

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 866**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0793 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2013 PCT/EP2013/076552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14090993**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2013 E 13803067 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 2931879**

54 Título: **Cultivo de tejido tridimensional heterogéneamente diferenciado**

30 Prioridad:

13.12.2012 EP 12196954

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

25.03.2021

73 Titular/es:

**IMBA-INSTITUT FÜR MOLEKULARE
BIOTECHNOLOGIE GMBH (100.0%)
Dr. Bohrgasse 3
1030 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**KNOBLICH, JÜRGEN y
LANCASTER, MADELINE A.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 813 866 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

Cultivo de tejido tridimensional heterogéneamente diferenciado

5 La presente invención se refiere al campo del modelado de cultivos de tejido artificiales.

10 El desarrollo del cerebro humano es de interés principal en la neurociencia, tanto por la naturaleza de su complejidad como porque los defectos en el desarrollo de este órgano único pueden conducir a una variedad de trastornos neurológicos devastadores. Por ejemplo, la microcefalia (MCPH), un trastorno marcado por un tamaño severamente reducido de la cabeza y el cerebro, conduce a defectos neurológicos con un mal pronóstico para la función cerebral normal (Cox et al., 2006).

15 Se han identificado varios genes como causantes de la MCPH (Thornton y Woods. 2009), por ejemplo ASPM (Bond et al., 2002) y CDK5RAP2 (Bond et al., 2005), y hasta ahora hay evidencia de todos ellos apuntando a un papel en el centrosoma o el polo del huso de las células en división (Megraw et al., 2011). En particular, ASPM es el homólogo humano del huso anormal (asp) de *Drosophila*, mientras que CDK5RAP2 es el homólogo de centrosomina (cnn), los cuales regulan la organización centrosomal y del huso.

20 Hasta ahora, los esfuerzos dirigidos a descubrir los mecanismos patogénicos de MCPH y las funciones de estas proteínas en el desarrollo del cerebro humano se han basado en modelos de ratón. Sin embargo, los mutantes de ratón para estos genes, incluidos CDK5RAP2 (Barrera et al., 2010, Lizarraga et al., 2010) y ASPM (Pulvers et al., 2010), no han podido recapitular el tamaño cerebral severamente reducido observado en pacientes humanos con mutaciones en estos genes

25 Gran parte del conocimiento actual sobre el desarrollo del cerebro de mamíferos proviene de estudios con roedores, que han revelado muchos de los mecanismos fundamentales de la neurogénesis de mamíferos. Tanto en roedores como en humanos, el desarrollo del cerebro comienza con la expansión del neuroepitelio para generar un tipo de progenitor neural denominado glía radial (RG) (Götz y Huttner, 2005). Estas RG se dividen en la superficie apical dentro de la zona ventricular (VZ), ya sea simétricamente para generar dos RG más o asimétricamente para generar una RG y una célula hija más diferenciada, una neurona o un progenitor intermedio. Estos luego migran hacia la zona subventricular (SVZ) mientras que las neuronas continúan migrando a través de la zona intermedia (IZ) para poblar capas específicas dentro de la placa cortical (CP).

35 Aunque el cerebro humano sigue estos mismos principios básicos durante el desarrollo temprano, existen varias diferencias clave con respecto a los roedores que permiten la notable expansión en la producción neuronal que se observa en los humanos a medida que avanza el desarrollo (Fietz y Huttner. 2011, Lui et al., 2011). Por ejemplo, el cerebro humano exhibe una gran población de una nueva célula madre llamada glía radial externa (oRG) (Fietz et al., 2010, Hansen et al., 2010), que puede dividirse simétricamente y asimétricamente, al igual que la glía radial en la VZ, para expandir la salida neuronal. Esta población solo está presente en un grado muy limitado en roedores, mientras que en los humanos constituyen una capa progenitora completamente separada, denominada SVZ externa (OSVZ). Además, la organización de zonas progenitoras es marcadamente más elaborada en humanos, exhibiendo una SVZ que se divide por una capa de fibra interna (IFL) en una SVZ interna (ISVZ) y la OSVZ. Tanto la IFL como la OSVZ están completamente ausentes en el ratón.

45 Estas diferencias pueden explicar las dificultades para modelar trastornos como la MCPH en roedores, y sugieren que estos trastornos pueden originarse en defectos en procesos de desarrollo neurológico que no pueden examinarse en ratones. Por lo tanto, los procedimientos que recapitulan los paradigmas del desarrollo del cerebro humano *in vitro* tienen un enorme potencial.

50 Se han descrito una variedad de sistemas de cultivo para la derivación de neuronas humanas a partir de células madre pluripotentes. La mayoría de estos enfoques utilizan las llamadas rosetas neurales (Wilson y Stice. 2006), que muestran características del neuroepitelio y pueden usarse para impulsar la formación de poblaciones puras de subtipos neuronales específicos. Sin embargo, estos enfoques tienen una capacidad limitada para modelar muchos aspectos del desarrollo del cerebro humano, ya que no recapitulan la complejidad y la heterogeneidad observadas *in vivo*.

El documento WO 2011/055855 A1 divulga la diferenciación de células madre embrionarias humanas en células progenitoras nerviosas y tejido protuberante en forma de copa.

60 El documento WO 2012/013936 A1 divulga la diferenciación de células y cultivos neuronales. Se divulgan células madre y progenitoras que forman estructuras de roseta.

El documento EP 2 314 671 A1 divulga cultivos derivados de células madre embrionarias humanas.

65 Wang et al. (2011) describen la identificación de células progenitoras del tipo glía radial en ratones.

El documento WO 2004/053096 A2 divulga tejidos cultivados a partir de células madre embrionarias.

5 El documento US 2007/0178586 describe un procedimiento para cultivar células madre en una estructura tridimensional.

Novak et al., J Clin Neur. 2000, 7 (4): 280-290 divulgan cerebros naturales que comprenden matriz extracelular (ECM).

10 Aunque se han hecho progresos significativos en el desarrollo de modelos *in vitro* de desarrollo de órganos completos para otros sistemas, tales como la glándula mamaria (Kenny et al., 2007), el intestino (Sato et al., 2009) y la retina (Eiraku et al., 2011, documento WO 2011/055855 A1), no se ha establecido un modelo de cultivo tridimensional del cerebro en desarrollo en su conjunto. Sin embargo, estudios previos han señalado un principio de autoorganización para varios tejidos neurales aislados, lo que sugiere que es posible un enfoque. En particular, Eiraku et al. (2008), documento US 2011/0091869 A1, han descrito la formación de tejido cortical cerebral dorsal en cultivo tridimensional a partir de células madre pluripotentes. Este estudio revela la notable capacidad del tejido cortical cerebral para autoorganizarse, y estos tejidos recapitularon muchos aspectos del desarrollo cortical dorsal temprano. Sin embargo, los tejidos generados estaban limitados en su identidad a la corteza dorsal del prosencéfalo, y aunque las neuronas generadas mostraban identidades y actividades de subtipos piramidales, no lograron formar capas discretas con una organización estereotípica de adentro hacia afuera. Además, las características del desarrollo del cerebro humano, como la presencia de células gliales radiales externas y la organización única de las zonas progenitoras no estaban presentes.

20 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos modelos de tejido basados en cultivos celulares, que representan el comportamiento del tejido *in vivo*.

25 La presente invención se refiere a un cultivo de tejido neuronal tridimensional artificial *in vitro* que comprende una población heterogénea de células humanas o células de primates no humanos de al menos dos capas de diferenciación neuronales y progenitoras diferentes, en las que al menos una capa progenitora comprende células gliales radiales externas; y dicho cultivo comprende una matriz tridimensional o se obtiene del cultivo de una agregación multicelular neuronal diferenciada en una matriz tridimensional; en la que dicha matriz tridimensional es un hidrogel. El nuevo tejido neuronal también se denomina "organoide" u "organoides cerebrales" en el presente documento. Los organoides cerebrales muestran una regionalización heterogénea de varias regiones del cerebro, así como el desarrollo de una corteza cerebral compleja y bien organizada. Además, estos tejidos muestran varias características específicas de los humanos, a saber, la presencia de una población glial radial externa sustancial y la organización de capas de zona subventricular cortical extra que no están presentes en el ratón. La presencia de células gliales radiales externas parece ser una de las características más distintivas, pero, por supuesto, también existen otras. Eiraku et al. (2008), por ejemplo, describe que en su cultivo la glía radial de los tejidos corticales disminuyó después del día 12 y aparentemente no se convirtió en células de la glía radial externa, caracterizándose la glía radial externa por su posición y morfología (falta de una conexión apical con la cavidad ventricular llena de líquido). De acuerdo con la invención, las células de la glía radial externa están preferiblemente en una capa progenitora, en particular, en una zona subventricular retirada de la zona ventricular en la que reside la glía radial. A continuación se describen otras características distintivas alternativas, por ejemplo, los marcadores de expresión genética.

45 La invención proporciona además un procedimiento para generar un cultivo de tejido neuronal artificial tridimensional que comprende a) proporcionar una agregación multicelular de células madre pluripotentes, b) cultivar dicha agregación multicelular en medio de inducción neural induciendo así la agregación multicelular para diferenciarse en tejido neural, c) cultivar dicha agregación multicelular diferenciada en una matriz tridimensional, preferiblemente un gel, expandiendo así dichas células en una agregación multicelular, en la que dichas células pueden diferenciarse más, y d) cultivar dicha agregación multicelular expandida y opcionalmente diferenciada de células de la etapa c) en un cultivo en suspensión. Se podrían producir varias poblaciones de progenitores y neuronas, que muestran una organización y un comportamiento adecuados.

55 Se conocen procedimientos para cultivar y diferenciar células madre en células y tejidos neuronales a partir de Eiraku (2008), documentos US 2011/0091869 A1 y WO 2011/055855 A1. Los procedimientos descritos allí pueden usarse en la primera etapa para obtener el tejido de la invención, especialmente las etapas de proporcionar una agregación multicelular de células madre pluripotentes y cultivar dicha agregación multicelular en medio de inducción neural. Durante la etapa de cultivar el agregado, las células madre pluripotentes pueden ser inducidas a diferenciarse en tejido neural. Para proporcionar una agregación multicelular, por ejemplo, es posible cultivar células madre pluripotentes de dichos agregados multicelulares. Contrariamente a estas referencias, la invención comprende además la etapa de cultivar los agregados celulares en una matriz tridimensional, preferiblemente un gel, que sorprendentemente resultó en un desarrollo de tejido mucho más avanzado.

60 La invención se refiere particularmente a un nuevo procedimiento para generar tejidos cerebrales grandes y complejos usando un sistema de cultivo *in vitro* tridimensional. Secciones individuales similares a tejidos de diferentes células diferenciadas del cultivo de la invención pueden estar en una disposición tridimensionalmente desarrollada. Los organoides cerebrales resultantes desarrollan una variedad de identidades regionales organizadas como dominios

discretos capaces de influenciarse entre sí, al igual que el cerebro en su conjunto. Además, las regiones corticales cerebrales muestran una organización similar al cerebro humano en desarrollo, así como la presencia de una población considerable de oRG. Además, las neuronas corticales cerebrales maduran para formar diversas identidades piramidales e incluso se organizan de adentro hacia afuera, recordando las capas corticales *in vivo*. El organoide se puede usar para modelar enfermedades neurológicas, por ejemplo, MCPH. En particular, la invención demuestra la utilización de las iPSC derivadas de pacientes y electroporaciones de ARNph en estos organoides para modelar la patogénesis de MCPH, un trastorno que ha sido difícil de modelar en ratones.

Los organoides de la invención se pueden obtener del cultivo de células madre pluripotentes. De acuerdo con la presente divulgación, en principio, las células también pueden ser totipotentes, si las razones éticas lo permiten.

Una célula "totipotente" puede diferenciarse en cualquier tipo de célula en el cuerpo, incluida la línea germinal después de la exposición a estímulos como los que normalmente ocurren en el desarrollo. Por consiguiente, una célula totipotente puede definirse como una célula capaz de crecer, es decir, desarrollarse, en un organismo completo.

Las células utilizadas en los procedimientos de acuerdo con la presente invención son preferiblemente (estrictamente) pluripotentes.

En una realización preferida particular, las células de la presente invención (incluidas todas las realizaciones adicionales relacionadas con ellas), son células humanas o células de primates no humanos, pluripotentes.

Una célula madre "pluripotente" no puede crecer en un organismo completo, pero es capaz de dar lugar a tipos de células que se originan en las tres capas germinales, es decir, mesodermo, endodermo y ectodermo, y puede ser capaz de dar lugar a todos los tipos de células de un organismo. La pluripotencia puede ser una característica de la célula en sí misma, por ejemplo, en ciertas células madre, o puede ser inducida artificialmente. Por ejemplo, en una realización preferida de la invención, la célula madre pluripotente se deriva de una célula somática, multipotente, unipotente o progenitora, en la que se induce la pluripotencia. Dicha célula se denomina en el presente documento como una célula madre pluripotente inducida. La célula somática, multipotente, unipotente o progenitora puede, por ejemplo, ser utilizada de un paciente, que se convierte en una célula pluripotente, es decir sujeta a los procedimientos de la invención. Dicha célula o el cultivo de tejido resultante se puede estudiar para detectar anomalías, por ejemplo, durante el desarrollo del cultivo de tejidos de acuerdo con los procedimientos de la invención. Un paciente puede por ejemplo, sufrir un trastorno neurológico o deformidad del tejido cerebral. Las características de dicho trastorno o deformidad pueden reproducirse en los organoides de la invención e investigarse.

Una célula "multipotente" es capaz de dar lugar a al menos un tipo de célula de cada uno de dos o más órganos o tejidos diferentes de un organismo, en la que dichos tipos de células pueden originarse de la misma o de diferentes capas germinales, pero no es capaz de dar lugar a todos los tipos de células de un organismo.

Por el contrario, una célula "unipotente" es capaz de diferenciarse de las células de un solo linaje celular.

Una "célula progenitora" es una célula que, como una célula madre, tiene la capacidad de diferenciarse en un tipo específico de célula, con opciones limitadas para diferenciarse, generalmente con una sola célula objetivo. Una célula progenitora suele ser una célula unipotente, también puede ser una célula multipotente.

Con capacidades de diferenciación decrecientes, las células madre se diferencian en el siguiente orden: totipotente, pluripotente, multipotente, unipotente. Durante el desarrollo del organoide de la invención, las células madre se diferencian de las pluripotentes (también son posibles las células totipotentes) en células madre neurales multipotentes, además en células madre unipotentes de una capa cerebral y posteriormente en células no madre de tejido. Las células de tejido pueden por ejemplo, ser células neuronales o células neuroepiteliales, como las células gliales.

El cultivo de tejido de la invención se cultiva *in vitro*, es decir, no es un cerebro aislado de un animal durante cualquiera de las etapas. Dado que se cultiva a partir de células madre pluripotentes humanas, esto permite el crecimiento del tejido cerebral humano sin la necesidad de obtener muestras de tejido cerebral fetal humano. Además, este sistema representa el crecimiento del tejido cerebral derivado en forma tridimensional, mientras que los tejidos cerebrales animales aislados solo se han utilizado en forma tridimensional para generar neuroesferas, una agregación de células madre neurales disociadas con capacidad multipotente limitada (Reynolds y Weiss, 1992). Estas neuroesferas no logran recapitular muchos aspectos del desarrollo cerebral *in vivo*, por ejemplo, identidades regionales, organización de capas progenitoras y de diferenciación, organización de capas neuronales, que pueden proporcionarse mediante el cultivo y/o procedimientos de tejido de la invención. El cultivo de tejido de la invención no es y difiere de acuerdo con estos aspectos de una neuroesfera.

Durante el desarrollo, los agregados celulares forman estructuras neuroepiteliales polarizadas y una lámina neuroepitelial, que desarrollará varios grupos redondos (rosetas). Estas etapas pueden ser controladas por medio de inducción neural como lo describe Eiraku (2008), documentos US 2011/0091869 A1 y WO 2011/055855 A1. En ausencia de medio de inducción neural, por ejemplo, al usar medios de diferenciación estándar, la invención

comprende además el cultivo en una matriz tridimensional, preferiblemente un gel, especialmente un gel rígido estable, que da como resultado una expansión adicional del neuroepitelio y la diferenciación. Una matriz tridimensional adecuada puede comprender colágeno. Más preferiblemente, la matriz tridimensional comprende una matriz extracelular del tumor de Engelbreth-Holm-Swarm o cualquier componente del mismo, tal como laminina, colágeno, preferiblemente colágeno de tipo 4, entactina y, opcionalmente, además proteoglicano de heparano sulfatado o cualquier combinación de los mismos. Tal matriz es Matrigel. El Matrigel es conocido en la técnica (documento US 4.829.000) y se ha utilizado previamente para modelar tejido cardíaco tridimensional (documento WO 01/55297 A2). Preferiblemente, la matriz comprende una concentración de al menos 3,7 mg/ml que contiene en partes en peso aproximadamente 60-85% de laminina, 5-30% de colágeno IV, opcionalmente 1-10% de nidógeno, opcionalmente 1-10% de proteoglicano de heparano sulfatado y 1-10% de entactina. Los componentes sólidos de Matrigel generalmente comprenden aproximadamente 60% de laminina, 30% de colágeno IV y 8% de entactina. La entactina es una molécula puente que interactúa con la laminina y el colágeno. La matriz tridimensional puede comprender además factores de crecimiento, tales como cualquiera del EGF (factor de crecimiento epidérmico), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), NGF, PDGF, IGF (factor de crecimiento similar a la insulina), especialmente IGF-1, TGF-β, activador de plasminógeno tisular. La matriz tridimensional también puede estar libre de cualquiera de estos factores de crecimiento.

En general, la matriz tridimensional es una estructura tridimensional de una matriz biocompatible. Preferiblemente comprende colágeno, gelatina, quitosano, hialuronano, metilcelulosa, laminina y/o alginato. La matriz puede ser un gel, en particular un hidrogel. Los hidrogeles organoquímicos pueden comprender alcohol polivinílico, poliacrilato de sodio, polímeros y copolímeros de acrilato con una abundancia de grupos hidrofílicos. Los hidrogeles comprenden una red de cadenas de polímeros que son hidrofílicos, a veces encontrados como un gel coloidal en el que el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son polímeros naturales o sintéticos altamente absorbentes (pueden contener más del 99% de agua). Los hidrogeles también poseen un grado de flexibilidad muy similar al tejido natural, debido a su importante contenido de agua.

Después de la expansión, los agregados celulares pueden cultivarse en cultivo en suspensión, preferiblemente un biorreactor. Dicho cultivo en cultivo en suspensión es también preferiblemente en ausencia de medio de inducción neural. Un medio adecuado es un medio de diferenciación estándar.

En una realización preferida, el medio puede comprender o carecer de los siguientes componentes:

Medio A para la etapa de cultivar células madre pluripotentes como un agregado (denominado cuerpo embrioide): formulación de reemplazo de suero, suero bovino fetal, glutamina, aminoácidos no esenciales, 2-mercaptoetanol, bFGF, preferiblemente aproximadamente 4 ng/ml de bFGF, o cualquier combinación de los mismos. Especialmente preferido, este medio contiene un inhibidor de ROCK para las etapas iniciales del cultivo agregado. Tal medio es por ejemplo, medio hES utilizado en los ejemplos.

El medio B es la etapa de diferenciar el agregado de células madre pluripotentes en tejido neural: suplemento de N₂ (Price y Brewer, 2001), glutamina, aminoácidos no esenciales, heparina o cualquier combinación de los mismos. Este medio carece preferiblemente de factores de crecimiento que diferenciarían el tejido neural para un destino particular. Tales factores de crecimiento ausentes pueden ser cualquiera de Shh, Wnt, Bmp, retinoides o FGF, o cualquier combinación de los mismos, especialmente todos ellos. Tal medio es por ejemplo, medio de inducción neural usado en los ejemplos.

Medio C para la etapa de cultivo en una matriz tridimensional, preferiblemente un gel: suplemento de N₂ (Price y Brewer, 2001), suplemento de B27 (Price y Brewer, 2001), insulina, 2-mercaptoetanol, glutamina, aminoácidos no esenciales, o cualquier combinación de los mismos. Este medio carece preferiblemente de factores de crecimiento que diferenciarían el tejido neural para un destino particular. Tales factores de crecimiento ausentes pueden ser cualquiera de Shh, Wnt, Bmp, retinoides o FGF, o cualquier combinación de los mismos, especialmente todos ellos. Tal medio es por ejemplo, medio de diferenciación utilizado en los ejemplos.

Medio D para la etapa de cultivo en un cultivo en suspensión, preferiblemente un biorreactor: suplemento de N₂, suplemento de B27, insulina, 2-mercaptoetanol, glutamina, aminoácidos no esenciales o cualquier combinación de los mismos. Este medio carece preferiblemente de factores de crecimiento que diferenciarían el tejido neural para un destino particular. Tales factores de crecimiento ausentes pueden ser cualquiera de Shh, Wnt, Bmp o FGF, o cualquier combinación de los mismos, especialmente todos ellos. Preferiblemente, este medio contiene ácido retinoico para promover la diferenciación y maduración piramidal. Tal medio es por ejemplo, "medio de diferenciación + RA" usado en los ejemplos.

Cualquier medio contiene además nutrientes, tampones, oxígeno. El medio puede comprender además factores de crecimiento o carecer de factores de crecimiento. Los factores de crecimiento que pueden estar presentes o ausentes son, por ejemplo, EGF, FGF, NGF, PDGF, IGF, especialmente IGF-1, TGF-β, activador de plasminógeno tisular. Los nutrientes preferidos incluyen un carbohidrato, especialmente una monohexosa o monopentosa, tal como glucosa o fructosa. En realizaciones preferidas, cualquiera de los medios, preferiblemente todos, están libres de suero.

La etapa de cultivar células madre pluripotentes se realiza preferiblemente durante una duración de 2 a 8 días, especialmente preferido de 5 a 7 días. En particular, dicha etapa puede realizarse en los días de cultivo de 0 a 8. La etapa de cultivar el agregado de células madre pluripotentes se realiza preferiblemente durante 2 a 7 días,

especialmente preferido de 4 a 6 días. En particular, dicha etapa puede realizarse en los días de cultivo 5 a 14. La etapa de cultivo en una matriz tridimensional, preferiblemente un gel, se realiza preferiblemente durante 1 a 6 días, especialmente preferido de 3 a 5 días. En particular, dicha etapa puede realizarse en los días de cultivo 9 a 18. La siguiente etapa de cultivo en un cultivo en suspensión se realiza preferiblemente durante al menos 3 días, especialmente preferido al menos 4 o al menos 5 días.

En realizaciones preferidas, el cultivo en suspensión (especialmente el cultivo en suspensión después de cultivar en una matriz tridimensional) es un cultivo en medio de agitación o vibración, en particular se prefiere un biorreactor. En esta etapa, el cultivo de la invención ha alcanzado un tamaño ampliado que depende del suministro constante de nutrientes. Esto se logra mejor mediante el lavado de las células, por ejemplo, mediante agitación o vibración.

En la realización preferida, durante la expansión celular, especialmente en la matriz tridimensional, se permite que las células se diferencien en células madre unipotentes (células progenitoras). Durante esta etapa, se desarrolla un tejido similar al tejido que comprende la formación de capas distintivas, incluidas las capas de células unipotentes, que dan lugar a células nerviosas o epiteliales especializadas.

El cultivo de células o tejidos puede obtenerse mediante dichos procedimientos. La invención se refiere a un cultivo de tejido neuronal tridimensional artificial crecido *in vitro* ("organoide") que comprende una población heterogénea de células de al menos dos capas de diferenciación neuronal diferentes como se divulgó anteriormente. Como se mencionó anteriormente, preferiblemente al menos una capa de diferenciación comprende una célula de glía radial externa.

El cultivo de la invención puede desarrollarse en un tejido diferenciado que comprende capas de diferente grado de diferenciación. En una estructura tridimensional, esto puede ser observable como secciones separadas de los cultivos. En realizaciones preferidas, el cultivo comprende secciones de tejido que forman al menos dos capas. Dicha capa puede conformarse alrededor de un cuerpo de tejido globular, por ejemplo, un cuerpo a partir del cual se han desarrollado las distintas capas. En particular, el tejido puede mostrar un desarrollo distintivo de secciones de tejido apical y dorsal.

El tejido de la invención es o se parece al tejido cerebral que comprende sustancialmente todas las células encontradas en el cerebro o progenitoras de las mismas. Dichas células pueden identificarse mediante marcadores selectivos de expresión génica, que están en un nivel por encima del promedio de células no diferenciadas, en particular incluyendo intervalos de confianza. Dichos marcadores pueden identificarse mediante sondas oligonucleotídicas específicas, que preferiblemente se unen exclusivamente a dicho ácido nucleico marcador objetivo, especialmente el ARNm marcador objetivo. Los marcadores pueden identificarse además por anticuerpos específicos.

Preferiblemente, las células del cultivo de la invención expresan uno o más marcadores de expresión génica seleccionados de los marcadores del prosencéfalo BF1 y Six3. Alternativamente, o además, preferiblemente las células del cultivo de la invención expresan uno o más marcadores de expresión génica seleccionados de los marcadores del rombencéfalo Krox20 e IIs1. En una determinada etapa de desarrollo, los marcadores del prosencéfalo se expresan en mayores cantidades en comparación con los marcadores del rombencéfalo en el tejido. Esto se refleja preferiblemente en el cultivo de la invención.

El cultivo de tejido de la invención puede caracterizarse alternativamente o además por comprender células que expresan uno o más marcadores de expresión génica seleccionados de Otx1, Otx2, FoxG1, Auts2, Tbr2, Tuj1, Brn2, Satb2, Ctip2, calretinina, o cualquier combinación de los mismos. Estos marcadores pueden expresarse durante cualquier etapa del cultivo durante el procedimiento de la invención, y preferiblemente se expresan en el cultivo de tejido proporcionado.

Preferiblemente, el cultivo de la invención comprende células que expresan Otx1 y/u Otx2. Otx1 y/u Otx2 se expresan en las células de identidad del prosencéfalo/mesencéfalo. Preferiblemente, este tipo de tejido está comprendido en el cultivo de la invención.

Preferiblemente, el cultivo de la invención comprende células que expresan FoxG1. FoxG1 se expresa en células de identidad de corteza dorsal. Preferiblemente, este tipo de tejido está comprendido en el cultivo de la invención.

Preferiblemente, el cultivo de la invención comprende células que expresan Auts2. Auts2 se expresa en células de identidad de corteza frontal. Preferiblemente, este tipo de tejido está comprendido en el cultivo de la invención.

Preferiblemente, el cultivo de la invención comprende células que expresan Tuj1. Tuj1 se expresa en células de una identidad de capa de fibra interna cortical. Preferiblemente, este tipo de tejido está comprendido en el cultivo de la invención. Nunca antes se había logrado la generación de una capa de fibra interna (y también una zona subventricular externa) y son indicadores del tejido de la invención.

Preferiblemente, el cultivo de la invención comprende células que expresan Brn2. Brn2 se expresa en células de una neurona nacida más tarde (neurona de la región externa). Preferiblemente, este tipo de tejido está comprendido en el cultivo de la invención.

5 Preferiblemente, el cultivo de la invención comprende células que expresan Satb2. Satb2 se expresa en células de una neurona nacida más tarde (neurona de la región externa). Preferiblemente, este tipo de tejido está comprendido en el cultivo de la invención.

10 Preferiblemente, el cultivo de la invención comprende células que expresan Ctip2. Ctip2 se expresa en células de neurona nacida antes (neurona de la región interna). Preferiblemente, este tipo de tejido está comprendido en el cultivo de la invención.

15 Preferiblemente, el cultivo de la invención comprende células que expresan calretinina. La calretinina se expresa en células de interneuronas corticales dentro de la placa cortical dorsal. Preferiblemente, este tipo de tejido y/o las interneuronas corticales está/están comprendidas en el cultivo de la invención.

El tejido artificial de la invención también se puede usar como una herramienta de investigación para estudiar los efectos de cualquier influencia externa (por ejemplo, fármacos u otros estímulos) o interna (mutaciones) en el crecimiento y la actividad de las células en el tejido. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para investigar un efecto del tejido neurológico en desarrollo, por ejemplo, un defecto, en particular un defecto del desarrollo, que comprende disminuir o aumentar la expresión de un gen de interés en una célula en cualquier etapa durante el procedimiento de la invención. Un gen de interés puede ser un gen, que se sospecha que es esencial o perjudicial cuando está activo durante el desarrollo del tejido neuronal sano. Los procedimientos para disminuir o aumentar la expresión de un gen son bien conocidos en la técnica e incluyen procedimientos de eliminación o desactivación (especialmente ARN de interferencia, inhibición antisentido, silenciamiento de ARNph, etc.) o introducciones de transgenes (por ejemplo, introducción), respectivamente. Tal disminución o aumento puede ser condicional, por ejemplo, mediante la introducción de un constructo genético con promotores inducibles y/o eliminación o inactivaciones o introducciones condicionales. La introducción de mutaciones condicionales de genes esenciales o la introducción de genes letales son posibles mediante el uso de vectores de mutación condicional adecuados, por ejemplo, que comprenden una trampa de genes reversible. Las mutaciones condicionales preferiblemente facilitan las mutaciones reversibles, que pueden revertirse a un estado genético activo o inactivo, respectivamente, tras la estimulación, por ejemplo, como en el sistema de doble flexión (documentos WO 2006/056615 A1; WO 2006/056617 A1; WO 2002/88353 A2; WO 2001/29208 A1). Las mutaciones pueden ser aleatorias o dirigidas al sitio en genes específicos. Por lo tanto, en las realizaciones preferidas de la invención, se introducen mutaciones reversibles en las células madre pluripotentes, ya sea mediante mutagénesis aleatoria (directa) o dirigida al sitio (inversa). Vectores adecuados comprenden un casete de inserción con mutaciones reversibles. Las mutaciones pueden activarse o desactivarse en cualquier etapa del procedimiento de la invención. Se pueden introducir vectores u otros ácidos nucleicos en las células con cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, electroporación. Por supuesto, también es posible proporcionar células que tengan una mutación dada. Dichas células pueden aislarse de un paciente, seguido de una etapa de inducir el estado pluripotente de las células madre y dejar que las células se desarrollen en el tejido de la invención, por ejemplo, por el procedimiento descrito anteriormente. El paciente puede tener una enfermedad particular de interés, especialmente un defecto neurológico o deformidad cerebral. Tal procedimiento se ha mostrado en los ejemplos a continuación para células de un paciente con microcefalia. Las mutaciones genéticas de la microcefalia, tal como una mutación en el gen Cdk5Rap2 que conduce a una disminución de la expresión, son ejemplos de mutaciones, que pueden investigarse mediante el procedimiento de la invención.

La presente invención proporciona además un procedimiento para seleccionar un agente terapéutico candidato adecuado para tratar un defecto de interés de un tejido neurológico en desarrollo, que comprende realizar el procedimiento anterior para investigar una mutación y administrar el agente candidato a dichas células en cualquier etapa durante el procedimiento, preferiblemente en todas las etapas. De acuerdo con este aspecto, un fármaco terapéutico candidato puede seleccionarse para tener un efecto sobre cualquier célula con una mutación, que puede introducirse como se describió anteriormente. Por supuesto, también es posible usar células de pacientes con una mutación dada, induciendo el estado de células madre pluripotentes y realizando los procedimientos de la invención para inducir el desarrollo de tejidos como se describió anteriormente. En particular, la presente invención proporciona investigaciones en mutaciones en microcefalia y permite la selección de agentes farmacéuticos, que pueden afectar las mutaciones, por ejemplo, compensar la insuficiencia o sobreexpresión en el gen mutado, por ejemplo, Cdk5Rap2 en microcefalia. Un fármaco candidato positivo podría ser un compuesto, que restaura el desarrollo celular normal, como se puede observar al realizar el procedimiento de generación de tejido de la invención sin una mutación para comparación, por ejemplo, mediante el uso de células madre pluripotentes sanas.

60 Por supuesto, también es posible seleccionar fármacos candidatos, por ejemplo, fármacos terapéuticos candidatos, que tengan algún efecto en el tejido normal también, sin una mutación, lo que conduce a un desarrollo aberrante. Así, en otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento para probar un fármaco candidato para efectos neurológicos, que comprende administrar un fármaco candidato a un cultivo artificial y determinar una actividad de interés de las células de dicho cultivo y comparar dicha actividad con una actividad de las células para el cultivo sin administrar dicho fármaco candidato, en el que una actividad diferencial indica un efecto neurológico. Se puede buscar

cualquier tipo de actividad de las células o tejidos de la invención, incluido el cambio metabólico o la señalización neuronal en un fármaco candidato. En esencia, el tejido altamente diferenciado de la invención puede usarse como modelo para pruebas de comportamiento cerebral sobre cualquier efecto de cualquier fármaco. Tal procedimiento también podría usarse para probar fármacos terapéuticos, destinados a tratar cualquier tipo de enfermedades, por tener efectos secundarios sobre los nervios, en particular el tejido cerebral, como se puede observar en el cultivo de tejidos de la invención.

La presente invención también se puede usar para obtener células neuronales. En particular, la invención proporciona un procedimiento para obtener una célula neural diferenciada que comprende la etapa de proporcionar un cultivo artificial y aislar una célula neural diferenciada de interés, o que comprende la etapa de generar un cultivo de tejido artificial de acuerdo con la invención que comprende además la etapa de aislar una célula neural diferenciada de interés. Dichas células aisladas del cultivo o tejido de la invención tienen el beneficio de representar propiedades morfológicas similares a las células aisladas del tejido cerebral de un animal no humano, como se mencionó anteriormente, o un humano.

La presente invención proporciona además un kit para generar un cultivo de tejido neuronal artificial tridimensional o para realizar el procedimiento de la invención, que comprende

- i) un medio que comprende una matriz tridimensional y nutrientes,
- ii) un medio que comprende ácido retinoico y nutrientes, y
- iii) un medio que comprende a) nutrientes y b) un inhibidor de ROCK, insulina o heparina,

en el que el kit comprende un medio de inducción neural, que opcionalmente comprende además un medio que comprende nutrientes pero que carece de factores de crecimiento que diferenciarían el tejido neural para un destino particular. Se describe un kit para generar el cultivo de tejidos de la invención que comprende recipientes con cualquiera de los medios de cultivo descritos anteriormente, especialmente un medio que contiene una matriz tridimensional como se describió anteriormente y nutrientes y un medio que comprende ácido retinoico y nutrientes, que opcionalmente comprende además un medio que comprende nutrientes y un inhibidor de ROCK y/u opcionalmente que comprende un medio que comprende nutrientes y que carece de factores de crecimiento que diferenciarían el tejido neural para un destino particular.

El kit comprende además un medio C que comprende una matriz tridimensional, y preferiblemente carece de factores de crecimiento que diferenciarían el tejido neural para un destino particular. Tales factores de crecimiento ausentes pueden ser cualquiera de Shh, Wnt, Bmp, retinoides o FGF, o cualquier combinación de los mismos, especialmente todos ellos. Este medio preferiblemente comprende además nutrientes celulares. Especialmente preferido, el medio comprende un suplemento de N₂ (Price y Brewer. 2001), un suplemento de B27 (Price y Brewer. 2001), insulina, 2-mercaptoetanol, glutamina, aminoácidos no esenciales o cualquier combinación de los mismos.

El kit comprende además un medio D que comprende ácido retinoico y nutrientes. Este medio carece preferiblemente de la matriz tridimensional. Especialmente preferido, el medio comprende suplemento de N₂, suplemento de B27, insulina, 2-mercaptoetanol, glutamina, aminoácidos no esenciales o cualquier combinación de los mismos. Este medio carece preferiblemente de factores de crecimiento que diferenciarían el tejido neural para un destino particular. Tales factores de crecimiento ausentes pueden ser cualquiera de Shh, Wnt, Bmp o FGF, o cualquier combinación de los mismos, especialmente todos ellos.

Opcionalmente, el kit puede comprender además un medio A que comprende un inhibidor de ROCK y nutrientes. Especialmente preferido, el medio comprende una formulación de reemplazo de suero, suero bovino fetal, glutamina, aminoácidos no esenciales, 2-mercaptoetanol, bFGF, preferiblemente aproximadamente 4 ng/ml de bFGF, o cualquier combinación de los mismos.

Opcionalmente, el kit puede comprender además medio B que comprende nutrientes y que carece de factores de crecimiento que diferenciarían el tejido neural para un destino particular. Tales factores de crecimiento ausentes pueden ser cualquiera de Shh, Wnt, Bmp, retinoides o FGF, o cualquier combinación de los mismos, especialmente todos ellos. Especialmente preferido, el medio comprende un suplemento de N₂ (Price y Brewer. 2001), glutamina, aminoácidos no esenciales, heparina o cualquier combinación de los mismos.

El kit de la invención preferiblemente comprende un medio para cualquiera de las etapas descritas anteriormente, seleccionadas de la etapa de cultivar células madre pluripotentes, la etapa de cultivar en una matriz tridimensional, preferiblemente un gel, la etapa de un cultivo en suspensión, preferiblemente un biorreactor. En particular, se prefiere la combinación de un medio para la etapa de cultivo en una matriz tridimensional, preferiblemente un gel, y la etapa de un cultivo en suspensión; o una combinación de un medio para las etapas de la etapa de cultivar el agregado de células madre pluripotentes, la etapa de cultivar en una matriz tridimensional, preferiblemente un gel. Preferiblemente, los medios para realizar etapas separadas se proporcionan en recipientes separados, tales como viales o matraces. Cualquiera de los medios de la invención puede comprender otras sustancias auxiliares tales como tampones, estabilizadores, nutrientes, como se mencionó anteriormente. El medio se puede proporcionar en forma sólida, seca o en forma acuosa.

Se contempla que cualquier procedimiento o producto descrito en este documento puede implementarse con respecto a cualquier otro procedimiento o producto descrito en este documento y que pueden combinarse diferentes realizaciones.

5 Las reivindicaciones presentadas originalmente se contemplan para cubrir reivindicaciones que dependen en gran medida de cualquier reivindicación presentada o combinación de reivindicaciones presentadas.

10 El uso de la palabra "un" o "uno, una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

15 Se contempla que cualquier realización discutida en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier procedimiento o producto de la invención, y viceversa. Cualquier realización discutida con respecto a una condición particular puede aplicarse o implementarse con respecto a una condición diferente. Además, las composiciones y kits de la invención pueden usarse para lograr los procedimientos de la invención.

20 A través de toda esta solicitud, el término "aproximadamente" puede usarse para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o procedimiento que se emplea para determinar el valor o en un valor establecido puede referirse a $\pm 10\%$.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin limitarse a estas realizaciones de la invención.

25 **Figuras:**

Figura 1. Descripción y caracterización del sistema de cultivo organoide cerebral. a. Esquema del sistema de cultivo descrito con más detalle en Procedimientos. Las células madre pluripotentes humanas (hPSC) se disociaron del cultivo de colonias en alimentadores y se transfirieron a agregados flotantes denominados cuerpos embrioides que comienzan a diferenciarse en las tres capas germinales. Se les permitió crecer durante 6 días en medios que contenían bFGF bajo, y luego se transfirieron a placas de baja adhesión que contenían medios de inducción neural definidos para soportar el crecimiento del neuroectodermo al tiempo que limitaban el crecimiento de otras capas germinales. El día 11, los tejidos de neuroectodermo se transfirieron a gotitas de Matrigel y se cultivaron en cultivo flotante en medios de diferenciación seguidos de cultivo en un biorreactor giratorio en medios de diferenciación que contenían ácido retinoico (RA). Los ejemplos de imágenes de cada etapa se muestran debajo del esquema. b. Los tejidos neuroepiteliales generados usando este enfoque (panel izquierdo) fueron más grandes y más continuos que cuando crecieron en suspensión estacionaria sin Matrigel (panel derecho). Este enfoque también generó tejidos con cavidades llenas de fluido más grandes, así como la localización apical típica de la proteína N-cadherina neural (flecha). c. El corte y la inmunohistoquímica revelaron que los tejidos avanzados presentaban una morfología compleja con regiones heterogéneas de tejidos neurales que contenían progenitores neurales (Sox2, rojo) y neuronas (Tuj1, verde) (flecha). d. Las imágenes de campo brillante de bajo aumento revelaron además grandes cavidades llenas de fluido que recuerdan los ventrículos (flecha blanca), así como una variedad de tejidos neurales en desarrollo, incluida la retina, como lo indica la presencia de un epitelio pigmentado de la retina (flecha negra). e. La tinción con hemotoxilina-eosina de organoides cerebrales en comparación con el cultivo estacionario revela tejidos más grandes en general con una subestructura que recuerda a las regiones cerebrales, tal como la corteza del prosencéfalo (flechas) y el plexo coroideo (punta de flecha).

Figura 2. Los organoides cerebrales humanos recapitulan varias identidades de la región cerebral. a. RT-PCR para marcadores del prosencéfalo (BF1 y Six3), así como marcadores del rombencéfalo (Krox20 e Isl1) en organoides corticales a los 12, 16 y 20 días de diferenciación. Se usó ADNc de cerebro fetal humano como control positivo. b. Inmunohistoquímica para los marcadores del prosencéfalo/mesencéfalo Otx1/2 (verde) y el marcador del rombencéfalo Gbx2 (rojo) a los 16 y 20 días de diferenciación que revela principalmente la identidad del prosencéfalo/mesencéfalo con regiones adyacentes del rombencéfalo que recuerdan el límite mesencéfalo-rombencéfalo (flechas). Núcleos con marcas de DAPI (azul). c. Inmunohistoquímica para el marcador FoxG1 (rojo) que revela una región discreta de la corteza dorsal dentro del organoide. d. Tinción para el marcador del lóbulo frontal Auts2 (rojo) que revela la subregionalización de los lóbulos corticales cerebrales dentro del organoide. e. Tinción para Nkx2.1 (rojo), un marcador de identidad cortical ventral, y Pax6 (verde) que marca la corteza dorsal revela las regiones adyacentes dorsal y ventral. La tinción de calretinina (verde) en una sección en serie revela la producción de interneuronas corticales en la región ventral del organoide. f. La tinción conjunta de Neuropilin-2 (Nrp2, rojo), así como la tinción de Frizzled-9 (rojo) y Prox1 (verde) revela regiones del hipocampo dentro de organoides cerebrales independientes. g. La tinción inmunohistoquímica para transtiretina (TTR), un marcador del plexo coroideo, revela regiones que también muestran la morfología típica del plexo coroideo.

Figura 3. Organización estereotípica de zonas progenitoras en la corteza dorsal de organoides cerebrales. a. Inmunohistoquímica para neuronas (Tuj1, verde) y progenitores gliales radiales (Pax6, rojo) en una típica región cortical dorsal grande (aprox. 1 mm de sección) dentro de un organoide cerebral que recapitula la organización

apical-basal de los progenitores adyacentes a la cavidad llena de líquido en una región que recuerda a la zona ventricular y a las neuronas recién nacidas que se acumulan basalmente. **b.** La tinción con el marcador de IP Tbr2 (rojo) revela una localización de la zona subventricular muy parecida *in vivo*. **c.** Tinción para fosfohistona H3 (PH3, verde) para marcar las células en la mitosis. Las divisiones progenitoras ocurrieron principalmente en la superficie apical, pero se pueden ver varias divisiones en una región subventricular, probablemente perteneciente a IP u ORG. Pax6 (rojo) marca la glía radial. **d.** Inmunohistoquímica para fosfo-vimentina (verde), un marcador de glía radial mitótica que revela la división típica en la superficie apical. **e.** Imagen de mayor aumento de la tinción con fosfo-vimentina (verde) de una glía radial divisoria que revela el largo proceso basal típico de la morfología de la glía radial. **f.** Esquema de la técnica de electroporación. Se inyectó ADN plasmídico en cavidades llenas de fluido dentro del organoide y se aplicó un pulso eléctrico a las células electroporadas (progenitores gliales radiales) adyacentes a la cavidad. Estos resultados en varias regiones de electroporación (panel derecho, GFP en verde) y alta eficiencia de electroporación de RG (panel inferior, GFP en verde). **g.** Progenitores electroporados con GFP (flechas) en un tejido en etapa temprana (18 días) que revela la morfología neuroepitelial. **h.** Tejido electroporado con GFP a los 30 días que revela glía radial (flechas) con morfología bipolar típica (puntas de flecha). **i.** Tejido electroporado con GFP a los 36 días que revela una región cortical más gruesa más avanzada con glía radial (flecha) que exhibe procesos apicales y basales largos (puntas de flecha).

Figura 4. La glía radial de los organoides cerebrales exhibe características típicas observadas *in vivo*. **a.** Cuadros de imágenes vivas de una glía radial electroporada (GFP, verde) que muestra el movimiento del cuerpo celular (flecha) a lo largo de los procesos bipolares. El tiempo en horas y minutos se muestra en la esquina superior derecha. **b.** Experimento de radiomarcado y seguimiento de BrdU que revela la migración nuclear intercinética. A 1 hora de la administración de BrdU, la glía radial positiva para BrdU (verde) (Sox2, rojo) se localizó en la región basal de la VZ. Cuatro horas después de lavar BrdU, se pueden observar muchas células BrdU+ desplazadas apicalmente, mientras que a las 6 horas después del lavado, se pueden observar varias células en la superficie apical. **c.** Tinción con fosfo-vimentina (verde) que revela una célula mitótica en la superficie apical durante la anafase (flecha) con una orientación plana de división. **d.** Cuantificación de la orientación de la glía radial de la división con respecto a la superficie apical, mostrada en contenedores de 0-30 grados (plana), 30-60 grados (oblicua) y 60-90 grados (vertical). n = 27 células de 5 regiones corticales cerebrales diferentes. **e.** Rastreo de linaje en tejidos electroporados con GFP después de un pulso corto de una hora de BrdU seguido de una búsqueda de 16 horas. Los pares de células hijas se marcan mediante marcación conjunta con GFP y BrdU. Se pueden observar divisiones simétricas con células hijas de la misma identidad (positiva para Sox2, azul, puntas de flecha), así como divisiones asimétricas (flechas). **f.** Cuantificación de los resultados mostrados en e. para 18 pares de células de tres tejidos corticales independientes. Los números sobre las barras representan el número de pares de hijas para cada categoría.

Figura 5. Los organoides cerebrales producen oRG y neuronas con un comportamiento típico de morfología y migración. **a.** La tinción con Sox2 (rojo, glía radial) y Tuj1 (verde, neuronas y procesos) revela la presencia de glía radial externa separada de la zona ventricular (VZ) apical y organizada de manera similar al desarrollo cortical humano. la VZ y la SVZ aparecen separadas de una capa de oRG (OSVZ) por una capa de fibras Tuj1+ muy parecidas a la capa de fibra interna (IFL). **b.** Inmunohistoquímica para fosfo-vimentina (verde) que revela oRG (flechas) divisorias con morfología celular típica, es decir, la presencia de un proceso basal (puntas de flecha) pero que carece de un proceso apical. Justo después de la división se puede observar un par de células hijas, una de las cuales hereda el proceso basal. Apical (A) está orientado hacia abajo mientras que basal (B) está orientado hacia arriba. **c.** La tinción con fosfo-vimentina (verde) en un par de células hijas recientemente divididas revela que una hija se mantiene como una oRG (Sox2+, rojo) mientras que la otra carece de expresión de Sox2 (punta de flecha). **d.** Orientación de la división de una oRG mitótica en anafase que revela una orientación vertical (60-90 grados) con respecto a la superficie apical (línea discontinua). La cuantificación de esta orientación se muestra a la derecha. **e.** La inmunohistoquímica para el marcador de neurona de nacimiento temprano Ctip2 (verde) y el marcador de neurona de nacimiento posterior Brn2 (rojo) revela poblaciones de neuronas independientes que muestran separación rudimentaria a los 30 días de diferenciación. **f.** A los 75 días de diferenciación, la separación de las neuronas recién nacidas (Ctip2, verde) y nacidas posteriormente (Satb2, rojo) es más evidente con una organización de adentro hacia afuera que recuerda a aquella observada *in vivo*. **g.** La tinción con calretinina (verde) para las interneuronas corticales generadas a partir de la corteza ventral (Figura 2e) exhibe la morfología típica de la migración tangencial al tejido cortical dorsal (FoxG1, rojo) con procesos principales perpendiculares a la superficie "ventricular" apical. **h.** Las neuronas corticales electroporadas con GFP (verde) (flechas) extienden los axones de largo alcance con evidencia de agrupación de axones (puntas de flecha) similar a la observada en los tractos piramidales. **i.** Imagen de gran aumento del axón neural electroporado con GFP (verde) que muestra una morfología compleja y ramificación del axón (puntas de flecha). **j.** Cuadros de mapas de calor de color falso de imágenes in vivo con tinte sensible al calcio Fluo-4 que revela oleadas espontáneas de calcio en neuronas individuales (puntas de flecha) de organoides cerebrales. El tiempo se muestra en minutos: segundos.

Figura 6. Organoides cerebrales generados a partir de iPSC derivadas de un paciente o de microcefalia de modelo de electroporación de ARNph. **a.** Escaneo de imagen de resonancia magnética del paciente A3842 tomado al nacer (arriba) en comparación con un control de la misma edad (abajo) que muestra la reducción del tamaño del cerebro y la cabeza y el plegado cortical simplificado (flechas). Imágenes Saggital T1 (izquierda) y axial

T2 (derecha). Barra de escala 1 cm. **b.** Secuenciación de cromatogramas que demuestran mutaciones sin sentido heterocigotas compuestas heredadas de cada padre. **c.** Transferencia Western para la proteína Cdk5Rap2 en lisados de fibroblastos de control y de la piel del paciente (A3842) que revela la pérdida de la proteína en el paciente A3842. La Vinculina (VCL) se muestra como un control de carga. **d.** Tinción inmunocitoquímica para Cdk5Rap2 en el paciente (A3842) y fibroblastos de control que revela la localización en los centrosomas (CPAP, verde) en el control pero carece de tinción en los fibroblastos del paciente. **e.** Imágenes representativas de campo claro de organoides cerebrales generados a partir de iPSC de control y derivadas del paciente (en el presente documento se muestra la línea 1M, todas las líneas se muestran en la Figura 9) a los 6, 11, 15 y 22 días de la diferenciación. El control exhibe grandes regiones corticales llenas de fluido, mientras que el tejido derivado del paciente exhibe un aumento de crecimiento con menos regiones de tejido cortical grueso. **f.** Inmunohistoquímica en tejidos de control y derivados del paciente (se muestra la línea 10M como ejemplo representativo) en el día 30 de diferenciación que revela menos neuronas (Doblecortina, DCX, verde, flechas) y zonas progenitoras más pequeñas (Sox2, rojo, puntas de flecha). **g.** Tinción en una etapa anterior (día 22) para neuronas (Tuj1, verde) y glía radial (Sox2, rojo) que revela zonas progenitoras más pequeñas y neuronas aumentadas en tejidos derivados del paciente (En el presente documento se muestran las líneas 1M y 14B). **h.** Mayor aumento de los tejidos corticales en desarrollo que muestran un aumento de las neuronas (Tuj1, verde, flechas) en el tejido derivado del paciente (línea 14B). **i.** Organoides derivados de células hES electroporadas conjuntamente con GFP (verde) y ARNph contra Cdk5Rap2 o un ARNph revuelto. Las regiones electroporadas con ARNph de Cdk5Rap2 exhiben pérdida de progenitores de Sox2+ (rojo) y más neuronas doblecortina (DCX, azul). **j.** Mayor aumento de resultados en **i.** mostrando la morfología neuronal de GFP (verde) electroporada con ARNph de Cdk5Rap2. Estos exhiben una mayor expresión de DCX (azul) y una pérdida de Sox2 (rojo) en comparación con el tejido revuelto o adyacente no electroporado.

Figura 7. Generación de organoides cerebrales a partir de múltiples células madre pluripotentes humanas.

a. La tinción con hematoxilina-eosina de organoides generados a partir de células ES H9 humanas, así como las células iPS humanas muestran un tamaño similar y una morfología compleja, así como la presencia de tejidos avanzados del prosencéfalo, que se muestran con un aumento mayor en los paneles inferiores. **b.** La tinción de N-cadherina (verde) y neuronas recién nacidas (Doblecortina, DCX, rojo) en tejidos generados tanto de células ES H9 humanas como de células iPS humanas revela una organización similar y polaridad basal apical táctil en ambos tipos de tejidos.

Figura 8. Identidad neuronal durante la diferenciación de organoides cerebrales.

RT-PCR de los marcadores de pluripotencia Oct4 y Nanog, así como los marcadores de identidad neural Sox1 y Pax6 en células ES humanas no diferenciadas y después de la diferenciación a los 6 y 9 días que revela una identidad pluripotente disminuida a los 9 días de diferenciación, mientras que la identidad neuronal se activó.

Figura 9. Caracterización de las iPSC derivadas del paciente y organoides cerebrales.

a. Las células iPS derivadas de fibroblastos de piel del paciente A3842 exhiben la morfología típica de células ES. Se eligieron cuatro líneas para el análisis basado en esta morfología y pluripotencia típicas. **b.** Tinción con fosfatasa alcalina (azul) de colonias de células iPS derivadas del paciente que revelan pluripotencia. **c.** Cultivo organoide temprano representativo del paciente (línea 1M) y control utilizando el protocolo y el tiempo establecido para las células hES normales. Los tejidos del pacientes eran mucho más pequeños y no podían prosperar, por lo que el protocolo tuvo que modificarse ligeramente para producir tejidos neurales. **d.** Los tejidos derivados del paciente que usan un mayor número de células iniciales muestran neuroepitelio pero no forman tejidos corticales gruesos llenos de líquido como se observa en los tejidos derivados del control. **e.** Transferencia Western para Cdk5Rap2 endógena en células 293T transfectadas con 4 diferentes ARNph contra Cdk5Rap2. ARNph1 y 2 son más eficientes, mientras que ARNph 4 conduce a una modesta reducción de proteínas. La tubulina se muestra como un control de carga.

Figura 10. Los organoides cerebrales humanos recapitulan varias identidades de la región cerebral.

a. Tinción para el marcador de preplaca Tbr1 (rojo) y marcador neuronal MAP2 (verde) que revela preplaca superficial (corchete superior) y capa neuronal subyacente similar a IZ (corchete inferior). **b-c.** Tinción para diversas identidades de la región del cerebro: prosencéfalo (**b**); corteza prefrontal (observe el límite discreto, flecha), Auts2 (**c**); hipocampo, Nrp2, Fzd9, Prox1. **d.** Tinción con hematoxilina-eosina de tejido retiniano que presenta capas estereotípicas: epitelio pigmentario retiniano (RPE), capa nuclear externa (ONL) y capa nuclear interna (INL). Barras de escala: 100 µm.

Figura 11. Organización estereotípica y comportamiento de los progenitores.

a. Tinción para el marcador de preplaca Tbr1 (rojo) y el marcador neuronal MAP2 (verde) que revela la preplaca superficial (corchete superior) y capa neuronal subyacente similar a IZ (corchete inferior). **b.** Tinción para el marcador de IP Tbr2 (rojo) que revela la localización de SVZ de los IP (flechas).

Figura 12. Organización y maduración de las neuronas corticales cerebrales.

a. Tinción inmunohistoquímica en el día 30 que muestra la preplaca (Tbr1) con signos tempranos de organización radial (MAP2, corchete i) y la presencia de una capa similar a IZ (corchete ii) adyacente a la VZ/SVZ (corchete iii). DAPI marca núcleos (azul). **b.** Tinción de Reelina que indica las células de Cajal-Retzius a lo largo de la superficie basal del tejido cortical dorsal. **c.** El rastreo de células individuales de oleadas de calcio con la aplicación de glutamato (regiones de interés,

ROI, delineadas en el panel izquierdo), medido por el cambio en la fluorescencia (unidades arbitrarias). Las flechas marcan el momento de la adición de glutamato. **d.** Rastreo de células individuales (ROI marcadas en la imagen a la izquierda) de las oleadas de calcio antes (paneles de la izquierda) y después de la adición de TTX (paneles de la derecha). Barras de escala: 100 μm .

5 **Figura 13. Modelado de organoides cerebrales de microcefalia.** **a.** La tinción en el día 22 muestra un aumento de las neuronas (Tuj1, flechas) en el tejido derivado del paciente (14B). **b.** Búsqueda del pulso de BrdU en organoides de control y derivados del paciente (14B) que muestran un mayor porcentaje de células BrdU⁺ con identidad neural y menos en la VZ en comparación con el control. Resultados cuantificados a la derecha. Las barras de error son SD ** P <0,01, prueba t de Student. n = 3 organoides para cada condición (300 células en total para el control, 204 células para el paciente). **c.** Tinción con P-Vimentina en tejidos de control y derivados del paciente (14B) que muestran divisiones mitóticas RG. Los RG de control en la anafase divididos exclusivamente horizontales (ángulo de 0-30 grados, flecha) mientras que los RG del paciente mostraron muchas orientaciones oblicuas y verticales (punta de flecha). Resultados cuantificados a la derecha (P <0,01, prueba exacta de Fisher 2x3, n = 11 células para control, n = 15 células derivadas del paciente, de > 5 regiones corticales cada una).

10 **Figura 14. Generación de organoides cerebrales a partir de múltiples células madre pluripotentes humanas.** **a.** La tinción con hemotoxilina-eosina de organoides cerebrales en comparación con el cultivo estacionario revela tejidos más grandes en general con una subestructura que recuerda a las regiones cerebrales, tal como la corteza del prosencéfalo (flechas) y el plexo coroideo (punta de flecha). **b.** Imágenes de mayor aumento de organoides teñidos con hemotoxilina-eosina que revelan capas que recuerdan la capa molecular cortical cerebral (barra), así como tejidos que recuerdan meninges (puntas de flecha) y plexo coroideo (flechas). **c.** Tinción con TUNEL (verde) que revela la muerte celular en las regiones interiores (flechas) del organoide cerebral con regiones corticales que se desarrollan a lo largo del exterior. DAPI marca núcleos (azul).

15 **Figura 15. Identidad neuronal durante la diferenciación de organoides cerebrales.** **a.** Tinción para los marcadores del lóbulo cortical Lmo4 (marcador frontal y occipital, verde) y Tshz2 (marcador occipital, rojo). Obsérvese la tinción nuclear esperada (flechas, puntas de flecha) para ambos en una región (paneles superiores) que sugiere identidad occipital, mientras que solo la tinción de Lmo4 (puntas de flecha) es claramente evidente en otra región (paneles inferiores) que sugiere identidad frontal. DAPI marca núcleos (azul). **b.** Tinción para el marcador ventral Nkx2.1 (rojo) y el marcador interneuronal cortical Calretinina (verde) en un organoide que contiene tanto las regiones ventral (puntas de flecha) como dorsal (superior izquierda) dentro de una sección. Las imágenes de la derecha son imágenes unidas de mayor aumento de la región descrita en la imagen de menor aumento de la izquierda. Las interneuronas con calretinina se pueden observar entre las dos regiones con la morfología típica de la migración y la redirección hacia la corteza dorsal (flechas). Barras de escala: 100 μm .

20 **Figura 16. Organización glial radial y morfología.** **a.** Tinción para los componentes BAF de remodelación de cromatina Baf53a (verde, paneles superiores) y Baf53b (verde, paneles inferiores) en secciones en serie del mismo tejido que muestra el Baf53a específico del progenitor neural expresado en las RG de VZ mientras que el Baf53b específico de neuronas se expresa en neuronas DCX+ (rojo) fuera de la VZ. **b.** Imagen de mayor aumento de la tinción con fosfo-vimentina (verde) de una glía radial en división que revela el largo proceso basal típico de la morfología glial radial.

25 **Figura 17. Organización espacial y características de las identidades de las neuronas corticales.** **a.** Tinción para el marcador de preplaca Tbr1 (verde) y el marcador de capa profunda Ctip2 (rojo) en el día 30 que revela una separación espacial rudimentaria que recuerda las primeras etapas del desarrollo de CP. **b.** El rastreo de células individuales de oleadas de calcio en neuronas individuales (regiones de interés, ROI, resumidas en el panel izquierdo), medido por el cambio en la fluorescencia (unidades arbitrarias).

30 **Figura 18. Características humanas del desarrollo cortical no recapituladas en organoides de ratón.** **a.** Imagen de baja amplificación de la región que se muestra en la Figura 5a que revela la presencia de una región separada de oRG (demarcada por puntas de flecha) que aparecen separadas de la VZ en todas las regiones (corchetes) pero más separadas y con una capa de fibras de Tuj1+ entre las partes más gruesas del tejido cortical (corchete más grande). Todo el organoide se puede observar en la Figura 1c. **b.** Imagen de bajo aumento de un organoide cerebral derivado de ESC de ratón teñido para neuronas (Tuj1, verde) y progenitores neurales (Sox2, rojo) que revela un tamaño de organoide más pequeño en general, así como regiones corticales más pequeñas (flechas) que las humanas. **c.** Mayor aumento de una región de identidad cortical en organoides cerebrales de ratón teñidos para progenitores RG (Sox2, rojo) que revelan la presencia de solo unos pocos oRG (puntas de flecha) que no se organizan en una capa separada como la que se observa en humanos.

35 **Figura 19. Parámetros de crecimiento del paciente.** **a.** Todos los parámetros de crecimiento se redujeron significativamente tanto al nacer como después del parto, con todos los puntajes z menores a -2 desviaciones estándar de la media de la población por edad y sexo (línea discontinua). Peso (wgt), altura (hgt) y circunferencia de la cabeza (circunferencia occipitofrontal, ofc) al nacer y a la edad actual de 3 años y medio. La circunferencia de la cabeza se vio mucho más gravemente afectada que la altura y el peso, lo que indica que el volumen del cerebro se redujo de manera desproporcionada como resultado de una restricción de crecimiento más severa.

Figura 20. Caracterización de las iPSC derivadas del paciente y organoides cerebrales. **a.** Cuantificación del porcentaje de progenitores Sox2+ y neuronas Tuj1+ en regiones corticales cerebrales de control y 2 líneas de tejidos derivados del paciente (1M y 14B) en la etapa temprana del día 22. Las barras de error son SEM. *** P <0,001 en comparación con el control, prueba t de Student. n = 4 tejidos para cada línea. **b.** Imagen de campo brillante de tejidos derivados del paciente (línea 14B) electroporada ya sea solo con GFP (panel izquierdo) o el constructo de expresión de GFP y CDK5RAP2 (panel derecho). Obsérvese la presencia de tejido neuroepitelial más grande (flechas) en el tejido electroporado CDK5RAP2 en comparación con el control. **c.** La tinción con GFP (verde) en tejidos de control con GFP (panel izquierdo) y derivados del paciente coelectroporados con CDK5RAP2 (14B) revelan la presencia de múltiples neuronas GFP+ (puntas de flecha) en el control 6 días después de la electroporación, mientras que los tejidos electroporados con CDK5RAP2 muestran múltiples glías radiales GFP+ (flechas).

Figura 21. Inactivación mediada por ARNph de CDK5RAP2 en organoides humanos. **a.** Transferencia Western para CDK5RAP2 endógeno en células 293T transfectadas con 4 diferentes ARNph contra CDK5RAP2. ARNph 1 y 2 son más eficientes, mientras que ARNph4 conduce a una modesta reducción de proteínas. La alfa-tubulina se muestra como un control de carga. **b.** Cuantificación del porcentaje de células electroporadas GFP+ que exhiben identidad progenitora Sox2+ o identidad neuronal DCX+ en el control revuelto o los tejidos coelectroporados con ARNph. *** P <0,001 en comparación con el control, prueba t de Student, n = 4 tejidos para cada ARNph. Las barras de error son SEM.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Métodos

Constructos de plásmidos y materiales. El plásmido de GFP utilizado para la electroporación conjunta con ARNph y para imágenes *in vivo* fue pCAG-GFP (plásmido Addgene 11150). Los ARNph dirigidos a CDK5RAP2 humano se clonaron usando la estrategia de expresión de ARNph pSuper (OligoEngine). Las secuencias de direccionamiento fueron las siguientes: ARNph 1 AGGACGTGTTGCTTCAGAAAT (SEQ ID NO: 1), ARNph 2 AGAGTCAGCCTTCTGCTAAAG (SEQ ID NO: 2), ARNph 3 GTGGAAGATCTCCTAACTAAA (SEQ ID NO: 3), ARNph 4 ACTATGAGACTGCTCTATCAG (SEQ ID NO: 4). El constructo de expresión CDK5RAP2 fue generado usando el sistema Gateway (Invitrogen) mediante amplificación por PCR de CDK5RAP2 a partir de ADNc de CDK5RAP2 humano MGC (ID del clon: 9052276) usando los cebadores con los sitios AttB: Directo GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGATGGACTTGTTGTTGGAAGA (SEQ ID NO: 5), Inverso: GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTCAGCTTTATTGGCTGAAAGTCTTCTC (SEQ ID NO: 6). CDK5RAP2 se clonó en el vector de destino pcDNA3.1/nV5-DEST. Condiciones de cultivo de organoides cerebrales. Se obtuvieron ES H9 humanas de referencia (WA09) de WiCell en el pase 26 con cariotipo normal verificado y libre de contaminación. Las células iPSC se obtuvieron de System Biosciences (SC101A-1) pluripotente verificadas y libre de contaminación. Todas las líneas PSC humanas se verificaron regularmente y se confirmaron negativas para micoplasma. Las células madre embrionarias humanas de referencia (ES) o células madre pluripotentes inducidas (iPS) se mantuvieron en MEF irradiados con rayos gamma CF-1 de acuerdo con los protocolos WiCell. En el día 0 de cultivo del organoide, las ESC o iPSC de referencia se disociaron de los MEF por tratamiento con dispasa y los MEF se eliminaron mediante separación por gravedad de las colonias de células madre de los MEF antes de la tripsinización de las células madre para generar células individuales. Luego se colocaron 4500 células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de unión ultrabaja en medio hES con bFGF bajo (reducido 5 veces) e inhibidor de ROCK 50 mM.

Los cuerpos embrioides (EB) se alimentaron cada dos días durante 6 días y luego se transfirieron a placas de 24 pocillos de baja adherencia en medios de inducción neural que contenían DMEM/F12, suplemento de N₂ 1:100 (Invitrogen), Glutamax (Invitrogen), MEM-NEAA y 1 µg/ml de heparina (Sigma). Estos comenzaron a formar tejidos neuroepiteliales, que se alimentaron cada dos días durante 5 días. El día 11 del protocolo, los tejidos se transfirieron a gotitas de Matrigel pipeteando en Matrigel frío sobre una lámina de Parafilm con pequeños hoyuelos de 3 mm. Estas gotitas se dejaron gelificar a 37 °C y posteriormente se retiraron del Parafilm y se cultivaron en medios de diferenciación que contenían una mezcla 1:1 de DMEM/F12 y Neurobasal que contenía un suplemento de N2 1:200, un suplemento de B27 1:100 sin vitamina A (Invitrogen), 3,5 µl/l de 2-mercaptoetanol, insulina 1:4000 (Sigma), Glutamax 1:100 (Invitrogen), MEM-NEAA 1:200.

Después de 4 días de crecimiento estacionario, las gotitas de tejido se transfirieron a un biorreactor giratorio que contenía medio de diferenciación como anteriormente excepto que se usó el suplemento de B27 con vitamina A. Dado que se ha demostrado que el ácido retinoico es importante para la diferenciación neuronal *in vivo*, se incluyó en el medio final utilizado para diferenciar los organoides cerebrales.

Condiciones de cultivo de organoides de ratón. Se cultivaron células ES A9 de ratón en MEF inactivados para crecer de mitomicina C y pases de acuerdo con los protocolos estándar (Tremml et al., 2008). Para la generación de organoides de ratón, se aplicó el protocolo de organoides con las siguientes modificaciones: las células se tripsinizaron y se sembraron 2000 células madre en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de unión ultra baja en medio de diferenciación como lo describen Eiraku et al. (medio que contiene SB431542 10 µM pero sin Dkk-1). Las etapas

posteriores se siguieron de acuerdo con el procedimiento de organoides humanos usando composiciones de medios idénticos, con la excepción de que para los tejidos de ratón se usó una sincronización más rápida de acuerdo con la morfología. Los EB se transfirieron al medio de inducción neural el día 4, se incrustaron en gotitas de Matrigel el día 6 y el día 9 se transfirieron al biorreactor giratorio.

Electroporación de organoides. La electroporación se realizó usando un electrodo de tejidos de placa de Petri y un electroporador de onda cuadrada (ECM 830), ambos de BTX Harvard Apparatus. Se inyectaron un total de 3 µl de plásmido total de 2 µg/µl (GFP para imágenes en vivo, 1,8 µg/µl de ARNph + 0,2 µg/µl de GFP para experimentos de ARNph) en 4-5 ubicaciones dentro del organoide y se realizó electroporación en medio de diferenciación sin antibióticos a 5 pulsos, 80 V, 50 ms de duración, intervalo de 1 s. Para los experimentos de rescate, el plásmido de expresión de GFP y el constructo CDK5RAP2 se electroporaron conjuntamente a concentraciones iguales (1 µg/µl cada uno).

Obtención de imágenes en vivo en organoides. La obtención de imágenes en vivo se realizó usando un sistema de escaneo láser confocal LSM780 (Zeiss) equipado con control de temperatura y CO₂. Para la obtención de imágenes de calcio, Fluo-4 direct (Life Technologies) se preparó de acuerdo con el fabricante y se aplicó 60 minutos antes del inicio de la obtención de imágenes. La obtención de imágenes se realizó a 494 nm de excitación y 516 nm de emisión, los cuadros se tomaron cada 20 segundos durante 100 cuadros. El análisis de datos de la obtención de imágenes de calcio se realizó utilizando ImageJ (Fiji). Las regiones de interés (ROI) se seleccionaron manualmente y se calculó la fluorescencia media para cada período de tiempo. El cambio de fluorescencia se calculó de la siguiente manera: $\Delta F/F = (F - F_{\text{basal}})/F_{\text{fondo}}$, en la que F_{basal} era el valor de fluorescencia media más bajo a través de las imágenes, mientras que F_{fondo} era la fluorescencia media promedio en todos los cuadros. Se añadió glutamato mediante la aplicación del baño a medio durante la formación de imágenes a una concentración final de 100 µM. Se añadió TTX mediante aplicación del baño al medio durante la formación de imágenes a una concentración final de 1 µM y se reanudó la formación de imágenes después de un tiempo de incubación de 10 minutos.

Histología e inmunofluorescencia. Los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4 °C seguido de lavado en PBS 3 veces 10 minutos. Los tejidos se dejaron sumergidos en sacarosa al 30% durante la noche y luego se embebieron en gelatina/sacarosa al 10%/7,5% y se seccionaron criogénicamente a 20 µm. Las secciones de tejido se tiñeron con hemotoxilina/eosina o se usaron para inmunotinción. Para inmunohistoquímica, las secciones se bloquearon y se permeabilizaron en Triton-X al 0,25%, suero de burro normal al 4% en PBS. Las secciones fueron incubadas con anticuerpos primarios en Triton-X al 0,1%, suero de burro normal al 4% en las siguientes diluciones: N-Cadherina (ratón, BD Biosciences 610920, 1:500), Sox2 (conejo, Chemicon, AB5603, 1:300), Tuj1 (ratón, Covance MMS-435P, 1:750), TUNEL (kit de detección de muerte celular in situ-fluoresceína, Roche), FoxG1 (conejo, Abcam ab18259, 1:200), Emx1 (conejo, Sigma HPA006421, 1:50), Krox20 (conejo, Covance PRB-236P, 1:100), Pax2 (ratón, Abnova H00005076-M01, 1:200), Lmo4 (cabra, Santa Cruz sc-11122, 1:50), Tshz2 (conejo, Sigma SAB4500379, 1:50), Otx1+2 (conejo, Abcam ab21990, 1:200), Gbx2 (cabra, Santa Cruz sc22230, 1:100), Auts2 (conejo, Sigma HPA000390, 1:250), Nkx2.1 (conejo, Epitomics 6594-1, 1:250), Pax6 (monoclonal de ratón, DSHB, 1:200), Pax6 (conejo, Covance PRB-278P, 1:300), Calretinina (ratón, Swant 6B3, 1:100), Nrp2 (cabra, RandD Systems AF2215, 1:40), Fzd9 (conejo, Acris SP4153P, 1:200), Prox1 (ratón, Chemicon MAB5654, 1:200), TTR (oveja, AbD Serotec AHP1837, 1:100), Tbr2 (conejo, Chemicon AB9618, 1:500), Tbr1 (conejo, Abcam ab31940, 1:300), MAP2 (ratón, 1:300), PH3 (conejo, Cell Signaling Technology 9706S, 1:300), P-Vimentina (ratón, MBL International D076-3S, 1:250), BrdU (preincubación en HCl 2N, 20 min, 37 °C, rata, AbD Serotec OBT0030CX, 1: 500), Baf53a (conejo, Bethyl IHC-00287, 1:250), Baf53b (conejo, Abcam ab140642, 1:250), Reelina, (ratón, Millipore MAB5366, 1:200), Ctip2 (rata, Abcam ab18465, 1:100), Satb2 (conejo, Abcam ab34735, 1:100), DCX (cabra, Santa Cruz sc-8066, 1:300), Brn2 (cabra, Santa Cruz sc-6029, 1:40). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los conjugados AlexaFluor 488, 568 y 647 de burro (Invitrogen, 1:500). Para las secciones teñidas para BrdU, las secciones se incubaron primero con HCl 2N a 37 °C durante 20 minutos y luego se lavaron tres veces en PBS antes del bloqueo.

Las muestras de ARNm total de RT-PCR se aislaron de organoides completos o células hES por triplicado usando reactivo Trizol (Invitrogen). El ADN contaminante potencial se eliminó usando DNA-Free (Ambion) y se usó 1 µg de ARN para la síntesis de ADNc usando SuperScript III (Life Technologies). Las condiciones de PCR y el número de ciclos (25-35 ciclos) para cada par de cebadores se determinaron empíricamente usando ADNc de hES o ADNc de cerebro fetal humano (Invitrogen). Los ciclos se realizaron a una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante 30 segundos, hibridación de 58-62 °C durante 45 segundos, dependiendo del par de cebadores, y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Los pares de cebadores utilizados fueron los siguientes: Oct4a Directo ggagaagctggagcaaaacc (SEQ ID NO: 7), Inverso tggctgaataccttcccaaa (SEQ ID NO: 8); Nanog Directo gatttggtggcctgaagaaa (SEQ ID NO: 9), Inverso ctttggaactggtggaagaa (SEQ ID NO: 10); Sox1 Directo tatctctgctccggctgtt (SEQ ID NO: 11), Inverso ggttctccctctctctc (SEQ ID NO: 12); Pax6 Directo agttcttcgcaacctggcta (SEQ ID NO: 13), Inverso attctctccccctctctc (SEQ ID NO: 14); Actb Directo aaatctggcaccacacctc (SEQ ID NO: 15), Inverso agagggctacagggatagca (SEQ ID NO: 16); BF1 Directo agaggggcagaagaagaac (SEQ ID NO: 17), Inverso tgaactcgtagatgcctgtg (SEQ ID NO: 18); Six3 Directo ctatcaacaaccccccaacca (SEQ ID NO: 19), Inverso agccgtgctgtcctagaaa (SEQ ID NO: 20); Krox20 Directo ttgaccagatgaacggagt (SEQ ID NO: 21), Inverso ctgcccctgaagtgaagg (SEQ ID NO: 22); Isl1 Directo gctttgttagggatgggaaa (SEQ ID NO: 23), Inverso actcgtatgtatcacctgga (SEQ ID NO: 24).

Cultivo celular y transferencia Western. Las células HEK293T se cultivaron en FBS/DMEM al 10% y se dividieron al 40% en una placa de 6 pocillos (BD Falcon) seguido de transfección al día siguiente usando TurboFect (Thermo Scientific) con 5 µg de ADN plasmídico. Las células se lisaron 2 días después y se realizó la transferencia Western usando anti-CDK5RAP2 de conejo (A300-554A, Bethyl Labs, 1:10.000) seguido de transferencia para anti-alfa tubulina de ratón (ratón, Sigma T6199, 1:10.000). Los fibroblastos dérmicos se obtuvieron mediante biopsia por punción cutánea y se cultivaron en medio completo amnioMAX C-100 (Invitrogen) y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C con 5% de CO₂ y 3% de O₂. Las células se lisaron en Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 280 mM, NP₄O al 0,5%, EDTA 0,2 mM, EGTA 0,2 mM, glicerol al 10% suplementado con comprimido inhibidor de proteasa (Roche). Las muestras de proteínas se procesaron en un gel de acetato de Tris al 3-8% (Invitrogen) seguido de inmunotransferencia usando anti-CDK5RAP2 de conejo (A300-554A, Bethyl Labs, 1:2.000) y anti-Vinculina de ratón (V9264, Sigma, 1:2.000). Para realizar la inmunofluorescencia, los fibroblastos del paciente se fijaron en metanol a -20 °C durante 7 minutos y luego se bloquearon en PBS/albumina de suero bovino al 1%. Luego se incubaron las células en anti-CDK5RAP2 de conejo (A300-554A, Bethyl Labs, 1:2.000) y anti-CPAP de ratón (SC-81432, Santa Cruz Biotechnology, 1:100) en solución de bloque. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los conjugados AlexaFluor 488 y 568 de burro (Invitrogen, 1:500).

Sujeto de investigación e identificación del gen. Se extrajo el ADN genómico de la sangre periférica del paciente 3842 y de los padres del paciente mediante procedimientos estándar. Se obtuvo el consentimiento informado de la familia y el estudio fue aprobado por el Comité de ética de investigación multicentro para Escocia (04: MRE00/19). La captura y secuenciación completa del exoma se realizó en el Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI), Reino Unido. El ADN se cortó a longitudes de 150 pb por sonicación (Covaris, Woburn, Massachusetts, EE. UU) antes de la captura y amplificación del exoma completo utilizando el kit SureSelect Human All Exon 50 Mb (Agilent, Santa Clara, CA). Los fragmentos se secuenciaron usando la plataforma Illumina HiSeq. Las lecturas de la secuencia final emparejada de 76 pb se alinearon con la secuencia de referencia hg19 del explorador del genoma UCSC usando BWA. Las variantes de secuencia se obtuvieron usando GenomeAnalysisTK (www.broadinstitute.org/gatk/) y se anotaron con puntajes de transcritos y consecuencia de proteínas, polifeno, condel y SIFT. Las mutaciones se confirmaron mediante secuenciación bidireccional de productos de PCR utilizando la química del terminador de tinte en un secuenciador capilar ABI 3730 (Applied Biosystems).

Reprogramación de las iPSC del paciente. Se reprogramaron los fibroblastos de la piel del paciente usando el suministro lentiviral de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Producción de lentivirus: una mezcla de ADN que consiste en vectores de empaquetamiento de virus (tat, rev, gag/pol, 1,5 µg cada uno y vsv-g, 3 µg) y el vector de reprogramación OKSM flanqueado por loxP (oct-4, klf4, sox2, c-myc, 30 µg) se transfectaron en células 293. En resumen, se añadieron gota a gota 112,5 µl de Fugene6 a 2 ml de DMEM bajo agitación vortical constante seguido de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de ADN se añadió a la mezcla de DMEM/Fugene6 mientras se agitaba en forma vortical para generar la mezcla de transfección final. Después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de transfección se añadió a células 293 confluentes al 80%, cultivadas en 13 ml de medio de cultivo 293. El medio que contenía virus se recogió y se reemplazó con medio nuevo 48 h, 60 h y 72 h después de la transfección. El sobrenadante viral se almacenó a 4 °C. Reprogramación de fibroblastos dérmicos humanos: se sembraron 1 x 10⁵ fibroblastos dérmicos el día anterior a la infección en placas de cultivo de 10 cm y 6 cm recubiertas con gelatina al 0,1%. Las células se incubaron durante 12 h con sobrenadante viral 1:1 mezclado con medio de fibroblastos dérmicos suplementado con 4 µg/ml de polibreno. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1x y se cultivaron durante 2 días más en medio de fibroblastos dérmicos. Después de 2 días, el medio se cambió a medio de iPSC humanas suplementado con 10 ng/ml de bFGF (PeproTech, cat.nr: 100-18B), CHIR99021 10 µM (Stemgent, cat.nr: 04-0004) y PD 0325901 1µM (Stemgent, cat.nr: 04-0006) y células cultivadas durante 21 días. El medio fue cambiado todos los días. Las colonias en crecimiento, identificadas por la apariencia morfológica, se recogieron y pasaron sobre MEF CF-1 inactivados (Global Stem, cat.nr: GSC-6201M). Las líneas iPSC derivadas del paciente se compararon con las células IPS de control obtenidas de un donante sano (System Biosciences, SC101A-1). La tinción con fosfatasa alcalina se realizó usando el kit de sustrato de fosfatasa alcalina Vector Blue (Vector Laboratories, SK5300). Las cuantificaciones en el paciente y los organoides derivados de iPSC de control se realizaron a ciegas utilizando nombres de archivos codificados en ImageJ.

Sinopsis clínica del paciente. El paciente A3842 mostró restricción de crecimiento de la vida fetal, con una marcada reducción en el tamaño del cerebro evidente a las 22/40 semanas de gestación. El embarazo progresó de otra manera normalmente y el paciente nació a término con un peso de 1,82 kg (-3,9 s.d.). Postnatalmente, el crecimiento también se redujo de tal manera que la altura a los 3 años y 7 meses fue de 73 cm (-6,7 s.d.) y la circunferencia de la cabeza de 35 cm (-13,2 s.d.), de acuerdo con una microcefalia desproporcionada severa. El paciente tenía ojos bastante prominentes y dientes de espacio amplio en forma cónica, pero no fue notable en el examen. No se observaron déficits neurológicos ni malformaciones en otros sistemas, aparte de una pérdida auditiva conductiva/neurosensorial mixta. Los hitos del desarrollo se retrasaron en forma leve/moderada. La obtención de imágenes neurológicas a las 22/40 semanas de gestación demostró un cerebro liso (la fisura de Silvio normalmente evidente en esta gestación no estaba presente) con lóbulos frontales pequeños y ausencia parcial del cuerpo caloso. Postnatalmente, las IRM demostraron microcefalia con un patrón giral simplificado y una corteza cerebral de grosor normal. En resumen, los hallazgos clínicos estuvieron en consonancia con los casos anteriores de microcefalia primaria por CDK5RAP2 (la sordera se ha informado previamente con CDK5RAP2), con parámetros de crecimiento que caen en el espectro de enanismo

primordial microcefálico-microcefalia primaria reportada para otros genes de microcefalia centrosomal tales como *CENPJ* y *CEP152*.

Ejemplo 2: El procedimiento de gota giratoria para la producción de organoides cerebrales.

El progreso reciente con modelos *in vitro* de varios sistemas de órganos ha demostrado la enorme capacidad de autoorganización para que las células madre pluripotentes formen tejidos completos. Al desarrollar un enfoque para modelar la complejidad y la heterogeneidad del cerebro humano, nos basamos en este concepto y se omitió cualquier patrón de factores de crecimiento que impulse artificialmente regiones cerebrales particulares. En su lugar, nos centramos en mejorar los requisitos de crecimiento del tejido y proporcionar el entorno necesario para que las señales intrínsecas influyan en el desarrollo en lugar de impulsar la formación de regiones cerebrales específicas extrínsecamente.

Se comenzó con un enfoque modificado para generar neuroectodermo a partir de cuerpos embrioides similar al utilizado para generar rosetas neurales (Xia y Zhang. 2009). Sin embargo, la diferencia clave en este enfoque es que estos tejidos neuroectodérmicos se mantuvieron en cultivo tridimensional y se incrustaron en gotas de Matrigel, que luego se transfirieron a un biorreactor giratorio para mejorar la absorción de nutrientes y permitir el crecimiento de tejidos más grandes y complejos (Figura 1a).

Este enfoque de gota giratoria condujo a la formación de neuroepitelios grandes y continuos que rodean una cavidad llena de líquido que recuerda a un ventrículo (Figura 1b). Estos neuroepitelios mostraron una expresión característica de la N-cadherina neural específica, que se localizó específicamente en la superficie interna reflejando la polaridad apical-basal típica para el desarrollo del neuroepitelio. Además, el neuroepitelio era más grande y más continuo que los tejidos generados de forma similar por Eiraku et al. (2008), que en su lugar formaron un agregado de varios neuroepitelios similares a rosetas pequeñas (Figura 1b, e).

Cuando se permitió que estos tejidos continuaran desarrollándose más, los organoides formaron tejidos heterogéneos muy grandes (de hasta 4 mm de diámetro), altamente complejos con características estructurales que recuerdan a varias regiones del cerebro (Figura 1c-e), que podrían sobrevivir indefinidamente (actualmente hasta 10 meses) cuando se mantienen en un biorreactor giratorio. El análisis histológico y morfológico macroscópico reveló regiones que recuerdan la corteza cerebral, el plexo coroideo, la retina y las meninges. Es importante destacar que los tejidos generalmente alcanzaron un límite de tamaño probablemente debido a la falta de un sistema circulatorio y las limitaciones en el intercambio de oxígeno y nutrientes. De acuerdo con esto, fue visible una muerte celular extensa en el núcleo de estos tejidos (Figura 14c), mientras que las diversas regiones del cerebro se desarrollaron a lo largo del exterior. Además, los organoides cerebrales podrían generarse de forma reproducible con una morfología y complejidad general similar tanto a las células ES humanas como de las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) (Figura 7a, b), lo que sugiere que este enfoque podría aplicarse a una variedad de células madre pluripotentes humanas.

Ejemplo 3: Los organoides cerebrales muestran varias regiones cerebrales discretas

Como los análisis morfológicos generales sugirieron que los organoides cerebrales mostraban regiones cerebrales heterogéneas, a continuación se buscó caracterizar la identidad regional de estos tejidos. Primero se realizó RT-PCR para varios marcadores de pluripotencia e identidad neural (Figura 8) y se descubrió que si bien los marcadores de pluripotencia Oct4 y Nanog disminuyeron durante el curso de la diferenciación de organoides, los marcadores de identidad neural Sox1 y Pax6 estaban sobrerregulados, lo que indica una inducción neuronal exitosa de estos tejidos

A continuación, se examinaron los marcadores regionales de identidad neural en organoides enteros (Figura 2a), que revelaron la presencia de marcadores tanto del prosencéfalo (BF1 y Six3) como de marcadores del rombencéfalo (Krox20 e Isl1) que sugieren una población heterogénea dentro del tejido. Sin embargo, se notó que a medida que los tejidos se desarrollaron en etapas más avanzadas, los marcadores del prosencéfalo permanecieron altamente expresados, mientras que los marcadores del rombencéfalo comenzaron a disminuir, lo que sugiere que las cantidades relativas dentro de los tejidos de estas identidades cambiaron en el transcurso de la diferenciación. Esto es particularmente interesante a la luz del hecho de que el desarrollo normal del cerebro humano refleja un cambio similar en las cantidades relativas de estas identidades debido a la expansión del desarrollo del tejido del prosencéfalo, que eventualmente constituye aproximadamente el 85% del cerebro humano.

Luego, se examinó si las células con estas identidades de región cerebral se desarrollaron como regiones discretas dentro de los organoides, como sugeriría la morfología macroscópica, o si fueron intercaladas aleatoriamente dentro del tejido. Para probar esto, se realizó una tinción inmunohistoquímica para los marcadores del prosencéfalo y mesencéfalo, así como las identidades del rombencéfalo en dos puntos temporales durante el desarrollo temprano de estos tejidos (Figura 2b). Se podían identificar claramente varias regiones de la identidad del prosencéfalo mediante la expresión de Pax6 y de la identidad del prosencéfalo/mesencéfalo, de acuerdo con lo determinado por la expresión de Otx1/2. Estas regiones estaban ubicadas adyacentes a las regiones que carecían de estos marcadores, pero eran positivas para los marcadores de rombencéfalo Gbx2, Krox20 y Pax2, que recordaban el límite inicial del mesencéfalo-rombencéfalo, lo que sugiere una comunicación regional similar y una probable represión mutua. Además, se observó

que las regiones de positividad de Gbx2 disminuyeron en abundancia a medida que el desarrollo progresó, de manera similar a los resultados observados en la Figura 2a, mientras que los tejidos del prosencéfalo positivos para Otx1/2 continuaron expandiéndose.

5 A continuación, se examinaron los tejidos más desarrollados para probar si se podían distinguir subregiones del prosencéfalo. Se realizó la tinción con el marcador de prosencéfalo FoxG1 (Figura 2c), que marcó las regiones que muestran la morfología cortical cerebral típica. Muchas de estas regiones también fueron positivas para Emx1 (Figura 2d), lo que indica identidad cortical dorsal. Se pudieron identificar varias regiones discretas dentro de los organoides cerebrales que se tiñeron positivamente para este marcador y mostraron la morfología cortical dorsal típica. También se probó la subespecificación dentro de la corteza dorsal, es decir, la corteza frontal, mediante tinción con el marcador Auts2 (Figura 2d). La tinción de Auts2 podría observarse en neuronas que marcan distintas regiones de la corteza dorsal, lo que sugiere una subespecificación de los lóbulos corticales dentro de los tejidos. Tshz2, un marcador del lóbulo occipital (Figura 15a), y Lmo4, un marcador de los lóbulos frontal y occipital pero ausente en parietal (Figura 15b). Estos marcadores podrían observarse en las neuronas que marcan distintas regiones de la corteza dorsal, lo que sugiere una subespecificación de los lóbulos corticales.

Además, la tinción de otras regiones corticales cerebrales, a saber, la corteza ventral (Figura 2e) y el hipocampo (Figura 2f), reveló de forma similar regiones discretas dentro de los organoides que también mostraron estas identidades. Sorprendentemente, las interneuronas producidas en las regiones ventrales del prosencéfalo exhibieron una morfología y ubicación consistentes con la migración de los tejidos ventrales a los dorsales (Figura 15b). Dentro de la corteza dorsal, estas neuronas muestran neuritas paralelas a la superficie apical, que recuerdan las extensiones migratorias observadas en la migración tangencial *in vivo* (Figura 5g). En particular, las interneuronas positivas para calretinina estaban ausentes de la corteza dorsal de los organoides que carecen de una región ventral (4/4 organoides negativos para Nkx2.1), lo que sugiere que las interneuronas se originan en el prosencéfalo ventral para migrar a la corteza dorsal. Esto sugiere que regiones distantes pueden influenciarse entre sí en el desarrollo de organoides cerebrales.

Finalmente, se pudieron observar otras estructuras cerebrales separadas de estas identidades corticales cerebrales, a saber, el plexo coroideo (Figura 2g) e incluso la retina inmadura (Figura 10d). En general, todos los tejidos examinados muestran regiones con morfología cortical dorsal (35/35, 100%), la mayoría muestra plexo coroideo (25/35, 71%) y varios muestran identidad del prosencéfalo ventral de acuerdo con lo determinado por la inmunorreactividad de Nkx2.1 (12/35, 34%), mientras que solo unos pocos mostraron tejido retiniano (determinado por la presencia de epitelio pigmentado retiniano, 4/35, 11%). Estos resultados sugieren que los organoides cerebrales desarrollaron una variedad de identidades de la región cerebral organizadas en dominios discretos, aunque interdependientes.

Ejemplo 4: La organización cortical dorsal y el comportamiento glial radial se recapitulan en organoides cerebrales

40 Como había interés en modelar el desarrollo y la enfermedad de la corteza dorsal humana, luego se examinó la organización de las regiones corticales dorsales dentro de los organoides cerebrales. La tinción de marcadores de progenitores gliales radiales (RG) y neuronas recién nacidas (Figura 3a) reveló la organización típica de la zona progenitora con RG que forman una capa adyacente a una gran cavidad llena de líquido que recuerda a un ventrículo, lo que sugiere la formación de una zona ventricular (VZ). La tinción con Tbr1 (Figura 11a) reveló el desarrollo adecuado de la identidad neuronal y la migración radial a la preplaca en desarrollo (precursor de la PC). Además, la tinción del progenitor neural y los componentes BAF neurales específicos reveló el cambio característico en los complejos de remodelación de la cromatina durante la especificación del destino neural (Figura 16a). Además, la tinción con el marcador del progenitor intermedio (IP) Tbr2 (Figura 3b) reveló una capa delgada de IP adyacente a la VZ, que recordaba la zona subventricular (SVZ). Por lo tanto, los tejidos corticales dorsales muestran una organización típica de la zona progenitora muy similar a la observada *in vivo*.

A continuación, se examinó si el comportamiento de estos progenitores reflejaba lo observado en la corteza cerebral de los mamíferos. Se examinó la proliferación dentro de estos tejidos mediante la tinción de fosfohistona H3 (PH3) (Figura 3c) y se observó que la mayoría de las células se dividen en la superficie apical, adyacente a la cavidad llena de líquido, lo que probablemente marca las divisiones de RG, que generalmente se dividen en la superficie apical. Además, se podría observar divisiones ocasionales fuera de la VZ que probablemente reflejen divisiones de IP que amplifican el tránsito y potencialmente divisiones de una población de células madre recientemente identificadas, glía radial externa (discutido con más detalle a continuación).

60 Además, cuando se tiñó con fosfo-Vimentina (Figura 3d), un marcador de RG mitóticas, se pudieron observar la mayoría de las divisiones que ocurren en la superficie apical, similar a la tinción con PH3, pero también se pudo observar procesos basales claros que se extienden hasta la superficie externa de estos tejidos (Figura 3e). Esto sugiere que las RG dentro de estos tejidos recapitularon la morfología apical basal típica observada *in vivo*.

65 Para examinar esto con más detalle, se busco etiquetar las RG individuales usando un enfoque de electroporación. A partir de nuestra experiencia con la electroporación en el útero en el cerebro embrionario de ratón, se desarrolló una

técnica para inyectar ADN plasmídico que codifica GFP en las cavidades llenas de fluido de estos tejidos y luego aplicar un campo eléctrico de pulso de onda cuadrada para electroporar las RG adyacentes a estas cavidades similares a ventrículos (Figura 3f). Este enfoque condujo a la expresión reproducible de GFP dentro de varias regiones y en células ubicadas adyacentes a cavidades llenas de fluido.

5 Cuando se examinaron las células marcadas con GFP dentro de estas regiones corticales dorsales, se pudieron identificar RG con morfología típica en varias etapas de desarrollo (Figura 3g). Por ejemplo, en los tejidos en etapas más tempranas, las RG mostraban una morfología neuroepitelial que reflejaba la estructura pseudoestratificada observada tempranamente en desarrollo. Sin embargo, los tejidos en etapas posteriores mostraron RG con procesos apicales y basales más largos que reflejan la morfología bipolar de estas células.

10 La observación de que la división de las RG se produjo en la superficie apical, sugirió que las RG pueden sufrir una migración nuclear intercinética típica. Para probar esto, se obtuvieron imágenes en vivo de RG electroporadas con GFP en organoides cerebrales. Se pudieron observar muchos ejemplos de RG que mostraban el movimiento del cuerpo celular a lo largo de los procesos apicales y basales (Figura 4a) consistentes con la migración nuclear intercinética.

15 Además, se realizaron experimentos de radiomarcado y seguimientos con el marcador de fase S BrdU para probar si los núcleos de RG se desplazaron desde la localización de VZ externa hacia la superficie apical con el tiempo, como era de esperar si las células experimentaran migración nuclear intercinética. De hecho, después de un pulso corto de 1 hora de BrdU, la mayoría de las células se localizaron en la región externa de la VZ (Figura 4b). Sin embargo, después del lavado y una búsqueda de 4 o 6 horas, se pudieron observar progresivamente más núcleos celulares teñidos positivamente para BrdU más cerca y adyacentes a la superficie apical. Esto es consistente con el comportamiento típico de migración nuclear intercinética de RG.

20 A continuación, se examinó el modo de división de las RG en la superficie apical. Ya se había observado que las RG mitóticas se tiñeron bien con P-Vimentina en la superficie apical (Figura 4c), y se pudo discernir claramente el plano de división de esta tinción. Por lo tanto, se realizaron mediciones del plano de división (Figura 4d) para examinar si las RG humanas dentro de estos organoides cerebrales mostraban orientaciones mitóticas similares a aquellas observadas en otros sistemas modelo, a saber, la neocorteza de ratón en desarrollo. Se observaron principalmente orientaciones planas, que eran paralelas a la superficie apical (Figura 4d), que a menudo se ha observado en el desarrollo de otras neocortezas de mamífero. Sin embargo, también se observaron orientaciones oblicuas bastante abundantes, que estaban presentes en mayor medida en estos tejidos humanos de lo que se ha descrito típicamente para la neocorteza de roedores en desarrollo. Curiosamente, estas mediciones reflejaron la misma tendencia descrita recientemente en el cerebro humano, lo que sugiere que los organoides cerebrales podrían recapitular aspectos del desarrollo cortical humano.

25 Se examinó además el potencial de destino de estas divisiones para probar si las RG en los organoides cerebrales humanos podrían dividirse simétrica o asimétricamente. Se realizó electroporación de GFP seguido de una breve radiomarcado y seguimientos de BrdU para divisiones de rastreo de linaje de una pequeña minoría de células. Cuando se examinaron pares de células hijas doblemente marcadas, se pudo observar tanto destinos de RG autorrenovadores simétricos, así como destinos asimétricos con solo una célula hija restante en RG (Figura 4e, f). Esto sugiere que las RG generadas en estos tejidos humanos podrían sufrir divisiones simétricas y asimétricas.

45 **Ejemplo 5: Formación de neuronas corticales cerebrales funcionales**

La formación de la CP organizada radialmente comienza con la formación de su precursor, la preplaca. Para evaluar esta organización inicial, se tiñeron los organoides de 30 días para Tbr1, un marcador de la preplaca, así como Map2, un marcador 38neuronal (Figura 12a). Esto reveló la presencia de una capa neural basal que recuerda a la preplaca, y una región apicalmente adyacente que recuerda a la IZ. Además, se pudieron observar neuronas positivas para Reelina a lo largo de la superficie basal, lo que sugiere la presencia de células de Cajal-Retzius, una población importante en la generación de la arquitectura de CP.

50 *In vivo*, las neuronas corticales dorsales maduran y extienden axones de largo alcance. Para probar estas características, se realizó electroporación de GFP y se examinó la morfología neuronal. Las proyecciones de axones marcadas con GFP mostraron un comportamiento complejo de ramificación y cono de crecimiento (Figura 5i) y proyectaron axones de largo alcance de una manera que recuerda a la agrupación de axones (Figura 5h).

55 Finalmente, se probó si las neuronas dentro de los organoides cerebrales podrían exhibir actividad neuronal al realizar imágenes de tinción de calcio para detectar oscilaciones de Ca^{2+} , que revelaron aumentos espontáneos de calcio en células individuales (Figura 5j, Figura 17b). Además, se aplicó glutamato exógeno (Figura 12c) y se observaron enriquecimientos de calcio más frecuentes, lo que indica la actividad receptora glutamatérgica. Finalmente, se realizó el bloqueo del potencial de acción mediante la aplicación de tetrodotoxina (TTX) y se observaron oleadas de calcio amortiguadas que indicaban que el enriquecimiento de calcio dependía de la actividad neuronal (Figura 12d).

60 **Ejemplo 6: Recapitulación de eventos posteriores en el desarrollo cortical cerebral humano**

Para examinar si los organoides cerebrales podrían usarse para estudiar procesos humanos específicos en el desarrollo neurológico, se examinó la morfología de la zona progenitora en tejidos corticales dorsales más avanzados en el desarrollo. Estas regiones eran típicamente mucho más gruesas y muy grandes (una sola región cortical dorsal dentro de un organoide podría crecer hasta 1 mm de ancho) si se le permitía desarrollarse en una etapa más avanzada. Se tiñeron las RG y las neuronas y se observó una gran cantidad de progenitores positivos para Sox2 que aparecen desplazados de la superficie apical (Figura 5a, Figura 18a). La identidad del marcador y la ubicación de estos progenitores apuntan a la posibilidad de que representen la glía radial externa (oRG), un tipo de progenitor recientemente identificado que está muy sobrerrepresentado en la corteza cerebral humana en comparación con ratones y otros mamíferos inferiores.

Para descartar la posibilidad de que esta organización similar a OSVZ fuera un artefacto *in vitro*, se adaptó el procedimiento a las células ES de ratón para generar organoides cerebrales de ratón y se examinó si había una organización similar presente (Figura 18b y c). Se observaron tejidos corticales mucho más pequeños en organoides de ratón en comparación con humanos, y solamente oRG ocasionales que no se acumularon en una región similar a OSVZ. Estos resultados sugieren que las capas de tipo OSVZ e IFL son específicas de los organoides humanos.

Además, se observa que estas oRG bastante abundantes parecían separadas de la VZ apical por una capa de fibra positiva para Tuj1 (Figura 5a) que recuerda a la capa de fibra interna observada en la corteza en desarrollo humana, pero no de ratón. Esta organización sugiere que los organoides cerebrales humanos podrían recapitular al menos algunos aspectos del desarrollo cortical específico de humanos que no se pueden modelar en ratones.

Con el fin de caracterizar aún más estas oRG potenciales, se realizó tinción con P-Vimentina para examinar su morfología y se observaron procesos basales obvios que emanan de estas células, mientras que carecían de procesos apicales (Figura 5b). Esta morfología, junto con la identidad del marcador de RG, es un sello distintivo de las oRG que sugieren que estos progenitores positivos para Sox2 y P-Vimentina desplazados basalmente en realidad representan oRG humanas.

A continuación se examinó el modo de división de estas oRG y se pudieron identificar divisiones asimétricas como marcadas por pares de células hijas con P-Vimentina en las que solamente una célula hija mantuvo la expresión de Sox2 (Figura 5c). Además, se pudo medir el plano de división en relación con la superficie apical y se encontró que la gran mayoría de las oRG se dividían perpendicularmente a la superficie apical (Figura 5d). Estos hallazgos sugieren que los organoides cerebrales podrían ser un sistema modelo útil para estudiar varios aspectos de las oRG humanas.

Como caracterización final de los organoides cerebrales humanos, se busco describir la identidad y el comportamiento de las neuronas producidas en las regiones corticales dorsales. Se comenzó por teñir los marcadores de la capa cortical cerebral durante las etapas avanzadas de desarrollo de estos tejidos. Los procedimientos anteriores para derivar neuronas corticales han podido generar varias neuronas de identidad de capa, y de manera similar se pudieron generar varias identidades de capa utilizando este enfoque. Sin embargo, mientras que otros procedimientos han fallado notablemente en recapitular la organización espacial de las capas de neuronas, nuestros organoides cerebrales mostraron al menos una separación rudimentaria de capas (Figura 5e) y esta separación espacial se volvió más discreta a medida que se permitió el desarrollo de los tejidos (Figura 5f).

Además, se observó una organización que recuerda el patrón de adentro hacia afuera observado en la corteza del mamífero en desarrollo *in vivo*. Específicamente, las neuronas nacidas más tarde marcadas por Brn2 y Satb2 se localizaron más en las regiones externas del tejido, mientras que las neuronas nacidas antes marcadas por Ctip2 permanecieron en la región interna (Figura 5e, f). Esto sugiere que estos tejidos tridimensionales pueden recapitular mejor los eventos de migración neuronal que cualquier procedimiento *in vitro* descrito anteriormente para generar neuronas corticales cerebrales.

En este sentido, incluso se pudieron observar interneuronas corticales positivas para calretinina dentro de la placa cortical dorsal y que exhiben procesos migratorios paralelos a la superficie apical compatibles con la migración tangencial (Figura 5g). Dentro de otras áreas de estos organoides, se pudieron identificar las regiones corticales ventrales que exhiben neuronas positivas para calretinina muy alejadas de la corteza dorsal. Esto sugiere que las interneuronas positivas para calretinina podrían migrar en un intervalo bastante largo para llegar a su destino dentro de la corteza dorsal, al igual que la corteza cerebral en desarrollo *in vivo*.

A continuación, se examinó la morfología de las neuronas corticales dorsales mediante el examen de células electroporadas con GFP en tejidos varios días después de la electroporación. Se pudieron identificar grupos de células piramidales corticales en maduración, probablemente nacidas aproximadamente al mismo tiempo, que proyectaban axones de largo alcance juntos en la misma ubicación distante dentro del organoide (Figura 5h). Además, las proyecciones del axón neuronal piramidal mostraron un comportamiento complejo de ramificación y cono de crecimiento (Figura 5i) similar al descrito *in vivo*.

Finalmente, se probó si las neuronas producidas dentro de los organoides cerebrales mostraban actividad neuronal realizando imágenes de calcio para detectar oscilaciones de Ca^{2+} . Usando el colorante sensible al calcio Fluo-4, se

podieron detectar oleadas espontáneas de calcio en neuronas individuales (Figura 5j). Estos hallazgos sugieren que las neuronas organoides cerebrales eran capaces de madurar y tener actividad sináptica.

Ejemplo 7: Los organoides cerebrales modelan la microcefalia e implican una diferenciación neural prematura

La microcefalia es un trastorno del desarrollo neurológico que se presenta con una circunferencia de cabeza pequeña (mayor que 2 desviaciones estándar por debajo de la media), que proviene del desarrollo de un tamaño cerebral muy reducido. Se han identificado varios genes en la microcefalia primaria, así como varios trastornos superpuestos, como el enanismo primordial osteodisplásico microcefálico (MOPD) y el síndrome de Seckel. Si bien la evidencia en los sistemas modelo sugiere que muchos de los genes identificados en estos trastornos pueden funcionar en el centrosoma o en la reparación del ADN, el fenotipo de microcefalia humana ha sido notablemente difícil de modelar, ya que los mutantes de ratón a menudo no muestran la misma gravedad del fenotipo. Dado que este trastorno refleja un defecto en el agrandamiento del cerebro durante el desarrollo, y el cerebro humano exhibe importantes divergencias en los mecanismos de expansión, se planteó la hipótesis de que los organoides cerebrales humanos pueden modelar mejor los aspectos de este trastorno.

Se identificó a un paciente con microcefalia severa (-13,2 desviación estándar por debajo de la media para la edad y el sexo) (Figura 6a) y estatura reducida (-6,7 sd), quien, de acuerdo con lo determinado mediante secuenciación del exoma y confirmado por secuenciación capilar (Figura 6b), tenía mutaciones de truncamiento heterocigotas compuestas en la secuencia de codificación del gen de microcefalia primaria previamente identificado CDK5RAP2 (Figura 6b). Ambas mutaciones condujeron a codones de parada prematuros en una región similar de la proteína, lo que sugiere que esto puede reflejar una mutación nula homocigótica.

Se obtuvieron fibroblastos de piel de este paciente y se realizó una transferencia Western (Figura 6c), así como tinción inmunocitoquímica para la proteína Cdk5Rap2 (Figura 6d). No se pudo detectar ninguna proteína en estas células de pacientes, lo que respalda la hipótesis de que la microcefalia se debe a la ausencia de la proteína Cdk5Rap2.

Para modelar el fenotipo en nuestro sistema organoide, luego se realizó la reprogramación de estos fibroblastos de la piel del paciente usando la administración lentiviral de los cuatro factores de reprogramación bien descritos: Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4. Se pudieron generar varios clones independientes de iPSC y se caracterizaron cuatro de estos por morfología y pluripotencia. Las cuatro líneas exhibieron tiempos de duplicación similares, así como la morfología de las colonias que no se distinguían de las iPSC humanas de control (Figura 9a). Todas las líneas podrían formar cuerpos embrioides y exhibir tinción positiva para el marcador de pluripotencia fosfatasa alcalina (Figura 9b).

A continuación realizamos un cultivo organoide cerebral de todas estas 4 líneas y se pudo observar que cuando se transfirieron a medios de inducción neural, los EB no se desarrollaron más en comparación con el control, y en su lugar permanecieron bastante pequeños (Figura 9c). Se formuló la hipótesis de que, dado que el paciente también mostró enanismo, quizás el crecimiento general también se vio perturbado. Por lo tanto, se modificó ligeramente el protocolo sembrando en placa el doble del número inicial de iPSC, permitiendo así que los EB se desarrollen aún más antes de transferir a la inducción neural. De hecho, este enfoque permitió la formación de neuroectodermo y posterior tejido neural. Sin embargo, la morfología macroscópica reveló que las cuatro líneas mostraban tejidos neuroepiteliales más pequeños y un alto grado de crecimiento neuronal en comparación con los tejidos de control (Figura 6e y Figura 9d).

Para examinar esto más a fondo, se permitió que los tejidos estuvieran en una etapa avanzada y se examinó la morfología general mediante tinción inmunohistoquímica para progenitores y neuronas (Figura 6f). Se pudieron observar tejidos neurales más pequeños en general, con muy pocas regiones que muestran progenitores que rodean lúmenes llenos de fluido muy pequeños en comparación con el control. Estos tejidos neurales más pequeños en general recordaban el tamaño cerebral muy reducido que se observa en los humanos con microcefalia.

Luego se intentó examinar la causa de la hipoplasia observada en estos pacientes organoides cerebrales. Con este fin, se examinaron los tejidos en etapas más tempranas por inmunohistoquímica para detectar progenitores y neuronas. Mientras que los tejidos de control en esta etapa mostraron una gran cantidad de tejidos grandes llenos de fluido, principalmente compuestos por progenitores, solo se pudieron observar pequeños lúmenes ocasionales llenos de líquido rodeados de progenitores en los tejidos derivados del paciente (Figura 6g, Figura 20a). Además, los tejidos de los pacientes exhibieron neuronas relativamente aumentadas en comparación con el control, lo que sugiere una diferenciación neural prematura (Figura 6h), tal vez a expensas de los progenitores. Para probar esta posibilidad, se realizaron experimentos de radiomarcado y seguimiento de BrdU (Figura 13d) que revelaron un aumento dramático en el número de células BrdU+/DCX+ en los organoides de los pacientes, de acuerdo con divisiones neurogénicas no proliferativas prematuras.

Dado que estos tejidos de los pacientes carecen de la proteína Cdk5Rap2 incluso antes del inicio de la inducción neural, luego se investigó si una pérdida aguda de la proteína después de la formación de organoides cerebrales conduciría a un defecto similar. Con este fin, se realizó la eliminación de Cdk5Rap2 mediada por ARNi por electroporación conjuntamente de GFP junto con tres ARNph independientes (ARNph1, ARNph2, ARNph4) encontrados para inactivar Cdk5Rap2 endógeno en células 293T humanas (Figura 9e). Los tres ARNph dieron

resultados similares, a saber, una sorprendente pérdida de progenitores Sox2+ en la zona de electroporación y un aumento en las neuronas recién nacidas DCX+ (Figura 6i). Es de destacar que ARNph4 produjo un fenotipo más débil probablemente porque este ARNph no exhibió la misma eficiencia de inactivación.

5 Finalmente, se probó si el fenotipo podría rescatarse reintroduciendo la proteína CDK5RAP2. Se realizó electroporación conjunta de GFP y CDK5RAP2 en organoides de pacientes el día 12 y se examinaron 6 días después. Como la sobreexpresión alta de CDK5RAP2 era tóxica (datos no mostrados), las células con alta señal de GFP no sobrevivieron hasta este momento. Sin embargo, se pudieron observar regiones en tejidos electroporados con CDK5RAP2 con neuroepitelio más grande en comparación con los tejidos electroporados solo con GFP (datos extendidos, Figura 7g). Este efecto podría deberse a las células supervivientes con un bajo nivel de reexpresión de CDK5RAP2. Para apoyar esta interpretación, la tinción con GFP (Figura 20c) reveló muchas células GFP+ de bajo nivel en organoides de pacientes con electroporación conjunta con CDK5RAP2 con morfología glial radial (54% +/- 2 SEM, n = 74 células de 3 tejidos). Por el contrario, las células GFP+ en los organoides del paciente electroporados con GFP solo exhibieron principalmente morfología neuronal con significativamente menos glía radial (19% +/- 11 SEM, n = 102 células de 3 tejidos, P <0,05, prueba t de Student). Por lo tanto, se concluyó que el fenotipo es específico de la pérdida de CDK5RAP2.

20 Cuando se examinó este fenotipo con más detalle, se pudo observar que prácticamente todas las células electroporadas conjuntamente con ARNph de GFP exhibían morfología neural y tinción conjunta con DCX (Figura 6j). Estos hallazgos sugieren que, de manera similar a los tejidos derivados del paciente, la inactivación aguda de Cdk5Rap2 conduce a una diferenciación neural prematura a expensas de los progenitores. Esto podría conducir a la disminución del tamaño general que se observa en los tejidos derivados del paciente, así como en los pacientes con microcefalia, ya que se espera que una pérdida de progenitores conduzca a una disminución final en el crecimiento total del tejido.

25 Como un enfoque independiente adicional, se realizó la inactivación de ARNi de CDK5RAP2 electroporando conjuntamente GFP con dos ARNph independientes encontrados para inactivar CDK5RAP2 endógeno (Figura 21a). Ambos ARNph condujeron a una sorprendente pérdida de progenitores Sox2+ y un aumento en las neuronas DCX+ (Figura 6j, Figura 21b) que refleja un aumento estadísticamente significativo en la producción de neuronas en lugar del mantenimiento de los progenitores (Figura 21b). Estos hallazgos respaldan la conclusión de que la pérdida de CDK5RAP2 conduce a una diferenciación neural prematura a expensas de los progenitores.

Ejemplo 8: Recapitulación

35 El desarrollo del cerebro humano exhibe una serie de características únicas que solo estamos comenzando a descubrir. La mayor parte de lo que se sabe acerca del desarrollo del cerebro humano se ha limitado a procesos fundamentales compartidos con roedores y otros mamíferos inferiores. Si bien estos conocimientos han sido indispensables para comprender los mecanismos básicos del desarrollo cerebral, estos estudios de desarrollo neurológico han estado limitados por los sistemas modelo disponibles.

40 Se ha establecido un enfoque novedoso para estudiar procesos de desarrollo neurológico humano a través del cultivo *in vitro* de organoides cerebrales de células madre pluripotentes humanas. Este procedimiento recapitula no solo estos mecanismos básicos de desarrollo neurológico compartidos con ratones y ratas, sino que también muestra muchas características del desarrollo del cerebro humano. Se tiene la esperanza de que este procedimiento permita el estudio de una variedad de procesos de desarrollo neurológico humano específicos.

45 Además, un objetivo principal en neurociencia es comprender las raíces de la enfermedad neurológica humana. Se han modelado al menos algunos aspectos de la microcefalia del trastorno del desarrollo neurológico humano en estos organoides cerebrales. El hallazgo de que las zonas progenitoras en los tejidos derivados del paciente muestran una diferenciación neural prematura a expensas de los progenitores tempranos respalda un modelo en el que la población fundadora de progenitores gliales radiales no se expande adecuadamente en los tejidos del paciente, lo que conduce a un cerebro en general más pequeño.

50 Esto también puede explicar por qué los modelos de ratón no han podido recapitular la gravedad del trastorno en humanos. Se formula la hipótesis de que la población fundadora de ratones de progenitores neurales no experimenta expansión en la misma medida que en humanos antes del inicio de la neurogénesis. Por lo tanto, una interrupción de esta expansión en la población fundadora en ratones no conduciría a un efecto tan severo como el observado en humanos. En general, estos hallazgos sugieren que se puede utilizar este sistema de cultivo *in vitro* para modelar aspectos del desarrollo neurológico humano y la enfermedad neurológica y, con suerte, proporcionar una nueva visión de las causas de estos trastornos.

Referencias:

65 Barrera et al., Dev Cell (2010) 18 (6): 913-26
Bond et al., Nat Genet (2002) 32 (2): 316-20
Bond et al., Nat Genet (2005) 37 (4): 353-5

- Cox et al., Trends Mol Med (2006) 12 (8): 358-66
 Eiraku et al., Cell Stem Cell (2008) 3: 519-532
 Elkabetz et al., Genes Dev (2008) 22 (2): 152-65
 Fietz et al., Nat Neurosci (2010) 13 (6): 690-9
 5 Fietz and Huttner. Curr Opin Neurobiol (2011) 21 (1): 23-35
 Götz and Huttner. Nat Rev Mol Cell Biol (2005) 6 (10): 777-88
 Hansen et al., Nature (2010) 464 (7288): 554-561
 Kenny et al., Mol Oncol (2007) 1 (1): 84-96
 Koch et al., Proc Natl Acad Sci USA (2009) 106 (9): 3225-30
 10 Lizarraga et al., Development (2010) 137 (11): 1907-17
 Lui et al., Cell (2011) 146 (1): 18-36
 Megraw et al., Trends Cell Biol (2011) 21 (8): 470-80
 Price y Brewer. Protocols for Neural Cell Culture: Tercera Edition. (2001) : 255-64
 Pulvers et al., Proc Natl Acad Sci USA (2010) 107 (38): 16595-600
 15 Reynolds y Weiss. Science (1992) 255 (5052): 1707-10
 Sato et al., Nature (2009) 459 (7244): 262-5
 Shi et al., Nat Neurosci (2012) 15 (3): 477-86, S1
 Thornton y Woods. Trends Genet (2009) 25 (11): 501-10
 Tremml et al., Curr Protoc Stem Cell Biol Capítulo 1, Unidad 1C.4 (2008)
 20 Wang et al., Nature Neuroscience, 14 (5) (2011): 555-561
 Wilson y Stice. Stem Cell Rev (2006) 2 (1): 67-77
 Xia y Zhang. Methods Mol Biol (2009) 549: 51-8
 Zhang et al., Nat Biotechnol (2001) 19 (12): 1129-33

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un cultivo de tejido neuronal tridimensional artificial cultivado *in vitro* que comprende una población heterogénea de células humanas o células de primate no humanas de al menos dos capas de diferenciación neuronal y progenitora diferentes,
 en el que al menos una capa progenitora comprende una célula de glía radial externa;
 y dicho cultivo comprende una matriz tridimensional o se obtiene del cultivo de una agregación multicelular neuronal diferenciada en una matriz tridimensional; en la que dicha matriz tridimensional es un hidrogel.
- 10 2. Cultivo de tejido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas secciones de tejido forman al menos dos capas, preferiblemente al menos una capa que se forma alrededor de un cuerpo de tejido globular.
- 15 3. Cultivo de tejido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho tejido desarrolla secciones de tejido apical y dorsal.
- 20 4. Cultivo de tejido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células de dicho cultivo expresan uno o más marcadores de expresión génica seleccionados de los marcadores del prosencéfalo BF1 y Six3, marcadores del rombencéfalo Krox20 e IIs1, preferiblemente en el que los marcadores del prosencéfalo se expresan en mayores cantidades en comparación con los marcadores del rombencéfalo.
- 25 5. Cultivo de tejido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las células de dicho cultivo expresan uno o más marcadores de expresión génica seleccionados de Otx1, Otx2, FoxG1, Auts2, Tuj1, Brn2, Satb2, Ctip2, calretinina.
- 30 6. Cultivo de tejido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho cultivo se obtiene a partir del cultivo de células pluripotentes.
- 35 7. Cultivo de tejido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una zona subventricular cortical externa o extra y células de una capa de fibra cortical interna.
- 40 8. Un procedimiento para generar un cultivo de tejido artificial que comprende a) proporcionar una agregación multicelular de células madre pluripotentes, b) cultivar dicha agregación multicelular en medio de inducción neural induciendo así la agregación multicelular para diferenciarse en tejido neural, c) cultivar dicha agregación multicelular diferenciada en una matriz tridimensional, preferiblemente un gel, expandiendo de ese modo dichas células en una agregación multicelular, en la que dichas células pueden diferenciarse adicionalmente, y d) cultivar dicha agregación multicelular expandida de células de la etapa c) en un cultivo en suspensión.
- 45 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha célula pluripotente es una célula pluripotente inducida, especialmente una célula pluripotente inducida que se ha aislado de un paciente.
- 50 10. El procedimiento de la reivindicación 8 o 9, en el que dichas células expandidas se diferencian en células madre unipotentes.
- 55 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que la matriz tridimensional comprende colágeno o una matriz extracelular del tumor de Engelbreth-Holm-Swarm, o cualquier componente del mismo seleccionado de laminina, colágeno, entactina y proteoglicano de heparano sulfatado o cualquier combinación de los mismos.
- 60 12. Un procedimiento para investigar un efecto del tejido neurológico en desarrollo que comprende disminuir o aumentar la expresión de un gen de interés en una célula en cualquier etapa durante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
- 65 13. Un procedimiento para seleccionar un agente terapéutico candidato adecuado para tratar un defecto de interés de un tejido neurológico en desarrollo, que comprende realizar el procedimiento de la reivindicación 12 y administrar el agente candidato a dichas células en cualquier etapa durante el procedimiento, preferiblemente en todas las etapas.
14. Un procedimiento para probar un fármaco candidato para efectos neurológicos, que comprende administrar un fármaco candidato a un cultivo artificial de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y determinar una actividad de interés de las células de dicho cultivo y comparar dicha actividad con una actividad de las células con el cultivo sin administrar dicho fármaco candidato, en el que una actividad diferencial indica un efecto neurológico.
15. Un procedimiento para obtener una célula neural diferenciada que comprende la etapa de proporcionar un cultivo artificial de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y aislar una célula neural diferenciada de interés, o que comprende la etapa de generar un cultivo de tejido artificial de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 que además comprende la etapa de aislar una célula neural diferenciada de interés.

16. Un kit para generar un cultivo de tejido neuronal artificial tridimensional de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o para realizar el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 que comprende

- 5
- i) un medio que comprende una matriz tridimensional y nutrientes,
 - ii) un medio que comprende ácido retinoico y nutrientes, y
 - iii) un medio que comprende a) nutrientes y b) un inhibidor de ROCK, insulina o heparina,

10

en el que el kit comprende un medio de inducción neural, que opcionalmente comprende además un medio que comprende nutrientes pero que carece de factores de crecimiento que diferenciarían el tejido neural para un destino particular.

Figura 1

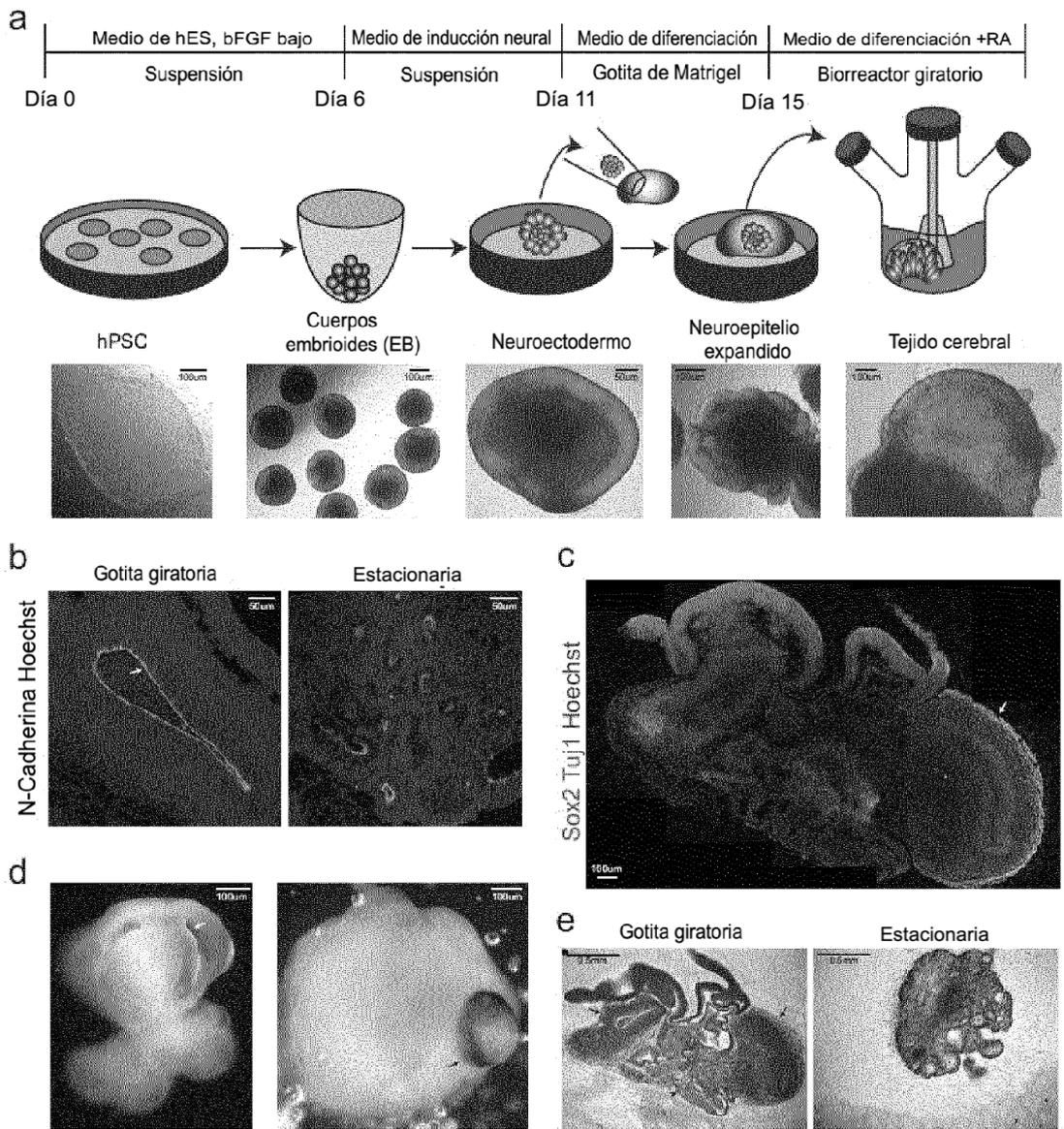


Figura 2

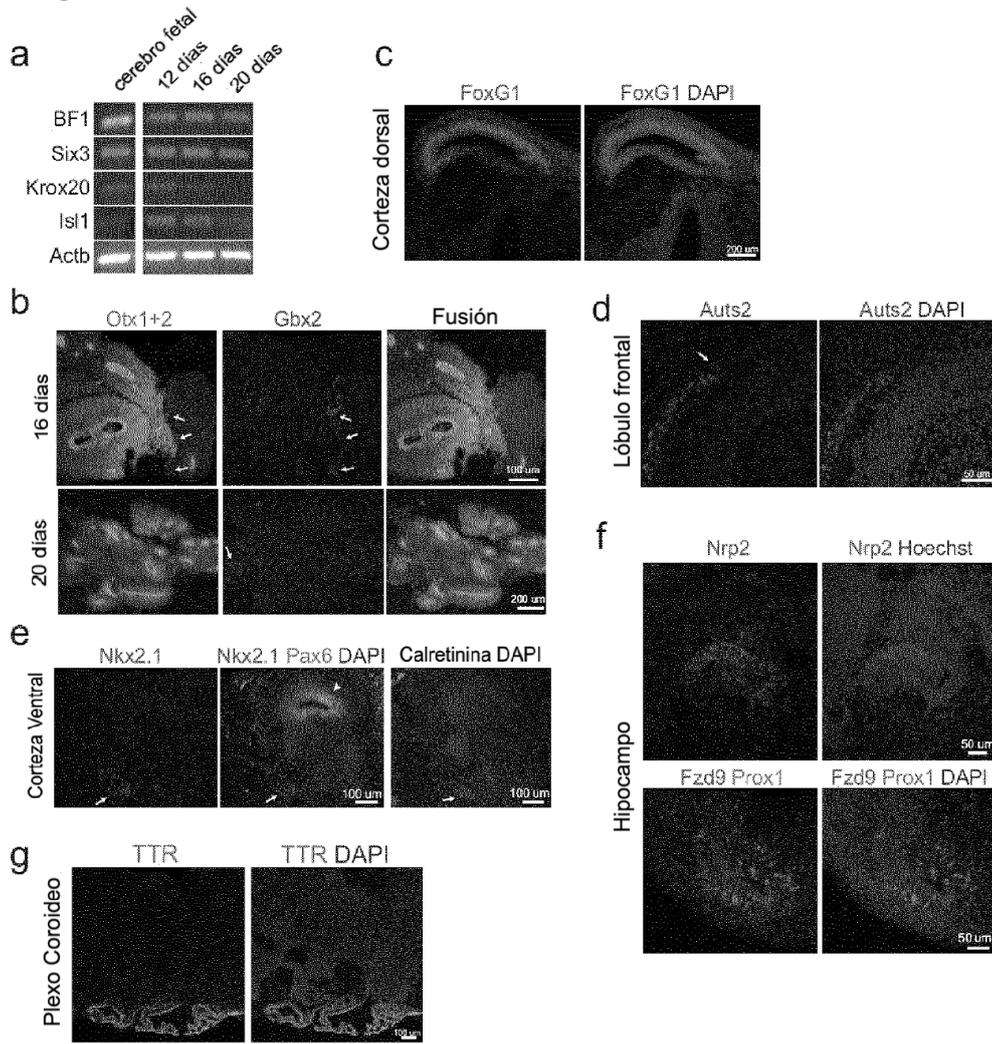


Figura 3

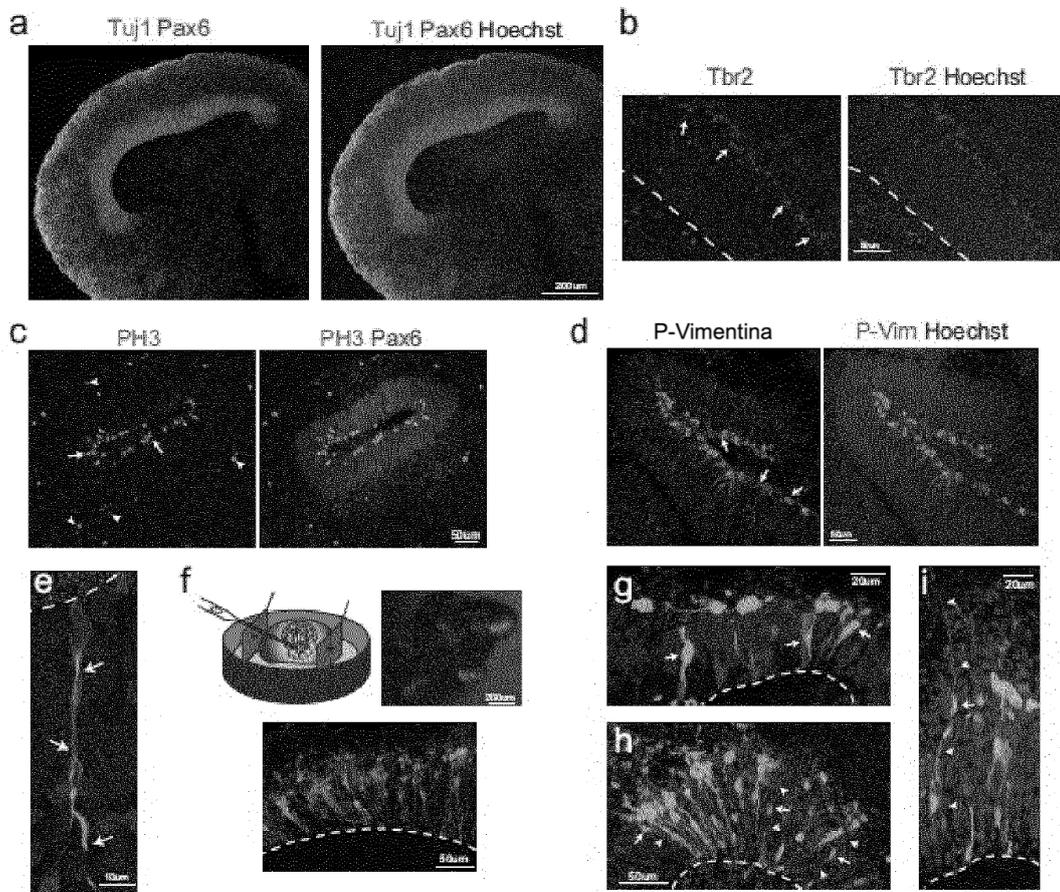


Figura 4

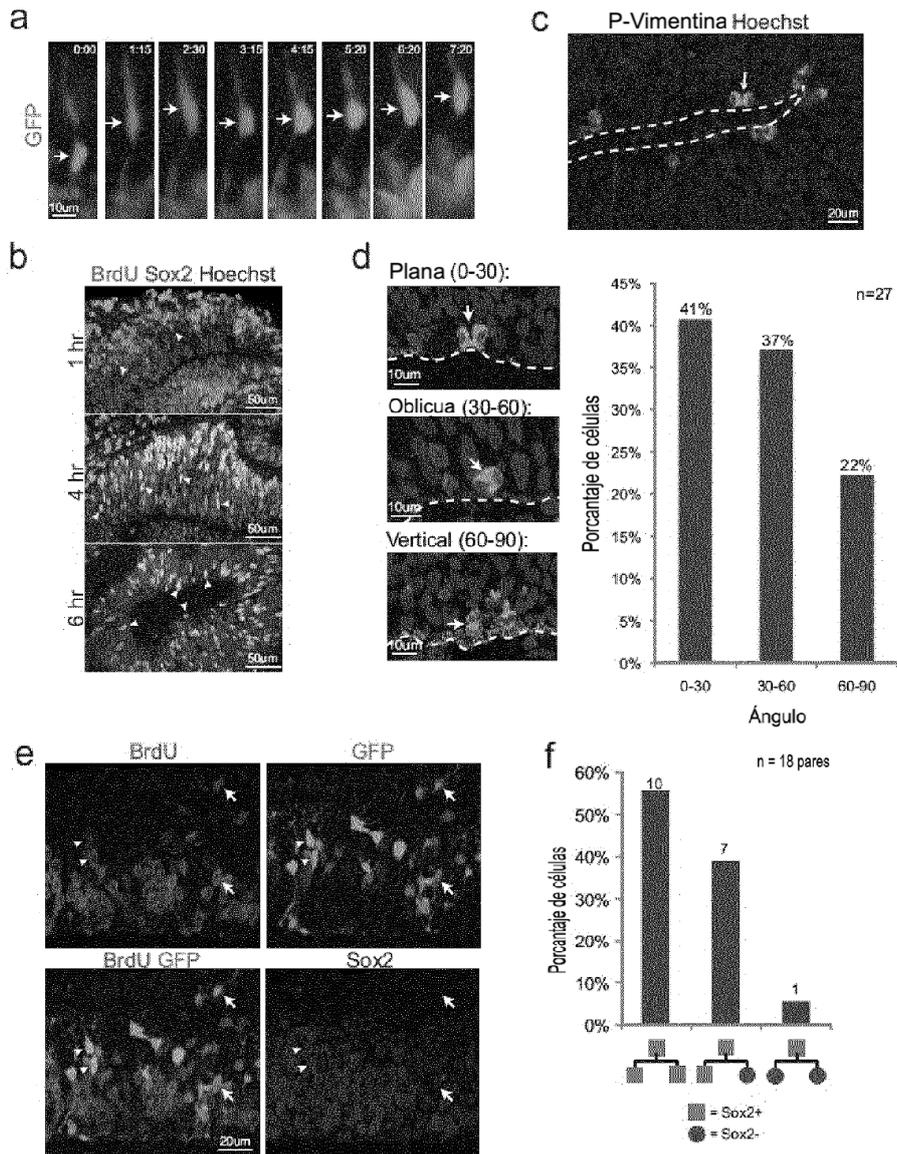


Figura 5

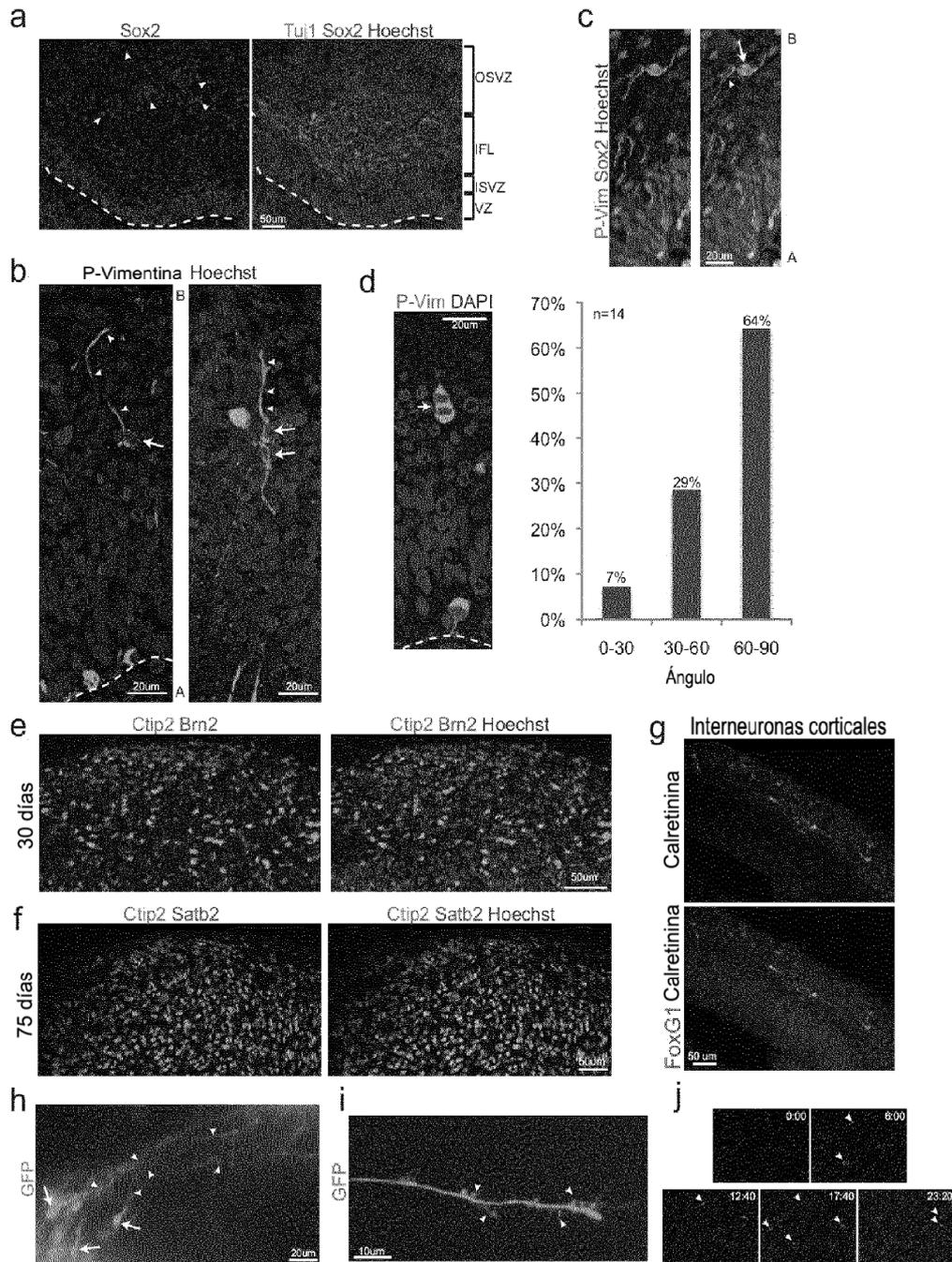


Figura 6

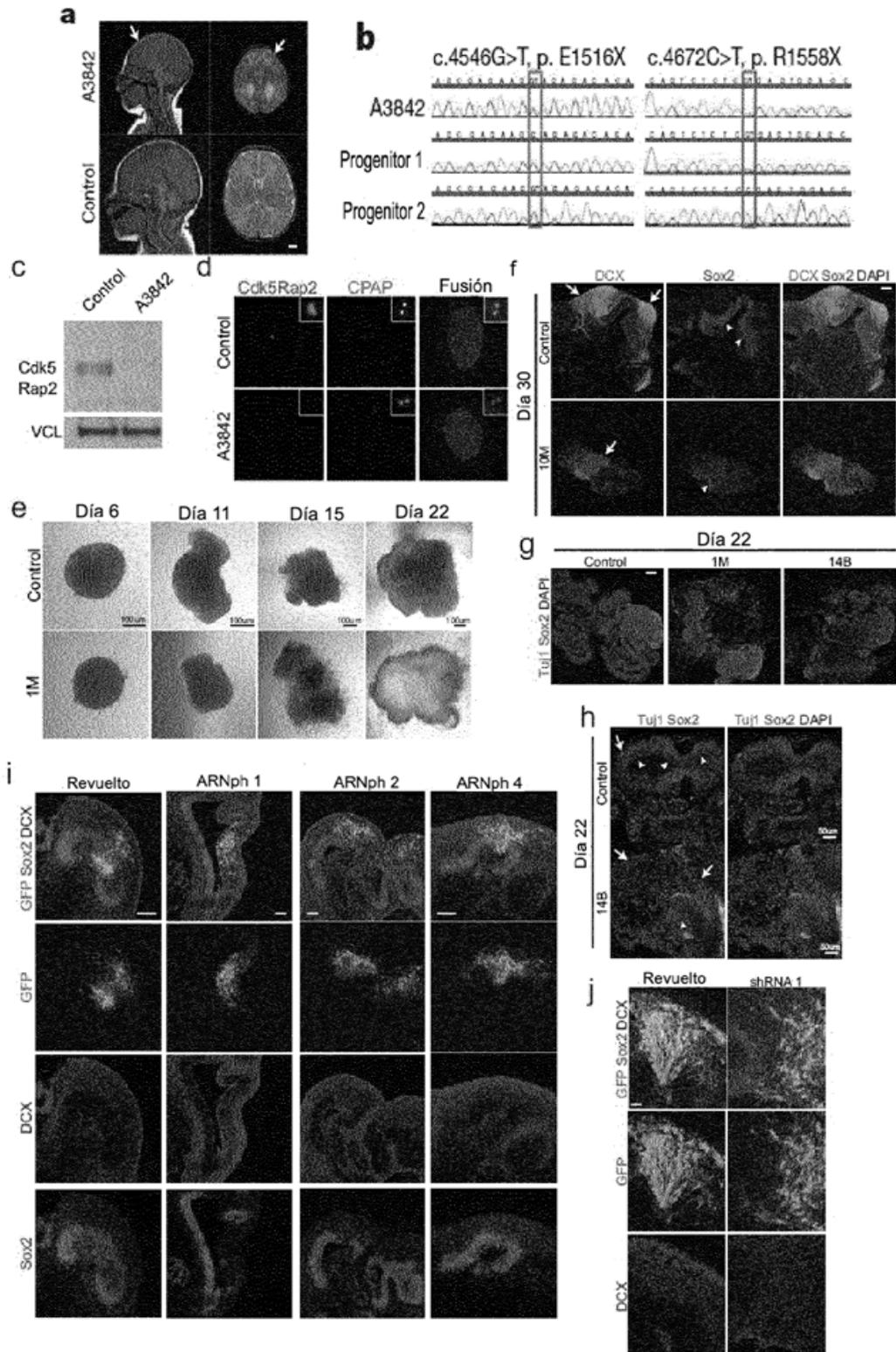


Figura 7

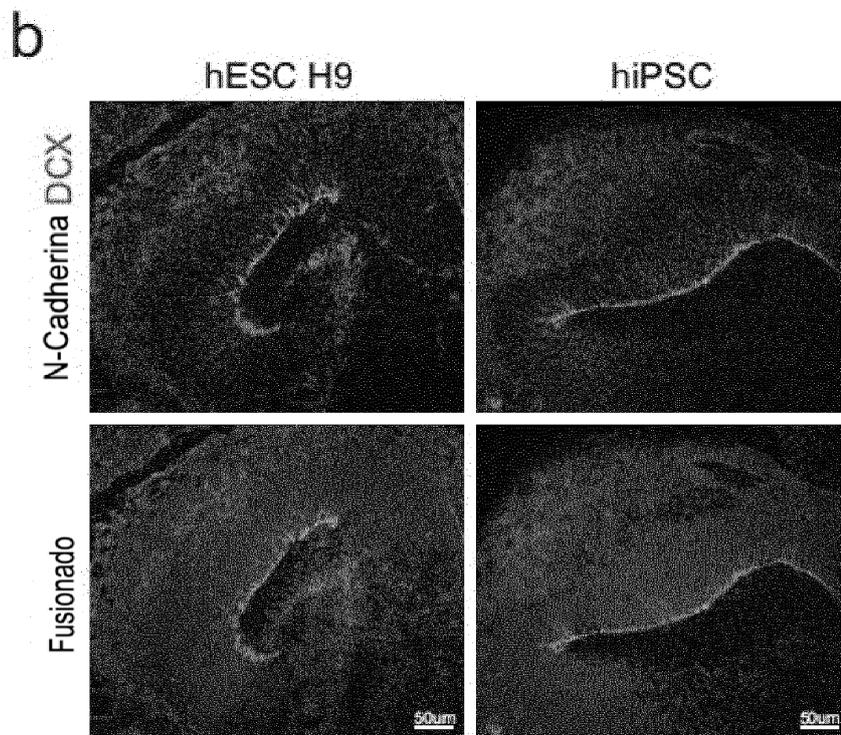
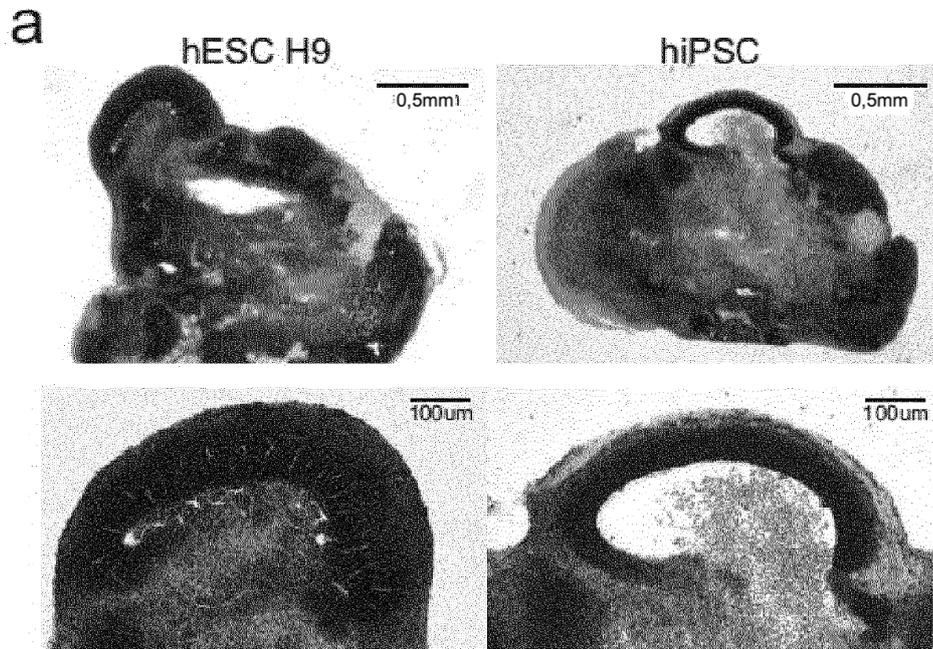


Figura 8

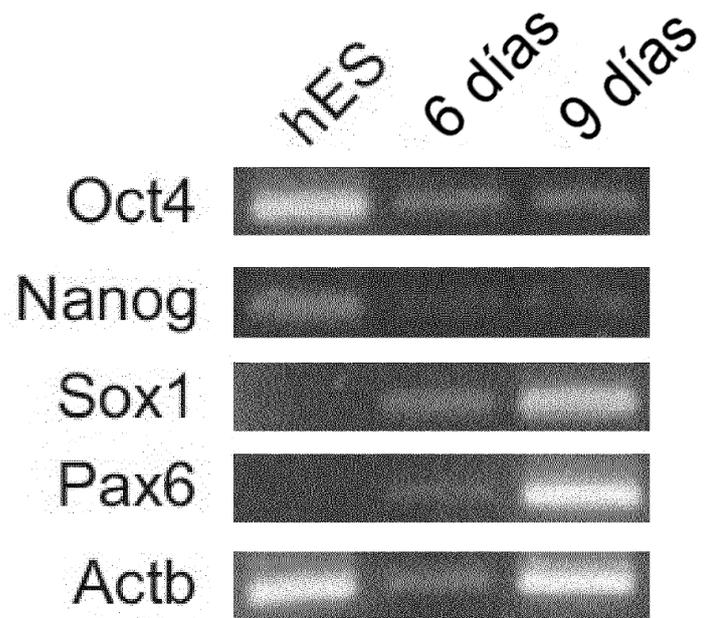


Figura 9

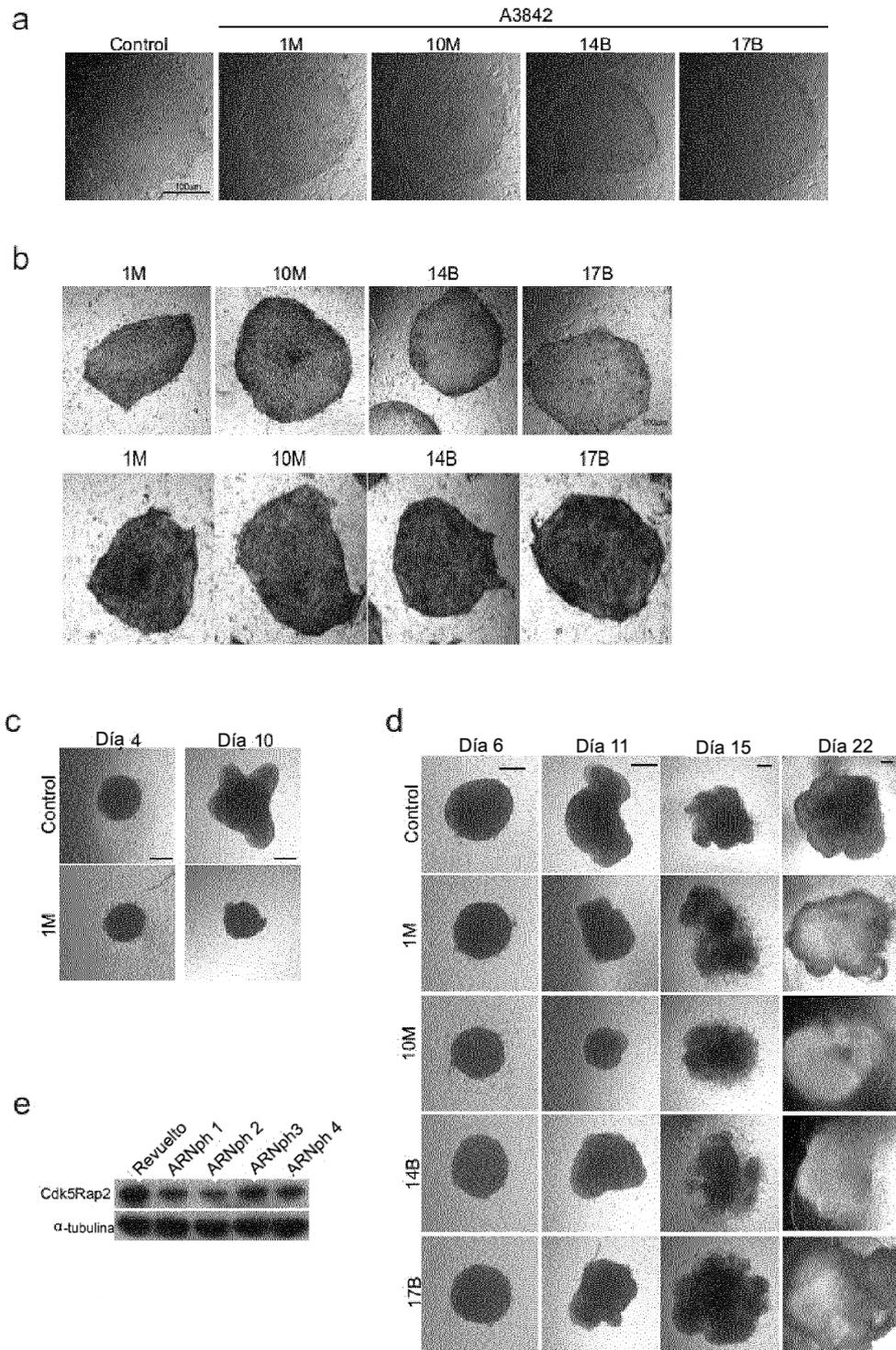


Figura 10

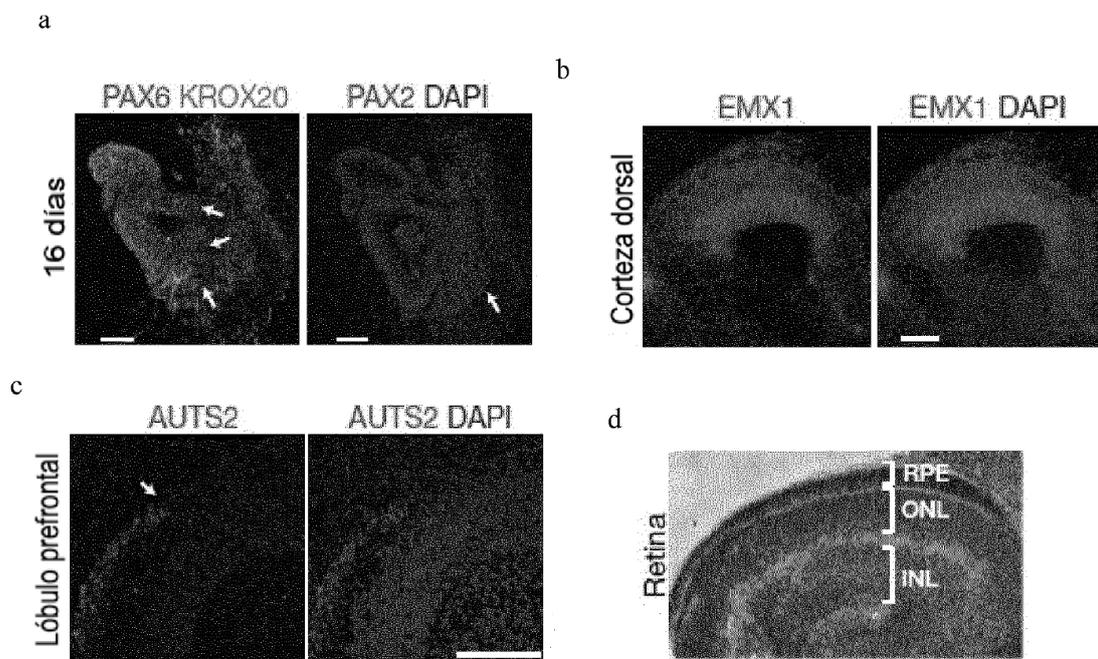
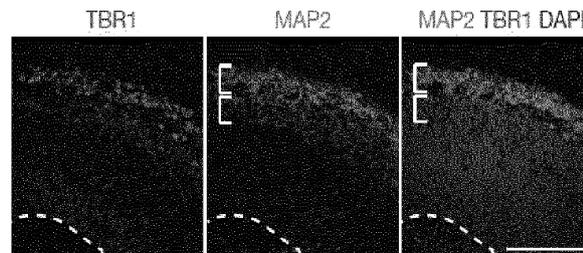


Figura 11

a



b

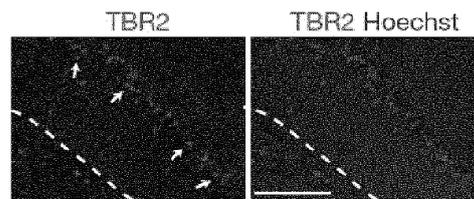


Figura 12

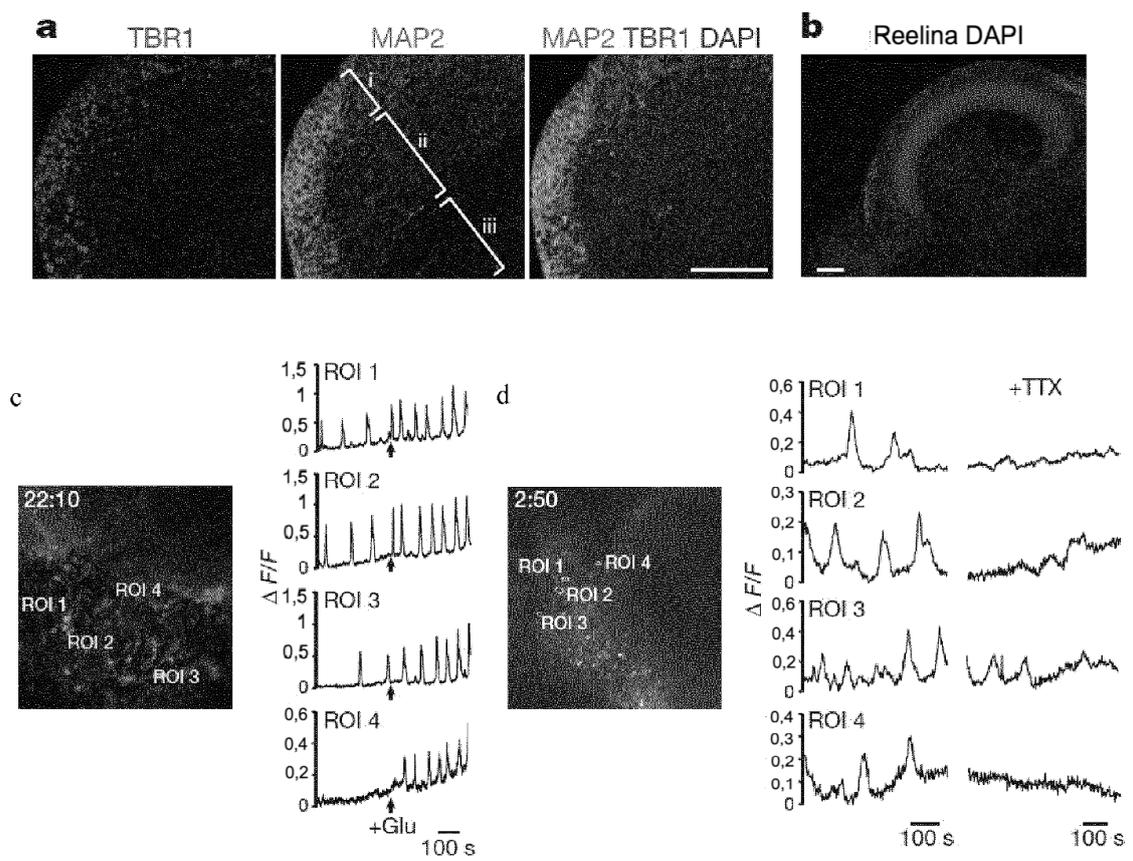


Figura 13

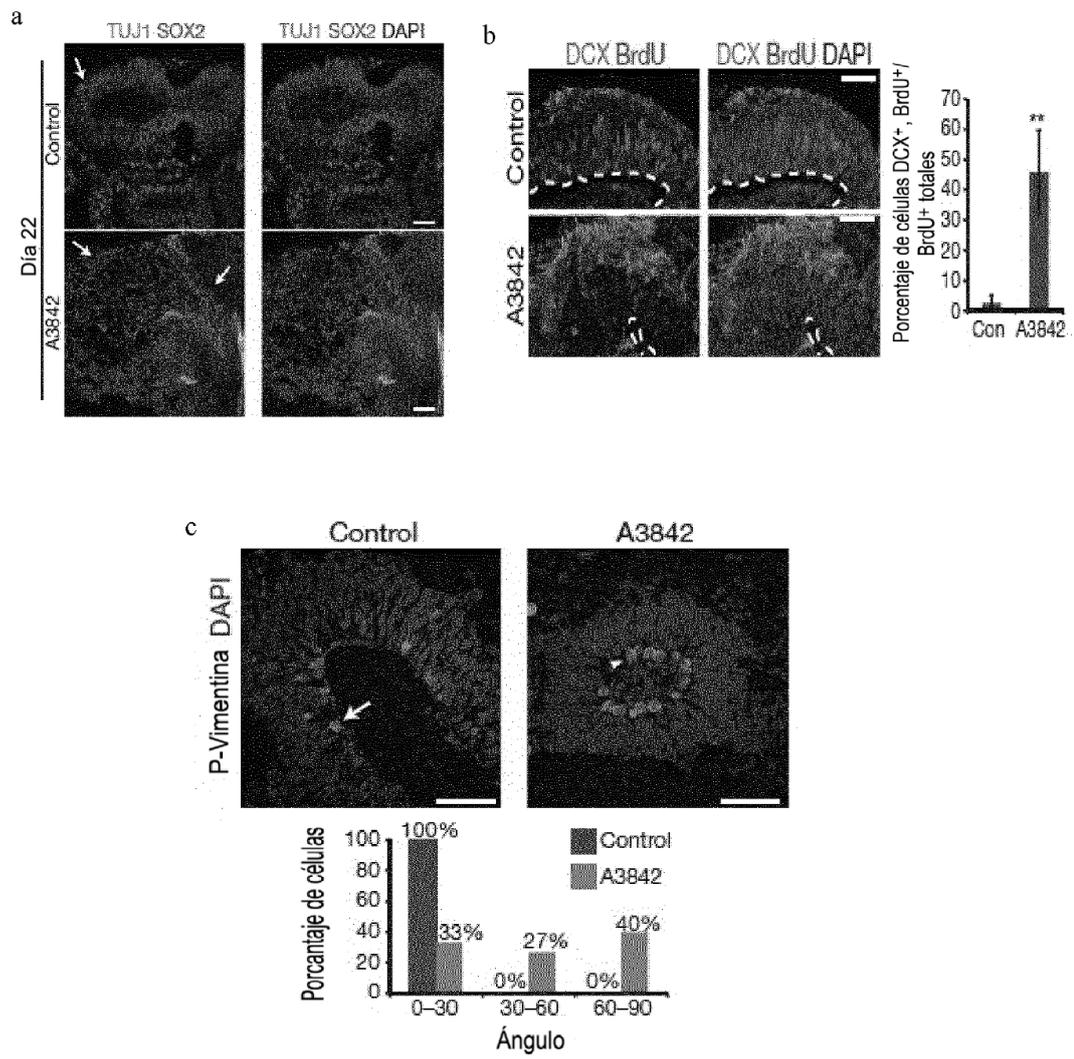


Figura 14

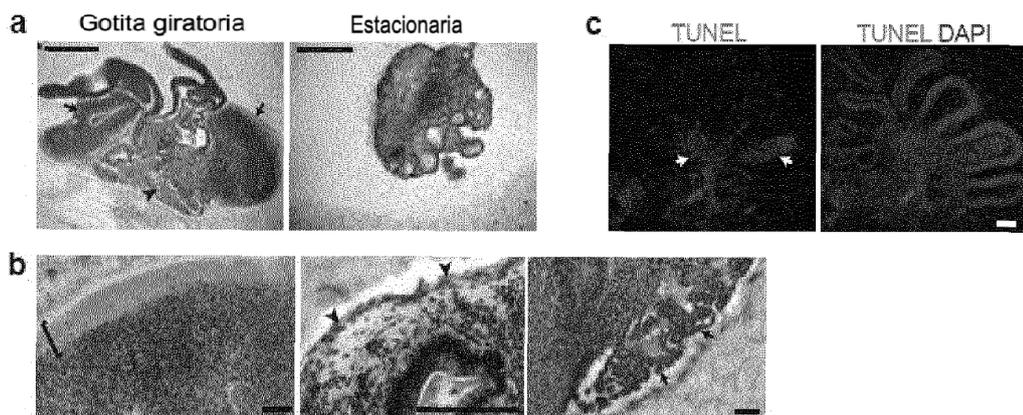


Figura 15

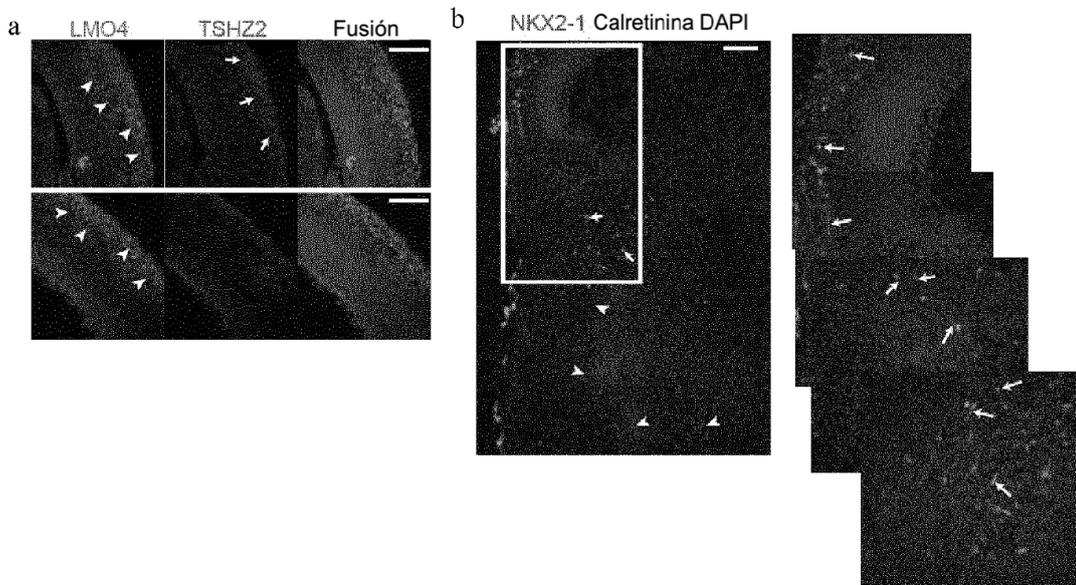


Figura 16

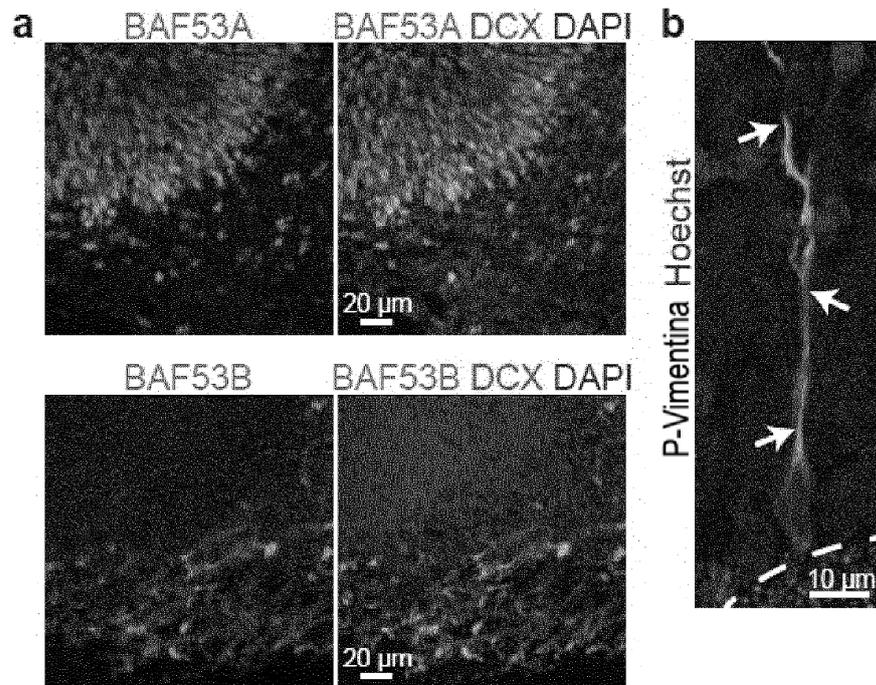


Figura 17

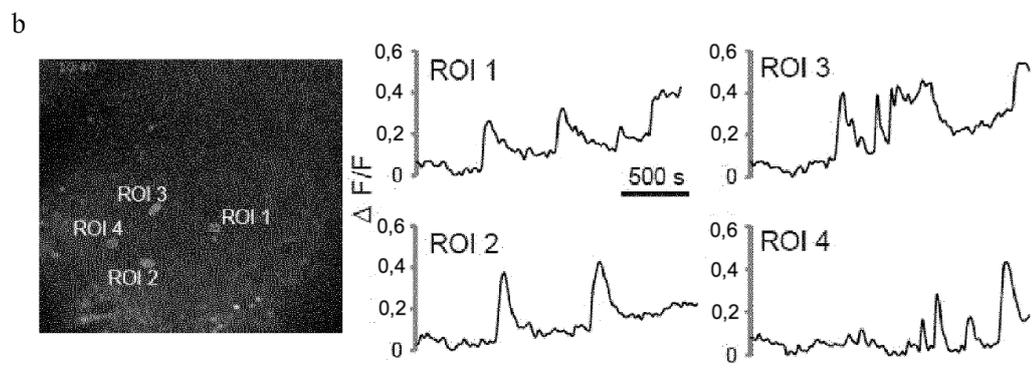
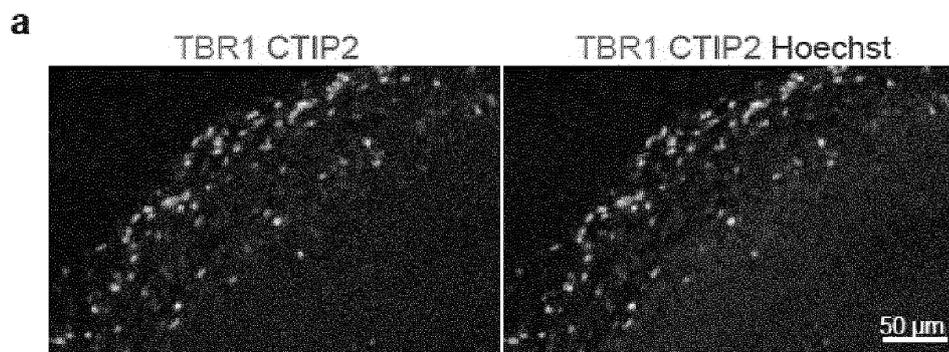


Figura 18

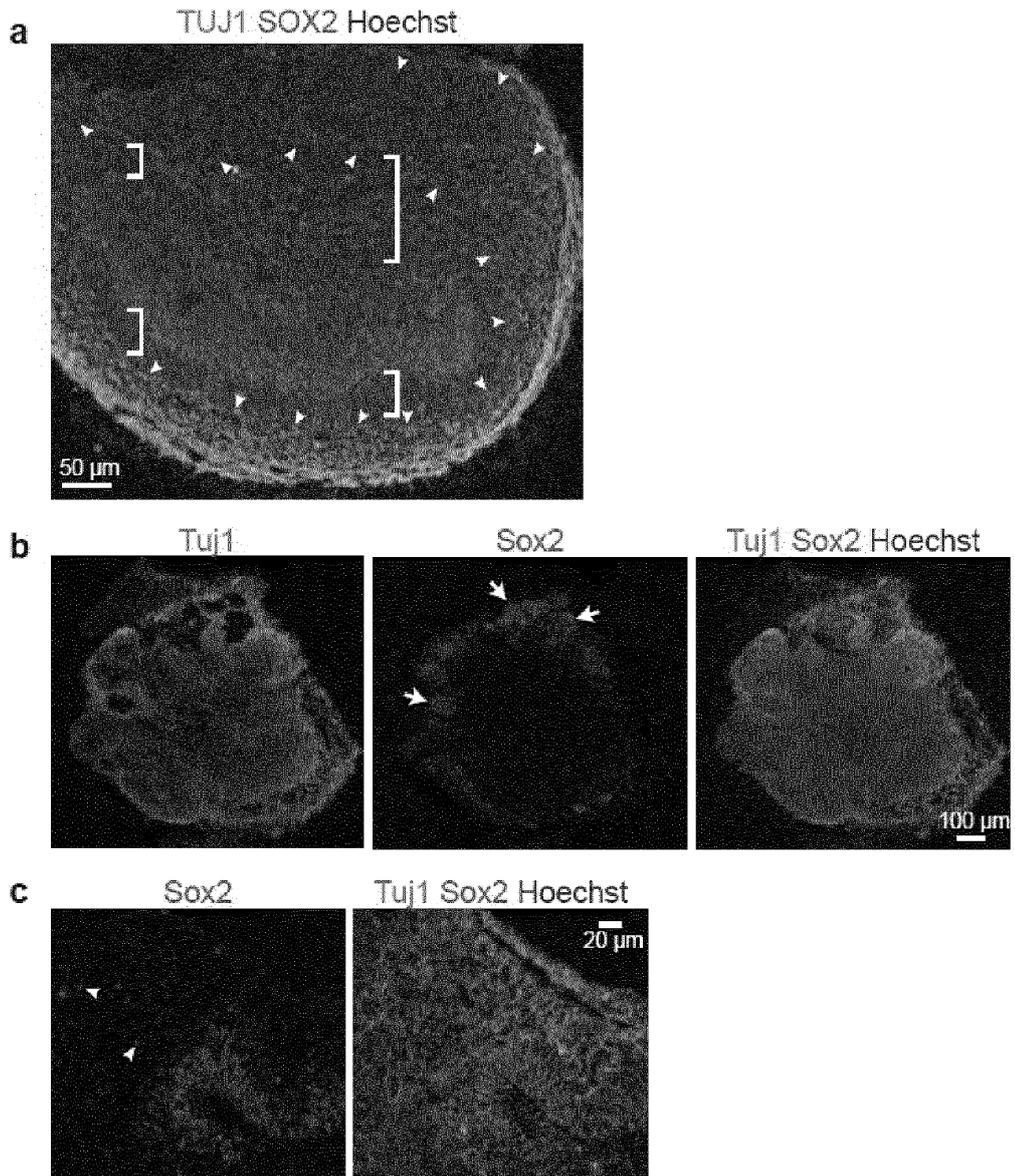


Figura 19

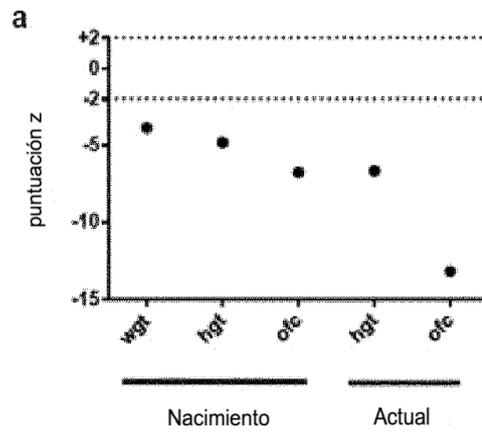


Figura 20

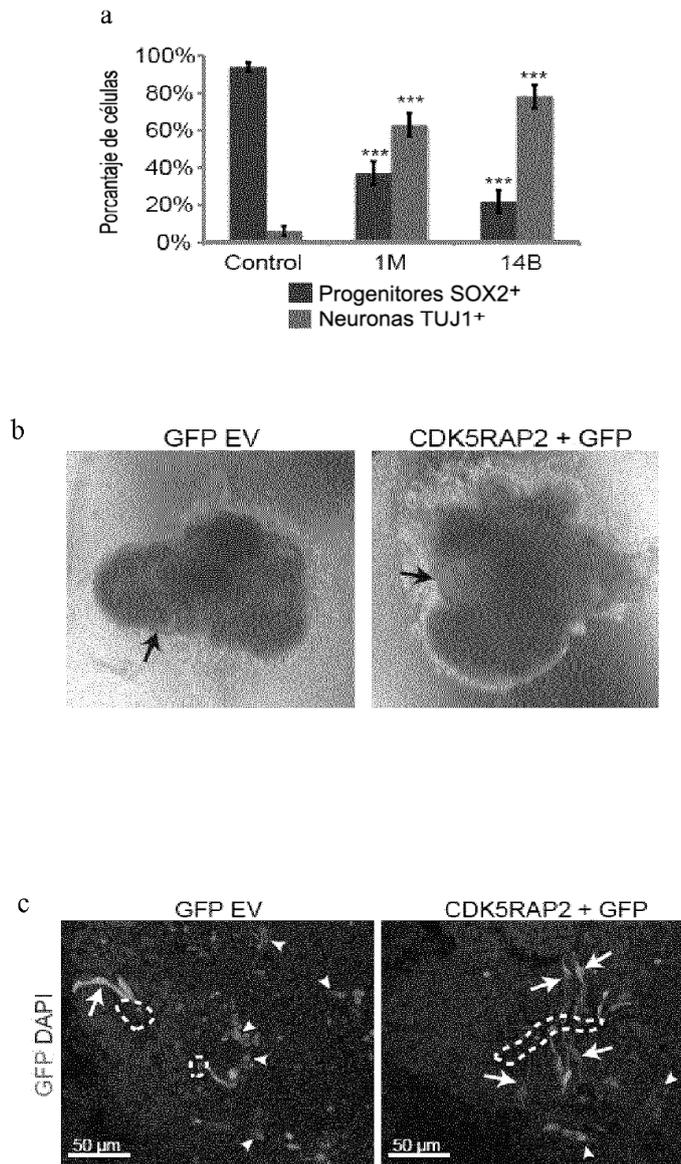


Figura 21

