

## Organoides de origen humano como modelo fisiopatológico de evaluación terapéutica de fármacos en COVID-19

### Organoids as a physiopathology model and therapeutic drug evaluation tool in COVID-19

Emilio González-López<sup>1</sup>, Tania F. Bahamóndez-Canas<sup>1,2\*</sup> , Carolina Campos-Estrada<sup>1,2</sup>, Daniel Moraga-Espinoza<sup>1,2</sup>,  
y Caroline Weinstein-Oppenheimer<sup>1,2\*</sup> 

#### Resumen

**Introducción:** La pandemia causada por SARS-CoV-2 ha impactado al mundo gravemente en diversos ámbitos y con ello ha surgido la necesidad de contar con herramientas con mayor relevancia fisiológica para investigar patologías complejas como el COVID-19. Los organoides son un modelo experimental con características únicas como la capacidad de autoformar una estructura tridimensional utilizando células en cultivo. Sobre esta base, surge la siguiente pregunta ¿son los organoides un modelo experimental factible para reflejar la fisiopatología del COVID-19 y evaluar la eficacia de fármacos que limiten su progresión? **Metodología:** Para abordar esta interrogante, esta revisión plantea el analizar la validez de los organoides como modelo experimental y verificar su utilidad en la evaluación de fármacos para el COVID-19. Para cumplir estos objetivos se realizó una revisión sistemática cualitativa de la literatura, a través de una búsqueda en PubMed con el término 'COVID-19 and stem cells and organoids' y también en un número especial de la revista *Cell*. **Resultados:** Se organizaron los resultados relevantes por sistema fisiológico y en la evaluación de fármacos. Los organoides más empleados para estudios de COVID-19 correspondieron a tejido respiratorio, nervioso y digestivo. Algunos resultados encontrados en la revisión fueron similares a aquellos obtenidos a partir de tejidos de pacientes COVID-19 o autopsias, encontrándose hallazgos relevantes como la posible disrupción de la barrera epitelial del sistema nervioso por infección del plexo coroideo. También se logró observar efectividad de fármacos que posteriormente pasaron a ser aprobados y utilizados exitosamente en pacientes. **Conclusión:** Los organoides se pueden componer a partir de diferentes tipos celulares y bajo diferentes protocolos experimentales, siendo relevante la lectura crítica de los artículos científicos para decidir si sus resultados son extrapolables a la fisiopatología de la enfermedad.

**Palabras Clave:** organoides; fisiopatología; células madre; SARS-CoV-2; descubrimiento de fármacos; modelo.

#### Abstract

**Introduction:** The pandemic caused by SARS-CoV-2 has impacted the world severely in several aspects and has created the need for research tools to study the COVID-19 disease. Organoids are experimental models with unique characteristics, like the ability to self-assemble in a tridimensional structure. Based on this, the following question arises: are organoids an experimental model suitable to reflect the physiopathology of COVID-19 and to allow the evaluation of the efficacy of drugs that limit its progression? **Methods:** To approach this question, this review aimed to analyze the validity of organoids as an experimental model and verify their utility in COVID-19 drug evaluation. To resolve these objectives, a qualitative systematic review was done through a PubMed search with the terms 'COVID-19 and stem cells and organoids' and on a special issue of the *Cell Journal*. **Results:** The results were organized by physiologic system and therapeutic drug evaluation. The most utilized tissues for the COVID-19 study were respiratory, nervous, and digestive. Some results found in the review were like those obtained from COVID-19 patient tissue or autopsies, finding some relevant discoveries like the possibility of the choroid plexus disruption in the nervous system caused by the infection. Efficacy was also observed in approved drugs and used later in patients successfully. **Conclusion:** Organoids might be composed starting with different cell types and under a variety of experimental protocols, being relevant the critical reading of the scientific literature to decide whether their results can be extrapolated to the pathophysiology of the disease.

**Keywords:** organoids; physiopathology; stem cells; SARS-CoV-2; drug discovery; model

Fecha de envío: 2023-06-12 - Fecha de aceptación: 2023-08-14

(1) Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.  
(2) Centro de Investigación Farmacopea Chilena, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.  
Autor de correspondencia: [caroline.weinstein@uv.cl](mailto:caroline.weinstein@uv.cl)



## Introducción

Desde el año 2019, la sociedad ha pasado por uno de los hitos más importantes en la historia, la pandemia de la enfermedad COVID-19. Esta enfermedad es causada por el virus SARS-CoV-2, el cual pertenece a la familia de coronavirus, cuya estructura corresponde a una cadena simple de ARN recubierta por una nucleocápside formada por la proteína N. Las proteínas M (membrana), S (*spike protein*, asociada al mecanismo de entrada a la célula hospedera) y E (envoltura) conforman la segunda capa que rodea al material genético del virus. Los factores que permiten la entrada del virus a la célula hospedera son principalmente la exopeptidasa de membrana, enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) y la serina proteasa celular de transmembrana 2 (TMPRSS2) (Wang *et al.*, 2020). Los primeros casos de personas infectadas por este virus fueron originados en la ciudad de Wuhan, China y fueron informados a la OMS en diciembre del 2019 (World Health Organization, 2020). A partir del 11 de marzo de 2020, la OMS declaró oficialmente la enfermedad COVID-19 como una pandemia (World Health Organization, 2020). Hasta octubre de 2022, se han registrado más de 600 millones de casos y más de 6 millones de muertes por COVID-19 en el mundo (Worldometer, 2022).

Los síntomas más comunes de la enfermedad causada por el virus son tos seca, fiebre, fatiga, dificultad para respirar, entre otros (Wang *et al.*, 2020). Sin embargo, aún se están dilucidando los mecanismos moleculares que impactan a los diferentes órganos y sistemas afectados por este síndrome. Uno de los principales sistemas afectados es el respiratorio, siendo las primeras células infectadas las células caliciformes (productoras de moco) y las ciliadas, lo que desencadena una inflamación y un arrastre de fluido a las vías respiratorias más profundas (Rudrapal *et al.*, 2020). La inflamación causada por la infección a nivel pulmonar aumenta la permeabilidad de los alvéolos, causando una acumulación de fluidos en los sacos alveolares lo que dificulta significativamente la respiración. También se ha observado una regulación a la baja de receptores ACE2, que protegen del daño pulmonar por su efecto vasodilatador, empeorando la condición del paciente (Rudrapal *et al.*, 2020).

También se han realizado hallazgos importantes en los efectos de COVID-19 a nivel de sistema nervioso, en el que se encuentran distintos signos neurológicos, como cefaleas, anosmia (pérdida de olfato), disgeusia (alteración del gusto), encefalitis, delirio, espasmos y síndrome de Guillain-Barré (Erickson *et al.*, 2021). Además, se pueden presentar síntomas gastrointestinales, como diarrea, vómitos y dolor abdominal. Estos no siempre son reconocidos y están relacionados con la capacidad infectiva del virus sobre las células del tracto digestivo (Wong *et al.*, 2020). Incluso, en algunos casos

graves se han encontrado alteraciones en parámetros hepáticos, como los niveles de aminotransferasas y la bilirrubina total, como consecuencia del daño hepático (Cha *et al.*, 2020).

La compleja fisiopatología de la enfermedad ha creado la necesidad de utilizar modelos experimentales que permitan observar, describir y estudiar de manera más detallada la evolución y progresión de la enfermedad. Una de las propuestas emergentes es el uso de organoides para este tipo de investigaciones.

Históricamente, los organoides como modelo de estudio *in vitro*, fueron precedidos por el uso de líneas celulares en cultivos en monocapa. A pesar de sus ventajas como modelo de estudio, que incluyen reducido tiempo de mantención, reproducibilidad, costo relativamente bajo, facilidad de efectuar análisis funcionales, escalabilidad y posibilidad de efectuar tamizajes de alto rendimiento; se han considerado modelos no fisiológicos, al tratarse la mayoría de las veces de células inmortalizadas que además carecen de la complejidad estructural, el microambiente estromal y la arquitectura de los tejidos, presentando menor diferenciación, comunicación intercelular y un grado variable de expresión génica respecto a los modelos *in vivo*. Surge entonces la tecnología de los organoides como un puente entre el cultivo celular y los modelos *in vivo* (Jensen & Teng, 2020).

El término científico-tecnológico organoide, ha evolucionado desde mediados del siglo pasado, en que algunos investigadores lo utilizaron para referirse a organelos intracelulares hasta la concepción moderna asociada con cultivos celulares complejos, que a diferencia de un cultivo simple 2D, se organiza por sí mismo en una estructura celular tridimensional y representa la relación del tejido con otras células del organismo. Sin embargo, en los tiempos contemporáneos aún no existe en la comunidad científica una definición de consenso para los organoides. Se puede considerar una definición amplia que abarca las variaciones entre distintos grupos de investigación: cultivo 3D generado a partir de cultivo primario, células madre adultas, células madre embrionarias o células madre pluripotenciales inducidas (iPSC, según sus siglas en inglés) que contiene tipos celulares órgano específicos derivados de las primeras y que posee propiedades de autorenovación, autoorganización y funcionalidades semejantes al tejido de origen (Xu *et al.*, 2023).

Las ventajas que ofrecen los organoides como modelo de estudio es que las células que los componen alcanzan mayor diferenciación celular, y su estructura agrupada en 3D permite una mayor comunicación intercelular, su sensibilidad a las drogas, tasa de proliferación y expresión génica representan mejor a los efectos *in vivo* (Jensen & Teng, 2020). Debido a estas características, los

organoides han sido empleados en estudios de modelación de enfermedades, como por ejemplo los organoides de pulmón han sido utilizados exitosamente para el estudio del virus de la influenza y sus efectos en el sistema respiratorio, en los que se ha podido observar la capacidad del virus de infectar y su respuesta a nivel celular (Hui et al., 2018). En cuanto a la sensibilidad de fármacos por los cultivos, los organoides presentan un ambiente más cercano al fisiológico que un cultivo 2D ya que la observación del efecto de una droga en particular podría ser más precisa en un organoide, por ejemplo, por su expresión genética y proteica más cercana a un modelo *in vivo*. El campo de desarrollo de nuevos fármacos se ha apoyado continuamente en distintos sistemas experimentales para la fase preclínica, como el uso de modelos *in vitro*, cultivos celulares y animales con el fin de determinar su eficacia y seguridad de uso. Como se mencionó anteriormente, los organoides han surgido como una alternativa a los métodos más simples como los modelos en dos dimensiones. Un ejemplo del uso de organoides en el desarrollo de productos innovadores es el estudio de Mills (2019), sobre el tamizaje de fármacos pro-proliferativos en organoides cardíacos. En dicho estudio, el uso de estos modelos celulares más representativos del cómo interactúan las células en los tejidos cardíacos permitió acotar los candidatos terapéuticos desde un número inicial de 100, a solamente 3 compuestos que pasaron a validación *in vivo*. Así, estos modelos no solo aceleran el proceso de elección de candidatos para nuevos fármacos sino también promueven el uso responsable de animales de experimentación al reducir el tamaño muestral cuando se llega a la etapa *in vivo*.

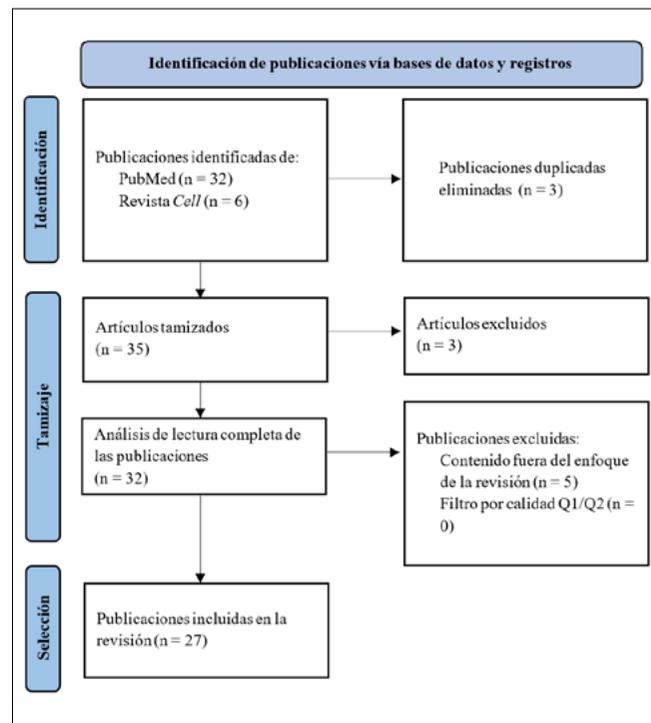
Debido a la contingencia de la pandemia, se han debido estudiar rápidamente diferentes candidatos para encontrar fármacos efectivos contra el COVID-19, utilizando herramientas de tamizaje de medicamentos. Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofrece el modelo de organoides, a la fecha no existe un análisis sistemático sobre su utilidad o preferencia como herramienta en la búsqueda de nuevas terapias específicas para el COVID-19.

De acuerdo con estos antecedentes, surge la oportunidad de estudiar esta nueva herramienta para contribuir a la investigación sobre la COVID-19, y nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Los organoides son un modelo experimental que refleja la fisiopatología de la COVID-19 y permite evaluar la eficacia de fármacos diseñados para limitar su progresión? Para responder esta pregunta, se plantean los siguientes objetivos: analizar la validez de los organoides como modelo experimental de la fisiopatología de la COVID-19 y verificar el potencial de estos organoides para el tamizaje de principios activos eficaces en el tratamiento de la infección por SARS-CoV-2.

## Metodología

Se realizó una revisión sistemática cualitativa a través del motor de búsqueda PubMed, incluyendo las siguientes palabras clave: “COVID-19 and stem cells and organoids” (Figura 1). Los filtros de búsqueda consideraron que las publicaciones estuvieran escritas en español o inglés y que la formación de organoides debe haber sido a partir de células madre humanas. No se utilizó un rango de tiempo específico debido a la naturaleza del tópico estudiado, sin embargo, todas las publicaciones encontradas fueron de los años 2020 y 2021. De esta forma, se obtuvieron 32 publicaciones que cumplían con los criterios anteriores, de los cuales 3 fueron descartados por ser comentarios y 5 porque su contenido estaba fuera del enfoque visualizado para esta revisión.

Durante el período temprano del desarrollo de este escrito, la revista *Cell* publicó un número especial sobre células madre y COVID-19, del cual se revisaron 21 artículos. Seis de ellos fueron elegidos sobre la base de los criterios mencionados anteriormente, y 3 fueron descartados por ser duplicados con respecto a la primera búsqueda. De las 27 publicaciones restantes, se verificó que contaran con la clasificación Q1 o Q2 (según clasificación de *Scimago Journal & Country Rank*). Ninguna publicación fue descartada después de este análisis.



**Figura 1:** Flujograma de inclusión y exclusión de las publicaciones identificadas. Adaptación del flujograma PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) (Page et al., 2021)

## 1. Organoides según sistemas de estudio

### 1.1 Sistema respiratorio

Los organoides representativos del sistema respiratorio han sido desarrollados y estudiados en relación con el COVID-19 en varios trabajos publicados. Estos modelos incluyen diversas células del epitelio del tracto respiratorio permitiendo un acercamiento integral a la fisiología de las vías respiratorias bajas. Este epitelio está constituido por células basales, ciliadas y secretoras desde la tráquea hasta los bronquiólos y por células alveolares tipo I (AT1) y tipo 2 (AT2) en el alveolo. Las células AT2, también conocidas como neumocitos tipo 2, son responsables de la producción del surfactante pulmonar (Weinberger, 2017).

Uno de los modelos obtenidos por Tiwari (2021) fue a partir de iPSC humanas, denominado LORG (*Lung Organoid*). Este modelo está compuesto por células AT1, AT2, ciliadas, basales y secretoras. La expresión de ACE-2 y TMPRSS2 se valoró mediante análisis de *western-blot* con resultados positivos, especialmente en células AT2. De esta manera, se reconoció que LORG era capaz de expresar el receptor y los co-factores necesarios para la infección por SARS-CoV-2. Se comprobó la entrada del virus a las células, mediante el uso de un pseudovirus que expresa el reportero *green fluorescence protein* (SARS-CoV-2 GFP) que permite el monitoreo por señales EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) detectadas al interior del organoide. Para cuantificar la infección viral, se utilizó un pseudovirus luciferasa para observar una respuesta quimioluminiscente significativa relativa a la transcripción viral. En cuanto a la respuesta del LORG frente a la infección, se detectó una regulación al alza de 10 veces para CCL5, CXCL10, IFN- $\beta$ , IL-6 e IL-8, comparado al estado basal no infectado, correspondiendo a los mismos resultados obtenidos a partir de células epiteliales de pulmón infectadas con SARS-CoV-2 (Tiwari *et al.*, 2021). Se detectó también la activación de los genes NLRP3, NLRC4, ASC, IL-18 y caspasa-1, relacionados con la activación del inflammasoma. Este trabajo, destaca porque los autores demuestran la autenticidad de pasos críticos en la diferenciación desde iPSC hasta LORG, describiendo morfológica e inmunocitoquímicamente los cultivos, además de desarrollar detección de marcadores clave mediante *western-blot*. Esta rigurosidad aporta a la credibilidad a los resultados presentados que confirman el potencial inflamatorio de la infección por SARS-CoV-2 a nivel de tejido pulmonar.

En otro modelo distinto formado a partir de células madre humanas pluripotentes (hPSC) denominado hPSC-LO (Han *et al.*, 2021) conformado prominentemente por células AT2, se detectó la expresión de ACE-2, furin (cofactor que facilita la entrada de SARS-CoV-2 a la célula) y TMPRSS2. En este modelo también se validó la entrada del virus mediante el uso de un pseudovirus luciferasa. Al igual que en

el modelo anterior, se detectó una sobreexpresión de quimiocinas, sin embargo, en hPSC-LO se observó una sobre activación de las vías de señalización asociadas a la artritis reumatoidea, tal como TNF e IL-17. Para estas vías se observó un comportamiento similar en tejido pulmonar de autopsia de pacientes con COVID-19 (Han *et al.*, 2021). Si bien esto último respalda los resultados obtenidos con las hPSC-LO, es un modelo simple al contener un solo tipo celular, lo que no refleja la complejidad fisiológica, ni se ajusta a la definición de organoide, aunque cumple con reproducir hechos conocidos de la infección por SARS-CoV-2. También se ha contemplado el aspecto funcional de estas células, usando alveoloesferas, un tipo de cultivo 3D, originado a partir de células AT2 (Katsura *et al.*, 2020). En este modelo, se observó una disminución de la expresión para las proteínas surfactantes en células infectadas por SARS-CoV-2, al ser comparado con las alveoloesferas control. Estos resultados en alveoloesferas se correlacionan con la evidencia del daño pulmonar inducido por la infección, debido a que la función del líquido surfactante es reducir la tensión superficial de los alvéolos y protegerlos del colapso durante la espiración (Cooper *et al.*, 2016). No obstante, el modelo de las alveoloesferas, aunque reproduce hechos observados en la infección por SARS-CoV-2, tal como expresión de interferones y apoptosis alveolar, adolece del mismo defecto enunciado para hPSC-LO, al incluir un solo tipo celular. Un aporte de este modelo es que utiliza células AT-2 derivadas de pulmones normales, reflejando el verdadero tipo celular que encontraría el virus en una infección real.

Otro estudio que se enfoca en células AT-2 derivadas de pulmones normales observó cambios transcriptómicos en un modelo tridimensional de células alveolares h3ACs tras la infección por SARS-CoV-2 (Youk *et al.*, 2020). Tras la entrada del virus, se observó un aumento en la expresión de genes inducidos por interferones. Los genes de proteínas transmembrana inducido por interferones (IFITM) son de particular interés debido a que están involucrados en los mecanismos de inhibición de la entrada del virus. Además, desde el punto de vista metodológico este estudio aporta a una producción de organoides en un medio de cultivo químicamente definido libre sustratos de recubrimiento de los frascos de cultivo que permite cultivo prolongado de los organoides.

Un protocolo de generación de organoides pulmonares que utiliza tejido embrionario e iPSC da cuenta de la posibilidad de formación de organoides de pacientes específicos (Leibel *et al.*, 2020). Esto se refiere a la capacidad de generar iPSC a partir de individuos de distinto sexo, edad, raza, etnia, factores genéticos, entre otros. Además, este modelo evidenció la formación de células de músculo liso en los organoides pulmonares, lo que indica la posibilidad de diseñar modelos de organoides más cercanos a la fisiología real del tejido en estudio que incluyan la variabilidad biológica.

Ambas propiedades son necesarias para estudios más certeros de la fisiopatología de la infección por SARS-CoV-2 y para el tamizaje de medicamentos para el tratamiento de COVID-19.

### 1.2 Sistema nervioso

Se han realizado diversos estudios en este sistema, en la búsqueda del conocimiento sobre el mecanismo de las manifestaciones neurológicas en pacientes COVID-19. En estos estudios se ha buscado detectar la expresión de los factores necesarios para la entrada del virus a la célula y así observar la capacidad infectiva en células del sistema nervioso. Se ha observado la expresión de ACE2 (Bullen *et al.*, 2020), TMRPSS2 o ambos (Jacob *et al.*, 2020) en varios modelos de organoides de tejido cerebral. En un estudio se observó el cofactor NRP1 el cual también participa en el proceso de entrada del virus a la célula (Jacob *et al.*, 2020). No obstante, la expresión de los ligandos del virus en los organoides no es señal inequívoca de que el virus *in vivo* infectará este tejido, especialmente cuando se trata de tejido cerebral, sitio anatómico protegido por la barrera hematoencefálica.

A propósito de lo anterior, en algunos modelos se pudo demostrar infección efectiva por SARS-CoV-2 por detección de marcadores virales dentro de las células, pero no se buscó identificar los co-factores necesarios para la entrada viral (Wang *et al.*, 2021). El estudio del sobrenadante del medio de cultivo de los organoides dio cuenta de la aparición de partículas virales (detectadas por marcadores específicos como la proteína M y S del virus, o la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp)) indicando que la infección viral era de tipo productiva (Mao & Jin, 2020). De esta manera, se demuestra que la infección puede ocurrir a nivel celular, aunque sigue quedando la interrogante acerca del acceso a sistema nervioso central en el organismo completo.

En un organoide de plexo coroideo, se observó un incremento en la expresión de citocinas inflamatorias como; CCL7, IL-32, CCL2, IL-18, IL-8 y TNF- $\alpha$  (Jacob *et al.*, 2020), siendo denominado como una desregulación transcripcional. Otros factores activados identificados son IL-6, IFIT3, OAS2, TLR3, TL37, la vía de señalización del complemento, calpaínas, apoptosis y la vía de necrosis regulada por RIPK1/3 (Tiwari *et al.*, 2021). Otro análisis transcriptómico en un estudio distinto identificó la expresión del factor de transcripción HIF1A, inducido por la hipoxia observada en las células infectadas (Bodnar *et al.*, 2021). Se encontró una expresión disminuida de vGLUT1 (transportador de glutamato vesicular 1), lo que indica un defecto en la sinaptogénesis en las neuronas (Bodnar *et al.*, 2021). Por una parte, el virus puede causar la lisis celular de las células infectadas, pero un hallazgo importante es la muerte de células no infectadas por SARS-CoV-2. Se observó que las células no infectadas adyacentes a las que cursan con infección experimentaron estrés

y muerte celular, posiblemente por la inflamación local (Jacob *et al.*, 2020). Estos resultados refuerzan lo señalado en párrafos precedentes, respecto a que el hallazgo de los ligandos para el virus no es la única investigación relevante para comprender la fisiopatología del virus, ya que la infección local generada por la infección puede afectar a las células vecinas no infectadas.

En complemento a lo indicado anteriormente, los estudios en organoides han entregado evidencia de que la infección es selectiva en cuanto al tipo de célula que infecta y el estado de madurez de esta. Diversos modelos mostraron una escasa infección en células neurales progenitoras (NPC), comparado con neuronas maduras. Los resultados mostraron una infección más eficiente en células maduras, lo cual es respaldado por la evidencia de un menor nivel de ACE2 y TMRPSS2 en NPCs (Ramani *et al.*, 2021). La región del cerebro es un factor importante a tener en cuenta, ya que se han obtenido resultados que demuestran una menor expresión de ACE2 en neuronas de la corteza (Yi *et al.*, 2020), y de ACE2 y TMRPSS2 en neuronas del hipocampo (Jacob *et al.*, 2020). En contraste a lo anterior, se demostró una mayor infectividad en el plexo coroideo, ya que estas células epiteliales expresan mayor nivel de ACE2 y TMRPSS2 que las células neuronales (Jacob *et al.*, 2020). Aunque se carece de suficiente evidencia concluyente, esto se ha relacionado al mecanismo con el que el virus es capaz de ingresar al sistema nervioso, ya que se han observado interrupciones en la integridad de la barrera epitelial en organoides de plexo coroideo. Se ha obtenido evidencia de filtración de líquido cefalorraquídeo, respaldado por una disminución del líquido interno del organoide y una dilución de las proteínas del medio de cultivo. Al mismo tiempo, se ha identificado una disminución en la expresión de los genes que permiten una secreción adecuada del líquido cefalorraquídeo (AQP1, AQP4, SLC22A8) (Jacob *et al.*, 2020). Estos resultados son relevantes al implicar al plexo coroideo, que constituye la conocida barrera hematoencefálica, como blanco del virus causando la pérdida de su función de filtro de acceso al Sistema Nervioso Central. De esta manera, parece plausible que *in vivo*, las diversas zonas del tejido cerebral puedan ser infectadas acorde a su susceptibilidad dada por la expresión de los ligandos como ACE-2 y otros asociados al tropismo del virus.

### 1.3 Sistema digestivo

A partir de la aparición de manifestaciones digestivas en los pacientes con COVID-19, el sistema digestivo pasó a ser un punto de interés para el estudio con organoides. En un modelo de organoide de colon hPSC-CO (organoides de colon de células madre pluripotente humanas) se incluyeron, entre otros tipos celulares, a enterocitos, células secretoras (de cáliz o caliciformes) y enteroendocrinas (Han *et al.*, 2021). Dentro de los hallazgos encontrados se corroboró la capacidad infectiva de SARS-CoV-2 en el organoide a partir del uso

de un pseudovirus luciferasa, el cual presentó una alta actividad de esta enzima dentro de las células, demostrando permisividad infectiva en todos los tipos celulares presentes en hPSC-CO. Estos autores poseían experiencia previa en la construcción de organoides y describen el proceso experimental y la constatación de los tipos celulares que constituyen este organoide mediante reconocidos marcadores de enterocitos, células caliciformes, células amplificadoras en tránsito, células neuroendocrinas y células madre. Además, estos autores efectuaron un modelo de xenotransplante de organoide, que permitió verificar la permisividad *in vivo* de estas células en un modelo que intenta mimetizar la situación en organismo completo.

En otro estudio, sobre la base del uso de un organoide de características similares a hPSC-CO se confirmó también la capacidad infectiva y replicativa de SARS-CoV-2 en el organoide (Zhao *et al.*, 2021). Se detectó también la producción de IFN (interferón) tipo III (IFN- $\lambda$ 1 y IFN- $\lambda$ 3), pero no de IFN tipo I y II en las células infectadas. En consecuencia, a la producción de IFN-III, se observó expresión de genes estimulados por interferones (ISGs). Como contribución adicional, los autores detallan que este modelo había sido estudiado previamente por su grupo en otra investigación, demostrando la expresión de ACE2 y TMRPSS2, lo cual es apoyado por la mención de otros estudios en organoides intestinales, demostrando una alta expresión de ambos cofactores (Geurts *et al.*, 2021). Estos autores describen con detalle los aspectos técnicos del desarrollo del modelo que recapitula la infección intestinal por SARS-CoV-2, informando la composición del medio de mantención y de diferenciación que tiene el fin de promover la diferenciación de las vellosidades intestinales. Además, siguieron el proceso de diferenciación mediante la detección de marcadores intestinales, tales como villina, fosfatasa alcalina, lisozima y mucina-2, que permitieron diferenciar los tipos celulares presentes en los organoides utilizados para estudiar la infección por SARS-CoV-2.

Por otro lado, también se han estudiado organoides de hepatocitos y células epiteliales del ducto biliar (colangiocitos). Se ha demostrado infectividad en estos organoides usando un pseudovirus SARS-CoV-2 luciferasa, siendo confirmada la infección por la alta actividad de luciferasa en las células de estos organoides (Yang *et al.*, 2020). En el estudio de Yang (2020), se encontró que en los organoides de hepatocitos hubo una inducción de quimiocinas (CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6 y CCL20) y a su vez una disminución en la expresión de marcadores pertenecientes al metabolismo hepático (CYP7A1, CYP2A6, CYP1A2, CYP2D6). Estos organoides fueron producidos a partir de células humanas pluripotenciales, sin embargo, el proceso de producción se detalla superficialmente en la información suplementaria, siendo el mayor énfasis de este reporte la presentación de la infectividad y del cambio en la ex-

presión génica, por métodos de secuenciación de mRNA, en las células infectadas con el pseudovirus.

Similarmente, en los organoides con colangiocitos se encontró mayor actividad de ciertas vías de señalización, tales como las de quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CXCL3 y CCL2), TNF, NF- $\kappa$ B e interacción citocina-receptor. Zhao y colaboradores (2021) observaron muerte celular (por estimulación de factores apoptóticos CD40, CARD 8 y STK4), disrupción de la barrera epitelial del ducto biliar y disminución en la expresión de transportadores de ácidos biliares (SLC10A2, CFTR) (Atala *et al.*, 2021). Los organoides utilizados en el estudio de Zhao (2021) fueron cultivados utilizando una matriz extracelular comercial, Matrigel™, en la que se cultivaron células progenitoras derivadas de ducto hepático biliar en un medio de cultivo definido. Estas se autoorganizaron en estructuras tridimensionales que constituyen los organoides ductales hepáticos. Los autores presentan evidencias de que estas estructuras retienen los marcadores de infectividad por SARS-CoV-2 antes de efectuar los estudios cuyos resultados se describieron.

#### 1.4 Desarrollos emergentes

El virus SARS-CoV-2 sigue circulando hoy en día, y por tanto es necesario extender la investigación a distintos campos, con el fin ampliar la comprensión de sus mecanismos y sus consecuencias para el individuo afectado. Ahmad y colaboradores, detectaron la presencia de ACE2 y TMPRSS2 en organoides de retina, los cuales incluían células similares a neuronas fotorreceptoras y ganglionares, entre otras (Ahmad Mulyadi Lai *et al.*, 2021). En este estudio, se corroboró la infección por SARS-CoV-2 mediante fluorescencia tras usar un pseudovirus GFP, y se encontró un aumento de la transcripción de genes relacionados con respuesta inflamatoria y apoptosis, como VCAM-1, CXCL1, MMP9, IL33, LY96 y BDKRB1. Los autores señalan que estos resultados son consistentes con los hallazgos encontrados en tejido endotelial pulmonar y vascular de personas infectadas con COVID-19 (Ahmad Mulyadi Lai *et al.*, 2021). Estos autores describen en suficiente detalle el proceso desde la obtención de iPSCs a partir de células sanguíneas periféricas mononucleares hasta el proceso de diferenciación hacia la producción de los organoides retinales, utilizando medios de cultivo diferenciales en suspensión. Además, reportan el seguimiento morfológico y de marcadores putativos del organoide retinal.

También se han realizado esfuerzos en estudios sobre el sistema cardíaco, ya que es otro posible foco de importancia en el desarrollo de la patología. Un estudio usó organoides cardíacos compuesto por cardiomiocitos (hPSC-CM) y células endoteliales (hPSC-EC), en que se observó una respuesta inflamatoria mediada por citocinas como IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Los autores hipotetizaron que esta tormenta de citocinas podría conducir a una disfunción sistólica, y sobre esta

base encontraron una posible diana terapéutica, BRD4, la cual es inhibida por la molécula INCB054329, previniendo la activación inflamatoria y evitando la disfunción del órgano cardíaco (Mills *et al.*, 2021). Estos autores entregan una descripción de la construcción del organoide cardíaco/endotelial, diferenciando por separado ambos tipos celulares a partir de células madre humanas pluripotentes en condiciones adherentes en frascos recubiertos con Matrigel™, y usando medios específicos. Para la formación del organoide utilizaron moldes producidos por fotolitografía y moldeado con dimeticona en que se sembraron los cardiomiocitos y células endoteliales en una relación 80:20, respectivamente. Es muy interesante indicar que estos autores evaluaron funcional y fenotípicamente los organoides en que realizaron sus observaciones. Otro estudio que resalta esta revisión es el de un organoide constituido por vasos sanguíneos, al que se le comprobó la infección por SARS-CoV-2, lo que permite definir una base para el estudio de la fisiopatología en el tejido endotelial y su respuesta inflamatoria (Monteil *et al.*, 2020). Estos organoides fueron obtenidos a partir de iPSc replicando el protocolo declarado por otros autores.

Por otro lado, el uso de organoides ha tenido relevancia incluso en la consideración de los factores ambientales y cómo estos pueden influir en la respuesta a la enfermedad. Por ejemplo, se estudió el impacto que podía tener el material particulado fino diésel 2.5 (dPM2.5) (un importante contaminante del aire) en un organoide alveolar (Kim *et al.*, 2020). Los organoides expuestos a este material mostraron una disminución en tamaño comparados con los controles, una mayor inducción inflamatoria por IL-1 $\beta$ , IL-6 y NOX-2/3/4, y un aumento de la transcripción para ACE2 y TMRPSS2. Por lo tanto, la exposición a dPM2.5 predispondría a la infección por SARS-CoV-2, el cual encontrará además un entorno proinflamatorio, incluso previo a su entrada a las células. Sin embargo, este estudio fue realizado con organoides que solo contenían células de la línea celular A549, lo que limita la extrapolación de los resultados al ambiente real.

El campo de la genética también ha utilizado a los organoides como un modelo de estudio. La revisión de Geurts (2021) explica brevemente cómo investigadores utilizaron la tecnología de CRISPR en un organoide para eliminar ciertos genes. Se formó un organoide de duodeno *knock out* para los genes TMRPSS2 y TMRPSS4, a partir del cual se observó una reducción de la replicación de SARS-CoV-2 en 4 veces en el caso de TMRPSS4 *knock out*, y una reducción no significativa para TMRPSS2 *knock out*. Otra instancia de modificación genética es un estudio en el que se realizó un *knock down* de los genes para FURIN, ACE2 y TMRPSS2 en células aisladas a partir de un organoide intestinal (Dobrindt *et al.*, 2020). Producto de la disminución en la expresión

de estos genes, se observó una reducción en la positividad para la proteína N del SARS-CoV-2 en las células, demostrando que los organoides podrían ser una plataforma apta para la observación de la respuesta de las células al virus tras una modificación genética. Sin embargo, es importante destacar que es difícil proyectar una modificación genética como una estrategia para evitar la infección viral en el contexto del mundo real.

## 2. Evaluación de fármacos

Tras comprobar la infectividad y respuesta celular de los organoides frente al SARS-CoV-2, varios autores han planteado este modelo para observar el efecto de fármacos, tanto posibles nuevos candidatos, como moléculas con actividad comprobada previamente. En un organoide de pulmón derivado de hPSC (hPSC-LO, mencionado anteriormente) se realizó un tamizaje de más de mil moléculas aprobadas por la FDA (Food and Drugs Administration). De éstas, cuatro bloquearon la actividad de luciferasa del pseudovirus: imatinib, cloroquina, ácido micofenólico (MPA) y dihidroclorhidrato de quinacrina (QNHC) (Han *et al.*, 2021). Se encontró que imatinib, MPA y QNHC bloqueaban la entrada del virus de manera dosis dependiente, evidenciado por una disminución del ARN viral y de la expresión de la proteína S tanto en hPSC-LO como en organoides de colon derivados de hPSC (hPSC-CO). En cuanto al mecanismo, se observó que imatinib y QNHC se unían a ACE2, a la vez que MPA y QNHC reducían la expresión de FURIN.

Por otro lado, en organoides de pulmón derivado de iPSc humanas (LORG), se probó la actividad inhibitoria del péptido EK-1 y un inhibidor de TMRPSS2 (camostat) (Tiwari *et al.*, 2021). Ambas moléculas mostraron efectividad al inhibir la infección por SARS-CoV-2. De manera similar, se expuso un organoide pulmonar (HLO) derivado de hESC (células madre embrionarias humanas) a la acción de antiandrógenos y se observó una disminución significativa en los niveles de ACE2 (Samuel *et al.*, 2020).

Para el sistema digestivo, se han realizado estudios sobre organoides intestinales, específicamente derivados de células madre pluripotente humanas (PSC-HIOs) (Krüger *et al.*, 2021). Un aspecto destacable de uno de estos trabajos es que la evaluación de los fármacos utilizados se aplicó también a una línea celular Caco-2 colorrectal, lo que permitió comparar la diferencia de la respuesta de estas con la de los organoides. Para remdesivir, se observó que, en organoides, la concentración inhibitoria 50 (IC50) fue 70 veces mayor que en las células Caco-2, demostrando la importancia del uso de estos cultivos tridimensionales para evitar resultados imprecisos. Los detalles de los resultados obtenidos por los estudios mencionados anteriormente se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Resultados de la evaluación de fármacos en organoides derivados de células madre.

Compuesto	Organoides	Mecanismo	Observaciones	Referencia
Imatinib	Organoides de pulmón y colon derivados de hPSC (hPSC-LO/CO)	Inhibición de la entrada viral por unión a ACE2	Se detectó una disminución del ARN viral y de la expresión de la proteína S.	Han <i>et al.</i> , 2021
QNHC		Inhibición de la entrada viral por unión a ACE2		
MPA		Reducción de la expresión de FURIN		
Cloroquina		Inhibición de la entrada viral		
Péptido EK-1	Organoides de pulmón derivados de iPSC humanas (LORG)	Unión al dominio HR1 de la proteína S	Disminución de la actividad de luciferasa, especialmente por combinación EK-1 y camostat	Tiwari <i>et al.</i> , 2021
Camostat		Inhibición de la proteína TMRPSS2		
Ketoconazol	Organoides de pulmón derivados de hESC (HLO)	Reducción de la expresión de ACE2	1) Reducción en el número de células positivas para la proteína N de SARS-CoV-2 2) Reducción de la titulación viral en el sobrenadante del organoide	Samuel <i>et al.</i> , 2020
Finasterida				
Dutasterida				
Remdesivir	Organoides de intestino derivados de PSC humanas (PSC-HIO)	Inhibición de la entrada viral	Reducción en el número de células infectadas en dosis de 0,5 µM y casi nula infección en dosis de 5 µM	Krüger <i>et al.</i> , 2021
Famotidina		Antagonista del receptor H2 de histamina	No hubo reducción en la tasa de infección, corroborado por inmunotinción para proteína S y qPCR para proteína N del SARS-CoV-2	
Péptido EK-1		Unión al dominio HR1 de la proteína S	Reducción del número de células positivas para proteína S	

ACE: enzima convertidora de angiotensina 2; QNHC: dihidroclorhidrato de quinacrina; hPSC: células madre humanas pluripotentes; MPA: ácido micofenólico

## Discusión

La necesidad de tener resultados concretos y robustos acerca de la enfermedad COVID-19 es crucial debido a la crisis sanitaria y socioeconómica que el mundo ha sufrido a causa de la pandemia por SARS-CoV-2. Mediante el uso de los organoides, se ha podido observar cómo la infección por el virus afecta a varios sistemas del organismo. Uno de los hallazgos más importantes encontrados es la similitud de los resultados que se obtuvieron en ciertos modelos de organoides, al compararlos con tejidos de pacientes COVID-19 o de autopsias, especialmente a nivel celular, lo que permite dar los primeros pasos para validar la utilidad de los organoides para el estudio de esta patología.

Los datos obtenidos a partir del estudio de fármacos también son un aporte positivo para el uso de organoides, por ejemplo, en el

caso de remdesivir, que mostró actividad inhibitoria de la infección en organoides que se tradujo posteriormente con éxito a estudios clínicos. Estos resultados permitieron que remdesivir se aprobara durante el 2020 en Europa, Japón, Singapur, Australia, entre otros países, siendo utilizado en pacientes con COVID-19 severo como tratamiento (Lamb, 2020). Todos estos resultados obtenidos a partir de organoides son relevantes para la transición al uso de un modelo que tiene por objetivo reducir el número de animales utilizados en las investigaciones, lo cual es un aspecto de gran importancia en el campo científico.

Sin embargo, surgen ciertas limitaciones en cuanto a la utilización de este modelo, propias debido al uso de un cultivo y no un organismo completo. Por ejemplo, la ausencia de células del sistema inmune es un factor importante que considerar, especialmente en

el modelamiento de esta patología la cual se caracteriza por altos niveles de inflamación. A partir de la observación de la disrupción de la barrera epitelial del plexo coroideo tras la infección de SARS-CoV-2 en el organoide, se abre la especulación de las consecuencias de esto, particularmente sobre la posible infiltración de células inmunes al sistema nervioso central, lo que potenciaría el ambiente proinflamatorio y el daño a nivel de este tejido, lo cual se refleja en los síntomas neurológicos a largo plazo descritos en pacientes infectados por SARS-CoV-2. Además, el estudio de fármacos que puedan interferir en la vía inflamatoria o inmune no representaría precisamente el comportamiento que tendría en un modelo *in vivo*, lo que limita las conclusiones que se pueden obtener con el modelo organoide. Desafortunadamente, en los estudios mencionados en la revisión se reflejan las limitaciones del diseño, sin embargo, el organoide es aun así un modelo más integrado y diverso que un cultivo celular en monocapa 2D, con utilidad en diversos campos de investigación.

Los resultados presentados anteriormente dan indicios de los efectos de la enfermedad en el organismo, y abre varias incógnitas que se podrían investigar a futuro. Por ejemplo, en los organoides hepáticos se observó una disminución en la expresión del metabolismo de los citocromos, lo que puede hacer pensar en una pérdida de la funcionalidad del hígado. Este hallazgo podría ser de alta relevancia para el estudio del 'long COVID', que consiste en las manifestaciones crónicas con las que el paciente permanece una vez superada la enfermedad y, por lo tanto, un posible daño hepático es importante a considerar a largo plazo. En este long COVID se han identificado signos neurológicos relacionados con una disfunción autónoma como fatiga, palpitations, falta de aire, dolor de pecho, anosmia y disgeusia (Yelin *et al.*, 2021). Por lo tanto, las observaciones realizadas en organoides del sistema nervioso son relevantes también para este punto, por ejemplo, la filtración de líquido cefalorraquídeo observada en el estudio de Pellegrini *et al.* (Pellegrini *et al.*, 2020), que implica un compromiso de la barrera protectora del cerebro, provocando muerte celular y daño neurológico, con consecuencias que podrían ser crónicas.

Adicionalmente, este modelo de organoide no solamente refleja la respuesta celular de manera aislada, sino que se pueden incluir también factores ambientales o genéticos para personalizar el estado del organoide. Por ejemplo, la mayor expresión de ACE2 y de genes proinflamatorios del organoide al ser expuestos al contaminante dPM2.5, se relaciona con un estado base de mayor inflamación, lo cual ha sido observado previamente (Sharma & Balyan, 2020). En este estudio se presentan algunos casos como

el exceso de PM10 en el aire siendo utilizado como un predictor para la infección por SARS-CoV-2 en la región del norte de Italia, y al mismo tiempo los autores detallan cómo la contaminación del aire exacerba las comorbilidades relevantes para COVID-19 como lo son la hipertensión o la obesidad.

El protocolo de organoides pulmonares de Leibel y colaboradores (2020) dio cuenta de la factibilidad de obtener organoides de pacientes específicos, lo que abre la puerta a la posibilidad de diseñar modelos personalizados. Es decir, el poder contar con organoides que representen más cercanamente aspectos como la susceptibilidad a la infección. Por ejemplo, se ha identificado una mayor expresión de ACE2 y TMPRSS2 en adultos (entre 20 y 59 años), además de una mayor susceptibilidad en hombres, así como ciertas variantes genéticas (Sayed Alinaghi *et al.*, 2021). Adicionalmente, un grupo de investigadores demostró que la expresión de estos dos factores variaría a lo largo del tracto respiratorio lo que implica la existencia de zonas más susceptibles a infección que otras. Los autores observaron una mayor expresión de ACE2 y TMPRSS2 en epitelio nasal comparado con el epitelio de vías aéreas más distales (tráquea, bronquiolos y alveolos) mediante la medición de los niveles de ARNm. (Hou *et al.*, 2020). Esto implica que en las vías respiratorias hay zonas donde existe una mayor susceptibilidad de infección por SARS-CoV-2, sin embargo, estos estudios fueron realizados en epitelio y no en modelos tridimensionales. A pesar de esto, sería interesante realizar las mismas observaciones en organoides pudiendo tener los distintos grupos celulares en cada cultivo, representando las distintas zonas del tracto respiratorio. Además, como se mencionó anteriormente, los organoides tienen una alta estabilidad transcriptómica, por lo que resultaría valioso la comparación de los resultados.

Los estudios que fueron analizados se llevaron a cabo durante el punto alto de la pandemia COVID-19, por lo que hay que tener un mayor criterio al interpretar los resultados, ya que durante este tiempo la información tenía que ser liberada rápidamente a la comunidad científica. Esto ha llevado a que se cuestione la rigurosidad científica de algunos estudios relacionados con el virus SARS-CoV-2, como lo indican algunas revisiones que detectaron limitaciones importantes en los estudios que el grupo de autores analizó (Orellana-Serradel *et al.*, 2020). Por ejemplo, en esta revisión fue incluido el estudio de Jacob, 2020, el cual posee varias limitaciones, como el uso de células embrionarias en el organoide neuronal, lo que hace difícil extrapolar los resultados a un individuo adulto, o también la exposición directa que se realizó del virus al organoide, lo cual no ocurriría en una situación *in vivo*.

## Conclusión

Los organoides se pueden componer a partir de diferentes tipos celulares y bajo diferentes protocolos experimentales, siendo relevante la lectura crítica de los artículos científicos para decidir si sus resultados son extrapolables a la fisiopatología de la enfermedad. Para esto es necesario verificar tanto el detalle experimental y del control de calidad de las diferentes fases de la producción de estos organoides para considerar válidas sus conclusiones. En cuanto al uso de los organoides para tamizaje de drogas, su aporte en acortar el tiempo de desarrollo y reducir el número de animales de experimentación ha quedado demostrado con el ejemplo de remdesivir que alcanzó la aprobación de agencias regulatorias de alto nivel de vigilancia durante el periodo de la pandemia.

## Fuentes de financiamiento y contribuciones

La presente revisión constituye una revisión independiente por el autor por lo cual no se describen fuentes de financiamiento.

## Conflictos de interés declarados por los autores

No existen conflictos de interés que puedan haber afectado a la confección del escrito o interpretación de los resultados.

## Referencias

Ahmad Mulyadi Lai, H. I., Chou, S.-J., Chien, Y., Tsai, P.-H., Chien, C.-S., Hsu, C.-C., Jheng, Y.-C., Wang, M.-L., Chiou, S.-H., Chou, Y.-B., Hwang, D.-K., Lin, T.-C., Chen, S.-J., & Yang, Y.-P. (2021). Expression of Endogenous Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Organoids. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**.

Atala, A., Henn, A., Lundberg, M., Ahsan, T., Greenberg, J., Krukin, J., Lynum, S., Lutz, C., Cetrulo, K., Albanna, M., Pereira, T., Eaker, S., & Hunsberger, J. (2021). Regen med therapeutic opportunities for fighting COVID-19. *Stem Cells Translational Medicine*, **10**, 5–13.

Cha MH, Regueiro M, Sandhu DS. (2020) Gastrointestinal and hepatic manifestations of COVID-19: A comprehensive review. *World J Gastroenterol.*; **26**(19):2323-2332.

Cooper, J. R., Abdullatif, M. B., Burnett, E. C., Kempself, K. E., Conforti, F., Tolley, H., ... & Davies, D. E. (2016). Long term culture of the A549 cancer cell line promotes multilamellar body formation and differentiation towards an alveolar type II pneumocyte phenotype. *PLoS one*, **11**(10), e0164438.

Dobrindt K, Hoagland DA, Seah C, Kassim B, O'Shea CP, Murphy A, Iskhakova M, Fernando MB, Powell SK, Deans PJM, Javidfar B, Peter C, Møller R, Uhl SA, Garcia MF, Kimura M, Iwasawa K, Crary JF, Kotton DN, Takebe T, Huckins LM, tenOever BR, Akbarian S, Brennand KJ. (2021) Common Genetic Variation in Humans Impacts In Vitro Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection. *Stem Cell Reports.*, **16**, 505-518.

Erickson MA, Rhea EM, Knopp RC, Banks WA. (2021). Interactions of SARS-CoV-2 with the Blood-Brain Barrier. *International Journal of Molecular Science*; **22**, 2681.

Geurts, M. H., van der Vaart, J., Beumer, J., & Clevers, H. (2021). The Organoid Platform: Promises and Challenges as Tools in the Fight against COVID-19. En *Stem Cell Reports* **16** 3, 412–418.

Jensen C, Teng Y. (2020). Is it time to start Transitioning from 2D to 3D Cell Culture. *Frontiers in molecular biosciences*, **7**, 33.

Han Y, Duan X, Yang L, Nilsson-Payant BE, Wang P, Duan F, Tang X, Yaron TM, Zhang T, Uhl S, Bram Y, Richardson C, Zhu J, Zhao Z, Redmond D, Houghton S, Nguyen DT, Xu D, Wang X, Jessurun J, Borczuk A, Huang Y, Johnson JL, Liu Y, Xiang J, Wang H, Cantley LC, tenOever BR, Ho DD, Pan FC, Evans T, Chen HJ, Schwartz RE, Chen S. (2021). Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids. *Nature*, **589**, 270-275.

Hou YJ., Okuda K., Edwards CE., Randell SH., Boucher RC., Baric RS. (2020), SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell*; **182**, 429–446

Hui, K. P. Y., Ching, R. H. H., Chan, S. K. H., Nicholls, J. M., Sachs, N., Clevers, H., Peiris, J. S. M., & Chan, M. C. W. (2018). Tropism, replication competence, and innate immune responses of influenza virus: an analysis of human airway organoids and ex-vivo bronchus cultures. *The Lancet Respiratory Medicine*, **6**, 846–854.

Jacob, F., Pather, S. R., Huang, W.-K., Zhang, F., Wong, S. Z. H., Zhou, H., Cubitt, B., Fan, W., Chen, C. Z., Xu, M., Pradhan, M., Zhang, D. Y., Zheng, W., Bang, A. G., Song, H., Carlos de la Torre, J., & Ming, G.-L. (2020). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Cells and Brain Organoids Reveal SARS-CoV-2 Neurotropism Predominates in Choroid Plexus Epithelium. *Cell Stem Cell*, **27**, 937-950.e9.

Katsura, H., Sontake, V., Tata, A., Kobayashi, Y., Edwards, C. E., Heaton, B. E., Konkimalla, A., Asakura, T., Mikami, Y., Fritch, E. J., Lee, P. J., Heaton, N. S., Boucher, R. C., Randell, S. H., Baric, R. S., & Tata, P. R. (2020). Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction. *Cell Stem Cell*, **27**, 890-904.e8.

- Kaushik G, Ponnusamy MP, Batra SK. Concise Review: Current Status of Three-Dimensional Organoids as Preclinical Models. (2018) *Stem Cells*, **36**, 1329-1340.
- Kim, J.-H., Kim, J., Kim, W. J., Choi, Y. H., Yang, S.-R., & Hong, S.-H. (2020). Diesel Particulate Matter 2.5 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Upregulation of SARS-CoV-2 Receptor during Human Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoid Development. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **17**, 8410.
- Krüger, J., Groß, R., Conzelmann, C., Müller, J. A., Koepke, L., Sparrer, K. M. J., Weil, T., Schütz, D., Seufferlein, T., Barth, T. F. E., Stenger, S., Heller, S., Münch, J., & Kleger, A. (2021). Drug Inhibition of SARS-CoV-2 Replication in Human Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Organoids. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, **11**, 935–948.
- Lamb, Y. N. (2020). Remdesivir: First Approval. *Drugs*, **80**, 1355–1363.
- Leibel, S. L., McVicar, R. N., Winquist, A. M., Niles, W. D., & Snyder, E. Y. (2020). Generation of Complete Multi-Cell Type Lung Organoids From Human Embryonic and Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells for Infectious Disease Modeling and Therapeutics Validation. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, **54**, e118.
- Mills, R. J., Parker, B. L., Quaife-Ryan, G. A., Voges, H. K., Needham, E. J., Bornot, A., Ding, M., Andersson, H., Polla, M., Elliott, D. A., Drowley, L., Clausen, M., Plowright, A. T., Barrett, I. P., Wang, Q. D., James, D. E., Porrello, E. R., & Hudson, J. E. (2019). Drug Screening in Human PSC-Cardiac Organoids Identifies Pro-proliferative Compounds Acting via the Mevalonate Pathway. *Cell Stem Cell*, **24**, 895-907.e6.
- Monteil, V., Kwon, H., Prado, P., Hagelkrüys, A., Wimmer, R. A., Stahl, M., Leopoldi, A., Garreta, E., Hurtado del Pozo, C., Prosper, F., Romero, J. P., Wirnsberger, G., Zhang, H., Slutsky, A. S., Conder, R., Montserrat, N., Mirazimi, A., & Penninger, J. M. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell*, **181**, 905-913.e7.
- Orellana-Serradell O., Díaz MC., González MC., Gutiérrez M., Herrera D., Jara D, Maureira D.,
- Ruiz-Fuentes JL., Sanhueza S., Leyton L. (2020). Does Peer Reviewing for COVID-19 Related Papers still work? *Frontiers in Research Metrics and Analytics*. 5:571886.
- Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, Shamseer L, Tetzlaff JM, Akl EA, Brennan SE, Chou R, Glanville J, Grimshaw JM, Hróbjartsson A, Lalu MM, Li T, Loder EW, Mayo-Wilson E, McDonald S, McGuinness LA, Stewart LA, Thomas J, Tricco AC, Welch VA, Whiting P, Moher D. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, **372**, 71.
- Rudrapal M, Khairnar SJ, Borse LB, Jadhav AG. (2020). Coronavirus Disease-2019 (COVID-19): An Updated Review. *Drug research (Stuttgart)*, **70**, 389-400.
- Samuel, R. M., Majd, H., Richter, M. N., Ghazizadeh, Z., Zekavat, S. M., Navickas, A., Ramirez, J. T., Asgharian, H., Simoneau, C. R., Bonser, L. R., Koh, K. D., Garcia-Knight, M., Tassetto, M., Sunshine, S., Farahvashi, S., Kalantari, A., Liu, W., Andino, R., Zhao, H., ... Fattahi, F. (2020). Androgen Signaling Regulates SARS-CoV-2 Receptor Levels and Is Associated with Severe COVID-19 Symptoms in Men. *Cell Stem Cell*, **27**, 876-889.e12.
- SCImago, (2021). SJR — SCImago Journal & Country Rank. Accedido en <http://www.scimagojr.com> en septiembre de 2021
- SeyedAlinaghi, S., Mehrtak, M., MohsseniPour, M. et al. (2021). Genetic susceptibility of COVID-19: a systematic review of current evidence. *European Journal of Medical Research*, **26**, 46.
- Sharma AK, Balyan P. (2020) Air pollution and COVID-19: Is the connect worth its weight? *Indian Journal of Public Health*.;64(Supplement):S132-S134.
- Wang, C., Zhang, M., Garcia, G. J., Tian, E., Cui, Q., Chen, X., Sun, G., Wang, J., Arumugaswami, V., & Shi, Y. (2021). ApoE-Isoform-Dependent SARS-CoV-2 Neurotropism and Cellular Response. *Cell Stem Cell*, **28**, 331-342.e5.
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **10**, 587269.
- Weinberger, Steven E., Barbara A. Cockrill, and Jess Mandel. Principles of Pulmonary Medicine E-Book. Elsevier Health Sciences, 2017.
- Wong SH, Lui RN, Sung JJ. (2020). Covid-19 and the digestive system. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **35**, 744-748.
- World Health Organization. (2020). *Timeline of WHO's response to COVID-19*. Timeline: WHO's COVID-19 response.
- Worldometer. (2022). *COVID Live Update*. COVID-19 Coronavirus Pandemic.
- Yang, L., Han, Y., Nilsson-Payant, B. E., Gupta, V., Wang, P., Duan, X., Tang, X., Zhu, J., Zhao, Z., Jiaffré, F., Zhang, T., Kim, T. W., Harschnitz, O., Redmond, D., Houghton, S., Liu, C., Naji, A., Cicceri, G., Guttikonda, S., ... Chen, S. (2020). A Human Pluripotent Stem Cell-based Platform to Study SARS-CoV-2 Tropism and Model Virus Infection in Human Cells and Organoids. *Cell Stem Cell*, **27**, 125-136.e7.

Xu Z, Yang J, Xin X, Liu C, Li L, Mei X, Li M (2023). Merits and challenges of iPSC-derived organoids for clinical applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **11**, 1188905.

Yelin D, Margalit I, Yahav D, Runold M, Bruchfeld J. (2021). Long COVID-19-it's not over until? *Clinical Microbiology and Infection*, **27**,506-508.

Youk J., Kim T., Evans K.V., Jeong Y-I., Hur, S.P., Kim, J.H., Yi, K., Kim, S.Y., Na, K.J., Bleazard, T., Kim, H.M., Fellows, M., Mahbubani, K.T., Saeb-Parsy, K., Kim S.Y.; Kim Y.T., Koh, G.Y., Choi, B-S., Ju, Y.S., Lee J-H (2020). Three-Dimensional Human Alveolar Stem Cell Culture Models Reveal Infection Response to SARS-CoV-2. *Cell Stem Cell* **27**, 905–919.

Yu J. (2021). Organoids: A New Model for SARS-CoV-2 Translational Research. *International Journal of Stem Cells*; **30**, 138-149.

Zhao, X., Li, C., Liu, X., Chiu, M. C., Wang, D., Wei, Y., Chu, H., Cai, J.-P., Hau-Yee Chan, I., Kak-Yuen Wong, K., Fuk-Woo Chan, J., Kai-Wang To, K., Yuen, K. Y., & Zhou, J. (2021). Human Intestinal Organoids Recapitulate Enteric Infections of Enterovirus and Coronavirus. *Stem Cell Reports*, **16**, 493–504.