

Organoides de tejidos reproductivos. Uso actual, limitaciones y potencial

Lara Herrera^{1,2}, Cristina Eguizabal^{1,2}

¹Unidad de Investigación, Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos, Osakidetza, Galdakao, Bizkaia.

²Grupo de Terapia Celular, Células Madre y Tejidos, Instituto de Investigación Sanitaria Biocruces Bizkaia, Barakaldo, Bizkaia.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares en dos dimensiones (2D) han sido la técnica *in vitro* predominante para estudiar en el laboratorio el comportamiento celular, realizar cribado de fármacos o establecer modelos de enfermedades. En la última década, se ha demostrado que este modelo *in vitro* no representa la situación *in vivo*. La estructura difiere sustancialmente entre en cultivo 2D y el cultivo tridimensional (3D), así como las redes de señalización. Esto puede convertirse en un problema cuando el resultado *in vitro* diverge del *in vivo*, de ahí la importancia de desarrollar cultivos 3D. A fin de dar soluciones a estas limitaciones los cultivos 3D surgen de la relevancia de estudiar el microambiente en los tejidos, la comunicación célula a célula y para generar estructuras en cultivo similares a los órganos. Aunque los modelos de cultivos primitivos 3D aparecieron en la década de los 70, se cree que los primeros en mencionar un “modelo de cultivo tridimensional” fueron el grupo del Dr. Barcellos-hoff en 1989 y el grupo del Dr. Petersen en 1992. Según el conocimiento de los cultivos 3D fue evolucionando, apareció el concepto de “organoide”. Antes del año 2005, los organoides eran considerados parte de co-cultivos 3D, y comúnmente eran denominados como pequeños fragmentos de tejido obtenidos a partir de órganos, la mayoría de tejido epitelial, separados del estroma mediante digestión mecánica y enzimática y crecidos en diferentes geles 3D para producir una estructura parecida a un órgano. Sin embargo, esta definición se ha visto modificada a lo largo de los años, cubriendo diferentes aproximaciones metodológicas que no implican una única técnica. El término organoide se puede referir a explantes primarios de conducto epitelial en una matriz extracelular 3D (MEX). También a la posibilidad de clonar derivados de células madre epiteliales primarias que han crecido sin mesénquima. De la misma manera, también se refiere a aquellos co-cultivos epiteliales-mesenquimales derivados a partir de células madre embrionarias (CMEs) o células madre pluripotentes inducidas (CMPIs). Otros grupos de investigación definen organoide como una estructura celular 3D *in vitro* derivada exclusivamente de tejido primario, CMEs o CMPIs, capaz de auto-renovarse y auto-organizarse, y que exhibe una función orgánica similar al tejido de procedencia.

En general, la formación de organoides claramente se apoya en el principio de auto-organización, el cual implica el mínimo control sobre los estímulos externos. El fundamento de este auto-ensamblaje orgánico podría originarse de la segregación de células con propiedades adhesivas similares en los dominios que alcanzan el patrón termodinámico más estable, conocido como la hipótesis de adhesión diferencial de Steinberg. Un segundo mecanismo que determina la morfogénesis de un tejido reside en la existencia de progenitores celulares que poseen la capacidad de residir en regiones concretas del tejido u órgano. Las diferentes estratificaciones o localizaciones dependen de la correcta orientación en la división de las células madre, la interacción entre divisiones simétricas y asimétricas, y la migración de las células hijas diferenciadas, definiendo su localización en el tejido. Como consecuencia, hay una gran heterogeneidad en los sistemas de organoides, por lo que no solo es difícil lograr la reproducibilidad entre distintos laboratorios, sino también entre distintas líneas de CMPIs y experimentos. Hasta la fecha se han podido generar organoides de numerosos órganos a partir de células madre humanas. Estas complejas estructuras nos proporcionan una oportunidad excepcional para modelar el desarrollo de órganos humanos en un sistema altamente similar al desarrollo *in vivo*.

TIPO DE ORGANOIDES

Los organoides se pueden derivar a partir de CMEs, CMPIs o células adultas residentes en un tejido u órgano. A lo largo de las dos últimas décadas ha sido posible derivar CMEs humanas a partir de la masa celular interna del embrión en fase de blastocito, así como propagar su crecimiento de manera indefinida *in vitro* sin que estas células pierdan sus propiedades de autorenovación y diferenciación a las tres capas germinales del embrión¹. En 2007, el Dr. Shinya Yamanaka generó por primera vez CMPIs a partir de fibroblastos humanos, abriendo la puerta a generar este tipo de células madre a partir de casi cualquier tipo celular maduro de nuestro cuerpo². Estos avances han permitido la diferenciación de varios tipos de células madre pluripotentes (CMPs) a células somáticas *in vitro*. Las células madre adultas residentes en tejido (CMA) son muy populares recientemente, debido a sus habilidades intrínsecas para la auto-renovación y diferenciación >>>

>>> a los tipos celulares presentes en los tejidos adultos, mientras mantienen su estabilidad genómica.

ORGANOIDES DERIVADOS A PARTIR DE CMEs HUMANAS

La primera derivación exitosa de una línea de CMEs se describió a finales de los noventa, dando lugar a un nuevo campo de investigación biomédica. Estas células son aisladas a partir de la masa celular interna del blastocito, y se pueden mantener en cultivo en un estado indiferenciado con alta capacidad proliferativa de manera indefinida. Un rasgo inherente de las CMEs es la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular del cuerpo humano. Hoy en día hay más de 400 líneas de CMEs disponibles, algunas de ellas caracterizadas y registradas en bancos de CMPs, como el Banco Nacional de Líneas del Instituto de Salud Carlos III (<https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/BIOBANCOS/BNLC/Paginas/default.aspx>). Las líneas de CMEs, H9 y H1, se han utilizado de manera frecuente a la hora de generar organoides. Ambas líneas celulares se han empleado en la creación de organoides de cerebro humano con el fin de establecer un modelo *in vitro* para el estudio de enfermedades neuronales (Figura 1A). Algunos grupos usaron la línea celular H1 así como CMPIs para generar esferoides endodérmicos de hígado que gradualmente se diferenciaron a esferoides de hepatoblastos. Este ejemplo ilustra la posibilidad de generar organoides hepáticos a partir de células humanas para el estudio de enfermedades hepáticas complejas en la placa de cultivo. Otra línea de CMEs, la línea H9, también representa otra fuente celular para la obtención de organoides pancreáticos. En este sentido, se desarrollaron células pancreáticas α , β , δ a partir de esta línea de CMEs, de hecho logrando la producción de islotes pancreáticos funcionales, capaces de producir gránulos secretores de insulina por parte de la población de células β , abriendo una nueva puerta al potencial tratamiento de la enfermedad de la diabetes.

ORGANOIDES DERIVADOS A PARTIR DE CMPIs HUMANAS

La posibilidad de generar CMPIs establece la posibilidad de contar con una fuente inagotable de células madre pluripotentes paciente-específicas. En este sentido la posibilidad de generar CMPIs de donantes sanos y enfermos ha abierto la puerta a la aplicación de esta tecnología en la medicina personalizada. Las CMPIs, de hecho, poseen la capacidad de mantener muchos rasgos propios del paciente, confiriéndoles una ventaja para el estudio de enfermedades y/o testar medicamentos. Las CMPIs ya han sido utilizadas para crear muchos tipos de organoides (Figura 1B). Algunos estudios han logrado crear papilas hepáticas a partir de CMPIs. Existen diferentes abordajes: por un lado, se estableció un sistema de diferenciación en el cual las CMPIs se cultivaron para formar agregados de hepatoblastos, los cuales fueron disociados y cultivados sobre Matrigel™, obteniendo organoides que contenían hepatocitos y colangiocitos. Por otro lado, se obtuvieron esferoides de intestino

anterior a partir de CMPIs y cultivando estos esferoides en un medio específico para diferenciación de hepatocitos, obtuvieron organoides de hígado que contenían todos los tipos celulares y que además exhibían un perfil transcripcional comparable al tejido hepático *in vivo*. Modelar *in vitro* enfermedades neurodegenerativas es un gran aliciente para tratar de desarrollar organoides cerebrales a partir de CMPIs. Los cultivos neurales que emulan el sistema nervioso central son comúnmente obtenidos a partir de la diferenciación de CMPIs a agrupaciones de células neuronales o mediante la generación de organoides de cerebro más complejos. Los progenitores neuronales humanos se han obtenido realizando cultivos celulares en suspensión 3D con el fin de generar agregados de células neuronales, mientras que los organoides de cerebro se han derivado sobre todo a partir del cultivo de esferoides de CMPIs cultivadas en ausencia de suero, los llamados “cuerpos embrionarios”. En este sentido, algunos autores usaron este último método para obtener unos novedosos organoides denominados “mini-cerebros”, que incluían distintas regiones cerebrales. Las CMPIs diferenciadas son capaces de auto-organizarse en cultivos 3D resultando en la formación de estructuras similares a tejidos que recuerdan en estructura y función por ejemplo al riñón humano en desarrollo. En este sentido el trabajo del grupo de la Dra. Nuria Montserrat demostró la posibilidad de generar organoides de riñón que eran similares al riñón humano del segundo trimestre de gestación³. Más recientemente el mismo grupo ha demostrado por primera vez la posibilidad de estudiar y bloquear la infección de SARS-CoV-2 utilizando organoides vasculares y de riñón.

ORGANOIDES DERIVADOS A PARTIR DE CMAs HUMANAS

Los organoides se pueden generar a partir de células del órgano adulto, formando un epitelio 3D *ex vivo* que a su vez puede crecer de manera indefinida. En tales cultivos, existen además células madre o progenitoras con capacidad de auto-renovación y diferenciación. En este sentido, el descubrimiento de las células madre adultas en las crestas intestinales de ratón positivas para Lgr5, abrió la posibilidad de generar organoides de intestino, representando el estudio clave que abrió la puerta a la generación de este tipo de cultivos⁴. Cuando tales cultivos se establecen a partir de células humanas, éstos representan una herramienta para la investigación básica ya que tales sistemas recapitulan muchos aspectos de la fisiopatología del tejido adulto (Figura 1C). Además, el uso de organoides derivados de células adultas de pacientes abre la puerta a la realización del diagnóstico y estratificación de los pacientes para la búsqueda de opciones terapéuticas. Sin embargo, el cultivo de este tipo de organoides presenta todavía algunas limitaciones, como la falta de inervación o el componente vascular o mesenquimal. Una aproximación fiable para el establecimiento y cultivo de organoides a partir de biopsias de pacientes es la liberación de las células madre de tejido, por ejemplo de las crestas intestinales, median-

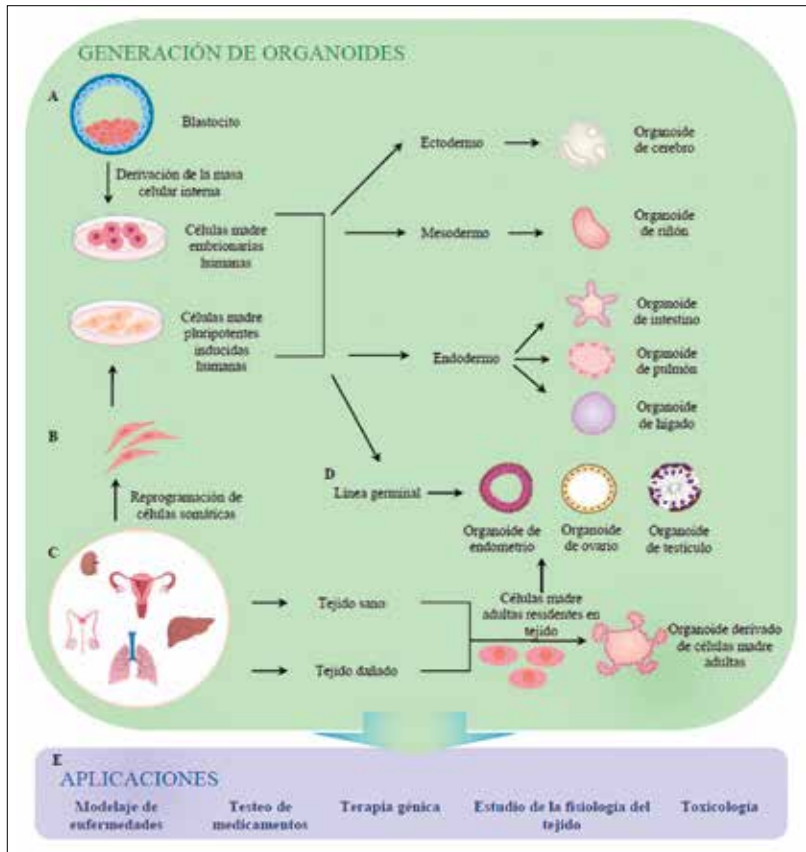


Figura 1
Generación de organoides humanos y sus aplicaciones. A) Los CMEs obtenidas de la masa celular interna del blastocito pueden generar organoides de cualquiera de las tres capas germinales. B) Las células somáticas de tejidos adultos pueden ser reprogramadas a CMEs y generar organoides de cualquiera de las tres capas germinales. C) Los organoides derivados de CMA pueden ser generados a partir de tejido sano o tejido dañado. D) Los organoides en el ámbito reproductivo pueden ser derivados a partir de CMEs y/o CMA residentes en tejido. E) Aplicaciones potenciales de los organoides humanos.

te el aislamiento físico y mecánico. Las células madre o los fragmentos de tejido son depositados en soportes de MEX y recubiertos con medio de cultivo suplementado con diferentes agentes tales como mitógenos, morfógenos y citoquinas que guían la auto-renovación y la diferenciación de estas células madre somáticas. No obstante, no hay un único protocolo o medio de cultivo que se adecúe a todos los tipos de tejidos, por lo que los protocolos deben ser adaptados al tipo celular original. Algunos grupos establecieron un procedimiento para el cultivo de organoides de epitelio intestinal que permite la multidiferenciación y autorenovación de los organoides de intestino humano, ofreciendo una estrategia viable para el modelaje *in vitro* del tejido intestinal humano y sus diferentes enfermedades. En este sentido otros trabajos aislaron células adultas humanas de páncreas, generando una progenie endocrina con propiedades de células β , incluyendo la habilidad de sintetizar, procesar, almacenar insulina y secretarla en respuesta a la glucosa. Los hepatocitos son conocidos por su pobre expansión a largo plazo en cultivo, apoyándose

en su mantenimiento *in vitro* en las células hepáticas derivadas de CMEs o CMA para el desarrollo de organoides. Recientemente, en este campo de trabajo se ha mejorado el protocolo para establecer cultivos a largo plazo de hepatocitos a partir de biopsias de hígado humano con el fin de formar organoides. Se mostró que las células primarias del conducto biliar pueden ser fácilmente expandidas *in vitro* como células madre bipotentes en organoides funcionales 3D. En líneas generales, los organoides derivados de tejido adulto se han convertido en una potente herramienta para el estudio *in vitro* de tejido afectados.

ORGANOIDES EN EL ÁMBITO DE LA REPRODUCCIÓN

Los problemas médicos y enfermedades respectivas al ámbito reproductivo, es decir, órganos reproductivos masculinos y femeninos, han llamado la atención a la comunidad de investigadoras/es que trabajan con organoides. Estas estructuras podrían arrojar luz a varios problemas que preocupan a la sociedad, como el cáncer, la infertilidad y otras patologías relacionadas con los órganos reproductivos. Los organoides son un sistema *in vitro* ideal para probar fármacos así como para comprender procesos relacionados con la infertilidad (Figura 1D).

ORGANOIDES TESTICULARES

La infertilidad masculina es una patología compleja y multifactorial que afecta entre el 9% y 15.8% de la población masculina. Además, los tratamientos contra el cáncer generalmente provocan problemas de fertilidad, debido a los efectos gonadotóxicos de la quimioterapia y/o radioterapia. Estos agentes terapéuticos afectan a la población células madre espermatogénicas (SSCs, del inglés *Spermatogonial Stem Cells*), lo cual influirá en la fertilidad del varón. Varios grupos han probado distintos abordajes con el fin de obtener organoides de testículo para estudiar la interacción entre los distintos tipos celulares de éste, y la posible restauración de la fertilidad. Pendergraft et al. generaron un sistema funcional de organoides de testículo humano mediante el co-cultivo de SSCs adultas y células de Leydig y Sertoli inmortalizadas, en un sistema de “gota colgante” con medio de cultivo suplementado con MEX soluble de testículo humano. A pesar de que tal abordaje no resultó en la generación de organoides que presentasen la correcta organización histológica del testículo, estos >>>

»» organoides fueron viables durante tres semanas produciendo testosterona. Además, una pequeña porción de células germinales diploides sufrieron meiosis, alcanzando el estado haploide⁵. Otros autores generaron organoides de testículo humano sembrando células adultas de testículo sobre matrices testiculares de adulto descelularizadas. A pesar de que estos organoides testiculares no imitaban la estructura histológica del testículo humano, las células inoculadas repoblaron la matriz, y se reorganizaron en estructuras capaces de producir testosterona e inhibina B, así como secretar citocinas. La proliferación a largo plazo de las células germinales y el mantenimiento del estadio indiferenciado hace de este tipo de cultivo un modelo *in vitro* para el estudio de propagación de las células testiculares germinales indiferenciadas y abriendo estudios de toxicología. Teniendo esto en cuenta, los próximos años van a ser determinantes a la hora de establecer sistemas de cultivo para perfeccionar la arquitectura del tejido y al mismo tiempo asegurar la funcionalidad celular.

ORGANOIDES DE OVARIO

El cáncer de ovario (CO) es uno de los cánceres más letales, ya que, en la mayoría de las pacientes, el cáncer es detectado en estadios muy avanzados o en metástasis. Los organoides de CO son una herramienta de investigación muy poderosa para modelar y estudiar este tipo de cáncer, simulando las características del tumor *in vitro*; es por ello que algunos grupos han desarrollado protocolos para establecer organoides de CO a largo plazo. Kopper et al. estableció un procedimiento para la derivación eficiente y la expansión a largo plazo de los organoides de CO. Derivaron 56 líneas de organoides provenientes de 32 pacientes, representando todos los subtipos principales de CO. Además los organoides de CO simulan las características histológicas y genómicas del tejido original⁶. En otros laboratorios fueron capaces de derivar organoides de OC de carcinoma seroso de ovario de alto grado. En tal trabajo se demostró que la neuregulina-1 (NRG1) representa un factor clave en la maximización del desarrollo y crecimiento de organoides de CO. Las líneas de organoides establecidas mostraron además la misma morfología y características del tumor también recapitulando la expresión de los marcadores tumorales y el perfil mutacional. De hecho, los organoides mostraron una sensibilidad tumor-específica a los agentes quimioterápicos utilizados a día de hoy para tratar el carcinoma seroso de ovario de alto grado. A pesar de que los organoides de CO son una herramienta muy poderosa para el estudio de esta enfermedad, los organoides de ovario podrían desarrollarse para el estudio de otras patologías como por ejemplo, el fallo ovárico prematuro u ovario poliquístico, entre otras, representando también un abordaje para tratar la infertilidad femenina.

ORGANOIDES DE ENDOMETRIO

El endometrio humano conforma la cavidad uterina y sirve como primer contacto para el embrión durante el proceso de implantación. El tejido endometrial es uno de

los tejidos más respondedores a las hormonas sexuales esteroideas, sufriendo cambios durante cada ciclo menstrual. Una respuesta anormal al estrógeno y a la progesterona puede resultar en un embarazo fallido debido a un endometrio refractario que puede llevar incluso a algunas enfermedades como el cáncer de endometrio. Generar organoides de endometrio podría ayudar a estudiar mejor la interacción de este tejido con las hormonas, analizar la respuesta a tratamientos neoplásicos o abordar el estudio de enfermedades endometriales, como la endometriosis. En este sentido algunos autores establecieron organoides de endometrio humanos a partir de endometrio en diferentes estadios: endometrio secretor, proliferativo y postmenopáusico, junto con endometrio decidual propio del embarazo. Los organoides formados a partir de endometrio secretor y decidual tuvieron la mayor tasa de éxito de formación (100 y 96%, respectivamente). Estos organoides se expandieron durante varias semanas, eran genéticamente estables y se diferenciaban siguiendo un tratamiento con hormonas reproductivas. Los organoides presentaban características de embarazo temprano cuando se les exponía a señales propias del mismo. En otro trabajo, se establecieron cultivos de organoides endometriales que fueron mantenidos en cultivo durante largos periodos de tiempo a partir de lesiones endometriales, patologías pre-cancerosas e hiperplasia endometrial. Estos organoides recapitulaban el fenotipo y la genética de la enfermedad, mostrando respuestas específicas a medicamentos. Finalmente, otros autores combinaron la derivación de organoides de endometrio con la secuenciación de RNA total y a nivel de célula única estableciendo así un atlas de expresión de organoides de endometrio de alta resolución. Con este trabajo se estudió la respuesta de los organoides endometriales a las hormonas reproductivas, encontrando que estos modelos de organoides son heterogéneos, conteniendo diferentes subpoblaciones de células que respondían a las hormonas, incluyendo también células madre.

APLICACIONES FUTURAS DE LOS ORGANOIDES EN INVESTIGACIÓN Y MEDICINA DE PRECISIÓN

Los organoides han revolucionado los estudios celulares *in vitro* dando lugar a la aparición de nuevos abordajes para la generación de nuevo conocimiento científico y futuras aplicaciones en el ámbito de la medicina (*Figura 1E*). Por un lado, los organoides humanos proporcionan información relevante sobre el desarrollo o progresión de las enfermedades en el contexto humano. El componente multicelular de los organoides ayuda a estudiar la fisiología tisular, contribuyendo a mejorar el conocimiento en el desarrollo, función e interacción celular de las células. Una de las características más atractivas de los organoides es el modelaje *in vitro* de enfermedades. Los organoides han sido utilizados para modelar enfermedades bacterianas, parasitarias y por infección viral, incluyendo enfermedades causadas por patógenos que antes no se han

podido estudiar *in vitro*, como por ejemplo la infección por SARS-CoV-2. Estos modelos recapitulan características de la infección *in vivo*. Además, los organoides provenientes de pacientes con enfermedades genéticas recapitulan los fenotipos celulares relacionados con la patología de interés, ofreciendo la oportunidad de elucidar el resultado de la enfermedad en diferentes tejidos. La aplicación de herramientas de edición génica, como CRISPR/Cas9 permite entender las causas subyacentes a la patología así como el modelado *in vitro* estudiando los cambios que aparecen entre células mutadas y no mutadas (editadas y no editadas).

Así mismo, el cáncer se ha estudiado en organoides de dos formas diferentes. Por un lado, algunos estudios generan organoides a partir de muestra tumoral, mientras que en otros casos, se ha descrito que es posible editar genéticamente organoides epiteliales a fin de estudiar el papel de las mutaciones de interés. Además, los organoides transformados o derivados de tejidos neoplásicos han sido de gran utilidad para la prueba de medicamentos y ensayos de toxicología. Además, la posibilidad de realizar screening de medicamentos podría convertirse en un procedimiento personalizado.

Respecto al ámbito reproductivo, la generación de organoides testiculares y ováricos han abierto una puerta al estudio de diferentes patologías, como el cáncer, la infertilidad o los problemas derivados del desbalance hormonal. En lo que respecta a los varones, la restauración de la fertilidad tras tratamientos contra el cáncer es un gran reto en el ámbito clínico, especialmente en paciente prepuberales. Los organoides derivados a partir de células testiculares de pacientes podrían ayudar a identificar los mecanismos clave que expliquen el daño celular después de los tratamientos contra el cáncer así como la infertilidad masculina. A su vez, estos modelos celulares se podrían utilizar para imitar las condiciones de los pacientes que sufren infertilidad provocada por el síndrome de Klinefelter, síndrome de Down o cáncer de testículo.

Por otro lado, la salud del sistema reproductivo femenino es una parte indispensable para la calidad de vida de la mujer. Las enfermedades y desórdenes del sistema reproductivo femenino no han sido suficientemente estudiados, especialmente en áreas como la endometriosis, cánceres ginecológicos y trastornos en el embarazo. Los organoides del sistema reproductivo femenino nos brindan la oportunidad de modelar tejidos de estos órganos, siendo el tejido ovárico y endometrial los más estudiados. Como los organoides derivados de pacientes llevan consigo la información genética y epigenética específica de cada paciente, esto podría aportar ventajas exclusivas para el screening de medicamentos y estudios toxicológicos. Además, los organoides podrían ayudar a entender el comportamiento de cánceres ginecológicos, como el cáncer de ovario o el carcinoma seroso de alto grado, ambos muy prevalentes y

agresivos. Dichos organoides ofrecen a los investigadores una forma de aprender sobre las vías celulares involucradas en la tumorigénesis y una alternativa única para modelar sensibilidad a medicamentos, estudios de perfil endocrino, y para correlacionar datos con el perfil genético de tumores individuales antes del tratamiento en dichas pacientes.

Pese a todos estos avances, aún hay varios desafíos en el ámbito de los organoides que hay que abordar. Uno de ellos son las limitaciones prevalentes del uso de matrices extracelulares derivadas de animales, como el Matrigel™, que se utiliza en la mayoría de los procedimientos para su generación. Este material es incapaz de recapitular los cambios dinámicos del tejido *in vivo*, por lo que es necesario el desarrollo de nuevos biomateriales para implementar la calidad de los organoides. Además, las matrices extracelulares derivadas de animales presentan un problema ético y clínico para el futuro trasplante de organoides en humanos. Otro de los grandes retos a superar incluye el control externo de la propiedad de auto-organización de las células madre, y así definir nuevos abordajes que permitan derivar organoides de manera predictiva y robusta. ■

PARA LEER MÁS

- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Garreta E, Prado P, Tarantino C, Oriá R, Fanlo L, Martí E, Zalvidea D, Trepát X, Roca-Cusachs P, Gavalda-Navarro A, Cozzuto L, Campistol JM, Izpisua Belmonte JC, Hurtado Del Pozo C, Montserrat N. Fine tuning the extracellular environment accelerates the derivation of kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Mater*. 2019 Apr;18(4):397-405. doi: 10.1038/s41563-019-0287-6.
- Toshiro Sato T, Vries RG, Snippert HJ, Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009 May 14;459(7244):262-5. doi: 10.1038/nature07935. Epub 2009 Mar 29.
- Pendergraft SS, Sadri-Ardekani H, Atala A, Bishop CE. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro. *Biol Reprod*. 2017 Mar 1;96(3):720-732. doi: 10.1095/biolreprod.116.143446.
- Kopper O, de Witte CJ, Löhmußaar K, Valle-Inclán JE, Hami N, Kester L, Balgobind AV, Korving J, Proost N, Begthel H, van Wijk LM, Revilla SA, Theeuwse R, van de Ven M, van Roosmalen MJ, Ponsioen B, Ho VWH, Neel BG, Bosse T, Gaarenstroom KN, Vrieling H, Vreeswijk MPG, van Diest PJ, Witteveen PO, Jonges T, Bos JL, van Oudenaarden A, Zweemer RP, Snippert HJG, Kloosterman WP, Clevers H. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat Med*. 2019 May;25(5):838-849. doi: 10.1038/s41591-019-0422-6.