



**Universidad**  
Zaragoza



**Facultad de Ciencias**  
**Universidad Zaragoza**

## TRABAJO FIN DE GRADO

PUESTA EN MARCHA DE UN MODELO IN VITRO 3D DE  
EPITELIO INTESTINAL COMO BASE DE UN MODELO DE  
CÁNCER DE COLON EN CHIP

ESTABLISHING OF A 3D IN VITRO MODEL OF  
INTESTINAL EPITHELIUM AS A BASIS OF A COLON  
CANCER MODEL IN CHIP

AUTOR

FERNANDO DÍEZ BALLARÍN

DIRECTORES

ESTELA SOLANAS VILLACAMPA

IGNACIO OCHOA GARRIDO

FACULTAD DE CIENCIAS

CURSO 2020-2021



## Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 El intestino grueso. Estructura.....	2
1.2 El cáncer de colon.....	3
1.3 Modelos para el estudio del cáncer de colon.....	3
1.3.1 Modelos Animales.....	3
1.3.2 Modelos In vitro.....	4
1.3.2.1 Cultivos de órganos.....	5
1.3.2.2 Cultivos celulares en 2D.....	5
1.3.2.3 Cultivos celulares en 3D.....	6
1.3.2.3.1 Esferoides.....	6
1.3.2.3.2 Organoides.....	7
1.3.2.3.3 Organ-on-chip (OoC).....	8
2. Objetivos.....	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1 Líneas celulares.....	10
3.2 Congelación de células Caco-2.....	10
3.3 Descongelación de células Caco-2.....	10
3.4 Formación de monocapa en pocillos de placa 96.....	11
3.5 Tinción azul alcian.....	11
3.6 Infección con Lentivirus.....	11
3.7 Siembra en chip.....	12
3.8 Integridad de la membrana con <i>Lucifer Yellow</i> .....	14
3.9. Tinción Hoechst.....	14
3.10. Inmunofluorescencia.....	15
3.11 Toma de imágenes en microscopio óptico, confocal y de fluorescencia.....	15
3.12 Estadística.....	16
4. Resultados.....	16
4.1 Densidad celular en pocillo de placa de 96.....	16
4.2 Producción de moco por HT29-MTX.....	16
4.3 Marcaje celular estable con lentivirus.....	18
4.4 Cálculo del coeficiente de permeabilidad con <i>Lucifer Yellow</i> .....	18
4.5 Seguimiento del cultivo durante 21 días.....	18
5. Discusión de resultados.....	20

Conclusiones .....	22
Conclusions .....	22
Referencias bibliográficas .....	23
ANEXOS .....	26
Anexo 1 .....	26
Anexo 2 .....	26
Anexo 3 .....	27
Anexo 4 .....	27
Anexo 5 .....	28

## Resumen

El cáncer de colon es un problema relevante para la salud pública, con una incidencia y una mortalidad elevada en todo el mundo. El desarrollo de nuevos modelos de estudio *in vitro* ha permitido superar importantes desventajas de modelos anteriores. Entre estos modelos se incluyen los modelos 3D de *Organ-On-Chip*. El objetivo del presente estudio fue recrear *in vitro* el epitelio de colon en un dispositivo microfluídico. En dicho modelo las células epiteliales se adhieren a una membrana porosa, que las separa a su vez de un canal inferior. El modelo será la base para el desarrollo posterior de un modelo *Organ-On-Chip* de cáncer de colon. Para ello se sembraron células Caco-2 o Caco-2:HT29-MTX (a un ratio 3:1, similar al ratio enterocitos:células caliciformes de colon) que se dejaron diferenciar durante 21 días. Sobre el modelo se valoró la diferenciación celular, la integridad del epitelio, la producción de moco y la evolución del epitelio en el tiempo. Se estableció una monocapa tanto con las células Caco-2 como Caco-2:HT29-MTX, que se mantuvo en cultivo durante 21 días. Las pruebas de azul alcian y de inmunofluorescencia para Muc-2 mostraron producción de mucina por las células HT29-MTX a 7 y 21 días, respectivamente. La permeabilidad del epitelio, mediante la técnica de *Lucifer Yellow*, similar a la observada en intestino y estudios previos, fue ligeramente mayor en las células Caco-2 con HT29-MTX, aunque no significativamente. Los resultados indican la formación de un epitelio similar al del colon, con una permeabilidad parecida y secreción de moco, si bien serán necesarios futuros estudios para una mejor caracterización.

Palabras clave: *Organ-On-Chip*, epitelio intestinal *in vitro*, HT29-MTX, Caco-2, moco, transporte paracelular

## Abstract

Colon cancer is a relevant public health issue, having a high incidence and mortality worldwide. The development of new *in vitro* models allowed to overcome important disadvantages seen in previous models. These models include *Organ-On-Chip* 3D models. The aim of this study was to recreate *in vitro* the epithelium in a microfluidic device. In these models, epithelial cells are attached to a porous membrane, which in turn separates them from a lower channel. This model will serve as a basis for the development of a subsequent *in vitro Organ-On-Chip* model of colon cancer. Caco-2 and HT29-MTX cells were seeded (at a 3:1 ratio, similar to the enterocytes:colon calyx cells ratio) and allowed to differentiate during 21 days in culture. Different tests were performed to assess cell differentiation, epithelial integrity, mucus production and epithelial evolution over time. It was possible to establish a monolayer with both Caco-2 and Caco-2:HT29-MTX cells and keep it in culture 21 days. Alcian blue staining and immunofluorescence tests for Muc-2 showed mucin production by HT29-MTX cells at 7 and 21 days, respectively. The permeability of the epithelium, studied by Lucifer Yellow technique, similar to that observed in the intestine and in concordance with previous studies, was slightly higher when cultured Caco-2 cells with HT29-MTX, although not significantly. The results indicate the formation of an epithelium similar to that of the colon, sharing alike permeability and secretion of mucus, although further studies will be needed for a better characterization.

Keywords: *Organ-On-Chip*, intestinal epithelium *in vitro*, HT29-MTX, Caco-2, mucus, paracellular transport

# 1. Introducción

## 1.1 El intestino grueso. Estructura

El intestino grueso, parte final del tubo digestivo, tiene una longitud de 30-40 cm cuando somos pequeños, creciendo hasta los 150 cm cuando somos adultos. Concretamente, empieza en la válvula ileocecal y termina en el borde anal, estando compuesto de 4 segmentos: apéndice vermiforme y ciego, colon (ascendente, trasverso, descendente y sigmoide), recto y canal anal (ver anexo 1).

La capacidad absorbente del intestino grueso es mucho menor que la del intestino delgado, si bien en el colon pueden absorberse cadenas cortas de ácidos grasos producidas por las bacterias anaeróbicas, proveyendo de energía al epitelio, así como grandes cantidades de agua. Siendo esta última su principal función (1).

A nivel histológico, las capas que forman su pared son desde el interior al exterior: la capa mucosa, la capa submucosa, capa muscular externa y capa serosa (ver anexo 2).

### *Mucosa*

La mucosa es la capa más interna formada a su vez por un epitelio, la lámina propia y la *Muscularis mucosae* (muscular de la mucosa). Es una capa gruesa, altamente vascularizada a nivel de la lámina propia. El epitelio es un epitelio cilíndrico simple formado principalmente por enterocitos. En este epitelio también se encuentran células caliciformes formadoras de mucina (especialmente importantes en el intestino grueso para la formación de las heces, llegando a suponer una cantidad equivalente a la cantidad de enterocitos a nivel de recto), así como células especializadas con funciones endocrinas llamadas células enteroendocrinas. Dentro de la mucosa encontramos formaciones cilíndricas que se invaginan hacia el interior formando criptas (tanto en intestino delgado como grueso), denominadas criptas de Lieberkhün, que se extienden hasta la *Muscularis mucosae* (ver anexo 2). Las criptas están revestidas de un epitelio más inmaduro que funciona principalmente como epitelio secretor más que absorbente. En la base de las criptas se encuentran las células madre pluripotentes que regenerarán el epitelio. La lámina propia es una capa de tejido conectivo laxo que proporciona el soporte estructural de la mucosa, pero también contiene muchos elementos celulares importantes para la absorción de nutrientes y la inmunidad. La *Muscularis mucosae* está formada por una fina capa de músculo liso en el límite de la mucosa y la submucosa (1).

### *Submucosa*

La submucosa es una capa de tejido conectivo denso, entre la *Muscularis mucosae* y la muscular externa. Contiene linfocitos, fibroblastos, mastocitos, sangre, vasos linfáticos y un plexo nervioso, el plexo submucoso o de Meissner. La submucosa apoya a la mucosa en las funciones especializadas de absorción de nutrientes, fluidos y electrolitos (1).

### *Muscular externa*

La muscular externa es la capa responsable de la contractibilidad y los movimientos peristálticos del intestino. Consiste en dos capas concéntricas de músculo liso, una circular y otra longitudinal. Entre dichas capas se encuentra el plexo de Auerbach o plexo muscular, parte del sistema nervioso entérico (1).

## Serosa

La capa serosa es la más externa de la pared intestinal y está compuesta por una capa simple de células mesoteliales respaldadas por tejido conectivo, la adventicia.

El intestino grueso tiene múltiples diferencias con el delgado. Principalmente, el intestino grueso es de mayor calibre, mayormente fijo en posición, contiene fibras musculares longitudinales externas que se unen en 3 bandas discretas llamadas “tenias”, no presenta ni pliegues circulares (válvulas conniventes o de Kerckring) ni vellosidades a nivel de la mucosa, aunque sí Criptas de Lieberküm, y posee un mayor número de células caliciformes en el epitelio productoras de moco para fluidificar el paso de las heces.

## 1.2 El cáncer de colon

La incidencia del cáncer colorrectal se incrementa con la edad, con el 90% de caso en personas mayores de 50 años (edad media de aparición 70 años), si bien también se puede dar en personas de menor edad. Por sexos, aparece con más frecuencia y más tempranamente en los varones que en las mujeres (2).

A nivel mundial, según datos de 2018, el cáncer colorrectal fue el tercero en incidencia en ambos sexos por detrás del cáncer de pulmón y de mama (3). Sin embargo, en España, resultó el tumor más diagnosticado en el año 2019 en ambos sexos (44.937 nuevos casos), siendo el segundo en varones después de próstata y el segundo en mujeres después de mamá (4). En relación con la mortalidad, de acuerdo con los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (INE) en diciembre de 2018 el cáncer de colon fue el segundo tumor responsable del mayor número de muertes por cáncer en ambos sexos (4).

Existente diferentes factores de riesgo asociados al cáncer colorrectal, algunos de los cuales podemos cambiar, como el sobrepeso o el consumo de alcohol y tabaco, y otros que no podemos cambiar, como el envejecimiento o los síndromes hereditarios (5).

Los tumores malignos colorrectales pueden originarse en cada una de las capas, siendo el más frecuente el adenocarcinoma (4).

En el adenocarcinoma, el cáncer se origina a partir de un pólipo (adenomatoso o hiperplásico) en la mucosa. Este proceso comienza con una cripta aberrante, que evoluciona hacia una lesión precursora (un pólipo), y que eventualmente progresa hacia el cáncer colorrectal. Actualmente, se supone que la célula de origen de la mayoría de los cánceres colorrectales es una célula madre o progenitora. Estas células, que residen en las criptas, van acumulando de forma progresiva alteraciones genéticas y epigenéticas que inactivan los genes supresores de tumores y activan oncogenes (6). Así, algunas de las rutas alteradas son:  $\beta$ -catenina/Wnt, PI3K/AKT/PTEN, GSK 3B, NF- $\kappa$ B, Raf/Ras... (7).

## 1.3 Modelos para el estudio del cáncer de colon

### 1.3.1 Modelos Animales

Mediante el uso de animales, los investigadores pueden realizar experimentos que serían impracticables o no éticos si se hicieran en humanos (8). Hoy en día siguen siendo una parte imprescindible en la investigación, a pesar de todos los problemas éticos que plantea su uso. Ahora que estamos más concienciados, se intenta utilizar cada vez menos animales y que sufran lo menos posible. Sus derechos quedan recogidos en la Declaración Universal de los Derechos de

los Animales de 1977 (9). Como consecuencia, requieren de cuidados especializados por parte de personal cualificado; además de una alta inversión inicial para la compra de los animales y jaulas, y para su cuidado (alimentaciones, cuidadores cualificados, instalaciones), lo que supone un encarecimiento del uso de estos modelos. Por otro lado, además, existen diferencias fisiológicas significativas entre humanos y animales que dificultan muchas veces la extrapolación de los resultados. No obstante, a pesar de los inconvenientes nombrados, son modelos que permiten una mejor evaluación de la seguridad, toxicidad y eficacia de un medicamento que los clásicos modelos *in vitro*.

En el estudio del cáncer de colon los modelos animales han tenido y tienen una gran importancia. Sobre todo, los ratones y ratas, debido a factores como el tamaño del animal, el tiempo de reproducción o la distancia filogenética... En sus inicios, para poder estudiar la enfermedad, se usaban modelos en los que se administraban carcinógenos a los animales. Sin embargo, estos modelos inducidos químicamente no resultan homogéneos, y rara vez se observan las propiedades invasivas (metástasis) del cáncer. En cuestión de cáncer de colon no hay constancia en la literatura de que se haya registrado una metástasis en modelos inducidos químicamente.

Actualmente, gracias al gran avance en el conocimiento de las rutas genéticas alteradas en el cáncer de colon, los modelos más utilizados son los modelos con animales modificados genéticamente que permiten estudiar los mecanismos de la carcinogénesis colorrectal. Estos modelos, en sus inicios, no mostraron buenos resultados hasta que Sødring *et al.* (10) cambiaron el sustrato genético de ratones C57BL/6 a A/J, resultando en un aumento de la formación de tumores en colon, con un número razonable de carcinomas. Ya durante el s. XX se hicieron varias modificaciones en el genoma que alteraban la expresión de genes importantes tanto para la supresión como para la inducción de tumores, como p53, KRAS, APC.... La ventaja de este tipo de modelos frente a los anteriormente utilizados es que los animales sí que pueden presentar metástasis. No obstante, a pesar de las ventajas mencionadas, estos sistemas presentan ciertas limitaciones. El desarrollo del cáncer es un proceso gradual con una mutación conductora que provoca mutaciones accesorias, y esto solo es parcialmente reflejado en estos modelos de ratones. Además, el número de mutaciones combinadas es limitado en ratón, ya que el fenotipo resultante muestra una esperanza de vida drásticamente reducida. Otro aspecto importante, es que los métodos de transfección son complicados y hay que seguir investigando en el desarrollo de protocolos más sencillos (11). Además, en el caso del cáncer de colon, existe una limitación importante que es que estos modelos no pueden reproducir las interacciones huésped-microbiota por las diferencias en la dieta y en la población microbiana del intestino, componente determinante en el desarrollo y progresión de esta enfermedad (12). Teniendo en cuenta todo lo anterior y que su uso para en estudios preclínicos es limitado por una falta de heterogeneidad genética y por discrepancias con el desarrollo del tumor humano y los problemas éticos y económicos que representan se ha hecho necesario el desarrollo y uso de modelos *in vitro* capaces de simular la patofisiología del cáncer.

### 1.3.2 Modelos *In vitro*

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Una vez alcanzada la confluencia es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado cuando su morfología y fisiología son más parecidas a su estado original (9).



Por un lado, tenemos el crecimiento en monocapa, que significa que las células crecen adheridas al sustrato (como el plástico de los recipientes). Estas líneas celulares no inician la proliferación hasta que se han adherido. Este es el modo de proliferación de la mayor parte de las células.

Por el otro, el crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato porque son independientes del anclaje. Es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores (13).

Los modelos *in vitro* han ido evolucionando desde sus inicios con el cultivo de órganos, seguidos de los cultivos 2D hasta la explosión en las últimas décadas de modelos más biomiméticos que simulan el entorno tridimensional de las células en el tejido, como son los cultivos 3D.

#### 1.3.2.1 Cultivos de órganos

El cultivo de órganos es un modelo que permite mantener, durante un tiempo limitado, la estructura propia del tejido *in vivo*, conservando las interacciones histológicas, con lo que los tipos celulares permanecen diferenciados (14). Por ende, son una buena réplica del tejido de origen y ofrecen múltiples ventajas para estudios de mecanismos fisiológicos como daño celular, secreción, diferenciación y desarrollo estructural. Los órganos pasan de estar *in vivo* a ser mantenidos *in vitro* por largos periodos de tiempo. Este tipo de modelos han sido eficazmente utilizados para caracterizar las interacciones histótípicas entre los diferentes tipos celulares dentro del órgano o tejido (15).

Relacionado con el colon, el primer cultivo de larga duración fue reportado en 1978 por Autrup *et al.* (16) y Shamsuddin *et al.* (17). Este tipo de cultivos a tan largo plazo suelen perder con el tiempo la arquitectura propia del tejido *in vivo*. Sakamoto *et al.* (18), en 1991, mantuvo un cultivo de colon durante 3 semanas con su arquitectura criptica. Si bien, a partir de las 3 semanas de cultivo, iba perdiendo gradualmente esa forma característica y las células epiteliales de la superficie eran reemplazadas por una monocapa de células cilíndricas o cuboideas mezcladas con células productoras de mucina. No se han evidenciado cambios morfológicos carcinogénicos durante el transcurso del período de cultivo del explante disponible hasta ahora. Las técnicas utilizadas en este tipo de cultivo se han ido perfeccionando de manera que se ha logrado mantener un cultivo durante 3 meses o más mediante xenotransplante a ratones ‘nude’ (8).

Uno de los mayores inconvenientes del cultivo de órganos es la dificultad de obtención de las muestras y la escasa viabilidad de los tejidos en cultivo (19), además de que tampoco permite la propagación, ya que el crecimiento de las células se produce únicamente en la periferia. Es un tipo de cultivo difícil de mantener durante largos periodos de tiempo, lo que limita la reproducibilidad del experimento (20).

#### 1.3.2.2 Cultivos celulares en 2D

Para poder superar las dificultades del cultivo de órganos y poder mantener las células un tiempo ilimitado, se desarrollaron otras técnicas de cultivo celular 2D.

A lo largo de los últimos años, los estudios preclínicos en cáncer se han basado en líneas de células cancerosas cultivadas *in vitro* y xenoinjertos derivados de pacientes. Estos pueden ser cultivados en 2D o 3D. Estas células entre ellas exhiben una expresión génica similar, así como un perfil genético parecido, pudiendo ser propagadas *in vitro* manteniendo su fenotipo de forma estable, por lo que, tienen un gran potencial para el modelado de enfermedades como el cáncer (21). En los últimos años, se han ido acumulando evidencias científicas que apoyan el papel central de las

células madre cancerosas (CSC) para el desarrollo tumoral. Así lo reflejan Matther *et al.* en su revisión sobre las CSC y los genes involucrados en la inducción y mantenimiento de la pluripotencia de estas células. Las células madre LGR5<sup>+</sup> o ALDH-1<sup>+</sup> son ampliamente utilizadas en la modelización del CRC (22).

Las líneas celulares han jugado un rol importante en el esclarecimiento de las rutas de señalización del cáncer. Una de las primeras usadas es las HeLa, derivada de un cáncer cervical en 1951. Muchas otras líneas humanas están disponibles comercialmente y se siguen usando a día de hoy. Algunas de ellas son: COLO 205, DLD-1, HT29, Caco-2... (23).

Sin embargo, en general, estos cultivos carecen de ciertas características presentes *in vivo*, entre ellas, la más significativa para lo que nos ocupa es la arquitectura específica del tejido, lo que puede afectar a la proliferación celular y a su respuesta a estímulos externos. Tampoco presentan ciertas interacciones complejas, lo que da lugar a un fallo en la réplica de la agresividad y la heterogeneidad de la enfermedad, haciéndolos poco fiables como modelos para predecir la respuesta a fármacos.

Las líneas celulares humanas han sido imprescindibles para la determinación de la importancia de las rutas involucradas en la enfermedad y para la selección y caracterización de fármacos, ya que los cultivos celulares guardan muchos aspectos genéticos, fenotípicos y epigenéticos de las enfermedades humanas. Sin embargo, estos modelos no son capaces de representar adecuadamente el microambiente de la enfermedad *in vivo*, la diferenciación celular, las funciones específicas del tejido ni la heterogeneidad natural celular presente en un tumor primario. Todos estos inconvenientes han provocado el desarrollo de nuevos sistemas *in vitro* capaces de simular a un mayor nivel las distintas enfermedades humanas, entre ellas el cáncer de colon (24).

### 1.3.2.3 Cultivos celulares en 3D

Los cultivos celulares 3D son una forma más fiable y fisiológicamente más relevante que los cultivos 2D (21). Consisten en el cultivo de células de tal manera que éstas expresen las características propias de toda su membrana, interaccionando con el entorno en las tres dimensiones. Los cultivos celulares en 3D permiten que las células se comporten de la manera en que lo harían en sus órganos o tejidos de origen, siendo la información obtenida en este tipo de modelos de mayor calidad y cantidad. Además, simulan la arquitectura del órgano, pudiendo establecer la heterogeneidad celular del mismo e incluso simular el microambiente celular, y por tanto también del tumor. La importancia del cultivo 3D reside en que las células se encuentran en un sistema que mantiene la integridad y estructura del tejido, de forma que las interacciones entre células están garantizadas (21). Asimismo, permiten el co-cultivo con otros tipos celulares. Todos estos aspectos positivos, les hacen buenos sistemas para seguir estudiando rutas tumorales o dianas terapéuticas.

No obstante, estos modelos no pueden adaptarse a todos los tipos celulares y requieren generalmente de una pre-disociación para conseguir células aisladas, excepto en los organoides. Otra limitación importante en ciertos tipos de cultivos es la difusión de nutrientes y oxígeno. Esta limitación se ha intentado paliar con el desarrollo de otras nuevas tecnologías 3D, como los esferoides o los modelos microfluídicos (21).

#### 1.3.2.3.1 Esferoides

Son construcciones celulares esféricas, basadas en una zona externa de proliferación rodeando una zona interna quiescente (ver anexo 3). La co-existencia de ambas partes permite simular la heterogeneidad celular observada en los tumores sólidos. Zoetemelk *et al.* generaron un esferoide

donde integraban el co-cultivo de diferentes tipos celulares humanos además de las propias células de carcinoma colorrectal (CRC), como son fibroblastos y células endoteliales en una ratio clínico relevante (25). Gracias a distintos ensayos, Jeppesen *et al.* (26) determinaron que el tamaño del fragmento tumoral inicial no afectaba a la tasa de éxito de la formación del esferoide ni a las características celulares del mismo, el cual preserva aspectos moleculares e histológicos del CRC. Sin embargo, la composición del medio de cultivo sí que tiene un gran impacto en la tasa de éxito para el mantenimiento de una alta viabilidad de los esferoides, si bien los protocolos disponibles siguen siendo inconsistentes (21).

Los esferoides tumorales tienen un potencial único como modelo para probar nuevas estrategias de tratamiento en un contexto celular 3D y un medio fisiopatológico (27).

Sin embargo, pese a la gran ventaja de este tipo de modelo en el estudio del CRC, los esferoides de CRC no cuentan con la presencia de células inmunes. Dada la importancia del sistema inmune en el desarrollo y evolución del tumor, y también en la efectividad del tratamiento, una nueva dirección de trabajo sería el poder desarrollar esferoides que integrasen en cierta forma la potencial respuesta inmune (21). Así, recientemente, esferoides de CRC derivados de pacientes han sido co-cultivados exitosamente con linfocitos del mismo paciente, de forma que linfocitos T que se infiltraban en el esferoide inducían la muerte de las células tumorales y una alteración de la estructura 3D del esferoide (28).

A pesar de todos los avances y ventajas que ofrece este sistema, también tiene algunos inconvenientes. Este modelo falla en replicar la fisiología *in vivo* de la arquitectura original del tumor, la composición celular, así como la respuesta a diferentes estímulos exógenos. Próximos avances en esta tecnología permitirán estudiar más a fondo la respuesta inmune contra el tumor.

#### 1.3.2.3.2 Organoides

El desarrollo y mejora de la tecnología de los cultivos 3D permiten a los diferentes tipos celulares mostrar sus propiedades de auto-organización. Así, los organoides reflejan las características estructurales y funcionales clave de los órganos, por lo que pueden utilizarse para modelar el desarrollo de los órganos humanos y diferentes patologías, además de para predecir la respuesta a fármacos. De hecho, el avance en los organoides ha abierto nuevas vías para la medicina regenerativa y, junto a la tecnología de edición, para la terapia génica. Los organoides también podrían cultivarse a partir de muestras metastásicas para identificar los mecanismos de la metástasis del cáncer.

En el caso de modelos intestinales, los organoides consisten meramente en un epitelio simple altamente polarizado, que encierra un lumen central, según describieron Sato *et al.* (29) y Grün *et al.* (30) y en el que se desarrollan las criptas intestinales. Sato *et al.* reportaron la necesidad de añadir Wnt3a para conseguir el desarrollo de las criptas de colon porque el epitelio de colon no produce suficiente. En el estudio de Grün *et al.* (30), en el que intentaban caracterizar todos los tipos celulares del intestino, se observó que la cara basal de las células se encontraba orientada hacia la matriz extracelular, matrigel circundante y que los bordes en cepillo de los enterocitos conformaban la superficie luminal, mientras que la secreción de las células de Paneth y calciformes se producía hacia el lumen. Estos autores generaron organoides en el que todos los tipos celulares epiteliales estaban representados en ratios fisiológicos. Dichos organoides eran notablemente estables, tanto genética como fenotípicamente y podían mantenerse en cultivo durante un largo periodo de tiempo (31).

En un estudio realizado por Clevers *et al.* (31) intentaron adaptar el cultivo de un organoide epitelial, al que denominaron “mini-gut”, a partir de células madre que conseguían diferenciar. En el estudio se observó que los componentes esenciales para su formación eran: 1) una fuente de Wnt, 2) un potente activador de la señalización del receptor quinasa como el EDF, 3) la inhibición de las señales BMP/Tgfb y 4) el matrigel. También observaron que pequeños fragmentos de tejido primario servían como material de partida en lugar de las células Lgr5+ aSCs purificadas. Esto era posiblemente debido a que las condiciones de cultivo mimetizaban una respuesta a daño, la cual en muchos tejidos puede reclutar células de nuevo a un estadio de células madre (32).

Los cultivos de organoides también son usados para crear modelos de CRC, ya sea directamente a partir del tejido canceroso o a partir de la modificación genética de tejido normal de intestino. Los organoides humanos de cáncer obtenidos a partir de células tumorales presentan una señalización activada de Wnt y, debido a esto, no lo necesitan para el crecimiento. La edición del gen APC (*Adenomatous polyposis coli*) mediada por CRISPR/CAS9 seguida de la introducción de mutaciones activadoras en KRAS y PIK3CA da lugar a organoides humanos isogénicos que modelan la secuencia adenoma-carcinoma en el CRC humano (33).

A pesar de todas sus ventajas, el cultivo de organoides presenta algunos inconvenientes. Debido a su estructura auto-organizadora, pueden derivar en diferentes fenotipos entre organoides, y puede inducir ruido de fondo en las pruebas de *screening* de fármacos. Otra desventaja importante es el tiempo que se tarda actualmente en establecer un organoide. Encima, la falta de algunos componentes, como el estroma tumoral o el microbioma, sigue siendo una importante limitación de los modelos, al igual que la difusión de nutrientes y oxígeno a las capas más internas (21).

#### 1.3.2.3.3 Organ-on-chip (OoC)

Para solucionar gran parte de los problemas existentes en los modelos presentados anteriormente, se empezó a desarrollar una nueva tecnología que combinaba los cultivos celulares convencionales, los modelos animales preclínicos y los ensayos clínicos en pacientes, recibiendo el nombre de *Organ-on-Chip* (OoC). Estos modelos pueden servir para la implantación de una medicina personalizada y así como para el cribado de nuevos fármacos y el estudio de la respuesta a la terapia contra el cáncer.

Los OoC son dispositivos de cultivo microfluídicos formados por microcanales perfundidos albergando células vivas (ver anexo 4). Son capaces de replicar la arquitectura del órgano y la fisiología que caracterizan al órgano *in vivo* (21). Mediante una combinación de biología celular, ingeniería y tecnología de biomateriales, el microambiente del chip simula el del órgano en el cuerpo (34).

Mediante esta tecnología se pueden cambiar parámetros celulares, moleculares, químicos y biofísicos de una manera controlada, individualmente o en combinaciones precisas, que permiten el estudio de cómo estos contribuyen al desarrollo de las enfermedades modelizadas, como puede ser el cáncer, a la progresión de las mismas y a la respuesta terapéutica de determinados fármacos.

Los modelos clásicos de intestino con células epiteliales humanas en estático sobre membranas porosas recubiertas de matriz extracelular dentro de dispositivos “trans-well” usados durante años no permiten simular algunas de las propiedades del intestino o sus funciones. Esto ha llevado al desarrollo en los últimos años de chips intestinales de mayor complejidad que incluyen canales revestidos de endotelio vascular humano, células inmunes o bacterias patógenas, que permiten la interacción entre ellos y simulan de una forma mucho más veraz el microambiente intestinal (21).

En este modelo de estudio, la aplicación neumática de succiones permite distintas deformaciones del aparato, asemejando los movimientos peristálticos del intestino. Bajo estas condiciones, las células son capaces de desarrollarse y crecer espontáneamente formando vellosidades, a diferencia del crecimiento en monocapa que tendrían en un cultivo convencional 2D. Este hecho supone, un importante avance, en comparación a los organoides que no experimentan este cambio de forma, ni están sometidos a fuerzas mecánicas.

Para imitar mejor la forma 3D del intestino humano, se han utilizado métodos de micromoldeado para formar andamios poliméricos en estructuras con forma de vellosidad. En un modelo creado por Kyu-Young *et al.* (35), se ha demostrado que el cultivo de Caco-2 en estas superficies favorece la formación de un epitelio con vellosidades, lo que viene acompañado de una mayor absorción de compuestos farmacológicos. A pesar de los esfuerzos, este modelo no permitió analizar la función de la barrera intestinal debido a que el material polimérico bloqueaba la membrana basolateral. En otro modelo, creado por Pranjul *et al.* en 2016, implementaban al cultivo de Caco-2 otro factor del microambiente tumoral: la microbiota (36).

Otro logro de los *Organ-on-Chip* fue publicado por Kassendra *et al.* y consistía en la integración de organoides en el dispositivo, resultando en una mayor similitud a la situación *in vivo*. Estos autores fueron capaces de recrear las funciones intestinales ‘normales’ gracias a la adición en el modelo de un flujo de fluidos y movimientos similares al peristaltismo, junto con células inmunes en un compartimento del dispositivo (37).

Por tanto, los dispositivos microfluídicos pueden también servir como plataformas fiables para la evaluación de la toxicidad de fármacos, dada su alta capacidad de mimetizar las estructuras y funciones *in vivo*. Sin embargo, con estos modelos, solo se consideran las respuestas de los tejidos/órganos sin tener en cuenta que en la realidad hay interacciones multiorgánicas, lo cual es crucial para evaluar la farmacocinética y la farmacodinámica de los fármacos. Para resolver este problema se han desarrollado en los últimos años los chips de múltiples órganos (‘body-on-chip’). Esta tecnología resume numerosas interacciones de órganos en una superficie limitada, manteniendo el mayor grado de similitud con la situación *in vivo*. A diferencia del OoC, estos sistemas no suelen necesitar el uso de bombas, debido a que el efecto de la gravedad es suficiente para impulsar el flujo de fluidos y así simular mejor el flujo fisiológico (21).

## 2. Objetivos

Este trabajo se engloba dentro de un proyecto mayor que tiene como fin el desarrollo de un modelo *in vitro Organ-On-Chip* de cáncer de colon en dispositivos microfluídicos. Dentro de este objetivo futuro, el presente trabajo tiene como meta general el generar un modelo *Organ-On-Chip* de epitelio sobre un dispositivo microfluídico con membrana porosa que simule las características de la barrera epitelial del intestino a nivel de colon.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Establecer una monocapa mediante co-cultivo de células de líneas de cáncer de colon, Caco-2 y HT29-MTX (productoras de moco) en dispositivos microfluídicos sobre membrana porosa.
- Diferenciar la monocapa a un fenotipo que simule el del epitelio del intestino grueso.
- Evaluar las características del modelo resultante, en cuanto a permeabilidad del epitelio y producción de moco.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Líneas celulares

Se iniciaron cultivos de las líneas celulares humanas de cáncer de colon, Caco-2, (ATCC), y HT29-MTX (productoras de moco), gentilmente cedidas por el laboratorio de Estudios con modelos celulares del centro tecnológico AINIA. La línea celular Caco-2 fue establecida en la década de los 70 por Jorgen Fogh en el Instituto de investigación contra el cáncer Sloan-Kettering a partir de una muestra de adenocarcinoma colorrectal humano. Esta línea celular se caracteriza porque una vez alcanzan la confluencia comienzan a polarizarse adquiriendo características propias de los enterocitos, como la expresión de lactasa, aminopeptidasa N, dipeptidilpeptidasa... Crecen en cultivo como una monocapa adherente de células epiteliales que crean uniones estrechas entre ellas (38). Las células HT29-MTX son células tipo caliciforme, que provienen de la línea celular de adenocarcinoma de colon HT29. Estas células cuando se tratan con metotrexato se diferencian a células secretoras de mucina (39). A lo largo de todo el proceso, ambas líneas se cultivaron en medio DMEM rico en glucosa (4,5 mg/l) (Lonza) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco), 1% de glutamina (Lonza), 1% de aminoácidos no esenciales (Lonza) y 1% de antibiótico (100UI penicilina y 100µg estreptomycin/ml, Lonza). Ambos tipos celulares, tras descongelarlos, se expandieron en frascos de cultivo T25 (Corning) hasta que alcanzar un 90% de confluencia. Posteriormente, se fueron subcultivando para mantenerlas en cultivo hasta que eran necesarias a una ratio 1/7 en un incubador a 37°C y con una atmosfera de aire con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las Caco-2 se usaron desde el pase 5 al 30 y las HT29-MTX desde el 9 al 36.

Para el subcultivo de las células, éstas se lavaban dos veces con 200 µl/cm<sup>2</sup> de PBS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (Lonza), se incubaban 5 minutos a 37°C en una solución de disociación tripsina-Versene (EDTA) 1x neutralizando a continuación con 120 µl/cm<sup>2</sup> de medio completo. Posteriormente, se centrifugaban a 200 x g durante 5 minutos y el pellet celular se diluía de nuevo en medio completo para hacer el subcultivo o contar el número de células necesarias para la prueba a realizar. El conteo celular se realizó mediante cámara de Neubauer.

Todos los trabajos con las células fueron realizados en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar de bioseguridad tipo II (Telstar).

### 3.2 Congelación de células Caco-2

Para el mantenimiento de las células por largos periodos de tiempo, las congelamos en nitrógeno líquido (criopreservación). Para ello tras la centrifugación una vez tripsinizadas las células (1x10<sup>6</sup> de células) fueron suspendidas en 900 µl de medio completo y 100 µl de DMSO (Sigma) en crioviales. Estos se congelaron en un contenedor de congelación con isopropanol (para asegurar un descenso de temperatura de 1°C por minuto) a -80°C. Transcurridas 24 horas, las células en los crioviales fueron transferidas a tanque de N<sub>2</sub> líquido. En la congelación celular resulta crucial que la temperatura descienda gradualmente para evitar la formación de cristales en el interior celular que podría resultar en pérdida de viabilidad.

### 3.3 Descongelación de células Caco-2

Para la descongelación de las células, en un falcon de 15 ml añadimos 5 ml de medio DMEM completo. A continuación, sacamos del tanque de nitrógeno líquido los viales y los introducimos en un baño de agua a 37°C hasta su descongelación. Entonces, pasamos el volumen completo del criotubo al falcon de 15 ml con el medio y centrifugamos 5 minutos a 200 x g para eliminar el DMSO, que puede resultar tóxico para las células. Por último, resuspendemos el pellet celular resultante en el volumen de medio deseado.

### 3.4 Formación de monocapa en pocillos de placa 96

Tuvo como objetivo la determinación del tiempo que tardaban las Caco-2 en formar una monocapa en placa de 96 pocillos (superficie/pocillo igual que la de la cámara de siembra del dispositivo microfluídico a usar posteriormente) desde diferentes concentraciones celulares iniciales.

Tras levantar las células del flask T25, se sembraron en placa de cultivo celular de 96-pocillos Corning) a una densidad de 5000, 10000, 20000 y 40000 cel/pocillo y un volumen total por pocillo de 200  $\mu$ l de medio, con cuatro pocillos de siembra por cada concentración. Las células sembradas fueron incubadas en incubador a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, observándose diariamente mediante microscopio invertido hasta alcanzar la formación de monocapa.

### 3.5 Tinción azul alcian

La tinción de azul alcian es utilizada para ver mucopolisacáridos, como los secretados por la línea celular HT29-MTX. No solo tiñe mucopolisacáridos, también es utilizado para otras mucosustancias ácidas. Se tiñen de azul por la presencia de cobre en la molécula (ver anexo 5) (40). Es un método de tinción ampliamente extendido en histología en combinación con microscopía óptica.

En placas de 6 y 24 pocillos pusimos cubres previamente autoclavados y sembramos  $3 \times 10^5$  cel/pocillo. Lo dejamos crecer hasta que vimos la formación de una monocapa sobre el cubre. Teñimos los cubres a 1, 7, 14 y 21 días desde la formación de la monocapa. Lavamos 2 veces con PBS (1 ml/pocillo en placa de 6). A continuación, fijamos con paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v disuelto en agua destilada) durante 25 minutos a temperatura ambiente (1 ml/pocillo). Lavamos con PBS 3 veces y teñimos con una solución de azul alcian 0,1% (p/v, pH=2.5) en ácido acético al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. Para finalizar, lavamos 3 veces con PBS y ponemos el cubre en un portaobjetos para visualizar los resultados en el microscopio.

### 3.6 Infección con Lentivirus

El objetivo de este protocolo fue conseguir la expresión estable de un fluorocromo que nos permitiera observar las células en el chip mediante fluorescencia. Las células Caco-2 se infectaron con lentivirus codificando para m-cherry y las células se infectaron con lentivirus codificando para GFP.

Todos los trabajos con lentivirus se realizaron en laboratorio de bioseguridad de tipo II usando las medidas de bioseguridad oportunas. Una transfección estable se consigue mediante la integración del ADN portado por el lentivirus en el ADN genómico de las células Caco-2. También podríamos haber hecho una infección con adenovirus, pero el genoma se introduce en el núcleo y se queda en forma episomal. Solo duraría la modificación 14 días aproximadamente, de forma que perderíamos la fluorescencia antes de terminar el cultivo. De esta manera se consigue transmitir la modificación de generación en generación y evitar el marcaje cada vez que lo necesites. El lentivirus se introduce en la célula y libera su material genético en el citoplasma. Este será internalizado al núcleo y se incorporará al DNA nuclear al azar. Habrá células que mueran por la infección, otras que no expresen la modificación (por caer en una región no codificante o insertarse múltiples copias en tándem) y otras que sí. Estas últimas son las que nos interesan.

El día de la transducción preparamos protamina a 1 mg/ml en agua Mili-Q. La protamina es un agente catiónico que propicia una mejor adhesión de los lentivirus. Filtramos la solución para esterilizar con una jeringa y un filtro de 0,2  $\mu$ m de poro.

Para la transducción las células habían sido sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning) hasta 60% de confluencia. A continuación, quitamos el medio en el que estaban las células y añadimos medio libre de suero (OPTI-MEN, Gibco) para evitar la inhibición de la transducción por el suero fetal del medio. Se probaron 12 condiciones de transfección diferentes, usando 2 pocillos de placa de 24 pocillos para cada una. Las soluciones preparadas se muestran a continuación:

- Control sin lentivirus:
  - o 0  $\mu$ l de protamina + 500  $\mu$ l de medio
  - o 2,5  $\mu$ l de protamina + 497,5  $\mu$ l de medio
  - o 5  $\mu$ l de protamina + 495  $\mu$ l de medio
- Lentivirus a una concentración 1:5
  - o 100  $\mu$ l de solución con lentivirus + 0  $\mu$ l de protamina + 400  $\mu$ l de medio
  - o 100  $\mu$ l de solución con lentivirus + 2,75  $\mu$ l de protamina + 397,5 de medio
  - o 100  $\mu$ l de solución con lentivirus + 5  $\mu$ l de protamina + 395 de medio
- Lentivirus a una concentración 1:10
  - o 50  $\mu$ l de solución con lentivirus + 0  $\mu$ l de protamina + 450  $\mu$ l de medio
  - o 50  $\mu$ l de solución con lentivirus + 2,5  $\mu$ l de protamina + 447,5  $\mu$ l de medio
  - o 50  $\mu$ l de solución con lentivirus + 5  $\mu$ l de protamina + 445  $\mu$ l de medio
- Lentivirus a una concentración 1:50
  - o 10  $\mu$ l de solución con lentivirus + 0  $\mu$ l de protamina + 490  $\mu$ l de medio
  - o 10  $\mu$ l de solución con lentivirus + 2,5  $\mu$ l de protamina + 487,5  $\mu$ l de medio
  - o 10  $\mu$ l de solución con lentivirus + 5  $\mu$ l de protamina + 485  $\mu$ l de medio

Añadimos 250  $\mu$ l de las soluciones y 250  $\mu$ l de medio OPTI-MEM en cada pocillo. Incubamos durante 48 horas y cambiamos el medio al completo. Cuando las poblaciones de células resistentes alcanzaron la confluencia, hicimos dilución al límite para la selección. La presencia de células infectadas y la eficacia de la infección se determinó mediante examen de las células con microscopio de fluorescencia (Leica).

### 3.7 Siembra en chip

Para este protocolo utilizamos dispositivos microfluídicos de la empresa aragonesa BEOChip. Los dispositivos consisten en una plataforma de cultivo. En concreto se utilizó el modelo Be-Transflow por ser un modelo que permite el contacto a través de una membrana porosa de policarbonato de una cámara superior (donde irá el epitelio intestinal del modelo propuesto) y un canal inferior (donde está previsto poner en un futuro el endotelio vascular para simular la interacción epitelio intestinal-vasculatura) (figura 1).

Es fácil de usar y de implementar, siendo compatible con cualquier tipo de microscopía óptica por su formato de portaobjetos. Además, su volumen es idéntico al de los pocillos de las placas de 96 para facilitar la transición al dispositivo *Betransflow*. Los cultivos celulares utilizados pueden recuperarse fácilmente para una mayor experimentación, así como para extraer la membrana con células para su procesamiento histológico (41).

En este caso, el tamaño de poro de la membrana porosa es de 8  $\mu$ m y el área del pocillo (0,3249  $\text{cm}^2$ ) es similar a la del pocillo de las placas de 96 (0,32). En el pocillo de siembra del chip caben hasta 195  $\mu$ l, según las especificaciones técnicas de BEOChip (41).



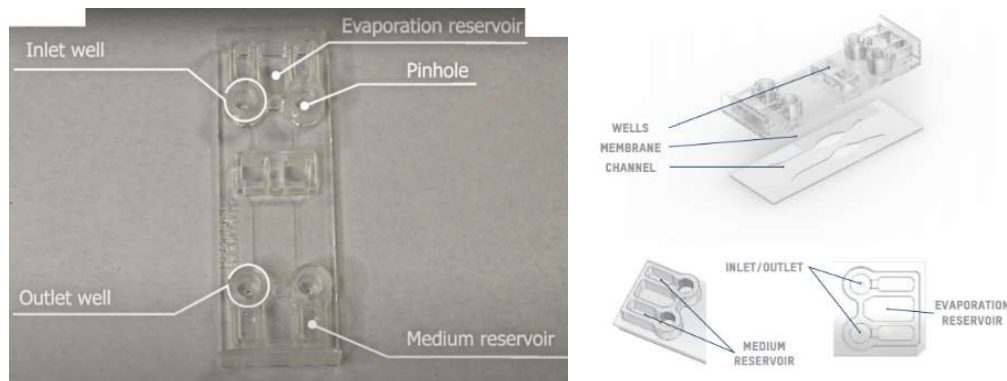


Figura 1. Dispositivo Be-transflow de BEOnChip utilizado para la siembra en chip de Caco-2 y HT29-MTX. (41)

Las células se siembran en los dos pocillos centrales, donde se encuentra la membrana que separa el canal inferior y el pocillo o cámara superior y sobre la que se apoyan y adhieren las células. El tamaño de poro de la membrana elegido fue de  $8\ \mu\text{m}$  para permitir en modelos posteriores la migración celular del tumor. Ponemos medio por debajo y por encima de la membrana. Para ponerlo por debajo, se añade por el *pinhole*  $50\ \mu\text{l}$  y añadimos más medio a los reservorios. Al reservorio de evaporación añadimos PBS ( $300\ \mu\text{l}$ ).

Para sembrar en el chip, primero levantamos las células Caco-2 y HT29-MTX. Para poder seguir las células en el tiempo, previamente a la siembra las células fueron marcadas con un marcador fluorescente. Debido a que no se pudo conseguir células fluorescentes estables debido a la contaminación de los cultivos de Caco y Ht29-MTX infectadas, las células se marcaron con un marcador de membrana. Las células Caco-2 con Vybrant-Dil (Invitrogen) y las células HT29-MTX con Vybrant-Dio (Invitrogen). Para ello, hicimos un conteo y preparamos medio sin suero fetal bovino. Diluimos para tener una concentración de  $1 \times 10^6$  cel/ml y añadimos  $1\ \text{ml}$  de marcador celular, que es un tinte fluorescente y nos va a permitir diferenciar las dos líneas celulares. Dil emite fluorescencia en rojo, usado para marcar las Caco-2, y Dio en verde, usado para marcar las HT29-MTX. Incubamos a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Tras los cuales las células fueron centrifugadas y lavadas 2 veces con PBS.

Durante el marcaje los chips eran precalentados en incubador a  $37^\circ\text{C}$  dentro de placa de Petri.

Para fomentar la adhesión celular a las membranas de los dispositivos, previamente a la siembra, la superficie de la cámara necesitaba ser colagenizada. Para ello, una solución stock de colágeno tipo I de cola de ratón (Corning) de  $3,36\ \text{mg/ml}$  se diluyó a una concentración final de  $0,1\ \text{mg/ml}$  en PBS frío, añadimos  $100\ \mu\text{l}$  en cada pocillo de siembra e incubamos a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Después, se retiró la solución y se lavó con PBS 2 veces.

Tras el marcaje, se volvieron a contar las células, sembrando un pocillo del chip solo con células Caco-2 y el otro con células Caco-2 y HT29-MTX en una relación 3:1 (relación aproximada que guardan in vivo los enterocitos y las células caliciformes en el epitelio de colon). La cantidad total de células sembradas en ambos casos fue de  $4 \times 10^4$  cel/pocillo (cantidad extrapolada de la prueba de formación de monocapa en placa de 96 pocillos) en un volumen total de  $100\ \mu\text{l}$ /pocillo. Por los canales se introdujeron  $50\ \mu\text{l}$  de medio y en los reservorios,  $100\ \mu\text{l}$ . Además, en los reservorios de evaporación añadimos  $300\ \mu\text{l}$  de PBS. Tras la siembra las células fueron incubadas en las condiciones anteriormente descritas durante 26 días (para asegurar la diferenciación del epitelio) realizando seguimiento mediante microscopía de fluorescencia, a distintos días (día 1, día 7, día

14 y día 21). Se cambió de medio cada 48h. Es muy importante realizar el cambio de medio despacio y añadirlo por las paredes para no levantar las células.

Este experimento se realizó 3 veces en 3 pases celulares consecutivos. Además de chips con células marcadas, en cada caso se sembraron chips sin marcar para las pruebas de inmunofluorescencia.

### 3.8 Integridad de la membrana con *Lucifer Yellow*

Para comprobar la integridad y permeabilidad de la monocapa de células en el pocillo del chip realizamos un experimento de permeabilidad con *Lucifer Yellow* (LY), una molécula polar fluorescente, de Biotium.

Se prepara una solución stock de LY 0,048 M en DPBS (Lonza) al 1% DMSO, guardándose en nevera protegida de la luz hasta su uso. Utilizamos DPBS con calcio y magnesio que permiten el mantenimiento de las uniones intercelulares. Llevamos solución stock de LY hasta una concentración de 60  $\mu$ M en DPBS 1% DMSO. Filtramos la solución para esterilizarla. Ya en el chip, lavamos los canales microfluídicos del chip con PBS y añadimos 50  $\mu$ l de DPBS 1% DMSO por canal y en cada reservorio. Añadimos 100  $\mu$ l de la solución 60  $\mu$ M de LY en los pocillos con las células. Lo incubamos 1 hora protegido de la luz a 37°C. A continuación, medimos recogemos los medios de la cámara superior y del canal inferior y medimos fluorescencia (longitud de onda de excitación 480 nm y de emisión 530 nm) con un fluorímetro de placas (Biotek).

Para cada lectura se realizó una recta patrón con distintas concentraciones de LY y así poder relacionar la absorbancia con la concentración en las muestras problema. Para ello hacemos diluciones seriadas a 60, 30, 15, 7,5, 3,75, y 1,875  $\mu$ M. Como blanco usamos DPBS 1% DMSO.

Para posteriores determinaciones, una vez realizada la prueba, lavamos los chips y fijamos las células con paraformaldehído al 4%, 100  $\mu$ l por canal y en cada pocillo con células. Incubamos 25 minutos a temperatura ambiente, lavamos con PBS y lo guardamos en la nevera con abundante PBS.

El coeficiente de permeabilidad se calculó como:

$$P_c = \frac{V_r \times C_f}{C_i \times A \times t}$$

Donde  $P_c$  es el coeficiente de permeabilidad,  $V_r$  es el volumen de recogida (volumen recogido en el canal inferior) en ml,  $A$  es el área en  $\text{cm}^2$  de la membrana del pocillo,  $C_i$  es la concentración inicial apical ( $\mu$ M),  $C_f$  es la concentración final del receptor ( $\mu$ M) y  $t$  es el tiempo del ensayo en segundos.

### 3.9. Tinción Hoechst

Con el fin de poder determinar la formación de monocapa y diferenciar aquellas células que hubieran podido perder el marcaje fluorescente con Vybrant a lo largo del cultivo, se tiñeron los núcleos con Hoechst. Esta tinción es una tinción fluorescente de núcleos, que penetra en las células y se une al ADN. Se excita con luz ultravioleta y emite fluorescencia de color azul entre 460 y 490 nm. Se une principalmente a regiones ricas en adenina-timina del ADN en el surco menor (42).

Quitamos el PBS de los chips fijados y lavamos una vez. Llenamos los pocillos de las células con 100  $\mu$ l de Hoechst a 1  $\mu$ g/ml. Incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente y lavamos

3 veces con PBS. Posteriormente, se tomaron imágenes de los chips en microscopio confocal (Nikon) y en microscopio de fluorescencia (Leica).

### 3.10. Inmunofluorescencia

Para determinar la producción de mucina por la monocapa en los chips se realizó determinación por inmunofluorescencia de Muc2. Es una mucina que se secreta principalmente en intestino, aunque también en pequeña proporción en las vías aéreas. Para ello, utilizamos dos chips con células sin marcar. El anticuerpo primario utilizado fue un anticuerpo monoclonal anti-mucina 2 humana de ratón (Santa Cruz Biotechnology), a una dilución 1:100. El anticuerpo secundario (Life Technology Eugene) usado fue un anticuerpo monoclonal anti-ratón de cabra unido a FITC. Este es un fluorocromo que se excita a 488 nm y emite fluorescencia a 516 nm.

Primeramente, los chips fueron fijados con PFA (4%). Permeabilizamos las células con Triton X-100 (Sigma) al 0,1 % de PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Realizamos 3 lavados con 100 µl de Tween (Sigma) a 0,05 % de PBS y bloqueamos las uniones inespecíficas con 50 µl de BSA al 3% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, retiramos con cuidado e incubamos toda la noche con el anticuerpo primario (dilución 1:100 en PBS con 0,5% de BSA) a 4°C.

Al día siguiente, lavamos 3 veces con 100 µl de BSA 0,3% y añadimos 50 µl del anticuerpo secundario (BSA 0,5% de PBS), diluido 1:500. Incubamos durante 2/3 horas a temperatura ambiente. Lavamos con 100 µl de BSA 0,5% de PBS una vez y con 100 µl de PBS otras dos veces. Para finalizar, hacemos la tinción con Hoechst, tal y como se detalla en el apartado 3.9.

### 3.11 Toma de imágenes en microscopio óptico, confocal y de fluorescencia

El microscopio invertido de contraste de fases (Leica) se utilizaba para hacer un seguimiento del crecimiento de los cultivos y hacer contajes con cámara de Neubauer. Las muestras teñidas con azul alcian se observaron en microscopio óptico a 10 y a 20 aumentos, tomando fotografías de 5 campos aleatorios por cada muestra.

La tinción Hoechst se observó mediante microscopía de fluorescencia en microscopio de fluorescencia Thunder de Leica del Instituto de investigación en ingeniería de Aragón. El fluoróforo se excita con luz ultravioleta y emite fluorescencia de color azul a entre 460 y 490 nm. Se visualizó a 2, 10 y 20 aumentos y se tomaron fotografías en 5 campos elegidos al azar para cada muestra. Para adecuar la distancia focal hubo que recortar la membrana donde se encuentran adheridas las células del chip y colocarlo en un portaobjetos junto con una gota de medio de montaje para microscopía. La microscopía de fluorescencia también se empleó para el seguimiento del cultivo durante los 21 días que se mantuvieron. Las Caco-2 estaban marcadas con Dil y las HT29-MTX con Dio. Dil tiene un espectro de absorción y de fluorescencia similar a la Rodamina (excitación a 546 nm y emisión a 568). El espectro de excitación de Dio alcanza un pico máximo en 492 nm y el de emisión a 517 nm. Las diferencias en estos espectros los hace ideal para el *multiplexing*. El microscopio Thunder tiene los filtros apropiados para observar la fluorescencia de la muestra.

El microscopio confocal (Nikon) se empleó para visualizar la tinción Hoechst junto con los marcadores Dio y Dil en la misma muestra, ya que ofrece la posibilidad de hacer reconstrucciones tridimensionales y poder ver, así, como se distribuye la tinción en el chip. Tomamos imágenes a 10 aumentos de todo el pocillo del chip. Los filtros del microscopio confocal son apropiados para excitar las moléculas a sus valores correspondientes.

### 3.12 Estadística

El análisis estadístico se ha realizado con el software ‘‘minitab’’ y las gráficas de comparación de medias con ‘‘matlab’’.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado en tres pases celulares consecutivos. Se analizaron los datos de dos condiciones de cultivo (C+H y C). En primer lugar, se determinó distribución de la varianza de los datos mediante los test de Anderson-Darling y Ryan-Joiner, obteniendo una distribución normal de la misma para todos ellos ( $P>0,05$ ). Además, se comprobó la existencia de datos atípicos mediante la prueba Grubbs, utilizando un nivel de confianza del 95%, no existiendo datos atípicos.

Tras esto se pasó al análisis de los datos mediante una prueba de comparación de medias (Prueba de T de student) para valores pareados.

## 4. Resultados

### 4.1 Densidad celular en pocillo de placa de 96

Se realizó un seguimiento del cultivo de Caco-2 y se observó mediante microscopía óptica la formación de la monocapa. El cultivo sembrado a 5000 cel/pocillo tardó 6 días en formar la monocapa, a 10000 cel/pocillo tardó 4 días, a 20000 cel/pocillo tardó 2 días y a 40000 cel/pocillo tardó 1 día.

### 4.2 Producción de moco por HT29-MTX

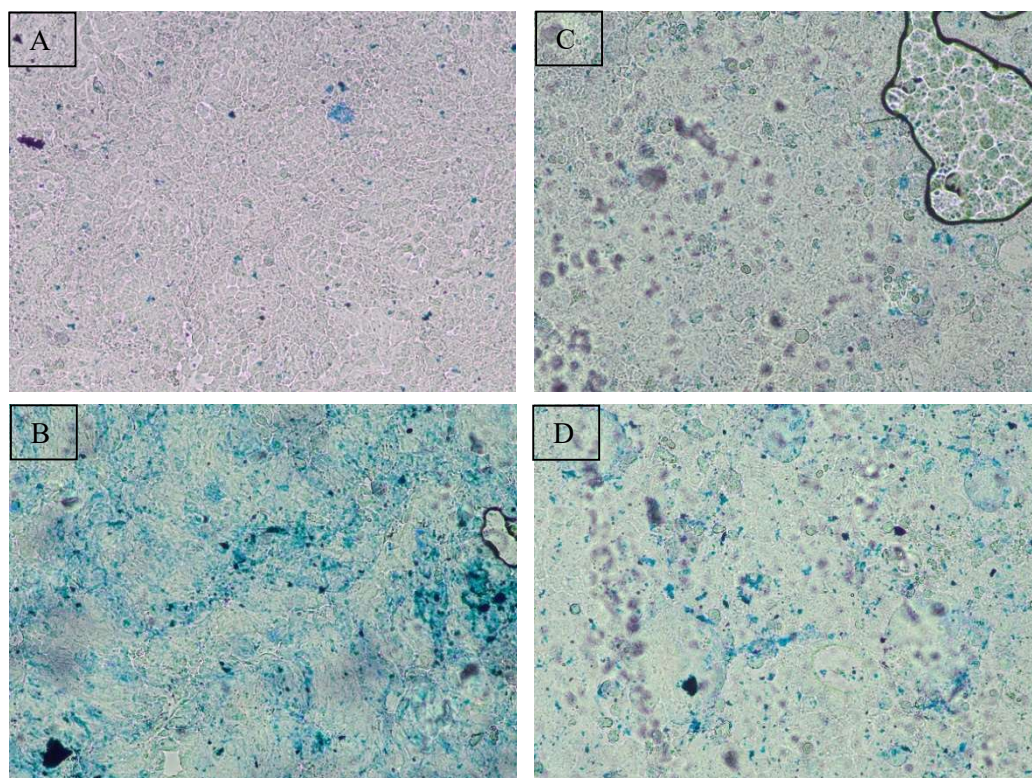


Figura 2. Imágenes de la tinción con azul alcian tomadas con el microscopio óptico a 10 aumentos. Observamos la secreción de moco en HT29-MTX a día 1 (A), HT29-MTX a día 7 (B), Caco-2 a día 7 (C) y Caco-2 con HT29-MTX a día 7 (D).

En la figura 2, se pueden observar diferentes imágenes tomadas con microscopio óptico (Leica) a 10 aumentos para visualizar la tinción de la mucina con azul alcian. En las muestras,

correspondientes a células HT29-MTX a día 1 (imagen A), se observan algunos puntos azules, que podría representar una ligera producción de mucina si bien no se puede descartar que dichos patrones sean debidos a artefactos de la tinción ya que también se vieron en las muestras con solo células Caco-2. Las células HT29-MTX (imagen B) mostraron una mayor producción de mucina a día 7, frente a las células Caco-2 (imagen C). Y mucho mayor que a día 1. Aquí el azul es mucho más intenso debido a una presencia elevada de mucina.

No se pueden presentar resultados de la tinción con Azul Alcían a los días 14 y 21, debido a que las células se levantaban en torno al día 10 de cultivo. Tras observar este fenómeno en repetidas ocasiones, se trataron los cubreobjetos con colágeno tipo I al 0,1% previamente a la siembra de células. Sin embargo, el problema no se solucionó y no fuimos capaces de mantener el cultivo más allá del día 10.

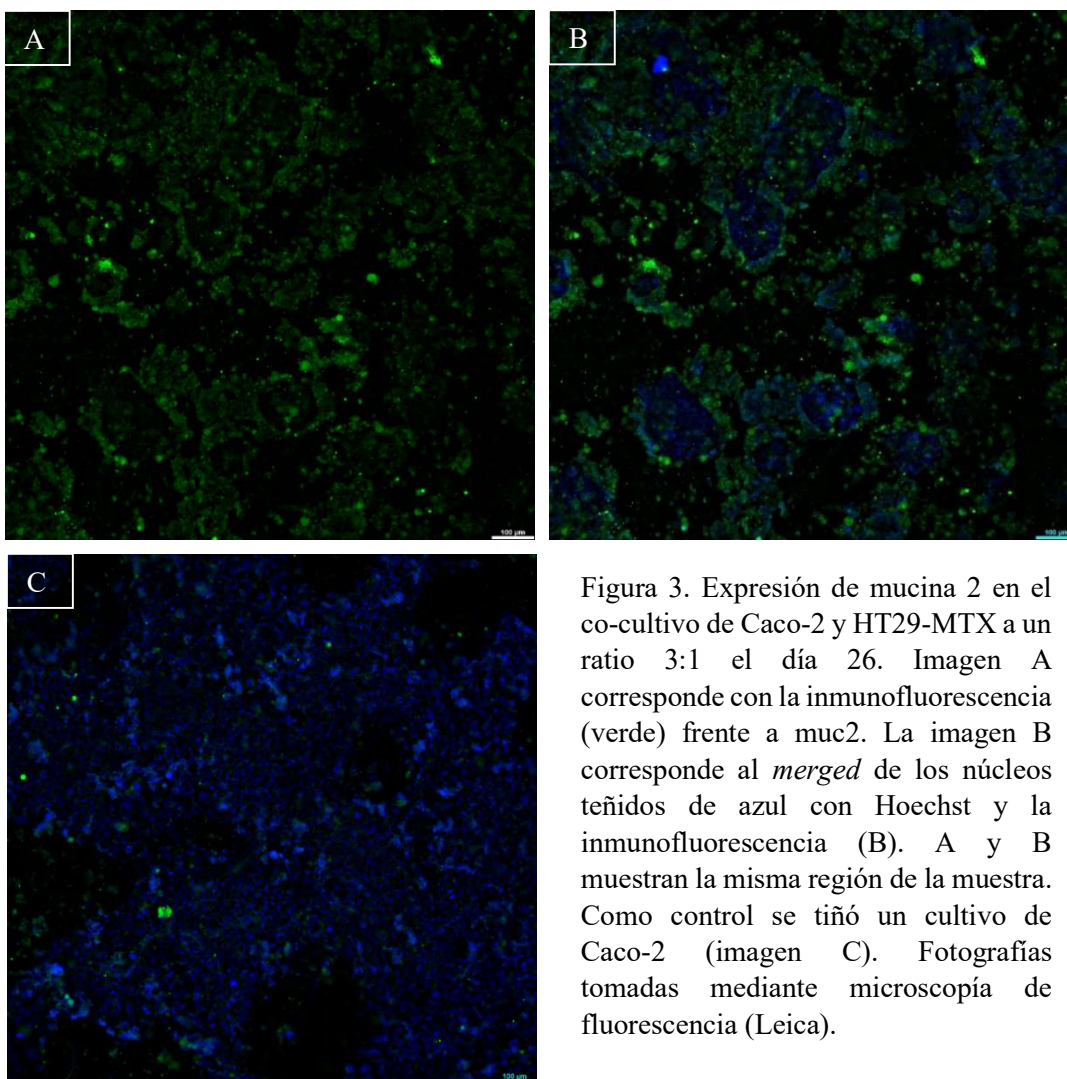


Figura 3. Expresión de mucina 2 en el co-cultivo de Caco-2 y HT29-MTX a un ratio 3:1 el día 26. Imagen A corresponde con la inmunofluorescencia (verde) frente a muc2. La imagen B corresponde al *merged* de los núcleos teñidos de azul con Hoechst y la inmunofluorescencia (B). A y B muestran la misma región de la muestra. Como control se tiñó un cultivo de Caco-2 (imagen C). Fotografías tomadas mediante microscopía de fluorescencia (Leica).

El ensayo de inmunofluorescencia para Muc2, se realizó para determinar la presencia y la distribución de la mucina en el chip más allá del día 21 (tiempo en el que se esperaba la diferenciación completa de las células). Las imágenes de la figura 3 fueron obtenidas de un cultivo de Caco-2 y HT29-MTX crecidas a una ratio 3:1 tratado el chip con colágeno. En las zonas donde se ven los núcleos azules de las células, es donde se ve la presencia de moco en verde. Los resultados obtenidos en los chips a estudio confirman la presencia de moco a día 21 por todo el epitelio (allí donde hay células existe producción de moco), dejando pequeños cúmulos de células,

donde posiblemente se distribuirán las Caco-2 sin cubrir. En el monocultivo de células Caco-2 (imagen C), que sirvió de control, se observa muy escasa fluorescencia verde, lo que muestra la pequeña producción de moco en estas células.

### 4.3 Marcaje celular estable con lentivirus

Desafortunadamente, al hacer la dilución al límite se contaminaron los cultivos tanto de Ht29MTX como de Caco2 infectados con lentivirus por lo que no fue posible de obtener una expresión estable de fluorescencia en las líneas celulares.

### 4.4 Cálculo del coeficiente de permeabilidad con *Lucifer Yellow*

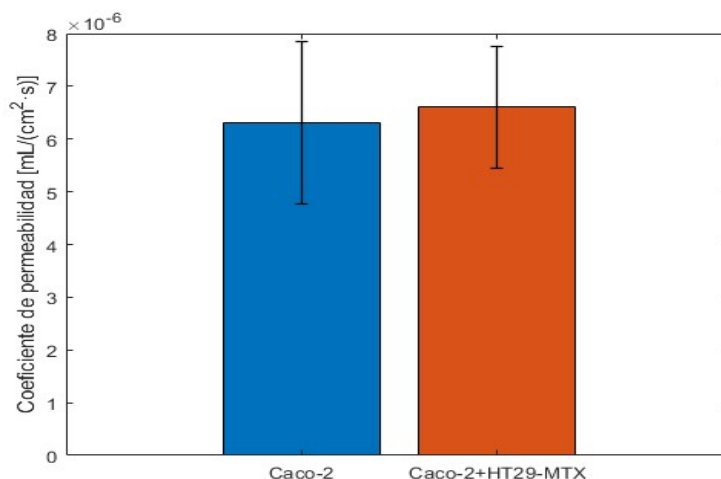
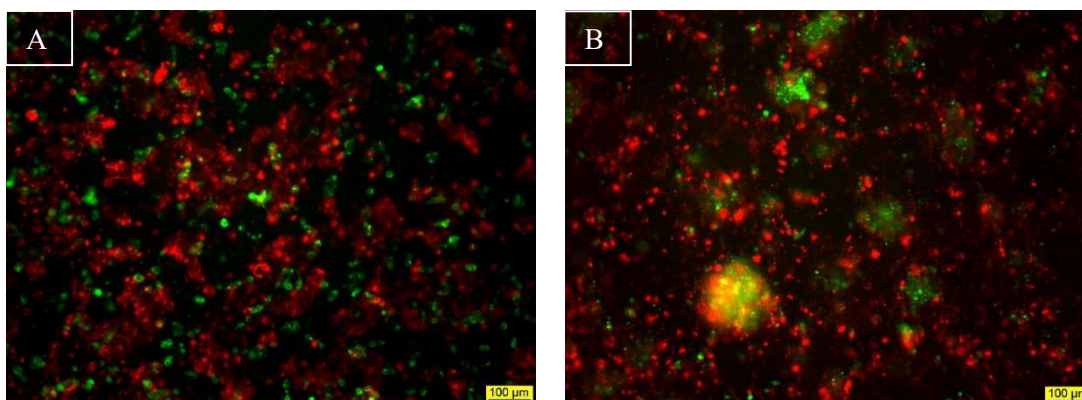


Figura 4. Coeficiente de permeabilidad de LY a través de la monocapa de Caco-2 y del co-cultivo de Caco-2 y HT29-MTX. Los valores son presentados como una media ± el error (n=3).

Como se ha descrito en material y métodos, las células se sembraron en dos condiciones: en monocultivo de Caco-2 y en co-cultivo de Caco-2 y HT29-MTX a un ratio 3:1. El *Lucifer Yellow*, marcador del transporte paracelular, se añadió a ambas condiciones de cultivo tras 26 días de cultivo de los chips (para asegurar la diferenciación total del epitelio). La figura 4 muestra el coeficiente de permeabilidad obtenido, tanto de Caco-2 ( $6,32 \times 10^{-6} \pm 8,90 \times 10^{-7}$  ml/ cm<sup>2</sup>\*s), como de Caco-2 sembradas junto con HT29-MTX ( $6,61 \times 10^{-6} \pm 6,67 \times 10^{-7}$  ml/ cm<sup>2</sup>\*s). La permeabilidad resultó ligeramente superior en las células en el co-cultivo con HT29MTX que en el monocultivo de Caco-2, si bien las diferencias no alcanzaron la significación estadística ( $p > 0,05$ ).

### 4.5 Seguimiento del cultivo durante 21 días



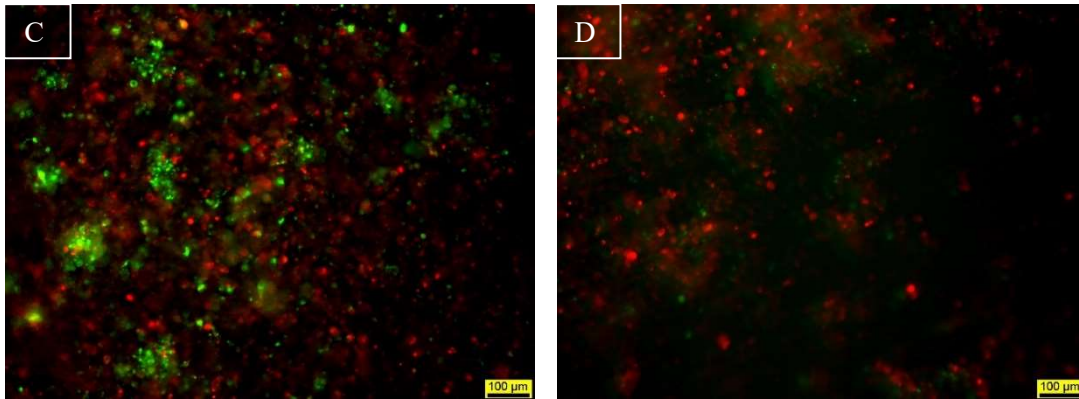
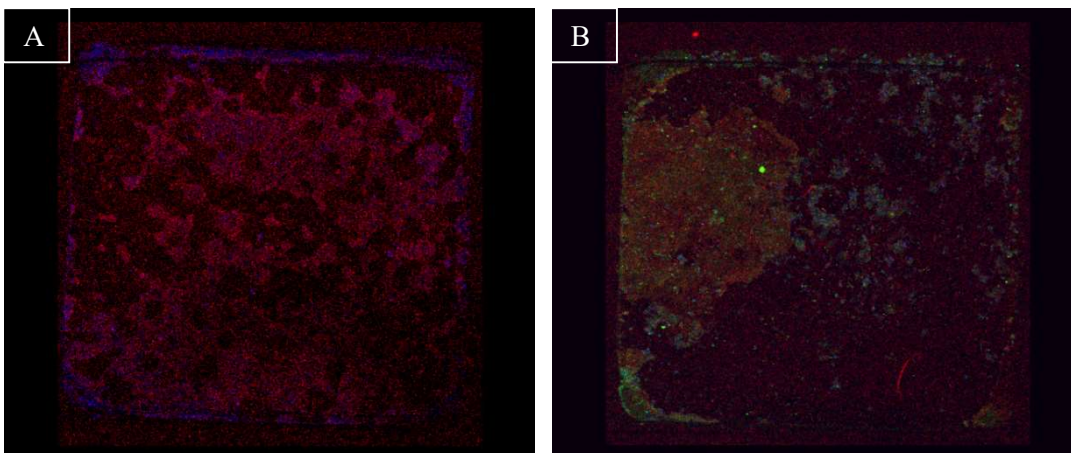


Figura 5. Seguimiento de la monocapa formada por células Caco-2 y HT29-MTX a días 1 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) en una proporción 3:1. Las Caco-2 están marcadas con Vybrant-Dil (rojo) y las células HT29-MTX con Vybrant-Dio (verde). Imágenes tomadas a 10 aumentos con el microscopio de fluorescencia (Leica).

De los resultados obtenidos de la formación de monocapa en pocillos de placa 96, se halló la cantidad de células a sembrar en los chips para tener formada la monocapa a las 24h (día 1). Se sembraron así, 40000cel/pocillo en la cámara del chip de monocultivo de Caco-2 y 30000 cel/pocillo de Caco-2 y 10000 cel/pocillo de HT29MTX en la cámara de co-cultivo (ratio 3:1). Durante 26 días se mantuvo el cultivo en chip de Caco-2 y Caco-2: HT29-MTX para dejar que las células se diferenciasesen.

En la figura 5, se puede observar la evolución en el tiempo (días 1, 7, 14 y 21 del cultivo del chip) de la monocapa formada por el co-cultivo de Caco-2 y HT29-MTX. Las Caco-2 emitían fluorescencia roja y las HT29-MTX emitían en verde. En todas los chips realizados se apreció un aumento de la monocapa a lo largo del tiempo (días 1, 7 y 14) debido al crecimiento celular de ambos tipos celulares y una mayor fluorescencia en rojo a todos los tiempos de incubación, manteniéndose la proporción de siembra de Caco-2 y HT29-MTX a lo largo del tiempo. Las células HT29-MTX tendieron a formar agrupaciones (imágenes B y C) a medida que se multiplicaban frente a una distribución más homogénea de las células Caco-2. Debido al marcaje inestable, al cabo de los días (día 21) se perdió la fluorescencia especialmente para las células marcadas en verde (HT29-MTX) (imagen D).



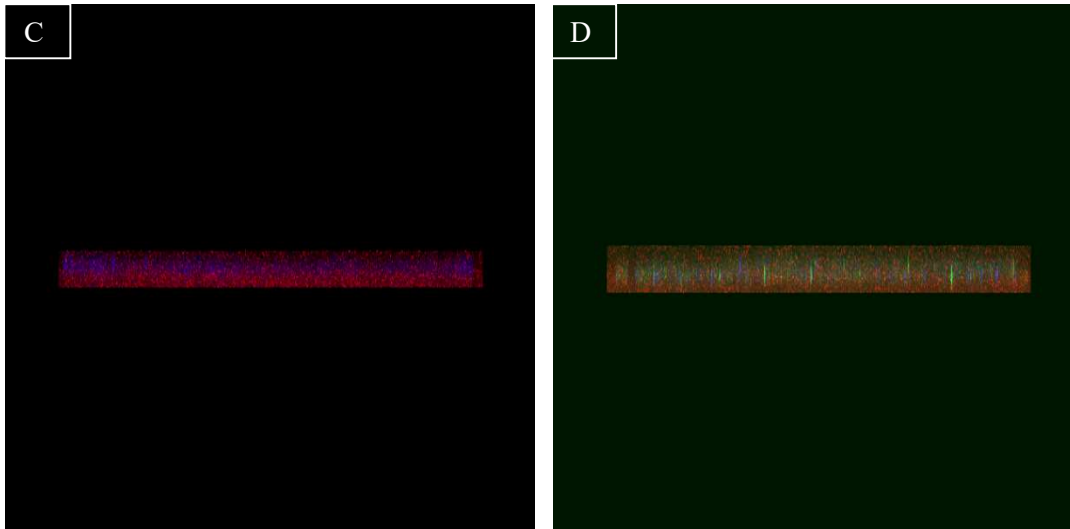


Figura 6. Imágenes en microscopio confocal del monocultivo de Caco-2 (imágenes A y C) y del co-cultivo de Caco-2 y HT29-MTX (imágenes B y D). Las imágenes C y D nos aportan una visión en Z del pocillo. Las imágenes están tomadas a 2 aumentos.

En las imágenes de la figura 6 observamos la monocapa a lo largo de todo el chip a día 26. Fueron tomadas con microscopía confocal. Las Caco-2 emiten fluorescencia en rojo y las HT29-MTX en verde. Además, se hizo una tinción con Hoechst para teñir de azul los núcleos de las células. En las imágenes en el eje Z (imágenes C y D) podemos ver la formación completa de la monocapa a lo largo de toda la membrana y la mayor presencia de Caco-2 frente a HT29mtx, concordando con la ratio 3:1 de siembra inicial. En las imágenes en XY, se aprecia que las células ocupan toda la superficie de la cámara (imágenes A y B), aunque en la imagen B hay una zona donde las HT29-MTX están más aglutinadas, que es donde se observa gran parte de la fluorescencia verde, posiblemente a que la fluorescencia era más profunda y no captada en esta dimensión en algunos puntos.

## 5. Discusión de resultados

Muchos de los modelos intestinales *in vitro* están basados en el monocultivo de Caco-2. Estos sistemas exhiben numerosas limitaciones y difieren de los resultados que se observan *in vivo*. Por ejemplo, este tipo celular presenta una alta unión entre células debido a una sobreexpresión de uniones estrechas, las cuales generan una barrera a la hora de transportar moléculas, dando como resultado una gran diferencia entre el transporte *in vivo* e *in vitro*; podemos estudiar el transporte paracelular o el eflujo mediado por glicoproteína P. Esto es importante para la salud humana ya que la mayoría de las moléculas terapéuticas son administradas por vía oral. Sin embargo, la evaluación de la permeabilidad intestinal es un proceso complejo, difícil de determinar (43). Otro inconveniente de los modelos previos reside en la falta de una capa de moco en la superficie de la monocapa, como sucede en el intestino. Para superar estas limitaciones hemos co-cultivado las Caco-2 y las HT29-MTX. El co-cultivo con HT29-MTX, células de tipo *caliciforme* productoras de mucina, además de aportar moco al modelo intestinal, tal y como parece en la literatura, reduce las uniones estrechas entre células epiteliales, aumentando el coeficiente de permeabilidad del epitelio frente a los monocultivos de Caco-2, asemejándolo al observado *in vivo* en intestino (44).

Para poder confirmar la producción de moco por las células HT29-MTX diferenciadas, teñimos los diferentes cultivos (células Caco-2, HT29-MTX y el co-cultivo a ratio 3:1) a diferentes días de diferenciación con azul alcian. Recordemos que la tinción de azul alcian es un colorante de carácter básico, muy utilizado en histología, que tiñe mucopolisacáridos ácidos. De los resultados



obtenidos, se demuestra la secreción de moco por las células HT29-MTX (figura 2). Dichos resultados sugieren que la función primaria de las HT29-MTX no se ve afectada por la presencia de otros tipos celulares y que su diferenciación para la producción de moco ya se puede ver a día 7 de cultivo. Las áreas que se tiñeron con el azul corresponderían a áreas donde estaban localizadas las HT29-MTX. En el cultivo de Caco-2 (Figura 2, imagen C) a 7 días, se puede observar únicamente una leve tinción, confirmando que la presencia de las HT29-MTX en el cultivo es lo que hace principalmente que haya mucina en la muestra. La leve tinción en las Caco-2 pudo ser debido a ruido de fondo o a que las Caco-2, si bien estas células también pueden secretar una pequeña cantidad de moco.

Estos resultados coinciden a los obtenidos por Fengguang Pan *et al.* (45) en 2015, quienes pretendían optimizar el cultivo *in vitro* de Caco-2 y HT29 para estudios de permeabilidad. También hallaron que las HT29-MTX secretan moco tanto cultivadas solas como en presencia de Caco-2 y que el co-cultivo no modificaba la función primaria de las HT29-MTX.

La inmunofluorescencia para anti-mucina 2, confirmó la producción de Muc2 por parte de las células, observándose zonas en verde (Muc-2) alrededor y entre las zonas azules, por el Hoechst (zonas muy posiblemente de células únicamente de Caco-2, que podrían corresponder a los domos característicos de estas células una vez diferenciadas). Aunque en el cultivo de Caco-2 también se observa una muy ligera producción de Muc2, coincidiendo con la literatura, no es comparable con la cantidad secretada por el co-cultivo con HT29MTX, que produce mucho más. Por lo que, todo parece indicar que la producción de muc2 correspondió a las células HT29-MTX, no obstante, para poder confirmar que el moco fue producido principalmente por las células HT29-MTX, se tendría que realizar un marcaje específico para este tipo celular o para las Caco-2.

Por otro lado, en el monocultivo de Caco-2 no se observó la formación de domos alrededor de los cuales se sitúa la mucina como sí se vio en el co-cultivo, lo que podría ser debido a que la diferenciación hacia un epitelio más biomimético viene condicionada por la presencia de HT29MTX, si bien sería necesario realizar estudios más en detalle de microscopía confocal o electrónica.

La permeabilidad paracelular fue evaluada mediante la medida del transporte de LY de un lado a otro de la membrana del chip y, por tanto, de la zona apical del epitelio formado al canal en contacto con la parte basal del mismo. La permeabilidad paracelular del epitelio depende en gran medida de las uniones estrechas que crean las células adyacentes entre sí y es un indicador de la integridad del epitelio. El monocultivo de Caco-2 ha sido muy utilizado en el pasado para ensayos de permeabilidad de fármacos en intestino, sin embargo, los resultados diferían a lo que se observaba *in vivo* debido a que en estos cultivos hay una gran cantidad de uniones estrechas que no se dan en el intestino debido a la presencia de otros tipos celulares. Como consecuencia se buscaron métodos para aumentar esta permeabilidad y obtener datos más precisos. Con la incorporación de las HT29-MTX buscamos superar esta limitación, disminuyendo la cantidad de uniones estrechas y aumentando la permeabilidad. Las HT29-MTX generan menor cantidad de uniones estrechas en comparación con las Caco-2. Si bien, estadísticamente, los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas, el coeficiente de permeabilidad en los ensayos con LY fue ligeramente mayor en el co-cultivo que en el monocultivo (figura 4). Estos resultados podrían ser indicativos de que la presencia de las HT29-MTX modifica la permeabilidad e integridad de la membrana, asemejándolo a lo observado en el intestino *in vivo*. Mismos resultados son los obtenidos por Béduneau *et al.* en 2014 (43), que estudiaron el transporte paracelular por LY y el flujo a través de la glicoproteína P. Estos autores también vieron que la

presencia de las HT29-MTX aumentaba el transporte paracelular, pudiendo generar un modelo intestinal que se asemejara más a lo que ocurre en el colon.

Además, los resultados de fluorescencia de los cultivos a lo largo del tiempo indicaron que la monocapa formada se mantenía. Seguíamos teniendo fluorescencia repartida homogéneamente por todo el pocillo del chip, tanto roja como verde. A pesar de que las HT29-MTX en monocultivo crecían bastante más deprisa que las Caco-2, en el co-cultivo en chip se veía que la fluorescencia roja era mayor a los distintos tiempos de incubación, por lo que la proporción 3:1 se mantenía. No obstante, al cabo de 26 días, el descenso del marcaje por el paso de los días (al no ser un marcaje estable) no nos permitió observar que dicha integridad se mantuviera hasta el final del cultivo (figura 5 imagen D), aunque los datos del LY y de microscopía confocal parecen indicar que sí permanecía formada.

Los resultados del microscopio confocal concuerdan con todos los demás. Se aprecia la formación de la monocapa a día 26 y la proporción 3:1 de células Caco-2:HT29-MTX. La aglutinación de las células HT29-MTX puede ser debido a problemas del marcador o a que se distribuyeron mal, lo que puede explicar que no se vean tantas diferencias en permeabilidad.

En los chips el levantamiento de las células es un grave problema ya que puede alterar los resultados de permeabilidad con LY y provocar que el transporte paracelular observado sea muy distinto al que cabría esperar de una monocapa bien formada. Por eso es muy importante retirar el medio o la solución que haya con cuidado y echarlo por las paredes lentamente.

## Conclusiones

En relación con los objetivos establecidos al inicio del trabajo de fin de grado y de los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

1. El co-cultivo de Caco-2 con HT29-MTX produjo una monocapa desde los primeros días de incubación, manteniéndose la proporción de ambas poblaciones celulares.
2. La permeabilidad del epitelio fue similar a la observada en colon *in vivo*, por lo que parece que se consiguió un epitelio íntegro a día 26 de cultivo.
3. No se puede concluir que el co-cultivo de HT29-MTX y Caco-2 aumentara la permeabilidad del epitelio, tal y como se cita en la literatura, aunque la media fue ligeramente superior, por lo que sería necesario un estudio a mayor profundidad.
4. El epitelio en el chip con Caco 2 y HT29-MTX a un ratio 3:1 produce y mantiene una capa de mucina hasta el cultivo a día 26.

## Conclusions

In relation to the objectives established at the beginning of the dissertation and to the results obtained, the following conclusions are drawn:

1. Co-culture of Caco-2 with HT29-MTX produced a monolayer from the first days of incubation, maintaining both cell populations' ratio.
2. The permeability of the epithelium was similar to that observed in the colon *in vivo*, so it seems that a complete epithelium was obtained at day 26 of culture.
3. It is not possible to conclude that the co-culture of HT29-MTX and Caco-2 increased epithelial permeability, although the mean was slightly higher, so a deeper analysis is needed.

4. The epithelium on the chip with Caco-2 and HT29-MTX at a ratio 3:1 produces and maintains a layer of mucin until culture at day 26.

## Referencias bibliográficas

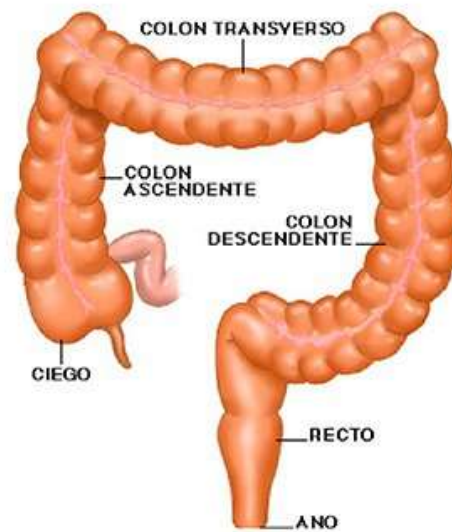
1. Bass LM, Wershil BK. and Large Intestine. Tenth Edit. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease- 2 Volume Set. Elsevier Inc.; 2018. 1649-1678.e3 p.
2. Cancer Colorectal - Clínica CEMTRO [Internet]. [cited 2021 Apr 30]. Available from: <https://www.clinicacentro.com/otras-especialidades/cirugia-general-aparato-digestivo/cancer-de-colon-recto/>
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2018 Nov [cited 2021 Jun 18];68(6):394–424. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30207593/>
4. Cáncer de colon y recto - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 [Internet]. [cited 2021 Apr 30]. Available from: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/colon-recto?start=2>
5. Cáncer de colon o de recto – American Cancer Society [Internet]. [cited 2021 Apr 30]. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto.html>
6. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet* [Internet]. 2019;394(10207):1467–80. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
7. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. 2015;34(3):1087–96.
8. Modelo animal | NHGRI [Internet]. [cited 2021 Feb 21]. Available from: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Modelo-animal>
9. bioetica [Internet]. [cited 2021 Apr 25]. Available from: <http://www.bioeticanet.info/animales/derechosanimales.htm>
10. Sødring M, Gunnes G, Paulsen JE. Spontaneous initiation, promotion and progression of colorectal cancer in the novel A/J Min/+ mouse. *Int J Cancer*. 2016;138(8):1936–46
11. Bürtin F, Mullins CS, Linnebacher M. Mouse models of colorectal cancer: Past, present and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2020 Apr 7;26(13):1394-1426. doi: 10.3748/wjg.v26.i13.1394. PMID: 32308343; PMCID: PMC7152519.
12. Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X, et al. and Microbiota. *Appl Mech Rev* [Internet]. 2019;19(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.080><http://dx.doi.org/10.1088/0960-1317/26/3/035013><http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0104-6><http://dx.doi.org/10.1038/s41551-020-0525-x><https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>
13. (No Title) [Internet]. [cited 2021 Apr 25]. Available from: [http://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo\\_celular.pdf](http://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf)
14. Santacruz Reyes L, Melo Jimenez Á, Rodríguez Herrera C, Moscoso Gama J. Historia de los cultivos de células animales in vitro y su importancia en la actualidad. *Biociencias*. 2017;12(2):127–40.
15. Resau JH, Sakamoto K, Cottrell JR, Hudson EA, Meltzer SJ. Explant organ culture: A review. *Cytotechnology*. 1991;7(3):137–49.

16. Autrup H, Barrett LA, Jackson FE, Jesudason ML, Stoner G, Phelps P, Trump BF, Harris CC. Explant culture of human colon. *Gastroenterology*. 1978 Jun;74(6):1248-57.
17. Shamsuddin AKM, Barrett LA, Autrup H, Harris CC, Trump BF. Long-term organ culture of adult rat colon. *Pathol Res Pract*. 1978;163(4):362-72.
18. Sakamoto K, Resau JH, Shamsuddin AM, Yuasa Y, Hoshino H, Nakano GI, et al. Long-term explant culture of human colon and a 3-step transformation model for rat colonic epithelium. *Pathobiology*. 1991;59(6):404-11.
19. Jong BK. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol*. 2005;15(5 SPEC. ISS.):365-77.
20. García J. Introducción al cultivo de tejidos. 2002;1-32. Available from: <http://histolii.ugr.es/jmgarcia/cultivos/cultivos.pdf>
21. Ramzy GM, Koessler T, Ducrey E, McKee T, Ris F, Buchs N, et al. Patient-derived in vitro models for drug discovery in colorectal carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1-21.
22. Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells in colorectal cancer: A review. *J Clin Pathol*. 2018;71(2):110-6.
23. Shoemaker RH. *Nrc1953.Pdf*. 2006;6:813-23.
24. May S, Evans S, Parry L. and microbiota. 2017;0(October):385-400.
25. Zoetemelk M, Rausch M, Colin DJ, Dormond O, Nowak-Sliwinska P. Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-14.
26. Jeppesen M, Hagel G, Glenthoj A, Vainer B, Ibsen P, Harling H, et al. Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. *PLoS One*. 2017;12(9):1-19.
27. 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.
28. Courau T, Bonnereau J, Chicoteau J, Bottois H, Remark R, Assante Miranda L, et al. Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):1-14.
29. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009 May 14;459(7244):262-5. doi: 10.1038/nature07935. Epub 2009 Mar 29. PMID: 19329995.
30. Grün D, Lyubimova A, Kester L, Wiebrands K, Basak O, Sasaki N, et al. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature [Internet]*. 2015;525(7568):251-5. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature14966>
31. Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*. 2016;165(7):1586-97.
32. Clevers H. What is an adult stem cell? *Science (80- )*. 2015;350(6266):1319-20.
33. Golovko D, Kedrin D, Yilmaz ÖH, Roper J. Colorectal cancer models for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2015;10(11):1217-29.

34. Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X, et al. Organ-on-a-chip: Recent breakthroughs and future prospects. *Biomed Eng Online* [Internet]. 2020;19(1):1–19.
35. Shim KY, Lee D, Han J, Nguyen NT, Park S, Sung JH. Microfluidic gut-on-a-chip with three-dimensional villi structure. *Biomed Microdevices*. 2017 Jun;19(2):37. doi: 10.1007/s10544-017-0179-y. PMID: 28451924.
36. Shah P, Fritz JV, Glaab E, Desai MS, Greenhalgh K, Frachet A, Niegowska M, Estes M, Jäger C, Seguin-Devaux C, Zenhausern F, Wilmes P. A microfluidics-based in vitro model of the gastrointestinal human-microbe interface. *Nat Commun*. 2016 May 11;7:11535. doi: 10.1038/ncomms11535. PMID: 27168102; PMCID: PMC4865890.
37. Kasendra M, Tovaglieri A, Sontheimer-Phelps A, Jalili-Firoozinezhad S, Bein A, Chalkiadaki A, et al. Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–14.
38. Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al. The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models. *Impact Food Bioact Heal Vitr Ex Vivo Model*. 2015;1–327.
39. ECACC General Cell Collection: 12040401 HT29-MTX-E12 [Internet]. [cited 2021 Jun 12]. Available from: [https://www.phculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=12040401&collection=ecacc\\_gc](https://www.phculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=12040401&collection=ecacc_gc)
40. Azul Alcian: una descripción general | Temas de ScienceDirect [Internet]. [cited 2021 Jun 12]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/alcian-blue>
41. BE-TRANSFLOW CUSTOM (10 devices per box) | BEOnChip – Biomimetic Environment On Chip [Internet]. [cited 2021 Jun 13]. Available from: <https://beonchip.com/product/be-transflow-custom/>
42. Thermo Scientific™ Hoechst 33342 Solution (20 mM) 5 ml Reactivos de inmunohistoquímica | Fisher Scientific [Internet]. [cited 2021 Jun 13]. Available from: <https://www.fishersci.es/shop/products/pierce-hoechst-3342-fluorescent-stain/10150888>
43. Van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005;1(2):175–85.
44. Béduneau A, Tempesta C, Fimbel S, Pellequer Y, Jannin V, Demarne F, et al. A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;87(2):290–8.
45. Pan F, Han L, Zhang Y, Yu Y, Liu J. Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies. *Int J Food Sci Nutr* [Internet]. 2015 [cited 2021 Jun 19];66(6):680–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26299896/>

## ANEXOS

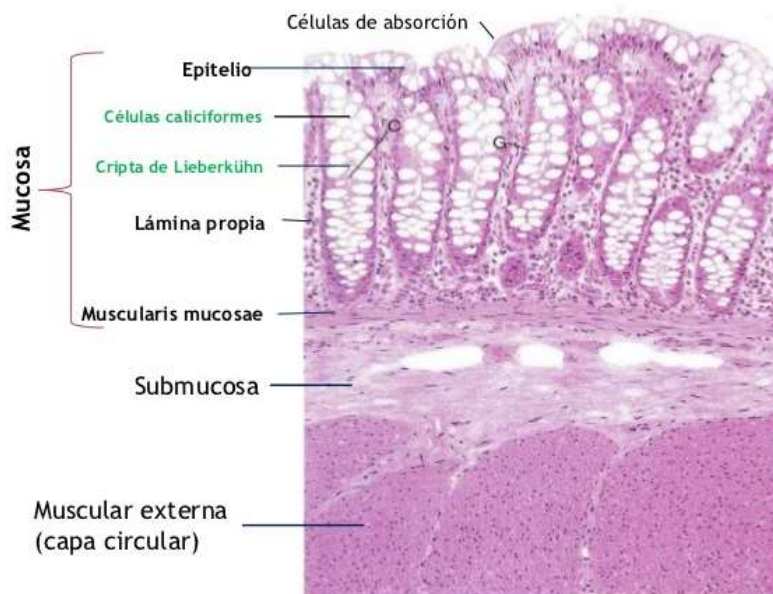
### Anexo 1



Anexo 1. Representación de los segmentos en el intestino grueso: ciego, colon, recto y ano.

Colon | Cirugía Digestiva Cancún [Internet]. [cited 2021 Jun 18]. Available from: <https://cirugiadigestivacancun.mx/padecimiento-colon/>

### Anexo 2



Anexo 2. Representación histológica de la estructura de la mucosa intestinal. Se diferencian perfectamente cada una de las capas, las criptas de Lieberkühn y las células caliciformes.

The True Life Of A Fabulous Med-Student: Sistema digestivo [Internet]. [cited 2021 Jun 18]. Available from: <http://medicinethefinalfrontier.blogspot.com/2015/05/sistema-digestivo.html>

### Anexo 3

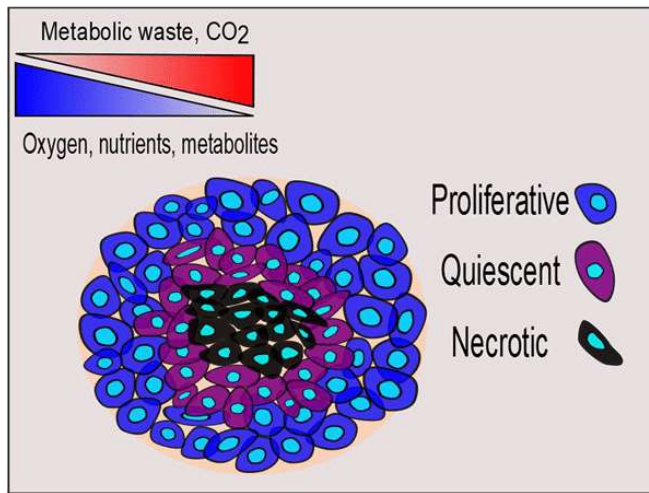
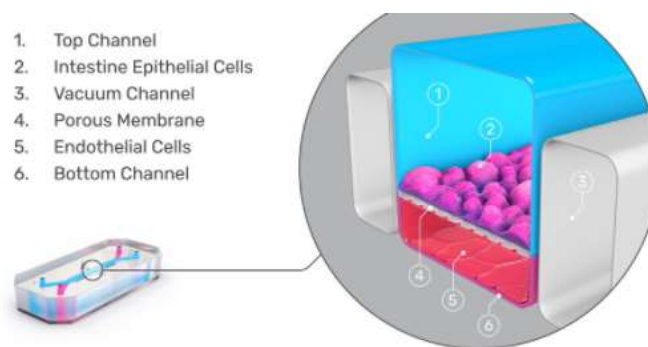


Figura 3. Disposición celular en los esferoides. Se puede ver el inconveniente de la difusión; las células centrales apenas reciben oxígeno, nutrientes o metabolitos.

Graphical representation of a multicellular tumour spheroid formed from... | Download Scientific Diagram [Internet]. [cited 2021 Jun 22]. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/Graphical-representation-of-a-multicellular-tumour-spheroid-formed-from-homotypic\\_fig1\\_321738032](https://www.researchgate.net/figure/Graphical-representation-of-a-multicellular-tumour-spheroid-formed-from-homotypic_fig1_321738032)

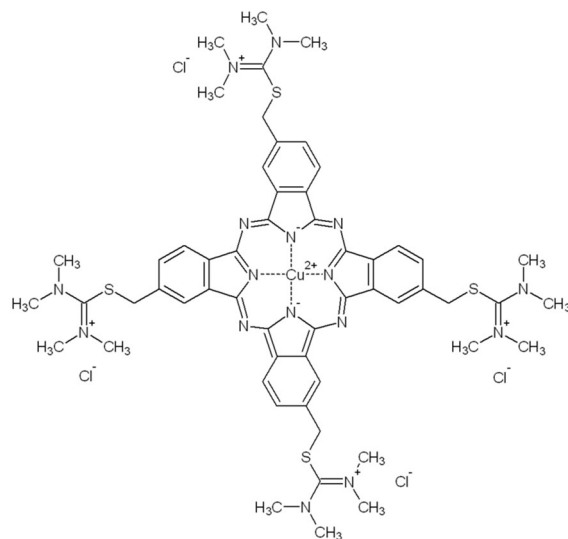
### Anexo 4



Anexo 4. Imagen de un dispositivo microfluídico semejante al usado en la realización de este trabajo con células intestinales adosadas a la membrana y endoteliales por el canal. El chip desarrollado en este proyecto no contiene las células endoteliales, pero se está ensayando ya para añadirlas.

Colon Intestine-Chip — Emulate [Internet]. [cited 2021 Jun 18]. Available from: <https://www.emulatebio.com/colon-intestine-chip>

## Anexo 5



Anexo 5. Estructura química del azul alcian utilizado para la tinción de mucina en los cultivos.

AlcianBlue.png (1079×1026) [Internet]. [cited 2021 Jun 24]. Available from: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c9/AlcianBlue.png>