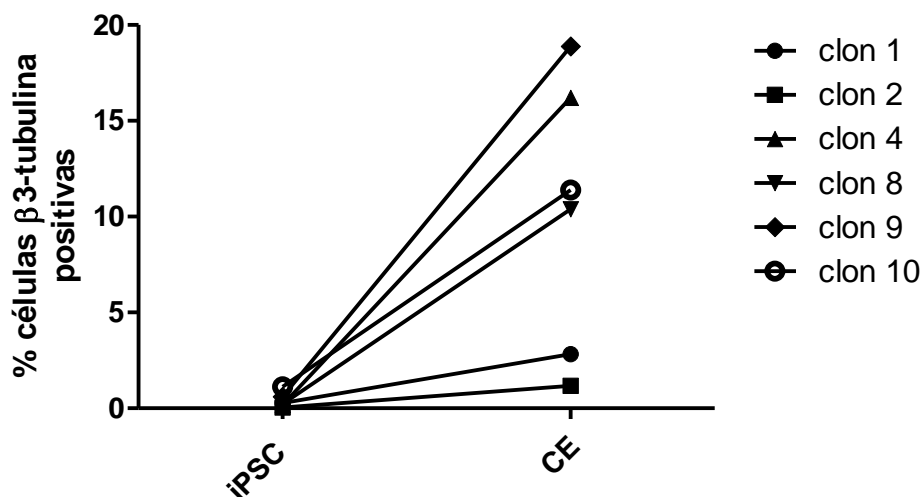
B

Figura 13. Evaluación de la expresión de β 3-tubulina en CE e iPSC. Los CE de 20 días y las iPSC provenientes de distintos clones fueron disgregados, fijados con PFA 4%, marcados con un anticuerpo anti β 3-tubulina, y posteriormente con un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488. Finalmente las muestras fueron analizadas por CF. **A)** Gráficos de puntos representativos del análisis por CF para la detección de población positiva para β 3-tubulina obtenidos de iPSC clon 10 y CE derivados de este clon. En la primera columna se muestra FSC vs SSC, en la segunda columna la exclusión de dobles y en la tercera FSC vs FL-1. **B)** Porcentajes de células positivas para β 3-tubulina obtenidos de diferentes clones de iPSC y sus correspondientes CE.

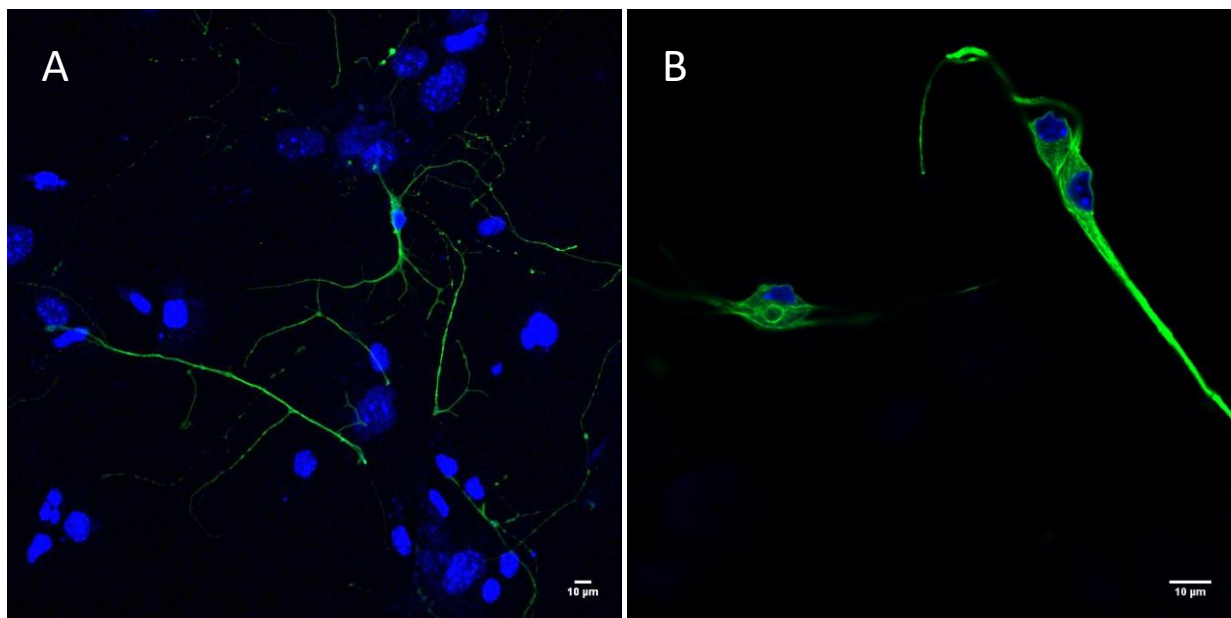


Figura 14. Expresión del marcador neuronal β 3-tubulina en CE detectada por IF. Los CE de 20 días fueron sembrados en vidrios, fijados, permeabilizados y marcados con un anticuerpo anti β 3-tubulina (verde). Los núcleos fueron marcados con Hoechst 3342 (azul). En las imágenes se observan células con morfología neuronal y tinción β 3-tubulina (verde) positiva. **A)** Aumento 100x; **B)** Aumento 400X. La escala representa 10 μ m

4.2.4- Ensayos reporteros para evaluar la activación de NF- κ B en iPSC, CE y MEF

Con el objeto de evaluar si las iPSC y los CE derivados de ellas conservaban la capacidad reportera de los fibroblastos transgénicos NF- κ B que le dieron origen, se realizó un ensayo de activación utilizando como estímulo inflamatorio 25 ng/mL de TNF- α (**Figura 15**). Se observó que la activación de NF- κ B (medida como la producción de luz generada por la actividad de la proteína reportera luciferasa al adicionarle su sustrato) fue significativamente mayor en los MEF (3,8 veces respecto al valor basal) comparado con los CE (1,6 veces de respecto al valor basal), mientras que las iPSC no difirieron significativamente del valor basal, sugiriendo que en éstas últimas no se produjo activación de la vía NF- κ B.

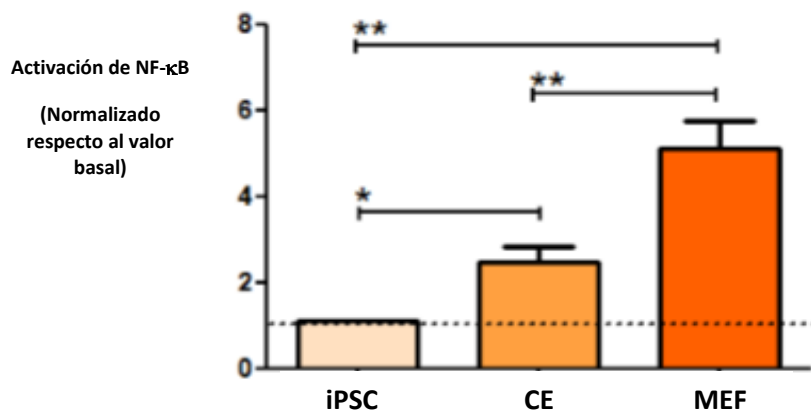


Figura 15. Ensayo reportero de NF- κ B. iPSC, CE, y MEF derivados del ratón transgénico NF- κ B-RE-luciferase fueron incubados con 25 ng/mL TNF α durante 24h. * p<0.001; **p<0.01 . Los valores fueron normalizados respecto a iPSCs, CE y MEF sin estimulación con TNF.

5-Discusión

5.1- Establecimiento del cultivo en 3D de la línea celular reportera HT-29-NF- κ B-hrGFP y evaluación de su respuesta frente a estímulos inflamatorios

El cultivo de células animales en monocapa, empleado desde la década del 50 de forma rutinaria en los laboratorios, revolucionó la forma de abordar el estudio de enfermedades así como el desarrollo de drogas, convirtiendo a los ensayos celulares en una herramienta valiosa a la hora de generar información confiable, reproducible y a un costo razonable.

Sin embargo, el hecho de que, por ejemplo, en la actualidad sólo el 10% de las drogas anti cáncer en desarrollo pasan con éxito las primeras fases pre clínicas (50) y que la falta de eficacia clínica y/o alta toxicidad son dos de las principales causas por las cuales estos medicamentos fallan, sugerirían que el cultivo celular bidimensional (2D), convencionalmente empleado para testear fármacos, tendría un poder predictivo limitado a la hora de extrapolar los resultados a los organismos vivos. Existe amplia evidencia científica que apoya estas observaciones y que atribuye a la incapacidad de los cultivos en 2D de recrear adecuadamente la complejidad estructural de los tejidos vivos la causa de su limitado poder predictivo (14,15).

Desde 1972, los investigadores exploraron las diferencias entre las células cultivadas en una superficie plana frente a los formatos tridimensionales. Desde entonces, la sorprendente similitud de las morfologías y los comportamientos *in vivo* de las células cultivadas en entornos de cultivo 3D no solo está bien documentada, sino que también está bien aceptada. (51).

En las últimas décadas, con el avance en las técnicas y materiales de cultivos, se desarrollaron los cultivos tridimensionales (3D), en los cuales las células crecen en suspensión normalmente con agitación, asociadas a matrices o plataformas, en superficies de baja adherencia o en gotas colgantes generando estructuras con volumen, asemejándose más a la disposición de las células en el organismo vivo (18,21,52). Los ensayos celulares en 3D mostraron ser mucho más predictivos de los eventos *in vivo* en comparación con los cultivos bidimensionales más simples (21). Por ejemplo, Tung y colaboradores demostraron que esferoides de la línea celular A431.H9 formados por el método de gota colgante mostraron diferencias en la viabilidad al ser comparadas con su contraparte en 2D en respuesta a un tratamiento quimioterapéutico con 5-fluorouracilo (5-FU) y tirapazamina (TPZ). En el caso de 5-FU, las células crecidas en 2D mostraron solamente un 5% de viabilidad después de un tratamiento de 96 horas, mientras que los esferoides presentaron una viabilidad del 75%. Por otro lado, al tratar las células con TPZ, se observó que las células crecidas en monocapa presentaban una viabilidad mayor (72%) en comparación con los esferoides (40%). Estos resultados indican que la manera en que se cultivan las células (es decir, 2D o 3D) puede alterar sustancialmente el efecto de una droga. Además, esta investigación destaca el hecho que las células en 3D no necesariamente exhiben una mayor resistencia a los medicamentos (53).

En este trabajo, como primer objetivo, se propuso generar modelos del epitelio intestinal en 3D, más precisamente esferoides celulares, a partir de una línea celular humana derivada del

epitelio intestinal y reportera para el factor de transcripción NF- κ B, el cual tiene una gran relevancia en el sistema gastrointestinal, como fue descrito en la introducción.

Se evaluaron dos metodologías para la formación de esferoides y en base a los resultados obtenidos, se determinó el MBA resultó ser más confiable y reproducible que el MGC. El MBA ya fue utilizado exitosamente por otros grupos de trabajo (54,55). Mediante esta técnica se produjeron esferoides de circularidad uniforme y reproducible al cabo de 4 días de cultivo. El origen de la línea HT-29, proveniente de un adenocarcinoma colorectal, pudo haber contribuido al éxito de este objetivo, ya que se sabe que células de origen tumoral poseen una predisposición a formar agregados celulares, facilitando la obtención de esferoides ya que muchos de los cambios en la expresión de genes que promueven la capacidad de migración e invasiva también favorecen la formación de esferoides (56). Si bien existen otros trabajos en la bibliografía donde se describe exitosamente el cultivo en 3D de la línea HT-29 (57), en este trabajo se reportó por primera vez el cultivo en 3D de la línea en su versión reportera para el factor de transcripción NF- κ B.

Los parámetros óptimos definidos para los ensayos reporteros incluyeron una densidad celular inicial de 3×10^4 células/pocillo y un tiempo de formación de esferoides de 4 días, a partir de los cuales se obtuvieron esferoides de aproximadamente 750 μ m de diámetro.

La comparación de la respuesta de la línea reportera en 2D versus 3D frente TNF α arrojó que al cabo de 72 h los esferoides presentaron una respuesta menor que la línea celular crecida en monocapa, llegando sólo a un 80% de la población GFP positiva para la máxima concentración de TNF α empleada (100 ng/mL). Es más, tanto a 24 como a 72 h de incubación con el estímulo, los valores de EC50 obtenidos con los esferoides fueron mayores que los calculados para 2D para ambos tiempos de incubación. Estos datos sugieren que la sensibilidad de la línea reportera podría verse modificada en función del sistema de cultivo que se emplea, en particular, en nuestro caso, las células HT-29-NF- κ B-hrGFP crecidas en un sistema tridimensional serían menos sensibles a un estímulo pro inflamatorio, comparado con el cultivo en monocapa. Estas observaciones coinciden con otras ya reportadas para otros sistemas (58).

Existen varios factores relacionados a los esferoides que podrían estar contribuyendo a esta diferencia. La dimensionalidad adicional de los esferoides comparada con los cultivos 2D no sólo influye en la organización espacial de los receptores de la superficie celular, sino que también induce restricciones físicas en las células. La literatura indica que esferoides tan pequeños como 150 μ m ya pueden exhibir interacciones 3D célula-célula y célula-matriz y también pueden mostrar un perfil de expresión alterado en comparación con cultivos 2D.

La difusión del estímulo a través del esferoide, la distribución de receptores de superficie dentro del esferoide e incluso variaciones en la actividad metabólica entre las células que lo forman pueden afectar la transducción de la señal desde el exterior hacia el interior de las células, y en última instancia influir en la expresión génica y las respuestas celulares (58).

Incluso la actividad proliferativa puede diferir; los cultivos de esferoides desarrollan gradientes químicos (por ejemplo, de oxígeno, nutrientes y catabolitos) a diámetros entre 200 y 500 μ m con una necrosis secundaria central establecida típicamente en tamaños superiores a 500 μ m. En estos casos, las células localizadas en la periferia esferoidal reflejan la situación

in vivo de las células adyacentes a los capilares (con un ciclo celular activo), mientras que las células más internas se vuelven inactivas y eventualmente mueren por apoptosis o necrosis.

El establecimiento de gradientes y la disposición concéntrica de poblaciones celulares heterogéneas en esferoides de tamaño creciente depende de la línea celular (59). En este trabajo se emplearon esferoides de 750 μm en los que no se observó necrosis central, como lo confirmó el estudio de la viabilidad celular por citometría de flujo. Sin embargo, la presencia de un gradiente químico hacia el interior del esferoide no puede ser descartado y podría, al menos en parte, ser responsable de la diferencia en la activación de la vía NF- κ B observada en comparación con el cultivo 2D.

En el intestino, la señalización NF- κ B tiene diversas funciones que gobiernan las respuestas inmunes protectoras y destructivas. La sobreexpresión de este factor ha sido asociada con enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (IBD, del inglés, *Inflammatory Bowel Diseases*) como son la Enfermedad de Crohn y la Colitis Ulcerosa (60). También ha sido asociado con varios tipos de cáncer, como por ejemplo el cáncer colorrectal y se ha observado que al disminuir su expresión se obtiene una reducción en el tamaño del tumor (61). Generalmente muchos enfoques terapéuticos resultan ser menos efectivos en 3D que en cultivos 2D (59). Nuestros resultados están en concordancia con esas observaciones ya que muestran que en la línea HT-29-NF- κ B-hrGFP la vía de señalización mediada por NF- κ B presentaría una menor sensibilidad a estímulos en un sistema en 3D. Esto a su vez, pone de manifiesto la relevancia del uso de este tipo de sistemas en fases pre-clínicas de desarrollo de drogas con el fin de reducir la brecha entre los cultivos celulares y el tejido vivo, mejorando la correlación de los resultados obtenidos.

5.2- Generación y caracterización de iPSC a partir de fibroblastos murinos del ratón BALB/c NF- κ B-RE-luciferase, para su posterior reprogramación a células del epitelio intestinal.

En el año 2006 el científico japonés Shinya Yamanaka y sus colaboradores establecieron una nueva técnica para reprogramar células somáticas al estado pluripotente forzando la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) (32). Este descubrimiento modificó profundamente el campo de la investigación en células madre al ofrecer un modelo que permitía sortear los debates éticos sobre el uso de células madre humanas y obtener de forma casi ilimitada líneas celulares pluripotentes específicas para ser utilizadas en el campo de la medicina e investigación, en el modelado de enfermedades, el desarrollo de drogas o incluso terapias regenerativas.

El segundo objetivo de este trabajo se basó en la generación de iPSCs a partir de MEF y MAF extraídos del modelo murino reportero BALB/c NF- κ B-RE-luciferase, como primer paso para la posterior diferenciación a células del epitelio intestinal. Por medio de la técnica de transducción lentiviral, empleando el plásmido STEMMCA, se logró obtener iPSCs, tanto a partir de MAF como de MEF. Si bien en este trabajo no se evaluó la eficiencia de reprogramación, en el trabajo original de Sommer y col. se reportó un valor de 0.05%, es decir, en promedio, solo uno de cada 2.000 fibroblastos transducidos formaron células pluripotentes (46,62). Un factor importante que afecta la eficiencia de la reprogramación es el estado de diferenciación de la célula a reprogramar. Cuanto más diferenciada es la célula,

más difíciles son las barreras que se deben superar para lograr la remodelación epigenética del genoma, necesaria para una reprogramación exitosa (63). En este trabajo se utilizaron fibroblastos en dos estadios de diferenciación diferentes: adulto y embrionario. El tiempo de aparición de las primeras colonias iPSC post transducción lentiviral fue mayor para los MAF que para los MEF. Este retraso en la cinética de la reprogramación probablemente sea consecuencia que en los fibroblastos adultos, completamente diferenciados, las marcas epigenéticas fueron más difíciles de eliminar.

En cuanto al estudio de marcadores de pluripotencia, los clones de iPSC NF- κ B generados en este trabajo expresaron los factores de transcripción Oct-3/4, Sox2 y Nanog, tanto a nivel de ARNm como de proteínas. En células humanas y de ratón, Oct4, Sox2 y Nanog forman un circuito regulador transcripcional central en las células madre pluripotentes para mantener su auto renovación. Oct4 y Sox2 co-ocupan un gran número de promotores y regulan los niveles de expresión de sus genes diana. Además activan la expresión de genes pluripotentes, incluidos Nanog y ellos mismos, al tiempo que reprimen la expresión de genes clave para la diferenciación celular (64).

Si bien los genes para Sox2 y Oct-4 se encuentran en el plásmido introducido y por la característica de los *primers* empleados no fue posible en este trabajo diferenciar la expresión endógena de la plasmídica, la expresión de Nanog es indicativa de que la maquinaria de reprogramación propia de las células fue activada ya que este gen no se encuentra en el plásmido STEMCCA introducido. Esta aclaración es importante debido al rol que estos genes cumplen para mantener la pluripotencialidad de los clones obtenidos.

Para cuantificar el porcentaje de iPSCs en cada clon se analizó la presencia del marcador pluripotente de superficie SSEA-1 por citometría de flujo. En todos los casos, se obtuvo un valor cercano al 70% de células SSEA-1 positivas. El hecho de que no se haya obtenido un valor superior puede deberse a que durante el cultivo de las iPSC, algunas colonias pueden sufrir diferenciación espontánea, perdiendo la expresión del marcador de pluripotencia. Por otra parte, si bien se intentó separar las iPSCs de los MEF alimentadores mecánicamente (al despegarlos de la placa de cultivo) y en función de su tamaño (durante el análisis de citometría empleando los parámetros de SSC y FSC), no podemos descartar la posibilidad de que una población de MEF (negativos para SSEA-1 y de un tamaño similar a las iPSC) haya sido incluida en el análisis, por lo cual el porcentaje real de células SSEA-1 podría ser aún mayor. El empleo de un marcador específico para fibroblastos hubiese sido apropiado para excluir completamente del análisis la población de MEF alimentadores, reduciendo la fuente de error en la determinación del porcentaje de iPSC.

Una vez confirmada la expresión de los marcadores de pluripotencia, el siguiente paso en la caracterización de iPSC consistió en demostrar su capacidad para diferenciarse en tejidos derivados de las tres capas germinales embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). Para ello, la bibliografía (32) sugiere dos tipos de ensayos: uno *in vivo*, consistente en la generación de teratomas y otro *in vitro*, basado en la generación de CE.

Los teratomas son tumores sólidos y definidos, a menudo derivados de la línea germinal, compuestos por células diferenciadas altamente organizadas que contienen representantes de las tres capas germinales. Si bien el ensayo del teratoma es ampliamente utilizado como ensayo funcional estándar para demostrar la pluripotencia de iPSC, la carencia de algunos

reactivos, así como la disponibilidad de ratones desnudos (cepa B6.Cg-*Foxn1*^{nu}/J) y los gastos asociados a un modelo *in vivo* limitaron su uso en este trabajo. Como método alternativo se optó, entonces, por la generación de CE. Los CE son agregados tridimensionales de células pluripotentes que se diferencian espontáneamente a los diferentes tipos celulares de las tres capas germinales. Las principales ventajas de esta metodología consisten en el fácil escalado y la posibilidad de trabajar bajo las condiciones estandarizadas que proporcionan los reactivos comerciales para cultivo celular sin introducir la variabilidad intrínseca asociada a los estudios con animales (49).

Luego de 20 días de cultivo en el medio para iPSC en ausencia de LIF (factor inhibidor de la diferenciación celular) se realizó la caracterización de los CE (por citometría de flujo e inmunofluorescencia) utilizando anticuerpos específicos para marcadores de las 3 capas germinales. Dos de los anticuerpos presentaron marcación inespecífica y no fue posible optimizar el protocolo durante el desarrollo de este trabajo. En cambio, se pudo detectar la presencia del marcador β 3-tubulina (ectodermo) en los CE de todos los clones analizados (no así en sus respectivas iPSC) y se logró distinguir células con morfología neuronal evaluadas por inmunofluorescencia. Esto indicaría que las células pluripotentes obtenidas fueron capaces de generar derivados de al menos una de las capas germinales (ectodermo).

En relación con la actividad reportera para NF- κ B, se observó que las iPSC no respondieron al estímulo inflamatorio. Sin embargo, sí se observó una respuesta en los CE, la cual, a su vez, fue significativamente menor comparada con la obtenida por los MEF. Es decir, la activación del factor NF- κ B parecería depender del estadio de diferenciación celular, siendo nula o escasa en el estadio más indiferenciado (iPSC) y aumentando conforme las células se diferencian, sugiriendo que la expresión de NF- κ B podría estar reprimida en estadios indiferenciados. Se sabe que en ratones (a diferencia de lo que sucede en humanos) la actividad NF κ B endógena aumenta durante la diferenciación de las células madre, conforme disminuye la expresión de Nanog, Sox2 y Oct4. Al respecto, Torres y Watt (65) han reportado que en el modelo murino el factor de transcripción Nanog contribuye al mantenimiento de la pluripotencia inhibiendo al factor NF- κ B física y funcionalmente. El factor Nanog sería capaz de unirse a las proteínas Rel por su extremo C terminal inhibiendo la transcripción dependiente de NF- κ B. Este mecanismo propuesto por Torres y col. explicaría los resultados obtenidos en este trabajo; la alta expresión de Nanog en las iPSC estaría inhibiendo la activación de NF- κ B, la cual gradualmente (a medida que disminuye los niveles de Nanog y las células se diferencian) aumentaría, como se evidencia en CE y MEF. Estudios comparativos entre los distintos estadios de diferenciación a nivel de la expresión génica de Nanog así como de Rel y otras proteínas de la familia de NF- κ B permitirían profundizar sobre esta hipótesis.

Los resultados alcanzados en este trabajo constituyen el primero de una serie de pasos destinados a la generación de organoides intestinales a partir de iPSC. La diferenciación de iPSCs a tejido intestinal requiere un proceso que imita los principales eventos del desarrollo, incluida la diferenciación definitiva del endodermo, la especificación del intestino, la morfogénesis, el desarrollo del intestino, el crecimiento y la homeostasis (33). Una vez obtenidos, estos organoides podrían ser utilizados en una multitud de aplicaciones pre-clínicas como puede ser el modelado de enfermedades, ensayos de toxicidad, estudio de interacciones huésped -patógenos y análisis más complejos como transcriptómica, epigenética y proteómica (66).

6- Análisis económico

El análisis económico se realizó comparando los costos para el ensayo de un solo compuesto comparando la respuesta proinflamatoria en un cultivo en 2 dimensiones, utilizando esferoides, y utilizando el ratón transgénico BALB/c NF-κB-RE-luciferase. Como se ilustra en la Tabla 5 la diferencia de costos entre el sistema de cultivo 2D y los esferoides no es mucho mayor, de aproximadamente un 15%, si se consideran todas las ventajas ya mencionadas de este sistema. Por otra parte, el modelo *in vivo* para el testeo de un solo compuesto presenta un costo 4 veces mayor (400%) sobre la metodología en 2 dimensiones.

Estos valores reflejan la importancia de contar con modelos que permitan un correcto cribado de manera de poder utilizar el menor numero de animales posibles. Como ya se mencionó fallar al comienzo de las fases preclínicas, permite que el costo de las moléculas abandonadas en el cribado permanezca relativamente bajo, es decir, cuanto más temprano esté el proceso de desarrollo y se rechace un compuesto, menor impacto económico tendrá para la compañía que financia su desarrollo (21) y menor será el costo del producto para los consumidores finales.

Tabla 5. Análisis económico.

| <i>IN VITRO</i> | | | <i>IN VIVO</i> | |
|--|----------------|---------------|---------------------------------------|-----------------|
| | 2D | 3D | | |
| Medios de cultivo | 2 U\$\$ | 2 U\$\$ | Animales (12 ratones) | 60 U\$\$ |
| Reactivos (TNF, Tripsina, PBS, etc) | 3 U\$\$ | 4 U\$\$ | Mantenimiento animales semanal | 9 U\$\$ |
| Material plástico | 8 U\$\$ | 8 U\$\$ | Duración del ensayo | 2 días |
| Duración del ensayo | 48 h | 6 días | | |
| Tiempo RRHH | 4 h (20 U\$\$) | 5h (25 U\$\$) | Tiempo RRHH | 17 h (85 U\$\$) |
| Total | 33 U\$\$ | 39 U\$\$ | Total | 154 U\$\$ |

7- Conclusión

En conclusión, en la presente tesis se lograron optimizar las condiciones propicias para la obtención de esferoides a partir de la línea celular reportera HT-29-NF- κ B-hrGFP. Sembrando 30.000 células y empleando la metodología de baja adherencia, se obtuvieron esferoides de diámetro regular luego de 4 días de cultivo y fue posible comparar la respuesta de éstos con las células cultivadas en 2D obteniéndose una respuesta menor para los esferoides.

Por otra parte, se lograron obtener y caracterizar colonias de iPSC a partir de fibroblastos del ratón BALB/c NF- κ B-RE-luciferase, las cuales presentaron marcación positiva para los marcadores de pluripotencia Sox-2, Oct3/4 y Nanog. Además, se evaluó la respuesta frente a un estímulo inflamatorio tanto de las colonias de iPSC obtenidas como de los CE. En el futuro se planea comenzar la diferenciación de iPSC a organoides intestinales.

Estos resultados contribuyen tanto al sector biotecnológico como al académico, ya que los modelos en 3D aquí desarrollados podrían ser empleados para resolver hipótesis en investigación básica como para fines más aplicados, como podría ser el descubrimiento de nuevas drogas. En este sentido, las aproximaciones aquí planteadas redundaría en mejorar la correlación de los resultados *in vitro* con los obtenidos *in vivo*, fomentando y promoviendo el principio de las 3Rs (Reducción, Refinamiento y Reemplazo). Adicionalmente, la generación de iPSC fue descrita por primera vez en el 2006 (32), y hasta el desarrollo de esta tesis no había antecedentes en Uruguay de grupos de investigación que hayan intentado generarlas. Las mismas han demostrado ser una excelente herramienta para diversas áreas, como son la medicina regenerativa, el estudio de patologías y fisiología intestinal, terapia génica y el estudio de nuevas drogas.

Parte de los resultados de este trabajo fueron presentados bajo la modalidad de poster durante la 2017 TRANSGENIC TECHNOLOGY MEETING, October 1-4, 2017, Snowbird Resort, Salt Lake City Utah, USA

Induced- pluripotent stem cells from transgenic mice NF- κ B-RE-Luc: First steps in the generation of new reporter cell models for the study of inflammation

Romina Pagotto¹, Micaela Sureda^{1,2}, Belen Harreguy¹, Geraldine Schlapp², Martina Crispo², Mariela Bollati-Fogolín¹

¹ Cell Biology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

² Transgenic and Experimental Animal Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.

The nuclear factor kappa B (NF κ B) transcription factors is a key regulator of immune development, immune responses, inflammation, and cancer. Taking this into consideration, it would be of great value to have availability of new cellular models as biological tools to evaluate the contribution of NF- κ B in inflammatory processes and to advance in the development of new, more efficient and selective drugs. In the last decade, induced pluripotent stem cells (iPSC) have become a promising tool for the study of pathologies and the screening of drugs. The present work aim to generate and characterize iPSC from murine embryonic fibroblasts (MEF) isolated from the reporter transgenic mice BALB/c NF- κ B-RE-luc. To accomplish that, MEF were transduced using a lentiviral system carrying the STEMCCA vector (kindly provided by Dr. Mostoslavsky, Genetics Department, Harvard Medical School, Boston, USA) with the four Yamanaka factors (Oct-4, Sox2, Klf4 and c-myc). After two weeks, colonies were picked up, expanded and cryopreserved. Characterization of the iPSCs was performed by determining the mRNA levels of the pluripotent genes Oct-4, Sox2, Nanog and GAPDH (as housekeeping gene). Furthermore, the expression of Oct-4, Nanog and SSEA-1 proteins were evaluated by immunofluorescence and in addition the SSEA-1 by flow cytometry. The iPSCs derived from the transgenic MEF showed consistent results in the expression of Oct-4, Nanog and Sox2 genes that are characteristic for pluripotent stem cells. In addition, the immunofluorescence images showed positive staining for Oct-4, Sox2 and SSEA-1 proteins in all analyzed colonies. Finally, flow cytometry results of the iPSC clones displayed more than 80% positive cells for the SSEA-1 marker. Ongoing work is focused on evaluating the reporter function of these clones by performing proof-of-concept experiments with known pro and anti-inflammatory compounds that modulate the activation of NF- κ B. The generation of the iPSC reporter lines and their validation as new biological tools will be of fundamental relevance for a deeper understanding of NF- κ B pathway in the development of different diseases and as a platform for drug discovery purposes.

8- Referencias

1. C Fantini M, Pallone F. Cytokines: From Gut Inflammation to Colorectal Cancer. 2008. 375-80 p.
2. Gonzalez-Castro AM, Martinez C, Salvo-Romero E, Fortea M, Pardo-Camacho C, Perez-Berezo T, Alonso-Cotoner C, Santos J, Vicario M. Mucosal pathobiology and molecular signature of epithelial barrier dysfunction in the small intestine in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2017;32(1):53-63.
3. Jurjus A, Eid A, Al Kattar S, Zeenny MN, Gerges-Geagea A, Haydar H, Hilal A, Oueidat D, Matar M, Tawilah J ,et al. Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: The links. *BBA Clin* 2016;5:16-24.
4. van der Heide F. Acquired causes of intestinal malabsorption. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2016;30(2):213-24.
5. Yu LC, Wang JT, Wei SC, Ni YH. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2012;3(1):27-43.
6. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ ,et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 2007;449(7165):1003-7.
7. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009;71:241-60.
8. Andersson-Rolf A, Zilbauer M, Koo BK, Clevers H. Stem Cells in Repair of Gastrointestinal Epithelia. *Physiology (Bethesda)* 2017;32(4):278-289.
9. Jackstadt R, Sansom OJ. Mouse models of intestinal cancer. *J Pathol* 2016;238(2):141-51.
10. Jiminez JA, Uwiera TC, Douglas Inglis G, Uwiera RR. Animal models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut Pathog* 2015;7:29.
11. Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Fontana L, Munoz-Quezada S, Gil A. In vitro cell and tissue models for studying host-microbe interactions: a review. *Br J Nutr* 2013;109 Suppl 2:S27-34.
12. Nath S, Desjeux J-F. Human intestinal cell lines as in vitro tools for electrolyte transport studies with relevance to secretory diarrhoea. 1991. 133-42 p.
13. Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986;68(9):1035-40.
14. Holt DJ, Chamberlain LM, Grainger DW. Cell-cell signaling in co-cultures of macrophages and fibroblasts. *Biomaterials* 2010;31(36):9382-94.
15. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(10):839-45.
16. Bokhari M, Carnachan RJ, Cameron NR, Przyborski SA. Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *J Anat* 2007;211(4):567-76.
17. Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, Sykes PH, Evans JJ. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. *Exp Cell Res* 2013;319(1):75-87.
18. Xu X, Farach-Carson MC, Jia X. Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnol Adv* 2014;32(7):1256-68.
19. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology and Therapeutics* 2016;163:94-108.
20. Woodcock J, Woosley R. The FDA critical path initiative and its influence on new drug development. *Annu Rev Med* 2008;59:1-12.
21. Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* 2013;18(5-6):240-9.

22. Fitzgerald KA, Malhotra M, Curtin CM, FJ OB, CM OD. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. *J Control Release* 2015;215:39-54.
23. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 2009;4(3):309-24.
24. Astashkina A, Grainger DW. Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2014;69-70:1-18.
25. Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *Journal of Translational Medicine* 2006;4:12-12.
26. Le Bivic A, Hirn M, Reggio H. HT-29 cells are an in vitro model for the generation of cell polarity in epithelia during embryonic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(1):136-40.
27. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ ,et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009;459(7244):262-5.
28. Foulke-Abel J, In J, Yin J, Zachos NC, Kovbasnjuk O, Estes MK, de Jonge H, Donowitz M. Human Enteroids as a Model of Upper Small Intestinal Ion Transport Physiology and Pathophysiology. *Gastroenterology* 2016;150(3):638-649 e8.
29. Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho QT, Ueno H, Toda S, Sugihara H, Fujimoto K, Weissman IL, Capecchi MR ,et al. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med* 2009;15(6):701-6.
30. Zachos NC, Kovbasnjuk O, Foulke-Abel J, In J, Blutt SE, de Jonge HR, Estes MK, Donowitz M. Human Enteroids/Colonoids and Intestinal Organoids Functionally Recapitulate Normal Intestinal Physiology and Pathophysiology. *J Biol Chem* 2016;291(8):3759-66.
31. Verfaillie C. Pluripotent stem cells. *Transfusion Clinique et Biologique* 2009;16(2):65-69.
32. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663-76.
33. Finkbeiner SR, Spence JR. A gutsy task: generating intestinal tissue from human pluripotent stem cells. *Dig Dis Sci* 2013;58(5):1176-84.
34. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, Hoskins EE, Kalinichenko VV, Wells SI, Zorn AM ,et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 2011;470(7332):105-109.
35. Takahashi Y, Sato S, Kurashima Y, Yamamoto T, Kurokawa S, Yuki Y, Takemura N, Uematsu S, Lai CY, Otsu M ,et al. A Refined Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Organoids. *Stem Cell Reports* 2018;10(1):314-328.
36. McCracken KW, Howell JC, Wells JM, Spence JR. Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc* 2011;6(12):1920-8.
37. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology* 2004;25(6):280-288.
38. Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor- κ B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol* 2009;25(2):92-9.
39. Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* 2011;21(1):146-58.
40. Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Research* 2011;21(1):146-158.
41. Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF- κ B in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2008;263(6):591-6.
42. Giuliani C, Napolitano G, Bucci I, Montani V, Monaco F. [Nf- κ B transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications]. *Clin Ter* 2001;152(4):249-53.

43. Mastropietro G, Tiscornia I, Perelmuter K, Astrada S, Bollati-Fogolin M. HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation. *Mediators Inflamm* 2015;2015:860534.
44. Carlsen H, Moskaug JØ, Fromm SH, Blomhoff R. In Vivo Imaging of NF-κB Activity. *The Journal of Immunology* 2002;168(3):1441.
45. Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 2009;27(3):543-9.
46. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 2007;131(5):861-872.
47. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.
48. Yusuf B, Gopurappilly R, Dadheech N, Gupta S, Bhonde R, Pal R. Embryonic fibroblasts represent a connecting link between mesenchymal and embryonic stem cells. *Dev Growth Differ* 2013;55(3):330-40.
49. Sheridan SD, Surampudi V, Rao RR. Analysis of Embryoid Bodies Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Means to Assess Pluripotency. *Stem Cells International* 2012;2012:9.
50. Hait WN. Anticancer drug development: the grand challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(4):253-4.
51. Justice BA, Badr NA, Felder RA. 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discov Today* 2009;14(1):102-107.
52. Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* 2005;5(9):675-88.
53. Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 2011;136(3):473-8.
54. Wong C, Vosburgh E, Levine AJ, Cong L, Xu EY. Human Neuroendocrine Tumor Cell Lines as a Three-Dimensional Model for the Study of Human Neuroendocrine Tumor Therapy. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* 2012(66):4218.
55. Hasebe Y, Okumura N, Koh T, Kazama H, Watanabe G, Seki T, Ariga T. Formation of rat hepatocyte spheroids on agarose. *Hepatology Research* 2005;32(2):89-95.
56. Sodek Katharine L, Ringuette Maurice J, Brown Theodore J. Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype. *International Journal of Cancer* 2008;124(9):2060-2070.
57. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols* 2009;4:309.
58. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay and Drug Development Technologies* 2014;12(4):207-218.
59. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 2010;148(1):3-15.
60. Schottelius AJ, Baldwin AS, Jr. A role for transcription factor NF-kappa B in intestinal inflammation. *Int J Colorectal Dis* 1999;14(1):18-28.
61. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF-kappaB, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* 2014;2(9):823-30.
62. Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009;460(7251):49-52.

63. Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H, Hochedlinger K. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 2009;41(9):968-76.
64. Zhang S, Cui W. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells* 2014;6(3):305-311.
65. Torres J, Watt FM. Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3. *Nat Cell Biol* 2008;10(2):194-201.
66. Dutta D, Heo I, Clevers H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends in Molecular Medicine* 2017;23(5):393-410.