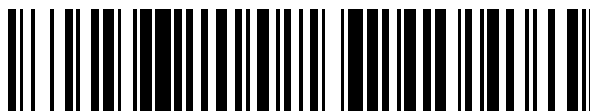


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 825 713**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2010 E 16151949 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2020 EP 3061808**

54 Título: **Medio de cultivo para células madre epiteliales y organoides que comprenden dichas células madre**

30 Prioridad:

**03.02.2009 EP 09151970**

**03.02.2009 US 149622 P**

**30.09.2009 EP 09171831**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.05.2021**

73 Titular/es:

**KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN  
WETENSCHAPPEN (100.0%)  
Kloveniersburgwal 29  
1011 JV Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**SATO, TOSHIRO;  
CLEVERS, JOHANNES, CAROLUS y  
HUCH ORTEGA, MERITXELL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 825 713 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Medio de cultivo para células madre epiteliales y organoides que comprenden dichas células madre

5 La invención se refiere a un medio de cultivo novedoso para cultivar células madre epiteliales, especialmente células madre epiteliales intestinales y de colon, y para cultivar organoides que comprenden dichas células madre. La invención se refiere adicionalmente a la descendencia de las células y los organoides que se cultivaron utilizando un medio de cultivo de la invención, y al uso de dicha descendencia en ensayos de toxicidad o en medicina regenerativa.

10 El epitelio auto-renovante del intestino delgado se ordena en criptas y vellosidades (Gregorieff y Clevers, 2005. Genes Dev. 19, 877-90). En las criptas se generan nuevas células y se pierden por apoptosis en las puntas de las vellosidades, con un tiempo de renovación epitelial resultante de 5 días en el ratón. Hace tiempo se sabe que las células madre auto-renovantes se encuentran cerca del fondo de la cripta y producen células amplificadoras del tránsito (TA) de rápida proliferación, capaces de diferenciarse hacia todos los linajes. El número estimado de células madre es de entre 4 y 6 por cripta (Bjerknes y Cheng, 1999. Gastroenterology 116, 7-14). Tres tipos de células diferenciadas, los enterocitos, las células caliciformes y las células enteroendocrinas, se forman a partir de las células TA y continúan su migración en bandas coherentes a lo largo del eje cripta-vellosidad. Cada vellosidad recibe células de múltiples criptas diferentes. El cuarto tipo de célula diferenciada principal, la célula de Paneth, se encuentra en el fondo de la cripta.

25 Recientemente se ha identificado un gen, *Lgr5*, que se expresa específicamente en un quinto tipo de célula, las células cilíndricas de la base de la cripta (CBC) en ciclo celular, que son células pequeñas que están intercaladas entre las células de Paneth (indicado mediante flechas negras en la Fig. 8b) (Barker *et al.*, 2007. Nature 449: 1003-1007). Utilizando un ratón en el que el casete de recombinasa *Cre* inducible por GFP/tamoxifeno se integró en el locus *Lgr5*, se demostró mediante rastreo de linaje que las células CBC *Lgr5*<sup>+</sup> constituyen células madre multipotentes que generan todos los tipos de células del epitelio incluso cuando se evaluaron 14 meses después de la inducción de *Cre*.

30 Recientemente se ha descubierto que también *Lgr6*, además *Lgr5*, pero no *Lgr4*, es un marcador único para las células madre adultas. Mientras que *Lgr5* se expresa en las células madre de cerebro, riñón, hígado, retina, estómago, intestino, páncreas, mama, folículo piloso, ovario, médula adrenal y piel, *Lgr6* se expresa en las células madre de cerebro, pulmón, mama, folículo piloso y piel.

35 En general se cree que es necesario un contacto íntimo entre las células madre epiteliales y los fibroblastos subepiteliales para anclar y sostener las células madre epiteliales y para proporcionar la orientación correcta necesaria para generar una estructura tridimensional adecuadamente polarizada.

40 Aunque se han descrito diversos sistemas de cultivo para cultivar células madre epiteliales primarias, incluidas las células madre del epitelio intestinal (Bjerknes y Cheng, 2006, Methods Enzymol. 419: 337-83), hasta la fecha no se ha establecido ningún sistema de cultivo a largo plazo que mantenga la pluripotencia de las células madre epiteliales. Además, no se conoce ningún sistema de cultivo que conserve la fisiología básica de cripta-vellosidad de las criptas que se han aislado de colon o intestino, o que conserve la fisiología básica de los fragmentos pancreáticos o fragmentos de tejido gástrico aislados.

#### 45 SUMARIO DE LA INVENCION

50 Por lo tanto, la invención proporciona un método para cultivar células madre epiteliales o un fragmento de tejido aislado que comprende dichas células madre epiteliales, el método comprendiendo:  
proporcionar una matriz extracelular;  
incubar dichas células madre epiteliales o dicho fragmento de tejido aislado que comprende dichas células madre epiteliales con la matriz extracelular; y  
cultivar las células madre epiteliales o fragmentos de tejido aislado en presencia de un medio de cultivo celular, que comprende un medio basal para células de animales o humanas al que se le añade:

55 nogina;  
entre 5 ngram/ml y 500 ngram/ml de un factor de crecimiento mitogénico seleccionado de factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de transformación alfa, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor neurotrófico derivado del cerebro y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF);  
60 y un agonista de Wnt seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 y R-espondina 4.

La invención también proporciona un método para cultivar un organoide, en el que el organoide comprende las células madre epiteliales.

65 La invención también proporciona un método para obtener un organoide pancreático cultivando células

madre epiteliales pancreáticas, o fragmentos de tejido que comprenden dichas células madre epiteliales, usando un método de la invención, en donde el paso de cultivar comprende:

- 5 - cultivar dichas células madre epiteliales pancreáticas o fragmentos de tejido que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en un primer paso en un medio que comprende Nogina como inhibidor de BMP, EGF y KGFo FGF, y R-espondina 1 como agonista de Wnt, suplementado con B27, N2, y/o N-acetilcisteína, y que opcionalmente comprende gastrina, exendina y nicotinamida, y
- 10 - posteriormente en un segundo paso en un medio que comprende EGF y KGF o FGF, y R-espondina 1 como agonista de Wnt, suplementado con B27, N2, y/o N-acetilcisteína.

La invención también proporciona un método para obtener un organoide gástrico cultivando células madre epiteliales gástricas, o fragmentos de tejido que comprenden dichas células madre epiteliales, usando un método de la invención, en donde el paso de cultivar comprende:

- 15 - cultivar dichas células madre epiteliales gástricas o fragmentos de tejido que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en un primer paso en un medio que comprende Nogina, EGF y FGF10, y R-espondina 1 y Wnt-3a como agonista de Wnt, y que comprende además B27, N2, y/o N-acetilcisteína, y
- 20 - posteriormente en un segundo paso en un medio en donde el medio es idéntico al primer medio excepto que la concentración de Wnt-3a se reduce en el segundo paso en comparación con la concentración de Wnt-3a que está presente en el primer paso.

25 La invención también proporciona un organoide de tejido tridimensional, en donde el organoide conserva la presencia de células madre epiteliales que retienen un fenotipo no diferenciado y capacidades de automantenimiento, en donde las células no epiteliales están ausentes de dicho organoide, y en donde dicho organoide puede obtenerse mediante un método de la invención.

30 La invención también proporciona una colección de más de 10 organoides de la invención.

La invención también proporciona el uso del organoide de la invención, o la colección de organoides de la invención, en una selección de descubrimiento de fármacos *in vitro* o ensayo de toxicidad.

35 La invención también proporciona el organoide de la invención, o la colección de organoides de la invención, para su uso en medicina regenerativa.

40 La invención también se refiere a un método para cultivar células madre epiteliales, fragmento de tejido epitelial aislado que comprende dichas células epiteliales, o células de adenoma, el método comprendiendo proporcionar una matriz extracelular, incubar dichas células madre epiteliales, dicho fragmento de tejido aislado que comprende dichas células madre epiteliales, o dichas células de adenoma con la matriz extracelular, cultivar las células madre epiteliales, fragmento de tejido aislado, o células de adenoma en presencia de un medio de cultivo, que comprende un medio basal para células animales o humanas al que se le añade nogina, entre 5 y 500 ngram/ml o por lo menos 5 y no más de 500 ngram/ml de un factor de crecimiento mitogénico seleccionado de factor de crecimiento epidérmico (EGF), gactor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor neurotrófico derivado del cerebro y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), y un agonista de Wnt seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 y R-espondina 4.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 Sorprendentemente, los autores de la presente invención descubrieron que un método de la invención permite el cultivo de células madre epiteliales, fragmentos aislados del intestino delgado, colon, estómago y páncreas que comprenden dichas células madre y células de adenoma, conservando al mismo tiempo la presencia de células madre que conservan un fenotipo indiferenciado y capaces de automantenimiento. Por ejemplo, las criptas aisladas que se cultivan según un método de la invención se convierten en organoides de cripta-vellosidad, que comprenden una luz central revestida de un epitelio de tipo vellosidad. El desarrollo de criptas aisladas fue alimentado por células madre que estaban presentes en las criptas. Los organoides resultantes experimentan múltiples eventos de fisión de cripta. Resultó incluso más sorprendente la observación de que un método de la invención permite el desarrollo de células madre epiteliales aisladas individuales hasta llegar a ser organoides de cripta-vellosidad en ausencia de un nicho de células madre. Los fragmentos gástricos aislados de la región pilórica del estómago se comportaban como organoides de cripta intestinal. Se selló la parte superior abierta de la unidad y la luz se rellenó con células apoptóticas. Los organoides gástricos recién formados se sometieron a eventos de gemación continuos (que recuerdan a la fisión de glándulas) manteniendo al mismo tiempo su polaridad con una luz central. Además, el cultivo de fragmentos pancreáticos dio como resultado la aparición de estructuras de tipo islote pancreático que expresan insulina y otros marcadores específicos de los islotes pancreáticos, parecidos a los islotes pancreáticos de Langerhans.

El epitelio que reviste la región pilórica del intestino delgado y grueso abarca protuberancias luminales, vellosidades, e invaginaciones, criptas. Cada célula a lo largo del eje cripta-vellosidad está polarizada, de manera que las células en la parte superior de las vellosidades intestinales, o en las posiciones superiores de las criptas colónicas, son las más diferenciadas y se pierden continuamente en la luz. La proliferación continua de las células madre que se encuentran en la base de las criptas y la proliferación masiva de células progenitoras que se encuentran en el centro de las criptas, asegura la sustitución adecuada de las células desprendidas.

Las células madre se encuentran en muchos órganos de los seres humanos y los ratones adultos. Aunque puede haber una gran variación en las características exactas de las células madre adultas en los tejidos del individuo, las células madre adultas comparten las siguientes características: conservan un fenotipo indiferenciado; sus descendientes pueden diferenciarse hacia todos los linajes presentes en el tejido pertinente; conservan capacidades de automantenimiento durante toda la vida; y son capaces de regenerar el tejido pertinente después de una lesión. Las células madre se encuentran en una ubicación especializada, el nicho de células madre, que suministra los contactos y las señales célula-célula apropiados para el mantenimiento de dicha población de células madre.

Las células madre epiteliales son capaces de formar los distintos tipos de células de las que está compuesto el epitelio. Algunos epitelios, tal como la piel o el intestino, muestran una rápida renovación celular, lo que indica que las células madre residentes deben estar proliferando continuamente. Otros epitelios, tales como el hígado o el páncreas, muestran una renovación muy lenta en condiciones normales.

Las criptas pueden aislarse del duodeno, intestino delgado y grueso, incluidos el yeyuno, íleon y colon, y la región pilórica del estómago mediante protocolos conocidos por el experto. Por ejemplo, las criptas pueden aislarse mediante la incubación de tejido aislado con agentes quelantes que liberan a las células de sus interacciones dependientes de calcio y magnesio con la membrana basal y los tipos de células del estroma. Después de lavar el tejido, la capa de células epiteliales se raspa de la submucosa con un portaobjetos de vidrio y se pica. Seguidamente, se incuba en tripsina o, más preferente, EDTA y/o EGTA y se separan los fragmentos de tejido no digeridos y las células individuales de las criptas, mediante, por ejemplo, etapas de filtración y/o centrifugación. Pueden utilizarse otras enzimas proteolíticas, tales como la colagenasa y/o la dispasa I, en lugar de la tripsina. Se utilizan métodos similares para aislar fragmentos de páncreas y estómago.

Los métodos para aislar células madre de tejido epitelial son conocidos en la técnica. Un método preferente se basa en el hecho de que las células madre expresan Lgr5 y/o Lgr6 en su superficie, que pertenecen a la gran superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR). La subfamilia Lgr es única, en cuanto a que porta un gran ectodominio rico en leucina importante para la unión del ligando. Los ligandos para Lgr5 y Lgr6 aún no se han descrito en la literatura. Por lo tanto, un método preferente comprende preparar una suspensión celular de dicho tejido epitelial, poner en contacto dicha suspensión celular con un compuesto de unión a Lgr5 y/o 6, aislar dicho compuesto de unión a Lgr5 y/o 6, y aislar las células madre de dicho compuesto de unión. Resulta preferente generar mecánicamente una sola suspensión celular que comprenda las células madre epiteliales a partir de las criptas aisladas, ya que se descubrió que en esta fase las células madre epiteliales tratadas con tripsina producían tasas de supervivencia bastante bajas.

Los compuestos de unión a Lgr5 y/o 6 preferentes comprenden anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales que reconocen y se unen específicamente al dominio extracelular de cualquiera de Lgr5 o Lgr6, tales como anticuerpos monoclonales, incluidos anticuerpos monoclonales de ratón y de rata. Mediante un anticuerpo de este tipo, pueden aislarse células madre que expresan Lgr5 y/o Lgr6, por ejemplo con la ayuda de perlas magnéticas o mediante clasificación de células activadas por fluorescencia, como queda claro para un experto.

En un método preferido de la invención, dichas células madre epiteliales se aíslan de las criptas, fragmentos gástricos o fragmentos pancreáticos. Por ejemplo, dichas células madre epiteliales se aíslan de criptas que están aisladas del intestino. Las células madre epiteliales preferidas se aíslan del intestino delgado, incluyendo el duodeno, yeyuno e íleon, páncreas y estómago.

Las células madre aisladas se cultivan preferentemente en un microambiente que imite al menos en parte un nicho celular en el que se encuentran de forma natural dichas células madre. Dicho nicho celular se imita cultivando dichas células madre en presencia de biomateriales, tales como matrices, armazones y sustratos de cultivo que representan señales reguladoras clave que controlan el destino de las células madre. Dichos biomateriales comprenden biomateriales naturales, semisintéticos y sintéticos, y/o mezclas de los mismos. Un armazón proporciona una red bidimensional o tridimensional. Los materiales sintéticos adecuados para dicho armazón comprenden polímeros seleccionados de entre sólidos porosos, nanofibras e hidrogeles tales como, por ejemplo, péptidos incluidos péptidos de autoensamblaje, hidrogeles compuestos por fosfato de polietilenglicol, fumarato de polietilenglicol, poli(acrilamida), metacrilato de polihidroxietilo, acetato de policelulosa, y/o copolímeros de los mismos (véase, por ejemplo, Saha *et al.*, 2007. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11(4): 381-387; Saha *et al.*, 2008. *Biophysical Journal* 95:4426-4438; Little *et al.*, 2008. *Chem. Rev.* 108, 1787-1796). Como sabe el experto, las

propiedades mecánicas tales como, por ejemplo, la elasticidad de los armazones, influyen en la proliferación, la diferenciación y la migración de las células madre. Un armazón biodegradable preferente comprende (co)polímeros que son sustituidos por componentes naturales después de un trasplante en un sujeto, por ejemplo, para promover la regeneración tisular y/o la cicatrización. Resulta preferente, además, que dicho armazón no induzca sustancialmente una respuesta inmunogénica tras el trasplante en un sujeto. Dicho armazón se complementa con ligandos naturales, semisintéticos o sintéticos, que proporcionan las señales necesarias para la proliferación y/o la diferenciación, y/o la migración de las células madre. En una forma de realización preferente, dichos ligandos comprenden fragmentos de aminoácidos definidos. Los ejemplos de dichos polímeros sintéticos comprenden el tensioactivo copolímero de bloque Pluronic® F127 (BASF), y Ethisorb® (Johnson and Johnson).

Un nicho celular es determinado en parte por las células madre y las células circundantes, y la matriz extracelular (ECM) que es producida por las células de dicho nicho. En un método preferente de la invención, las células madre epiteliales o las criptas aisladas, se fijan a una ECM. La ECM está compuesta por diversos polisacáridos, agua, elastina y glicoproteínas, en la que las glicoproteínas comprenden colágeno, entactina (nidógeno), fibronectina y laminina. La ECM es secretada por las células del tejido conectivo. Se conocen diferentes tipos de ECM, que comprenden diferentes composiciones que incluyen diferentes tipos de glicoproteínas y/o una combinación diferente de glicoproteínas. Dicha ECM puede proporcionarse cultivando células productoras de ECM, tales como por ejemplo fibroblastos, en un recipiente, antes de eliminar estas células y añadiendo células madre epiteliales o criptas aisladas. Son ejemplos de células productoras de matriz extracelular los condrocitos, que producen principalmente colágeno y proteoglicanos, los fibroblastos, que producen principalmente colágeno de tipo IV, laminina, procolágenos intersticiales y fibronectina, y los miofibroblastos colónicos que producen principalmente colágenos (tipo I, III y V), proteoglicano de condroitin sulfato, ácido hialurónico, fibronectina y tenascina-C. Como alternativa, dicha ECM se proporciona en el mercado. Los ejemplos de matrices extracelulares disponibles en el mercado son proteínas de matriz extracelular (Invitrogen) y Matrigel™ (BD Biosciences). El uso de una ECM para cultivar células madre mejoraba la supervivencia a largo plazo de las células madre y la continua presencia de células madre indiferenciadas. En ausencia de una ECM, los cultivos de células madre no podían cultivarse durante períodos más largos y no se observó una presencia continua de células madre indiferenciadas. Además, la presencia de una ECM permitía el cultivo de organoides de tejido tridimensionales, que no podían cultivarse en ausencia de una ECM.

Una ECM preferente para su uso en un método de la invención comprende al menos dos glicoproteínas distintas, tales como dos tipos diferentes de colágeno o un colágeno y laminina. Dicha ECM puede ser una matriz extracelular de hidrogel sintético o una ECM natural. Una ECM sumamente preferente es proporcionada por Matrigel™ (BD Biosciences), que comprende laminina, entactina y colágeno IV.

Un medio de cultivo celular que se utiliza en un método de la invención comprende cualquier medio de cultivo celular. Un medio de cultivo celular preferente es un medio sintético definido que está tamponado a un pH de 7,4 (preferentemente entre 7,2 y 7,6 o al menos 7,2 y no superior a 7,6) con un tampón a base de carbonato, mientras que las células se cultivan en una atmósfera que comprende entre un 5% y un 10% de CO<sub>2</sub>, o al menos de un 5% y no más de un 10% de CO<sub>2</sub>, preferentemente CO<sub>2</sub> al 5%. Un medio de cultivo celular preferente está seleccionado de entre DMEM/F12 y RPMI 1640 complementado con glutamina, insulina, penicilina/estreptomina y transferrina. En una forma de realización preferente adicional, se utiliza Advanced DMEM/F12 o Advanced RPMI, que está optimizado para el cultivo sin suero y ya incluye insulina. En este caso, dicho medio Advanced DMEM/F12 o Advanced RPMI se complementa preferentemente con glutamina y penicilina/estreptomina. Resulta preferente, además, que dicho medio de cultivo celular se complemente con un factor de crecimiento purificado, natural semisintético y/o sintético y no comprenda un componente indefinido tal como suero bovino fetal o suero de ternera fetal. Los complementos tales como, por ejemplo, B27 (Invitrogen), N-acetilcisteína (Sigma) y N2 (Invitrogen) estimulan la proliferación de algunas células y pueden añadirse adicionalmente al medio, de ser necesario.

Un componente que se añade al medio de cultivo basal es un inhibidor de BMP. Las BMP se unen como un ligando dimérico a un complejo receptor que consiste en dos diferentes serina/treonina quinasas receptoras, receptores de tipo I y tipo II. El receptor de tipo II fosforila el receptor de tipo I, que da como resultado la activación de esta quinasa receptora. El receptor de tipo I fosforila posteriormente sustratos de receptor específicos (SMAD), lo que da como resultado una vía de transducción de señales que conduce a la actividad transcripcional.

Dicho inhibidor de BMP se define como un agente que se une a una molécula de BMP para formar un complejo en el que la actividad de BMP queda neutralizada, por ejemplo evitando o inhibiendo la unión de la molécula de BMP a un receptor de BMP. Como alternativa, dicho inhibidor es un agente que funciona como antagonista o agonista inverso. Este tipo de inhibidor se une con un receptor de BMP y evita la unión de una BMP a dicho receptor. Un ejemplo de un último agente es un anticuerpo que se une a un receptor de BMP y evita la unión de BMP al receptor unido al anticuerpo.

Dicho inhibidor de BMP inhibe una actividad dependiente de BMP en una célula hasta a lo sumo un 90%, más preferentemente a lo sumo un 80%, más preferentemente a lo sumo un 70%, más preferentemente a lo sumo un 50%, más preferentemente a lo sumo un 30%, más preferente a lo sumo un 10%, más preferentemente un 0%,

con respecto a un nivel de una actividad de BMP en ausencia de dicho inhibidor. Como sabe el experto, una actividad de BMP puede determinarse midiendo la actividad transcripcional de BMP, por ejemplo como se ejemplifica en Zilberberg *et al.*, 2007. BMC Cell Biol. 8:41.

5 Se conocen varias clases de proteínas naturales de unión a BMP, incluidas nogina (Peprotech), cordina y proteínas de tipo cordina (R&D Sytems) que comprenden dominios cordina, folistatina y proteínas relacionadas con folistatina (R&D Sytems) que comprenden un dominio folistatina, DAN y proteínas de tipo DAN (R&D Sytems) que comprenden un dominio con nudo de cisteínas de DAN, esclerostina/SOST (R&D Sytems), decorina (R&D Sytems), y alfa-2 macroglobulina (R&D Systems).

10 Un inhibidor de BMP preferente para su uso en un método de la invención está seleccionado de entre nogina, DAN y proteínas de tipo DAN incluidas Cerberus y Gremlin (R&D Sytems). Estas proteínas difusibles son capaces de unirse a un ligando BMP con diferentes grados de afinidad e inhibir su acceso a los receptores de señalización. La adición de cualquiera de estos inhibidores de BMP al medio de cultivo basal evita la pérdida de células madre, que de lo contrario se produce después de aproximadamente 2-3 semanas de cultivo.

15 Un inhibidor de BMP sumamente preferente es nogina. La nogina se añade preferentemente al medio de cultivo basal a una concentración de al menos 10 ng/ml, más preferente al menos 20 ng/ml, más preferente al menos 50 ng/ml, más preferente al menos 100 ng/ml. Una concentración sumamente preferente es aproximadamente 100 ng/ml ó 100 ng/ml. Durante el cultivo de células madre, dicho inhibidor de BMP se añade preferentemente al medio de cultivo cada dos días, mientras que el medio de cultivo se renueva preferentemente cada cuatro días.

20 Un componente adicional que se añade al medio de cultivo basal es un agonista de Wnt. La vía de señalización Wnt se define por una serie de eventos que se producen cuando una proteína Wnt se une a un receptor de superficie celular de un miembro de la familia de receptores Frizzled. Esto da como resultado la activación de proteínas de la familia Dishevelled que inhiben un complejo de proteínas que incluye axina, GSK-3, y la proteína APC para degradar la  $\beta$ -catenina intracelular. La  $\beta$ -catenina nuclear enriquecida resultante potencia la transcripción por los factores de transcripción de la familia TCF/LEF.

25 Un agonista de Wnt se define como un agente que activa la transcripción mediada por TCF/LEF en una célula. Por lo tanto, los agonistas de Wnt se seleccionan de entre verdaderos agonistas de Wnt que se unen y activan un miembro de la familia de receptores Frizzled incluida todas y cada una de las proteínas de la familia Wnt, un inhibidor de la degradación de la  $\beta$ -catenina intracelular, y activadores de TCF/LEF. Dicho agonista de Wnt estimula una actividad de Wnt en una célula en al menos un 10%, más preferentemente al menos un 20%, más preferentemente al menos un 30%, más preferentemente al menos un 50%, más preferentemente al menos un 70%, más preferentemente al menos un 90%, más preferente al menos el 100%, con respecto a un nivel de dicha actividad de Wnt en ausencia de dicha molécula. Como sabe el experto, una actividad de Wnt puede determinarse midiendo la actividad transcripcional de Wnt, por ejemplo, mediante los constructos indicadores Tcf-luciferasa pTOPFLASH y pFOPFLASH (Korinek *et al.*, 1997. Science 275:1784-1787).

30 Un agonista de Wnt comprende una glicoproteína secretada, incluidas Wnt-1/Int-1; Wnt-2/Irp (proteína relacionada con Int-1); Wnt-2b/13; Wnt-3/Int-4; Wnt-3a (R&D Sytems); Wnt-4; Wnt-5a; Wnt-5b; Wnt-6 (Kirikoshi H. *et al.* 2001. Biochem. Biophys. Res. Com. 283: 798-805); Wnt-7a (R&D Sytems); Wnt-7b; Wnt-8a/8d; Wnt-8b; Wnt-9a/14; Wnt-9b/14b/15; Wnt-10a; Wnt-10b/12; Wnt-11; y Wnt 16. Se proporciona una visión de conjunto de las proteínas Wnt humanas en "THE WNT FAMILY OF SECRETED PROTEINS", R&D Systems Catalog, 2004. Los agonistas de Wnt adicionales incluyen la familia de proteínas secretadas R-espondina, que está implicada en la activación y regulación de la vía de señalización Wnt y que está compuesta por 4 miembros (R-espondina 1 (NU206, Nuvelo, San Carlos, CA), R-espondina 2 ((R&D Sytems), R-espondina 3, y R-espondina-4); y norrina (también denominada proteína de la enfermedad de Norrie o NDP) (R&D Sytems), que es una proteína reguladora secretada que funciona como una proteína Wnt en cuanto a que se une con alta afinidad al receptor Frizzled-4 e induce la activación de la vía de señalización Wnt (Kestutis Planutis *et al.* (2007) BMC Cell Biol. 8: 12). Recientemente se ha identificado un agonista de molécula pequeña de la vía de señalización Wnt, un derivado de aminopirimidina, y también se incluye expresamente como agonista de Wnt (Liu *et al.* (2005) Angew Chem. Int. Ed. Engl. 44, 1987-90).

35 Los inhibidores de GSK conocidos comprenden ARN pequeños de interferencia (ARNip; Cell Signaling), litio (Sigma), kenpaullona (Biomol International; Leost, M. *et al.* (2000) Eur. J. Biochem. 267, 5983-5994), 6-bromoindirubin-30-acetoxima (Meijer, L. *et al.* (2003) Chem. Biol. 10, 1255-1266), SB 216763 y SB 415286 (Sigma-Aldrich), y miembros de la familia FRAT y péptidos derivados de FRAT que impiden la interacción de GSK-3 con la axina. Se proporciona una visión de conjunto en Meijer *et al.*, (2004) Trends in Pharmacological Sciences 25, 471-480, que se incorpora en el presente documento por referencia. El experto conoce métodos y ensayos para determinar un nivel de inhibición de GSK-3 y comprenden, por ejemplo, los métodos y el ensayo que se describen en Liao *et al.* 2004, Endocrinology, 145(6): 2941-9).

40 El agonista de Wnt es R-espondina 1-4. Los inventores descubrieron que la adición de por lo menos un agonista de Wnt al medio de cultivo basal es esencial para la proliferación de las células madre epiteliales o criptas

aisladas.

En una forma de realización preferente adicional, dicho agonista de Wnt comprende o consiste en R-espondina 1. La R-espondina 1 se añade preferentemente al medio de cultivo basal a una concentración de al menos 50 ng/ml, más preferente al menos 100 ng/ml, más preferente al menos 200 ng/ml, más preferente al menos 300 ng/ml, más preferente al menos 500 ng/ml. Una concentración sumamente preferente de R-espondina 1 es aproximadamente 500 ng/ml ó 500 ng/ml. Durante el cultivo de las células madre, dicho miembro de la familia Wnt se añade preferentemente al medio de cultivo cada dos días, mientras que el medio de cultivo se renueva preferentemente cada cuatro días.

Más preferiblemente se usan tanto R-espondina como Wnt-3a como agonista de Wnt. Esta combinación es se prefiere particularmente ya que esta combinación tiene sorprendentemente un efecto sinérgico sobre la formación de organoides. Las concentraciones preferidas son aproximadamente 500 ng/ml/ o 500 ng/ml para R-espondina y aproximadamente 100 ng/ml ó 100 ng/ml para Wnt3a.

Otro componente adicional que se añade al medio de cultivo basal es un factor de crecimiento mitogénico seleccionado de una familia de factores de crecimiento que comprenden el factor de crecimiento epidérmico (EGF; Peptrotech), el factor de crecimiento de transformación alfa (TGF-alfa; Peptrotech), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; Peptrotech), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; R&D Systems) y el factor de crecimiento queratinocítico (KGF; Peptrotech). EGF es un potente factor mitogénico para diversas células ectodérmicas y mesodérmicas cultivadas y tiene un profundo efecto en la diferenciación de células específicas *in vivo* e *in vitro* y de algunos fibroblastos en cultivo celular. El precursor de EGF existe en forma de molécula unida a la membrana que se escinde proteolíticamente para generar la hormona peptídica de 53 aminoácidos que estimula las células. Un factor de crecimiento mitogénico preferente es EGF. EGF se añade preferentemente al medio de cultivo basal a una concentración de entre 5 ng/ml y 500 ng/ml o de al menos 5 ng/ml y no superior a 500 ng/ml. Una concentración preferente es al menos 10, 20, 25, 30, 40, 45 ó 50 ng/ml y no superior a 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150 ó 100 ng/ml. Una concentración más preferente es al menos 50 ng/ml y no superior a 100 ng/ml. Una concentración incluso más preferente es aproximadamente 50 ng/ml ó 50 ng/ml. Podrían utilizarse las mismas concentraciones para un FGF, preferentemente para FGF10 o FGF7. Si se utiliza más de un FGF, por ejemplo FGF7 y FGF10, la concentración de un FGF es como se ha definido anteriormente y se refiere a la concentración total de FGF utilizado. Durante el cultivo de las células madre, dicho factor de crecimiento mitogénico se añade preferentemente al medio de cultivo cada dos días, mientras que el medio de cultivo se renueva preferentemente cada cuatro días. Puede utilizarse cualquier miembro de la familia bFGF. Preferentemente, se utiliza FGF7 y/o FGF10. FGF7 también se conoce como KGF (factor de crecimiento queratinocítico). En una forma de realización preferente adicional, se añade al medio de cultivo basal una combinación de factores de crecimiento mitogénicos tal como, por ejemplo, EGF y KGF, o EGF y BDNF. En una forma de realización preferente adicional, se añade al medio de cultivo basal una combinación de factores de crecimiento mitogénicos tal como, por ejemplo, EGF y KGF, o EGF y FGF10.

Una forma de realización adicional de un método según la invención comprende un medio de cultivo que comprende un inhibidor de Rock (Rho-quinasa). Se descubrió que la adición de un inhibidor de Rock evitaba la anoikis, especialmente cuando se cultivaban células madre individuales. Dicho inhibidor de Rock está seleccionado preferentemente de entre diclorhidrato de (R)-(+)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida, monohidratado (Y-27632; Sigma-Aldrich), 5-(1,4-diazepan-1-il-sulfonil)isoquinolina (Fasudil o HA1077; Cayman Chemical), y diclorhidrato de (S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil]-hexahidro-1H-1,4-diazepina (H-1152; Tocris Bioscience). Dicho inhibidor de la Rho-quinasa, por ejemplo Y-27632, se añade preferentemente al medio de cultivo cada dos días durante los siete primeros días de cultivo de dichas células madre. Una concentración preferente para Y27632 es 10  $\mu$ M.

En otra forma de realización adicional, un método según la invención comprende un medio de cultivo que comprende adicionalmente un agonista de Notch. La señalización de Notch ha demostrado desempeñar un papel importante en la determinación del destino celular, así como en la supervivencia y proliferación celular. Las proteínas receptoras Notch pueden interactuar con varios ligandos unidos a la superficie o secretados, incluidos pero no limitados a Delta 1, Jagged 1 y 2, y similar a Delta 1, similar a Delta 3, similar a Delta 4. Tras la unión del ligando, los receptores Notch se activan por eventos de escisión en serie que implican a miembros de la familia de proteasas ADAM, así como una escisión intramembranosa regulada por la presinilina gamma secretasa. El resultado es una translocación del dominio intracelular de Notch al núcleo, donde activa la transcripción de los genes aguas abajo. Un agonista de Notch preferente está seleccionado de entre Jagged 1 y Delta 1, o un derivado o fragmento activo de los mismos. Un agonista de Notch sumamente preferente es el péptido DSL (Dontu *et al.*, Breast Cancer Res. 6: R605-R615), con la secuencia CDDYYYGFGCNKFCRPR. Dicho péptido DSL (Ana Spec) se utiliza preferentemente a una concentración entre 10  $\mu$ M y 100 nM o al menos 10  $\mu$ M y no superior a 100 nM. La adición de un agonista de Notch, especialmente durante la primera semana de cultivo, aumenta la eficacia del cultivo por un factor de 2-3. Dicho agonista de Notch se añade preferentemente al medio de cultivo cada dos días durante los siete primeros días de cultivo de dichas células madre.

Un agonista de Notch se define como una molécula que estimula una actividad de Notch en una célula en al menos un 10%, más preferentemente al menos un 20%, más preferentemente al menos un 30%, más preferentemente al menos un 50%, más preferentemente al menos un 70%, más preferentemente al menos un 90%, más preferentemente al menos el 100%, con respecto a un nivel de una actividad de Notch en ausencia de dicha molécula. Como sabe el experto, una actividad de Notch puede determinarse midiendo la actividad transcripcional de Notch, por ejemplo, mediante un constructo indicador 4xwtCBF1-luciferasa como se ha descrito (Hsieh *et al.*, 1996. Mol. Cell. Biol. 16, 952-959).

La descripción proporciona adicionalmente un medio de cultivo celular, que comprende un medio basal para células de animales o humanas al que se añade un inhibidor de la proteína morfogenética ósea (BMP), un agonista de Wnt; y entre 5 y 500 nanogramos/ml o al menos 5 nanogramos/ml y no más de 500 nanogramos/ml de un factor de crecimiento mitogénico seleccionado del grupo que consiste en EGF, TGF $\alpha$ , KGF, FGF10 y un FGF. Preferentemente, un factor mitogénico está seleccionado de los grupos que consisten en EGF, TGF- $\alpha$  y KGF o en EGF, TGF-D y FGF7 o en EGF, TGF- $\alpha$  y FGF o en EGF y KGF o en EGF y FGF7 o en EGF y un TGF $\alpha$  y KGF o en TGF $\alpha$  y FGF7 o en TGF $\alpha$  y un FGF. EGF puede sustituirse por TGF $\alpha$ . Más adelante se identifican varios medios de cultivo preferentes en función del organoide a obtener. Un medio de cultivo celular según la invención permite la supervivencia y/o proliferación y/o diferenciación de las células madre epiteliales o criptas aisladas en una matriz extracelular. La expresión "medio de cultivo celular" es sinónimo de "medio", "medio de cultivo" o "medio celular".

En un método preferido de acuerdo con la invención, un primer medio de cultivo comprende nogina como inhibidor de BMP, tanto factor de crecimiento epidérmico como factor de crecimiento de queratinocitos como factores de crecimiento mitogénico, R-espondina 1 como agonista de Wnt, suplementado con B27, N2, y N-acetilcisteína. El KGF podría reemplazarse por un FGF, o por FGF10. También pueden añadirse al primer medio [Leu15]-Gastrina I, Exendina y/o Nicotinamida.

En otra realización preferida, dicho medio de cultivo, denominado un segundo medio de cultivo es idéntico a dicho primer medio excepto que no hay nogina y preferiblemente no [Leu15]-Gastrina I, Exendina y/o Nicotinamida. Dicho segundo medio de cultivo comprende por lo tanto tanto factor de crecimiento epidérmico como factor de crecimiento de queratinocitos como factores de crecimiento mitogénico, y R-espondina 1 como agonista de Wnt, suplementado con B27, N2, y N-acetilcisteína. El KGF podría reemplazarse por un FGF, o por FGF10..

Estos dos medios de cultivo celular soportan fragmentos pancreáticos que comprenden células madre pancreáticas que se cultivan en estos medios en una matriz extracelular de Matrigel para formar organoides pancreáticos que comprenden estructuras similares a islotes pancreáticos en una matriz extracelular. El segundo medio sin nogina es un medio mínimo, mientras que el primero con nogina lleva a un medio mejorado para expandir los fragmentos pancreáticos. Un medio de expansión es un medio que preferiblemente promueve la supervivencia y/o la proliferación de células durante al menos dos días de cultivo.

Se ha diseñado un tercer medio que es capaz de promover, inducir la diferenciación de células hacia un organoide pancreático en el plazo de por lo menos 5 días. Un marcador de diferenciación preferido hacia la formación de un organoide pancreático es la Neurogenina-3, cuya expresión podría detectarse mediante RT-PCR o mediante inmunohistoquímica. Se dice que un medio de diferenciación como por ejemplo un tercer o cuarto medio es funcional cuando la Neurogenina-3 podría ser detectada por RT-PCR o por inmunohistoquímica después de por lo menos cinco días de cultivo en dicho medio. Este paso de diferenciación se lleva a cabo preferiblemente después de un primer paso de expansión en un medio como el primer o segundo medio como se ha definido anteriormente. Este tercer medio es idéntico al segundo medio identificado anteriormente excepto que no hay FGF o KGF o FGF10. Este tercer medio comprende factor de crecimiento epidérmico y R-espondina 1 como agonista de Wnt, suplementado con B27, N2 y N-acetilcisteína.

Se ha diseñado un cuarto medio que es idéntico a dicho primer medio en donde dicho cuarto medio también se suplementa con [Leu15]-Gastrina I y/o Exendina. Dicho tercer medio es un medio de diferenciación mínimo, mientras que dicho cuarto medio es un medio de diferenciación mejorado. Un medio de diferenciación es un medio que preferiblemente induce o promueve una diferenciación específica de células durante por lo menos cinco días de cultivo. En el caso del organoide pancreático, la diferenciación puede medirse detectando la presencia de un marcador específico asociado con el linaje pancreático como se ha definido anteriormente en la presente. Ejemplos de otros marcadores asociados con el linaje pancreático incluyen: la secreción de insulina que es detectable por RTPCR o inmunohistoquímica después de por lo menos 7, 8, 9, 10 días de cultivo en un medio de diferenciación.

Por lo tanto, en un método preferido para obtener y/o cultivar un organoide pancreático, células madre epiteliales, fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales o células de adenoma se cultivan en un primer paso en el primer o el segundo medio, posteriormente en un segundo paso o bien en el tercer o el cuarto medio. El primer paso puede tener una duración de por lo menos dos semanas y puede ser más largo. Un primer paso puede realizarse durante más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más de 10 meses. El segundo paso puede tener una duración de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 días o más. Cada paso se lleva a cabo preferiblemente usando una matriz extracelular como se define en la presente. Las concentraciones preferidas de cada compuesto presente en cada medio ya se han definido en la presente en la descripción o en los ejemplos. En una realización preferida, si se va a usar un organoide pancreático para la medicina regenerativa, se parte de células epiteliales o de un fragmento pancreático aislado. En otra realización preferida, si se va a usar un organoide pancreático como sistema de

descubrimiento de fármacos, se parte del adenoma. Por consiguiente, un organoide pancreático obtenible mediante un método de la invención es un aspecto adicional de la invención. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención proporciona un primer, segundo, tercer, cuarto medio como se define en la presente.

5 Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se obtiene un organoide pancreático que es funcional y está vivo después de por lo menos diez meses de cultivo (ver parte experimental). La funcionalidad se caracteriza preferiblemente por la secreción de insulina. Como la cantidad final de organoides del páncreas obtenida se correlaciona con la duración del cultivo, el experto en la técnica comprende que la invención es una invención pionera y potencialmente abre nuevas posibilidades, por ejemplo, en la medicina regenerativa.

10 En consecuencia, en un método preferido para obtener y / o cultivar un organoide pancreático, células madre epiteliales, se cultivan fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales o células de adenoma en contacto con una matriz extracelular en un primer paso en un medio que comprende EGF, KGF o FGF y R-espondina 1 como agonista de Wnt, suplementado con B27, N2 y N-Acetilcisteína, posteriormente en un segundo paso en un medio que comprende EGF y R-spondina 1 como agonista de Wnt, suplementado con B27, N2 y N- acetilcisteína.

15 En un método preferente adicional según la invención, un medio de cultivo comprende nogina como inhibidor de BMP, factor de crecimiento epidérmico como factor de crecimiento mitogénico, R-espondina 1 y Wnt3a como agonista de Wnt. Este medio de cultivo celular sustenta el cultivo de criptas intestinales pequeñas aisladas en cultivos tridimensionales que comprenden Matrigel como matriz extracelular.

20 En otro método preferente adicional según la invención, un medio de cultivo comprende nogina como inhibidor de BMP, factor de crecimiento epidérmico como factor de crecimiento mitogénico, R-espondina 1 como agonista de Wnt, péptido Jagged-DSL como agonista de Notch y el inhibidor de Rho quinasa Y-27632. Este medio de cultivo celular soporta el cultivo de células madre epiteliales individuales aisladas en cultivos tridimensionales que comprenden Matrigel como matriz extracelular.

25 En un método preferido adicional de acuerdo con la invención, un medio de cultivo comprende nogina como inhibidor de BMP, factor de crecimiento epidérmico y BDNF como factores de crecimiento mitogénico, R-espondina 1 y Wnt-3a como agonistas de Wnt, suplementado con al menos uno de entre B27, N2 y N-acetilcisteína. Wnt-3a es un agonista de Wnt preferente en este método preferente. Este medio de cultivo celular sustenta el cultivo de criptas de colon aisladas en cultivos tridimensionales que comprenden Matrigel como matriz extracelular. Este medio es capaz de promover la supervivencia y/o proliferación y/o diferenciación de las células durante al menos dos días de cultivo. Puede seleccionarse un marcador de diferenciación preferente hacia la formación de una cripta de colon del siguiente grupo: fosfatasa alcalina que indica la presencia de enterocitos, Muc2 que indica la presencia de células caliciformes y neurogenina-3 o cromogranina que indican la presencia de células endocrinas. La expresión de cada uno de estos marcadores puede detectarse mediante RT-PCR o mediante inmunohistoquímica. Un medio funcional para promover la supervivencia y/o proliferación y/o diferenciación de las células para obtener una cripta de colon es tal que pueda detectarse al menos uno de los marcadores identificados después de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días de cultivo, o más tiempo. Un medio preferente comprende nogina como inhibidor de BMP, factor de crecimiento epidérmico como factor de crecimiento mitogénico, y R-espondina 1 y/o Wnt-3a como agonistas de Wnt, complementado con al menos uno de entre B27, N2 y N-acetilcisteína. Este medio se denomina "quinto medio" de la invención que representa un aspecto adicional de la invención.

30 Por lo tanto, en un método preferente para obtener y/o cultivar una cripta de colon, se cultivan células madre epiteliales, fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales o células de adenoma en un medio como se ha identificado anteriormente, preferentemente el quinto medio. Este método se lleva a cabo preferentemente utilizando una matriz extracelular como se define en el presente documento. Las concentraciones preferentes de cada compuesto presente en dicho medio ya se han definido en el presente documento en la descripción o en los ejemplos. Por consiguiente, una cripta de colon que puede obtenerse mediante un método de la invención es un aspecto adicional de la invención. En la medida del conocimiento de los solicitantes, esta es la primera vez que se había obtenido una cripta de colon que fuese funcional y estuviese viva después de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses de cultivo (véase la parte experimental). La funcionalidad se caracteriza preferentemente por la presencia de al menos uno de los marcadores que se han identificado anteriormente. La invención es una invención pionera y, potencialmente, abre nuevas posibilidades, por ejemplo, en medicina regenerativa. Por consiguiente, en un método preferente para obtener y/o cultivar una cripta de colon, se cultivan células madre epiteliales, fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales o células de adenoma en contacto con una matriz extracelular en un medio que comprende nogina, EGF, y R-espondina 1 y/o Wnt-3 como agonista de Wnt, complementado con B27, N2 y N-acetilcisteína.

35 En otro método preferido adicional de acuerdo con la invención, un medio de cultivo comprende nogina como inhibidor de BMP, factor de crecimiento epidérmico como factor de crecimiento mitógeno, R-spondina 1 como agonista de Wnt, suplementado con Wnt-3a o KGF, y comprende además B27, N2, N-acetilcisteína. Este medio se denomina sexto medio y representa por consiguiente un aspecto adicional de la invención. El KGF puede reemplazarse por un FGF o por FGF10. Este medio preferiblemente comprende nogina como inhibidor de BMP,

factor de crecimiento epidérmico y FGF10 como factor de crecimiento mitogénico, R-espondina 1 y Wnt-3a como agonista de Wnt, y además comprende B27, N2, N-acetilcisteína. Se prefiere FGF10 como FGF ya que da mejores resultados que, por ejemplo, FGF7 (figura 32). Este medio de cultivo celular soporta el cultivo de fragmentos gástricos aislados u organoide gástrico en cultivos tridimensionales que comprenden Matrigel como matriz extracelular.

Este sexto medio es un medio para expandir un fragmento gástrico. Un medio de expansión es un medio que promueve preferiblemente la supervivencia y/o la proliferación de células durante por lo menos dos días de cultivo. Se ha diseñado un medio adicional, es decir, un séptimo medio que es capaz de promover, inducir la diferenciación de las células hacia un organoide gástrico o un fragmento gástrico en el plazo de por lo menos 2 días. Este séptimo medio es idéntico al sexto medio identificado anteriormente excepto que la concentración de Wnt-3a se reduce en comparación con la presente en el sexto medio. La concentración se reduce en por lo menos un 25%, 50%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600% o más en comparación con la concentración de Wnt-3a presente en el sexto medio. Este séptimo medio comprende el factor de crecimiento epidérmico y R-espondina 1 y Wnt-3a como agonista de Wnt, nogina y FGF10 suplementados con B27, N2, N-acetilcisteína y gastrina. La gastrina se usa preferiblemente a una concentración de 1 nM.

Dicho séptimo medio es un medio de diferenciación. Un medio de diferenciación es un medio que preferiblemente induce o promueve una diferenciación específica de células durante por lo menos dos, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 días de cultivo o más. En el caso de un organoide gástrico o un fragmento gástrico, la diferenciación puede medirse detectando la presencia de un marcador específico asociado con el linaje gástrico. Ejemplos de marcadores asociados con el linaje gástrico incluyen: MUC5AC (un marcador de células de pozo), GASTRINA y/o SOMATOSTATINA (ambos, marcadores de células endocrinas). La presencia de por lo menos uno de dichos marcadores se lleva a cabo preferentemente mediante RT-PCR y / o inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. La presencia de por lo menos uno de estos marcadores es preferiblemente detectable después de al menos 6 días en las condiciones de diferenciación, más preferiblemente al menos 10 días. Se dice que un medio de diferenciación como por ejemplo un séptimo medio es funcional cuando por lo menos uno de los marcadores identificados anteriormente podría detectarse por RT-PCR o por inmunohistoquímica después de por lo menos seis días de cultivo en dicho medio. Este paso de diferenciación se lleva a cabo preferiblemente después de un primer paso de expansión en un medio como el sexto medio como se ha definido anteriormente.

Por lo tanto, en un método preferido para obtener y/o cultivar un fragmento gástrico, los fragmentos de tejido aislado de células madre epiteliales que comprenden dichas células madre epiteliales o células de adenoma se cultivan en un primer paso en el sexto medio, posteriormente en un segundo paso en el séptimo medio. Cada paso se lleva a cabo preferiblemente usando una matriz extracelular como se define en la presente. El primer paso puede tener una duración de por lo menos 3 días y puede ser más largo. Puede realizarse un primer paso durante más de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más. El segundo paso puede tener una duración de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 días o más. Las concentraciones preferidas de cada compuesto presente en cada medio ya se han definido en la presente en la descripción o en los ejemplos. Por consiguiente, un fragmento gástrico obtenible mediante un método de la invención es un aspecto adicional de la invención.

Por consiguiente, en un método preferido para obtener y/o cultivar un fragmento gástrico, se cultivan células madre epiteliales, fragmentos de tejido aislados que comprenden dichas células madre epiteliales o células de adenoma en contacto con una matriz extracelular en un primer paso en un medio que comprende nogina como inhibidor de BMP, factor de crecimiento epidérmico y FGF10 como factor de crecimiento mitogénico, R-espondina 1 y Wnt-3a como agonista de Wnt, y además comprende B27, N2, N-acetilcisteína, posteriormente en un segundo paso en un medio que comprende factor de crecimiento epidérmico y R-espondina 1 y Wnt-3a como agonista de Wnt, nogina y FGF10 suplementados con B27, N2 y N-acetilcisteína, en donde la concentración de Wnt-3 se reduce en el segundo paso en comparación con la concentración de Wnt-3a presente en el primer paso.

En otro método preferente adicional según la invención, un medio de cultivo comprende nogina como inhibidor de BMP y factor de crecimiento epidérmico como factor de crecimiento mitogénico. Este medio de cultivo celular sustenta el cultivo de fragmentos de adenoma aislados o células de adenoma individuales aisladas en cultivos tridimensionales que comprenden Matrigel como matriz extracelular.

Puede añadirse a un medio de cultivo, en el momento de la preparación, un ligando tal como por ejemplo Wnt3a. Como alternativa, un ligando se expresa en una línea celular transfectando o infectando una línea celular con un constructo de expresión adecuado que exprese dicho ligando. Se cultiva dicha línea celular y el medio de cultivo que comprende el ligando secretado se recolecta a intervalos de tiempo adecuados. Por ejemplo, las células producirán Wnt3a tan pronto como alcancen la confluencia y dejen de desarrollarse. Como control se utiliza el medio de cultivo de las células que no fueron transfectadas o infectadas con dicho constructo de expresión. El medio acondicionado se recolecta y se ensaya, por ejemplo en un ensayo en el que la expresión de luciferasa es controlada por elementos sensibles a TCF para detectar la presencia de un agonista de Wnt tal como Wnt3a (Korinek *et al.*, 1997. Science 275:1784-1787). El medio se diluye cuando se utiliza en los cultivos para regenerar tejido. Como sabe el experto, la adición de un exceso de ligando es a veces tan perjudicial para el cultivo como lo es la adición de demasiado poco ligando. Por lo tanto, la dilución real del medio acondicionado dependerá de la cantidad de ligando que se determine en el ensayo.

La invención se refiere además al uso de un medio de cultivo de acuredo con la invención para cultivar células madre epiteliales o estructuras de organoide aisladas que comprenden estas células madre en una matriz extracelular, mediante el cual dichas células madre no comprenden preferiblemente células madre embrionarias humanas. Se prefieren células madre adultas humanas. Además, las células madre epiteliales clasificadas individuales del intestino delgado, colon y estómago también son capaces de iniciar estos organoides tridimensionales en un medio de cultivo de acuerdo con la invención. La invención se refiere además al uso de un medio de cultivo de acuerdo con la invención para cultivar fragmentos pancreáticos que comprenden células madre que forman organoides pancreáticos que comprenden estructuras similares a islotes pancreáticos.

Resulta preferente que dichas células madre sean células madre epiteliales pancreáticas, estomacales, intestinales o colónicas, de manera que las células madre más preferentes son células madre de intestino delgado. Un medio de cultivo según la invención permite el establecimiento de condiciones de cultivo a largo plazo en las que las criptas individuales experimentan múltiples eventos de fisión de cripta, mientras se generan simultáneamente dominios epiteliales de tipo vellosidad en los que están presentes todos los tipos de células diferenciadas. El uso de un método de cultivo según la invención permitió periodos de cultivo de al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos diez meses.

Las criptas cultivadas experimentan cambios morfológicos drásticos después de ser llevadas a cultivo. La abertura superior de las criptas recién aisladas queda sellada y esta zona poco a poco se hincha y se llena de células apoptóticas, de manera muy parecida a cómo las células apoptóticas emergen por estrangulamiento en la punta de las vellosidades. Se descubrió que la zona de la cripta experimentaba continuos eventos de gemación que creaban criptas adicionales, un proceso que recuerda a la fisión de cripta. Las extensiones de tipo cripta comprenden todos los tipos de células epiteliales diferenciadas, incluidas células proliferantes, células de Paneth, enterocitos y células calciformes. No se identificaron miofibroblastos ni otras células no epiteliales en los organoides en ninguna fase.

La expansión de las estructuras de cripta en gemación creó organoides, que comprendían > 40 de estructuras de tipo cripta que rodeaban una luz central revestida de un epitelio de tipo vellosidad y rellenas de cuerpos de células apoptóticas. Los organoides de cripta-vellosidad comprenden una luz central revestida de un epitelio de tipo vellosidad. La luz se abre a intervalos de tiempo consecutivos para liberar el contenido en el medio. Los organoides pueden someterse a pases y mantenerse en cultivo durante al menos 6 meses sin perder las características esenciales. Los pases implican preferentemente la fragmentación manual de los organoides.

Se forma una estructura de organoide de cripta-vellosidad similar cuando se cultivan células madre epiteliales individuales. Después de aproximadamente una semana, se forman estructuras que se parecen mucho a las estructuras de organoide de cripta-vellosidad que se obtienen con las criptas intactas. El análisis histológico de estos organoides también puso de manifiesto la conservación de la arquitectura básica cripta-vellosidad, la presencia de todos los tipos de células diferenciadas, y la ausencia de elementos no epiteliales.

En un aspecto, la invención proporciona por lo tanto organoides de cripta-vellosidad, que comprenden una luz central revestida de un epitelio de tipo vellosidad que es el resultado del cultivo de células madre epiteliales o criptas aisladas en un medio de cultivo de la invención. Preferentemente, dicho organoide de cripta-vellosidad puede obtenerse utilizando un método de la invención.

En un aspecto adicional, la invención proporciona organoides pancreáticos generados u obtenibles mediante el cultivo de fragmentos pancreáticos de acuerdo con un método de la invención. Aproximadamente el 20% de los organoides pancreáticos forman una estructura de gemación 7 días después del inicio del cultivo. Los conductos pancreáticos proliferan rápidamente, al contrario que el tejido acinar, que solo crece muy lentamente. Después de pasar los organoides pancreáticos, se observan estructuras similares a islotes pancreáticos que secretan insulina que se asemejan a los islotes pancreáticos de Langerhans que están presentes en el tejido de páncreas sano. La invención proporciona además un organoide gástrico que comprende una luz central. Preferentemente, dicho organoide gástrico puede obtenerse mediante un método de la invención.

Otros factores de crecimiento que pueden añadirse a un medio de cultivo, por ejemplo para aumentar la presencia de islotes pancreáticos en los organoides o para sustentar adicionalmente el cultivo de fragmentos aislados tales como fragmentos gástricos, comprenden ciclopamina (inhibidor de Sonic-hedgehog; Tocris Bioscience), activina, GLP (péptido similar a glucagón) y su derivado (exendina 4; California Peptide Research), gastrina (Genscript), un agonista de Notch (péptido Jagged, Ana Spec), nicotinamida y un agonista de Wnt tal como Wnt-3a. Resulta interesante utilizar Wnt-3a cuando se inicia el cultivo con una sola célula.

La invención proporciona adicionalmente un grupo de organoides de cripta-vellosidad, comprendiendo cada uno más de 10, preferentemente más de 20, más preferentemente más de 40 organoides. Los organoides de cripta-vellosidad rodean una luz central revestida de un epitelio de tipo vellosidad. La luz se rellena de cuerpos de células apoptóticas. Las células en los organoides de cripta-vellosidad están polarizadas, encontrándose las células madre en la base de las estructuras. La parte superior de las estructuras de tipo cripta comprenden células apoptóticas que

se desprenden hacia la luz. Dicho grupo de organoides de cripta-vellosidad comprende preferentemente al menos un 10% de células viables, más preferente al menos un 20% de células viables, más preferente al menos un 50% de células viables, más preferente al menos un 60% de células viables, más preferente al menos un 70% de células viables, más preferente al menos un 80% de células viables, más preferente al menos un 90% de células viables. La viabilidad de las células puede evaluarse mediante tinción de Hoechst o tinción con yoduro de propidio en FACS.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de los organoides de cripta-vellosidad según la invención en un cribado para el descubrimiento de fármacos, un ensayo de toxicidad o en medicina regenerativa.

Con fines de alcanzar un alto rendimiento, dichos organoides de cripta-vellosidad se cultivan en placas de múltiples pocillos, tales como, por ejemplo, placas de 96 pocillos o placas de 384 pocillos. Se utilizan bibliotecas de moléculas para identificar una molécula que influya en dichos organoides. Las bibliotecas preferentes comprenden bibliotecas de fragmentos de anticuerpos, bibliotecas de presentación de péptidos en fagos, bibliotecas de péptidos (por ejemplo, LOPAP™, Sigma Aldrich), bibliotecas de lípidos (BioMol), bibliotecas de compuestos sintéticos (por ejemplo, LOP AC™, Sigma Aldrich) o bibliotecas de compuestos naturales (Specs, TimTec). Además, pueden utilizarse bibliotecas genéticas que induzcan o repriman la expresión de uno o más genes en la descendencia de las células de adenoma. Estas bibliotecas genéticas comprenden bibliotecas de ADNc, bibliotecas antisentido y bibliotecas de ARNip o de otros ARN no codificantes. Las células se exponen preferentemente a múltiples concentraciones de un agente de ensayo durante determinado periodo de tiempo. Al final del periodo de exposición, se evalúan los cultivos. La expresión "que influya" se utiliza para incluir cualquier cambio en una célula, incluido, pero no limitado a, una reducción, o pérdida, de la proliferación, un cambio morfológico, y la muerte celular. Dichos organoides de cripta-vellosidad también pueden utilizarse para identificar fármacos que se dirijan específicamente a las células de carcinoma epitelial, pero no a dichos organoides de cripta-vellosidad, gástricos o pancreáticos.

Dichos organoides de cripta-vellosidad, gástricos o pancreáticos pueden sustituir además el uso de líneas celulares tales como células Caco-2 en los ensayos de toxicidad de posibles nuevos fármacos o de suplementos alimenticios conocidos o novedosos.

Además, dichos organoides de cripta-vellosidad, gástricos o pancreáticos pueden usarse para cultivar un patógeno como un norovirus que actualmente carece de un modelo animal o de cultivo tisular adecuado.

Los cultivos que comprenden los organoides de cripta-vellosidad son útiles en medicina regenerativa, por ejemplo en la reparación después de la cirugía y/o después de la radiación del epitelio intestinal, en la reparación del epitelio intestinal en pacientes que padecen una enfermedad inflamatoria intestinal tal como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, y en la reparación del epitelio intestinal en pacientes que padecen el síndrome del intestino corto. Se encuentra otro uso en la reparación del epitelio intestinal en pacientes con enfermedades hereditarias del intestino delgado/colon. Los cultivos que comprenden organoides pancreáticos también son útiles en medicina regenerativa, por ejemplo como implantes después de la resección del páncreas o parte del mismo y para el tratamiento de la diabetes tal como la diabetes I y la diabetes II.

En una forma de realización alternativa, las células madre epiteliales expandidas se reprograman a destinos tisulares relacionados tales como, por ejemplo, células pancreáticas incluidas las células  $\beta$  pancreáticas, y células hepáticas. Hasta el momento, no ha sido posible regenerar las células pancreáticas ni las células madre de hígado a partir de células madre adultas. Los métodos de cultivo de la presente invención permitirán analizar los factores que transdiferencian las células madre epiteliales estrechamente relacionadas a una célula pancreática, incluida una célula  $\beta$  pancreática, y una célula hepática.

Resultará evidente para un experto que la terapia génica puede utilizarse además en un método dirigido a la reparación de tejido dañado o enfermo. Puede utilizarse, por ejemplo, un vehículo adenoviral o retroviral de introducción de genes para introducir la información genética, como ADN y/o ARN en las células madre. Un experto puede reemplazar o reparar genes concretos elegidos como diana en la terapia génica. Por ejemplo, puede insertarse un gen normal en una ubicación no específica dentro del genoma para reemplazar un gen no funcional. En otro ejemplo, puede sustituirse una secuencia génica anormal por una secuencia génica normal mediante recombinación homóloga. Como alternativa, la mutación inversa selectiva puede devolver un gen a su función normal. Un ejemplo adicional es modificar la regulación (el grado en que un gen está activado o desactivado) de un gen concreto. Preferentemente, las células madre se tratan *ex vivo* mediante un enfoque de terapia génica y se transfieren posteriormente al mamífero, preferentemente un ser humano que necesita tratamiento.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para cultivar una célula de adenoma epitelial, que comprende proporcionar una matriz extracelular, fijando una célula de adenoma epitelial a la matriz extracelular, cultivando la célula en presencia de un medio de cultivo celular, que comprende un medio basal para células de animales o humanas al que se añade un inhibidor de la proteína morfogenética ósea (BMP), y entre 5 ngram/ml y 500 ngram/ml o al menos 5 ngram/ml y no más de 500 ngram/ml de un factor de crecimiento mitogénico seleccionado de entre EGF, TGF-alfa y KGF. Puede sustituirse KGF por un FGF o FGF10.

Una célula de adenoma de colon epitelial comprende una modificación en un gen que codifica la proteína APC, lo que da como resultado una degradación menos eficaz de la  $\beta$ -catenina intracelular por un complejo de proteínas que comprende APC. Otras mutaciones comunes en los adenomas de colon comprenden mutaciones en la  $\beta$ -catenina o la axina-2. El resultado global es una señalización TCF/LEF potenciada debido a un aumento de la cantidad de  $\beta$ -catenina en el núcleo. Se descubrió que un medio de cultivo sin un agonista de Wnt era suficiente para la proliferación de las células de adenoma.

Dicha célula de adenoma puede aislarse del adenoma epitelial mediante métodos conocidos en la técnica, que comprenden el uso de agentes de disociación tal como EDTA. Como alternativa, pueden aislarse del adenoma células de adenoma positivas para Lgr5 o Lgr6 individuales utilizando un compuesto de unión a Lgr5, seguido de análisis FACS o con perlas magnéticas.

La divulgación se refiere adicionalmente a la descendencia de una célula de adenoma epitelial que se cultivó en presencia de un medio de cultivo celular, que comprende un medio basal para células de animales o humanas al que se añade un inhibidor de la proteína morfogenética ósea (BMP) y entre 5 ngram/ml y 500 ngram/ml o al menos 5 ngram/ml y no más de 500 ngram/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF). Las células de adenoma cultivadas no son capaces de desarrollar una estructura tridimensional polarizada tal como una arquitectura de tipo cripta-vellosidad. Más bien, las células de adenoma forman estructuras en forma de globo en las que las células están orientadas al azar, ya sea hacia la periferia o hacia la luz central. No hay ninguna señal de diferenciación a otros tipos de células epiteliales. Este resultado indica que la APC desempeña un papel en la organización tridimensional de la arquitectura de tipo cripta-vellosidad.

Además, la invención se refiere al uso de la descendencia de las células de adenoma para un cribado selectivo para el descubrimiento de fármacos para identificar un fármaco que influya específicamente en las células de adenoma en comparación con las células epiteliales normales expandidas que se cultivan en el mismo medio de cultivo. Con fines de alcanzar un alto rendimiento, la descendencia de las células de adenoma se cultiva en placas de múltiples pocillos tales como, por ejemplo, placas de 96 pocillos o placas de 384 pocillos. Se utilizan bibliotecas de moléculas para identificar una molécula que influya en dicha descendencia. Las bibliotecas preferentes comprenden bibliotecas de fragmentos de anticuerpos, bibliotecas de presentación de péptidos en fagos, bibliotecas de péptidos (por ejemplo, LOPAP™, Sigma Aldrich), bibliotecas de lípidos (BioMol), bibliotecas de compuestos sintéticos (por ejemplo, LOP AC™, Sigma Aldrich) o bibliotecas de compuestos naturales (Specs, TimTec). Además, pueden utilizarse bibliotecas genéticas que induzcan o repriman la expresión de uno o más genes en la descendencia de las células de adenoma. Estas bibliotecas genéticas comprenden bibliotecas de ADNc, bibliotecas antisentido y bibliotecas de ARNip o de otros ARN no codificantes. Un compuesto que influye en las células de adenoma se ensaya posteriormente, o en paralelo, para determinar si influye en las células epiteliales normales expandidas. La expresión "que influye" se utiliza para incluir cualquier cambio en una célula, incluidas una reducción, o pérdida, de la proliferación, un cambio morfológico, y la muerte celular. Dicha descendencia también puede utilizarse para identificar fármacos que se dirigen específicamente a las células de carcinoma epiteliales, en comparación con las células de adenoma epiteliales, incluida la reversión de las células de carcinoma.

Resultará evidente que dicha descendencia también puede utilizarse en un enfoque de alto rendimiento para determinar los perfiles metabólicos y la estabilidad metabólica *in vitro* de los fármacos candidatos.

La invención se refiere adicionalmente al uso de la descendencia de las células de adenoma según la invención, y de los organoides de cripta-vellosidad de la invención, en ensayos de toxicidad. Dicha descendencia y organoides de cripta-vellosidad son fáciles de cultivar y se parecen más a las células epiteliales primarias que, por ejemplo, a líneas de células epiteliales tales como Caco-2 (ATCC HTB-37), I-407 (ATCC CCL6) y XBF (ATCC CRL 8808) que se utilizan actualmente en los ensayos de toxicidad. Se prevé que los resultados de toxicidad obtenidos con cultivos de adenoma primario o con organoides de cripta-vellosidad se asemejen más a los resultados obtenidos en pacientes. Se utiliza un ensayo de toxicidad celular para determinar la citotoxicidad organoespecífica. Los compuestos que se ensayan en dicho ensayo comprenden agentes quimiopreventivos para el cáncer, productos químicos ambientales, complementos alimentarios y posibles sustancias tóxicas. Las células se exponen a múltiples concentraciones de un agente de ensayo durante determinado periodo de tiempo. Los intervalos de concentración para los agentes de ensayo en el ensayo se determinan en un ensayo preliminar utilizando una exposición de cinco días y diluciones logarítmicas a partir de la mayor concentración soluble. Al final del periodo de exposición, se evalúan los cultivos para determinar la inhibición del desarrollo. Los datos se analizan para determinar la concentración que inhibía el criterio de valoración en un 50 por ciento (TC50).

En el presente documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utiliza en su sentido no limitativo para referirse a que los elementos que siguen al verbo están incluidos, pero que los elementos que no se mencionan específicamente no quedan excluidos. Además, el verbo "consistir" puede sustituirse por "consistir esencialmente en" refiriéndose a que un producto tal como se define en el presente documento puede comprender otro(os) componente(s) adicional(es) además de los identificados específicamente, no modificando dicho(s) componente(s) adicional(es) la característica única de la invención. Además, un método

como se define en el presente documento puede comprender otra(s) etapa(s) adicional(es) además de las identificadas específicamente, no modificando dicha(s) etapa(s) adicional(es) la característica única de la invención. Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de haya más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y sólo uno de los elementos. Por lo tanto, el artículo indefinido "un" o "una" se refiere por lo general a "al menos uno/a". El término "aproximadamente" cuando se utiliza en asociación con un valor numérico (aproximadamente 10) se refiere preferentemente a que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos un 1% del valor.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos solamente, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

#### Descripción de las figuras

Figura 1. Necesidad de factores de crecimiento del cultivo de criptas.

a: Se sembraron 500 criptas con EGF (E: 0 ng/ml-50 ng/ml) y R-espondina 1 (R: 0 ng/ml-500 ng/ml) por triplicado; los organoides de cripta se contaron 7 días después de la siembra.

b: Se cultivaron 500 criptas/organoides de cripta con EGF (50 ng/ml) y R-espondina 1 (500 ng/ml) con las cantidades indicadas de nogina y, se siguieron durante 3 pases. Se contaron los organoides de cripta en cada pase. El experimento se repitió tres veces con resultados comparables.

Figura 2. Establecimiento del sistema de cultivo de las criptas intestinales.

a: Evolución temporal de una sola cripta aislada desarrollándose hasta formar un organoide. La imagen de contraste de interferencia diferencial pone de manifiesto células de Paneth que contienen gránulos en el fondo de las criptas (flechas).

b, c: Las criptas aisladas individuales forman de manera eficaz organoides de cripta. A través de una repetida fisión de cripta, las estructuras generan numerosos organoides de cripta con forma de pulpo el día 14.

d: Imagen confocal reconstruida en 3D de un solo organoide después de un cultivo de 3 semanas. Las células madre Lgr5-GFP<sup>+</sup> (gris claro) se localizan en la punta de los dominios de tipo cripta. Tinción de contraste para ADN: ToPro-3 (gris oscuro).

e: Representación esquemática de un organoide de cripta. El organoide consiste en una luz central revestida de epitelio de tipo vellosidad y varios dominios de tipo cripta circundantes. Las células gris oscuro en la punta del dominio cripta indican la posición de las células madre Lgr5<sup>+</sup>, que están presentes en cada dominio cripta. La barra de escala indica 50  $\mu$ m.

Figura 3. Análisis por conglomerados de los perfiles de expresión génica.

El análisis por conglomerados de los niveles de expresión utilizando criptas colónicas y de intestino delgado recién aisladas, así como organoides de intestino delgado mostró alto grado de similitud entre los organoides de intestino delgado y el tejido del que se derivaron, las criptas de intestino delgado. Las criptas colónicas se agrupaban en una rama separada, lo que indica un patrón de expresión génica diferente de este tejido estrechamente relacionado. Es de destacar que sólo el 1,2% de todos los genes expresados estaban significativamente enriquecidos en los organoides con respecto a las criptas de intestino delgado, mientras que - *viceversa* - el 2% estaban enriquecidos en las criptas de intestino delgado. El análisis Ingenuity Pathway sobre estos genes diferenciales puso de manifiesto la presencia específica de una firma de linfocitos en las criptas recién aisladas, mientras que no pudo identificarse ninguna vía significativa en el pequeño número de genes enriquecidos en los organoides (no mostrado). Los inventores llegaron a la conclusión de que el último grupo representa el ruido biológico, mientras que la firma de linfocitos deriva de la contaminación por células inmunitarias intraepiteliales, perdidas tras el cultivo.

Figura 4. Los organoides de cripta conservan las características básicas de las criptas-vellosidades.

a-e: El código de activación de Wnt se conserva en los dominios cripta, a: La  $\beta$ -catenina nuclear (gris oscuro, flechas) sólo se observó en los dominios cripta. Imagen de mayor resolución de la Fig. 5. Asterisco, matrigel; Lu, luz b: EphB2 (gris claro) se expresa en un gradiente en las células CBC y células TA. Advértanse las células madre Lgr5-GFP<sup>+</sup> como indica la flecha blanca, c: Células apoptóticas caspasa-3<sup>+</sup> (gris oscuro, flechas) desprendiéndose hacia la luz central revestida de enterocitos, d: 40 cromosomas en una extensión de células de un cultivo de criptas de > 3 meses de antigüedad.

e-g: Rastreo de linaje de células madre Lgr5<sup>+</sup> *in vitro*, e: Se estimularon criptas de ratones reporteros *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2/Rosa26-lacZ* mediante tamoxifeno *in vitro* durante 12 horas, y se cultivaron durante los días indicados. La tinción LacZ (gris oscuro) muestra que las células LacZ<sup>+</sup> individuales dispersadas (día 1) generaban criptas LacZ<sup>+</sup> enteras *in vitro* (día 2-14). Los recuadros muestran a mayor aumento los organoides de cripta teñidos, f: El análisis histológico muestra que un dominio cripta LacZ<sup>+</sup> entero (gris oscuro/negro) se introduce en el dominio vellosidad, g: El porcentaje de organoides de cripta con células LacZ<sup>+</sup> permaneció estable en el tiempo, lo que indica que las células Lgr5<sup>+</sup> poseen actividad de célula madre a largo plazo. Se sembraron por triplicado 500 criptas, y se contaron los organoides de cripta LacZ<sup>+</sup>. Las barras de error son la desviación típica de los triplicados. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Figura 5. Imagen de mayor resolución de la Fig. 4a, Fig. 11m y 11p.

Figura 6. No hay indicios de fibroblastos subepiteliales en los organoides de cripta.

- 5 a: La inmunotinción para la actina de músculo liso (SMA; gris oscuro, ejemplos indicados mediante flechas negras) demuestra la presencia de fibroblastos subepiteliales debajo de la capa epitelial.  
 b: La ausencia de células SMA+ en matrigel (asterisco) indica la ausencia de fibroblastos subepiteliales en el sistema de cultivo. Barra de escala: 50 µm.

10 Figura 7.

- 15 a-c: Se estimuló una cripta de un ratón reportero *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2/Rosa26-YFP* mediante tamoxifeno *in vitro* durante 12 horas, y se obtuvieron imágenes para los días indicados. Las células *Lgr5+* son de color gris claro y se indican mediante las flechas blancas. d: Se estimularon organoides de siete días de antigüedad derivados de una cripta *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2/Rosa26-YFP* mediante tamoxifeno *in vitro* durante 12 horas, y se cultivaron y se obtuvieron imágenes para los días indicados. La fluorescencia YFP (gris claro) muestra que las células YFP+ individuales dispersas (día 1) generaban múltiples descendientes *in vitro* en los siguientes cinco días. El dominio vellosidad estalló durante el día 1-1,5, seguido de la formación de nuevos dominios vellosidad (círculo blanco). Adviértase que las células YFP+ están migrando hacia el dominio vellosidad.

20 Figura 8. Las células madre *Lgr5+* clasificadas individuales generan estructuras de cripta-vellosidad enteras.

- 25 a: células *Lgr5-GFP+* preparadas a partir de un intestino *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* (parte inferior) en comparación con un compañero de camada de tipo silvestre (parte superior). Se dividieron las células *GFP+* en dos poblaciones; *GFP<sup>hi</sup>* y *GFP<sup>low</sup>*.  
 b: el análisis con microscopio confocal de una cripta recién aislada muestra *GFP<sup>hi</sup>* en células CBC (puntas de flecha negras) y *GFP<sup>low</sup>* por encima de CBC (puntas de flecha blancas).  
 c: Células *GFP<sup>hi</sup>* clasificadas.  
 d: 1.000 células *GFP<sup>hi</sup>* clasificadas (izquierda) y células *GFP<sup>low</sup>* (derecha) después de 14 días de cultivo.  
 e-f: Catorce días después de la clasificación, las células *GFP<sup>hi</sup>* individuales forman organoides de cripta, situándose las células *Lgr5-GFP+* (células de color gris claro) y las células de Paneth (flechas blancas) en el fondo de las criptas. Barra de escala: 50 µm.  
 f: Fondo de la cripta a mayor aumento.  
 e-g: Para visualizar las células proliferantes, los organoides se cultivaron con el análogo de timidina EdU (gris claro, ejemplos indicados por las flechas blancas) durante 1 hora, después de lo cual se fijaron. Adviértase que sólo los dominios cripta incorporaron EdU. Colorante de contraste: DAPI (gris oscuro).

35 Figura 9.

- 40 a: Eficacia de formación de colonias de las células individuales clasificadas en pocillos individuales. Se proporciona el promedio para 4 experimentos individuales, de los cuales en cada experimento 100 células se verificaron visualmente y, a continuación, se hizo el seguimiento del desarrollo.  
 b: Un ejemplo de una célula *GFP<sup>hi</sup>* individual desarrollándose con éxito.  
 c: Número de células por organoide individual promediado para 5 organoides en desarrollo.  
 d: Se volvió a sembrar en placas una suspensión de células individuales derivadas de un organoide-derivado-de-una-sola-célula y se cultivó durante 2 semanas.

45 Figura 10. Potencia de formación de colonias de una célula individual clasificada en un pocillo individual. Un ejemplo de una sola célula *GFP<sup>hi</sup>* desarrollándose con éxito. Las flechas apuntan a una partícula de polvo como referencia. Barra de escala: 50 µm.

50 Figura 11. Composición de los organoides derivados de células madre individuales.

- 55 a-d: imagen confocal reconstruida tridimensional para, a: villina en gris claro (ápex de los enterocitos que revisten la luz central), b: tinción Muc2 indicada mediante las flechas blancas (células caliciformes), c: lisozima en gris claro (células de Paneth), d: cromogranina A en gris claro (células enteroendocrinas). El núcleo se sometió a tinción de contraste con DAPI.  
 e-g: tinción de secciones de parafina, e: fosfatasa alcalina en negro (ápice de los enterocitos que revisten la luz central), f: PAS en gris oscuro (células caliciformes), g: lisozima en gris oscuro (células de Paneth), h: sinaptofisina en gris oscuro (células enteroendocrinas).  
 i-p: las secciones de microscopía electrónica de los organoides de cripta demuestra la presencia de enterocitos (i), células caliciformes (j), células de Paneth (k) y células enteroendocrinas (l), m/o: la imagen de una cripta a bajo aumento ilustra la ausencia de células estromales, n-o: m a mayor aumento, n: maduración del borde en cepillo hacia el compartimiento luminal del organoide, como indica la diferencia de longitud de las microvellosidades (flechas negras), p: imagen a bajo aumento del dominio vellosidad. Lu, luz del organoide de cripta rellena de cuerpos apoptóticos y revestida de enterocitos polarizados.  
 G, células caliciformes; EC, células enteroendocrinas; P, células de Paneth; asterisco, matrigel. Barra de escala: 5 µm (m, p), 1 µm (n, o).

65

Figura 12. Comparación de imágenes de microscopía electrónica entre una cripta *in vivo* y una cripta cultivada *in vitro*.

a, b: Intestino normal en la base de la cripta con el tejido conectivo subyacente (flechas). Para la comparación véanse c-g de los organoides, también obtenidas de la base de una cripta.

d: Imagen a gran aumento de la membrana apical; hay hendiduras intercelulares (flechas) entre las membranas de dos células adyacentes. Advértase el desmosoma (cabeza de flecha) seguido de una hendidura intercelular.

e: Sitio basal a gran aumento en el que la membrana de dos células adyacentes puede ir seguida de hendiduras intracelulares. Estas imágenes son comparables a "a" y "b" del intestino de un ratón normal. La causa de estas hendiduras intercelulares puede ser el choque osmótico durante la fijación con aldehído.

f-g: Todas las células que componen el organoide están en un estado saludable y carecen de grandes vacuolas u otros signos de estrés. Pueden observarse figuras de mitosis (c) y en cada célula muchos poros nucleares (f, flechas) y mitocondrias intactas. El RE y Golgi (g) pueden observarse sin indicios de hinchamiento. No hay señales de cariorexis, cariólisis ni cariopcnosis. Por lo tanto, no se observan signos de lisis celular ni apoptosis. Las células en la luz del organoide muestran las características apoptóticas esperadas que pueden observarse en el intestino de un ratón normal; f muestra otro ejemplo de una célula enteroendocrina.

Mi: células mitóticas, Lu: luz, EC: células enteroendocrinas, G: Golgi.

Figura 13. Las criptas derivadas de colon también pueden mantenerse en cultivo. Las criptas aisladas individuales derivadas de colon forman de manera eficaz organoides de cripta utilizando las mismas condiciones de cultivo que las utilizadas para las criptas de intestino delgado. A través de la fisión de cripta repetida, las estructuras generan numerosos organoides de cripta con forma de pulpo a los 14 días.

Figura 14. La adición de BDNF aumenta la eficacia del cultivo. Se cultivaron criptas de colon aisladas individuales en presencia de EGF, nogina, R-espondina y BDNF. Imágenes de los organoides de cripta de colon obtenidas los días 0, 4 y 14 después del inicio del cultivo.

Figura 15. La adición de Wnt3a aumenta adicionalmente la eficacia del cultivo de los organoides de cripta de colon. Se cultivaron criptas de colon aisladas individuales en presencia de EGF, nogina, R-espondina. El uso de medio acondicionado con Wnt3a (+Wnt3a) aumentaba la eficacia del cultivo hasta un 30% en comparación con el cultivo de los organoides de colon en un medio de control (-Wnt3a).

Figura 16. El adenoma aislado de ratones APC<sup>-/-</sup> pueden desarrollarse *in vitro*. Se disociaron adenomas aislados individuales de ratones APC<sup>-/-</sup> y se cultivaron utilizando las condiciones descritas anteriormente salvo que no se incluyó R-espondina en los medios de cultivo.

a: Los organoides de adenoma tal como se muestra aquí el día 4 se desarrollan generalmente como un quiste simple, que contiene una luz central que contiene las células apoptóticas.

b: Un organoide de adenoma a mayor aumento.

c: Se tiñó un organoide de adenoma con  $\beta$ -catenina (gris oscuro) y hematoxilina (gris claro en la luz). La capa externa del organoide consiste en células epiteliales con una tinción de  $\beta$ -catenina nuclear. La luz interior contiene células muertas que han captado hematoxilina, teñida de color gris oscuro.

d: La capa externa de las células epiteliales a mayor aumento, que muestra la  $\beta$ -catenina nuclear transparente.

Figura 17. La adición de Wnt3a aumenta la eficacia de la formación de organoides.

a: Se clasificaron células Lgr5-GFP<sup>hi</sup> y se cultivaron con o sin Wnt3a (100 ng/ml) además de la condición de cultivo de células individuales convencional (EGF, nogina, R-espondina, ligando Notch e Y-27632, como se ha descrito anteriormente para las células individuales). Estas imágenes de placas con organoides cultivados en presencia y ausencia de Wnt3a son representativas.

b: Se sembraron 100 células/pocillo y se contó el número de organoides 14 días después de la siembra. En este gráfico se representa el número de organoides/placa.

Figura 18. Modelo para la función de R-espondina 1.

La señalización Wnt/ $\beta$ -catenina se inicia tras la unión de un ligando de Wnt canónico a Frizzled y la asociación con los receptores LRP5/6. En ausencia de R-espondina 1, la señalización Wnt está limitada por la cantidad de LRP6 en la superficie celular, que se mantiene baja por la internalización mediada por DKK1/Kremen1. La R-espondina 1 potencia la señalización Wnt antagonizando el recambio de LRP6 mediado por DKK1/Kremen1, lo que da como resultado un aumento de los niveles de LRP6 en la superficie celular. Esta figura se obtuvo de PNAS 104:14700, 2007.

Figura 19. Las células de Paneth se encuentran adyacentes a las células madre Lgr5<sup>+</sup> en el intestino delgado. Se aislaron criptas del intestino delgado de ratones knock-in *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2*. Aquí se presentan ejemplos de criptas representativas. Las células GFP<sup>+</sup> son Lgr5<sup>+</sup> (gris claro, indicado mediante flechas negras) y se encuentran generalmente adyacentes a las células de Paneth (indicadas mediante \*).

Figura 20. En ausencia de células de Paneth viables, se reduce la eficacia de formación de organoides.

Se incubaron criptas aisladas con 1  $\mu$ M de Newport Green-DCF (Molecular Probe) en PBS + Pluronic 127 al

0,1% (Sigma) durante 3 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavado con PBS. Después de esto, criptas se embebieron en Matrigel y se cultivaron utilizando las condiciones normales que se han descrito anteriormente.

Figura 21. Eficacia del cultivo de organoides gástricos.

(a) GFP (flechas, que señalan las células positivas para GFP) e imagen DIC de glándulas gástricas aisladas de la región pilórica del estómago de ratones Lgr5-GFP. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Aumento 63x.

(b) Se sembraron por duplicado 100 glándulas gástricas/pocillo con EGF (E), R-espondina 1 (R), nogina (N), EGF + R-espondina 1 (ER), EGF + nogina (EN), EGF + R-espondina 1 + nogina (ERN), EGF + R-espondina 1 + nogina + Wnt3A (ERNW) o EGF + R-espondina 1 + nogina + Wnt3A + KGF (ERNWK). Se contó el número de organoides gástricos 2, 5 y 7 días más tarde. Los resultados se muestran como la media  $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes (b) se sembraron por duplicado 100 glándulas gástricas/pocillo con proteína recombinante Wnt3A (ENRWK) o medio acondicionado con Wnt3A (ENRWCMK) complementado con los otros factores de crecimiento descritos en a. Se contó el número de organoides en gemación el día 7 después de la siembra y el día 2 después del primer pase.

Figura 22. Formación de organoides gástricos *in vitro*.

(a) Glándulas gástricas aisladas que se desarrollan hasta formar organoides. Imágenes de contraste de interferencia diferencial de los días 1, 2, 5 y 7 después de la siembra. Aumento de 10x (días 1, 2, 5). Día 7 con aumento de 4x, recuadro a 10x.

(b) Se realizaron pases de los cultivos cada 4-7 días mediante disociación mecánica. Los cultivos se han desarrollado al menos durante un mes. Imágenes representativas que muestran estructuras en gemación que salen de los organoides en diferentes pases. Pase 1 (P1), pase 2 (P2) y pase 4 (P4) que representan los días 8, 11, 20, respectivamente.

Figura 23. Marcadores de glándulas gástricas.

(a) Cultivos gástricos de ratones Lgr5-lacZ. Se detectó expresión de lacZ en la gemación gástrica el día 5 después de la siembra (véase la flecha, que indica las células positivas para LacZ (gris oscuro)), lo que indica la presencia de células positivas para Lgr5. Aumento de 20x.

(b) La tinción con Ki67 (negro) muestra las células proliferantes positivas en la base de la estructura de tipo glándula.

(c) Células apoptóticas caspasa-3 (gris oscuro) presentes en el interior de la luz del organoide.

(d) Células positivas para mucina gástrica 5AC (gris oscuro) presentes en los organoides gástricos.

Lu, luz del organoide. Aumento de 20x.

Figura 24. Los conductos pancreáticos pueden formar organoides de tipo pancreático *in vitro*. Se cultivaron conductos pancreáticos recién aislados en presencia de EGF, nogina, R-espondina 1 y KGF. Imágenes de contraste de interferencia diferencial de los días 0, 4 y 14 después de la siembra.

Figura 25. Se forman estructuras de tipo islote pancreático después de aproximadamente 3 semanas de cultivo *in vitro*. Imágenes de contraste de interferencia diferencial del día 21 después de la siembra.

Figura 26.

Se inyectó a ratones Axina-LacZ vehículo solo (A) o R-espondina (B). Después de 2 días, se aisló el páncreas y se determinó la presencia de expresión de LacZ mediante tinción con X-gal. El panel central de B muestra, a mayor aumento, un conducto que muestra tinción positiva para LacZ, lo que indica la expresión de Axina-LacZ a lo largo del revestimiento del conducto pancreático. El panel de la izquierda muestra que las células del conducto pequeño en las células del conducto intercalar o centroacinar expresaban Axin2-LacZ (cuyos ejemplos se indican mediante flechas negras). Los aumentos se muestran en la esquina de cada imagen. Se realizó la ligadura del conducto pancreático en ratones de tipo silvestre. En diferentes momentos después de la PDL, se aisló el páncreas y las secciones de tejido obtenidas de la zona PDL y no PDL se tiñeron con H-E. Se muestran los aumentos para cada instante de tiempo (C). La ligadura del conducto pancreático se realizó en ratones de tipo silvestre (wt) y Axina2-LacZ. 7 días después de la PDL, se aisló el páncreas y se determinó la expresión de Axina2-LacZ mediante tinción con X-gal de las secciones de tejido fijadas (D) o fragmentos de órganos como preparaciones enteras (E). Los círculos blancos indican una porción ligada del páncreas. Expresión de Ki67 (ejemplos indicados mediante flechas) en secciones de tejido pancreático 5 días después de la PDL. Se muestran los aumentos (F). Incorporación de BrdU (ejemplos indicados mediante flechas) en el tejido pancreático 2 días después del tratamiento *in vivo* con R-espondina. Se muestran los aumentos (G). Se determinó la expresión de ARNm de Lgr5 mediante Q-PCR en tejido pancreático obtenido de ratones sometidos a PDL o una operación simulada. En el páncreas con PDL, la zona PDL y la zona no-PDL se sometieron a Q-PCR. Se muestra el aumento de la expresión de Lgr5 en comparación con la proteína de unión a la caja TATA (tbp), un gen constitutivo, (H). 13 días después de la PDL, se aisló el páncreas y se determinó la expresión de Lgr5-LacZ mediante tinción con X-gal de secciones de tejido fijadas. Los ejemplos de células teñidas se indican mediante flechas negras (I).

Figura 27.

Imágenes de fragmentos ductales pancreáticos cultivados *in vitro* en EM obtenidas en diferentes instantes de tiempo después de aislarse de un ratón de tipo silvestre (A, panel superior). Las células centroacinares no se desarrollaron durante periodos superiores a 7 días, después de lo cual se desintegraron (A, panel inferior). Los fragmentos pancreáticos se cultivaron en presencia o ausencia de EGF (50 ng/ml), R-espondina (1 µg/ml), FGF10 (100 ng/ml) o nogina (100 ng/ml). Las imágenes de los cultivos se obtuvieron 7 y 14 días después del inicio del cultivo con fragmentos pancreáticos recién aislados. Los cultivos sin EGF no sobrevivieron más de 10 días (B). Los fragmentos pancreáticos aislados de ratones Axina2-LacZ se cultivaron en ausencia o en presencia de R-espondina (1 µg/ml) durante 3 días. La tinción con X-gal mostró expresión de Axina-LacZ sensible a Wnt en las células ductales después de 3 y 14 días solamente en presencia de R-espondina (ejemplos señalados mediante flechas blancas). No se detectó tinción con X-gal en las células acinares o de los islotes (C). Se aislaron fragmentos ductales de ratones Lgr5-LacZ y se cultivaron durante 3 días en ausencia o en presencia de R-espondina. La expresión de Lgr5-LacZ, como indica la tinción con X-gal, muestra células Lgr5<sup>+</sup> en las puntas de las yemas, similar a su expresión después de la PDL (D). Tinción FACS de las células obtenidas de los fragmentos pancreáticos cultivados en presencia de un agonista de Wnt, R-espondina. Las células se tiñeron para EpCAM, un marcador celular panepitelial, y LacZ (fluoresceína-di-galactopiranosido, FDG). El porcentaje de células Lgr5<sup>+</sup> es significativamente mayor cuando los fragmentos pancreáticos se cultivan en presencia de una señal de Wnt (E).

#### Figura 28

Se aisló el páncreas de los ratones 7 días después del tratamiento PDL y las células pancreáticas se tiñeron con Ep-CAM-APC y sustrato fluorescente para LacZ (kit FluoroReporter), se clasificaron y cultivaron en EM que incluía Y-27632 10 mM y medio acondicionado con Wnt3a al 50% durante 4 días. El medio de cultivo se cambió a medio EM sin Wnt e Y-27632 después de 4 días. Se obtuvieron fotos los días indicados y se muestra un aumento de 40x.

#### Figura 29

Los organoides pancreáticos se transfirieron del EM a DM. El efecto de eliminar el FGF10 del medio de expansión, que da como resultado el DM, inducía la diferenciación a islotes. Los organoides pancreáticos se cultivaron durante 10 días en DM después de lo cual pudieron detectarse estructuras de tipo islotes *in vitro*. Se muestran las imágenes de los cultivos en presencia y ausencia de FGF10 (A) y muestra aumento de la expresión de determinados marcadores de diferenciación, Ngn3 y somatostatina tal como se mide mediante PCR. HPRT es un gen constitutivo (B). En varios instantes de tiempo después de la transferencia al DM, se evaluó la expresión de varios marcadores mediante PCR (C). El cambio de morfología de los quistes pancreáticos a estructuras de tipo células β (D) acompañaba la aparición de determinados marcadores de células β, tales como insulina y péptido C tal como se detecta mediante inmunofluorescencia (E). La presencia de R-espondina en el DM es esencial para la regeneración de las progenitoras de las células P, como indica la tinción de inmunofluorescencia positiva para Ngn3 (los ejemplos se indican mediante flechas blancas) (F).

#### Figura 30

Se aislaron en el momento fragmentos de páncreas humano y se cultivaron en EM. Se obtuvieron fotos de los cultivos en los instantes de tiempo indicados después del inicio del cultivo.

#### Figura 31

Los cultivos de criptas *in vitro* producen ligando(s) Wnt.

(A) Representación esquemática de la vía Wnt. Cuando se secretan ligandos de Wnt, pueden activar de manera autocrina o paracrina la vía de señalización Wnt. La porcupina es importante para una correcta secreción de los ligandos de Wnt. Los inhibidores IWP dan como resultado una inhibición de la secreción de los ligandos de Wnt.

(B) Organoides de ratón cultivados en condiciones normales como se indica en el ejemplo 1.

(C) La incubación de los cultivos de organoides de ratón con IWP 1 µM da como resultado la muerte celular de los cultivos de organoides.

(D) La adición de medio acondicionado con Wnt3A potencia los cultivos de organoides de ratón.

(E) La muerte de los organoides inducida por IWP se rescata añadiendo medio acondicionado con Wnt3A.

Se muestra un aumento de 10x (B-E).

#### Figura 32

Establecimiento del cultivo de criptas intestinales humanas

Organoides humanos cultivados a partir de intestino delgado (A-D) y colon (E-H) después de 3 (A, C, E, G) y 5 (B, D, F, H) días en medio complementado con EGF, nogina y R-espondina con (A, B, E, F) y sin (C, D, G, H) medio acondicionado con Wnt3A.

#### Figura 33. Establecimiento del cultivo de organoides gástricos

- 5 (A) Se sembró un total de 100 glándulas gástricas/pocillo, por duplicado, con EGF (E); R-espondina 1 (R); nogina (N); EGF + R-espondina 1 (ER); EGF + nogina (EN); EGF + R-espondina 1 + nogina (ERN); EGF + R-espondina 1 + nogina + Wnt3A (ERNW); EGF + R-espondina 1 + nogina + Wnt3A + FGF10 (ERNWF); EGF + R-espondina 1 + nogina + medio condicionado de control + FGF10 (ERNCCMF) o EGF + R-espondina 1 + nogina + medio acondicionado con Wnt3A + FGF10 (ERNWCMF). Se contó el número de organoides gástricos 2, 5 y 7 días más tarde. Los resultados se muestran como la media  $\pm$ EEM de 2 experimentos independientes.
- 10 (B) Se sembró un total de 100 glándulas gástricas/pocillo, por duplicado, con medio acondicionado con Wnt3A (ENRWCM) o medio acondicionado con Wnt3A complementados con FGF10 (ENRWCMF). Se contó el número de organoides en gemación después de 7, 15 (pase 2) y 60 días (pase 10) en cultivo.
- 15 (C) Se sembró un total de 100 glándulas gástricas/pocillo en medio acondicionado con Wnt3A (WCM) + EGF + nogina y R-espondina complementado con cualquiera de FGF7/KGF (K) o FGF10 (F). Se ensayaron tanto 100 ng/ml como 1.000 ng/ml. Se contó el número de organoides en gemación después de 4 días (pase 7) en cultivo. Se ha mostrado un experimento representativo.
- 20 (D) Glándulas gástricas aisladas convirtiéndose en organoides. Imágenes de contraste de interferencia diferencial de los días 1, 2, 3, 4, 7 después de la siembra. Después de una semana, los cultivos necesitaron una división 1:5 ó 1:6. El subcultivo y mantenimiento se realizaron como se describe en la sección complementaria de materiales y métodos. Imágenes representativas de los cultivos después de 15 días, 3 meses, 4,5 y 6 meses en cultivo; (aumento de 10x).
- (E) Ejemplo de un cultivo de 5 días de antigüedad, desarrollado en medio acondicionado de control. Adviértase que el cultivo no se está desarrollando y no ha podido formar dominios de glándula. En estas condiciones el cultivo no sobrevivió más de 7 días.
- (F) Tinción con E-cadherina de preparaciones enteras en un organoide gástrico de 3 meses de antigüedad.

25 **Figura 34. Las células Lgr5+ve Individuales construyen organoides gástricos duraderos *in vitro***

- 30 (A) Análisis confocal de una unidad gástrica pilórica recién aislada del estómago de un ratón Lgr5-EGFP-ires-CreERT2. Las flechas muestran distintas poblaciones GFPhi (gris), GFPlo (negro) y GFP-ve (blanco).
- (B) Las células Lgr5-EGFP+ve se distinguen de las poblaciones GFPlo y GFP-ve según su nivel de expresión de GFP. FSC, dispersión frontal.
- (C) Ejemplo representativo de un organoide en desarrollo procedente de una sola célula Lgr5+ve. Flechas que muestran la formación de yemas de dominio de tipo glándula el día 7. Aumentos originales: días 1-4; aumento de 40x, días 5-6; aumento de 20x, días 7-8; aumento de 10x y día 9; aumento de 5x.
- 35 (D) Los organoides derivados de una sola célula Lgr5+ve se han disociado y se dividen cada 5-7 días. Imágenes representativas de un cultivo de 3 meses de antigüedad. Aumentos originales: panel de la izquierda; aumento de 4x, panel de la derecha; aumento de 10x.
- (E) Análisis confocal de células que expresan Lgr5 EGFP en un cultivo gástrico de 14 días de antigüedad desarrollado a partir de una sola célula GFPhi. Adviértase que las células Lgr5-GFP+ve se encuentran en el fondo de los dominios de glándula (flecha blanca; aumento de 10x).
- 40 (F) Organoides cultivados con el análogo de timidina EdU (rojo) durante 1,5 horas. Sólo los dominios de glándula incorporan EdU (flechas blancas; aumento de 20x). Tinción de contraste, 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI; nuclear).
- (G) Se estimuló un cultivo de 2 semanas de antigüedad procedente de un cultivo unicelular de un ratón reportero Lgr5-EGFP-ires-CreERT2/Rosa26-YFP con tamoxifeno *in vitro* durante 20 horas, y se obtuvieron imágenes los días indicados. La fluorescencia YFP (amarillo) muestra que las células amarillas individuales dispersadas (día 1,5) generan descendencia múltiple *in vitro*. Adviértase que las células YFP+ve migran hacia la luz central (círculo punteado blanco).
- 45 (H) Análisis de la expresión de genes específicos del gástrico de cultivos de 2 meses de antigüedad derivados de células individuales Lgr5+ve. Cultivos mantenidos en medio con alta concentración (panel de la izquierda) o con baja concentración (panel central) de Wnt3A. Adviértase que los cultivos derivados del gástrico son negativos para los genes específicos de intestino (panel de la derecha).
- 50 (I) Cultivos mantenidos en medio con baja concentración de Wnt3A durante al menos 10 días. Panel superior: imagen confocal de tinción ECad (rojo, organoides derivados de epitelio). Tinción de contraste, Hoescht 33345 (azul). Paneles inferiores: secciones de parafina teñidas para Tff2 (marrón, células mucosas del cuello), ácido peryódico-Schiff (rojo, células de la fosita), MUC5AC (marrón, células de la fosita) y cromogranina A (marrón, células enteroendocrinas).
- 55

Ejemplos

- 60 Ejemplo 1: Cultivo de criptas y vellosidades de intestino delgado *in vitro*

Materiales y métodos

- 65 Ratonés: Se utilizaron ratones exogámicos de 6-12 semanas de edad. La generación y el genotipado del alelo *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2*<sup>1</sup> se han descrito anteriormente<sup>1</sup>. Se obtuvieron ratones reporteros Rosa26-lacZ o

YFP Cre de Jackson Labs.

Aislamiento de criptas, disociación de células y cultivo: se liberaron las criptas del intestino delgado murino mediante incubación en EDTA 2 mM/PBS durante 30 minutos a 4°C. Las criptas aisladas se contaron y se sedimentaron. Se mezclaron 500 criptas con 50 µl de Matrigel (BD Bioscience) y se sembraron en placas de 24 pocillos. Después de la polimerización del Matrigel, se añadieron 500 µl de medio de cultivo de criptas (Advanced DMEM/F12 con factores de crecimiento (10 ng/ml-50 ng/ml de EGF (Peprotech), 500 ng/ml de R-espondina 1<sup>11</sup> y 100 ml/ng de nogina (Peprotech)). Para los experimentos de clasificación, las criptas aisladas se incubaron en medio de cultivo durante 45 minutos a 37°C, seguido de resuspensión con una pipeta de vidrio. Las células disociadas se hicieron pasar por un filtro celular de 20 µm. Las células GFP<sup>hi</sup>, GFP<sup>low</sup> o GFP se clasificaron mediante citometría de flujo (MoFlo, Dako). Las células epiteliales viables individuales se sometieron a selección mediante parámetro del ancho de pulso, dispersión lateral y dispersión frontal, y tinción negativa para yoduro de propidio. Las células clasificadas se recogieron en medio de cultivo de criptas y se embebieron en Matrigel que incluía péptido Jagged-1 (Ana Spec, 1 µM) a razón de 1 célula/pocillo (en placas de 96 pocillos, 5 µl de Matrigel). Se cubrió con medio de cultivo de criptas (250 µl para la placa de 48 pocillos, 100 µl para la placa de 96 pocillos) que incluía Y-27632 (10 µM). Se añadieron factores de crecimiento cada dos días y se cambió todo el medio cada 4 días. Para los pases, se extrajeron los organoides del Matrigel y se disociaron mecánicamente en dominios de una sola cripta, y se transfirieron a nuevo Matrigel. Se realizaron pases cada 1-2 semanas con una relación de división 1:5.

Reactivos; se adquirieron EGF recombinante murino y nogina de Peprotech. Se utilizaron R-espondina 1 recombinante humana<sup>11</sup>, Y-27632 (Sigma), 4-hidroxitamoxifeno (Sigma) y EdU (Invitrogen) para los experimentos de cultivo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos para la inmunotinción: anti-lisozima (Dako), anti-sinaptofisina (Dako), anti-BrdU (Roche), anti-β-catenina (BD Bioscience), anti-E-cadherina (BD Bioscience), anti-actina de músculo liso (Sigma), anti-EphB2 y B3 (R&D), anti-vellosidades, anti-Muc2, anti-cromogranina A (Santa Cruz), anti-caspasa-3 (Cell Signaling).

Aislamiento de criptas: se abrieron longitudinalmente los intestinos delgados aislados, y se lavaron con PBS frío. El tejido se cortó en trozos de aproximadamente 5 mM, y se lavaron adicionalmente con PBS frío. Los fragmentos de tejido se incubaron en EDTA 2 mM con PBS durante 30 minutos en hielo. Después de eliminar el medio EDTA, los fragmentos de tejido se suspendieron enérgicamente con una pipeta de 10 ml con PBS frío. El sobrenadante era la fracción de las vellosidades y se desechó; el sedimento se resuspendió con PBS. Después de una enérgica suspensión adicional y centrifugación, el sobrenadante estaba enriquecido en criptas. Esta fracción se hizo pasar por un filtro celular de 70-um (BD Bioscience) para eliminar el material de vellosidades residual. Las criptas aisladas se centrifugaron a 300 rpm durante 3 minutos para separar las criptas de las células individuales. La fracción final consistió esencialmente en criptas puras y se utilizó para el cultivo o la disociación de células individuales.

Inducción con tamoxifeno y tinción con X-gal: Para activar CreERT2, se incubaron las criptas con una dosis baja de 4-hidroxitamoxifeno (100 nM) durante 12 horas y se cultivaron en medio de cultivo de criptas. La tinción con X-gal se realizó como se ha descrito anteriormente<sup>1</sup>. No se observó tinción sin tratamiento con 4-hidroxitamoxifeno.

Análisis de microscopía electrónica: Como se ha descrito anteriormente<sup>1</sup> se fijó Matrigel que incluía los organoides de cripta en fijador de Karnovsky (paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 2,5%, Na-cacodilato 0,1 M, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7,4) durante 5 horas a temperatura ambiente. Las muestras se embebieron en resina Epon y se examinaron con un microscopio Phillips CM10 (Eindhoven, Países Bajos).

Análisis de micromatrices: Expresión génica de las criptas colónicas, criptas de intestino delgado y organoides. Se dividieron en dos partes criptas de intestino delgado recién aisladas procedentes de dos ratones. Se aisló directamente ARN de una parte (RNeasy Mini Kit, Qiagen), la otra parte se cultivó durante una semana, seguido de aislamiento del ARN. Los inventores prepararon ARNc siguiendo las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies). Se hibridó por separado ARNc con marcaje diferencial de criptas de intestino delgado y de organoides para los dos ratones en micromatrices de genoma completo de ratón de dos colores "Whole Mouse Genome, 4X44k" de Agilent (G4122F) en dos experimentos de marcaje cruzado, lo que dio como resultado cuatro matrices individuales. Además, se hibridaron criptas colónicas aisladas frente a criptas de intestino delgado con marcaje diferencial en dos experimentos de marcaje cruzado, lo que dio como resultado cuatro matrices individuales. La información sobre la señal y el ruido de fondo de la micromatriz se recuperó mediante Feature Extraction (V.9.5.3, Agilent Technologies). Todos los análisis de datos se realizaron con ArrayAssist (5.5.1, Stratagene Inc.) y Microsoft Excel (Microsoft Corporation). Las intensidades de señal sin procesar se corrigieron restando el ruido de fondo local. Los valores negativos se convirtieron en un valor positivo próximo a cero (desviación típica del ruido de fondo local) con el fin de permitir el cálculo de las relaciones entre las intensidades para características sólo presentes en un canal (criptas de intestino delgado u organoides) o (criptas de intestino delgado o criptas colónicas). La normalización se realizó aplicando un algoritmo de Lowess y se filtraron las características individuales si se cambiaban ambas intensidades (criptas de intestino delgado u organoides) o (criptas de intestino delgado o criptas colónicas) o si ambas intensidades eran inferiores a dos veces la señal del ruido de fondo. Además, se filtraron las características no uniformes. Los datos están disponibles en GEO (Gene

Expression Omnibus, número GSE 14594) tras su publicación. Se realizó un agrupamiento jerárquico no supervisado sobre las intensidades normalizadas (señal procesada en Feature Extraction) de pequeñas criptas de colon/intestino y organoides utilizando Cluster 3 (distancia: city-block, correlación: enlace promedio) y se visualizó con TreeView. Los genes se consideraron cambiados de manera significativa si estaban sistemáticamente en todas las matrices enriquecidos en más de 3 veces en los organoides o las criptas.

Análisis de las imágenes: Las imágenes de los organoides de cripta se obtuvieron con microscopía confocal (Leica, SP5), con un microscopio invertido (Nikon DM-1L) o con un microscopio estereoscópico (Leica, MZ16-FA). Para la inmunohistoquímica, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 1 hora a temperatura ambiente, y las secciones de parafina se procesaron con la técnica convencional<sup>1</sup>. La inmunohistoquímica se realizó como se ha descrito anteriormente<sup>1</sup>. Para la inmunotinción de preparaciones enteras, se aislaron organoides de cripta del matrigel utilizando dispasa (Invitrogen), y se fijaron con PFA al 4%, seguido de permeabilización con Triton-X al 0,1%. La tinción EdU se realizó siguiendo el protocolo del fabricante (Click-IT, Invitrogen). El ADN se tiñó con DAPI o ToPro-3 (Molecular Probe). Se obtuvieron imágenes en 3D con microscopía confocal (Leica, SP5) y se reconstruyeron con el software Velocity (Improvision).

## Resultados

El epitelio intestinal es el tejido que más rápidamente se autorrenueva en los mamíferos adultos. Los inventores han demostrado recientemente la presencia de aproximadamente seis células madre *Lgr5*<sup>+</sup> en ciclo celular en el fondo de las criptas del intestino delgado. Los inventores ya han establecido las condiciones de cultivo a largo plazo en las que las criptas individuales experimentan múltiples eventos de fisión de cripta, mientras se generan simultáneamente dominios epiteliales de tipo vellosidad en los que están presentes todos los tipos de células diferenciadas. Las células madre *Lgr5*<sup>+</sup> clasificadas individuales también pueden iniciar estos organoides de cripta-vellosidad. Los experimentos de rastreo indican que la jerarquía de las células madre *Lgr5*<sup>+</sup> se mantiene en los organoides. Los inventores llegaron a la conclusión de que las unidades de cripta-vellosidad intestinales son estructuras auto-organizativas, que pueden construirse a partir de una célula madre individual en ausencia de un nicho celular no epitelial.

El epitelio auto-renovante del intestino delgado se ordena en criptas y vellosidades<sup>2</sup>. En las criptas se generan nuevas células y se pierden por apoptosis en las puntas de las vellosidades, con un tiempo de renovación de 5 días en el ratón. Se sabe desde hace tiempo que las células madre auto-renovantes se encuentran cerca del fondo de la cripta y que producen las células amplificadoras del tránsito (TA) de rápida proliferación. El número estimado de células madre es de entre 4 y 6 por cripta. Los enterocitos, las células caliciformes y las células enteroendocrinas se desarrollan a partir de las células TA y continúan su migración en bandas coherentes a lo largo del eje cripta-vellosidad. El cuarto tipo de célula diferenciada principal, la célula de Paneth, se encuentra en el fondo de la cripta. Los inventores han identificado recientemente un gen, *Lgr5*, que se expresa específicamente en las células cilíndricas de la base de la cripta en ciclo celular que están intercaladas entre las células de Paneth. Utilizando un ratón en el que se integró un casete recombinasa *Cre* inducible por GFP/tamoxifeno en el locus *Lgr5*, los inventores demostraron mediante rastreo de linaje que las células *Lgr5*<sup>+</sup> constituyen células madre multipotentes que generan todos los tipos de células del epitelio<sup>1</sup>, incluso cuando se evalúan 14 meses después de la inducción con *Cre*<sup>3</sup>.

Aunque se han descrito diversos sistemas de cultivo<sup>4-7</sup>, no se ha establecido ningún sistema de cultivo a largo plazo que mantenga la fisiología básica de la cripta-vellosidad<sup>2</sup>.

Se suspendieron preparaciones de cripta de ratón en Matrigel. El desarrollo de la cripta necesitaba EGF y R-espondina 1 (Fig. 1a). Los pases pusieron de manifiesto una necesidad de nogina (Fig. 1b). Las criptas cultivadas se comportaron de manera estereotipada (Fig. 2a). La abertura superior quedó rápidamente sellada, y la luz se llenó con células apoptóticas. La zona de la cripta experimentó eventos de gemación continuos, que recuerda la fisión de cripta<sup>17</sup>. Las células de Paneth siempre estaban presentes en el lugar de la yema. Pudieron cultivarse la mayoría de las criptas (Fig. 2b). La expansión adicional creó organoides, que comprendían > 40 dominios cripta que rodeaban una luz central revestida de un epitelio de tipo vellosidad ("dominio vellosidad") (Fig. 2c-e). La tinción con E-cadherina puso de manifiesto una sola capa de células (datos no presentados). Semanalmente, los organoides se disociaban mecánicamente y se volvían a sembrar a 1/5 de la densidad de siembra previa. Los organoides se cultivaron durante > 6 meses sin perder las características que se describen más adelante. El análisis de la expresión mediante micromatriz puso de manifiesto que los organoides seguían siendo muy similares a las criptas de intestino delgado recién aisladas, en comparación, por ejemplo, con las criptas de colon frescas (Fig. 3).

El cultivo de criptas *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* puso de manifiesto células madre *Lgr5-GFP*<sup>+</sup> entremezcladas con las células de Paneth en la base de la cripta. La activación de Wnt, como lo demuestra la  $\beta$ -catenina nuclear (Fig. 4a, Fig. 5) y la expresión de los genes diana de Wnt *Lgr5* (Fig. 2d) y *EphB2*<sup>18</sup> (Fig. 4b) se limitaba a las criptas. Las células apoptóticas se desprendieron hacia la luz central, un proceso que recuerda el desprendimiento de las células apoptóticas en las puntas de las vellosidades *in vivo* (Fig. 4c). Las extensiones de cromosomas en metafase de organoides > 3 meses de antigüedad pusieron de manifiesto sistemáticamente 40 cromosomas/célula

(n = 20) (Fig. 4d). Sorprendentemente, los inventores no encontraron pruebas de la presencia de miofibroblastos u otras células no epiteliales (Fig. 6).

Los inventores cultivaron criptas de ratones *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* cruzados con el reportero *Rosa26-LacZ* activable por *Cre* para permitir el rastreo de linaje. Justo después de la inducción mediante tamoxifeno a baja dosis, los inventores observaron células marcadas individuales (Fig. 4e, g). Más del 90% de ellas generaron criptas totalmente azules (Fig. 4e-g), lo que implica que las células *Lgr5-GFP<sup>+</sup>* conservan de hecho propiedades de las células madre. Las criptas del ratón reportero *Rosa26-YFP* activable por *Cre<sup>19</sup>* permitió el rastreo de linaje mediante análisis confocal. Justo después del tratamiento con tamoxifeno, los inventores observaron células marcadas individuales que inducían el rastreo de linaje durante los siguientes días, tanto en las criptas recién aisladas (Fig. 7a-c) como en los organoides establecidos (Fig. 7d).

Recientemente, se establecieron estructuras epiteliales de glándula mamaria a partir de células madre individuales *in vitro*<sup>21</sup>. Cuando se clasificaron las células *Lgr5-GFP<sup>hi</sup>* individuales, estas murieron inmediatamente. El inhibidor de la Rho quinasa Y-27632, disminuía significativamente esta muerte celular. Se descubrió que un péptido agonista de Notch<sup>24</sup> sustentaba el mantenimiento de las criptas proliferantes<sup>23</sup>. En estas condiciones, un número significativo de células *Lgr5-GFP<sup>hi</sup>* sobrevivieron y formaron grandes organoides de cripta. Rara vez se formaron organoides cuando se sembraban células hijas *GFP<sup>low</sup>* (Fig. 8d). Múltiples células *Lgr5-Ghi* se entremezclaban con las células de Paneth en el fondo de las criptas (Fig. 8e-f). La incorporación de EdU (análogo de la timidina) puso de manifiesto células en fase S en las criptas (Fig. 8g).

Los inventores clasificaron las células hasta 1 célula/pocillo, verificaron visualmente la presencia de células individuales y siguieron el desarrollo resultante. En cada uno de los cuatro experimentos individuales, identificaron e hicieron seguimiento a 100 células individuales. En promedio, aproximadamente el 6% de las células *Lgr5-GFP<sup>hi</sup>* se multiplicaron hasta formar organoides, mientras que las células restantes murieron por lo general en las primeras 12 horas, se supone que debido al estrés físico y/o biológico intrínseco al procedimiento de aislamiento. Las células *GFP<sup>low</sup>* rara vez se multiplicaron (Fig. 9a). La Figura 9b y la Fig. 10 ilustran el desarrollo de un organoide a partir de una célula *Lgr5-GFP<sup>hi</sup>* individual. A los cuatro días de cultivo, las estructuras consistían en aproximadamente 100 células, coherente con el ciclo celular de 12 horas de las células de la cripta proliferante<sup>25</sup> (Fig. 9c). Después de dos semanas, los organoides se disociaron en células individuales y se volvieron a sembrar en placas para formar nuevos organoides (Fig. 9d). Este procedimiento podía repetirse al menos cuatro veces cada dos semanas, sin pérdida aparente de eficacia de la nueva siembra en placas.

Los organoides derivados de células madre individuales parecían indistinguibles de los derivados de las criptas enteras. Las células de Paneth y las células madre se encontraban en el fondo de las criptas (Fig. 8 e, f, Fig. 11 c, g). Los enterocitos completamente polarizados como lo demuestran los bordes en cepillo maduros villina<sup>+</sup> y la fosfatasa alcalina apical revestían la luz central (Fig. 11 a, e, i). Las células calciformes (*Muc2<sup>+</sup>*, Fig. 11b; *PAS<sup>+</sup>*, Fig. 11f) y las células enteroendocrinas (cromogranina A<sup>+</sup>, d Fig. 11; sinaptofisina<sup>+</sup>, Fig. 11h) estaban dispersas por la estructura del organoide. Se reconocieron al microscopio electrónico cuatro tipos de células maduras (Fig. 11i-l). Las células no epiteliales (del estroma/mesenquimales) estaban ausentes, una observación confirmada por imágenes de ME (Fig. 11i-p, Fig. 12 c-g). Tanto las criptas (Fig. 11m, o) como el epitelio luminal central (Fig. 11p) consistían en una sola capa de células epiteliales polarizadas que se apoyaba directamente sobre el soporte de matrigel. En la Fig. 5 se proporcionan imágenes de alta resolución de estas fotos de ME. El organoide teñido para E-cadherina en rojo y sometido a tinción de contraste con núcleos en azul, pone de manifiesto la naturaleza monocapa del epitelio del organoide (datos no presentados).

Es bien sabido que las criptas epiteliales están en contacto íntimo con los miofibroblastos subepiteliales<sup>26-28</sup> y se cree por lo general que estas últimas células crean un nicho celular especializado en el fondo de las criptas<sup>27,29,30</sup>. Un nicho de este tipo crearía un ambiente único para anclar y sustentar las células madre intestinales. Los inventores demuestran a continuación que puede establecerse un epitelio auto-renovante mediante un conjunto limitado de señales de crecimiento que se presentan de manera uniforme. A pesar de ello, las células madre aisladas generan de forma autónoma asimetría de una manera muy estereotipada. Esto conduce rápidamente a la formación de estructuras de tipo cripta, estando situadas las células de Paneth y las células madre generadas *de novo* en sus fondos y rellenas de células TA. Estas estructuras de tipo cripta suministran dominios lumbales de tipo vellosidad que consisten en enterocitos postmitóticos, donde las células apoptóticas emergen por estrangulamiento hacia la luz, lo que recuerda a la pérdida de las células en las puntas de las vellosidades. La observación paradójica de que las células individuales expuestas a un entorno uniforme promotor del desarrollo pueden generar estructuras asimétricas es particularmente evidente tras el examen detallado de la vía Wnt. Aunque todas las células se exponen a R-espondina 1, sólo las células en las criptas presentan características distintivas de una señalización Wnt activa, es decir,  $\beta$ -catenina nuclear y la expresión de genes diana de Wnt. Aparentemente, la capacidad de respuesta diferencial a la señalización Wnt más que la exposición diferencial a señales de Wnt extracelulares es el factor clave de la formación de un eje cripta-vellosidad.

En resumen, los inventores llegaron a la conclusión de que una célula madre intestinal *Lgr5<sup>+ve</sup>* individual puede actuar independientemente de las señales de posición de su entorno y que puede generar una estructura

epitelial auto-organizativa en continua expansión que recuerda la del intestino normal. El sistema de cultivo descrito simplificará el estudio de la biología de las criptas-vellosidades activadas por células madre. Además, puede abrir nuevas vías para la medicina regenerativa y la terapia génica.

5 Ejemplo 2. Cultivo de criptas y vellosidades de colon *in vitro*

Material y métodos

Medio acondicionado con Wnt3A

10 Se cultivan una línea celular que expresa el ligando Wnt3a y la misma línea celular, sin el ligando Wnt3a (medio de control) durante un periodo de 3-4 semanas. Las células producen Wnt3a tan pronto como dejan de crecer hasta la confluencia. El medio se recoge y se ensaya en el ensayo TOPflash, un ensayo de luciferasa utilizando un constructo de elementos sensibles a TCF-luc (TOP) y el mismo constructo, pero con mutaciones en los  
15 elementos sensibles a TCF (FOP). La relación entre el TOP/FOP debe ser superior a 20 para el medio que se utilizará en los cultivos. El medio se diluye al 25%-50% cuando se utiliza en los cultivos para regenerar tejido.

20 Se abrió un colon recién aislado y se lavó con PBS o DMEM, y se cortó en trozos pequeños. Los fragmentos se incubaron con EDTA 2 mM/PBS durante 1 hora a 4°C con agitación suave. Después de eliminar la solución de EDTA, los fragmentos de tejido se suspendieron enérgicamente en 10 ml de PBS frío con una pipeta de 10 ml. Se desechó el primer sobrenadante que contenía los restos y el sedimento se suspendió con 10 ml-15 ml de PBS. Después de una suspensión enérgica adicional de los fragmentos de tejido, el sobrenadante estaba enriquecido en criptas colónicas. Los fragmentos se sedimentaron y se mezclaron con matrigel, y se cultivaron como un sistema de cultivo de organoides de intestino delgado. El matrigel se incubó durante 5-10 minutos a 37°C.  
25 Después de la polimerización del matrigel, se añadieron 500 µl de medio de cultivo tisular (50% de Advanced-DMEM/F12/ 50% de medio acondicionado con Wnt-3a complementado con 200 ng/ml de N-acetilcisteína, 50 ng/ml de EGF, 1 µg/ml de R-espondina 1, 100 ng/ml de nogina, 100 ng/ml de BDNF (Peprotech). Se cambiaba todo el medio cada 2-3 días. Para el pase, los organoides se sacaron del Matrigel utilizando una pipeta de 1.000 µl y se disociaron mecánicamente en pequeños fragmentos y se transfirieron a Matrigel recién preparado. El pase se realizó  
30 con una relación de división 1:4 al menos una vez cada dos semanas. En estas condiciones, los cultivos se han mantenido durante al menos 3 meses.

Resultados

35 Los organoides colónicos se desarrollan más lentamente y con menor eficacia en comparación con los organoides de intestino delgado. Con la misma condición de factores de crecimiento que el intestino delgado, menos del 5% de las criptas colónicas aisladas de colon distal se desarrolló y formó una estructura de organoide (Fig. 13). Fue difícil desarrollar criptas colónicas a partir de la parte proximal del colon. Puesto que los inventores descubrieron una regulación positiva de trkB, el receptor de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), en el análisis de micromatrices (células Lgr5-GFP<sup>hi</sup> de colon vs. células Lgr5-GFP<sup>low</sup> de colon), determinaron el efecto de BDNF para los organoides colónicos. Los inventores observaron constantemente una eficacia del cultivo aproximadamente 2 veces mayor en el cultivo BDNF+ que en el cultivo BDNF-. Por lo general, un organoide de colon contendría aproximadamente 10 dominios cripta (Fig. 14). En consonancia con su origen, no pudieron detectarse células de Paneth. En comparación con los organoides de intestino delgado, la cripta colónica no posee células de Paneth  
40 productoras de Wnt-3a en la base de la cripta, por lo tanto, la complementación de Wnt-3 aumenta la eficacia del cultivo de las criptas colónicas, pero no la de las criptas de intestino delgado. Por lo general, los inventores obtuvieron una eficacia del cultivo de hasta un 30% cuando añadieron medio acondicionado con Wnt-3a (Fig. 15).

50 En conclusión, tanto las criptas derivadas de intestino delgado como las derivadas de colon pueden mantenerse y propagarse *in vitro* utilizando las condiciones descritas anteriormente, haciendo de este el primer método de cultivo jamás descrito que da como resultado la generación de epitelio intestinal en un sistema artificial.

Ejemplo 3. Cultivo de adenomas *in vitro*

55 Materiales y métodos

(Véase el Ejemplo 1)

Resultados

60 Los adenomas han sido históricamente difíciles de cultivar *in vitro*. Puesto que las condiciones descritas anteriormente se utilizaron para cultivar con éxito criptas saludables derivadas de intestino delgado, así como de colon, se determinó si condiciones similares podrían sustentar adenomas *in vitro*. Después del aislamiento de un adenoma de ratones APC<sup>-/-</sup> utilizando EDTA 2,5 mM, se cultivaron adenomas individuales en condiciones similares a las descritas anteriormente. Lo que es más importante, estas condiciones eran adecuadas para mantener el  
65

crecimiento de los adenomas *in vitro*, sin embargo, la R-espondina resultaba superflua. Esto puede explicarse fácilmente por el hecho de que ya no es necesaria para inducir la vía de señalización Wnt, ya que la ausencia de APC en estas células dará lugar automáticamente a  $\beta$ -catenina nuclear. Esto hace que la R-espondina, un agonista de Wnt, esté de más en el cultivo de adenomas *in vitro*. La Figura 16a, y a mayor aumento en la Fig. 16b, muestra que, a diferencia de los organoides de cripta normales, en los que puede verse el proceso de gemación de la cripta con una luz central, los organoides de adenoma simplemente se desarrollan como quistes. Las células muertas se desprenden hacia la luz, como puede concluirse a partir de la presencia de una gran cantidad de células muertas en el interior de la luz. En los organoides de cripta normales, sólo se observa  $\beta$ -catenina nuclear en la base del dominio cripta (véase la Fig. 4a). En los organoides de adenoma (Fig. 16c y un mayor aumento en 16d), se observó  $\beta$ -catenina nuclear en todas las células epiteliales, coherente con la mutación genética de APC. Estos organoides pueden someterse a pases de manera indefinida.

Se ensayó adicionalmente si las células clasificadas Lgr5<sup>+</sup> individuales derivadas de los adenomas en ratones Lgr5-EGFP-Ires-CreERT2/APC<sup>flox/flox</sup> eran capaces de formar organoides de adenoma similares *in vitro* utilizando las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas (sin R-espondina). De hecho, este era el caso y los organoides obtenidos tenían una estructura altamente comparable a la de los que se obtuvieron utilizando adenomas completos como material de partida para el cultivo *in vitro* (datos no presentados).

#### Ejemplo 4. Ensayo del efecto de otros agonistas de Wnt

Para determinar si otros agonistas de Wnt tienen el mismo efecto que la R-espondina, a saber, facilitar la formación de organoides de cripta-vellosidad *in vitro*, se añadió Wnt3a soluble a células individuales clasificadas Lgr5<sup>+</sup> y se evaluó el efecto sobre la formación de la cripta-vellosidad *in vitro*.

#### Materiales y métodos

Se clasificaron células Lgr5-GFP<sup>hi</sup> y se cultivaron con o sin Wnt3a (100 ng/ml) además de la condición de cultivo de células individuales convencional (EGF, nogina, R-espondina, ligando Notch e Y-27632, como se ha descrito anteriormente para las células individuales). Los inventores sembraron 100 células/pocillo y contaron el número de organoides 14 días después de la siembra.

Se incubaron criptas aisladas con Newport Green-DCF 1  $\mu$ M (MolecularProbes) en PBS + Pluronic 127 al 0,1% (Sigma) durante 3 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavado con PBS. Después de esto, las criptas se embebieron en Matrigel y se cultivaron utilizando las condiciones normales que se han descrito anteriormente.

#### Resultados

La adición de Wnt3a en ausencia de R-espondina no tuvo ningún efecto sobre la formación de colonias: se formaron pocas colonias, o ninguna, en ausencia de R-espondina. Sin embargo, en presencia de R-espondina, se observó un aumento de la eficacia en la formación de organoides sólo en presencia de Wnt3a (Fig. 17). Esto indica que ambos factores se apoyan entre sí en su capacidad para estimular y sustentar la diferenciación de las células madre a todas las células necesarias para la formación de una capa completa de células epiteliales. La hipótesis actual es que la R-espondina es responsable de la inhibición de la internalización de un correceptor de Frizzled, LRP6, antes de la señalización a través de Frizzled. Tras la unión del factor de Wnt a Frizzled y el correceptor LRP6, se activa la vía de señalización Wnt<sup>31</sup>. Cuando LRP6 está presente en la superficie celular, tendrá lugar la activación de Wnt (Fig. 18). Por lo tanto, si no hay R-espondina en el medio de cultivo, Wnt3a no será capaz de activar la vía Wnt, puesto que LRP6 está internalizado y no está disponible para la señalización en combinación con el factor de Wnt, evitando así la activación de la vía Wnt.

Wnt3a es un factor soluble que, en circunstancias fisiológicas, es producido por las células de Paneth. Estas células se encuentran generalmente adyacentes a las células madre (Fig. 19) y se tiene la hipótesis de que estas células sustentan el mantenimiento de la diferenciación en curso de la capa de células del epitelio intestinal. Otros factores Wnt que también son secretados por las células de Paneth son Wnt6, 9b y 11. Se prevé que Wnt6 tenga el mismo efecto sobre la diferenciación de las células madre que Wnt3a. Estos hallazgos apoyan la idea de que las células de Paneth son importantes para la formación de un nicho de células madre. Estos datos son sorprendentes, puesto que se ha especulado mucho sobre un nicho de células madre, pero hasta el momento no hay datos experimentales que apoyen la existencia de un nicho de este tipo. El apoyo adicional para la presencia de un nicho de células madre procede de un experimento en el que se destruyeron selectivamente células de Paneth. Se aislaron criptas del intestino delgado de un ratón y se cultivaron *in vitro* en presencia de un quelante de cinc<sup>32</sup> que erradica específicamente las células de Paneth. Este se utilizó a concentraciones tan bajas y durante tan poco tiempo que sólo afectó a las células de Paneth y no a otras células dentro de la cripta. Después del tratamiento con el quelante de cinc, se evaluó la formación de organoides. Se observó una reducción significativa de la formación de organoides cuando ya no había células de Paneth en las criptas originales (Fig. 20). En presencia de Wnt3a, esta reducción se restauró parcialmente (datos no presentados). Esto confirma que la célula de Paneth tiene una función en el mantenimiento de un nicho de células madre, que sustenta la diferenciación de las células madre Lgr5<sup>+</sup> en la cripta.

Ejemplo de referencia 5. Las condiciones de cultivo también sustentan el desarrollo de organoides de estómago

El estómago consiste en 3 regiones topográficas (fundus, cuerpo y antro) y 2 áreas glandulares funcionales (oxíntica y pilórica). El área de glándulas oxínticas comprende el 80% del órgano, mientras que el área pilórica comprende el 20% del órgano. El epitelio gástrico de mamíferos está organizado en unidades gástricas que consisten en un epitelio de superficie plana, una fosita corta y una glándula larga. La fosita está revestida de células secretoras de moco mientras que la glándula está compuesta por células secretoras separadas en tres regiones: el istmo, el cuello y la base. El epitelio gástrico se renueva constantemente. Los estudios de rastreo realizados en el laboratorio de los inventores han demostrado que las células positivas para LGR5 situadas en la base de la glándula satisfacen la definición de severidad (Barker *et al.*, en preparación). Hasta el momento, los cultivos gástricos en monocapa no han sido capaces de recapitular las características de la unidad gástrica, que está formada por varias células gástricas diferenciadas. Además, los sistemas de método de cultivo 3-D descritos solamente reconstruyen células mucosas de la superficie gástrica altamente diferenciadas, sin mostrar células endocrinas. Además, estos cultivos sólo se habían llevado a cabo durante un período de 7 días, indicando así una falta de capacidad de auto-renovación (Ootani A., Toda, S., Fujimoto K., Sugihara H., *Am. J. Pathol.*, junio de 2003; 162(6): 1905-12). En el presente documento los inventores han desarrollado un método para aislar unidades gástricas de la región pilórica del estómago murino y han sido capaces de desarrollar un sistema de cultivo 3D que muestra un mantenimiento más duradero.

#### Materiales y métodos

##### Aislamiento de la unidad gástrica

Se abrieron longitudinalmente estómagos aislados y se lavaron en Advanced-DMEM/F12 frío (Invitrogen). Bajo el estereoscopio, la región pilórica se cortó y se aisló del cuerpo y el preestómago y la mucosa pilórica se separó de la capa muscular cuidadosamente con pinzas. A continuación, el tejido se cortó en trozos de aproximadamente 5 mm y se lavó adicionalmente con tampón de aislamiento frío ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  28 mM +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40 mM + NaCl 480 mM + KCl 8 mM + sacarosa 220 mM + D-sorbitol 274 mM + DL-ditiotreitol 2,6 mM). Los fragmentos de tejido se incubaron en EDTA 5 mM con tampón de aislamiento durante 2 horas a 4°C con agitación suave. Después de eliminar la solución de EDTA, los fragmentos de tejido se suspendieron enérgicamente en 10 ml de tampón de aislamiento frío con una pipeta de 10 ml. El primer sobrenadante que contenía las células muertas se desechó y el sedimento se suspendió con 10 ml-15 ml de tampón de aislamiento frío. Después de una suspensión enérgica adicional de los fragmentos de tejido, el sobrenadante estaba enriquecido en unidades gástricas. Cada 10-20 suspensiones el sobrenadante era sustituido por tampón de aislamiento frío recién preparado y se mantuvo en hielo y se comprobó la presencia de unidades gástricas. Este procedimiento se repitió hasta la completa liberación de las unidades gástricas, por lo general 4-5 veces. Las suspensiones de unidades gástricas enriquecidas se centrifugaron a 600 rpm durante 2-3 minutos para separar las unidades gástricas aisladas de las células individuales y el sedimento se utilizó para el cultivo.

##### Cultivo gástrico

Se aislaron unidades gástricas enteras que contenían las regiones de la glándula, el istmo y la fosita, de la región pilórica del estómago murino mediante incubación con EDTA 5 mM a 4°C durante 2 horas como se ha indicado en la sección anterior. Las unidades gástricas aisladas se contaron y se sedimentaron. Se mezclaron 100 unidades gástricas con 25  $\mu\text{l}$  de Matrigel (BD Bioscience), se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 48 pocillos y se incubaron durante 5-10 minutos a 37°C hasta la completa polimerización del Matrigel. Después de la polimerización, se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo tisular (Advanced-DMEM/F12 complementado con B27, N2, 200 ng/ml de N-acetilcisteína, 50 ng/ml de EGF, 1  $\mu\text{g/ml}$  de R-espondina 1, 100 ng/ml de nogina, 100 ng/ml de Wnt3A, 50 ng/ml ó 100 ng/ml de KGF). Se cambió el medio cada 2 días. Para el pase, se sacaron los organoides del Matrigel utilizando una pipeta de 1.000  $\mu\text{l}$  y se disociaron mecánicamente en pequeños fragmentos y se transfirieron a Matrigel recién preparado. El pase se realizó con una relación de división 1:4 una vez o dos veces por semana. En estas condiciones, los cultivos se han mantenido durante al menos 1 mes.

##### Reactivos

Se adquirieron Advanced DMEM/F12 y los complementos sin suero B-27 y N2 Serum-Free Supplement de Invitrogen y N-acetilcisteína de Sigma. Se adquirieron EGF recombinante murino, nogina y KGF humano de Peprotech, y la proteína recombinante Wnt3A de Stem Cell Research. De los factores de crecimiento mencionados, sólo se han ensayado diferentes concentraciones para R-espondina 1 y KGF. A 50 ng/ml, la R-espondina 1 inhibe el crecimiento del cultivo. KGF puede utilizarse ya sea a 50 ng/ml ó 100 ng/ml, pero la eficacia de gemación es mayor en la condición de 100 ng/ml. Se preparó medio acondicionado con Wnt3a como se ha descrito anteriormente (Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3<sup>o</sup>, Nusse R. *Nature*, mayo de 2003, 22; 423(6938):448-52).

## Inmunohistoquímica y análisis de imágenes

Para la tinción con X-gal, los organoides se fijaron directamente en el matrigel con glutaraldehído al 0,25% (Sigma) en MgCl<sub>2</sub> 100 mM en PBS, durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después, los cultivos se lavaron 3 veces con solución de lavado (desoxicolato sódico al 0,01% + NP40 al 0,02% + MgCl<sub>2</sub> 5 mM en PBS) y se incubaron durante 16 horas a 37°C con 1 mg/ml de X-Gal (Invitrogen) en presencia del K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> al 0,21% y K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> al 0,16%. Después del lavado en PBS, los cultivos se postfijaron con PFA al 2% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Todos los reactivos se adquirieron de Sigma. Para la inmunohistoquímica, los organoides se aislaron del matrigel utilizando tripsina (Tryple Select, Invitrogen), se fijaron con PFA al 4% durante 1 hora a temperatura ambiente y se embebieron en parafina. Las secciones de parafina se procesaron con técnicas convencionales y se realizó la inmunohistoquímica como se ha descrito anteriormente. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-Ki67 de ratón (clon mM1, Monosan) (1:200), anti-caspasa-3 escindida de conejo (Cell Signaling Technology) (1:400) y anti-mucina gástrica humana 5AC (Novocastra clon 45M1) (1:200). En todos los casos se realizó la recuperación del antígeno con tampón citrato. Las secciones se sometieron a tinción de contraste con hematoxilina de Mayer. Las imágenes de los organoides gástricos y las glándulas gástricas aisladas se obtuvieron con un microscopio invertido (Nikon DM-IL) o con microscopía confocal (Leica SP5).

## Resultados

Hasta el momento, los cultivos gástricos se han desarrollado en monocapas. Sin embargo, los cultivos en monocapa carecen de la capacidad de recapitular las características de toda la unidad gástrica, que está formada por varias células gástricas diferenciadas (células mucosas de la fosita, células enteroendocrinas y células sin mucosidad proliferantes). Recientemente, el laboratorio de los inventores ha demostrado mediante rastreo de linaje *in vivo*, que las células positivas para Lgr5 presentes en el fondo de las criptas intestinales son verdaderas células madre intestinales (Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Bom M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Nature 2007; 449:1003-7). Al igual que el epitelio intestinal, el epitelio gástrico se renueva constantemente. Se han encontrado células positivas para Lgr5 en el fondo de las unidades de glándula gástrica pilórica y, los estudios de rastreo han demostrado que estas células positivas para Lgr5 satisfacen la definición de severidad al mostrar auto-renovación y capacidad de multipotencia (Barker *et al.* en preparación). Puesto que los autores han sido capaces de cultivar criptas intestinales a partir de células Lgr5<sup>+</sup> individuales en estructuras 3-D, se determinó si condiciones similares podrían sustentar el desarrollo de unidades gástricas pilóricas *in vitro*.

Después del aislamiento de las unidades de glándula gástrica utilizando EDTA 5 mM, las glándulas gástricas (Fig. 21a) se suspendieron en Matrigel. El crecimiento del cultivo gástrico necesitaba EGF (50 ng/ml), nogina (100 ng/ml), R-espondina 1 (1 ug/ml) y Wnt3A (100 ng/ml) (Fig. 21b). El KGF (50 ng/ml ó 100 ng/ml) era esencial para la formación de los eventos de gemación y, por lo tanto, la expansión de los cultivos. Por lo tanto, las unidades pilóricas cultivadas se comportaron como los organoides de cripta intestinal. La parte superior abierta de la unidad se sella y la luz se rellena de células apoptóticas. Los organoides gástricos recién formados experimentaron continuos eventos de gemación (que recuerdan a la fisión de glándulas) manteniendo al mismo tiempo su polaridad con la gemación de las glándulas gástricas con una luz central. Cuando se utilizó medio acondicionado con Wnt3A, que muestra 10-100 veces mayor actividad de Wnt en comparación con la proteína recombinante Wnt3A recombinante, se detectó un aumento significativo de la eficacia de formación de la gemación (Fig. 21c), lo que pone de manifiesto una dependencia de la dosis de Wnt para la formación de la gemación y la morfogénesis.

Se han cultivado organoides durante al menos 1 mes sin perder las propiedades descritas. Semanalmente, los organoides se someten a pases 1:4 mediante disociación mecánica (Fig. 22). El cultivo de unidades gástricas pilóricas Lgr5-lacZ puso de manifiesto la presencia de células madre positivas para Lgr5 en los organoides gástricos (Fig. 23a). Como demuestra la tinción con Ki67, las células proliferantes se encuentran en la base de las estructuras de tipo glándula (Fig. 23b), mientras que las células positivas para caspasa 3 apoptóticas se encuentran extruidas hacia la luz (Fig. 23c). El mucina gástrica 5AC (MUC5AC) es un marcador específico de las células de la fosita gástrica, también denominadas células foveolares. Las células positivas para MUC5AC se encuentran en los organoides, lo que indica la presencia de al menos un linaje de células gástricas diferenciadas (Fig. 23d). Sin embargo, no se han detectado células derivadas endocrinas. Por lo tanto, se necesitan factores adicionales. Estos incluyen el péptido liberador de gastrina, activadores o inhibidores de las familias Hedgehog y Notch, otros activadores de la vía Wnt y otros inhibidores de la familia BMP, activadores de la familia TGF.

Ejemplo de referencia 6a. Pueden cultivarse *in vitro* organoides pancreáticos

## Material y métodos

Se cortó páncreas recién aislado en trozos pequeños, y se incubó en DMEM (Invitrogen) con una mezcla de enzimas digestivas (300 U/ml de colagenasa tipo XI (Sigma), 0,01 mg de dispasa 1 (Roche) y 0,1 mg de ADNasa) durante 10 minutos en un agitador orbital (80 rpm, 37°C). Después de la incubación, los fragmentos de tejido se disociaron suavemente mediante pipeteo mecánico. Los fragmentos no digeridos se dejaron sedimentar durante 1

minuto con gravedad normal, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. El sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro celular de 70  $\mu\text{m}$ , y el residuo se lavó con DMEM. Los fragmentos que quedaron en el filtro celular se recolectaron aclarando el filtro celular invertido con DMEM, y se hicieron precipitar. Los fragmentos consistían principalmente en tejido acinar pancreático e incluía conductos pancreáticos. El sedimento se mezcló con matrigel y se cultivó como un sistema de cultivo de organoides de intestino delgado (véase Materiales y métodos del Ejemplo 1). El matrigel se incubó durante 5-10 minutos a 37°C. Después de la polimerización del matrigel, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo tisular (Advanced-DMEM/F12 complementado con B27, N2, 200 ng/ml de N-acetilcisteína, 50 ng/ml de EGF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de R-espondina 1, 100 ng/ml de nogina, 50 ng/ml ó 100 ng/ml de KGF (PeproTech). Los factores de crecimiento se añadieron cada 2 días. Se cambiaba todo el medio cada 4-6 días. Para el pase, se sacaron los organoides del Matrigel utilizando una pipeta de 1.000  $\mu\text{l}$  y se disociaron mecánicamente en pequeños fragmentos y se transfirieron a Matrigel recién preparado. El pase se realizó con una relación de división 1:4 una o dos veces por semana. En estas condiciones, los cultivos se han mantenido durante al menos 2 meses.

## Resultados

El tejido pancreático formó una estructura quística simple 3-4 días después del cultivo en presencia de EGF. La nogina y R-espondina aumentaron sinérgicamente el tamaño de la estructura quística, pero no influyeron en la morfogénesis de los organoides. El KGF indujo significativamente la formación de la gemación, así como la eficacia del cultivo. Utilizando la combinación óptima de factores de crecimiento (EGF, nogina, R-espondina 1 y KGF), más del 80% del conducto pancreático se desarrolló en la mejor combinación de factores de crecimiento. Una vez se hubieron llevado a cultivo los conductos pancreáticos, los conductos sellaron rápidamente ambos extremos de la estructura y formaron una estructura simple. Aproximadamente el 20% de los organoides comenzó a formar una estructura en gemación 7 días después del inicio del cultivo (Fig. 24). Los conductos pancreáticos proliferan rápidamente, a diferencia del tejido acinar, que sólo se desarrolla muy lentamente.

Es interesante señalar que, después del pase de los organoides, aproximadamente 2-3 semanas después del inicio del cultivo, se observaron estructuras de tipo islote pancreático (Fig. 25). Estas estructuras de tipo islote no se observan generalmente antes del pase. Los islotes sobreviven durante al menos 7 días, pero proliferan muy lentamente o no lo hacen en absoluto. Estas estructuras de tipo islote se asemejan a los islotes pancreáticos de Langerhans que están presentes en el tejido pancreático sano. Tales islotes contienen, entre otras, células alfa y células beta que producen glucagón e insulina respectivamente. Las estructuras de tipo islote observadas contienen células que expresan insulina, neurogenina 3, y Pdx-1. Se ensayarán varios factores de crecimiento para determinar si aumentan la presencia de células  $\beta$  pancreáticas en los organoides que se derivan de tejido pancreático. Los factores de crecimiento candidatos comprenden ciclopamina (inhibidor de Sonic-hedgehog), activina, GLP (péptido similar al glucagón) y su derivado (exendina 4), gastrina y nicotinamida.

Ejemplo de referencia 6b. Pueden cultivarse *in vitro* organoides pancreáticos

### Material y métodos

Se cortó páncreas recién aislado en trozos pequeños, y se incubó en DMEM (Invitrogen) con una mezcla de enzimas digestivas (300 U/ml de colagenasa tipo XI (Sigma), 0,01 mg/ml de dispasa 1 (Roche) y 0,1 mg/ml de ADNasa) durante 10 minutos en un agitador orbital (80 rpm, 37°C). Después de la incubación, los fragmentos de tejido se disociaron suavemente mediante pipeteo mecánico. Los fragmentos no digeridos se dejaron sedimentar durante 1 minuto con gravedad normal. Los fragmentos no digeridos se digirieron adicionalmente con la mezcla de enzimas digestivas durante 10 minutos. Este procedimiento de digestión se repitió hasta que los fragmentos no digeridos consistieron principalmente en conductos pancreáticos. Las estructuras de conducto pancreático se recogieron manualmente a partir de los fragmentos no digeridos al microscopio. Los conductos pancreáticos se mezclaron con matrigel y se cultivaron como un sistema de cultivo de organoides de intestino delgado (véase Materiales y métodos del Ejemplo 1). El matrigel se incubó durante 5-10 minutos a 37°C. Después de la polimerización del matrigel, se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo tisular (Advanced-DMEM/F12 complementado con 1x Glutamax, penicilina/estreptomina, HEPES 10 mM, B27, N2, N-acetilcisteína 10 mM, [Leu<sup>15</sup>]-gastrina 1 10 nM, exendina4 100 nM, nicotinamida 10 mM, 50 ng/ml de EGF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de R-espondina 1, 100 ng/ml de nogina, 50 ng/ml ó 100 ng/ml de FGF7 (KGF) o FGF10 (PeproTech). El medio de cultivo se cambió cada 2 días. Para el pase, los organoides se sacaron del Matrigel utilizando una pipeta de 1.000  $\mu\text{l}$  y se disociaron mecánicamente en pequeños fragmentos y se transfirieron a Matrigel recién preparado. El pase se realizó con una relación de división 1:4 una vez o dos veces por semana. En estas condiciones, los cultivos se han mantenido durante al menos 10 meses.

### Resultados

El tejido pancreático formó una estructura quística simple 3-4 días después del cultivo en presencia de EGF. La nogina y R-espondina aumentaron sinérgicamente el tamaño de la estructura quística, pero no influyeron en la morfogénesis de los organoides. FGF7 (KGF)/FGF10 indujeron significativamente la formación de la gemación, así como la eficacia del cultivo. Utilizando la combinación óptima de factores de crecimiento (EGF, nogina, R-

espondina 1 y FGF7 (KGF)/FGF10), más del 80% del conducto pancreático se desarrolló en la mejor combinación de factores de crecimiento. Una vez se hubieron llevado a cultivo los conductos pancreáticos, los conductos sellaron rápidamente ambos extremos de la estructura y formaron una estructura simple. Aproximadamente el 80% de los organoides comenzó a formar una estructura en gemación 7 días después del inicio del cultivo (Fig. 24). Los conductos pancreáticos proliferan rápidamente, a diferencia del tejido acinar, que sólo se desarrolla muy lentamente. Es interesante señalar que después del pase de los organoides, aproximadamente 2-3 semanas después del inicio del cultivo, se observaron estructuras de tipo islote pancreático (Fig. 25). Estas estructuras de tipo islote no se observan generalmente antes del pase. Los islotes sobreviven durante al menos 14 días, pero proliferan muy lentamente o no lo hacen en absoluto. Estas estructuras de tipo islote se asemejan a los islotes pancreáticos de Langerhans que están presentes en el tejido pancreático sano. Tales islotes contienen, entre otras, células alfa y células beta que producen glucagón e insulina respectivamente. Las estructuras de tipo islote observadas contienen células que expresan insulina, neurogenina 3, y Pdx-1. Se ensayarán varios factores de crecimiento para determinar si aumentan la presencia de células  $\beta$  pancreáticas en los organoides que se derivan de tejido pancreático. Los factores de crecimiento candidatos comprenden ciclopamina (inhibidor de Sonic-hedgehog), activina, GLP (péptido similar al glucagón) y su derivado (exendina 4), gastrina y nicotinamida.

Ejemplo de referencia 7. Expansión libre de progenitoras pancreáticas adultas *in vitro* mediante inducción de una respuesta regenerativa Wnt/Lgr5

## 20 Materiales y métodos

### Ratones, reactivos y tejidos

Se obtuvo tejido pancreático de los siguientes ratones: knock-in para Axina-LacZ (Lustig *et al.* Mol. Cell. Biol. 2002), knock-in para Lgr5-LacZ (Barker *et al.*, 2007), Lgr5-GFP (Barker *et al.*, 2007). Se inyectaron, p.i., a ratones Axina-LacZ 100  $\mu$ g de R-espondina 1 humana purificada (proporcionada amablemente por A. Abo, Nuvelo Inc, CA, EE.UU.) y se sacrificaron 48 horas más tarde para el análisis de la expresión de LacZ en el páncreas. La ligadura del conducto pancreático se realizó como se ha descrito en ratas (Wang *et al.*, 1995) con pequeñas modificaciones. El procedimiento experimental para la PDL fue el siguiente: se anestesia a los animales con una mezcla de fluanisona:fentanilo:midazolam inyectada por vía intraperitoneal a una dosis de 3,3 mg/Kg, 0,105 mg/Kg y 1,25 mg/Kg, respectivamente. Se coloca a los animales en posición supina, y la superficie abdominal se afeita y limpia con una solución antiséptica (solución de yodo). A continuación, se practica una incisión en la línea media de la pared abdominal anterosuperior desde la apófisis xifoides y se expone el páncreas. Utilizando un microscopio de disección, se localiza el lóbulo esplénico del páncreas y se liga el conducto pancreático con una sutura monofilamento de polipropileno de 7-0, a aproximadamente 1 mm distal a la unión con el conducto del lóbulo gástrico. Después de la cirugía, se administra s.c. el analgésico buprenorfina a una dosis de 0,01 mg/kg-0,05 mg/kg. A continuación, se cierran la pared abdominal y la piel con suturas de seda 5-0.

Se trató el páncreas recién aislado como se describe en el ejemplo 6, lo que dio como resultado fragmentos pancreáticos que se cultivaron en las condiciones que se describen a continuación. El conducto pancreático principal y la primera rama de los conductos se aislaron mecánicamente. Los fragmentos se cortaron en trozos pequeños y se incubaron en DMEM (Invitrogen) con la mezcla de enzimas digestivas (300 U/ml de colagenasa tipo XI (Sigma), 0,01 mg/ml de dispasa I (Roche) y 0,1 mg/ml de ADNasa) durante 30 minutos en un agitador orbital (80 rpm, 37°C). Después de la digestión, se liberaron de los fragmentos la mayoría de las células acinares. Los fragmentos no digeridos, que consistían principalmente en células del conducto pancreático, se dejaron sedimentar durante 1 minuto con gravedad normal, y se desechó el sobrenadante. Después de lavar tres veces con PBS, los fragmentos no digeridos se incubaron con EDTA 2 mM/PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los fragmentos se pipetearon enérgicamente y se dejaron sedimentar durante 1 minuto con gravedad normal. El sobrenadante enriquecido con células del conducto se transfirió a tubos nuevos y se lavó con PBS tres veces. Las células del conducto se sedimentaron y se mezclaron con el Matrigel. El matrigel se incubó durante 5-10 minutos a 37°C. Después de la polimerización del matrigel, se añadieron 500  $\mu$ l de medio de expansión (Advanced-DMEM/F12 complementado con 1x Glutamax, penicilina/estreptomicina, Hepes 10 mM, B27, N2, N-acetilcisteína 1 mM, [Leu<sup>15</sup>]-gastrina I 10 nM, exendina4 100 nM, nicotinamida 10 mM, 50 ng/ml de EGF, 1  $\mu$ g/ml de R-espondina 1, 100 ng/ml de nogina, 50 ng/ml ó 100 ng/ml de FGF7 (KGF) o FGF10 (Peprotech). Se cambiaba todo el medio cada 2 días. Para el pase, los organoides se sacaron del Matrigel utilizando una pipeta de 1.000  $\mu$ l y se disociaron mecánicamente en pequeños fragmentos y se transfirieron a Matrigel recién preparado. El pase se realizó con una relación de división 1:4 una vez por semana. En estas condiciones, los cultivos se han mantenido al menos durante 2 meses. Para la diferenciación, el medio de expansión se cambió a medio de diferenciación (Advanced-DMEM/F12 complementado con Glutamax, penicilina/estreptomicina, Hepes 10 mM, B27, N2, 200 ng/ml de N-acetilcisteína, [Leu<sup>15</sup>]-gastrina I 10 nM, exendina4 100 nM, 50 ng/ml de EGF, 1  $\mu$ g/ml de R-espondina 1, 100 ng/ml de nogina). FGF10 se obtuvo de Peprotech. BrdU se obtuvo de Sigma.

### Q-PCR

Se aisló ARN mediante el kit RNeasy Mini Kit (Quiagen), y se sometió a transcripción inversa utilizando la

transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (Promega). Se amplificó ADNc en un termociclador. Los cebadores utilizados se muestran a continuación.

5 mmTBP (directo): TATTGTATCTACCGTGAATCTTGG  
 mmTBP (inverso): CAGTTGTCCGTGGCTCTC  
 Lgr5 (directo) TCCAACCTCAGCGTCTTC  
 Lgr5 (inversa) TGGGAATGTGTGTCAAAG  
 (T<sub>m</sub> = 57°C)

10 PCR

Todos los cebadores se diseñaron para que flanqueasen o abarcasen secuencias de intrones con el fin de distinguir el ADN genómico.

15 Hprt (F) AAGTTTGTGTTGGATATGC (R) CATCTTAGGCTTTGTATTTGG (T<sub>m</sub>) 57°C, 106 pb  
 Ngn3 (F) TCCTCGGAGCTTTTCTACGA (R) TGTGTCTCTGGGGACACTTG (T<sub>m</sub>) 60°C, 239 pb/373 pb (banda genómica)  
 Pax6 (F) AACAACCTGCCTATGCAACC (R) ACTTGGACGGGAAGTACAC (T<sub>m</sub>) 60°C, 206 pb  
 Glucoquinasa (F) AAGATCATTGGCGGAAAG (R) GAGTGCTCAGGATGTTAAG (T<sub>m</sub>) 57°C, 193 pb  
 20 Cromogranina A (F) GCTGACAGCAGAGAAGCGGCT(R)GACAGGCTCTCTAGCTCCTGG (T<sub>m</sub>) 60°C, 231 pb  
 Glut2 (slc2a2) (F) AAGTTGGAAGAGGAAGTCAG (R) AGACCTTCTGCTCAGTCG (T<sub>m</sub>) 57°C, 124 pb  
 Insulina (F) TTTGTCAAGCAGCACCTTTG (R) TCTACAATGCCACGCTTCTG (T<sub>m</sub>) 57°C, 214 pb  
 Somatostatina (F) GAGGCAAGGAAGATGCTGTC (R) GGGCATCATTCTCTGTCTGG (T<sub>m</sub>) 57°C, 214 pb  
 25 Glucagón (F) TTACTTTGTGGCTGGATTGCTT (R) AGTGGCGTTTGTCTTCATTCA (T<sub>m</sub>) 57°C, 149 pb

25 Análisis de imágenes

Las imágenes de los organoides de cripta se obtuvieron mediante microscopía confocal con una Leica SP5, con un microscopio invertido (Nikon DM-IL) o con un microscopio estereoscópico (Leica, MZ16-FA). Para la inmunohistoquímica, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 1 hora a temperatura ambiente, y las secciones de parafina se procesaron con técnicas convencionales (Barker *et al.*, Nature 2007). La inmunohistoquímica se realizó como se ha descrito anteriormente (Barker *et al.*, Nature 2007). Para la inmunotinción de preparaciones enteras, los organoides pancreáticos se aislaron del Matrigel utilizando dispasa (Invitrogen), y se fijaron con PFA al 4%, seguido de permeabilización con Triton X-100 al 0,1%. Se utilizaron los siguientes anticuerpos para la inmunohistoquímica; anti-BrdU (Amersham), anti-Ki67 (Dako), anti-insulina (Sigma), anti-péptido C (Cell Signaling), anti-Ngn3 (Developmental Hybridoma Studies Bank). El ADN se tiñó con DAPI o ToPro-3 (Molecular Probes). Se obtuvieron imágenes tridimensionales con microscopía confocal. La tinción con X-gal se realizó como se describe en el ejemplo 5 con inmunohistoquímica y análisis de imágenes.

40 FACS

Se cultivaron organoides pancreáticos en presencia o ausencia de R-espondina (1 µg/ml). Se sacaron del matrigel mecánica o enzimáticamente (TrypLE). Los organoides aislados se digirieron adicionalmente mediante TrypLE durante 10 minutos a 37°C. Las células disociadas se hicieron pasar por un filtro celular de 40 µm (BD Bioscience) y se tiñeron con anti-EpCAM conjugado con APC (eBioscience). Se tiñó LacZ con el kit FluoroReporter (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Las células viables individuales se seleccionaron con el parámetro de dispersión lateral, ancho de pulso, y tinción con yoduro de propidio.

50 Expansión *in vitro* de células pancreáticas positivas para Axina2-LacZ individuales.

Se aisló el páncreas de los ratones 7 días después del tratamiento PDL, y los conductos pancreáticos se aislaron como se ha descrito anteriormente. Los conductos pancreáticos aislados se incubaron con TrypLE Express (Invitrogen) durante 20 minutos a 37°C, seguido del paso por un filtro celular 40 µm (BD Bioscience). Las células se tiñeron con EpCAM-APC y sustrato fluorescente para LacZ (kit FluoroReporter) como se describe en el Ejemplo 7. Se analizaron las células y las células epiteliales viables individuales se clasificaron con un citómetro de flujo (MoFlo; Dako Cytomation), y se recogieron en el medio EM. Las células clasificadas se sedimentaron, se mezclaron con Matrigel y se cultivaron con medio EM que incluía medio acondicionado con Wnt al 50% e Y-27632 10 mM durante 4 días. El medio de cultivo se cambió a un medio EM sin Wnt ni Y-27632 después de 4 días.

60 Resultados

Las células madre Lgr5<sup>+</sup> dependientes de Wnt individuales derivadas del intestino delgado pueden cultivarse para formar organoides de tipo intestino en continua expansión (Sato *et al.*, 2009). En un páncreas adulto sano, la vía Wnt está inactiva y - por consiguiente - no se expresa *Lgr5*. Tras la lesión por la ligadura parcial del conducto (PDL), los inventores descubrieron que la vía Wnt se vuelve muy activa, mientras que aparece expresión

de *Lgr5* en las yemas de los conductos en regeneración. En condiciones modificadas a partir del sistema de cultivo intestinal, los fragmentos de conducto adulto recién aislados inician la expresión de *Lgr5* y forman quistes en gemación que se expanden 10 veces por semana durante > 30 semanas. La eliminación de los estímulos de crecimiento convierte estos quistes en estructuras con morfología de islote inmaduro, que expresan marcadores endocrinos y de células  $\beta$ . Las células estimuladas con Wnt individuales de páncreas lesionado también pueden iniciar estos cultivos de largo plazo. Los inventores llegaron a la conclusión de que el límite de Hayflick no se aplica a las células progenitoras adultas cuando se cultivan en condiciones optimizadas. Por lo tanto, los métodos de cultivo que favorecen la expansión de las células madre adultas específicas de órgano pueden representar una alternativa a la generación de tejido basada en ES o en iPS.

Aunque el desarrollo de los compartimentos exocrino y endocrino del páncreas embrionario se entiende con gran detalle (Jensen, 2004), se sabe mucho menos sobre la generación de las células de los islotes en el páncreas posnatal (Bonner-Weir y Weir, 2005; Bouwens y Rooman, 2005). El rastreo del linaje genético ha aportado pruebas de que las células  $\beta$  preexistentes, más que las células madre/progenitoras, generan nuevas células  $\beta$  en ratones adultos tanto en condiciones fisiológicas normales como después de una pancreatectomía parcial (Dor *et al.*, 2004, Teta *et al.*, 2007). Se ha descrito recientemente la existencia de células progenitoras multipotentes en el revestimiento ductal del páncreas de ratones adultos, que pueden activarse en el páncreas lesionado para aumentar la masa de células  $\beta$  funcionales (Xu *et al.* 2008). Se obtuvo una lesión controlada realizando una PDL en el páncreas de ratones adultos que portaban un indicador promotor de *Ngn3*, que codifica un interruptor maestro para las progenitoras de las células de los islotes embrionarios (Apelqvist *et al.*, 1999; Gradwohl *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2002; Schwitzgebel *et al.*, 2000) y que es silencioso en el páncreas postnatal normal (Gu *et al.*, 2002). La diferenciación de estas progenitoras de las células  $\beta$  es dependiente de *Ngn3* y da lugar a todos los tipos de células de los islotes, incluidas las células  $\beta$  sensibles a glucosa (Xu *et al.*, 2008). En la actualidad no se sabe qué señales inducen la aparición de estas progenitoras después de la lesión. Tales perspectivas parecen ser importantes, ya que pueden guiar el diseño de enfoques *in vitro* hacia la expansión de progenitoras.

Para determinar si la señalización Wnt desempeña un papel en la inducción de las progenitoras de las células  $\beta$ , se hizo seguimiento de la expresión del alelo *Axina2-LacZ* en el páncreas adulto. El alelo *Axina2-LacZ* ha demostrado representar un fiel indicador general para la señalización Wnt (Lustig *et al.*, Mol. Cell. Biol. 2002). Como era de esperar, el indicador estaba inactivo en el páncreas adulto (Fig. 26A). Sin embargo, cuando los inventores inyectaron el agonista de Wnt *Rspol* (Kim *et al.*, 2005) en ratones *Axina2-LacZ* para activar la vía de señalización Wnt, advirtieron la presencia de células sensibles a Wnt a lo largo de los conductos, pero no en los acinos ni en los islotes del páncreas (Fig. 26B). Puesto que las progenitoras de las células  $\beta$  se han detectado anteriormente sólo después de la lesión del páncreas, a continuación se ensayó si se activaba fisiológicamente una respuesta Wnt en estas células después de la lesión, realizando una PDL. La Figura 26C muestra la tinción H-E de secciones de tejido pancreático aislado de la zona PDL y no PDL. Como se ha informado anteriormente (Abe *et al.*, 1995), las células acinares se vuelven apoptóticas después de 5 días y se sustituyen por estructuras de conducto recién formadas mediante un mecanismo que no se comprende completamente. Después de 7 días, también se observa un aumento del número de islotes (neogénesis de los islotes), así como del tamaño de los islotes (como se indica mediante un asterisco). Esto indica que la PDL tuvo éxito. De hecho, el indicador *Axina2-LacZ* se activaba específicamente a lo largo de los conductos de la parte ligada del páncreas, mientras que la parte no ligada no mostraba esta respuesta (Fig. 26D y E). Además, la respuesta de proliferación, tal como se determina mediante tinción con Ki67, quedaba restringida principalmente a los conductos de la parte ligada, mientras que en los conductos de la parte no ligada no pudo detectarse Ki67 nuclear (Fig. 26F). Esto se asemejaba a la detección de células positivas para BrdU proliferantes en el páncreas después del tratamiento con R-espondina (Fig. 26G).

Los inventores han demostrado anteriormente en los intestinos que una determinada población de células sensibles a Wnt son células madre (Barker *et al.*, 2007). Un marcador de esa población de células era *Lgr5*. El gen *Lgr5* es, al igual que *Axina-2*, un gen sensible a Wnt. Sin embargo, en el intestino y en la piel sólo se expresa en las células madre estimuladas por Wnt pero no en las células amplificadoras del tránsito (Barker *et al.*, 2007; Jaks *et al.*, 2008)). Por lo tanto, se considera que es un auténtico marcador de células madre. Los inventores tienen la hipótesis de que, al igual que las células *Lgr5*<sup>+</sup> de los intestinos, las células *Lgr5*<sup>+</sup> del páncreas también pueden ser el origen de las progenitoras de las células  $\beta$  como se detecta después de la lesión. Para probar esta hipótesis, se realizó la PDL en el páncreas de ratones *Axina-LacZ* y *Lgr5-LacZ* y se determinó la expresión de ARNm de *Lgr5* y tinción *LacZ*. Es interesante señalar que *Lgr5* se hizo fácilmente detectable mediante qPCR en una evolución temporal después de la PDL (Fig. 26H). Por otra parte, la PDL en ratones knock-in para *Lgr5-LacZ* dio como resultado una actividad específica del indicador en las yemas de los conductos en regeneración (indicadas mediante los asteriscos), como se demuestra mediante tinción con X-gal (Fig. 26I). La aparición de expresión de *Lgr5* en los sitios de regeneración activa sugería que *Lgr5* podría no sólo marcar las células madre en la autorrenovación fisiológica (por ejemplo, en el intestino, el estómago o el folículo piloso), sino que su expresión puede anunciar también la activación por Wnt de células madre/progenitoras regenerativas después de la lesión.

Teniendo en cuenta la aparición del marcador de células madre *Lgr5* dependiente de Wnt, los inventores razonaron que las progenitoras de páncreas adultas pueden expandirse en las condiciones de cultivo de organoides intestinales anteriormente definidas (Sato *et al.*, 2009). Se han establecido anteriormente cultivos de poblaciones

heterogéneas de células del páncreas y, por lo general, incluyen factores de crecimiento tales como EGF (Githens *et al.* *In vitro Cell Dev Biol.* 1989), FGF10 (Miralles *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1999) y HGF (Lefebvre *et al.* *Diabetes.* 1998, Suzuki *et al.*, *Diabetes* 53, 2004) y complementos séricos tales como gastrina (Rooman *et al.* *Gastroenterology* 2001), nicotinamida (Rooman *et al.* *Diabetologia.* 2000) y otros. Varios de tales cultivos dieron como resultado la generación *in vitro* de células con fenotipos de tipo células  $\beta$  (Bonner-Weir *et al.*, 2000; Seaberg *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004) que, en determinadas condiciones fueron capaces de revertir la hiperglucemia cuando se trasplantaron en ratones diabéticos (Hao *et al.*, 2006; Ramiya *et al.*, 2000). La mayoría de estos enfoques comienzan con poblaciones de células mixtas que experimentan senescencia a lo largo del tiempo. Parece justo decir que no existe hoy en día ningún sistema de cultivo a largo plazo robusto que mantenga una fuerte expansión de progenitoras de páncreas adultas, no transformadas, definidas, durante largos períodos de tiempo que mantengan la capacidad de diferenciarse a lo largo del linaje endocrino.

En primer lugar, los inventores trataron de cultivar fragmentos de conducto purificados en medio de expansión (EM). Como se muestra en la Figura 27A, los fragmentos de conducto pequeños experimentaron inmediatamente expansión hasta formar estructuras de tipo quiste que experimentaban continua gemación, mientras que los islotes (datos no presentados) y los acinos (panel inferior) se desintegraban gradualmente. Los cultivos se expandieron 10 veces/semana (y se sometieron a pases semanalmente) durante más de 30 semanas. Se han ensayado múltiples factores de crecimiento para determinar las señales necesarias para la expansión óptima de las células pancreáticas *in vitro* (Fig. 27B). Claramente, en ausencia de EGF, los cultivos se desintegraron después de 7 días. También la ausencia de R-espondina o FGF10 redujo la viabilidad de los cultivos después de 14 días. Por el contrario, la nogina, un inhibidor de BMP, no tuvo ningún efecto en el crecimiento sostenido de los fragmentos pancreáticos. La adición de nicotinamida, exendina4, gastrina al medio de expansión no era esencial, pero dio como resultado un aumento de la eficacia del cultivo (datos no presentados).

Puesto que los inventores demostraron que la señalización Wnt se activaba tras la PDL, se determinó el efecto sobre el crecimiento sostenido de la adición de un agonista de Wnt a los fragmentos pancreáticos recién aislados *in vitro*. Cuando los conductos se aislaron de ratones Axina2-LacZ, los quistes en gemación se tiñeron en su totalidad de azul sólo en presencia del agonista de Wnt R-espondina 1 (Fig. 27C), que se asemeja a la situación *in vivo* después de la PDL (Fig. 26D y E). No se observó tinción azul en los islotes o acinos recién aislados de páncreas Axina2-LacZ. De acuerdo con las observaciones *in vivo* después de la PDL, sólo las yemas de los quistes Lgr5-LacZ se teñían de azul (Fig. 27D). Además, el cultivo de organoides Lgr5-lacZ pancreáticos durante 14 días en presencia de R-espondina aumentó significativamente el porcentaje de células Lgr5<sup>+</sup> (Fig. 27E). Es importante destacar que cuando los fragmentos pancreáticos se cultivaron en ausencia de R-espondina en EM, los organoides dejaron de proliferar en el plazo de 1 mes, mientras que en presencia de R-espondina, pueden expandirse durante un período de tiempo ilimitado. Estas observaciones implican que las progenitoras sensibles a Wnt situadas cerca de los conductos estimulaban el desarrollo de los quistes en gemación, que eran mantenidos posteriormente por las células que expresan Lgr5 con propiedades similares a las células madre.

Para poner directamente a prueba esta idea, los inventores clasificaron células positivas para Axina2-LacZ de los ratones 7 días después de la PDL y descubrieron que estas células iniciaban de manera eficaz quistes en gemación que eran indistinguibles de los quistes iniciados en el conducto (Fig. 28). Las células individuales necesitan la presencia de Wnt3A en el medio. La comparación de la eficacia del cultivo en presencia o ausencia de Wnt3A después de la disociación de células individuales mostró que las células individuales cultivadas en ausencia de Wnt3A se desarrollan inicialmente como pequeñas estructuras quísticas, pero detienen la proliferación después de 2-4 días. Este no es el caso para los cultivos de páncreas iniciados a partir de fragmentos pancreáticos aislados. Es interesante señalar que la Wnt3A podía eliminarse después de 4 días, lo que indica que, o bien esta señal ya no era necesaria para estimular el crecimiento, o que la producción de Wnt3A era iniciada por células derivadas de las células clasificadas individuales con las que se había iniciado el cultivo.

A continuación, se intentó evaluar el potencial de los quistes en gemación para generar células de linaje endocrino. Con este fin, se ensayaron varios cambios en el EM para definir un medio de diferenciación (DM). Se ensayó una serie de factores para determinar su efecto sobre la diferenciación a los linajes endocrinos. La eliminación de FGF10 parecía ser crucial para la inducción de la diferenciación. Sólo en ausencia de FGF10 aparecieron estructuras de tipo islote (Fig. 29A), lo que se correspondía con la expresión de varios marcadores de diferenciación de las progenitoras de las células  $\beta$  (Ngn3), las células  $\beta$  (insulina). Aparecen glucagón (células  $\alpha$ ) y somatostatina (células  $\delta$ ) (Fig. 29B y C). Por otra parte, marcadores de diferenciación tales como la glucoquinasa, Pax6 y la cromogranina A estaban regulados positivamente a partir de los 10 días después de la exposición al medio DM. Por lo tanto, DM consistía óptimamente en al menos EGF y R-espondina y no tenía FGF7 ni 10. La expresión sostenida de Lgr5, un marcador de células madre, en condiciones de diferenciación puede explicarse por la presencia de R-espondina, un agonista de Wnt, en el DM, puesto que Lgr5 es un gen sensible a Wnt. Cuando las células se cultivaron en presencia de nicotinamida en EM, además era importante eliminarla también del medio para obtener la diferenciación completa. Cuando los quistes en gemación después de cualquier periodo de cultivo se transfirieron del EM al DM, los quistes experimentaron un proceso de "involución" estereotipado: el progresivo plegamiento hacia el interior de la pared conducía a la impactación del quiste en un cuerpo compacto más pequeño con semejanza morfológica a un islote (Fig. 29D). La morfológica de tipo islote fue confirmada por los marcadores

para las células  $\beta$  de los islotes tales como insulina y péptido C (Fig. 29E). Para confirmar la dependencia de esta etapa del proceso de regeneración en la señalización Wnt, se cultivaron fragmentos pancreáticos en DM en ausencia o en presencia de R-espondina. Es importante destacar que las progenitoras de las células  $\beta$ , como se demuestra por la expresión de Ngn3, sólo pudieron detectarse en presencia de R-espondina (Fig. 29F).

#### Ejemplo 8. Expansión *in vitro* de fragmentos de páncreas humano

Durante el desarrollo embrionario del páncreas, se observaron células que expresaban neurogenina 3+ o insulina en la red de conductos pancreáticos, y se sugirió que las células del conducto pancreático dan lugar a células progenitoras endocrinas y, por consiguiente, a células endocrinas maduras. Se ha demostrado que las células del conducto pancreático humano se diferencian a células productoras de insulina sensibles a glucosa *in vitro* (Bonner-Weir, S *et al.* 2000 PNAS), y este hallazgo hizo a las células del conducto pancreático una fuente atractiva para la terapia de reemplazo de células beta. Sin embargo, ha sido difícil expandir células del conducto sin perder la capacidad de diferenciación endocrina. En el sistema de cultivo anteriormente descrito, las células del conducto pancreático humano perdieron la propiedad epitelial o experimentaron senescencia después de 2 semanas hasta 5 semanas (Trautmann B *et al.* Pancreas, vol. 8, 248-254). Por lo tanto, no existe un sistema de cultivo robusto para expandir células del conducto pancreático humano que conserven la capacidad de diferenciación endocrina. Aprovechando el establecimiento de un sistema de cultivo de organoides de páncreas de ratón, en el presente documento, los inventores intentaron establecer un sistema de cultivo de organoides de páncreas humano.

#### Desarrollo de progenitoras de páncreas humano *in vitro*

Se obtuvo páncreas humano de Leiden University Medical Center, Países Bajos. Es importante destacar que en las mismas condiciones que las descritas para los fragmentos de páncreas de ratón anteriormente indicadas (ejemplo 7), también pueden cultivarse *in vitro* fragmentos de páncreas humano recién aislados (Fig. 30). En estas condiciones de expansión, la eficacia del cultivo de los fragmentos pancreáticos fue de aproximadamente un 80%, lo que significa que el 80% de los fragmentos pancreáticos recién aislados se expandieron de manera eficaz *in vitro* durante un período de tiempo más largo. En comparación con el páncreas de ratón, el tejido acinar forma más fácilmente estructuras quísticas, sin embargo, estas estructuras dejaron de proliferar en un plazo de 4 semanas. Las células del conducto pancreático de la red ductular más grande producen de manera más eficaz estructuras quísticas y, con el tiempo, forman organoides con yema. Los organoides pancreáticos se dividieron con una relación 1:5 una vez por semana y se mantuvieron *in vitro* al menos 5 semanas sin perder la capacidad de proliferación.

En resumen, los inventores han establecido un sistema de cultivo de organoides de páncreas humano y tuvieron éxito en la expansión de células del conducto pancreático al menos 3.000 veces a partir del volumen original. Los inventores están optimizando la condición de cultivo de diferenciación endocrina para las células del conducto pancreático humano, y este enfoque *in vitro*, una vez optimizado, podría tener importantes implicaciones para poner la terapia de reemplazo de células beta a disposición de un mayor número de personas con diabetes mellitus de tipo 1 y 2.

#### Referencias

- Abe K, Watanabe S. (1995) Apoptosis of mouse pancreatic acinar cells after duct ligation. Arch Histol Cytol. 58:221-9.
- Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H. (1999) Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. Nature 400:877-81.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. Nature. 449:1003-7.
- Bonner-Weir, S., y Weir, G.C. (2005). New sources of pancreatic beta-cells. Nat. Biotechnol. 23, 857-861.
- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G.C., Tatkiewicz, K., Song, K.H., Sharma, A., y O'Neil, J.J. (2000). In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97, 7999-8004.
- Bouwens, L., y Rooman, I. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass. Physiol. Rev. 85. 1255-1270.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., y Melton, D.A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. Nature 429, 41-46.
- Githens S, Schexnayder JA, Desai K, Patke CL. (1989) Rat pancreatic interlobular duct epithelium: isolation and culture in collagen gel. En Vitro Cell Dev Biol. 25:679-88.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., y Guillemot, F. (2000). Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97, 1607-1611.
- Gu, G., Dubauskaite, J., y Melton, D.A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. Development 129, 2447-2457.
- Hao, E., Tyrberg, B., Itkin-Ansari, P., Lackey, J.R., Geron, I., Monosov, E.Z., Barcova, M., Mercola, M., y Levine, F. (2006). Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. Nat. Med. 12, 310-316.
- Jaks V, Barker N, Kasper M, van Es JH, Snippert HJ, Clevers H, Toftgård R. (2008) Lgr5 marks cycling, yet long-

lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet.* 40:1291-9.

Lefebvre VH, Otonkoski T, Ustinov J, Huotari MA, Pipeleers DG, Bouwens L. (1998) Culture of adult human islet preparations with hepatocyte growth factor and 804G matrix is mitogenic for duct cells but not for beta-cells. *Diabetes.* 47:134-7

5 Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J. (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors.

Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J. *Mol Cell Biol.* 1184-93.

10 Miralles F, Czernichow P, Ozaki K, Itoh N, Scharfmann R. (1999) Signaling through fibroblast growth factor receptor 2b plays a key role in the development of the exocrine pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96:6267-72.

Ramiya, V.K., Maraist, M., Arfors, K.E., Schatz, D.A., Peck, A.B., y Cornelius, J.G. (2000). Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat. Med.* 6, 278-282.

15 Rooman I, Heremans Y, Heimberg H, Bouwens L. (2000) Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro. *Diabetologia*, julio de 2000; 43(7):907-14.

Rooman I, Lardon J, Flamez D, Schuit F, Bouwens L. (2001) Mitogenic effect of gastrin and expression of gastrin receptors in duct-like cells of rat pancreas. *Gastroenterology* 121:940-9.

20 Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459:262-5.

Schwitzgebel, V.M., Scheel, D.W., Conners, J.R., Kalamaras, J., Lee, J.E., Anderson, D.J., Sussel, L., Johnson, J.D., y German, M.S. (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127, 3533-3542.

25 Seaberg, R.M., Smukler, S.R., Kieffer, T.J., Enikolopov, G., Asghar, Z., Wheeler, M.B., Korbitt, G., y van der Kooy, D. (2004). Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat. Biotechnol.* 22, 1115-1124.

Suzuki, A., Nakauchi, H., y Taniguchi, H. (2004). Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 53, 2143-2152.

30 Teta, M., Rankin, M.M., Long, S.Y., Stein, G.M., y Kushner, J.A. (2007). Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev. Cell* 12, 817-826.

Trautmann B, Schlitt HJ, Hahn EG, Löhr M. (1993) Isolation, culture, and characterization of human pancreatic duct cells. *Pancreas* 8:248-54.

Wang, R.N., Kloppel, G., y Bouwens, L. (1995). Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38, 1405-1411.

35 Xu X, D'Hoker J, Stangé G, Bonné S, De Leu N, Xiao X, Van de Castele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G, Heimberg H. (2008) Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell.* 132(2):197-207.

40 Ejemplo 9. Cultivo de criptas de intestino delgado o de colon humano *in vitro*

45 Como se ha descrito en los ejemplos 1 y 2 ya es posible, por primera vez, generar condiciones de cultivo a largo plazo para epitelio de intestino delgado y colon de ratón. Los organoides de cripta-vellosidad se desarrollan mediante la complementación de un conjunto de factores de crecimiento definidos y una matriz extracelular. Los organoides contienen células madre intestinales que se dividen activamente y dan lugar a todos los principales linajes de células diferenciadas presentes en el intestino. En este ejemplo se demuestra que estas condiciones de cultivo no son exclusivas del epitelio intestinal de ratón, sino que también pueden utilizarse para cultivar epitelio intestinal humano.

50 Material y métodos

Cultivos de organoides de colon de ratón

55 Se cultivaron cultivos de organoides de ratón como se ha descrito en el ejemplo 1. Se utilizó un inhibidor de la producción de Wnt (IWP-2) para inhibir la secreción de Wnt (Chen *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, febrero de 2009; 5(2):100-7).

Cultivos de organoides de colon humano

60 Se aislaron criptas de colon humano a partir de una muestra de ensayo colónica normal reseca y se cultivaron como estructuras de organoide durante 7 días utilizando el sistema de cultivo de organoides establecido (Sato *et al.*, 2009 *Nature*, mayo, 14; 459(7244):262-5). Puesto que este protocolo estaba optimizado para los cultivos de organoides derivados de ratón, los inventores hicieron un pequeño cambio añadiendo medio acondicionado con Wnt3a, con el fin de asegurar un desarrollo óptimo de los organoides de colon humano. Para obtener este medio acondicionado, se expresa Wnt3a en una línea celular transfecando un constructo de expresión adecuado que codifica dicho ligando. Se cultiva dicha línea celular y el medio de cultivo que comprende el ligando secretado se

recolecta a intervalos de tiempo adecuados. Por ejemplo, las células comienzan la producción de Wnt3a en el momento en que alcanzan la confluencia y dejan de crecer. Como control negativo se utilizó el medio de cultivo de las células que no fueron transfectadas o infectadas con dicho constructo de expresión vacío. El medio acondicionado se recolectó y se ensayó, por ejemplo en un ensayo en el que la expresión de luciferasa es controlada por elementos sensibles a TCF para cuantificar la presencia de un agonista de Wnt tal como Wnt3a (Korinek *et al.*, 1997. *Science* 275:1784-1787).

## Resultados

La proliferación del epitelio intestinal depende de la vía de señalización Wnt. Sin embargo, la ubicación exacta de la fuente de Wnt no está clara (Gregorieff y Clevers, 2005, *Genes Dev.*, abril, 15; 19(8):877-90). Puesto que los organoides intestinales de ratón se desarrollaron de manera independiente de nicho (Sato *et al.*, 2009 *Nature*, mayo, 14; 459(7244):262-5) los inventores presumieron que estos organoides pueden producir sus propios ligandos de Wnt. Para ponerlo a prueba, se inhibió la secreción de Wnt mediante incubación con un inhibidor de porcupina. La porcupina es importante para la secreción de Wnt (figura esquemática 31A). La incubación con IWP 1  $\mu\text{M}$  (Chen *et al.*, *Nat Chem Biol.*, febrero de 2009; 5(2):100-7) dio como resultado la muerte de los organoides (Fig. 31 B y C). Los organoides pudieron rescatarse añadiendo medio acondicionado con Wnt3A, lo que indica que los organoides producen de hecho ligandos de Wnt (Fig. 31 D y E).

A continuación, se intentó cultivar organoides de intestino humano. Resultó que la adición de Wnt3a al medio era necesaria porque sin ello, los organoides de cripta nunca formaban estructuras en gemación y morían en un plazo de 5-10 días para el intestino delgado y de 3-4 días para el colon (Figura 32). En general, los organoides de cripta intestinal humana se desarrollaron de manera comparable a los cultivos de organoides de ratón. Por lo general, se obtuvo una eficacia del cultivo de hasta un 80% dependiendo de la actividad del medio acondicionado con Wnt-3a. Los cultivos de intestino humano han estado en cultivo durante un máximo de 3 meses. Se esperaba el efecto de Wnt-3a en el colon humano, ya que se observó también que potenciaba los efectos en el cultivo de organoides de colon de ratón. El requisito de Wnt-3a en el intestino delgado y el colon humano puede provenir de la menor producción de ligandos de Wnt endógenos por los organoides humanos, debido al menor número de células de Paneth presentes en el intestino humano, en comparación con el intestino de ratón. Hasta ahora, no existía un sistema de cultivo de intestino humano a largo plazo reproducible, y el sistema de cultivo de los inventores es útil no sólo para comprender la biología de las células madre intestinales humanas, sino también para aplicar un ensayo orientado a la clínica, tal como el cribado de fármacos.

### Ejemplo 10. Condiciones de cultivo optimizadas para el desarrollo de organoides de estómago

Como se ha descrito en el ejemplo 5, se ha identificado un medio de cultivo que puede utilizarse para cultivar epitelio del estómago durante largos períodos. En el presente documento se describen las condiciones optimizadas para estos cultivos de organoides de estómago.

## Materiales y métodos

Aislamiento de unidad gástrica, disociación de células individuales y clasificación de células EGFP<sup>+</sup>.

Se aislaron glándulas gástricas de regiones pilóricas de ratón como se ha descrito anteriormente con algunas modificaciones (Bjerknes y Cheng, 2002, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, septiembre; 283(3):G767-77). En resumen, al microscopio, se abrió el estómago a lo largo de la curvatura mayor, se lavó con solución salina y se aisló el píloro. Se extrajo la capa muscular del estómago y el epitelio restante se dividió en trozos de 5 mM y se incubó durante 3-5 horas en una solución salina tamponada ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  28 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40 mM, NaCl 480 mM, KCl 8 mM, sacarosa 220 mM, D-sorbitol 274 mM, DL-ditiotreitol 2,6 mM) que contenía EDTA 10 mM (para el cultivo o la tinción), o EGTA 5 mM (para el aislamiento de ARN) a 4°C. Después de eliminar el agente quelante, los fragmentos de tejido se suspendieron enérgicamente en la solución tamponada con una pipeta de 10 ml. Después de la suspensión y la centrifugación, el sedimento estaba enriquecido en glándulas gástricas. Después de aislar las glándulas, se recogieron las células y se resuspendieron en medio SMEM sin calcio (Invitrogen), complementado con 10 mg/ml de tripsina y 0,8 unidades/ $\mu\text{l}$  de ADNasa I (para el análisis de micromatrices) o se resuspendieron en TrypleExpress (GLBCO) complementado con 0,8 unidades/ $\mu\text{l}$  de ADNasa (con fines de cultivo). En ambos casos, después de la incubación a 37°C durante 20-25 minutos, las células se centrifugaron y se filtraron a través de una malla de 40  $\mu\text{m}$ . Las células EGFP<sup>hi</sup> y EGFP<sup>lo</sup> se clasificaron mediante citometría de flujo (MoFlo, Beckman Coulter). Las células epiteliales viables individuales se sometieron a selección mediante el parámetro del ancho de pulso y dispersión frontal. Donde se indica, las células se sometieron a selección para la tinción negativa de yoduro de propidio, se recogieron en Trizol LS (Invitrogen) y se aisló el ARN según el protocolo del fabricante, o bien se recogieron en medio de cultivo gástrico, se embebieron en Matrigel (BD Bioscience) y se cultivaron según el protocolo que detalla a continuación.

## Cultivo gástrico

Para el cultivo, se contaron las glándulas gástricas aisladas y se mezcló un total de 100 glándulas con 50  $\mu$ l de Matrigel (BD Bioscience) y se sembraron en placas de 24 pocillos. Después de la polimerización del Matrigel, se cubrieron con medio de cultivo gástrico (Advanced DMEM/F12 complementado con B27, N2 y n-acetilcisteína (Invitrogen) que contenía factores de crecimiento (50 ng/ml de EGF (PeproTech), 1  $\mu$ g/ml de R-espondina 1, 100 ng/ml de nogina (PeproTech), 100 ng/ml de FGF10 (PeproTech) y medio acondicionado con Wnt3A). Para el cultivo de células individuales, se recogió un total de 100 células EGFP<sup>hi</sup> clasificadas/pocillo en medio de cultivo gástrico y se embecieron en Matrigel (BD Bioscience). Después de la polimerización del Matrigel, se cubrió con medio de cultivo gástrico. Durante los 2 primeros días después de la siembra, el medio también se complementó con inhibidor de ROCK Y-27632 10  $\mu$ M (Sigma Aldrich), para evitar la anoikis. Se añadieron factores de crecimiento cada dos días y se cambió todo el medio cada 4 días. Para el pase, los organoides gástricos se sacaron del Matrigel, se disociaron mecánicamente y se transfirieron a Matrigel recién preparado. El pase se realizó cada 1-2 semanas con una relación de división 1:5-1:8. Para confirmar la necesidad de Wnt3A, se complementó con proteína recombinante Wnt3A de ratón (Stem Cell Technologies) en lugar del medio acondicionado con Wnt3A. Para los experimentos de rastreo *in vitro*, se incubaron organoides gástricos de 2 semanas de antigüedad con 100 nM de 4-hidroxitamoxifeno en medio de cultivo gástrico durante 20 horas para activar el Lgr5-CreERT2. Posteriormente, la YFP se visualizó y se registró en los organoides vivos utilizando microscopía confocal (Leica, SP5).

#### Medio acondicionado con Wnt3A

Se preparó medio Wnt3a siguiendo el protocolo descrito en otro sitio (Willert *et al.*, 2003, Nature, mayo, 22; 423(6938):448-52). Se utilizó el ensayo TOP/FOP para ensayar la actividad Wnt del medio acondicionado con Wnt3A y el medio acondicionado de control, como describen Van de Wetering y colaboradores (van de Wetering *et al.*, 2001 Cancer Res., 1 de enero; 61(1):278-84). Una relación TOP/FOP  $\geq$  50 se consideró "medio con alto contenido de Wnt" y se diluyó 1:1 con el medio de cultivo de organoides gástricos. Una dilución 1:10 de este medio con alto contenido de Wnt3a (relación TOP/FOP  $\sim$  5) se consideró "medio con bajo contenido de Wnt" y se utilizó con fines de diferenciación.

#### Inmunohistoquímica de los organoides gástricos

Para la inmunohistoquímica, los organoides gástricos se lavaron una vez con PBS y se fijaron inmediatamente con paraformaldehído al 4% durante 15-20 minutos a TA. Donde se indica, los organoides gástricos se embecieron en parafina y se procesaron utilizando técnicas convencionales. Para la tinción de preparaciones enteras, las muestras se permeabilizaron con PBS con Triton X-100 al 0,5%-BSA al 1% y se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios. Después de varios lavados en PBS con Triton X-100 al 0,3%, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario. La tinción EdU se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Click-IT; Invitrogen). Los núcleos se tiñeron con yodo TOPRO3 o Hoechst33342. Las imágenes de las glándulas gástricas y de los organoides gástricos se obtuvieron mediante microscopía confocal (Leica, SP5). La reconstrucción tridimensional se realizó utilizando el software Volocity (Improvision).

#### RT-PCR

Se extrajo el ARN de los cultivos de células gástricas o tejido recién aislado utilizando el kit RNeasy Mini RNA Extraction Kit (Qiagen) y se sometió a transcripción inversa utilizando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (Promega). El ADNc se amplificó en un termociclador (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems, Londres, Reino Unido) como se ha descrito anteriormente (Huch *et al.*, 2009). Los cebadores utilizados se muestran a continuación (símbolo del gen seguido de los cebadores directo (5'-3') e inverso (5'-3')).

Lgr5: GGAAATGCTTTGACACACATTC, GGAAGTCATCAAGGTTATTATAA  
 Gif: TGAATCCTCGGCCTTCTATG, CAGTTAAAGTTGGTGGCACTTC  
 Pgc: CCAACCTGTGGGTGTCTTCT, TTAGGGACCTGGATGCTTTG  
 Muc6: TGCATGCTCAATGGTATGGT, TGTGGGCTCTGGAGAAGAGT  
 Muc5ac: CCATGAAGTGGGAGTGTGTG, TTGGGATAGCATCCTTCCAG  
 Ghrl: GCCCAGCAGAGAAAGGAATCCA, GCGCCTCTTTGACCTCTTCC  
 Gast: GCCAACTATTCCCCAGCTCT, GGCTCTGGAAGAGTGTGGT  
 Stt: GAGGCAAGGAAGATGCTGTC, GGGCATCATTCTCTGTCTGG  
 Muc2: GAACGGGGCCATGGTCAGCA, CATAATTGGTCTTGCATGCC  
 Cdx2: CTTGCTGCAGAGCTCAAC, TCTGTGTACACCACCCGGTA  
 Hprt: AAGCTTGCTGGTAAAAGGA, TTGCGCTCATCTTAGGCTTT

#### Resultados

Para determinar el desarrollo óptimo de las unidades gástricas *in vitro*, se aislaron unidades de glándula gástrica que se suspendieron en Matrigel y se cultivaron en condiciones diferentes. Las condiciones de crecimiento del cultivo gástrico fueron similares a las de los cultivos de intestino delgado (incluidos EGF, nogina y R-espondina 1), a excepción de una estricta dependencia de Wnt3A en forma de medio acondicionado. Este requisito se confirmó

utilizando proteína Wnt3a purificada (Fig. 33A). Además, FGF10 resultó ser un componente esencial para inducir eventos de gemación y para la expansión de los cultivos en organoides de unidades múltiples (Fig. 33B). Puede utilizarse FGF10 para reemplazar FGF7 (KGF), que se ha utilizado en el ejemplo 5, e incluso da como resultado un aumento de 2 veces del % de organoides en gemación 4 días después del inicio del cultivo (Fig. 33C). Los organoides gástricos recién formados experimentaron continuos eventos de gemación, manteniendo al mismo tiempo su polaridad, estando las yemas del dominio de glándula gástrica distribuidas alrededor de una luz central (Fig. 33D). En ausencia de medio acondicionado con Wnt3a, los organoides gástricos se deterioraron rápidamente (Fig. 33E). Cada semana, los organoides se disociaban mecánicamente y se dividían hasta una quinta parte de su densidad de siembra previa. Las unidades pilóricas cultivadas eran estructuras epiteliales de una sola capa, como lo demuestra la tinción E-cad (Fig. 33F). Los inventores han cultivado con éxito organoides gástricos durante al menos 8 meses sin pérdida detectable alguna de las propiedades descritas anteriormente.

Para determinar si las células Lgr5<sup>+ve</sup> gástricas (Fig. 34A) eran capaces de generar y mantener unidades de glándulas gástricas pilóricas *in vitro*, se clasificaron células Lgr5-EGFP<sup>high</sup> (Fig. 34B). Cuando se clasificaron las células Lgr5-EGFP<sup>high</sup> individuales, un promedio del 8% de las células se convirtió en organoides, mientras que las células restantes murieron dentro de las primeras 24 horas. Las células Lgr5-EGFP<sup>hi</sup> clasificadas comenzaron a dividirse rápidamente y ya podían verse pequeñas estructuras de tipo quiste después de 5 días. Durante los días siguientes, las estructuras (de tipo quiste) recién formadas comenzaron a generar dominios de tipo glándula (Figura 34C). Después de 9-11 días de cultivo, los organoides gástricos se disociaron manualmente y se dividieron para generar nuevos organoides. Los organoides gástricos derivados de células individuales se volvieron a sembrar con éxito semanalmente durante al menos 3 meses, sin perder las propiedades descritas (Figura 34D). Del día 7 en adelante, la expresión de Lgr5-EGFP estaba restringida a la base de los dominios de tipo glándula (Figura 34E). Como lo demuestra la tinción EdU, las células proliferantes se encontraban en la base de estos dominios de tipo glándula (Figura 34F), mientras que las células positivas para caspasa 3 apoptóticas se encontraban extruidas hacia la luz (datos no presentados). Se estudió el rastreo de linaje en los organoides establecidos derivados de células Lgr5<sup>+ve</sup> individuales aisladas de un ratón reportero Lgr5-EGFP-ires-CreERT2/Rosa26-YFP. Después de la inducción con tamoxifeno, el gen indicador YFP<sup>+ve</sup> se activó rápidamente en las células Lgr5<sup>+ve</sup> individuales dentro de los dominios de tipo glándula. En los días siguientes, el dominio de expresión de YFP se expandió considerablemente dentro de los organoides en crecimiento, lo que confirma la contribución de las células madre Lgr5<sup>+ve</sup> al desarrollo de los organoides *in vitro* (Figura 34G). Los organoides derivados de cultivos de células individuales eran estructuras epiteliales de una sola capa, como lo demuestra la tinción E-cadherina (Figura 34I). Además de Lgr5, los cultivos expresaron los marcadores epiteliales gástricos factor intrínseco gástrico, mucina 6 y pepsinógeno C. No se observó diferenciación a los linajes de la fosita o enteroendocrino en estas condiciones de cultivo. (Esto es diferente del ejemplo 5, donde se observó el linaje de células de la fosita. Sin embargo, en ese ejemplo se utilizó proteína Wnt3a en lugar de medio acondicionado con Wnt que es menos activo. La reducción de la concentración de medio acondicionado con Wnt da como resultado la diferenciación al linaje de células de la fosita, véase más adelante). La reducción de la concentración de Wnt3A en el medio de cultivo dio como resultado la formación de estructuras gástricas comparables que albergaban células de la fosita polarizadas, como lo demuestra la expresión de mucina gástrica 5AC (MUC5AC) y ácido peryódico-Schiff (PAS), células mucosas del cuello, como lo demuestra la expresión de Tff2 y algunas células enteroendocrinas inmaduras dispersas (cromogranina A) (Figura 34H, 1). La adición de factores de crecimiento adicionales como RA, IGF y exendina4 puede dar como resultado una diferenciación más madura de los cultivos de estómago hacia los diversos linajes celulares. En conjunto, estas observaciones *in vivo* e *in vitro* demuestran que Lgr5 está marcando una población anteriormente no percibida de células madre adultas multipotentes auto-renovantes en el estómago pilórico.

## Referencias

1. Barker, N. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449, 1003-7 (2007).
2. Bjerknes, M. y Cheng, H. Intestinal epithelial stem cells and progenitors. *Methods Enzymol* 419, 337-83 (2006).
3. Barker, N., van de Wetering, M. y Clevers, H. The intestinal stem cell. *Genes Dev* 22, 1856-64 (2008).
4. Evans, G. S., Flint, N., Somers, A. S., Eyden, B. y Potten, C. S. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci* 101 (Pt 1), 219-31 (1992).
5. Whitehead, R. H., Demmler, K., Rockman, S. P. y Watson, N. K. Clonogenic growth of epithelial cells from normal colonic mucosa from both mice and humans. *Gastroenterology* 117, 858-65 (1999).
6. Fukamachi, H. Proliferation and differentiation of fetal rat intestinal epithelial cells in primary serum-free culture. *J Cell Sci* 103 (Pt 2), 511-9 (1992).
7. Perreault, N. y Jean-Francois, B. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell Res.* 224, 354-64 (1996).
8. Korinek, V. *et al.* Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19, 379-83 (1998).
9. Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H. y Clevers, H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 17, 1709-13 (2003).
10. Kuhnert, F. *et al.* Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101, 266-71 (2004).



<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador  
  
 <400> 2  
 tattgtatct accgtgaatc ttgg 24  
  
 10 <210> 3  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 3  
 cagttgtccg tggctctc 18  
 20  
 <210> 4  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 4  
 30 tccaacctca gcgtcttc 18  
  
 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 5  
 40 tgggaatgtg tgtcaaag 18  
  
 <210> 6  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 50  
 <400> 6  
 aagttgttg ttgatatgc 20  
  
 <210> 7  
 55 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Cebador  
  
 <400> 7  
 catcttaggc ttgtattg g 21  
 65 <210> 8

# ES 2 825 713 T3

<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador

<400> 8  
tcctcggagc tttctacga 20

10 <210> 9  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador

<400> 9  
tgtgtctctg gggacactg 20

20 <210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Cebador

30 <400> 10  
aacaacctgc ctatgaacc 20

35 <210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Cebador

<400> 11  
acttgacgg gaactgacac 20

45 <210> 12  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Cebador

<400> 12  
aagatcattg gcggaag 18

55 <210> 13  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Cebador

<400> 13  
gagtgctcag gatgtaag 19

65

# ES 2 825 713 T3

<210> 14  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 14  
10 gctgacagca gagaagcggc t 21  
  
<210> 15  
<211> 21  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 15  
20 gacaggctct ctgctcctg g 21  
  
<210> 16  
<211> 20  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
  
30 <400> 16  
aagttggaag aggaagtcag 20  
  
<210> 17  
<211> 18  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
40 <223> Cebador  
  
<400> 17  
agacctctg ctgagtcg 18  
  
45 <210> 18  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
50 <220>  
<223> Cebador  
  
<400> 18  
55 tttgtcaagc agcaccttg 20  
  
<210> 19  
<211> 20  
<212> ADN  
60 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 19  
65 tctacaatgc cacgctcctg 20

<210> 20  
<211> 20  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
  
10 <400> 20  
gaggcaagga agatgctgtc 20  
  
<210> 21  
<211> 20  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
20  
  
<400> 21  
gggcatcatt ctctgtctgg 20  
  
<210> 22  
25 <211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
30 <223> Cebador  
  
<400> 22  
ttactttgtg gctggattgc tt 22  
  
35 <210> 23  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Cebador  
  
40 <400> 23  
agtggcgttt gtcttcattc a 21  
  
<210> 24  
<211> 22  
45 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
50  
  
<400> 24  
ggaaatgctt tgacacacat tc 22  
  
<210> 25  
55 <211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
60 <223> Cebador  
  
<400> 25  
ggaagtcac aaggttatta taa 23  
  
65 <210> 26

# ES 2 825 713 T3

<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador

<400> 26  
tgaatcctcg gccttctatg 20

10 <210> 27  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador

<400> 27  
cagttaaagt tgggtgcact tc 22

20 <210> 28  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Cebador

30 <400> 28  
ccaacctgtg ggtgtcttct 20

35 <210> 29  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Cebador

<400> 29  
ttagggacct ggatgcttgg 20

45 <210> 30  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Cebador

<400> 30  
tgcagctca atggtatggt 20

55 <210> 31  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Cebador

<400> 31  
tgtgggctct ggagaagagt 20

65

# ES 2 825 713 T3

<210> 32  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 32  
10 ccatgaagtg ggagtgtgtg 20  
  
<210> 33  
<211> 20  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 33  
20 ttgggatagc atcctccag 20  
  
<210> 34  
<211> 22  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 34  
30 gccagcaga gaaaggaatc ca 22  
  
<210> 35  
<211> 20  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 35  
40 gcgcctcttt gacctctcc 20  
  
<210> 36  
<211> 20  
45 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 36  
55 gccaactatt cccagctct 20  
  
<210> 37  
<211> 20  
<212> ADN  
60 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador  
  
<400> 37  
65 ggctctggaa gagtgttgc 20

<210> 38  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 10 <400> 38  
 gaggcaagga agatgctgtc 20  
  
 <210> 39  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20  
 <400> 39  
 gggcatcatt ctctgtctgg 20  
  
 <210> 40  
 25 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Cebador  
  
 <400> 40  
 gaacggggcc atggtcagca 20  
 35  
 <210> 41  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 41  
 cataattggt ctgcatgcc 20  
 45  
 <210> 42  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 42  
 55 cttgctgcag acgctcaac 19  
  
 <210> 43  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 65 <400> 43

# ES 2 825 713 T3

tctgtgtaca ccacccgga 20

<210> 44

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

10

<400> 44

aagcttgctg gtgaaaagga 20

<210> 45

<211> 20

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador

<400> 45

ttgcgctcat ctaggcttt 20

25

**REIVINDICACIONES**

**1.** Un método para cultivar células madre epiteliales o un fragmento de tejido aislado que comprende dichas células madre epiteliales, el método comprendiendo:

- 5 proporcionar una matriz extracelular;  
 incubar dichas células madre epiteliales o dicho fragmento de tejido aislado que comprende dichas células madre epiteliales con la matriz extracelular; y  
 10 cultivar las células madre epiteliales o fragmento de tejido aislado en presencia de un medio de cultivo celular que comprende un medio basal para células de animales o humanas al que se le añade:
- 15 nogina;  
 entre 5 y 500 ngram/ml de un factor de crecimiento mitogénico seleccionado de factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de transformación alfa, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor neurotrófico derivado del cerebro y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF); y  
 un agonista de Wnt seleccionado de R-espondina 1, R-espondina 2, R-espondina 3 y R-espondina 4.

**2.** El método de la reivindicación 1, en donde dicho medio de cultivo comprende además

- 20 un inhibidor de Rock (Rho-quinasa), opcionalmente seleccionado de Y-27632, Fasudil, y H-1152; y/o un agonista de notch.

**3.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el método es para cultivar un organoide, en donde el organoide comprende las células madre epiteliales.

**4.** Un método para obtener un organoide pancreático cultivando células madre epiteliales pancreáticas, o fragmentos de tejido que comprenden dichas células madre epiteliales, usando un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el paso de cultivar comprende:

- 30 - cultivar dichas células madre epiteliales pancreáticas o fragmentos de tejido que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en un primer paso en un medio que comprende Nogina, EGF y KGF o FGF, y R-espondina 1 como agonista de Wnt, suplementado con B27, N2, y/o N-acetilcisteína, y que opcionalmente comprende además gastrina, exendina y nicotinamida, y  
 35 - posteriormente en un segundo paso en un medio que comprende EGF y KGF o FGF, y R-espondina 1 como agonista de Wnt, suplementado con B27, N2, y/o N-acetilcisteína.

**5.** Un método para obtener un organoide gástrico cultivando células madre epiteliales gástricas, o fragmentos de tejido que comprenden dichas células madre epiteliales, usando un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el paso de cultivar comprende:

- 40 - cultivar dichas células madre epiteliales gástricas o fragmentos de tejido que comprenden dichas células madre epiteliales en contacto con una matriz extracelular en un primer paso en un primer medio que comprende Nogina, EGF y FGF10, y R-espondina 1 y Wnt-3a como agonista de Wnt, y que comprende además B27, N2, y/o N-acetilcisteína, y  
 45 - posteriormente en un segundo paso en un medio en donde el medio es idéntico al primer medio excepto que la concentración de Wnt-3a se reduce en el segundo paso en comparación con la concentración de Wnt-3a que está presente en el primer paso.

**6.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la matriz extracelular comprende un colágeno y laminina.

**7.** Un organoide de tejido tridimensional, en donde el organoide conserva la presencia de células madre epiteliales que retienen un fenotipo diferenciado y capacidades de automantenimiento, en donde las células no epiteliales están ausentes de dicho organoide, y en donde dicho organoide puede obtenerse por un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

**8.** Una colección de más de 10 organoides, como se define en la reivindicación 7.

**9.** El uso del organoide de la reivindicación 7, o la colección de organoides en la reivindicación 8, en una selección de descubrimiento de fármacos *in vitro* o ensayo de toxicidad.

**10.** El organoide de la reivindicación 7, o la colección de organoides de la reivindicación 8, para su uso en medicina regenerativa.

65

Fig 1

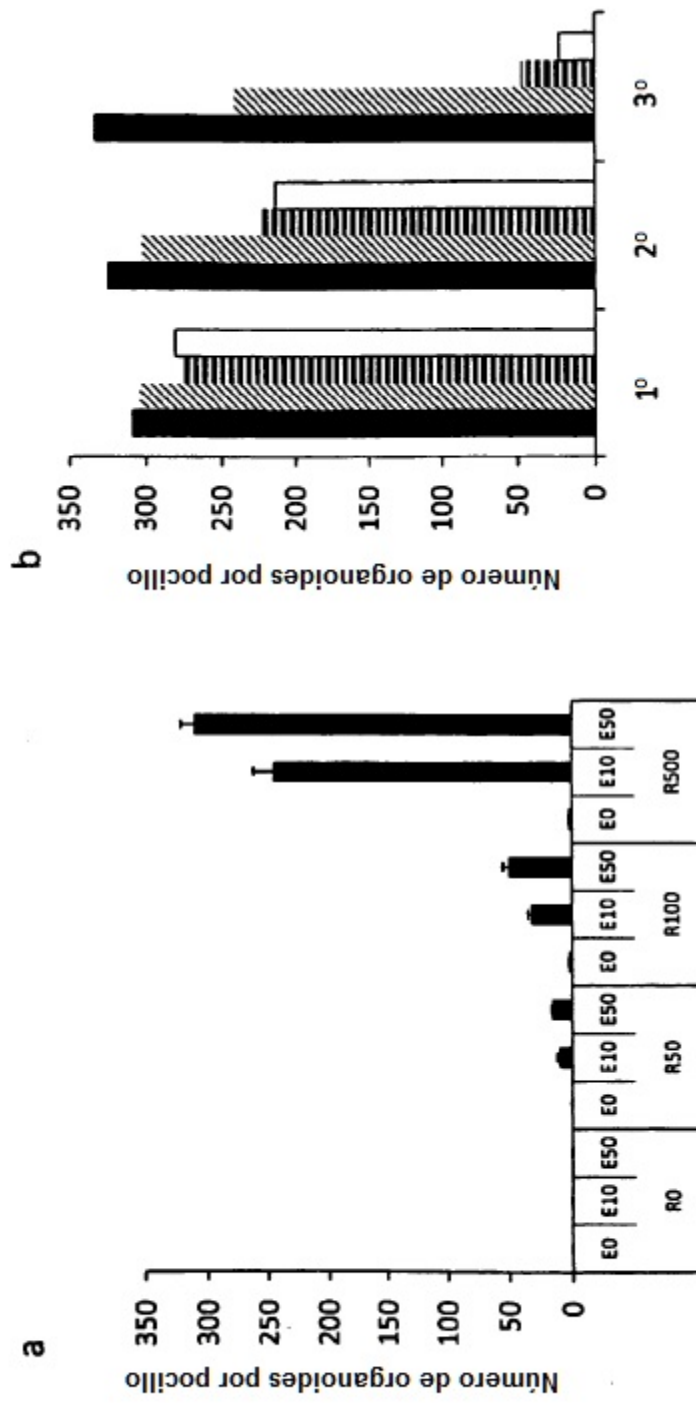
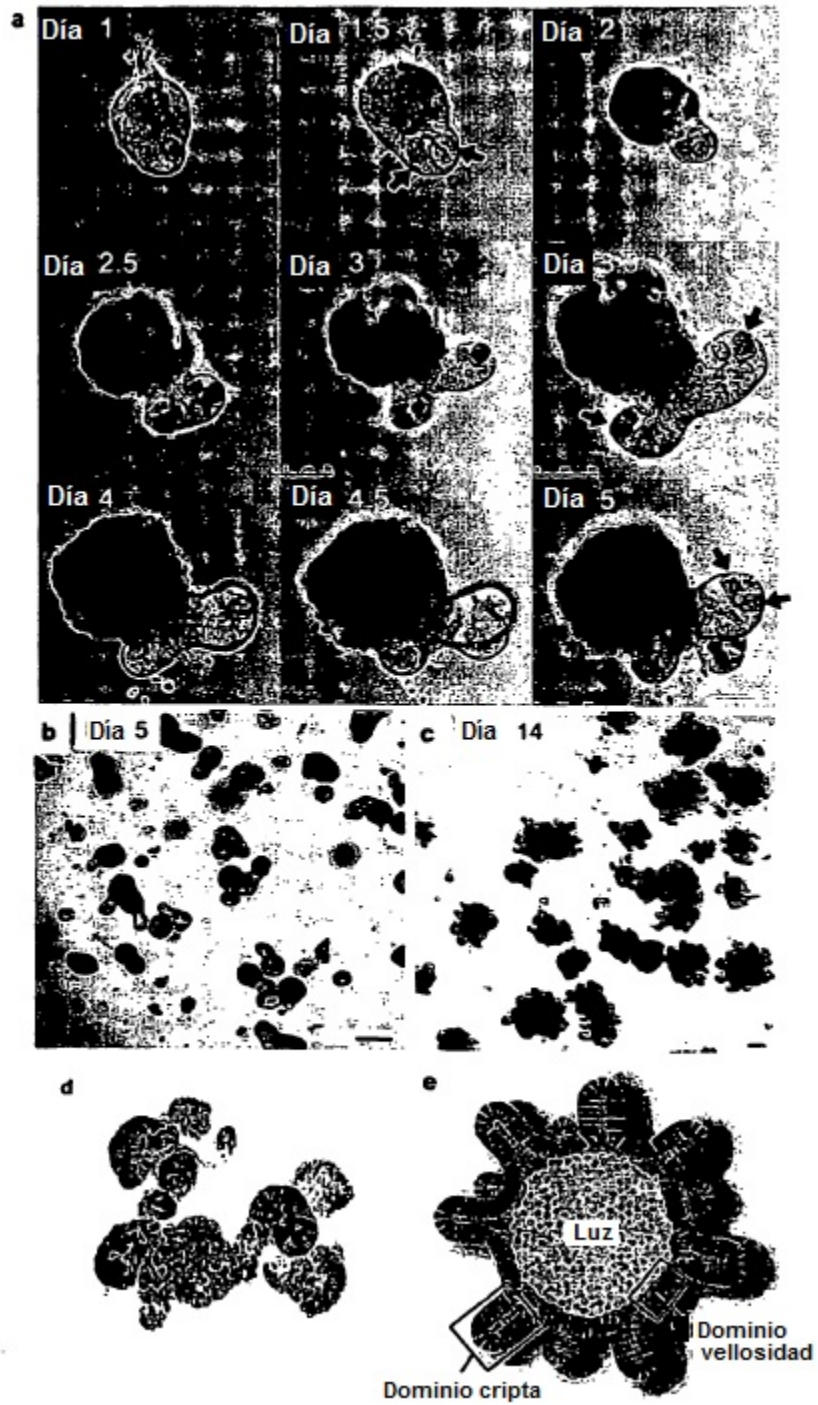
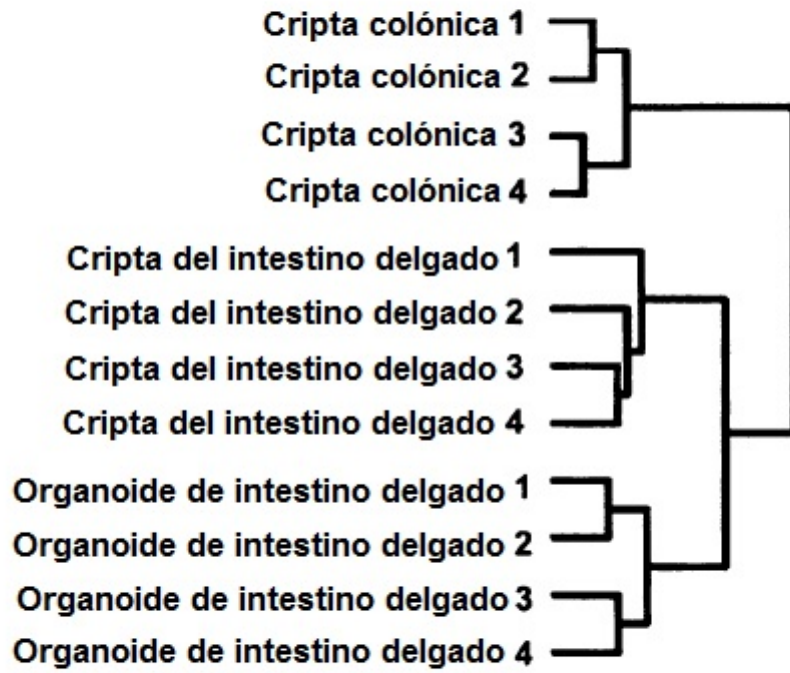


Fig 2



*Fig 3*



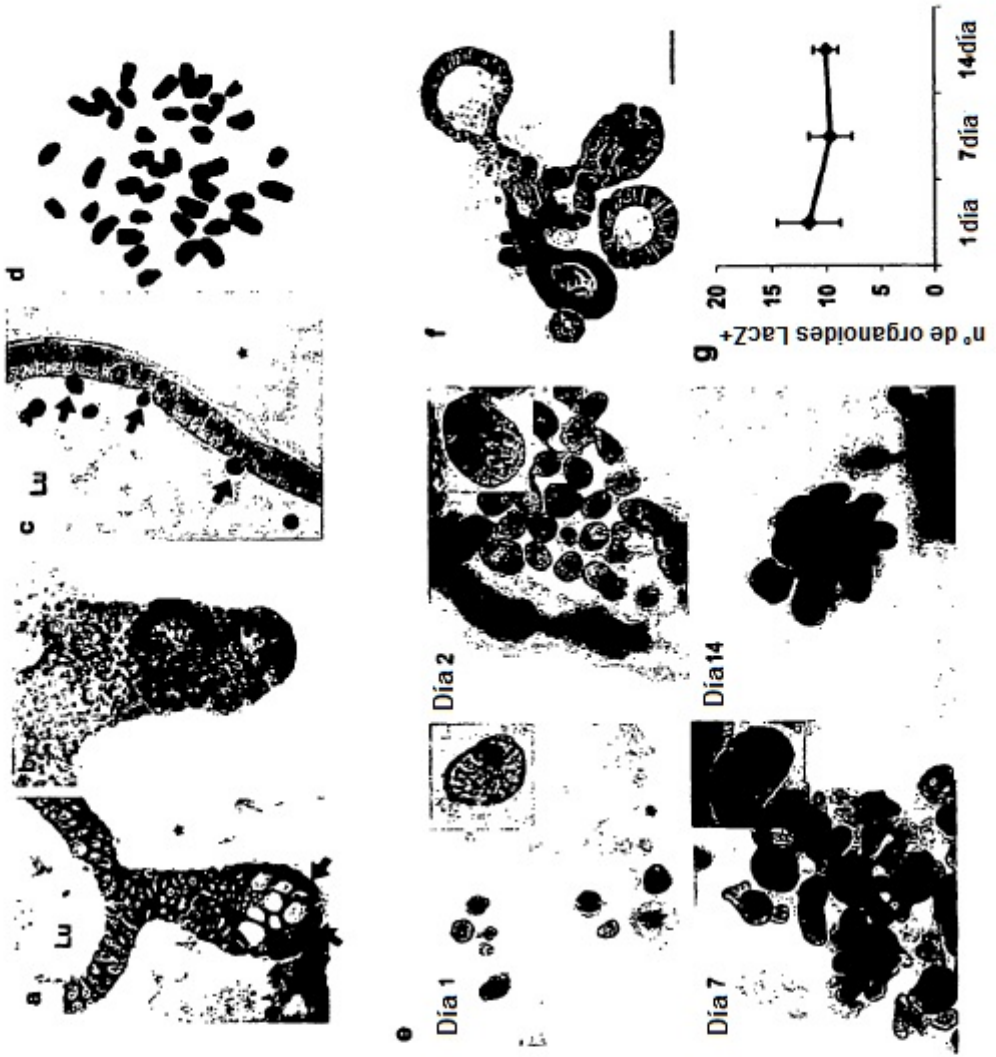


Fig 4



*Fig 5b*

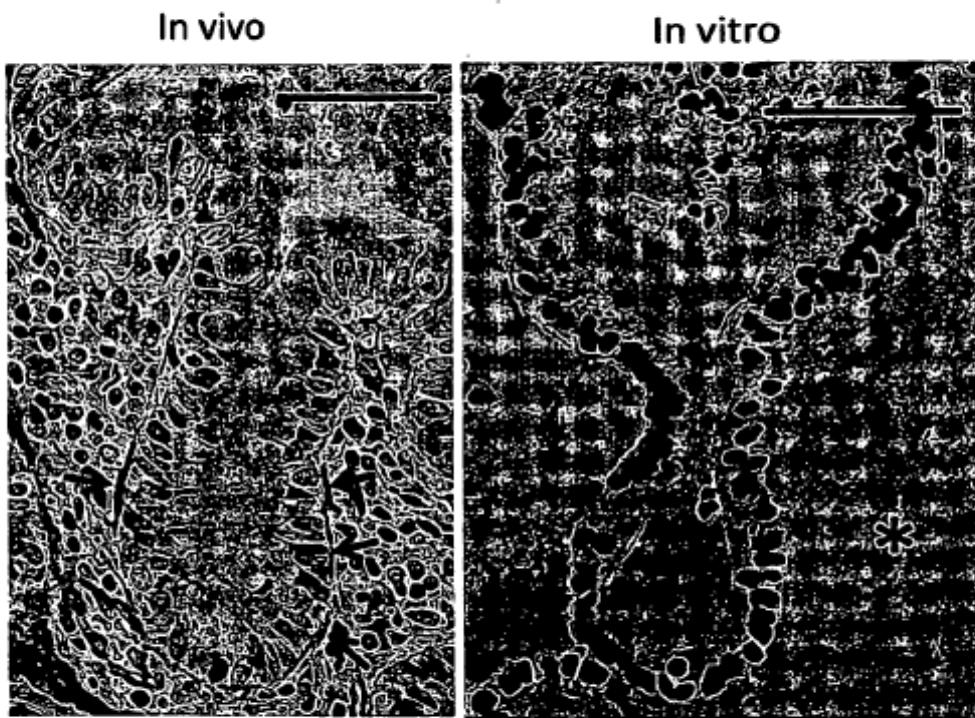


*Fig 5c*

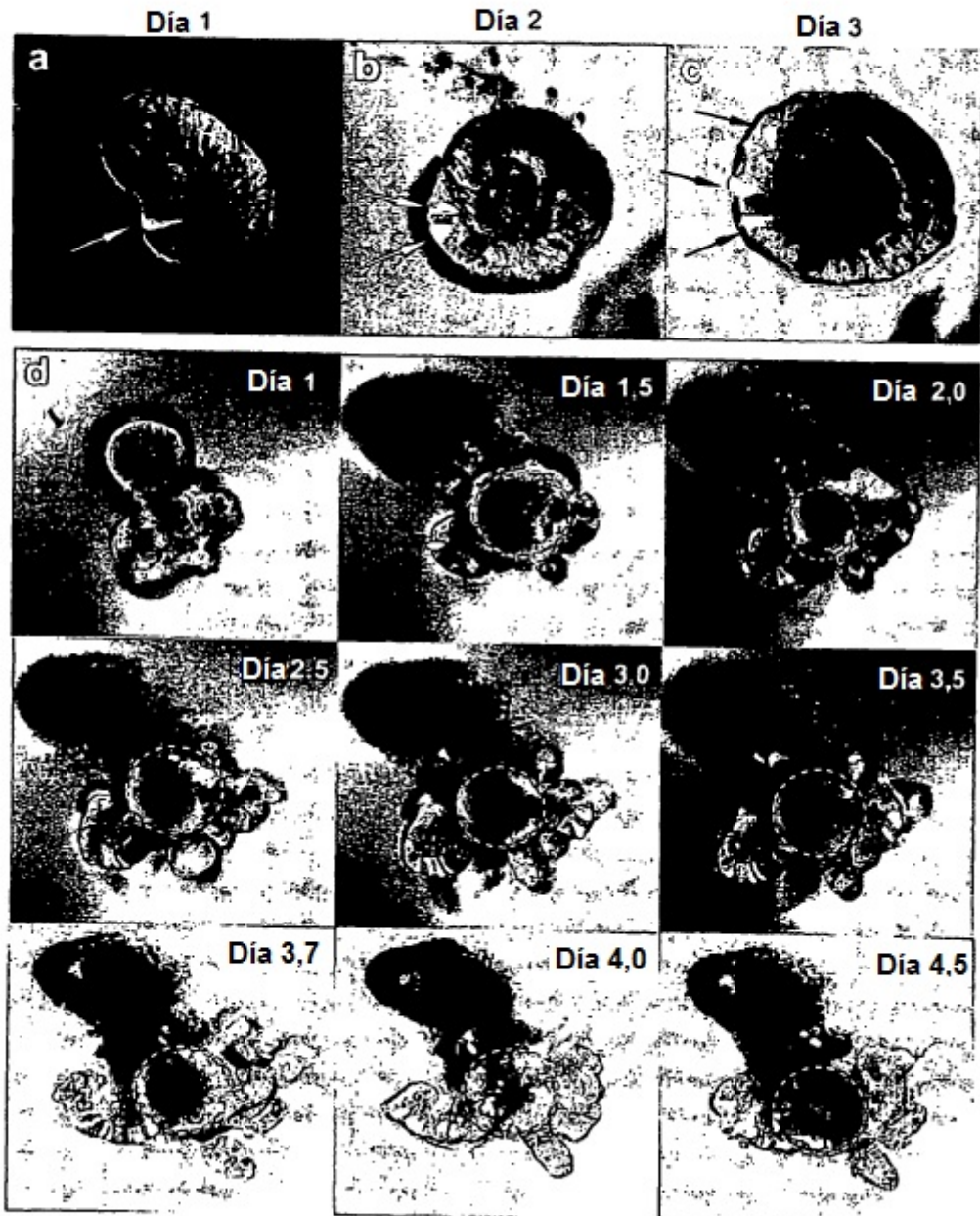


*Fig 5a*

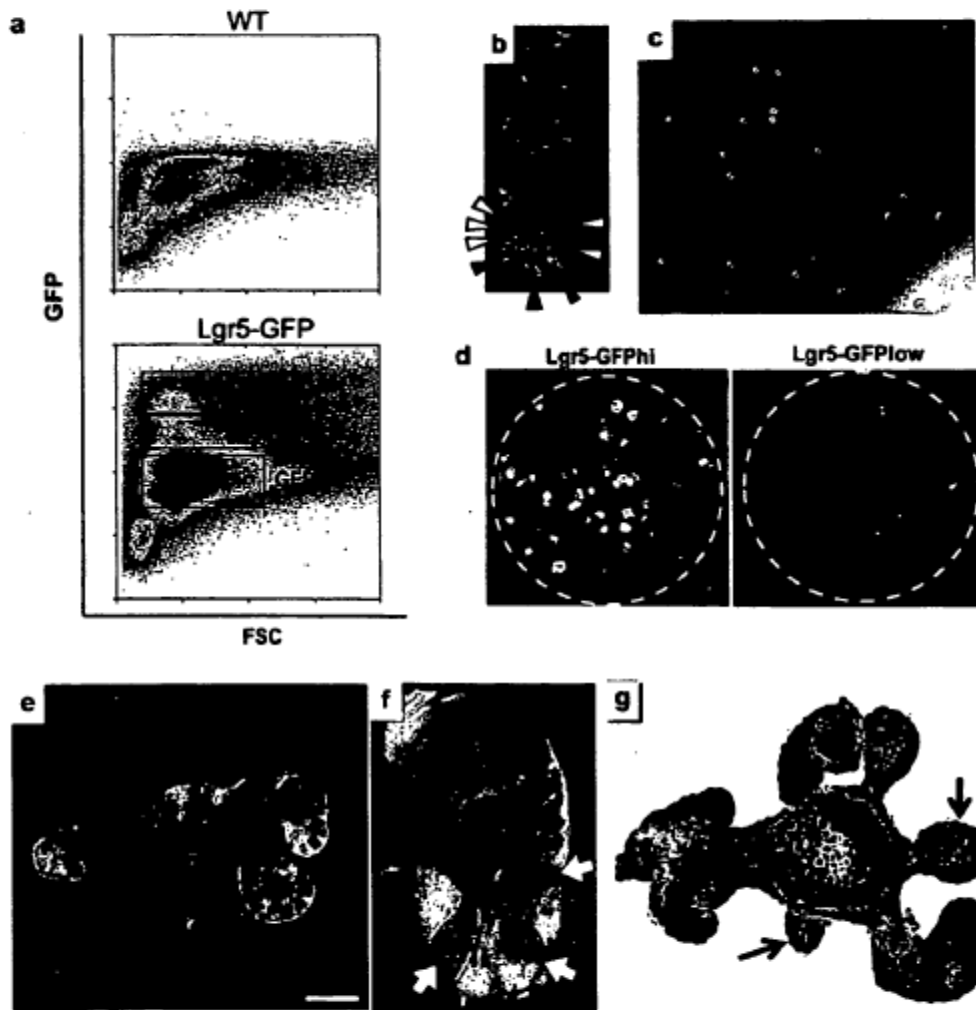
*Fig 6*



*Fig 7*



*Fig 8*



**Fig 9**

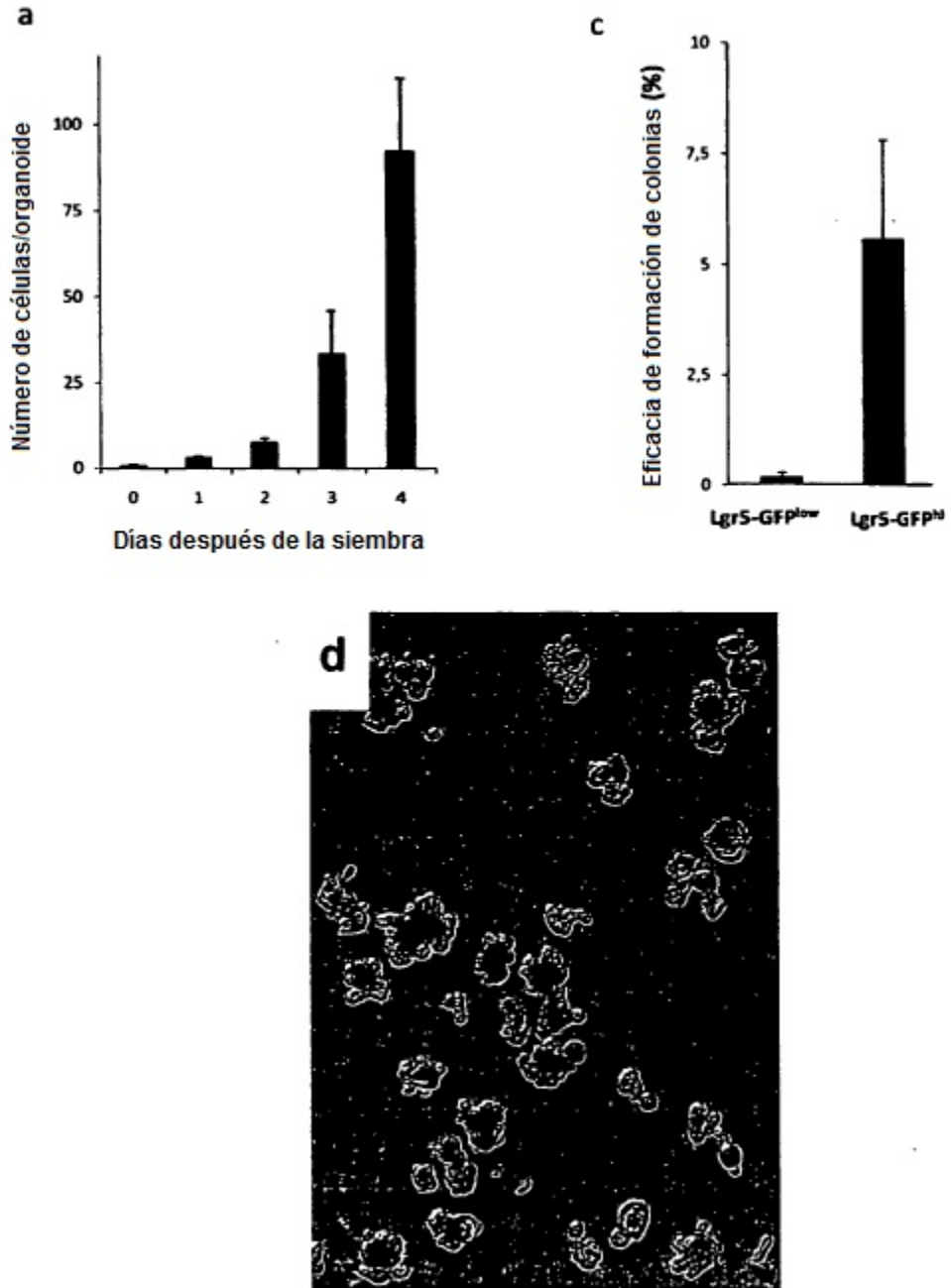
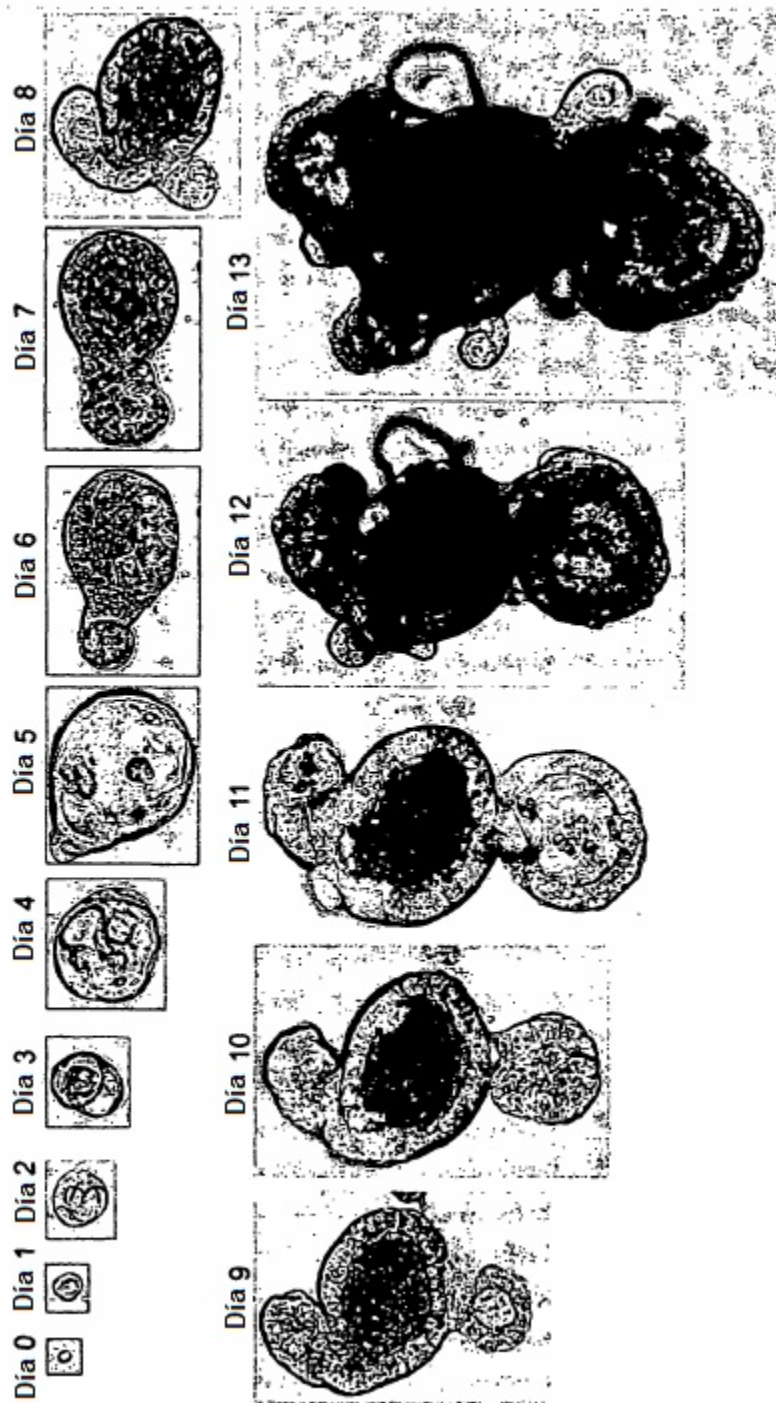


Fig 9b



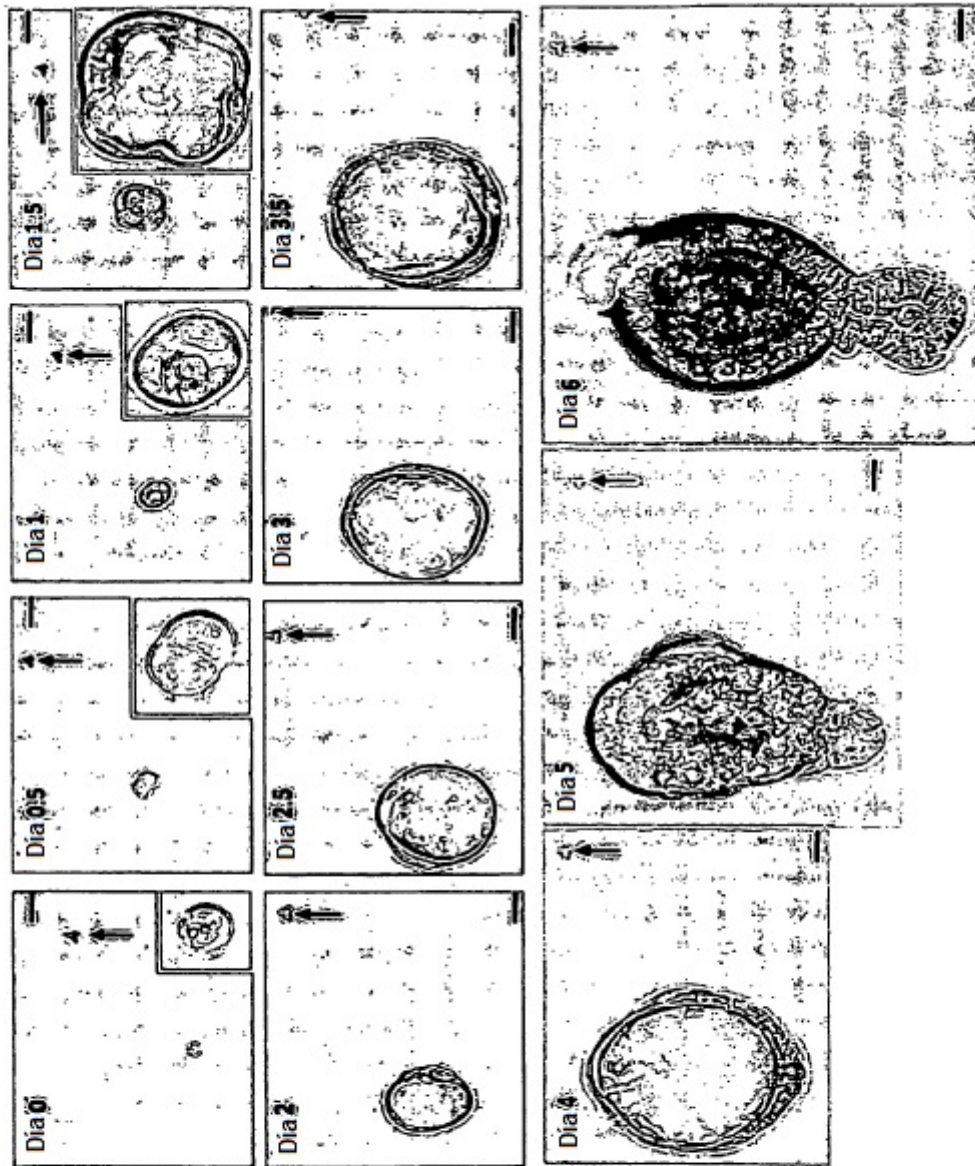


Fig 10

*Fig 11*

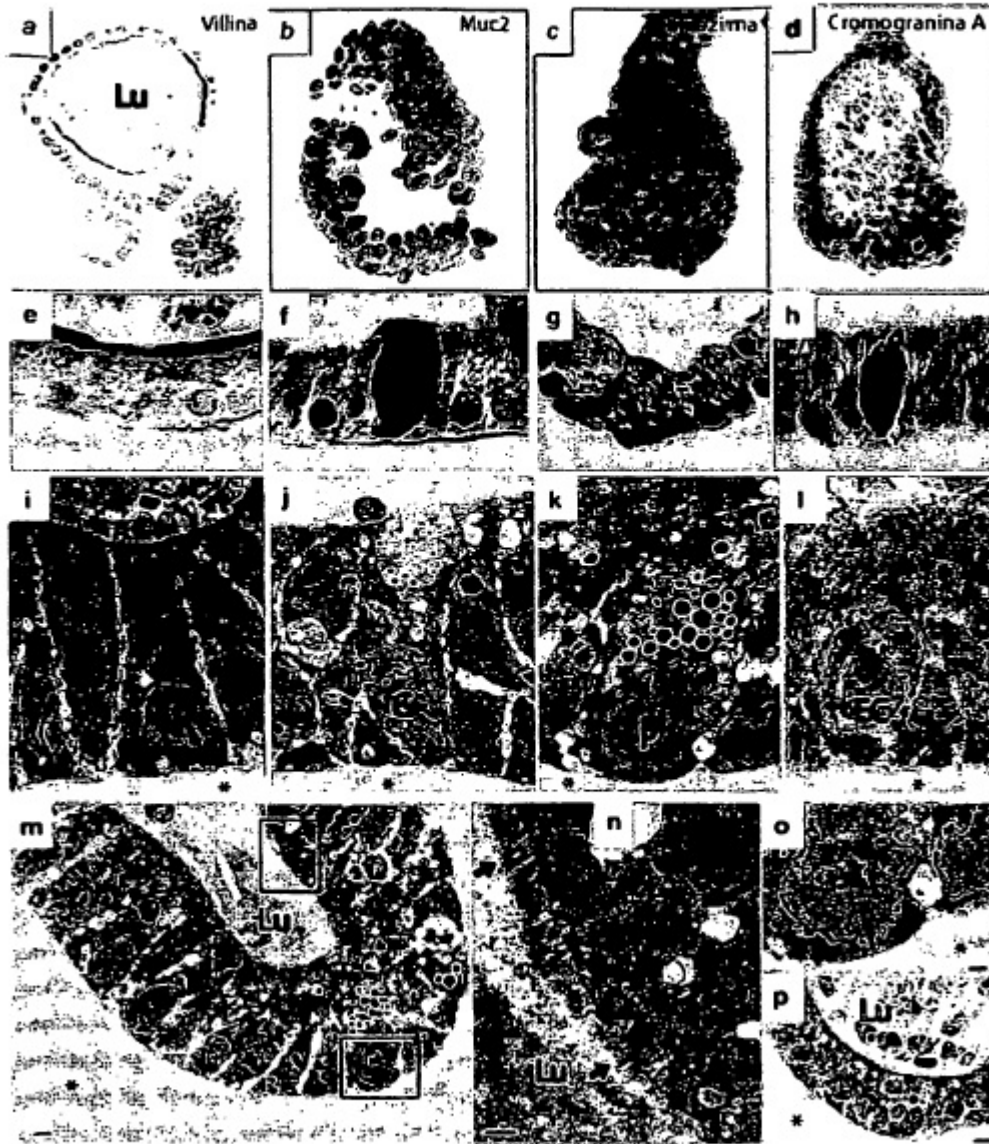
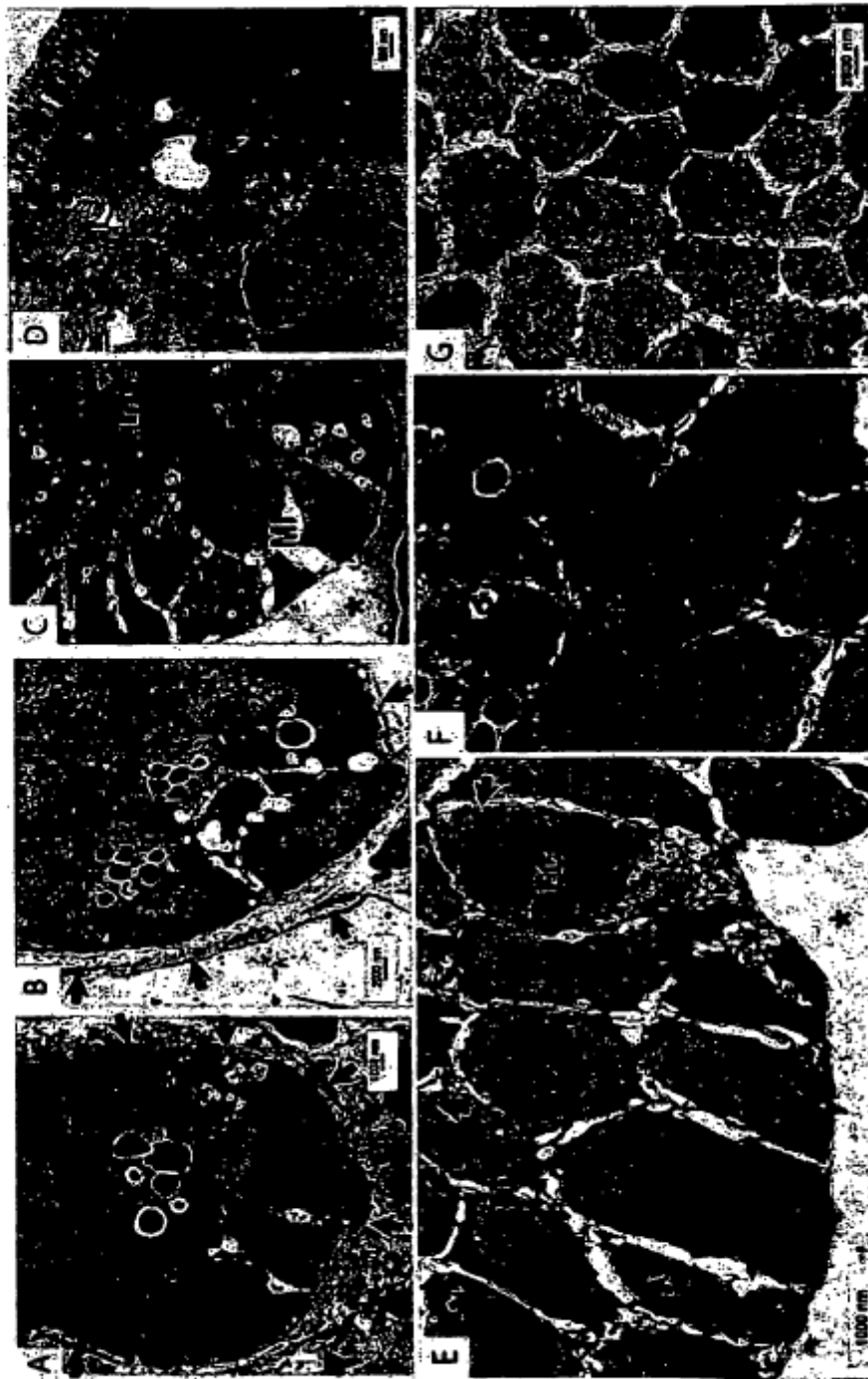


Fig 12



*Fig 13*



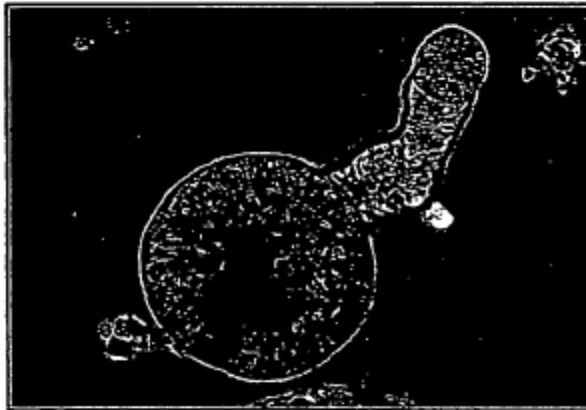
**Fig 14a**

**Criptas  
de colon  
recién  
aisladas**



**Fig 14b**

**Organoide  
de cripta  
de colon  
Día 4**

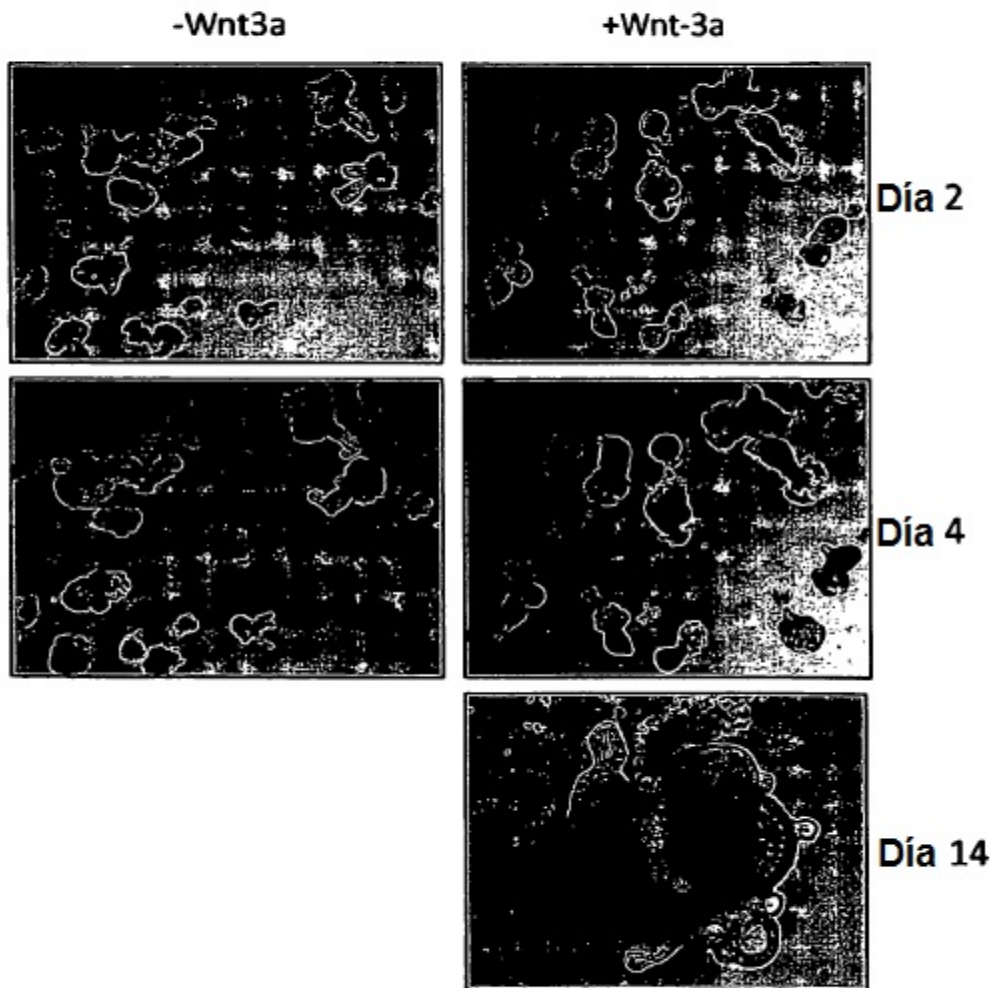


**Fig 14c**

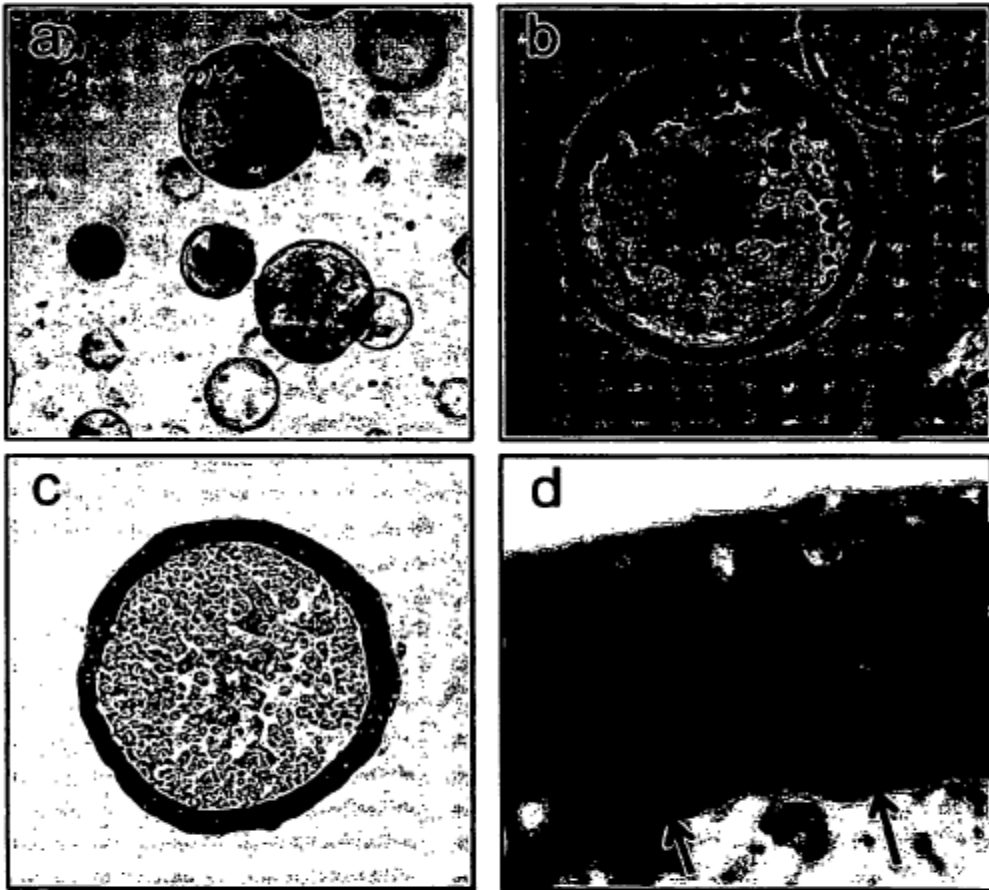
**Organoide  
de cripta  
de colon  
Día 14**



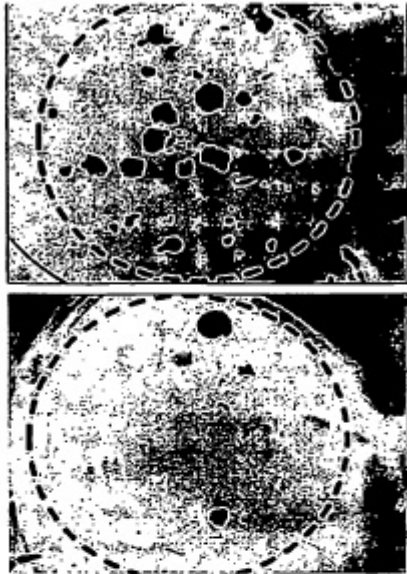
*Fig 15*



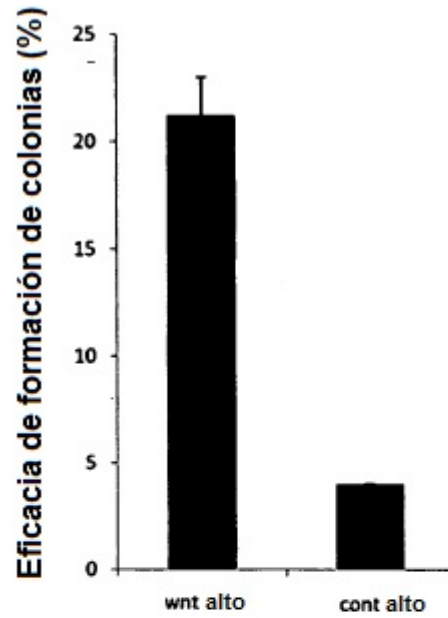
*Fig 16*



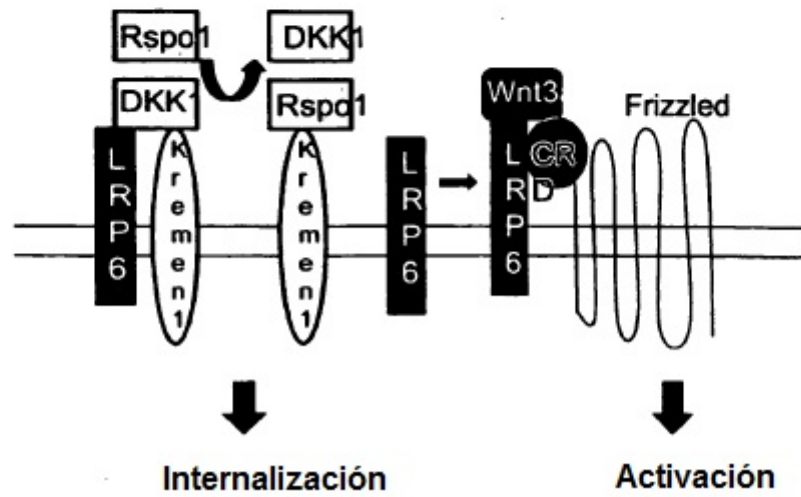
*Fig 17a*



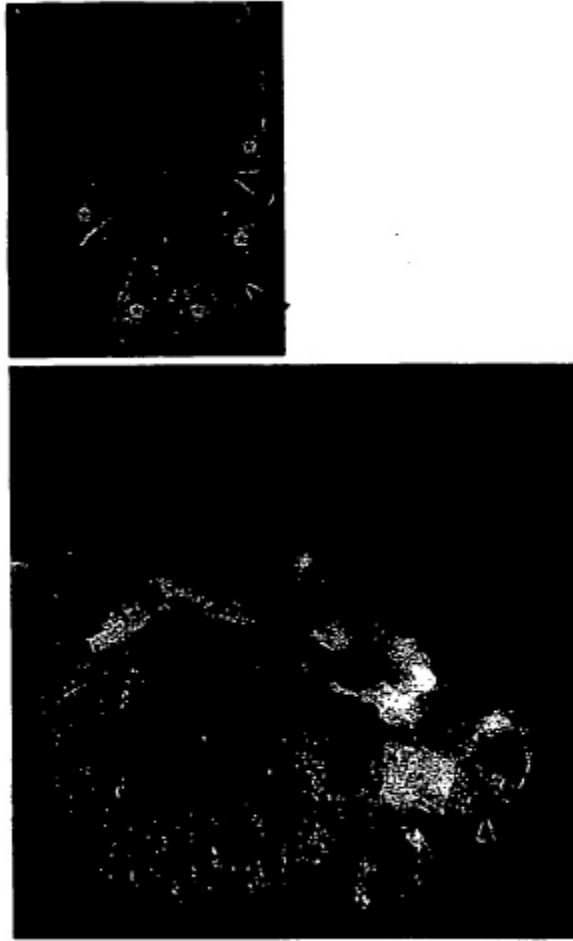
*Fig 17b*



*Fig 18*



*Fig 19*



*Fig 20*

Control

Quelante de cinc

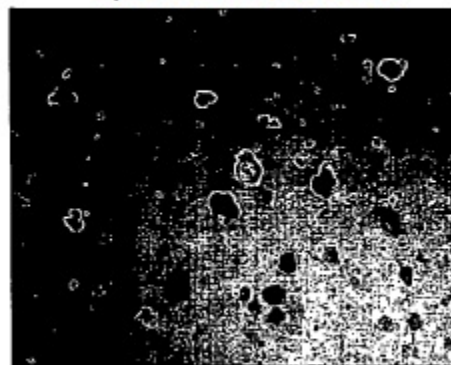
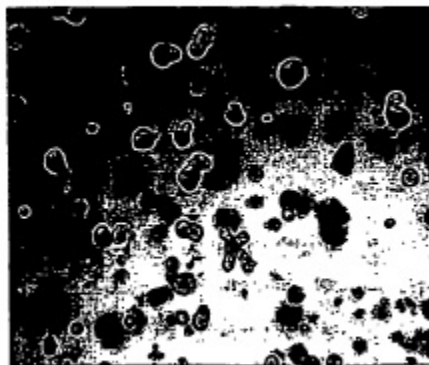


Fig 21a



Fig 21b

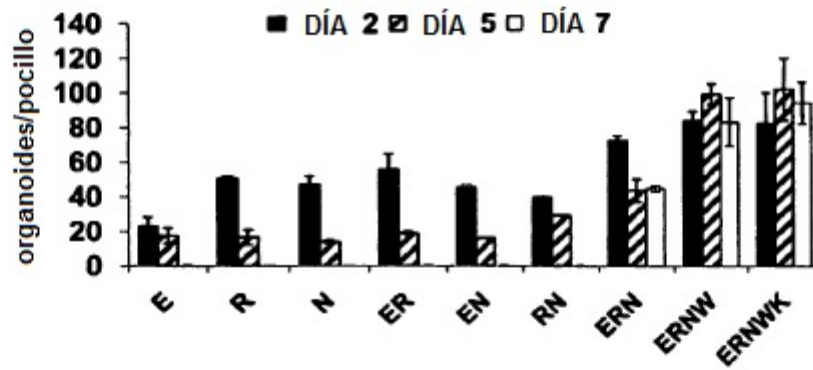


Fig 21c

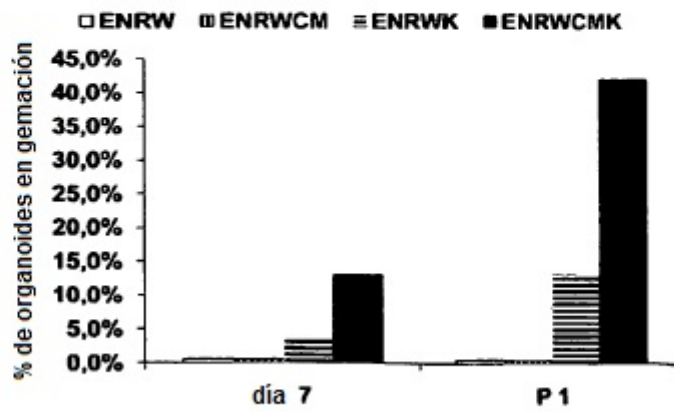


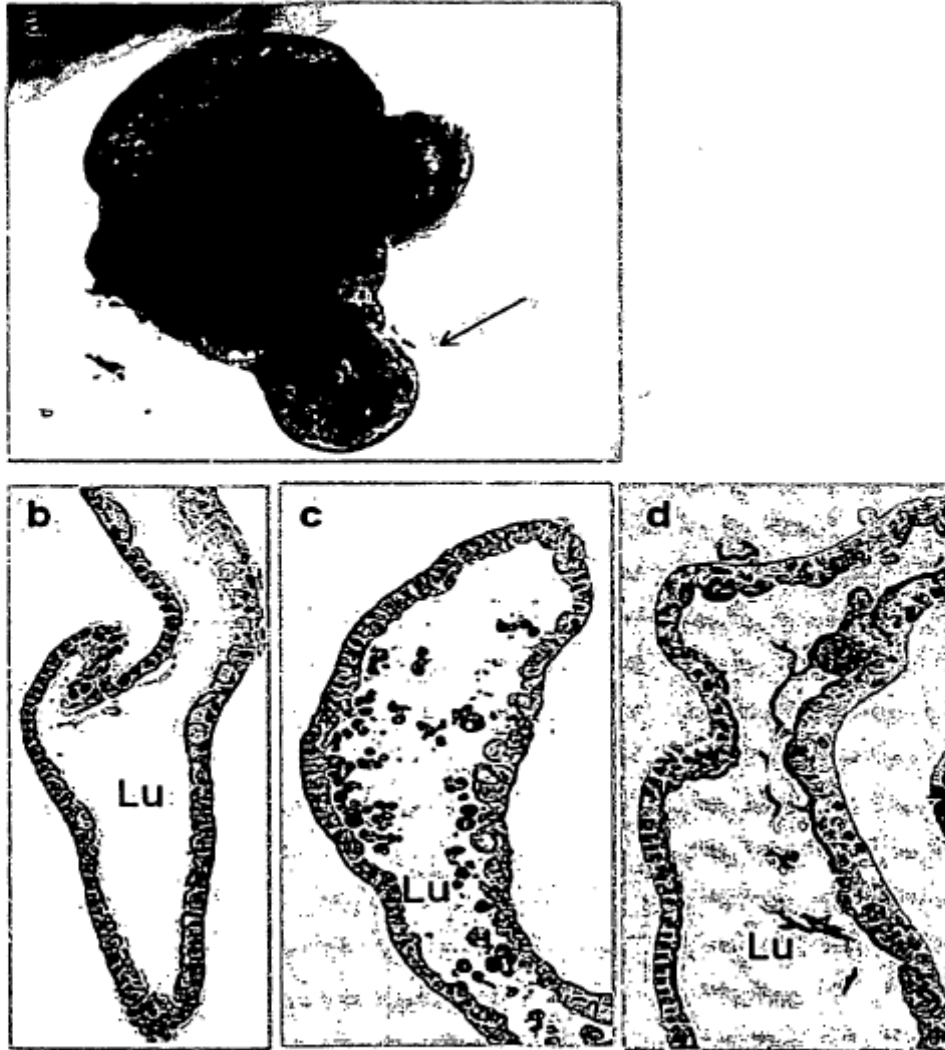
Fig 22a



Fig 22b



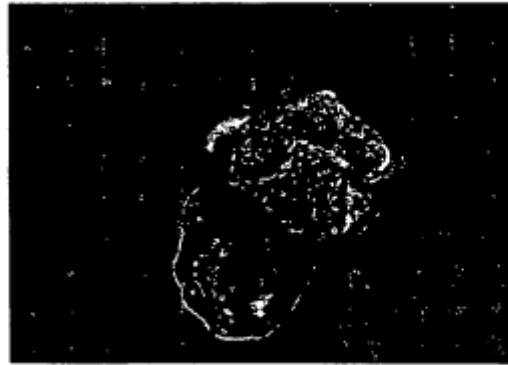
*Fig 23*



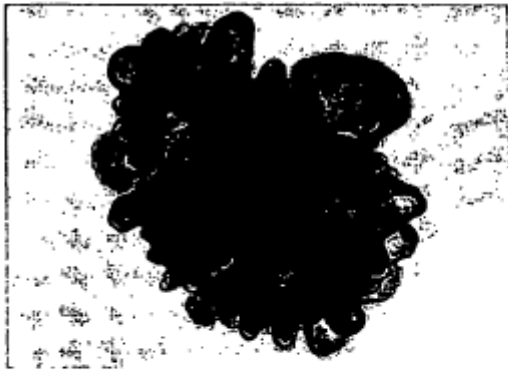
*Fig 24a*



*Fig 24b*

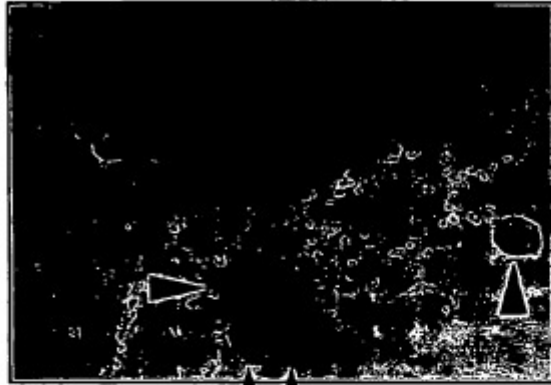


*Fig 24c*



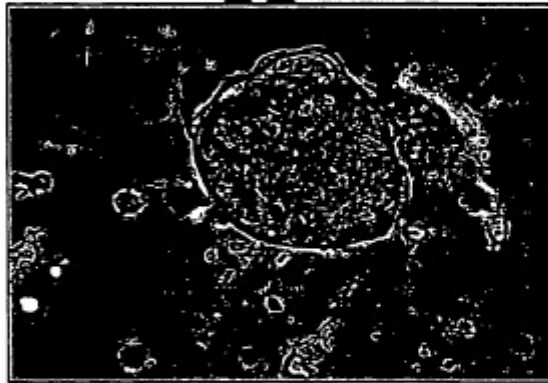
**Fig 25a**

Organoide de  
conducto  
pancreático con  
estructuras de  
tipo islote  
(flechas)  
Día 21



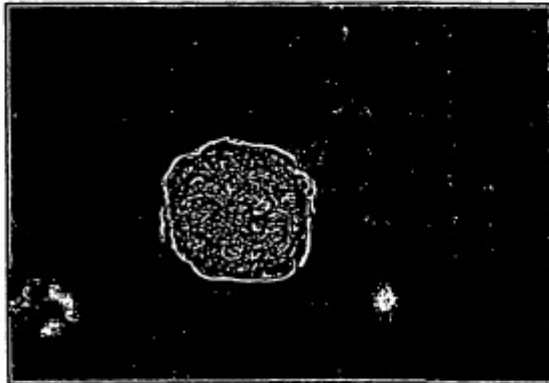
**Fig 25b**

Estructura de  
tipo islote  
(gran aumento)

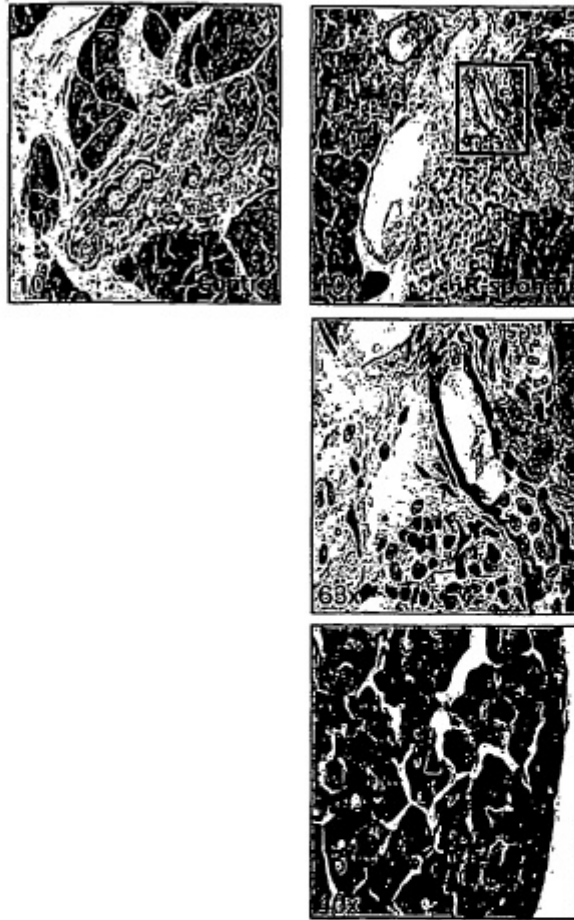


**Fig 25c**

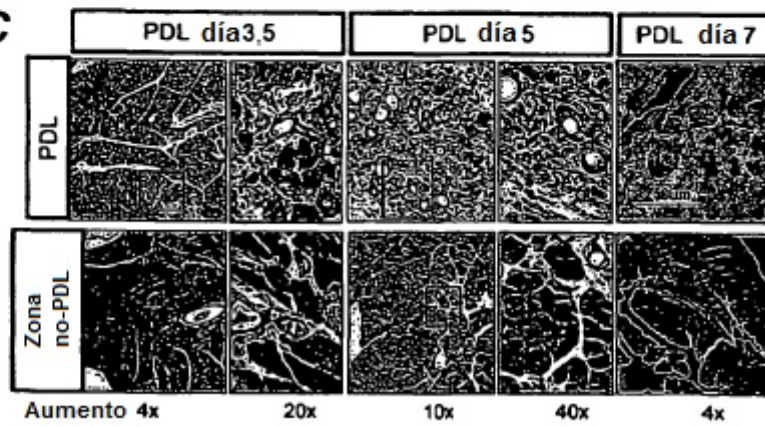
Estructura de tipo  
islote pancreático



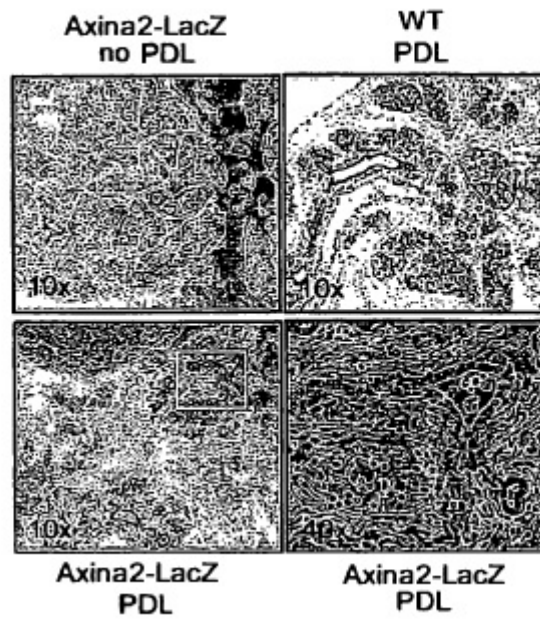
*Fig 26a*



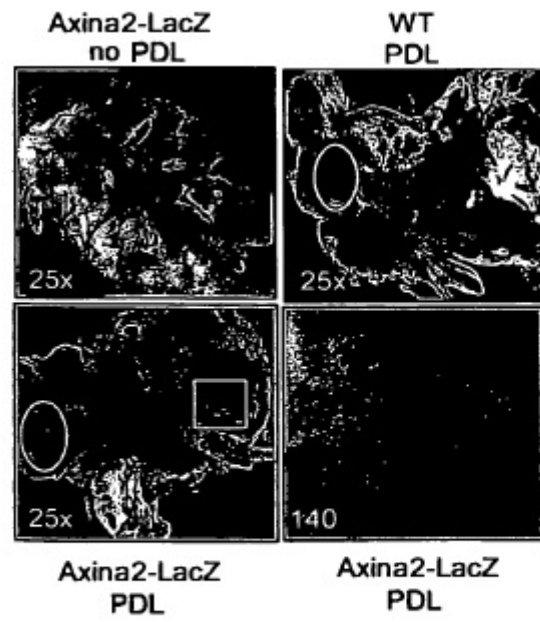
*Fig 26c*



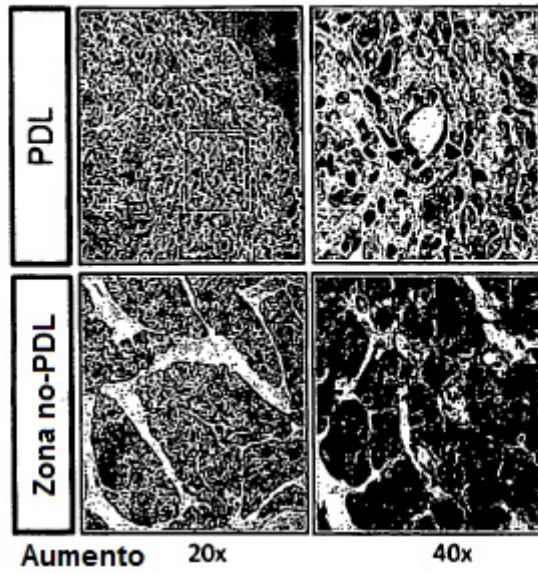
*Fig 26d*



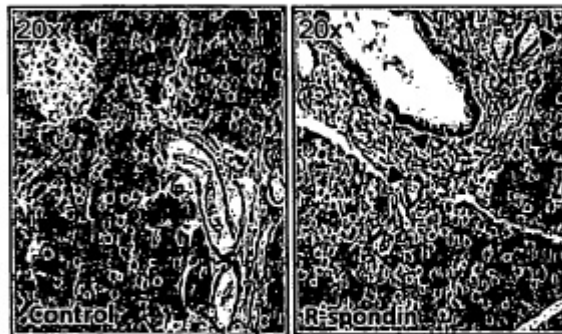
*Fig 26e*



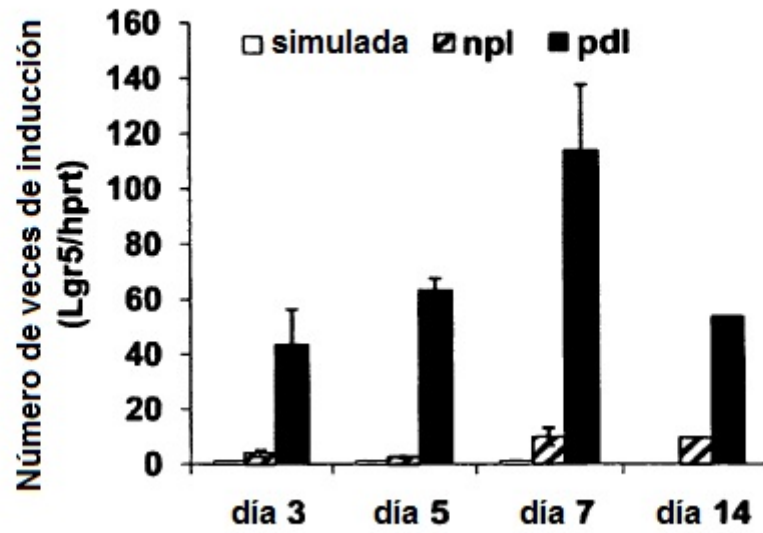
*Fig 26f*



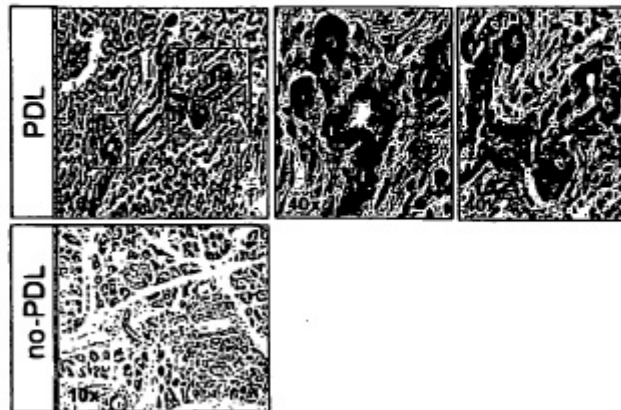
*Fig 26g*



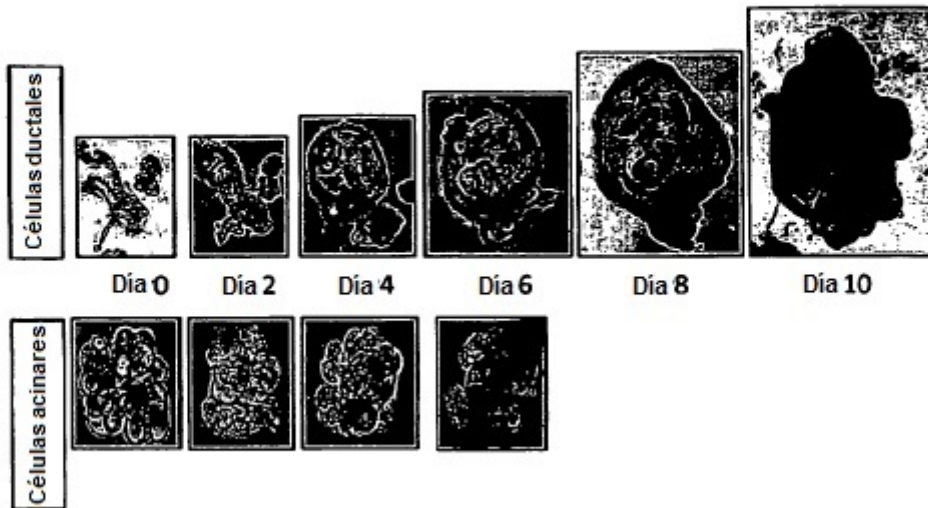
*Fig 26h*



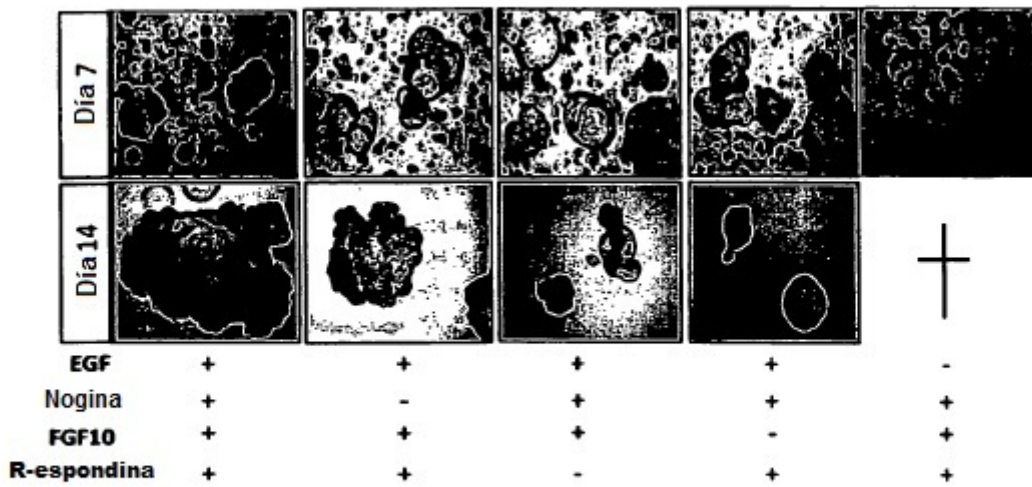
*Fig 26i*



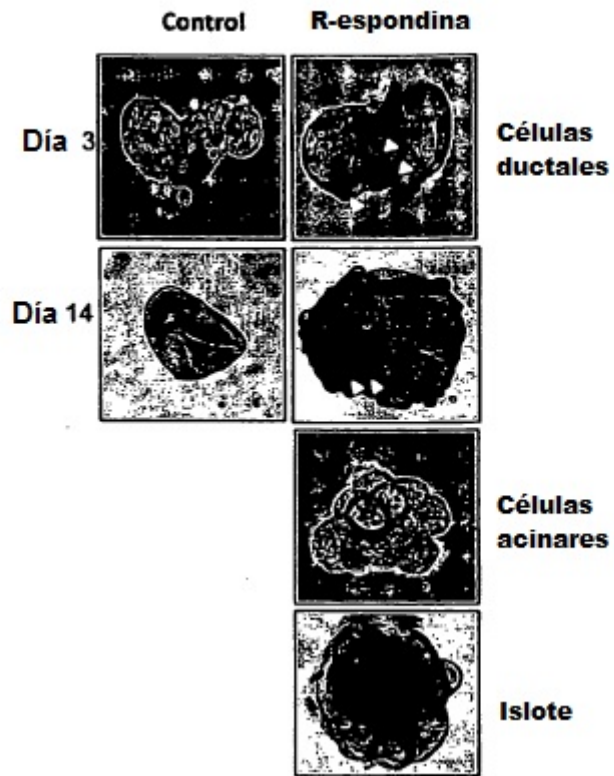
*Fig 27a*



*Fig 27b*



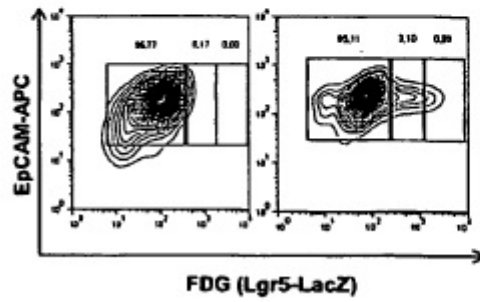
*Fig 27c*



*Fig 27d*

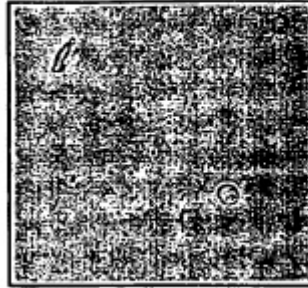


*Fig 27e*

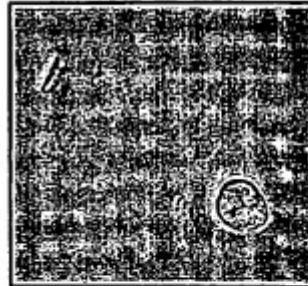


*Fig 28*

**Día 0**



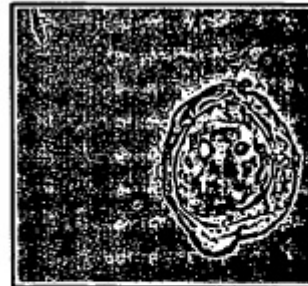
**Día 3**



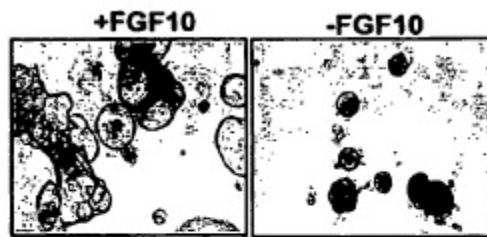
**Día 5**



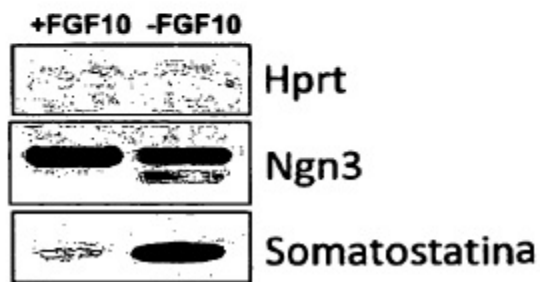
**Día 7**



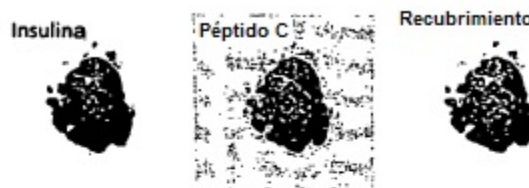
*Fig 29a*



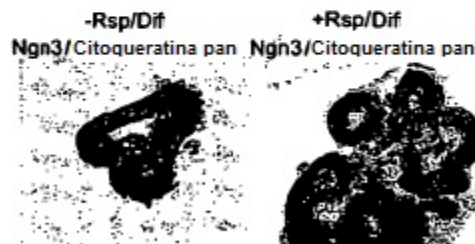
*Fig 29b*



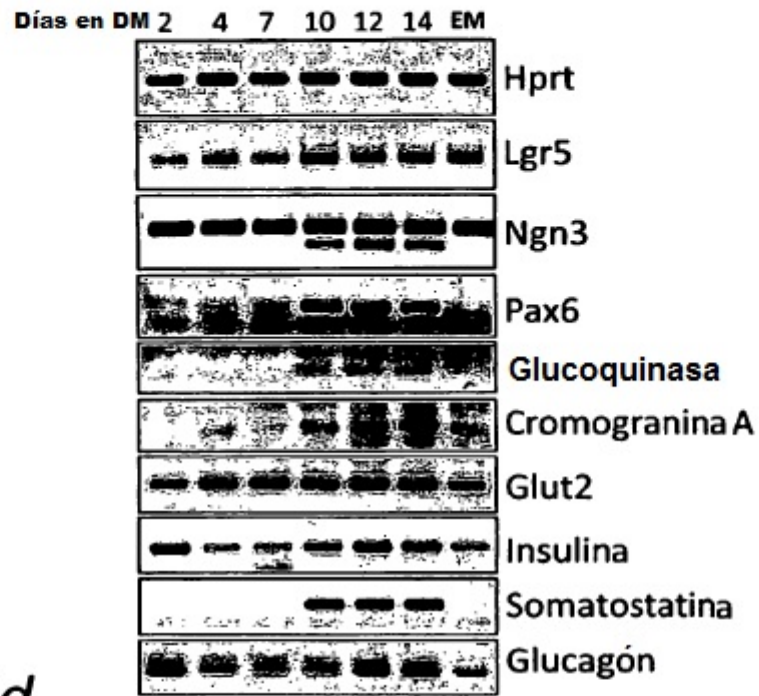
*Fig 29e*



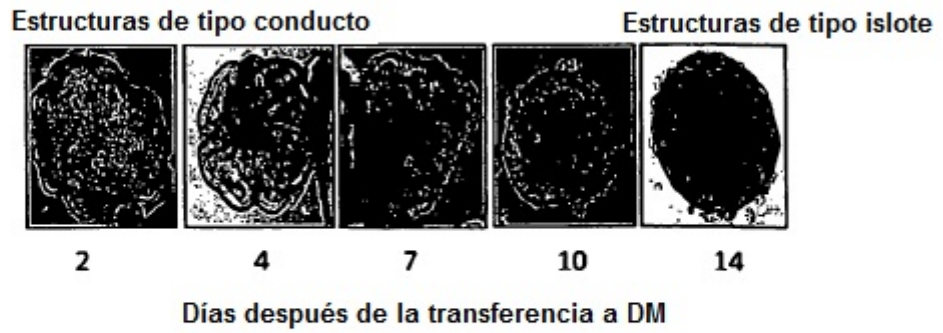
*Fig 29f*



*Fig 29c*



*Fig 29d*



*Fig 30*

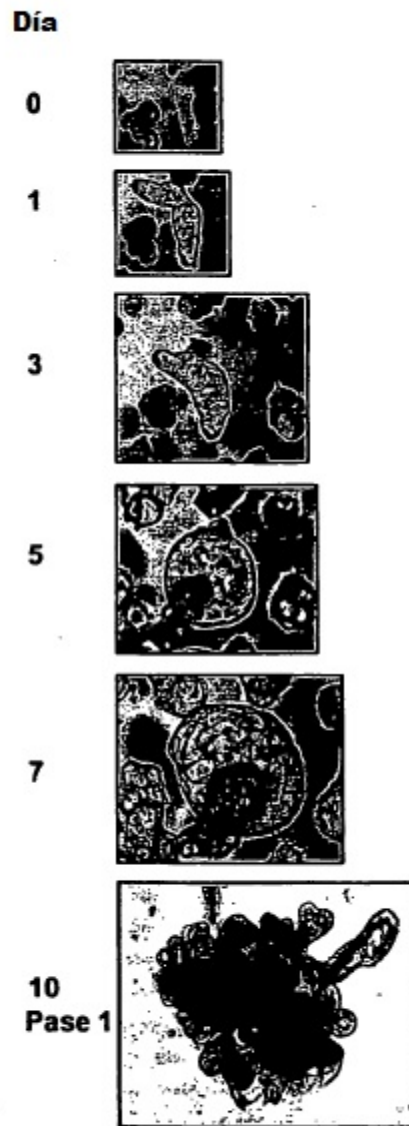


Fig 31a

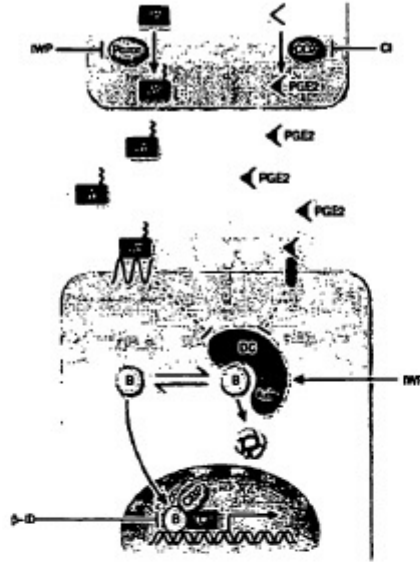


Fig 31

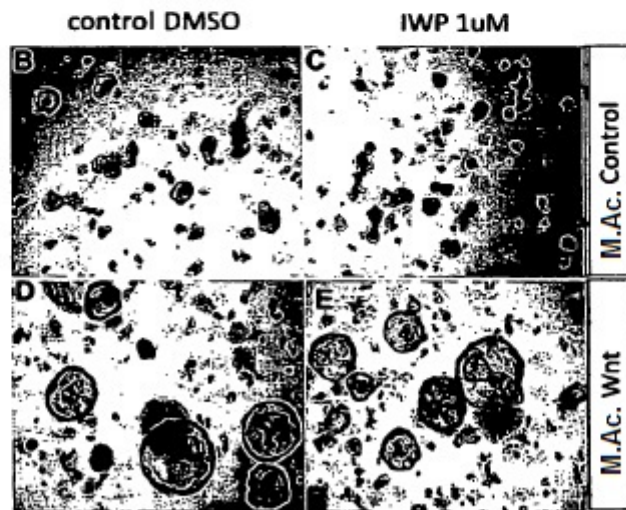
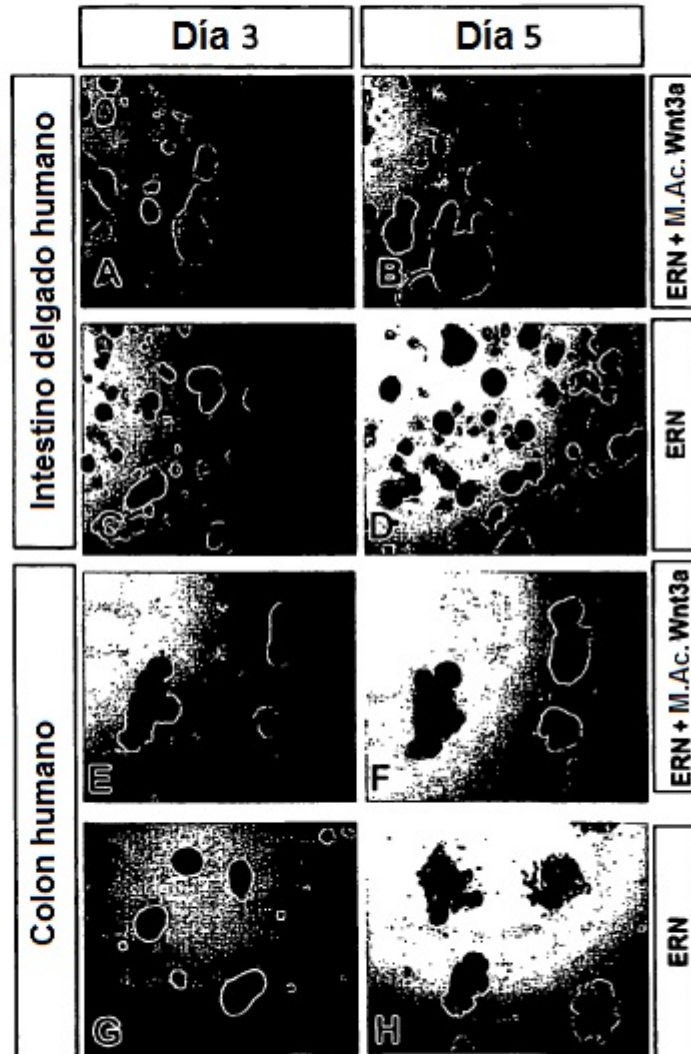
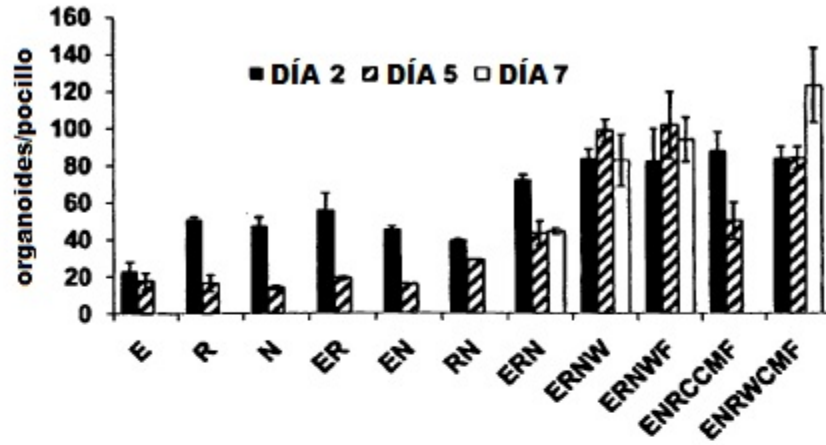


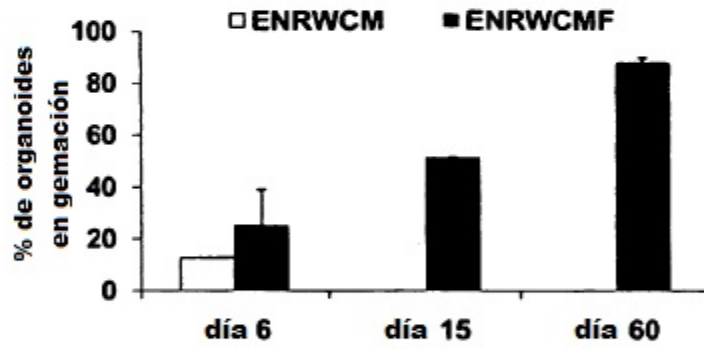
Fig 32



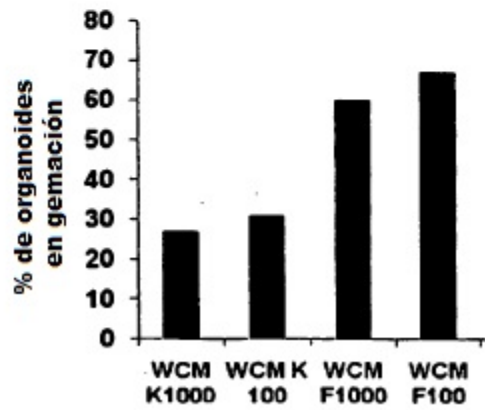
*Fig 33a*



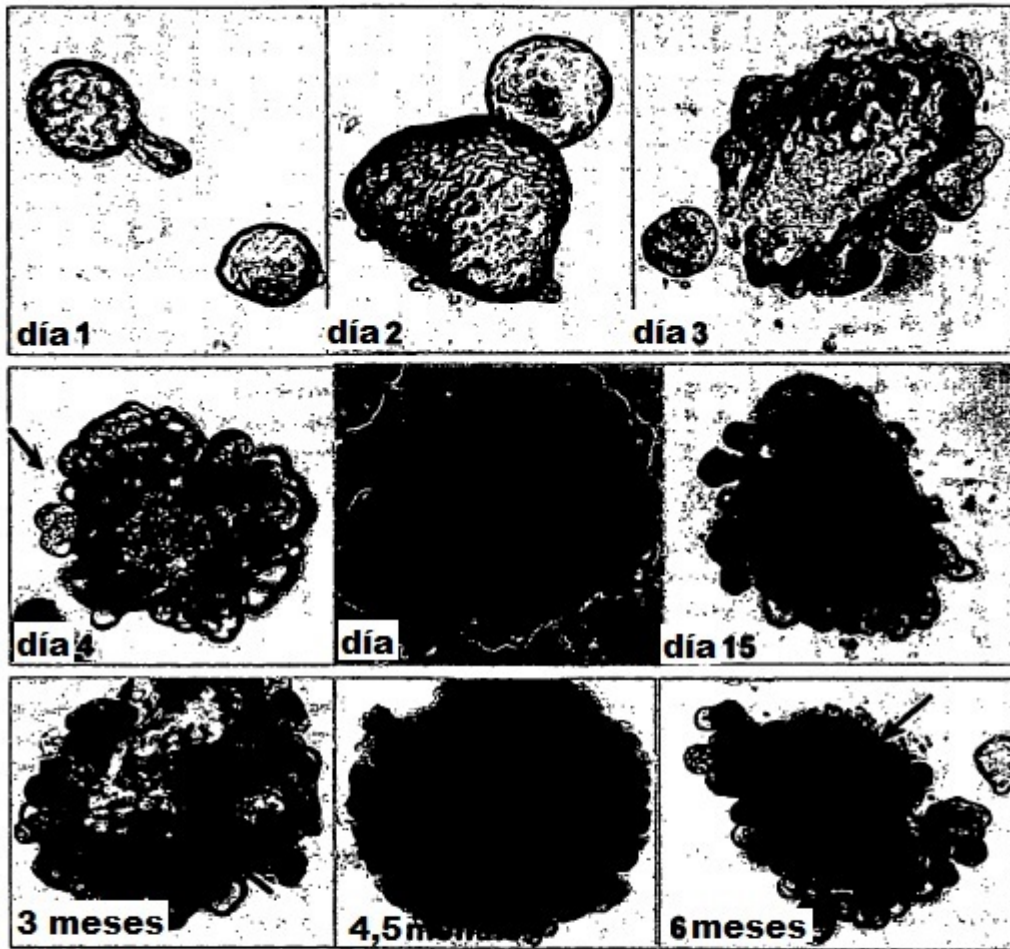
*Fig 33b*



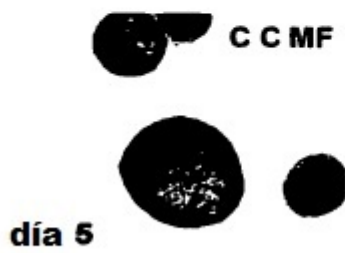
*Fig 33c*



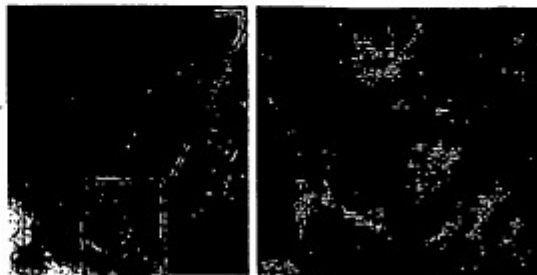
*Fig 33d*



*Fig 33e*



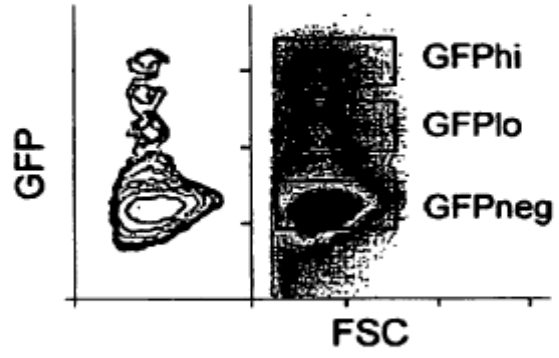
*Fig 33f*



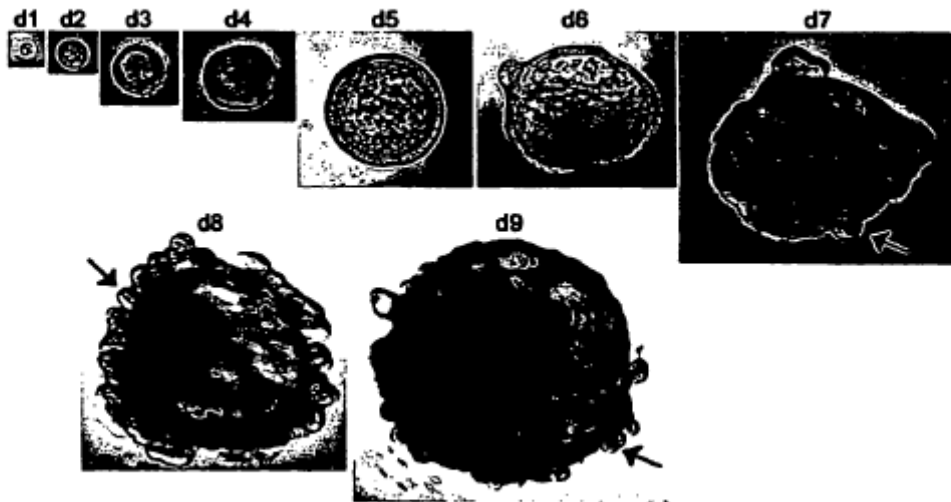
*Fig 34a*



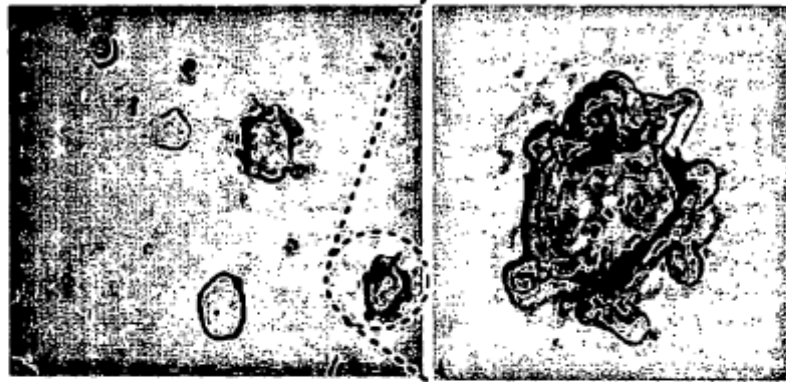
*Fig 34b*



*Fig 34c*



*Fig 34d*



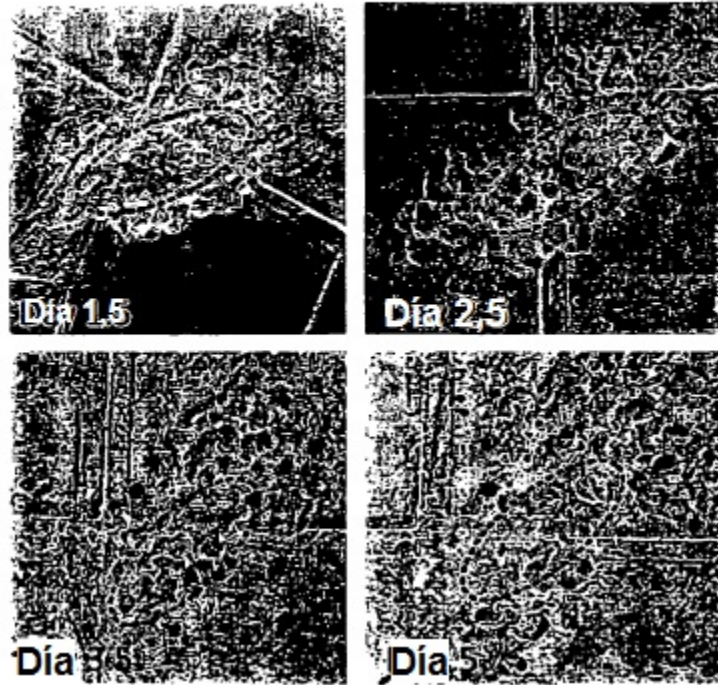
*Fig 34e*



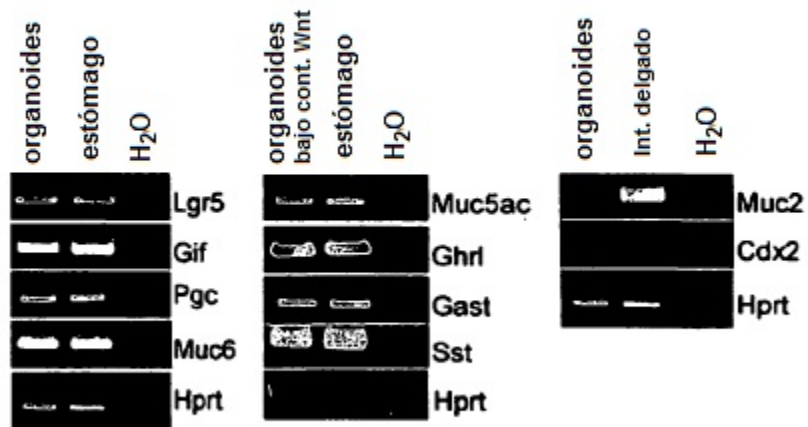
*Fig 34f*



*Fig 34g*



*Fig 34h*



*Fig 34i*

