

LEONOR MARIA MOREIRA ALVES E ALMEIDA

**DESCONGELAMENTO DE ORGANÓIDES
INTESTINAIS CANINOS – TÉCNICAS E DESAFIOS**

Orientador: Prof. Dr. André Meneses

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária**

**Lisboa
2023**

LEONOR MARIA MOREIRA ALVES E ALMEIDA

**DESCONGELAMENTO DE ORGANÓIDES
INTESTINAIS CANINOS – TÉCNICAS E DESAFIOS**

Dissertação defendida em provas públicas
para a obtenção do Grau de Mestre no curso
de Mestrado em Medicina Veterinária,
conferido pela Universidade Lusófona de
Humanidades e Tecnologias, no dia 12 de
Outubro de 2023, com o Despacho de
Nomeação de Júri N° 355/2023, com a
seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Laurentina
Pedroso

Arguente: Professora Doutora Ana Lima

Orientador: Professor Doutor André Meneses

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Lisboa
2023

RESUMO

Os organóides são modelos de cultura celular tridimensionais complexos, formados a partir de células tronco pluripotentes ou de células mãe, com capacidade de auto-organização e que replicam a fisiologia *in vivo* de uma maneira muito mais precisa do que os sistemas de cultura celular bidimensionais. Existe um grande número de aplicações para os organóides incluindo estudos sobre organogénese, desenvolvimento de novos fármacos, autorrenovação celular, medicina regenerativa, patogénese do cancro e de outras patologias crónicas como é o caso da *Inflammatory Bowel Disease* nos cães. Através do método de criopreservação é possível manter culturas de organóides viáveis durante meses ou anos com a possibilidade de se descongelarem quando se pretender. Neste trabalho desenvolveram-se dois protocolos de descongelação de organóides caninos e analisou-se o desenvolvimento dos mesmos nas primeiras 72 horas pós descongelamento. Avaliou-se ainda a viabilidade de o uso de um meio humano nos enteróides caninos. Concluiu-se que é possível criopreservar organóides durante anos, conservando a sua viabilidade, apesar de ainda existirem muitas limitações associadas ao processo de descongelamento dos mesmos.

Palavras-chave: Criopreservação, Culturas, Descongelação, Organóides, Pluripotentes.

ABSTRACT

Organoids are complex three-dimensional cell culture models, formed from pluripotent stem cells or stem cells, with the capacity for self-organization and replication of in vivo physiology in a much more precise way than two-dimensional cell culture systems. There is a wide range of applications for organoids, including studies on organogenesis, drug development, cell self-renewal, regenerative medicine, cancer pathogenesis, and other chronic pathologies, such as Inflammatory Bowel Disease in dogs. Through the method of cryopreservation, it is possible to maintain viable organoid cultures for months or years with the possibility of thawing them when desired. In this study, two canine organoid thawing protocols were developed, and their development was analyzed in the first 72 hours post-thawing. The feasibility of using a human medium for canine enteroids was also assessed. It was concluded that it is possible to cryopreserve organoids for years while preserving their viability, although there are still many limitations associated with the thawing process.

Keywords: Cryopreservation, Cultures, Organoids, Pluripotent, Thawing.

LISTA DE ABREVIATURAS

2D (bidimensional): Duas dimensões

3D (3-dimensional): Três dimensões

ASCs (adult stem cells): células totipotentes

CBC (crypt *base* columnar cells): células colunares

CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator): regulador de condutância transmembrana de fibrose cística

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DMSO: Dimetil sulfóxido

DRC: Doença renal crónica

ESCs (embryonic stem cells): Células totipotentes embrionárias

Et al.: E outros, de locução latina “*et alli*”

FBS: Soro de fetos de Bovino

GI: Gastrointestinal

hPSCs (human pluripotent stem cells): Células totipotentes pluripotentes humanas

HV-ULHT: Hospital Veterinário da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

IBD (inflammatory bowel disease): Doença inflamatória intestinal

iPSCs (indeuced pluripotent stem cells): Células pluripotentes induzidas

ISCs (intestinal stem cells): Células totipotentes intestinais pluripotentes

ISH (in situ hybridation): Hibridação *in situ*

ITU: Infecção do trato urinário

LPS: Lipopolissacarídeo

MEC (extra celular matrix): Matriz extracelular

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

OVH: Ovariohisterectomia

PAAF: Punção aspirativa com agulha fina

POCUS: *Point of care ultrasound*

qISCs (quiescente intestinal stem cells): Células totipotentes intestinais quiescentes

TA (transit amplification): Amplificação de trânsito

ÍNDICE

RESUMO	- 3 -
ABSTRACT	- 4 -
LISTA DE ABREVIATURAS.....	- 5 -
ÍNDICE DE TABELAS	- 8 -
ÍNDICE DE FIGURAS	- 9 -
1. CASUÍSTICA DE ESTÁGIO	- 10 -
2. INTRODUÇÃO.....	- 13 -
2.1 CÉLULAS TOTIPOTENTES INTESTINAIS.....	- 17 -
2.2 ORIGEM DOS ORGANÓIDES	- 19 -
2.3 CONCEITO DE ORGANÓIDES.....	- 21 -
2.4 TIPOS DE ORGANÓIDES.....	- 22 -
2.5 CARACTERÍSTICAS DOS ORGANÓIDES.....	- 24 -
2.5.1 Autorenovação.....	- 25 -
2.5.2 Organização tridimensional.....	- 25 -
2.6 Manutenção da diferenciação celular	- 27 -
2.7 Expressão de marcadores moleculares	- 28 -
2.8 Resposta a estímulos ambientais	- 28 -
2.9 ENGENHARIA DOS ORGANÓIDES	- 30 -
2.10 APLICAÇÕES DOS ORGANÓIDES EM MEDICINA VETERINÁRIA.....	- 35 -
2.10.1 Regeneração de tecidos	- 35 -
2.10.2 Descoberta de fármacos e estudos na absorção de fármacos.....	- 36 -
2.10.3 Pesquisa de biomarcadores	- 36 -
2.10.4 Estudo da fisiopatologia de doenças.....	- 36 -
2.10.5 Medicina personalizada	- 37 -
2.10.6 Transplante de órgãos.....	- 37 -
2.11 CULTURA 3D DE ORGANÓIDES INTESTINAIS EM CÃES	- 38 -
2.12 CRIOPRESERVAÇÃO DE ORGANÓIDES	- 41 -
2.13 LIMITAÇÕES DA CULTURA DE ORGANÓIDES NA ATUALIDADE	- 41 -
2.13.1 Nível de maturação e função limitada	- 42 -
2.13.2 Complexidade limitada.....	- 42 -
2.13.3 Heterogeneidade limitada	- 43 -
2.13.4 Limitação das leituras	- 43 -
2.14 Escala de produção	- 43 -
2.15 Falta de vascularização	- 44 -
2.16 Modelos simplificados de doenças	- 44 -

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	- 46 -
3.1 Procedimento científico.....	- 46 -
3.1.1 Protocolo 1.....	- 47 -
3.1.2 Protocolo 2.....	- 48 -
3.1.3 Protocolo de Passagem	- 49 -
4. RESULTADOS	- 50 -
5. DISCUSSÃO.....	- 54 -
6. CONCLUSÃO.....	- 57 -
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 58 -
8. ANEXO	- 1 -

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Casuística de consultas e internamento, por área médica, acompanhadas durante todo o estágio.....	- 11 -
Tabela 2 - Casuística de cirurgias acompanhadas nos meses de estágio.....	- 12 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do epitélio intestinal com os diferentes tipos de células. (Adaptado de Meneses 2016).	- 19 -
Figura 2: Linha do tempo do desenvolvimento do cultivo de organóides (Adaptado de Corró 2020).	- 21 -
Figura 3: Técnicas de culturas de organóides (Adaptado de Brustle 2013).	- 23 -
Figura 4: Diversas aplicações dos organóides (Adaptado de Corró 2020)	- 32 -
Figura 5: Aplicações potenciais dos organóides em Medicina Veterinária (Adaptado de Penning & Van den Boom 2023).	- 35 -
Figura 6: Ilustração esquemática das várias células totipotentes que podem ser usadas para produzir organóides 3D, dependendo da sua origem e espécies (Adaptado de Pain, 2021). ..	- 38 -
Figura 7: Placa de 24 poços às 0h após descongelamento	- 50 -
Figura 8: Microscopia invertida dos organóides às 0h	- 50 -
Figura 9: Microscopia invertida dos organóides às 24h	- 51 -
Figura 10: Microscopia invertida dos organóides às 48h	- 51 -
Figura 11: Microscopia invertida dos organóides às 72h e após a primeira passagem	- 52 -
Figura 12: Microscopia invertida dos organóides às 24h	- 52 -
Figura 13: Microscopia invertida dos organóides às 48h	- 53 -
Figura 14: Microscopia invertida dos organóides às 72h	- 53 -

1. CASUÍSTICA DE ESTÁGIO

1. Estágio Curricular

O estágio curricular da autora decorreu no hospital veterinário de animais de companhia da Universidade Lusófona Humanidades e Tecnologias (HV-ULHT). Iniciou-se no dia 15 de setembro de 2022 e terminou dia 8 de janeiro de 2023.

O estágio estendeu-se pelas diferentes áreas da medicina veterinária de animais de companhia abrangendo medicina interna, cirurgia, imagem, anestesia, oncologia, dermatologia, neurologia e serviço de urgência, com o objetivo de serem percorridos todos os domínios por forma a melhorar e aprofundar o conhecimento adquirido.

O período de estágio totalizou 600 horas, distribuídas pelos diversos horários laborais: manhã, tarde, noite e fins de semana. O acompanhamento dos médicos do hospital foi rotativo para haver a possibilidade de contacto com diferentes métodos de trabalho nas diversas áreas.

Nas cirurgias assistidas, a autora teve oportunidade ocupar várias funções (anestesia, ajudante de cirurgia e apenas observador do processo) aumentando o conhecimento prático, desde a preparação pré-cirúrgica do animal até à parte de recobro. Assim sendo, foi possível acompanhar os pacientes na escolha e administração dos fármacos utilizados durante o pré-cirúrgico, cirúrgico e pós cirúrgico, bem como proceder à colocação de cateteres e tubos endotraqueais, assepsia das várias regiões a serem intervencionadas, preparação do animal na mesa cirúrgica e acompanhamento da fase de recobro.

Na parte do internamento foram realizados diversos procedimentos: avaliações físicas aos animais internados, administrações de medicações, ajuda em métodos de contenção, passeios dos animais internados, alimentações, execução de pensos, POCUS (point-of-care ultrasound) colocação de cateteres e ainda prestada ajuda a equipas em situações de urgência.

No total foram acompanhados 332 animais, sendo a sua maioria cães.

Dentro da clínica médica foram observados casos de várias especialidades demonstrados na tabela 1.

Tabela 1 - Casuística de consultas e internamento, por área médica, acompanhadas durante todo o estágio.

Área Médica	Número Absoluto	Porcentagem
Imagiologia	38	11,9%
Endocrinologia	54	17,1%
Urgência	37	11,7%
Consulta de acompanhamento	35	11%
Urologia/Nefrologia	41	13%
Dermatologia	20	6,3%
Oftalmologia	11	3,5%
Endocrinologia	62	19,5%
Infeciosas e Parasitárias	4	1,3%
Neurologia	8	2,5%
Oncologia	7	2,2%
Total	317	100%

A área com maior casuística acompanhada durante o estágio foi a endocrinologia devido a um elevado número de consultas acompanhadas com médicos de medicina interna. Em segundo lugar, urologia e nefrologia, onde foram observados um grande número de pacientes com doença renal crônica (DRC) e infecções do trato urinário (ITU).

Em relação a área de imagem, foram realizados vários R-X e acompanhadas várias ecografias, incluindo eco-cardio e ecografia ocular. Foi ainda possível assistir várias cistocenteses e biópsias por punção aspirativas de agulha fina (PAAF).

As cirurgias acompanhadas, num total de 15 casos, consistiram, maioritariamente, em ovariectomia (OVH) e orquiectomias (Tabela 2).

Na área da oncologia foi possível acompanhar várias administrações quimioterapêuticas. Em dermatologia a autora acompanhou vários problemas dermatológicos, e executou métodos de coloração de amostras com a respetiva observação microscópica. Na área de neurologia foram observados diversos pacientes e dada a oportunidade de realizar vários exames neurológicos.

Tabela 2 - Casuística de cirurgias acompanhadas nos meses de estágio.

Procedimento Cirúrgico	Número Absoluto	Percentagem
Ovariohisterectomia (OVH)	5	33,3%
Orquiectomia	6	40%
Odontologia	3	20%
Oftalmologia	1	7,6%
Total	15	100%

De uma forma geral estes seis meses de estágio fomentaram uma sólida aquisição de conhecimentos teórico-práticos que permitiram à autora consolidar conhecimentos e compreender a rotina e funcionamento de um hospital de animais de companhia.

2. INTRODUÇÃO

O avanço da tecnologia em biologia celular e molecular tem proporcionado inúmeras possibilidades para a pesquisa científica em Medicina Veterinária. Entre as técnicas mais recentes, destacam-se os organóides, estruturas tridimensionais que mimetizam *in vitro* a arquitetura e algumas funções de órgãos específicos *in vivo* (Clevers *et al.*, 2016).

Os cães são frequentemente utilizados em estudos toxicológicos. Só no ano de 2018, na União Europeia, foram utilizados para fins científicos 17.711 cães, totalizando 25,717 animais em uso (European Commission, 2021). Contudo, os Estados Unidos da América superam largamente o número, tendo utilizado 58.511 cães para pesquisa em 2019 (United States Department of Agriculture, 2019). Tais estatísticas destacam a necessidade urgente de substituir os métodos de investigação animal por alternativas viáveis *in vitro*, de acordo com o princípio dos 3Rs (e conceito dos 4Rs), ou pelo menos reduzir o número de animais utilizados para pesquisa ao mínimo absoluto (Collins *et al.*, 2019).

Para esse fim, métodos *in vitro* de última geração estão a ser aprimorados com o objetivo de reduzir o número de animais usados em pesquisa e minimizar a dor daqueles que continuam a ser usados neste tipo de procedimentos. Recentemente, foi desenvolvido um novo método capaz de permitir a cultura prolongada de células totipotentes ou criptas intestinais isoladas denominado organóide enteróide. Estas estruturas são formadas a partir de células totipotentes pluripotentes ou células estaminais que se diferenciam e se auto-organizam em estruturas tridimensionais complexas.

Essas células são nutridas com uma combinação adequada de fatores de crescimento e cultivadas numa matriz extracelular (MEC) tridimensional, permitindo que se diferenciem em organóides enteróides, exibindo as principais funções do epitélio intestinal normal, ou seja, assemelhando-se a um mini-intestino (Sato *et al.*, 2009; Barker *et al.*, 2012).

Os organóides são modelos *in vitro* que mimetizam a organização e as funções dos tecidos em condições fisiológicas (Pleguezuelos *et al.* 2020). As células presentes nos organóides são capazes de manter a sua diferenciação celular apresentando características semelhantes às células presentes nos tecidos *in vivo*, o que permite o estudo de processos biológicos e patológicos de maneira mais fiel à realidade (Corrò *et al.*, 2020).

O estabelecimento de sistemas *in vitro* relevantes para interpretar o desenvolvimento de doenças complexas é de extrema importância. Atualmente existe uma grande evolução no uso de modelos clássicos de cultura de células para modelos tridimensionais mais sofisticados

com o objetivo de investigar os efeitos de microorganismos comensais ou patogênicos em células/órgãos específicos de seres humanos, animais de companhia e de produção (Neal *et al.*, 2018). Muitos desses modelos podem ser aplicados em culturas de organóides de cancro. Existem também modelos altamente sofisticados de interface ar-líquido de organóides de cancro derivados de pacientes. Um desses modelos inclui até mesmo o complexo microambiente tumoral com células imunes, tornando-se um modelo muito atrativo e complexo (Neal *et al.*, 2018).

Variadíssimos trabalhos têm sido realizados com organóides de animais de companhia, incluindo intestino canino e felino (Chandra *et al.*, 2019; Kramer *et al.*, 2020; Gabriel *et al.*, 2022; Tekes *et al.*, 2020), fígado canino e felino (Kruitwagen *et al.*, 2017 e 2020), rim (Chen *et al.*, 2019), bexiga (Elbadawy *et al.*, 2019), próstata (Usui *et al.*, 2017), pele (Wiener *et al.*, 2018) e tecido tireoideu (Jankovic *et al.*, 2021). Além destes modelos de animais de companhia já foram produzidos organóides derivados de animais de produção, principalmente organóides intestinais de espécies, como porcos, bovinos, ovinos, equinos e aves (Powell *et al.*, 2017), que foram recentemente reformulados de forma mais aprofundada (Kawasaki *et al.*, 2022). Posto isto, podemos afirmar que os organóides podem evoluir para se tornar um modelo central que conecta os três pilares do conceito “One Health”, interligando a saúde humana, animal e ambiental.

As doenças gastrointestinais (GI) não afetam apenas os seres humanos, sendo também uma importante ameaça para animais de produção e animais de companhia, implicando elevados custos tanto para os sistemas de saúde quanto para os proprietários de animais. Vírus e bactérias enteropatogênicas estão frequentemente envolvidos na iniciação ou no agravamento de patologias gastrointestinais (Hoffmann *et al.*, 2016; Honneffer *et al.*, 2014; Mondo *et al.*, 2019).

Os organóides têm ganho destaque nos últimos anos devido à sua capacidade de replicar a complexidade dos tecidos *in vivo* mas em ambiente controlado, permitindo estudar mais pormenorizadamente a fisiopatologia de doenças humanas e veterinárias. Além disso, é possível conduzir ensaios científicos com maior precisão.

Esse método de cultura tem-se mostrado um poderoso sistema para investigar os mecanismos moleculares reguladores e patológicos do epitélio intestinal (Grabinger *et al.*, 2014). Os organóides também são amplamente utilizados para estudar a regulação de células totipotentes intestinais no que toca à auto-renovação, crescimento e diferenciação, podendo ainda ser usados para investigar a fisiopatologia das mais diversas doenças gastrointestinais,

como cancro colorretal, bem como a resposta terapêutica a diversos fármacos (Tesori *et al.*, 2013; Csukovich *et al.*, 2022).

Estudos têm demonstrado que os organóides podem ser utilizados para investigar outras doenças humanas e animais, incluindo cancro, doenças do sistema nervoso central, renais, hepáticas, entre outras (Yusuke *et al.*, 2022; Meneses *et al.*, 2022). Outra aplicação promissora dos organóides em Medicina Veterinária é a medicina regenerativa, replicando modelos para mimetizar a regeneração tecidual e a formação de órgãos, bem como para testar a eficácia de terapias regenerativas em diferentes espécies (Meneses *et al.*, 2022).

Além disso, a capacidade dos organóides serem cultivados e armazenados por longos períodos em condições controladas confere-lhes uma vantagem importante permitindo a avaliação de terapias a longo prazo e a realização de estudos de toxicidade em diferentes espécies (Csukovich *et al.*, 2022).

O crescimento a longo prazo de culturas organotípicas intestinais foi viabilizado através da identificação de condições que simulam o ambiente onde se originam as células estaminais intestinais (Meneses *et al.*, 2022). Apesar da sua utilidade como modelos para doenças humanas, apenas recentemente foram publicados alguns modelos de organóides intestinais em Medicina Veterinária, envolvendo cães, gatos e animais de exploração agrícola. A doença inflamatória intestinal (IBD) caracteriza-se pela inflamação do intestino, sendo a sua patogénese desconhecida, afetando tanto humanos como cães. A adoção de novas tecnologias, como a de organóides, contribui para o avanço do conhecimento sobre a IBD, além de que permite prever a resposta a novas terapias, melhorando os resultados clínicos (Meneses *et al.*, 2022).

Com base nos dados atuais em humanos, roedores e cães, bem como em descobertas preliminares, confirma-se a hipótese de que os organóides intestinais caninos reproduzem de forma fiel a estrutura e função do segmento intestinal que representam, constituindo assim um modelo ideal para o estudo da IBD em cães (Meneses *et al.*, 2022).

O uso de organóides pode reduzir a necessidade da utilização de animais vivos em ambiente de laboratório permitindo que as pesquisas sejam conduzidas da forma mais ética e sustentável.

Vários estudos recentes geraram organóides a partir de tecidos de diferentes órgãos de cães. Por exemplo, Powell *et al.* (2017) cultivaram enteróides derivados do íleo durante 229 dias, enquanto Chandra *et al.* (2019) produziram organóides de vários segmentos do intestino delgado e cólon. Ambos os estudos demonstraram que os organóides intestinais de cães podem

ser criopreservados, descongelados e expandidos para serem utilizados em experiências laboratoriais futuras. Os organóides enteróides de cães são formados por diferentes tipos de células do epitélio intestinal, incluindo células tronco/progenitoras, enterócitos absortivos (que expressam enzimas do bordo em escova), células quimiossensoriais (que expressam SOX9 e gene DCLK1), tight junctions e células semelhantes às células de Paneth (Chandra *et al.*, 2019). É importante notar que, embora as células de Paneth sejam relatadas como ausentes em cães, Chandra *et al.*, (2019) demonstraram células funcionalmente equivalentes no epitélio intestinal do cão e em organóides.

Os mesmos autores utilizaram uma série de testes funcionais para demonstrar e quantificar as funções epiteliais dos organóides sob microscopia ótica. Foram realizadas pesquisas sobre a função do regulador de condutância transmembrana para fibrose quística e sobre a absorção de vesículas semelhantes a exossomas (do parasita nematóide *Ascaris suis*). Estes testes podem ser usados para avaliar o desempenho do fenótipo e a resposta aos tratamentos utilizados neste tipo de patologias.

Organóides de queratinócitos de cães foram produzidos para tratar distúrbios de pele como alopecia (Wiener *et al.*, 2018). Estes organóides são gerados a partir de folículos capilares microdissecados ou da epiderme interfolicular e podem ser mantidos em cultura por vários meses permanecendo fenotipicamente estáveis, conforme caracterizado pela análise de expressão genética, microscopia, histologia e expressão de proteínas.

Na investigação biomédica humana os cães são frequentemente usados como modelo uma vez que em algumas doenças se assemelham muito mais ao ser humano do que os roedores geralmente usados (Kruitwagen *et al.*, 2014; Spee *et al.*, 2010). Assim sendo, já foi desenvolvido um sistema de cultura de organóides hepáticos de cães onde foram utilizados cães saudáveis e cães com deficiência no gene COMMD1 para avaliar as terapias genéticas e de células totipotentes já descobertas. Este gene é essencial para a homeostase do cobre a nível hepático, sendo por isso de extrema importância entender a mutação genética para que se possa encontrar uma cura para esta patologia, que afeta tanto humanos como animais (Nantasanti *et al.*, 2015). Estes organóides hepáticos foram produzidos a partir de amostras de fígado congeladas com DMSO ou a partir de biópsias recolhidas através de uma PAAF (punção aspiração com agulha fina) (Nantasanti *et al.*, 2015).

Estas culturas de organóides de fígado de cães foram mantidas em criopreservação durante 8 meses e foram retomadas após a sua descongelação. A análise do cariótipo dos organóides revelou que a maioria das células (> 85%) manteve o número normal de

cromossomas, mesmo após 8 meses de cultura provando que é possível a manutenção da estabilidade genética dos organóides a longo prazo. Além disso, os autores deste procedimento mostraram ainda que existe uma forte possibilidade de que a autorrenovação e diferenciação em células tubulares se deva à expressão induzida da proteína STAT3, sobre expressa a nível celular nestas células (Nantasanti *et al.*, 2015).

Além dos diferentes tipos de organóides acima referidos, foram produzidos organóides de cancro de próstata (Usui *et al.*, 2017) e bexiga (Elbadaw *et al.*, 2019) a partir de células cancerígenas presentes na urina de cães. Ambos os modelos de organóides assemelhavam-se às características histopatológicas e perfis de expressão genética dos tecidos originais (Elbadaw *et al.*, 2019).

O uso de organóides também pode ser útil para o desenvolvimento de terapias personalizadas para animais de estimação, já que as diferenças entre indivíduos são mais facilmente estudadas num modelo *in vitro* que mimetize a fisiologia do animal em questão. Por exemplo, organóides de tumores de cães podem ser utilizados para testar a eficácia de diferentes tratamentos, permitindo a escolha da terapia mais adequada para cada caso (Soumya *et al.*, 2021).

2.1 CÉLULAS TOTIPOTENTES INTESTINAIS

Ao longo do processo de desenvolvimento embrionário o trato gastrointestinal (GI) origina-se do endoderma e assume a forma de um tubo que pode ser dividido em três regiões distintas: o intestino anterior, o intestino médio e o intestino posterior. O intestino anterior é responsável pela formação da cavidade oral, faringe, vias respiratórias, pâncreas, estômago e fígado (Fatehulah *et al.*, 2016). Por sua vez, o intestino médio desenvolve-se dando origem ao intestino delgado e ao cólon ascendente, enquanto o intestino posterior origina o restante do cólon e o reto. O estudo das alterações moleculares e da regulação da sinalização subjacente ao desenvolvimento do trato gastrointestinal, bem como da manutenção da homeostase, desempenham um papel crucial na formação e preservação dos organóides derivados de células totipotentes adultas (ASCs) e pluripotentes (PSCs) em regiões específicas. Esses estudos têm sido desenvolvidos para investigação e criação *in vitro* de processos fisiológicos e patológicos relacionados com o trato gastrointestinal (Haaker *et al.*, 2020).

O epitélio do intestino delgado possui uma elevada capacidade de autorrenovação, regenerando-se a cada três a cinco dias. Há muito tempo que se sabe que as células totipotentes intestinais pluripotentes (ISCs) são a base celular para este potencial regenerativo (Carlone &

Breault, 2012). As ISCs encontram-se na base da cripta intestinal e as suas células-filhas de amplificação de trânsito (TA), que se dividem rapidamente, ocupam o restante da cripta e fluem para os flancos das vilosidades onde se diferenciam e absorvem nutrientes. Os tipos de células diferenciadas incluem os enterócitos absorventes, várias células secretoras (células de *Paneth*, células caliciformes, células enteroendócrinas e células tufo) e as células M das placas de *Peyer* (Sato & Clevers, 2013).

Os enterócitos absorventes são o tipo de célula predominante no epitélio intestinal e desempenham um papel central na digestão e absorção de nutrientes no lúmen do intestino. As células caliciformes são o segundo tipo de célula predominante e produzem mucina para lubrificar a superfície luminal. Esta camada de mucina contém a flora bacteriana antes desta se ligar à superfície epitelial. As células enteroendócrinas são um tipo de célula rara e estão espalhadas ao longo do eixo da cripta. Ao detetarem sinais neuroendócrinos, as células enteroendócrinas produzem várias hormonas para controlar a secreção de enzimas digestivas, o metabolismo e os movimentos intestinais. Em contraste com esses três tipos de células diferenciadas, as células de *Paneth* são células diferenciadas de longa duração (dois a três meses) que migram para o fundo da cripta, onde esterilizam o lúmen através da produção de peptídeos antibacterianos. O epitélio colónico é desprovido de células de *Paneth* mas contém células semelhantes denominadas células secretoras de cripta profunda ou células caliciformes de base de cripta (Date & Sato, 2015).

Foram identificados dois tipos de ISC. O primeiro, designado por célula +4, foi definido com base na retenção de marcadores de DNA, proliferação e resposta à lesão por radiação, e o segundo, conhecido como células colunares da base da cripta (CBC), foi definido utilizando o rastreamento de linhagem citológica. Mais recentemente, os marcadores moleculares e as técnicas de rastreamento de linhagem transgénica foram usados para definir as células do hemograma e as células +4. As células do hemograma são as células proliferativas que impulsionam a produção celular nas criptas; dividem-se diariamente, com uma rotatividade frequente (Meneses *et al.*, 2016)

As células com marcação +4 foram recentemente reclassificadas como células totipotentes intestinais de reserva ou quiescentes (qISCs). Estas células têm uma taxa de divisão muito baixa em condições normais, mas podem ser induzidas a produzir novas células CBC em resposta a lesões ou outros estímulos (Goodell *et al.*, 2015). Uma das razões pelas quais o campo da investigação intestinal não chegou a um consenso sobre a identidade e localização das células totipotentes intestinais nas últimas quatro décadas tem sido a falta de marcadores

bem validados para esta população de células. A identificação de tais marcadores é fundamental para avançar na compreensão da biologia das células totipotentes intestinais, da homeostase tecidual, do reparo e do cancro (Lin & Barker, 2011). Existem vários marcadores de células para as células totipotentes do hemograma e para as células com marcação +4 (Leushacke & Barker, 2014). Embora a sua especificidade seja controversa, alguns deles serão apresentados a seguir na Figura 3.

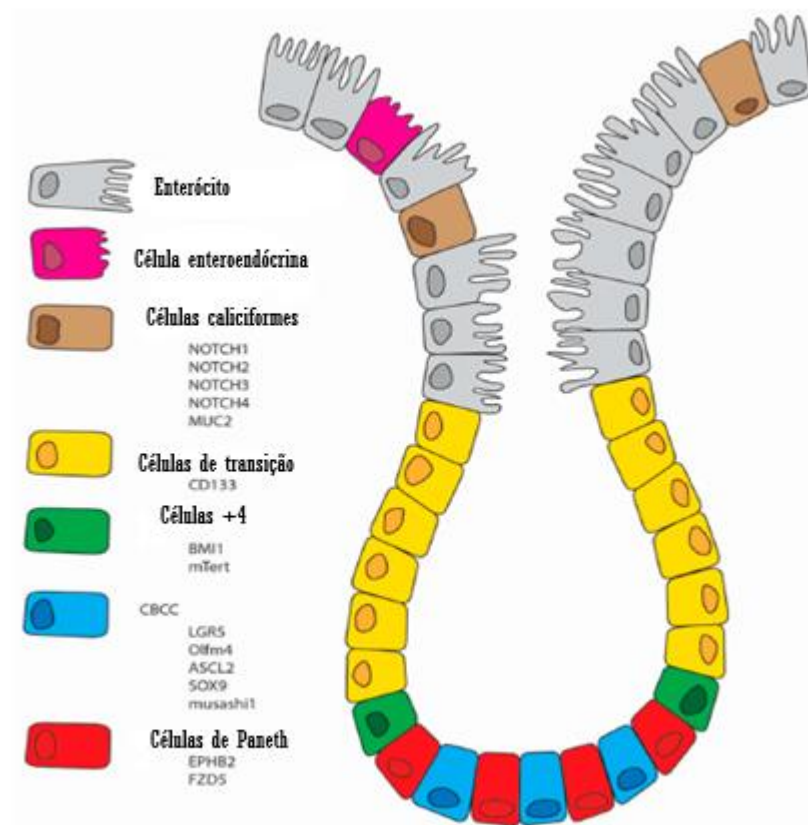


Figura 1: Representação esquemática do epitélio intestinal com os diferentes tipos de células. (Adaptado de Meneses 2016).

2.2 ORIGEM DOS ORGANÓIDES

No ano de 1907, Wilson realizou a primeira tentativa documentada de regeneração *in vitro* de um organismo, demonstrando que células esponjosas dissociadas poderiam auto-organizar-se originando um organismo completo. Décadas mais tarde vários grupos de cientistas efetuaram experiências de dissociação e reagregação de células para gerar diferentes tipos de órgãos em anfíbios, como propensofros (Holtfreter, 1944), e em embriões de galinha (Weiss & Taylor, 1960).

Em 1964, Malcom Steinberg propôs a hipótese da adesão diferencial, sugerindo que a classificação e o rearranjo celular poderiam ser explicados pela termodinâmica mediada pela adesão celular superficial diferencial (Steinberg, 1964). O campo da pesquisa com células totipotentes começou a florescer quando as células pluripotentes (PSCs) foram isoladas e estabelecidas pela primeira vez a partir de embriões de rato (Evans, 1981; Martin, 1981). No entanto, somente em 1998 os cientistas conseguiram isolar e cultivar células totipotentes embrionárias derivadas de blastocistos humanos pela primeira vez (Thomson *et al.*, 1998).

Posteriormente, as iPSCs (células totipotentes pluripotentes induzidas) foram estabelecidas por meio da reprogramação de fibroblastos de rato e humanos, o que teve um impacto significativo nas pesquisas relacionadas com células totipotentes e organóides (Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006, Yu *et al.*, 2007). Esses avanços na obtenção e cultura de células totipotentes têm sido fundamentais para o desenvolvimento e melhoria dos modelos de organóides abrindo novas possibilidades para estudos biológicos e médicos.

Em 1987, Liu *et al.* melhoraram as condições de cultura das células, simulando o microambiente *in vivo*. Na altura demonstraram que o epitélio mamário pode formar ductos tridimensionais e lumina quando cultivado em extrato EHS ECM, onde parecem ser capazes de sintetizar e secretar proteínas do leite, contrariamente ao tipo de cultura bidimensional. Desta mesma forma, células epiteliais alveolares tipo II foram capazes de manter a sua diferenciação na presença da ECM, destacando a importância das interações célula-matriz na manutenção e diferenciação de tecidos (Takahashi *et al.*, 2007). A pesquisa de organóides evoluiu de culturas 2D para 3D quando foi possível gerar tecido cortical cerebral a partir de células totipotentes embrionárias usando o método de cultura de agregação 3D.

Em 2009, Sato *et al.* demonstraram que as células totipotentes intestinais adultas que expressam o recetor 5 acoplado à proteína G contendo uma repetição rica em leucina (Lgr5) podem formar organóides intestinais tridimensionais em Matrigel, que se auto-organizam e se diferenciam em estruturas criptoglandulares de vilosidades, mesmo na ausência de mesênquima. Este foi o primeiro relato da produção de uma cultura organóide tridimensional derivada de uma única célula-tronco adulta, definindo o cenário para muitos trabalhos subsequentes com organóides noutro tipo de órgãos incluindo mesoderma (como estômago, fígado, pâncreas, pulmão e rim) e neuroectoderma (cérebro e retina), utilizando células totipotentes ASCs ou PSCs. A linha do tempo da origem dos organóides está descrita na Figura 1.

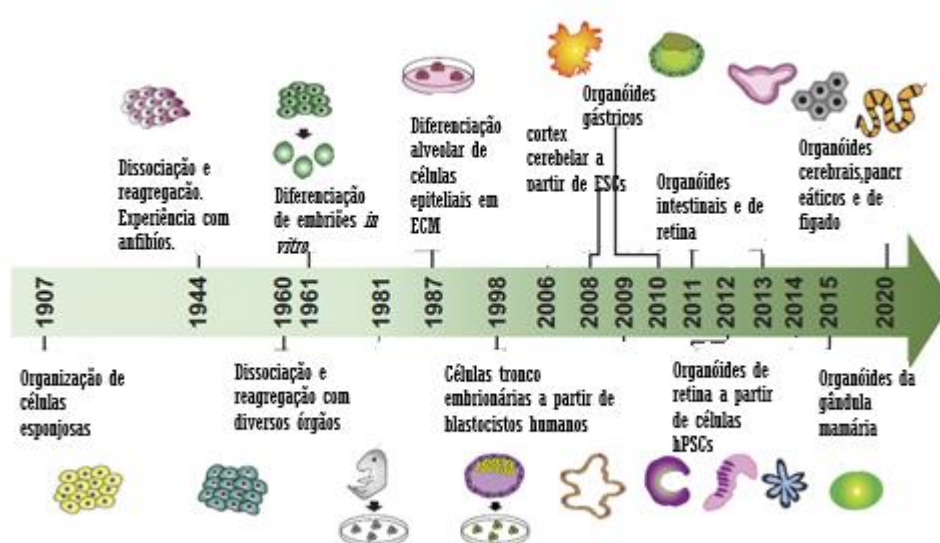


Figura 2: Esquema temporal do desenvolvimento da cultura de organóides (Adaptado de Corrà 2020).

2.3 CONCEITO DE ORGANÓIDES

Um organóide é formado a partir de células totipotentes ou células totipotentes adultas que são cultivadas em condições específicas permitindo a sua autorrenovação de forma independente. As células totipotentes podem ser obtidas a partir de diferentes fontes, como embriões, células totipotentes pluripotentes induzidas (iPSCs) derivadas de células adultas, ou células totipotentes adultas presentes em tecidos específicos. Essas células totipotentes são extraídas, isoladas e armazenadas para uso à posteriori. Depois, as células totipotentes são colocadas num meio de cultura personalizado contendo nutrientes, fatores de crescimento e outras substâncias necessárias para a sua sobrevivência e crescimento. Esse meio de cultura pode ser ajustado para promover a formação de um tipo específico de organóide, dependendo do tecido desejado. As células totipotentes aglomeram-se em formato tridimensional, através de culturas suspensas ou matrizes tridimensionais. Essa orientação permite que as células interajam umas com as outras e se organizem em três dimensões. À medida que as células totipotentes se agrupam, elas começam a diferenciar-se assumindo características semelhantes às do tecido que se pretende replicar (Sato *et al.*, 2009).

O processo de formação dos organóides implica que estes sejam submetidos a diferentes passagens, também conhecidas como subculturas, que são um processo em que os organóides são transferidos para novas placas de cultura ou recipientes para permitir sua expansão e continuidade do crescimento. É um procedimento comumente realizado em

laboratórios para manter e ampliar os organóides ao longo do tempo (Corrò *et al.*, 2020). Durante as passagens, os organóides são dissociados ou fragmentados em pequenos pedaços para permitir que se distribuam em novas placas de cultura. Este processo ocorre devido ao uso de enzimas digestivas específicas ou de processos mecânicos delicados, dependendo da natureza dos organóides e do tipo de tecido ou órgão em estudo (Corrò *et al.*, 2020). Após a dissociação, os fragmentos de organóides são transferidos para um novo meio de cultura, geralmente contendo fatores de crescimento e nutrientes adequados para sustentar o seu crescimento. Os organóides são então incubados nas condições apropriadas, como temperatura, humidade e concentração de CO₂ para permitir a sua sobrevivência e proliferação (Corrò *et al.*, 2020). As passagens são geralmente realizadas em intervalos de tempo regulares, que podem variar de alguns dias a algumas semanas, dependendo da taxa de crescimento dos organóides e dos objetivos experimentais. Cada passagem resulta num aumento do tamanho do organóide o que permite que seja utilizado em diferentes estudos ou para a distribuição a outros laboratórios (Corrò *et al.*, 2020). É importante salientar que as passagens podem influenciar a estabilidade genética e a heterogeneidade dos organóides ao longo do tempo. Portanto, é fundamental manter um elevado controlo a nível experimental e monitorizar regularmente a expressão de marcadores moleculares e a função dos organóides durante as passagens para garantir a qualidade e consistência dos resultados (Corrò *et al.*, 2020).

2.4 TIPOS DE ORGANÓIDES

Existem diferentes tipos de organóides que podem ser produzidos para uso em estudos veterinários, dependendo do objetivo da pesquisa. Algumas das categorias mais comuns incluem organóides gastrointestinais, hepáticos, renais e neurais. São importantes para o estudo das doenças associadas a estes tecidos e para o desenvolvimento de novos tratamentos para essas doenças (Fatehullah *et al.*, 2016).

Os organóides podem ser produzidos a partir de células totipotentes adultas (ASCs), células totipotentes embrionárias (ESCs) ou células pluripotentes induzidas (iPSCs) (Figura 2). As ESCs são células totipotentes obtidas a partir da massa interna do embrião antes da implantação. As ASCs, em princípio, são derivadas de tecido adulto maduro, mas não necessariamente de animais adultos, podendo ser obtidas de animais juvenis ou mesmo de embriões avançados (Fatehullah *et al.*, 2016; Lancaster & Knoblich, 2014).

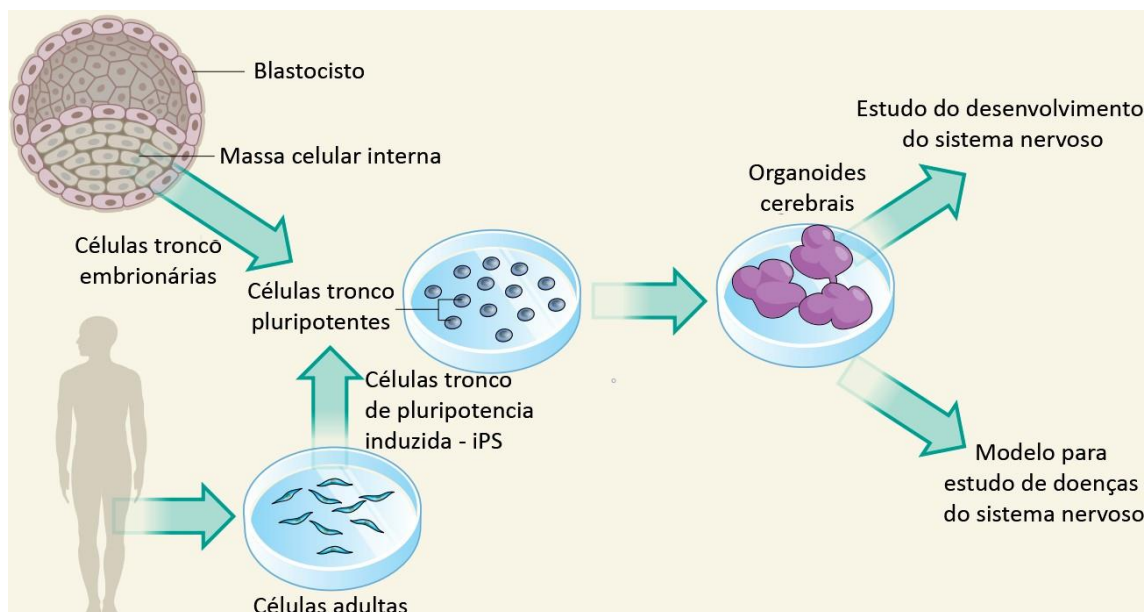


Figura 3: Técnicas de culturas de organóides (Adaptado de Brustle 2013).

Os organóides derivados de ASCs são intrinsecamente programados com funções específicas de localização (Middendorp *et al.*, 2014), tornando-os mais semelhantes a um adulto do que os organóides derivados de iPSCs ou ESCs, embora os últimos ainda retenham células mesenquimais associadas ao tecido (Wells & Spence, 2014).

Sob condições adequadas, as células totipotentes podem dividir-se gerando uma célula-filha que mantém a natureza de célula totipotente, enquanto que a outra célula-filha pode diferenciar-se em outro tipo celular específico do tecido. Nos tecidos *in vivo*, o microambiente direto das células totipotentes e das suas células-filhas em diferenciação fornecem diversos sinais que direcionam esses processos e orientam a direção da diferenciação, determinando quais tipos de células e tecidos serão desenvolvidos. Esses sinais incluem os contatos célula a célula (Morrison & Spradling, 2008), contatos de células com compostos da matriz extracelular, fatores de crescimento autócrinos, hormonas produzidas por células vizinhas, outras células do tecido ou células periféricas de órgãos (Lancaster & Knoblich, 2014).

Embora os organóides sejam amplamente utilizados na pesquisa médica e veterinária, há uma escassez de estudos específicos que utilizem essa técnica em gatos. No entanto, alguns estudos sugerem que os organóides podem ser uma ferramenta valiosa para estudos em felinos (Tekes *et al.*, 2020; Kruitwagen *et al.*, 2017; Haaker *et al.*, 2020). No contexto desta espécie, foram produzidos com êxito organóides a partir de tecidos intestinais e hepáticos, utilizando as técnicas de cultura celular 3D atuais (Tekes *et al.*, 2020; Kruitwagen *et al.*, 2017; Haaker *et al.*, 2020). Estes organóides de gato foram utilizados para pesquisas biomédicas e/ou veterinárias,

com foco na própria espécie. O tecido ileal retirado de gatos foi utilizado para gerar organóides enteróides que foram mantidos durante 67 dias e 18 passagens em cultura sendo posteriormente criopreservados. Tal como os enteróides de outras espécies, os enteróides de gato formaram estruturas por brotamento, com regiões distintas de proliferação celular mostradas pela coloração EdU, em áreas de brotamento e dobramento. Os enteróides de gato expressaram o marcador de células totipotentes de cripta LGR5 mas, ao contrário de enteróides de outras espécies, o marcador mesenquimal vimentina foi expresso de forma bastante óbvia desaparecendo por volta da passagem 7-9, seguida pela cessação da sua expansão na passagem 10 cessando o crescimento entre a passagem 13–18. Isso sugere que os tipos de células do tipo mesenquimal são essenciais para o crescimento enteróide de gato. Recentemente, Tekes *et al.*, (2020) relataram terem gerado organóides derivados do cólon de gato e estudado as interações patógeno-hospedeiro e a resposta imunitária contra o coronavírus entérico felino.

No que diz respeito aos organóides de fígado de gato, estes foram gerados a partir de amostras de fígado que foram mantidas durante 25 passagens em condições de cultura. Além disso, a análise de cariótipo mostrou que 80-85% da população de células no organoide do fígado mantinha o número normal de cromossomas (Velasco *et al.*, 2020), quando mantidos por 23 passagens refletindo a estabilidade genética a longo prazo dos organóides. Os organóides hepáticos felinos expressaram marcadores de células totipotentes adultas (LGR5, PROM1 e BMI1), células progenitoras hepáticas (KRT7, KRT19 e HNF1b), hepatócitos precoces (HNF4a e TBX3, ALB) e hepatócitos maduros (PROX1, PC, HMGCL, TTR, FAH e CYP3A132). Recentemente, no mesmo estudo, o grupo de pesquisa utilizou organóides de fígado de gato e identificou duas drogas potencialmente úteis no tratamento da lipidose hepática em gatos (Haaker *et al.*, 2020).

2.5 CARACTERÍSTICAS DOS ORGANÓIDES

As principais características dos organóides incluem a capacidade de se reproduzirem numa organização tridimensional de células com uma arquitetura semelhante ao tecido original sendo ainda capazes de manter a diferenciação celular, a expressão de marcadores moleculares e a capacidade de resposta a estímulos ambientais (Sato *et al.*, 2013). As suas características são as seguintes:

2.5.1 Autorenovação

A capacidade dos organóides de se autorrenovarem a partir de células tronco embrionárias ou de células pluripotentes é uma das suas principais características, que tem sido amplamente estudada em medicina veterinária (Sato *et al.*, 2013). Esta característica permite que essas estruturas celulares sejam mantidas a longo prazo e que novas culturas possam ser geradas a partir de um único organóide. As células possuem ainda a capacidade de se organizarem numa estrutura semelhante ao tecido original sem a necessidade de intervenção externa (Soumya *et al.*, 2021). Esta capacidade é importante porque permite a produção de organóides a partir de células saudáveis ou de células de tumorais, sendo possível a reprodução de doenças em modelos animais (Soumya *et al.*, 2021).

Assim, a característica de autorrenovação dos organóides permite a manutenção de culturas por longos períodos, a produção em larga escala de tecidos e a reprodução de doenças em modelos animais *in vitro* (Soumya *et al.*, 2021).

2.5.2 Organização tridimensional

A organização 3D é uma característica essencial para a funcionalidade e relevância dos organóides na pesquisa em medicina veterinária dado que a maioria das células dos tecidos vivos estão organizadas dessa forma, o que afeta a interação entre as células e o ambiente extracelular (Stewart *et al.*, 2018). A organização em três dimensões dos organóides permite que eles reproduzam as características fisiológicas e patológicas dos tecidos do organismo animal, tornando-os um modelo eficaz para a pesquisa porque permite que as células interajam de maneira semelhante ao que ocorre no órgão original, o que pode ser crucial para o estudo de doenças, para o desenvolvimento de novas terapias e testes de fármacos (Stewart *et al.*, 2018).

A organização tridimensional dos organóides envolve a formação de diferentes tipos celulares e a sua disposição espacial correta, bem como a criação de microambientes especializados. Importa referir alguns pontos-chave sobre a organização:

2.5.2 a) Autoagregação celular

As células iniciais, células totipotentes pluripotentes ou células progenitoras, têm capacidade de se autoagregarem, formando uma estrutura esférica inicial conhecida como corpo embrióide. Este passo celular é crucial para o desenvolvimento organóide (Stewart *et al.*, 2018).

2.5.2 b) Polaridade e camadas celulares

À medida que o corpo embrióide se desenvolve, ocorre a polarização celular, com a formação de diferentes camadas de células. Essas camadas geralmente incluem uma camada externa de células ectodermais, uma camada interna de células endodermais e uma camada intermédia de células mesodermas (Zachos *et al.*, 2016). Essa organização em camadas é essencial para a correta formação dos diferentes tipos celulares e para a função adequada do tecido ou órgão representado pelo organóide (Zachos *et al.*, 2016).

2.5.2 c) Auto-organização e morfogénese

À medida que os organóides se desenvolvem, ocorre um processo de auto-organização, no qual as células interagem e se organizam espontaneamente em estruturas complexas (Wells *et al.*, 2014). Essa auto-organização é regulada por interações celulares, gradientes de sinalização e propriedades físicas do ambiente tridimensional. Esses processos são responsáveis pela formação de estruturas morfologicamente semelhantes às encontradas nos órgãos naturais, como a formação de vesículas oculares num organóide de retina ou a organização de ductos e ácinos num organóide de glândula mamária (Wells *et al.*, 2014).

2.5.2 d) Vascularização

A organização tridimensional adequada dos organóides também envolve a vascularização, ou seja, a formação de vasos sanguíneos funcionais dentro da estrutura (Takahashi *et al.*, 2007). A vascularização é crucial para fornecer nutrientes e oxigénio às células, além de permitir a troca de substâncias e a remoção de resíduos metabólicos. A falta de vascularização adequada pode limitar o crescimento e a funcionalidade dos organóides (Takahashi *et al.*, 2007).

2.5.2 e) Reprodução de estruturas e funções específicas

Dependendo do tipo de órgão que está sendo desenvolvido, os organóides devem mimetizar não apenas a organização tridimensional, mas também a estrutura e as funções específicas do mesmo (Takahashi *et al.*, 2007). Isso pode envolver a formação de unidades funcionais, como alvéolos pulmonares, vilosidades intestinais ou folículos ovários, com características celulares e microambientes apropriados para os mesmos (Takahashi *et al.*, 2007).

2.6 Manutenção da diferenciação celular

Os organóides mantêm a diferenciação celular, ou seja, as células que compõem a estrutura têm características semelhantes às do tecido original, não ocorrendo desdiferenciação (Sahoo *et al.*, 2022). A preservação da identidade celular e das funções é essencial para que os organóides possam ser utilizados em estudos de diferentes áreas, incluindo a medicina veterinária. A manutenção da diferenciação celular em organóides é um aspecto fundamental para garantir a funcionalidade dessas estruturas tridimensionais que se assemelham a órgãos em miniatura (Sahoo *et al.*, 2022).

Existem vários fatores que contribuem para a manutenção da diferenciação celular em organóides, conforme descrito por Pleguzuelos *et al.*, 2020, sendo eles:

1. Matriz extracelular (MEC)

A MEC desempenha um papel importante na manutenção da diferenciação celular em organóides. Ela é composta por uma rede de proteínas e glicoproteínas que fornecem suporte estrutural e sinais bioquímicos às células. A MEC pode ser derivada de diferentes fontes, como matriz de gel colagénio, matriz de gelatina e hidrogel, que fornecem o ambiente tridimensional necessário para a formação dos organóides e ajudam a manter a diferenciação celular.

2. Sinais de orientação celular

Os organóides requerem sinais apropriados para orientar as células em direção a um determinado destino celular. Isso pode ser alcançado por meio da adição de fatores de crescimento e citocinas específicas ao meio de cultura. Esses sinais instruem as células a seguir um programa de desenvolvimento celular específico diferenciando-se nos tipos celulares desejados.

3. Interações celulares

A comunicação entre as células é crucial para a manutenção da diferenciação celular em organóides. As células totipotentes e as células progenitoras presentes nos organóides interagem umas com as outras através de vias de sinalização e moléculas de adesão celular, o que influencia a sua diferenciação e organização. Além disso, a presença de células de suporte, como células endoteliais ou células estromais, pode fornecer sinais adicionais para a manutenção da diferenciação celular.

4. Polaridade celular

A polaridade celular correta é essencial para a manutenção da diferenciação celular em organóides. As células devem estabelecer e manter a polaridade apical-basal, formando domínios especializados, como *tight junctions*, junções comunicantes e microvilosidades. Esses domínios são cruciais para o funcionamento adequado dos tecidos e órgãos e devem ser mantidos nos organóides para garantir a sua funcionalidade.

5. Controlo do ambiente físico-químico

Fatores ambientais, como a concentração de oxigénio, a rigidez da matriz e a composição do meio de cultura, também podem influenciar a manutenção da diferenciação celular em organóides. É importante criar condições culturais ideais, fornecer um aporte adequado de oxigénio e nutrientes, ajustar a rigidez da matriz para imitar o ambiente fisiológico e manter a composição química do meio de cultura apropriada para a diferenciação celular (Penning & Van den Boom, 2023).

2.7 Expressão de marcadores moleculares

Os organóides expressam marcadores moleculares típicos do tecido original, o que os torna úteis para o estudo de doenças e para o desenvolvimento de novas terapias. Esses marcadores podem incluir proteínas específicas do tecido como hormonas, recetores, transportadores ou enzimas (Penning & Van den Boom, 2023).

Estudos destacam a importância da caracterização dos marcadores moleculares presentes nos organóides, uma vez que eles fornecem informações importantes sobre a identidade celular e a funcionalidade dos tecidos presentes (Meneses *et al.*, 2016). A expressão de marcadores moleculares também pode ser útil na criação de modelos experimentais mais precisos e específicos para o estudo de doenças e tratamentos em medicina veterinária (Penning & Van den Boom, 2023).

2.8 Resposta a estímulos ambientais

Os organóides são capazes de responder a estímulos ambientais, o que permite que os pesquisadores estudem as interações entre as células e o ambiente em que vivem. Isso é

importante porque muitas doenças têm uma base ambiental sendo, portanto, influenciadas pelo ambiente onde se encontram (Csukovich *et al.*, 2022).

A capacidade dos organóides de responder a estímulos ambientais permite a simulação de condições patológicas específicas e a avaliação da eficácia de tratamentos em ambiente controlado *in vitro*. Em medicina veterinária, isso pode ser especialmente útil para estudar doenças de animais e desenvolver terapêuticas personalizadas (Corrò *et al.*, 2020).

Os organóides podem exibir respostas semelhantes aos tecidos ou órgãos *in vivo* quando são expostos a estímulos ambientais relevantes:

1. Estímulos químicos

Os organóides podem ser expostos a compostos químicos, como drogas, toxinas ou substâncias terapêuticas, para avaliar os seus efeitos. A resposta dos organóides a esses estímulos pode incluir mudanças na expressão de marcadores moleculares, diferenciação celular, viabilidade celular, resposta inflamatória, entre outros (Corrò *et al.*, 2020).

2. Estímulos mecânicos

A aplicação de estímulos mecânicos, como alongamento, compressão ou fluxo de fluido, em organóides que mimetizam tecidos como o músculo, o osso ou o tecido pulmonar, podem desencadear respostas específicas. Essas respostas podem incluir a ativação de vias de sinalização celular, remodelação do tecido, diferenciação celular e expressão de genes relacionados à resposta mecânica (Corrò *et al.*, 2020).

3. Estímulos inflamatórios

Organóides podem ser expostos a estímulos inflamatórios, como citocinas inflamatórias, para estudar a resposta imunológica e inflamatória do tecido. Isso pode incluir a ativação de células imunes residentes nos organóides, a produção de mediadores inflamatórios e a expressão de genes associados à resposta imune (Csukovich *et al.*, 2022).

4. Estímulos microambientais

Os organóides podem ser cultivados em condições que mimetizam o microambiente específico do tecido ou órgão. Isso pode incluir a presença de células estromais, matriz extracelular, fatores de crescimento ou interações celulares específicas. Esses estímulos

microambientais podem modular a função e a diferenciação celular nos organóides (Csukovich *et al.*, 2022).

É importante destacar que a capacidade dos organóides em responder a estímulos ambientais pode depender da complexidade do modelo e da fidelidade com que reproduzem o tecido ou órgão original. Além disso, as respostas podem ser influenciadas por fatores como a maturação do organóide, a presença de vasculatura funcional e a interação com o sistema imunológico (Penning & van den Boom, 2023).

Além dessas características, os organóides apresentam outras vantagens em relação aos modelos animais tradicionais, como a capacidade de produzir resultados mais precisos e reprodutíveis, a possibilidade de realizar experiências de alto rendimento numa escala menor e com uma grande redução dos custos em relação às experiências efetuadas em animais vivos. Isso torna os organóides uma ferramenta valiosa para a pesquisa em medicina veterinária e para o desenvolvimento de novas terapias para doenças que afetam os animais (Soumya *et al.*, 2021).

2.9 ENGENHARIA DOS ORGANÓIDES

De acordo com Takebe & Wells (2019), um novo campo científico aplica os princípios da interface entre biologia e engenharia para o desenvolvimento controlado de sistemas auto-organizados. A engenharia narrativa utilizada no design racionalizado para maximizar a dependência da história biológica, conhecida como estigmergia, que leva à auto-organização robusta de tecidos formados por grupos de células no tempo e no espaço. Isto inclui processos de padronização, montagem, morfogénese e crescimento (Takebe *et al.*, 2019).

As principais considerações de design da engenharia narrativa são:

1) Design de espaço

Consiste em projetar o tecido como um padrão espacial para o preparar para a auto-organização (Fatehullah *et al.*, 2016).

2) Controlo ambiental biológico

Envolve a seleção de moduladores ambientais que mimetizam de forma fidedigna toda a complexidade dos processos *in vivo*, como organogénese, homeostase e regeneração (Fatehullah *et al.*, 2016).

3) Controlo ambiental sintético

Trata-se do design de moduladores ambientais sintéticos que são estudados em várias disciplinas orientadas pela engenharia, como engenharia de tecidos, biologia sintética, biofabricação, biomateriais, fabricação e formação computacional (Fatehullah *et al.*, 2016).

É importante destacar que esses três elementos não são necessariamente independentes, mas estão inter-relacionados durante o processo de organogênese.

Atualmente existem várias abordagens para criar organóides mais avançados. Um desenvolvimento relativamente recente revela que as construções de maior complexidade podem ser obtidas através da "fusão" de organóides que foram inicialmente cultivados e padronizados separadamente (Souza *et al.*, 2018). Conforme demonstrado para esferóides do prosencéfalo e relatado por diversos grupos, esse processo parece ser tão simples quanto co-cultivar os organóides desejados para que entrem em contato físico.

Numa outra abordagem alguns cientistas substituíram a Matrigel na cultura de organóides intestinais por hidrogéis de síntese definida. Esses hidrogéis foram utilizados para definir a sinalização e as propriedades mecânicas da matriz, que são importantes para a expansão celular e formação de organóides (Souza *et al.*, 2018).

O sistema de cultura 3D é estabelecido através da utilização de cultura em suspensão onde se impossibilita o contato físico direto com a placa de cultivo. Isto é possível através do uso de matrizes extracelulares, meios de cultura apropriados e manipulação cuidadosa das células totipotentes ou células pluripotentes (Souza *et al.*, 2018). Estas matrizes são formadas por hidrogéis biológicos ou sintéticos que se assemelham à matriz extracelular (MEC) natural sendo o Matrigel o mais utilizado. Matrigel é uma mistura proteica heterogênea e gelatinosa secretada pelas células de sarcoma de rato Holm-Swarm (EHS). Esta mistura é composta principalmente por proteínas aderentes, como o colagénio, a entactina, laminina e proteoglicanos de sulfato de heparina que se assemelham ao ambiente extracelular, fornecem suporte estrutural e matriz extracelular às células. Esta "auto-organização" torna possível o crescimento de estruturas alongadas de organóides que são passíveis de diferenciação e reprodutibilidade. Abordagens de engenharia provavelmente farão parte de esforços contínuos para cultivar organóides que sejam cada vez mais complexos e ao mesmo tempo melhor controlados (Souza *et al.*, 2018).

Alternativamente, a estrutura tridimensional dos organóides também pode ser estabelecida através da técnica de "interface ar-líquido". Neste caso, as células são cultivadas numa camada de fibroblastos ou Matrigel inicialmente submersa num meio que gradualmente

evapora, expondo as camadas celulares superiores ao ar para permitir a polarização e diferenciação (Corrò *et al.*, 2020).

Os organóides estão a tornar-se uma das principais ferramentas de cultura celular em muitos estudos biomédicos. A vasta gama de tipos de tecidos, a capacidade de expansão a longo prazo e as características fisiológicas da arquitetura 3D dos organóides fazem deles uma poderosa nova tecnologia para muitas aplicações biológicas e clínicas. De notar que os organóides têm sido amplamente utilizados para a compreensão fisiopatológica de doenças, medicina de precisão, estudos de toxicologia e medicina regenerativa (Figura 4) (Corrò *et al.*, 2020).

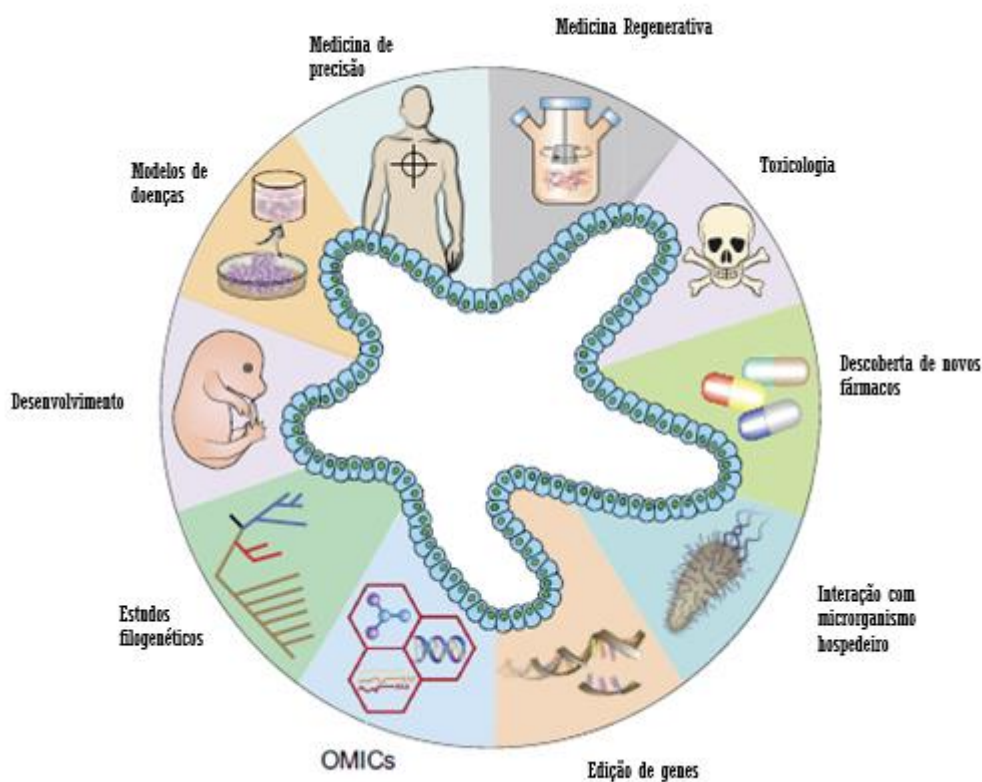


Figura 4: Diversas aplicações dos organóides (Adaptado de Corrò 2020)

A estabilidade e a flexibilidade do sistema de cultura de organóides proporcionaram uma oportunidade única para investigar doenças que afetam tecidos epiteliais. Através dos organóides é possível:

1. Reprodução da arquitetura tecidual

Os organóides são capazes de mimetizar a arquitetura tridimensional e a organização celular de tecidos ou órgãos específicos. Eles são compostos por diferentes tipos celulares que se organizam de forma semelhante aos tecidos *in vivo*, permitindo o estudo de interações celulares complexas e a compreensão de como as células se comportam num contexto fisiológico (Souza *et al.*, 2018).

2. Modelagem de doenças humanas

Os organóides podem ser gerados a partir de células de pacientes com doenças específicas, permitindo a replicação *in vitro* dessas condições. Tal situação é particularmente útil em doenças em que a aquisição de amostras de tecido é limitada ou invasiva. Os organóides derivados de pacientes podem fornecer informações sobre a patogênese da doença, identificar características específicas da mesma e servir como plataforma para testes de fármacos personalizados (Souza *et al.*, 2018).

3. Variação genética

Os organóides podem ser derivados de células com diferentes mutações genéticas, permitindo o estudo do efeito dessas mutações específicas num contexto de tecido ou órgão. Isso é importante para o estudo de doenças genéticas hereditárias, bem como para avaliar a resposta de diferentes mutações a tratamentos específicos (Eldabawy *et al.*, 2019).

4. Resposta a estímulos ambientais

Os organóides têm a capacidade de responder a estímulos ambientais como drogas, toxinas ou fatores de crescimento. Isto permite o estudo dos mecanismos subjacentes à resposta celular a esses estímulos e a avaliação da eficácia de tratamentos num ambiente fisiológico (Eldabawy *et al.*, 2019).

5. Estudos de toxicidade

Os organóides podem ser usados como modelos para avaliar a toxicidade de compostos químicos ou drogas. Eles podem fornecer uma plataforma mais relevante e preditiva em comparação com as culturas celulares bidimensionais, permitindo a identificação precoce de efeitos tóxicos e a triagem de compostos potencialmente perigosos (Eldabawy *et al.*, 2019).

6. Estudos de desenvolvimento e regeneração

Os organóides podem ser utilizados para estudar processos de desenvolvimento e regeneração de tecidos e órgãos. Eles podem ser cultivados em condições que imitam a diferenciação e o crescimento celular durante o desenvolvimento, permitindo o estudo dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos nesses processos complexos (Eldabawy *et al.*, 2019).

Essas propriedades dos organóides tornam-nos ferramentas valiosas para o estudo das doenças, fornecendo insights sobre a patogênese, identificação de alvos terapêuticos, desenvolvimento de medicamentos e medicina personalizada. No entanto, é importante ressaltar que os organóides são modelos simplificados e não podem reproduzir completamente a complexidade dos tecidos e órgãos *in vivo*. Portanto, eles são usados em combinação com outros modelos e abordagens para uma compreensão completa das doenças (Hofer & Lutolf, 2021).

A recriação de ambientes patogênicos de tecidos, recriando as condições de cultura, é uma estratégia simples mas poderosa pois permite investigar o papel da regulação ambiental nos fenótipos da doença. Os organóides derivados de tecidos saudáveis fornecem um material de referência importante para medir a anormalidade molecular e fenotípica dos organóides de doenças (Fujii & Sato, 2021).

2.10 APLICAÇÕES DOS ORGANÓIDES EM MEDICINA VETERINÁRIA

Tal como já foi referido anteriormente, os organóides apresentam potencial para aplicação na medicina veterinária onde se destaca o estudo de doenças, medicina personalizada e futuramente em transplantes como retratado na figura 5.

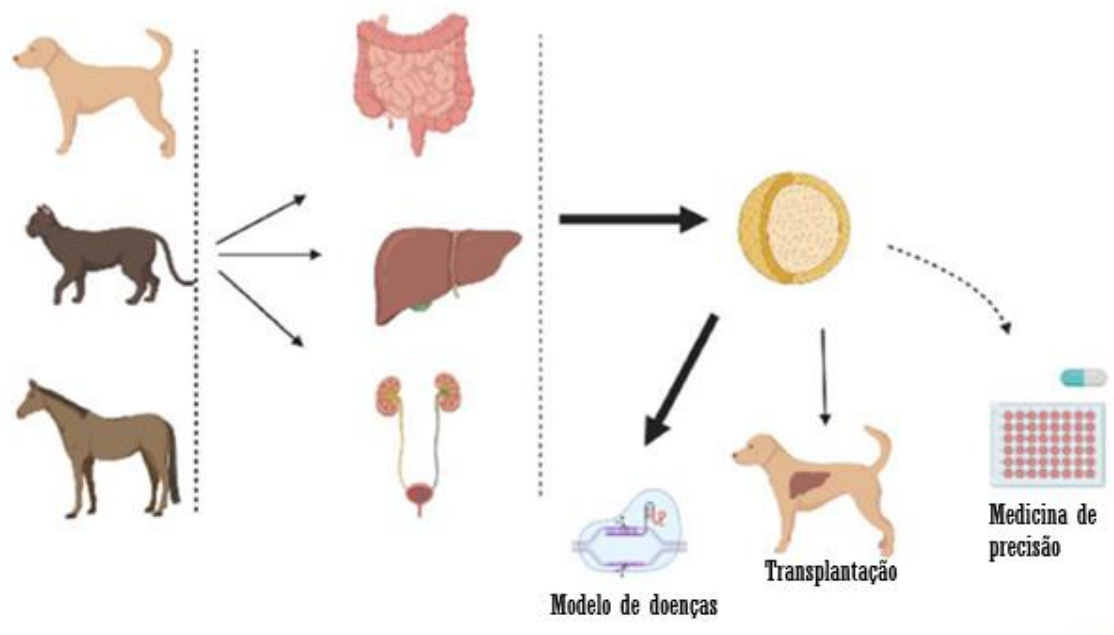


Figura 5: Aplicações potenciais dos organóides em Medicina Veterinária (Adaptado de Penning & Van den Boom 2023).

2.10.1 Regeneração de tecidos

Os organóides podem ser usados para estudar o desenvolvimento de tecidos e órgãos em animais, bem como para investigar a regeneração de tecidos danificados. Isso pode fornecer informações valiosas sobre processos de cicatrização, regeneração e desenvolvimento em diferentes espécies. Embora ainda haja um longo caminho a percorrer no uso dos organóides, na medicina regenerativa já existem diversos protocolos em que se originam organóides a partir de tecidos saudáveis, que ao fim de apresentarem o tamanho pretendido são passíveis de ser implantados na região lesionada (Yuli *et al.*, 2012).

2.10.2 Descoberta de fármacos e estudos na absorção de fármacos

Os organóides podem ser utilizados para testar a toxicidade e a eficácia de medicamentos num ambiente controlado de laboratório. Isto pode ajudar a identificar possíveis efeitos colaterais e determinar a dosagem adequada para os tratamentos. Foi identificado o potencial de utilização de monocamadas derivadas de colonóides caninos como um sistema modelo para avaliar a permeabilidade aos diferentes fármacos (Yuli *et al.*, 2012). Embora haja limitações associadas ao uso dessas monocamadas unicelulares, elas fornecem informações pertinentes sobre as possíveis barreiras ao movimento de fármacos dissolvidos do lúmen intestinal para o sistema portal. No entanto, são necessários estudos adicionais envolvendo organóides derivados de outros segmentos intestinais caninos e a avaliação de uma ampla gama de fármacos classificados pelo sistema BCS para determinar de forma conclusiva a utilidade das monocamadas de organóides intestinais caninos na previsão da absorção de drogas terapêuticas em cães (Yuli *et al.*, 2012). Uma vantagem importante deste método em relação a outros sistemas modelo é a sua capacidade de proporcionar o primeiro modelo intestinal canino específico para avaliar a permeabilidade membranar (Sahoo *et al.*, 2023).

2.10.3 Pesquisa de biomarcadores

A tecnologia de organóides recebeu um impulso após a descoberta pioneira e subsequente identificação das células totipotentes do intestino delgado e do cólon, que expressam o gene marcador LGR5 (Baker *et al.*, 2007). Dois anos depois, células totipotentes LGR+ isoladas individualmente demonstraram a capacidade de se auto-organizar em organóides intestinais semelhantes a criptas-vilosas (Sato *et al.*, 2009). A proteína transmembranar LGR5, envolvida na sinalização Wnt, revelou-se um marcador clássico de células totipotentes adultas (Lancaster & Knoblich, 2021; Beumer & Clevers, 2014).

2.10.4 Estudo da fisiopatologia de doenças

A importância dos organóides no estudo da fisiopatologia de doenças em Medicina Veterinária consiste no facto de ser possível criá-los a partir de biopsias de células doentes de tecidos afetados. Além disso, é possível corrigir mutações potencialmente causadoras de doenças, permitindo estudos de causa-efeito. No entanto, é necessário um estudo aprofundado

na comparação dos resultados obtidos em cultura artificial com aqueles obtidos *in vivo*, dado que existem diferenças nas condições de cultivo (Soumya *et al.*, 2021).

2.10.5 Medicina personalizada

Os organóides podem ser criados a partir de células de um animal específico, permitindo a criação de modelos personalizados para entender a resposta individual a medicamentos e tratamentos. Isto pode ser especialmente útil em medicina veterinária por existir uma grande variabilidade entre espécies e indivíduos (Soumya *et al.*, 2021).

2.10.6 Transplante de órgãos

O uso de órgãos transplantados em Medicina Veterinária apresenta desafios éticos, logísticos e financeiros, mas a sua aplicação num futuro próximo pode ser uma alternativa viável no tratamento de muitas patologias que não apresentam resolução médica (Agopian *et al.*, 2009; Kruitwagen *et al.*, 2020).

Em 2009, foi realizado um estudo que descreveu o transplante de organóides ileais em seis cães raça Beagle. O resultado do transplante autólogo não foi o esperado dado que não se formou neomucosa (independentemente do sítio do implante). Por outro lado, organóides alogénicos derivados do intestino fetal apresentaram resultados positivos em três dos quatro cães que foram submetidos ao procedimento (Agopian *et al.*, 2009). Nos dias de hoje ainda não foi efetuado nenhum outro estudo nessa linha de pesquisa (Agopian *et al.*, 2009).

A Figura 6 ilustra a interação entre células totipotentes, organóides e espécies.

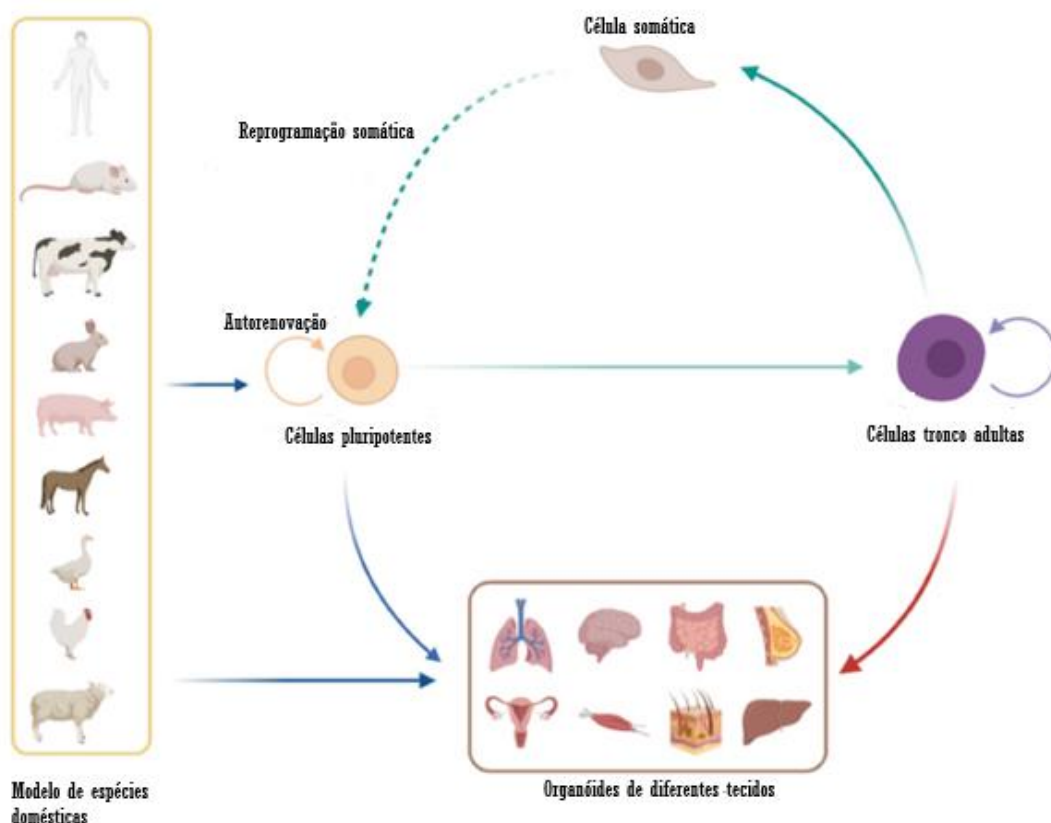


Figura 6: Ilustração esquemática das várias células totipotentes que podem ser usadas para produzir organóides 3D, dependendo da sua origem e espécies (Adaptado de Pain, 2021).

2.11 CULTURA 3D DE ORGANÓIDES INTESTINAIS EM CÃES

O trato gastrointestinal dos cães de porte médio é composto por intestino com aproximadamente 4,5 metros de comprimento, dividido em cinco segmentos funcionais ao longo do eixo proximal-distal. Os segmentos do intestino delgado incluem o duodeno, jejuno e íleo, enquanto o cego e o cólon formam o intestino grosso (Kararli, 1995).

Em diferentes condições patológicas ou após tratamentos médicos, como quimioterapia e radioterapia, ocorre uma desregulação significativa da homeostase entre a proliferação celular e a morte celular, resultando na perda da integridade epitelial e inflamação local. A invasão subsequente de bactérias intestinais e a estimulação associada do sistema imunológico agravam ainda mais com a evolução da doença (Grabinger *et al.*, 2014).

Os organóides têm sido amplamente utilizados no estudo da regulação da auto-renovação, crescimento e diferenciação das células totipotentes intestinais. Além disso, os organóides expandidos *in vitro* podem ser aplicados em terapias com células totipotentes

gastrointestinais em modelos animais pré-clínicos e em estudos relacionados com células tumorais do cólon, entre outras aplicações (Tesori *et al.*, 2013).

A cultura 3D de organóides intestinais em cães é uma técnica de cultura celular que permite o desenvolvimento de estruturas semelhantes a órgãos *in vitro*, utilizando células de cães num ambiente tridimensional. Essa técnica é utilizada em estudos de biologia celular e molecular para entender a fisiologia do intestino de cães e desenvolver tratamentos para doenças gastrointestinais (Powell & Behnke, 2017).

Os organóides do intestino delgado são estruturas tridimensionais que se desenvolvem a partir de células totipotentes intestinais que replicam as características do epitélio intestinal *in vivo*. Esses organóides contêm todas as células epiteliais do intestino, como enterócitos, células caliciformes, células enteroendócrinas e células de *Paneth*, além de células estromais, incluindo fibroblastos e células imunológicas. As células do organóide são mantidas num ambiente semelhante ao ambiente *in vivo*, incluindo fatores de crescimento e nutrientes específicos (Luu, 2020).

A cultura a longo prazo de organóides intestinais de vários mamíferos, incluindo gatos, cães, vacas, cavalos, porcos e ovelhas, depende das proteínas Wnt3a e R-spondin. Esta observação significativa confirmou a conservação das moléculas sinalizadoras necessárias para a expansão dos organóides intestinais. Os resultados quantitativos de RT-PCR indicaram a expressão de mRNA de LGR5, o que confirma a importância de Wnt e R-espondina no meio de cultura. Infelizmente, os autores não forneceram informações detalhadas sobre a diferenciação celular das células totipotentes em direção a outras criptas e tipos celulares de vilosidades (Powell & Behnke, 2017).

O estudo da diferenciação e funcionalidade dos organóides enteróides caninos tem sido focada nas doenças inflamatórias intestinais com o intuito de compreender as doenças gastrointestinais. Foram cultivados organóides intestinais de cães saudáveis, cães com inflamação intestinal e cães com adenocarcinomas intestinais, derivados do duodeno, jejuno, íleo e cólon, que expressaram marcadores para células totipotentes, células enteroendócrinas, células tufo e células de *Paneth* (LGR5 mRNA na base da cripta) (Mochel *et al.*, 2017; Chandra *et al.*, 2019; Ambrosini *et al.*, 2020; Kopper *et al.*, 2021; Allenspach & Iennarella-Servantez, 2021; Sahoo *et al.*, 2022; Gabriel *et al.*, 2022).

A doença inflamatória intestinal foi reconstruída a partir dos organóides do cólon através da estimulação do LPS, que resultou na expressão diferencial de vários genes associados a tumores, o que sugere a existência de uma ligação entre a inflamação crônica e a

carcinogênese (Sahoo *et al.*, 2022). Organóides derivados de biópsias intestinais foram usados para investigar as diferenças na expressão de proteínas das *tight junctions* entre cães com enteropatia com perda de proteína e cães saudáveis (Allenspach & Iennarella-Servantez, 2021). A Hibridação *in situ* (ISH) mostrou claramente um aumento da zonulina-1 (marcador intestinal) em cães afetados em comparação com cães saudáveis. Isto explica o porquê do aumento de permeabilidade do epitélio que resulta na perda de proteínas (Penning & Van den Boom, 2023).

A partir da avaliação do marcador de células totipotentes, o estudo mostrou que os níveis de mRNA de LGR5 se encontravam altamente elevados em organóides enteropáticos. RNA-ISH contornou o problema prático associado à falta de anticorpos anti-LGR5, medindo os níveis de mRNA em vez da expressão de proteínas (Penning & Van den Boom, 2023).

Em conjunto, estas descrições moleculares e funcionais detalhadas dos organóides intestinais caninos identificaram a importância das aplicações da tecnologia organóide ao replicar doenças. Os organóides intestinais formam estruturas de vilosidades criptográficas com o lúmen intestinal no interior dificultando estudos sobre o transporte transepitelial. Para facilitar tais estudos e medir as interações microbianas, os organóides do cólon foram cultivados numa membrana porosa em modo 2D (Penning & Van den Boom, 2023).

Este sistema organóide é considerado muito útil em estudos de doenças. Foi apresentado um protocolo detalhado sobre como usar organóides caninos num sistema de câmara dupla, permitindo que outros pesquisadores criem uma configuração experimental semelhante para a sua própria doença ou espécie de interesse (Gabriel *et al.*, 2022).

Assim, a arquitetura 3D em si é fundamental na orientação da organização espacial das linhagens celulares, criando gradientes de fatores de crescimento que determinam as etapas de diferenciação celular (Sato & Clevers, 2013). O uso de matrizes de cultura 3D para a produção de organóides explora os mecanismos que orientam o desenvolvimento celular *in vivo*. Portanto, o conhecimento adquirido com a biologia das células totipotentes e os *insights* obtidos através da metodologia de cultura 3D *in vitro* têm sido cruciais no desenvolvimento de métodos para gerar modelos de organóides para uma variedade de órgãos McCauley & Wells (2017).

Apesar dos consideráveis avanços no campo dos organóides intestinais, um dos principais desafios, abordado por Fatehullah *et al.*, (2016), é a tradução rápida e segura do conhecimento sobre células totipotentes de ratos para a sua aplicação em seres humanos. Nos últimos anos, houve um aumento significativo nos esforços para utilizar as células totipotentes intestinais na medicina regenerativa, impulsionados principalmente pela identificação de marcadores de superfície celular que permitem o isolamento de populações puras de células

totipotentes, bem como, pelo desenvolvimento de métodos de cultura que proporcionam um ambiente quase fisiológico para a expansão e crescimento epitelial das células totipotentes. No entanto, a manutenção do ímpeto e a garantia de questões relacionadas à segurança no processo de transposição dos resultados obtidos em ratos para a aplicação em seres humanos exige a utilização de animais experimentais e pacientes clínicos, como os cães, que apresentam patologias gastrointestinais e hepáticas altamente semelhantes às encontradas nos seres humanos. Devido à integridade genômica robusta dos cães, torna-se viável utilizar os organóides como uma ferramenta poderosa na medicina regenerativa e na pesquisa biomédica, com a possibilidade futura de criar tecidos para transplante autólogo. Além disso, o desenvolvimento de organóides formados a partir de células cancerígenas oferece perspectivas significativas para a personalização e otimização dos tratamentos atuais (Watson *et al.*, 2014). No entanto, é importante ressaltar que ainda há uma lacuna na literatura científica em relação aos estudos que envolvem a caracterização molecular de organóides intestinais em cães.

2.12 CRIOPRESERVAÇÃO DE ORGANÓIDES

Através da criopreservação é possível armazenar e preservar as estruturas 3D por períodos prolongados não comprometendo a sua viabilidade e funcionalidade (Clinton *et al.*, 2018). Na criopreservação são utilizados agentes crioprotetores e métodos controlados de congelamento para minimizar os danos celulares (Clinton *et al.*, 2018).

Através da criopreservação é possível criar um conjunto de amostras de organóides de diferentes tipos de tecidos e em diferentes estados patológicos, o que permite comparar várias amostras. Estes organóides podem ainda ser descongelados quando for pretendido, sendo por isso um recurso valioso nas várias aplicações de investigação. Este método de armazenamento requer uma caracterização cuidadosa e um controlo de qualidade dos organóides criopreservados para que a sua aplicabilidade fisiológica e reprodutibilidade sejam mantidas (Clinton *et al.*, 2018).

2.13 LIMITAÇÕES DA CULTURA DE ORGANÓIDES NA ATUALIDADE

Embora os organóides apresentem excelentes perspectivas de pesquisa, como a análise *in vitro* de processos fisiológicos, estudo de doenças e manipulação genética, eles também apresentam desafios e limitações das quais podemos destacar:

2.13.1 Nível de maturação e função limitada

Um notável grau de funcionalidade fisiológica tem sido alcançado no intestino (produção de muco e atividades de absorção) (Zachos *et al.*, 2016), estômago (acidificação induzida por histamina) (McCracken *et al.*, 2017), fígado (expressão de albumina, acúmulo de glicogênio e captação de lipoproteína de baixa densidade) (Hu *et al.*, 2018) e glândulas (produção de leite) (Jamieson *et al.*, 2017). No entanto, nenhum dos sistemas organóides conseguiu reproduzir na totalidade a função de órgão correspondente. Geralmente, os organóides carecem de tipos de células especializadas essenciais e não conseguem reproduzir a complexidade dos órgãos que lhes deram origem, incluindo a ausência parcial de um compartimento mesenquimal, vascularização e/ou microbioma. Embora os organóides multicompartimentais tenham sido mantidos, eles apresentam falta de consistência na organização celular o que dificulta a realização de leituras experimentais fidedignas e robustas. A aplicação de fluxo, uma interface de ar ou estímulos mecânicos pode melhorar o controle terminal das células *in vitro* (Lu & Kassab, 2011; Park *et al.*, 2011). No entanto, a integração destes recursos ainda é tecnicamente desafiadora. Uma limitação significativa dos sistemas organóides é o tempo limitado sob o qual eles podem ser mantidos em cultura. Organóides epiteliais têm uma expectativa de vida o que, muitas vezes, é insuficiente pois não permite diferenciar as células totipotentes adultas (ASCs) em todos os tipos celulares diferenciados esperados *in vivo*. Essa restrição de tempo de cultura é ainda mais problemática em organóides derivados de células totipotentes pluripotentes (PSCs), cuja expectativa de vida difere significativamente do momento da organogênese *in vivo*, especialmente em sistemas humanos. Como resultado, esses organóides geralmente não amadurecem além de um fenótipo fetal (Fatehullah *et al.*, 2016; Clevers, 2016).

2.13.2 Complexidade limitada

Embora os organóides possam replicar algumas características dos órgãos ou tecidos originais, são estruturas simplificadas em comparação com os órgãos que lhes deram origem. A falta de complexidade pode resultar em funcionalidades e interações celulares não completamente representativas do tecido ou órgão real (Qian *et al.*, 2016). (Co *et al.*, 2019).

2.13.3 Heterogeneidade limitada

Os organóides podem apresentar alterações nas diferentes populações de células presentes, o que pode levar a diferenças na função e nas respostas aos estímulos. Além disso, a heterogeneidade limitada pode dificultar o processo de reprodução exata de certas condições e fenótipos específicos (Velasco *et al.*, 2019). Embora as células totipotentes em organóides se possam diferenciar em diversos tipos celulares, a capacidade de diferenciação pode ser limitada. Nem todos os tipos celulares presentes num órgão podem ser adequadamente imitados num organóide, o que pode limitar sua funcionalidade e aplicações específicas (Velasco *et al.*, 2019).

2.13.4 Limitação das leituras

As configurações utilizadas rotineiramente baseiam-se principalmente na monitorização ótica como método de leitura, o qual proporciona apenas informações limitadas sobre a funcionalidade dos organóides. A monitorização *in situ* de metabolitos, péptidos secretados ou potenciais elétricos enfrenta desafios devido às variabilidades associadas à formação de organóides. Por exemplo, a medição da resistência elétrica transepitelial é uma técnica padrão em sistemas de cultura epitelial 2D de transwell que avalia a integridade da barreira epitelial. No entanto, tais medições são tecnicamente desafiadoras em organóides (Kim *et al.*, 2018). Da mesma forma, a funcionalidade de sistemas hepáticos *in vitro* pode ser avaliada através da análise de metabolitos de compostos exógenos e endógenos, bem como da síntese de biliar e proteínas, como a albumina ou transferrina (Collins *et al.*, 2019).

2.14 Escala de produção

A produção de organóides em grande escala pode ser desafiadora. Cultivar e manter um grande número de organóides em laboratório pode ser trabalhoso e requer recursos significativos. Esta limitação pode dificultar a aplicação dos organóides em estudos de grande escala ou aplicações clínicas.

2.15 Falta de vascularização

Um dos principais desafios dos organóides é a falta de um sistema vascular funcional. A ausência de vasos sanguíneos limita a capacidade dos organóides em receber nutrientes e oxigênio adequadamente e de eliminar resíduos metabólicos. A falta de vascularização também limita a capacidade dos organóides de simular completamente a fisiologia dos órgãos reais (Collins *et al.*, 2019).

2.16 Modelos simplificados de doenças

Embora os organóides possam ser usados como modelos de doenças, é importante ressaltar que eles geralmente representam uma versão simplificada da doença. Isso pode não refletir completamente a complexidade das doenças em humanos ou em animais, limitando a utilidade dos organóides em certos contextos (Collins *et al.*, 2019).

Esta dissertação tem como principal objetivo a descrição e realização do processo de descongelamento de organóides intestinais caninos, tendo como objetivos específicos:

1. Realizar dois métodos de descongelação em organóides intestinais.
2. Determinar a eficácia de ambos os métodos, avaliando microscopicamente os organóides nas primeiras 24, 48 e 72 horas após a descongelação.
3. Verificar a viabilidade e a capacidade de desenvolvimento dos organóides nas primeiras 24, 48 e 72 horas após a descongelação.
4. Testar a viabilidade do uso de um meio humano em enteróides caninos.

Serão ainda abordados os principais métodos de cultura, as suas aplicações na fisiopatologia de doenças e na descoberta de novos medicamentos, as técnicas de descongelamento (dados não publicados), assim como as suas limitações e perspectivas futuras.

Para a elaboração desta dissertação foi realizada uma revisão bibliográfica extensa, contemplando os avanços mais recentes na área, com foco na fisiopatologia de doenças intestinais (duodenais e jejunais) em cães. Foram ainda discutidos os desafios da utilização dos mesmos em que se destacam a falta de padronização dos protocolos de cultura, a necessidade de melhorar a capacidade de diferenciação celular, as fragilidades do processo de

descongelamento das células e ainda a possibilidade do desenvolvimento de novos modelos experimentais para diversas doenças durante a cultura dos mesmos.

O uso de organóides em cães é uma área promissora que pode contribuir significativamente para a compreensão e tratamento de diversas doenças em Medicina Veterinária. A presente dissertação fornecerá uma visão geral das aplicações dos organóides em cães destacando as oportunidades e desafios desta técnica inovadora.

Importa ressaltar que este será o primeiro estudo em organóides intestinais caninos em Portugal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimento científico

A presente pesquisa foi realizada no laboratório de cultura celular da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT) durante o período do mês de junho do decorrente ano. Os organóides utilizados foram gentilmente cedidos pela Faculdade de Medicina Veterinária e Hubrecht Institute da Universidade de Utrecht (Países Baixos), como parte da cooperação científica entre as duas instituições. Para obtenção e uso dos mesmos o projeto faz parte de um grupo que envolve a Universidade de Utrecht e a FMV-ULHT de Lisboa. As amostras utilizadas foram colhidas frescas através de biópsia de um cadáver, (University 3R-policy, DEC Nº 2013.II.12.124) conforme exigido pela legislação holandesa, sendo posteriormente submetidas ao processo de criopreservação.

Nesta investigação foram utilizadas duas técnicas de descongelação descritas na literatura. As células foram enviadas em criotubos contendo organóides em meio de criopreservação (Gibco Recovery[®]) e mantidas em azoto até seu descongelamento/ressuspensão.

Neste procedimento foram utilizados 5 poços de duas placas de 24 poços que, um dia antes de se iniciar o procedimento de descongelamento foram colocadas e mantidas na incubadora até seu uso no dia seguinte. Assim como Matrigel que foi aliquotada em tubos tipo eppendorf contendo 1mL cada e mantida em refrigeração (4°C) até seu uso, evitando assim sua solidificação precoce.

Após o descongelamento em banho maria a 37°C os organóides foram transferidos para um tubo cônico com capacidade para 15mL e o mesmo foi preenchido com 7mL de Advanced DMEM fresco. Seguidamente o tubo foi centrifugado a 440G, 4°C por 5 minutos, retirando posteriormente o sobrenadante que foi desprezado. Pipetou-se o tubo retirando várias amostras que foram colocadas na placa previamente aquecida, que posteriormente foi levada à incubadora a 37°C e 5% CO₂ até ocorrer a total solidificação da Matrigel[®] (cerca de 15

minutos). De seguida adicionou-se o meio de cultura (IntestinCult[®]) pré-aquecido em banho-maria a 37°C em cada poço semeado. Após este procedimento a placa foi levada para incubadora.

A avaliação das células foi feita sob microscopia de luz em microscópio invertido. As placas com a cultura celular foram avaliadas nas 24, 48 e 72 horas após a sua implantação no meio de cultura.

As técnicas utilizadas foram as seguintes:

3.1.1 Protocolo 1

1. Preparação do reagente:

- 2.080 mL de Meio Basal de Crescimento acrescido de soro fetal bovino (FBS)
- 440mL de Meio Advanced DMEM[®]
- Penicilina-Estreptomicina 100 x 5 ml
- Matrigel (50 µl por poço)

2. Protocolo

2.1 Pré aqueceu-se o Meio Basal de Crescimento a 37°C em banho-maria por 15 minutos.

2.2 Retirou-se o frasco dos organóides criopreservados do depósito de azoto líquido e procedeu-se ao seu descongelamento rápido (3-4 minutos) em banho-maria a 37°C.

2.3 Garantiu-se que as células estavam completamente descongeladas antes de se prosseguir, não deixando as células a 37°C após o descongelamento.

2.4 Lavou-se o tubo com Meio Basal de Crescimento aquecido.

2.5 De forma asséptica, transferiram-se as células descongeladas para o tubo cónico.

2.6 Centrifugaram-se as células a 400G, 4°C por 5 minutos.

2.7 Removeu-se delicadamente o sobrenadante para evitar alterações no pellet celular e ressuspendeu-se o mesmo em 250µl de Matrigel[®].

2.8 Transferiu-se a suspensão celular para uma placa de Cultura de Tecidos T25 (25 cm²) estéril, sendo utilizados 5 poços da referida placa.

2.9 Colocou-se a placa de cultura de tecidos semeada numa estufa a 5% de CO₂ a 37°C durante 15 minutos.

2.10 Adicionou-se 2µl de Penicilina-estreptomicina a cada poço.

2.11 Dois dias depois trocou-se o meio dos frascos utilizando Meio de Crescimento de Seleção recém-preparado e pré-aquecido.

3.1.2 Protocolo 2

Previamente ao início do procedimento foi necessário descongelar a Matrigel® e conservá-la a 4°C conforme foi anteriormente descrito, além de pré aquecer as placas de 24 poços a 37°C, durante pelo menos 24h.

1. Num tubo Falcon de 15ml foram pré aquecidos 5ml de meio basal (IntestineCult) a 37°C durante 15 minutos. Vale ressaltar que anteriormente o referido meio foi mantido refrigerado até o momento de seu uso.

2. 500 µl de IntestineCult, a 37°C, foram distribuídos pelos 5 poços da placa. Foram adicionados ainda 10 µM de ROCKYinhibitor (Y27632®) a cada poço semeado, formando o meio basal aquecido.

3. Os organóides foram colocados em banho-maria a 37°C até descongelarem por completo. De seguida foram adicionados 500 µl de meio basal aquecido ao tubo criogénico contendo os organóides e realizada a ressuspensão dos mesmos.

4. A suspensão dos organóides foi pipetada para o meio basal presente no tubo Falcon.

5. De seguida foi realizada centrifugação a 440 x g/4°C/5 min.

6. Após a centrifugação os organóides foram colocados em gelo (o sobrenadante do meio basal aquecido foi desprezado, deixando 50 µl no tubo).

7. Os organóides foram ressuspensos nesses 50 µl de meio basal e foram adicionados 50 µl de Matrigel. De seguida foram ressuspensos por pipetagem (a proporção final de organóides de meio para Matrigel foi de 1:1).

8. Foram então adicionadas cinco gotículas de 10 µl por poço numa placa de 24 poços (2 poços para a suspensão de 100 µl) e incubadas de cabeça para baixo (37°C, 5% CO₂) durante 10 a 15 min.

9. Após a solidificação da Matrigel, foram adicionados 750µl de meio de cultura e 10 µM de inibidor de ROCKY inhibitor (Y27632®).

10. Por fim foram mantidos na incubadora a 37°C, 5% CO₂ e avaliados diariamente durante 3 dias consecutivos.

3.1.3 Protocolo de Passagem

1. Procedeu-se á preparação do novo meio formado por 442,2µl de Advanced DMEM[®], 10,4µl de Glutamax[®], 20,8µl de Hepes[®] e 10,4µl de Nicotinamida (N2).
2. Colocou-se o novo meio na estufa a 37°C durante 15 minutos.
3. Colocou-se 600µl de Advanced DMEM[®] refrigerado em cada poço semeado e retirou-se todo o conteúdo para um tubo cónico homogeneizando sempre a amostra através da pipetagem.
4. Centrifugou-se durante 5 min, 4°C a 2500rpm.
5. Retirou-se todo sobrenadante ficando só as células que se encontravam no pellet.
6. Adicionou-se 150µl de Matrigel ao tubo com as células.
7. Homogeneizou-se o tubo no vórtex durante 5 segundos.
8. Retirou-se 50µl do tubo para cada poço da nova placa.
9. Colocou-se a placa na estufa durante 15min a 37°C para solidificar a Matrigel[®].
10. Adicionou-se 500µl do meio novo ao redor do conteúdo celular que se encontrava centralizado no meio do poço.
11. Colocou-se 500µl de *Hanks solution*[®] nos poços que se encontravam em volta dos poços com as células para evitar a evaporação do meio de cultura quando colocada a amostra na estufa.
12. Colocou-se a placa na estufa a 5% de CO₂ a 37°C.

4. RESULTADOS

Protocolo 1

Os organóides foram imediatamente observados após o processo de descongelamento, através de microscopia invertida constatando-se que se encontravam dispersos pelo poço (conforme sinalizado pelas setas na figura 8), ao invés de centrados como seria desejável, devido ao excesso de sobrenadante não removido.

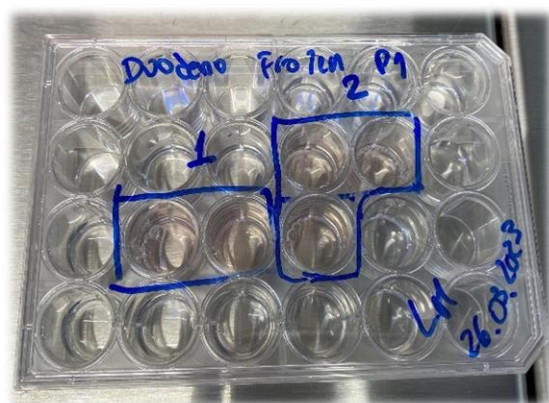


Figura 7: Placa de 24 poços às 0h após descongelamento

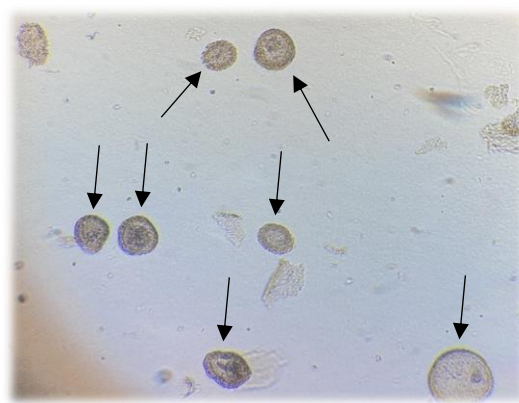


Figura 8: Microscopia invertida dos organóides às 0h

Findo o procedimento a primeira verificação foi realizada às 24 horas do descongelamento e implantação das células em meio de cultura. Nesta primeira avaliação constatou-se que a densidade celular era satisfatória em todos os 5 poços, pese embora se observasse alguma morte celular. A viabilidade das células pôde ser inferida atendendo à alteração de cor do meio de cultura de rosa para amarelo turvo, indicando o consumo de nutrientes pelas células em desenvolvimento. Na figura 9 pode observar-se um organóide viável (a) e um inviável (b)).

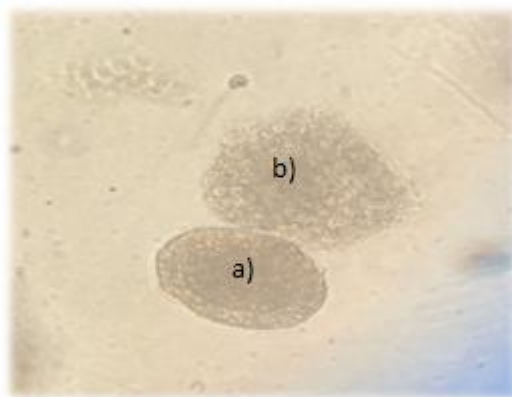


Figura 9: Microscopia invertida dos organóides às 24h

Às 48 horas as células foram novamente reavaliadas tendo-se observado que a proliferação celular era inferior à desejada em todos os poços.

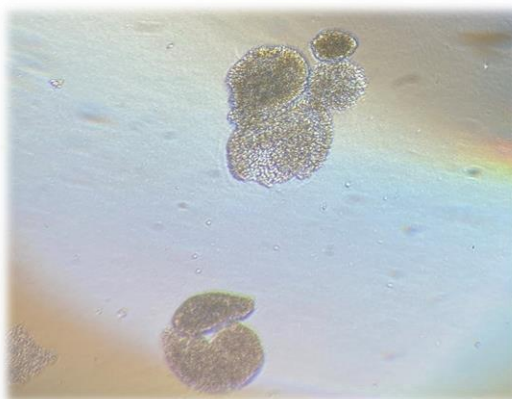


Figura 10: Microscopia invertida dos organóides às 48h

Por fim, às 72 horas da experiência verificou-se que os organóides apresentavam uma densidade celular não satisfatória, com uma taxa de mortalidade celular superior à pretendida, pelo que foi necessário proceder á primeira passagem dos mesmos. Na figura 11 pode-se observar um organóide viável central rodeado por fragmentos de organóides que se poderão tornar viáveis com o tempo. Esta fragmentação é típica quando os organóides são submetidos a passagens.

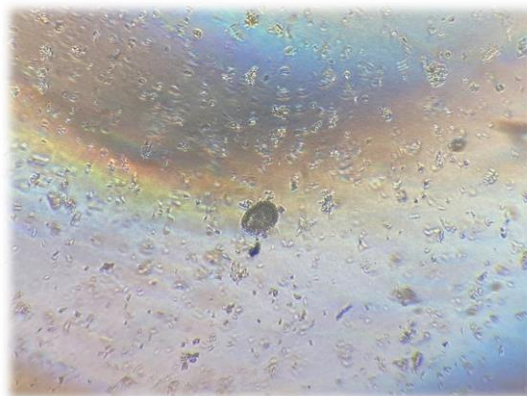


Figura 11: Microscopia invertida dos organóides às 72h e após a primeira passagem

Protocolo 2

Tal como no protocolo 1, as células foram observadas após o processo de descongelação e passadas 24, 48 e 72 horas. No momento pós descongelação as células encontravam-se no centro da placa tal como se pretendia.

Após as 24 horas os organóides encontravam-se vivos e bem dispersos por toda a placa. A alteração da coloração do meio para mais claro significa que os nutrientes foram consumidos pelas células.

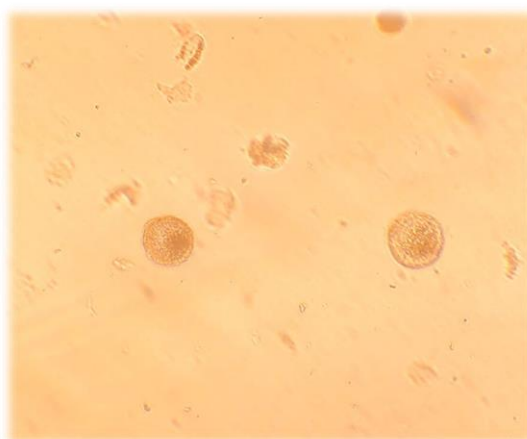


Figura 12: Microscopia invertida dos organóides às 24h

Às 48 horas a maioria das células encontravam-se viáveis, mas a proliferação e diferenciação celular não eram as expectáveis, visto que não apresentavam mais camadas celulares do que no dia anterior. Neste dia o meio de cultura foi retirado e substituído por 200µl de Intestinal Cult, previamente aquecido a 37°C em banho-maria.

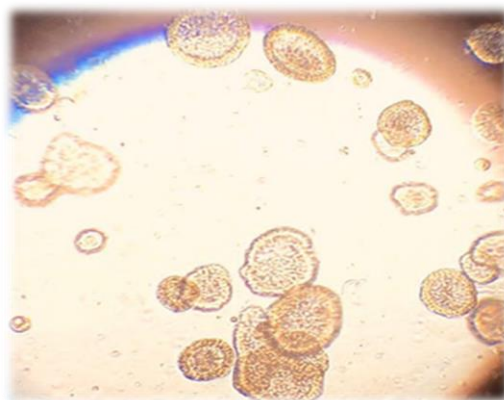


Figura 13: Microscopia invertida dos organóides às 48h

Passadas 72 horas havia uma maior percentagem de morte celular comparada com o dia anterior. Os organóides existentes mantinham o número de camadas celulares o que nos levou a concluir que o meio humano utilizado não é o indicado no caso de intestino de cão.

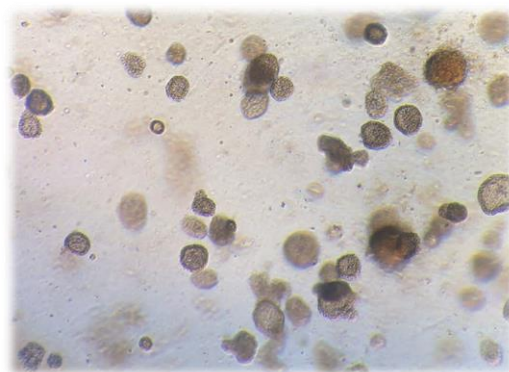


Figura 14: Microscopia invertida dos organóides às 72h

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento deste trabalho experimental tinha como objetivo comparar dois protocolos de descongelamento de organóides enteróides caninos criopreservados. Pretendia-se ainda testar a viabilidade de um meio de cultura humano (IntestineCult) que já obteve bons resultados em organóides enteróides de ratos, gatos e humanos.

Tal como referido anteriormente, os organóides utilizados neste procedimento foram generosamente cedidos pela Universidade de Utrecht (Países Baixos). Por esta razão foram submetidos a um transporte de 24h preservados em gelo seco. Aquando da receção da amostra constatou-se que os tubos não se encontravam em gelo seco, não sendo possível determinar qual o período em que não se encontraram corretamente acondicionados. Com esta premissa, não é possível garantir a manutenção das condições ótimas de conservação durante todo o transporte, podendo ter havido comprometimento da viabilidade celular. Idealmente os organóides deveriam ser criopreservados em azoto líquido com temperaturas a rondar os -196°C, condições difíceis de manter durante o transporte em gelo seco com temperaturas de -78°C. Esta amplitude térmica pode ser uma das justificações para os resultados encontrados neste trabalho no primeiro protocolo. Assim sendo, entrou-se em contato com a Universidade de Utrecht para que nos enviassem nova amostra de células permitindo-nos por em prática o segundo protocolo sem este viés.

As concentrações utilizadas no procedimento foram calculadas através de um ficheiro Excel, cedido pela Universidade de Utrecht, que calcula a percentagem de todos os constituintes utilizados consoante o número de poços que se vão cultivar. A realização do protocolo um apresentou vários desafios. O primeiro imprevisto ocorreu no transporte das células dado que não viajaram na temperatura desejada como já foi referido anteriormente. O Segundo desafio ocorreu no momento em que se procedeu à extração do sobrenadante que não foi retirado dos organóides em quantidade suficiente levando a que a suspensão se espalhasse pelos poços em vez de se manter centrada como era pretendido, perdendo assim, a consistência necessária para uma cultura 3D. O desenvolvimento dos organóides viáveis não foi o desejado e tal pode dever-se ao excesso de sobrenadante dimetilsulfóxido (DMSO) que ficou no momento da pipetagem do mesmo. Este anti-inflamatório é considerado um bom crio protetor mas, em doses elevadas, torna-se tóxico para as células levando à morte celular.

A colocação de penicilina-estreptomicina teve como objetivo diminuir o risco de contaminação da amostra o que foi conseguido em todo a fase do protocolo.

Passadas 24 horas do descongelamento verificou-se um número de células vivas satisfatório, o meio apresentava-se mais pálido comprovando a viabilidade dos organóides que consumiram o material do meio alterando a cor do mesmo. Foram ainda observadas algumas células mortas algo concordante com Clinton *et al.*, que concluiu em 2019 que o descongelamento de organóides pode apresentar alguns desafios, principalmente devido à sensibilidade e complexidade destas estruturas tridimensionais. Após 48 horas os organóides não apresentavam o desenvolvimento esperado pelo que foi necessário antecipar a primeira passagem (habitualmente realizada aos cinco dias após o descongelamento) que ocorreu no dia seguinte passadas 72 horas. A passagem consistiu na colocação de todas as células em dois poços de uma nova placa suspensas em Matrigel. As células encontravam-se centradas nos poços e adicionou-se à sua volta o novo meio constituído por Advanced DMEM[®], Glutamax[®], Hepes[®] e N2. O Advanced DMEM é um meio basal utilizado na cultura celular de mamíferos. O Glutamax[®] é um dipeptídeo L-alanil-L-glutamina que funciona como suplemento celular que minimiza a acumulação de amónia melhorando a viabilidade e o crescimento celular, mantendo-se estável a várias temperaturas. O Hepes[®] funciona como tampão mantendo o pH entre 7,2 e 7,6. O N2 utiliza-se também como suplemento celular. Aos poços próximos dos cultivados foi adicionado Hanks *solution* para evitar a desidratação celular/evaporação excessiva no meio de cultura quando colocados dentro da estufa. No dia seguinte à passagem a taxa de morte celular encontrava-se bastante elevada o que nos levou a concluir que o mau transporte das células foi prejudicial para a sua sobrevivência o que nos levou a rejeitar a amostra.

Após a receção e confirmação do correto acondicionamento durante o transporte da segunda amostra de células procedeu-se ao descongelamento das mesmas seguindo o protocolo número dois. Neste procedimento utilizou-se o meio de cultura IntestineCult e inclui-se o inibidor ROCKY *inhibitor* Y27632. As ROCKYs são enzimas quinases responsáveis pela tradução plasmática de recetores de membrana envolvidos em processos de fosforilação, promovendo a proliferação celular. Acredita-se que a sobreexpressão destas enzimas está associada a metastização tumoral, segundo Yuehong Wu *et al.* A primeira parte do protocolo correu como esperado e a grande maioria das células encontravam-se vivas e viáveis no dia seguinte ao procedimento. Às 48 horas pós descongelamento os organóides viáveis encontravam-se pouco desenvolvidos e a quantidade de células mortas era superior à do dia anterior, assim sendo, substituiu-se o meio antigo por 500µl de Intestinal Cult, que é um meio de cultura celular bastante completo na manutenção a longo prazo de organóides intestinais.

Pretendeu-se assim, adicionar um meio mais nutritivo para estimular a proliferação da cultura. Infelizmente por conta de segredos industriais não se conhece a formulação detalhada do referido meio, que já foi utilizado com sucesso em organóides intestinais humanos. Após as 72h do protocolo dois ter sido posto em prática constatou-se que as células não se estavam a desenvolver como era suposto. Além de haver uma elevada taxa de mortalidade, os organóides viáveis não cresceram como pretendido apresentando poucas camadas celulares. Nesta fase seria expectável um maior grau de proliferação e diferenciação celular pelo que se concluiu que este meio de cultura humano não é viável em enteróides de cães.

Alguns dos desafios comumente enfrentados durante o processo de descongelamento de organóides incluem a viabilidade celular dado que um processo de descongelamento rápido ou inadequado pode levar a altas taxas de mortalidade celular, comprometendo a integridade estrutural dos organóides. Um método de descongelamento inadequado pode levar ainda à perda de diferenciação celular e diminuição da função dos organóides, tal como aconteceu na realização deste procedimento. Pode ainda ocorrer uma agregação celular indesejada levando à perda da organização tridimensional e à heterogeneidade celular dentro dos organóides, afetando a sua utilidade como modelos de pesquisa. Por último e não menos importante, a contaminação microbiana, dado que o descongelamento inadequado pode aumentar o risco de contaminação por microrganismos, como bactérias, fungos ou vírus, que podem afetar negativamente a saúde das células dos organóides (Clinton *et al.*, 2018).

Este trabalho é de suma importância pois abre a porta à medicina do futuro sendo o primeiro trabalho feito em Portugal em organóides de animais. Esta nova técnica promete revolucionar a medicina humana e veterinária não só devido à sua capacidade de replicação de doenças como também pela possibilidade de futuramente ser possível a transplantação de organóides em patologias sem cura médica. A redução do uso de animais em experiências laboratoriais pode ser possível dada a oportunidade de substituição pelos organóides. Esta tese contou com o apoio e cooperação da Universidade de Utrecht, uma Universidade pioneira e líder em experiência mundial neste tema.

6. CONCLUSÃO

As técnicas de criopreservação e descongelamento são exequíveis em organóides intestinais caninos ainda que apresentem muitas dificuldades. O transporte das células é um ponto chave para que o descongelamento das mesmas corra como pretendido. A técnica utilizada no primeiro protocolo demonstrou alguns dos problemas que podem surgir num processo de descongelamento, levando a que seja necessário alterar algumas etapas e constituintes para melhorar a viabilidade da cultura assim como a antecipação de alguns pontos chave da cultura de organóides como foi o caso da passagem que teve de ser antecipada dada a pouca resposta das células que obtivemos nos primeiros dias pós descongelamento. O segundo protocolo permitiu-nos concluir algo nunca testado. O meio humano utilizado é prejudicial numa cultura de enteróides de canídeos embora seja bastante viável no caso de enteróides de humanos, ratos e gatos.

Os organóides são uma ferramenta altamente promissora na investigação científica moderna para fins medicinais ou estudos toxicológicos e têm o potencial de serem ferramentas importantes de pesquisa *in vitro* em diversos aspetos da medicina veterinária e ciências de produção animal, podendo complementar ou até mesmo substituir parcialmente os estudos com animais.

Apesar de terem limitações em comparação com órgãos *in vivo*, os organóides possuem vantagens distintas em relação a outros modelos *in vitro* já que replicam melhor a estrutura e função dos tecidos. Por serem modelos quase idênticos podem ser uma vantagem para estudos de mecanismos específicos, além de fornecerem um modelo de pesquisa acessível e bem definido, que pode ser usado para obter informações sobre importantes características complexas, como eficiência alimentar e resistência a doenças.

São ainda necessários mais estudos nesta área com o objetivo de uniformizar e aprimorar os diferentes processos de descongelamento, otimizando a viabilidade celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agopian, V. G., Chen, D. C., Avansino, J. R., & Stelzner, M. (2009). Intestinal stem cell organoids transplantation generates neomucosa in dogs. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 13, 971–982. doi: 10.1007/s11605-009-0806-x.

Allenspach, K. & Iennarella-Servantez, C. (2021). Canine protein losing enteropathies and systemic complications. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* (51) 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.09.010>.

Allenspach, K., Iennarella-Servantez, C. (2021). Canine protein losing enteropathies and systemic complications. *Vet Clin North Am Small Pract.* (51), 111–22. doi: 10.1016/j.cvsm.2020.09.010.

Ambrosini, Y. M., Park, Y., Jergens, A. E., Shin, W., Min, S., Atherly, T. (2020). Recapitulation of the accessible interface of biopsy-derived canine intestinal organoids to study epithelial-luminal interactions. *PLoS ONE* (15) e0231423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231423>.

Arnold, C. (2022). Sick as a dog: How understanding canine diseases will save human lives. *Nature Medicine*, 28 (12), 1970-1973. doi: 10.1038/s41591-022-02025-5.

Augustyniak, J., Bertero, A., Coccini, T., Baderna, D., Buzanska, L., & Caloni, F. (2019). Organoids are promising tools for species-specific *in vitro* toxicological studies. *Journal of Applied Toxicology*, 39 (12), 1610-1622. doi: 10.1002/jat.3815.

Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., et al. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 449, 1003–1007. doi: 10.1038/nature06196.

Barker, N., van Oudenaarden, A. & Clevers, H. (2012). Identifying the stem cell of the intestinal crypt: Strategies and pitfalls. *Cell Stem Cell*, 11 (4), 452-460. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.009.

Beumer, J. & Clevers, H. (2021). Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (22) 39–53. doi: 10.1038/s41580-020-0278-0.

Broutier, L., Andersson-Rolf, A., Hindley, C. J., Boj, S. F., Clevers, H., Koo, B. K., Huch, M. (2016). Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nature Protocols* (11) 1724–1743. doi: 10.1038/nprot.2016.097.

Brüstle, O. (2013). Miniature human brains. *Nature*, 501(7467), 319–320. <https://doi.org/10.1038/nature12552>

Camp, J. G., Badsha, F., Florio, M., Kanton, S., Gerber, T., Wilsch-Brauninger, M... Treutlein, B. (2015). Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), 15672-15677.

Carlone, D.L. & Breault, D.T. (2012). Tales from the crypt: The expanding role of slow cycling intestinal stem cells. *Cell Stem Cell* (10) 2-4.

Chandra, L., Borchering, D.C., Kingsbury, D., Atherly, T., Ambrosini, Y.M., Bourgois-Mochel, A., ... Allenspach, K. (2019). Derivation of adult canine intestinal organoids for translational research in gastroenterology. *BMC Biol*, 17, 33. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0652-6>.

Chen, T.C.; Neupane, M.; Chien, S.J.; Chuang, F.R.; Crawford, R.B.; Kaminski, N.E.; Chang, C.C. (2019). Characterization of Adult Canine Kidney Epithelial Stem Cells That Give Rise to Dome-Forming Tubular Cells. *Stem Cells Dev.* (28) 1424–1433.

Clevers, H. (2016). Modeling development and disease with organoids. *Cell*, 165 (7), 1586-1597.

Clinton, J., & McWilliams-Koeppen, P. (2018). Initiation, Expansion, and Cryopreservation of Human Primary Tissue-Derived Normal and Diseased Organoids in Embedded Three-

Dimensional Culture. *Current Protocols in Cell Biology*, 82(1), e66.
<https://doi.org/10.1002/cpcb.66>

Co, J. Y., Margalef-Català, M., Li, X., Mah, A. T., Kuo, C. J., Monack, D. M., Amieva, M. R. (2019). Controlling epithelial polarity: a human enteroid model for host-pathogen interactions. *Cell Reports*, 26 (9), 2509-2520.

Collins, S. D., Yuen, G., Tu, T., Budzinska, M. A., Spring, K. J., Bryant, K., & Shackel, N. A. (2019). *In vitro* models of the liver: disease modeling, drug discovery and clinical applications. In J. E. E. Tirnitz-Parker (Ed.), *Hepatocellular Carcinoma* (pp. 47-67).
<https://doi.org/10.15586/hepatocellularcarcinoma.2019.ch3>.

Corrò, C., Novellademunt, L., & Li, X. V. S. W. (2020). A brief history of organoids. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 319, C151-C165.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>.

Csukovich, G., Pratscher, B., & Burgener, I. A. (2022). The World of Organoids: Gastrointestinal Disease Modelling in the Age of 3R and One Health with Specific Relevance to Dogs and Cats. *Animals*, 12(18), 2461. <https://doi.org/10.3390/ani12182461>.

Date, S., & Sato, T. (2015). Mini-gut organoids: Reconstitution of the stem cell niche. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (31) 269-289.

De Souza, N. (2018). Organoids by design. *NATURE METHODS*, 15(1), 1-3.

Elbadawy, M., Usui, T., Mori, T., Tsunedomi, R., Hazama, S., Nabeta, R., ... Sasaki, K. (2019). Establishment of a novel experimental model for muscle-invasive bladder cancer using a dog bladder cancer organoid culture. *Cancer Science*, 110, 2806-2821.
<https://doi.org/10.1111/cas.14118>.

European Commission. (2021). Summary Report on the Statistics on the Use of Animals for Scientific Purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2018. Brussels.

Available

online:

[https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/SWD %2520part A and B.pdf](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/SWD_%2520part_A_and_B.pdf)

Evans M. (1981). Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture. *J Reprod Fertil* 62: 625–631. Doi:10.1530/jrf.0.0620625.

Fatehullah, A., Tan, S. H., & Barker, N. (2016). Organoids as an *in vitro* model of human development and disease. *Nature Cell Biology*, 18, 246-254.

Fatehullah, A., Tan, S. H., & Barker, N. (2016). Organoids as an *in vitro* model of human development and disease. *Nature Cell Biology*, 18(3), 246-254.

Fujii, M., & Sato, T. (2021). Somatic cell-derived organoids as prototypes of human epithelial tissues and diseases. *Nature Materials*, 20(2), 156-169.

Gabriel, V., Zdyrski, C., Sahoo, D. K., Dao, K., Bourgois-Mochel, A., Atherly, T., ... Mochel, J. P. (2022). Canine intestinal organoids in a dual-chamber permeable support system. *Journal of Visualized Experiments*, 181, e63612-v. <https://doi.org/10.3791/63612-v>.

Gabriel, V., Zdyrski, C., Sahoo, D.K., Dao, K., Bourgois-Mochel, A., Kopper, J., ... Allenspach, K. (2022). Standardization and Maintenance of 3D Canine Hepatic and Intestinal Organoid Cultures for Use in Biomedical Research. *J. Vis. Exp.* (179), Doi: 10.3791/63515.

Goodell, M.A., Nguyen, H., & Shroyer, N. (2015). Somatic stem cell heterogeneity: Diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16, 299-309.

Grabinger, T., Luks, L., Kostadinova, F., Zimmerlin, C., Medema, J.P., Leist, M., & Brunner, T. (2014). Ex vivo culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy. *Cell Death & Disease*, 5, e1228. doi: 10.1038/cddis.2014.194.

Haaker, M. W., Kruitwagen, H. S., Vaandrager, A. B., Houweling, M., Penning, L. C., Molenaar, M. R., ... & Helms, J. B. (2020). Identification of potential drugs for treatment of hepatic lipidosis in cats using an *in vitro* feline liver organoid system. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 34, 132-138. <https://doi.org/10.1111/jvim.15670>.

Hellman S. (2021). Generation of equine enteroids and enteroid-derived 2D monolayers that are responsive to microbial mimics. *Vet Res.* (52) 108. doi: 10.1186/s13567-021-00976-0.

Hofer, Moritz & Lutolf, Matthias P. (2021). Engineering organoids. *Nature* (6), 402-420.

Hoffmann, A.R.; Proctor, L.M.; Surette, M.G.; Suchodolski, J.S. (2016). The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Vet. Pathol.* (53) 10–21.

Holtfreter J.(1944). Experimental studies on the development of the pronephros. *Rev Can Biol* (3) 220–250.

Honneffer, J.B.; Minamoto, Y.; Suchodolski, J.S. (2014). Microbiota Alterations in Acute and Chronic Gastrointestinal Inflammation of Cats and Dogs. *World J. Gastroenterol.* (20) 16489–16497.

Hu, H., Gehart, H., Artegiani, B., López-Iglesias, C., Dekkers, F., Basak, O, ... Clevers H. (2018). Long-term expansion of functional mouse and human hepatocytes as 3D organoids. *Cell*, 175, 1591-1606.

Jamieson, P. R., Dekkers, P. R., Rios, A. C., Fu, N. Y., Lindeman, G. J., Visvader, J. E. (2017). Derivation of a robust mouse mammary organoid system for studying tissue dynamics. *Development*, 144, 1065-1071.

Jankovic, J.; Dettwiler, M.; Fernández, M.G.; Tièche, E.; Hahn, K.; April-Monn, S.; ... Campos, M. (2021). Validation of Immunohistochemistry for Canine Proteins Involved in Thyroid Iodine Uptake and Their Expression in Canine Follicular Cell Thyroid Carcinomas (FTCs) and FTC-Derived Organoids. *Vet. Pathol.* (58) 1172–1180.

Kar, S.K., Wells, J.M., Ellen, E.D., te Pas, M.F.W., Madsen, O., Groenen, M.A.M., Woelders, H. (2021). Organoids: a promising new *in vitro* platform in livestock and veterinary research. Vet Res, 52, 43. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00904-2>.

Kararli, T. (1995). Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. Biopharmaceutics & Drug Disposition, 16(5), 351-380. doi: 10.1002/bdd.2510160502.

Kawasaki, M.; Goyama, T.; Tachibana, Y.; Nagao, I.; Ambrosini, Y.M. (2022). Farm and Companion Animal Organoid Models in Translational Research: A Powerful Tool to Bridge the Gap Between Mice and Humans. Front. Med. Technol. (4) 895379.

Kim, G. A., Ginga, N. J., & Takayama, S. (2018). Integration of sensors in gastrointestinal organoid culture for biological analysis. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 6(2), 123-131.

Kopper, J. J., Iennarella-Servantez, C., Jergens, A. E., Sahoo, D. K., Guillot, E., Bourgois-Mochel, A. (2021). Disease pathogenesis and accelerate drug discovery: A one health approach. Frontiers in Toxicology, 3, 773953. doi: 10.3389/ftox.2021.773953.

Kramer, N.; Pratscher, B.; Meneses, A.M.C.; Tschulen, W.; Walter, I.; Swoboda, A.; Kruitwagen, H.S.; Schneeberger, K.; Penning, L.C.; Spee, B. (2020). Generation of Differentiating and Long-Living Intestinal Organoids Reflecting the Cellular Diversity of Canine Intestine. Cells (9) 822.

Kruitwagen, H. S., Oosterhoff, L. A., van Wolferen, M. E., Chen, C., Nantasanti, S., Assawarachan, A., Schneeberger, K., Kummeling, A.; van Straten, G.; Akkerdaas, I.C.; Vinke, C.R. (2020). Long-term survival of transplanted autologous canine liver organoids in a COMMD1-deficient dog model of metabolic liver disease. Cells, 9, 410. doi: 10.3390/cells9020410.

Kruitwagen, H. S., Oosterhoff, L. A., Vernooij, I., Schrall, I. M., van Wolferen, M. E., Bannink, F., ... & Spee, B. (2017). Long-term adult feline liver organoid cultures for disease modeling of hepatic steatosis. *Stem Cell Reports*, 8, 822-830. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.015>

Kruitwagen, H. S., Spee, B., Viebahn, C. S., Venema, H. B., Penning, L. C., Grinwis, G. C., Favier, R. P., van den Ingh, T. S., Rothuizen, J., Schotanus, B. A. (2014). The canine hepatic progenitor cell niche: molecular characterisation in health and disease. *Veterinary Journal*, 201, 345-352. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.05.024>.

Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345, 1247125. <https://doi.org/10.1126/science.1247125>.

Leushacke, M., & Barker, N. (2014). Ex vivo culture of the intestinal epithelium: Strategies and applications. *Gut*, 63, 1345-1354.

Li, M .L., Aggeler, J., Farson, D.A., Hatier, C., Hassell, J., Bissell, M.J. (1987). Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 136–140. doi:10.1073/pnas.84.1.136.

Lin, S.A., & Barker, N. (2011). Gastrointestinal stem cells in self-renewal and cancer. *Journal of Gastroenterology*, 46, 1039-1055.

Lu, D., & Kassab, G. S. (2011). Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *J. R. Soc. Interface*, 8, 1379-1385.

Luu, L. (2020). Development of Small Intestinal Organoid Cultures for the Study of Enteric Pathogens - Thesis submitted in accordance with the requirements of the University of Liverpool for the degree of Doctor in Philosophy.

Martin, GR. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634–7638. doi:10.1073/pnas.78.12.7634.

McCauley, H. A., & Wells, J. M. (2017). Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development*, 144, 958–962. <https://doi.org/10.1242/dev.140731>.

McCracken, K. W., Catálogo, R., & Wells, J. M. (2017). Wnt/ β -catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans. *Nature*, 541, 182-187.

Meneses, A. M. C., Schneeberger, K., Kruitwagen, H. S., Penning, L. C., van Steenbeek, F. G., Burgener, I. A., & Spee, B. (2016). Intestinal Organoids—Current and Future Applications. *Veterinary Sciences*, 3, 31. <https://doi.org/10.3390/vetsci304003>.

Meneses, A., Carvalho, P., Spee, B. (2022). Canine intestinal organoid as a model for inflammatory bowel disease. *I Encontro de Investigação da FMV da Universidade Lusófona- Edição Especial*, 13, 1-8.

Middendorp, S., Schneeberger, K., Wiegerinck, C. L., Mokry, M., Akkerman, R. D., van Wijngaarden, S., ... & Nieuwenhuis, E. E. (2014). Adult stem cells in the small intestine are intrinsically programmed with their location-specific function. *Stem Cells*, 32, 1083-1091. <https://doi.org/10.1002/stem.1655>.

Mochel, J. P., Jergens, A. E., Kingsbury, D., Kim, H. J., Martin, M. G., & Allenspach, K. (2017). Intestinal stem cells to advance drug development, precision, and regenerative medicine: A paradigm shift in translational research. *AAPS Journal*, 20, 17. Doi: 10.1208/s12248-017-0178-1.

Mondo, E.; Marliani, G.; Accorsi, P.A.; Cocchi, M.; di Leone, A. (2019). Role of Gut Microbiota in Dog and Cat's Health and Diseases. *Open Vet. J.* (9) 253–258.

Morrison, S. J., & Spradling, A. C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132, 598–611. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.038>.

Nantasanti, S., de Bruin, A., Rothuizen, J., Penning, L. C., & Schotanus, B. A. (2016). Organoids are a powerful tool for the study of liver disease and personalized treatment design in humans and animals. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(3), 325-330. doi: 10.5966/sctm.2015-0152.

Nantasanti, S., Spee, B., Kruitwagen, H.S., Chen, C., Geijsen, N., Oosterhoff, L.A. (2015). Disease modeling and gene therapy of copper storage disease in canine hepatic organoids. *Stem Cell Rep.* (5) 895–907. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.09.002.

Neal, J.T.; Li, X.; Zhu, J.; Giangarra, V.; Grzeskowiak, C.L.; Ju, J.; Liu, I.H.; Chiou, S.H.; Salahudeen, A.A.; Smith, A.R. (2018). Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell* 175, 1972–1988.

Park, J. S., Chu, J. S., Tsou, A. D., Diop, R., Tang, Z., Wang, A., Li, S. (2011). The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β . *Biomaterials*, 32(16), 3921-3930. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.019.

Penning, L. C., & van den Boom, R. (2023). Companion animal organoid technology to advance veterinary regenerative medicine. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1032835. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1032835>

Pleguezuelos-Manzano, C., Puschhof, J., den Brink, S., Geurts, V., Beumer, J., & Clevers, H. (2020). Establishment and Culture of Human Intestinal Organoids Derived from Adult Stem Cells. *Current Protocols in Immunology*, 130(1). <https://doi.org/10.1002/cpim.106>

Powell, R. H., & Behnke, M. S. (2017). WRN conditioned media is sufficient for *in vitro* propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals. *Biology Open*, 6, 698-705. <https://doi.org/10.1242/bio.021717>

Sahoo, D. K., Borcharding, D. C., Chandra, L., Jergens, A. E., Atherly, T., Bourgois-Mochel, A., Mochel, J. P. (2022). Differential transcriptomic profiles following stimulation with lipopolysaccharide in intestinal organoids from dogs with inflammatory bowel disease and intestinal mast cell tumor. *Cancers*, 14, 3525. <https://doi.org/10.3390/cancers14143525>

Sato, T., & Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*, 340, 1190–1194. <https://doi.org/10.1126/science.1234852>

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262–265. doi:10.1038/nature07935.

Spee, B., Carpino, G., Schotanus, B. A., Katoonizadeh, A., Vander-Borght, S., Gaudio, E. & Roskams, T. (2010). Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut*, 59, 247-257. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.188367>.

Steinberg, M.S. (1964). The problem of adhesive selectivity in cellular interactions. In: *Cellular Membranes in Development*, edited by Locke M. New York and London: Academic Press, 1964.

Stewart, A.S., Freund, J.M., Gonzalez, L.M. (2018). Advanced three-dimensional culture of equine intestinal epithelial stem cells. *Equine Vet J.* (50) 241–8. doi: 10.1111/evj.12734.

Takahashi, K. & Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.

Takebe, T. & Wells, J. M. (2019). Organoids by design. *Science*, 364(6444), 956-959. doi:10.1126/science.aaw7567.

Tekes, G., Ehmann, R., Boulant, S. A.O., & Stanifer, M. A.O. (2020). Development of feline ileum- and colon-derived organoids and their potential use to support feline coronavirus infection. *Cells*, 9, 2085. Doi: 10.3390/cells9092085.

Tesori, V., Puglisi, M.A., Lattanzi, W., Gasbarrini, G.B., & Gasbarrini, A. (2013). Update on small intestinal stem cells. *World Journal of Gastroenterology*, 19, 4671-4678. Doi: 10.3748/wjg.v19.i29.4671

United States Department of Agriculture. (n.d.). Annual Report Animal Usage by Fiscal Year. Retrieved April 22, 2023, from https://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/downloads/reports/FY19-Summary-Report-Column-F.pdf

Usui, T., Sakurai, M., Nishikawa, S., Umata, K., Nemoto, Y., Haraguchi, T., ... Sato, K. (2017). Establishment of a dog primary prostate cancer organoid using the urine cancer stem cells. *Cancer Science*, 108, 2383-2392. <https://doi.org/10.1111/cas.13418>.

Velasco, S., Kedaigle, A. J., Simmons, S. K., Nash, A., Rocha, M., Quadrato, G., ... Arlotta, P. (2019). Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature*, 570(7762), 523-527.

Velasco, V., Shariati, S. A., & Esfandyarpour, R. (2020). Microtechnology-based methods for organoid models. *Microsystem Nanoengineering*, 6, 76. <https://doi.org/10.1038/s41378-020-00185-3>.

Wakisaka, Y., Sugimoto, S., Sato, T. (2022). Organoid Medicine for Inflammatory Bowel Disease. *Stem Cells*, 40(1), 123-132. <https://doi.org/10.1093/stmcls/sxab020>.

Weiss, P. & Taylor, A.C. (1960). Reconstitution of complete organs from single-cell suspensions of chick embryos in advanced stages of differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 46: 1177–1185. Doi:10.1073/pnas.46.9.1177.

Wells, J. M. & Spence, J. R. (2014). How to make an intestine. *Development*, 141, 752-760. <https://doi.org/10.1242/dev.097386>.

Wiener, D.J., Basak, O., Asra, P., Boonekamp, K.E., Kretzschmar, K., Papaspyropoulos, A., Clevers, H. (2018). Establishment and characterization of a canine keratinocyte organoid culture system. *Vet Dermatol*, 29, 375. <https://doi.org/10.1111/vde.12541>.

Wilson, H.V. (1907). A new method by which sponges may be artificially reared. *Science* 25: 912–915. Doi:10.1126/science.25.649.912.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917–1920. Doi:10.1126/science.1151526.

Yui, S., Nakamura, T., Sato, T., Nemoto, Y., Mizutani, T., Zheng, X., ... Watanabe, M. (2012). Functional engraftment of colon epithelium expanded *in vitro* from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nature Medicine*, 18, 618–623. Doi: 10.1038/nm.2695.

Zachos, N. C., Kovbasnjuk, O., Foulke-Abel, J., In, J., Blutt, S. E., de Jonge, H. R.,... Donowitz, M. (2016). Human enteroids/colonoids and intestinal organoids functionally recapitulate normal intestinal physiology and pathophysiology. *J. Biol. Chem.*, 291, 3759-3766.

8. ANEXO

Dog intestinal organoids											
Dog											
list of organoids	No. of wells	vol/well (ul)	total vol (ul)	list of organoids	No. of wells	vol/well (ul)	total vol (ul)	list of organoids	No. of wells	vol/well (ul)	total vol (ul)
duodenum	4	520	2080	duodenum	0	520	0	duodenum	8	55	440
jejunum	5	520	2600	jejunum	0	520	0	jejunum	9	55	495
colon	0	520	0	colon	5	520	2600	colon	16	55	880
total	9		4680	total	5		2600	total	33		1815
total media to be prepared	4680			total media to be prepared	2600			total MATRIGEL to be prepared	1815		
Advanced DMEM	1989,8			Advanced DMEM	1102,8			wntCM	22,7		
B27	93,6			B27	52,0			NIC	1,8		
Glutamax	46,8			Glutamax	26,0			R-spondin	18,2		
Hepes	93,6			Hepes	52,0			EGF	0,9		
N2	46,8			N2	26,0			GAS	1,815		
NIC	46,8			NIC	26,0			NOG	3,6		
P/S	46,8			P/S	26,0			Rocki	1,8		
wntCM	2012,4			wntCM	1118,0						
R-spondin	234,0			R-spondin	130,0						
dilutedA83	23,4			dilutedA83	13,0						
NAC	9,4			NAC	5,2						
NOG	9,4			NOG	5,2						
Gentammycin	9,4			Gentammycin	5,2						
GAS	4,7			GAS	2,6						
EGF	2,3			EGF	1,3						
Primocin	9,4			Primocin	5,2						
SB202190	1,6			SB202190	0,9						
HGF (Colon only)	4,68			HGF (Colon only)	2,6						
Rocki	4,7	only 1 week after thawing/isolation		Rocki	2,6						
diluted A83	50			diluted A83	50						
A83 (x20,000)	0,5			A83 (x20,000)	0,5						
Adv DMEM/F12 dog	49,5			Adv DMEM/F12 dog	49,5						

Tabela 1: Documento Excel cedido pela Universidade de Utrecht para cálculo das concentrações dos constituintes dos meios de cultura.