



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Comparación de cultivos celulares
bidimensionales y tridimensionales para
la generación de un modelo *in vitro* de
mesencéfalo ventral**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Angel Lizandro Polanco Maldonado



DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Itzel Escobedo Avila

Ciudad Universitaria, CD. MX 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1.Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
No. de cuenta

2.Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3.Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4.Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5.Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6.Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7.Datos del trabajo escrito.

Título
Subtítulo
Número de páginas
Año

1.Datos del alumno

Polanco
Maldonado
Ángel Lizandro
56 91 18 51
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311300732

2.Datos del tutor

Dra.
Itzel
Escobedo
Avila

3.Datos del sinodal 1

Dr.
Jaime Iván
Velasco
Velázquez

4.Datos del sinodal 2

Dr.
Adolfo
López
Ornelas

5.Datos del sinodal 3

Dra.
Anayansi
Hernández
Molina

6.Datos del sinodal 4

Biól.
Saúl
Cano
Colín

7.Datos del trabajo escrito.

Comparación de cultivos celulares bidimensionales y tridimensionales para la generación de un modelo *in vitro* de mesencéfalo ventral

Agradecimientos personales

A mi madre, Gabriela, por toda la paciencia, esfuerzo, confianza y amor que me has dado desde que nací. Sin ti nunca hubiera conseguido esta meta, te amo y este también es tu logro.

A mi padre, Mauricio, por tu apoyo y constante guía durante toda mi vida. Por ser un buen padre y mi mejor amigo.

A mi hermana, Alejandra, por siempre estar a mi lado y ser un gran ejemplo a seguir desde que era niño.

A Bernardo, por ser un apoyo constante y siempre estar dispuesto a respaldarme en momentos de necesidad.

A mis hermanos Irvin, Yederick y Erick, por ser parte de mi vida y estar siempre presentes cuando los necesito.

A mis padrinos, Joaquín y María Esther, por ser valiosas personas y ejemplo a seguir.

A la Dra. Itzel, por aceptar ser mi asesora en este trabajo y enseñarme con mucha paciencia y dedicación. Muchas gracias por la confianza y ser una gran asesora.

Al Dr. Iván, por aceptarme en su laboratorio y estar al pendiente de mi orientación y formación académica.

A César Meléndez, por ser mi primer amigo en la carrera y por ayudarme (a tu forma) para que pudiera convivir y encajar en el laboratorio.

A Xóchitl, Beetsi, Rolando, Alonso, Karla Itzel, Fernando, Karla, Majo, Adolfo, Enrique y Galilea, por hacer única mi estancia en el laboratorio. Con cada uno he reído y aprendido bastante.

A Giselle y Jorge, por ser los mejores profesores que he tenido en toda mi vida, enseñarme y creer en mí desde que soy niño. Sin ustedes nunca habría soñado con este día ni con dedicarme a la ciencia, los considero mi segunda familia y haré que estén orgullosos de mí.

A mis maestros Saúl y Sinué, por ser los mejores profesores de la carrera. Por guiarme, enseñarme y ayudarme a descubrir el tipo de formación académica que quiero tener, son mi ejemplo a seguir.

Al Dr. Mayani, sin sus clases no hubiera descubierto lo que me apasiona en esta hermosa profesión y siempre le agradeceré por eso.

Al Dr. Emilio, por darme la lección más grande de mi vida y que hasta el día de hoy me impulsa a esforzarme. Disciplina y constancia es el legado que me dejó.

A Omar, por ser uno de mis mejores amigos en la carrera y ser una de las personas en las que más confío.

A mis amigos, Brenda, Mireles, Zyanya y Fer Trejo, por ser unos buenos amigos durante la carrera.

A Yesenia, Marianna y Fernanda, por ser las mejores compañeras que alguien podría tener en la universidad. Recordaré los buenos momentos que tuvimos durante la carrera.

A Alitz, Irene y Zelcy, por convertirse inesperadamente en el mejor grupo de amigos con los que puedo contar y estar cuando lo necesito.

A Roberto, Emiliano, Oto, César Gon, Gabriel, Alan y Sergio, por ser mis mejores amigos desde la prepa. Sin ustedes no sé qué hubiera sido de mi vida y siempre los amaré.

A Melba, Darcy, Schoenbeck, Paola, Susana, Freddy, Xio, Osiris y Michel por convertirse en muy buenos amigos con los que no esperaba llevarme tan bien y ser un salvavidas en la selva.

A mi parcera Daniela, por ser una de las mejores amigas que podría tener y aunque estés lejos siempre estás ahí cuando lo necesito.

A Isa, por convertirte rápidamente en una de las personas en las que más confío y siempre ofrecerte a escucharme y ayudarme cuando lo necesito.

A mi ultramiga Daniela Gavilanes, por contagiarme la alegría y hacerme reír con tus historias que agradezco la confianza de contármelas.

A la Brends, por ser mi otro yo de un multiverso, darme las mejores pláticas frikis y alegrarme los días con tus memes e historias.

A Annamaria, por recomendarme “Ciudades invisibles” y con ello, el mantra de vida que me ha mantenido centrado y feliz.

A Luna Méndez, sé que no somos grandes amigos, pero muchas gracias por siempre ofrecerme tu amistad y tu casa cuando estoy solo.

Al equipo de No Somos Niños, por ayudarme a encontrar mi segunda pasión en esta vida y con la que he podido completar mi felicidad.

A Klem, por ser más que un entrenador y ser un buen amigo con el que puedo confiar y durante mucho tiempo de manera indirecta me ayudó a lidiar con la depresión.

A Tabata, por siempre inspirarme a seguir mis pasiones sin importar lo que tenga que sacrificar.

A Sam García, por hacer amenas y divertidas clases de dibujo.

A Ana Reyes, por darle like a la foto de mi concurso.

A Melissa, Yair, Pepe, Brittany, Daniela Mendoza, Aridai, Roman, Pardo, Carlos Román, Abril, Alan Labastida, Larry, Aleja Manríquez, Apolinar, Colunga, Amigo Mágico, Aranza, Ariel Rentería, Ariel Salazar, Ashley, Benito, Brenda Cabrera, Bryan, Carlos R. Marquez., Caro Cornejo, León, Chucho, Coral, Cris BT, Cris LG, Kat, Diego NB, Kevin Alex, Eduardo, Eli BP, Emiliano, Esvi, Eva, Fer Tovar, Fer Cruz, Fátima, Gaby, Geo, Hei Ree, Humberto, Henry, Ingrid, Isahy, Chelo, Ivette, Jack, Javi, Jazz, Jonathan Panchorizo, Karliz Ruiz, Ponche, Barrios, Berny, Axel, Julián Pineda, Kaori, Karla, Leo, Lourdes, Luis Vargas, Katzex, Isaac, Temo, Andrea, Erick Stage, Yin Stage, Gaby Cerón, Lule, Maan Andy, Pau Mej, Alice Polanco, Maca Amador, Mar Escutia, Mariana Ruíz, Mariana Acuña, Mariie Jimenez, Mario, Marlene, Carolina Ricárdez, Martina, Mauricio de Jesús, Melisa Medina, Mok, Miguel Espinosa, Mildred, Moon Castellanos, Nadine, Pablo Lavaniegos, Nicole, Noemi, Osvaldo, Paloma, Pablo Antonio, Pao Mendoza, Patricio, Moguel, Chava, Porfirio, Raquel, Raymundo, Rebeca Tapia, Renato, Koala, Landetta, Rodri, Rodrigo Pérez, Pollo, Quintana, Trejo, Suárez, Fersen, Galleta, Chato, Rubi, Sam Ramírez, Sam Quant, Sara, Sarai, Sofía Espinosa, Tanit, Toño, Aldo, Onix, Pamela Avendaño, Onii Chan, Vale Aguilera, Valeria Paleta, Vania, Veró Arroyo, Victor Alejandro, Weendy, Katia, Xime del Toro, Esteban Aceves, Yólotli, Éric Grip, Keyla Rivera, Alicia Guzmán, Karla Saavedra, Enrique Rivera, Luis G, Alejandro Rendón, Luke, Jair Ramos, Alan Estrella, Calleros, Iván Morales, Bogar, Omar Vilchis., Nidia Vicente, Ricardo Abreu, Lorena Moreno, Barak, Karen Cárdenas, Alexa Valladares, Sophie Cruz, Dea Laus, Alex Gallardo, Frida HG, Abraham, Rogelio Escalona, Azael., Shaddai, Isaac Gómez, Jorge Valencia, Sofía Rangel, Ale Celic, Jessica Reyes, Adamaris, Melissa Synyster, Mariann Odali, Brenda Loreda, Ale Maruri, Jessi Gln, Nuzeth, Uri, Andrea Tafolla, Arely García, Areli Moreno, Carolina Montzerrat, Caro Martos, María Richaud, Brian Urbano, Christopher Marino, Anayeli, Andy Torres, Alex Ordaz, Haifa, Carlos Yarim, Choreño, Julieta, Misael, Jaime, Dr. Alma, Andrea Montiel, Carla Gallardin, Arturo Vázquez, a mi abuela y toda persona que haya conocido durante toda mi vida, espero no haberme olvidado de nadie. Pensé que sería gracioso tratar de poner a todas las personas que de una u otra forma he conocido.

“What We Do In Life, Echoes In Eternity”

Gladiator

Índice:

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	3
3. Introducción	4
3.1. Desarrollo del sistema nervioso central	4
3.2. Desarrollo del mesencéfalo ventral	7
3.3. Diferenciación de neuronas dopaminérgicas	8
3.4. Células troncales	10
3.5. Cultivos bidimensionales	12
3.6. Cultivos tridimensionales	15
3.7. Organoides	16
3.8. Organoides cerebrales	19
4. Planteamiento del problema	21
4.1. Pregunta de investigación	21
4.2. Hipótesis	21
4.3. Objetivo general	22
4.4. Objetivos particulares	22
4.5. Estrategia experimental	23
5. Metodología	23
5.1. Cultivo celular bidimensional	23
5.2. Inmunofluorescencia en cultivos bidimensionales	24
5.3. Cultivo celular tridimensional	26
5.4. Inmunofluorescencia en cultivos tridimensionales	27
6. Resultados	30
6.1. Caracterización de células troncales embrionarias humanas	30
6.2. Diferenciación dopaminérgica	32
6.2.1. Caracterización día 14	32
6.2.2. Caracterización día 31	34
6.2.3. Caracterización día 63	36
6.3. Generación de organoides de mesencéfalo humano	38
6.3.1. Caracterización al día 14	40
6.3.2. Caracterización al día 31	42

6.3.3. Caracterización al día 63	45
6.4. Comparación de los cultivos bidimensionales y tridimensionales	47
7. Discusión	51
7.1. Caracterización de la línea celular embrionaria H1	51
7.2. Diferenciación dopaminérgica y generación de organoides de mesencéfalo	52
7.3. Caracterización de los cultivos bidimensionales y tridimensionales al día 14	53
7.4. Caracterización de los cultivos bidimensionales y tridimensionales al día 31	56
7.5. Caracterización de los cultivos bidimensionales y tridimensionales al día 63	58
8. Conclusión	60
9. Perspectivas	61
10. Referencias	62

1. Abreviaturas;

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AP	Antero-posterior
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso (por sus siglas en inglés; Bone Morphogenetic Proteins)
DA	Dopamina
DV	Dorso-ventral
ECM	Matriz extracelular (por sus siglas en inglés; Extracellular matrix)
ESCs	Células troncales embrionarias (por sus siglas en inglés; Embryonic Stem Cells)
FGF8	Factor de crecimiento de fibroblastos 8 (por sus siglas en inglés; Fibroblast Growth Factor 8)
FDM	Medio de diferenciación final (por sus siglas en inglés; Final Differentiation Medium)
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (por sus siglas en inglés; Glial fibrillary acidic protein)
GR	Glía Radial
hMO	Organoide mesencefálico humano (por sus siglas en inglés; human Midbrain Organoid)
iPSCs	Células troncales pluripotentes inducidas (por sus siglas en inglés; induced Pluripotent Stem Cells)
IsO	Organizador ístmico (por sus siglas en inglés; Isthmus Organizer)
NDA	Neuronas dopaminérgicas
ME	Matriz extracelular
MesV	Mesencéfalo ventral
MPM	Medio modelador de mesencéfalo (por sus siglas en inglés; Midbrain Patterning Medium)
NE	Neuroepitelio
NECs	Células neuroepiteliales (por sus siglas en inglés; Neuroepithelial Cells)
NIM	Medio de inducción neural (por sus siglas en inglés; Neural Induction Medium)
NPCs	Células progenitoras neurales (por sus siglas en inglés; Neural Progenitor Cells)
NSCs	Células troncales neurales (por sus siglas en inglés; Neural Stem Cells)
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos (por sus siglas en inglés; Phosphate Buffer Saline)
PLO	Poli-L-ornitina
PSCs	Células troncales pluripotentes (por sus siglas en inglés; Pluripotent Stem Cells)

SHH Sonic Hedgehog

SNC Sistema nervioso central

SNpc Sustancia nigra pars compacta

SSEA4 Antígeno de superficie etapa-específico SSEA4 (por sus siglas en inglés; Stage- Specific Embryonic Antigen 4)

TGF- β Factor de crecimiento transformante β (por sus siglas en inglés; Transforming Growth Factor beta)

TGIM Medio de inducción de crecimiento tisular (por sus siglas en inglés; Tissue Growth Induction Medium)

TH Tirosina hidroxilasa

TUJ1 β -Tubulina III

2. Resumen

Los cultivos bidimensionales (2D) han sido un modelo ampliamente usado para estudiar diferentes eventos del desarrollo embrionario y adulto, comprender enfermedades y evaluar posibles tratamientos, sin embargo, este modelo no representa el ambiente tridimensional (3D), ni mantienen la compleja organización y arreglo que tienen las células en tejidos y órganos como el cerebro *in vivo*. En este trabajo estandarizamos la implementación de un cultivo 3D cerebral usando células troncales embrionarias para generar organoides de mesencéfalo humano (hMO) con base en un protocolo ya descrito. Esto con el objetivo de caracterizar diversos marcadores como LMX, OTX2 y Calbindina y evaluar el potencial de su uso como modelo *in vitro* del desarrollo embrionario del mesencéfalo y definir las posibles ventajas y/o desventajas de su uso con respecto a los cultivos 2D. Observamos que los hMO presentaron poblaciones celulares de precursores neurales y linaje dopaminérgico; así como presentaron poblaciones celulares positivas para los marcadores de linaje dopaminérgico FOXA2, LMX1A, nestina, OTX2, β -Tubulina III y Tirosina Hidroxilasa. Estas poblaciones también tuvieron una distribución específica dentro de los hMO, con la presencia de estructuras parecidas a rosetas neurales en la periferia y la presencia de células gliales GFAP+ (marcador característico de diferenciación astrogliar) en el centro del hMO, lo que indicó la presencia de diferenciación hacia un linaje glial. En comparación con los cultivos 2D, los hMO mostraron potencial de diferenciación hacia una mayor variedad de linajes celulares, lo cual permitiría estudiar características del neurodesarrollo embrionario humano como la migración celular y las interacciones espacio-temporales con el microambiente que guían la diferenciación neural y glial en esta región cerebral.

3. Introducción

3.1. Desarrollo del sistema nervioso central

Durante el desarrollo embrionario de cualquier vertebrado existe un evento denominado gastrulación, encargado de formar 3 capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo; las cuales, a través de diferentes mecanismos celulares y moleculares darán origen a todos los tipos celulares, tejidos y órganos que conformarán al organismo. El ectodermo es la capa embrionaria de la que se deriva la epidermis y el sistema nervioso, este último inicia su especificación desde la región dorsal del ectodermo, la cual está localizada sobre una estructura cilíndrica llamada notocorda (Gilbert & Barresi, 2016; Purves et al., 2018). Desde la notocorda se induce espacio-temporalmente otro evento llamado neurulación, donde el ectodermo dorsal (también llamado neuroectodermo) se establece como la placa neural, una estructura compuesta de células epiteliales columnares pseudoestratificadas que son indiferenciadas (células neuroepiteliales), por medio de algunos morfógenos como Sonic Hedgehog (SHH), y algunos antagonistas de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs). A pesar de mantener características de naturaleza epitelial, las células del neuroepitelio (NE) pueden ser consideradas las primeras células precursoras neurales ya que poseen un alto grado de plasticidad y preceden a las células progenitoras neurales (NPC) del sistema nervioso (Götz & Huttner, 2005; Bergström & Forsberg-Nilsson, 2012; Gilbert & Barresi, 2016).

Posteriormente, los bordes de la placa neural se invaginan y se elevan hasta formar los pliegues neurales, los cuales migran hacia la línea media dorsal del embrión para converger y generar el tubo neural; de manera simultánea se forma un surco neural en el centro de la placa. Del tubo neural se derivan el sistema nervioso central (SNC), y la médula espinal, mientras que el sistema nervioso periférico se desarrolla a partir de la cresta neural, un grupo de células de la región más dorsal del tubo neural justo debajo del ectodermo suprayacente que dará origen a la epidermis (Wilde et al., 2014; Gilbert & Barresi, 2016; Purves et al., 2018) (Fig. 1).

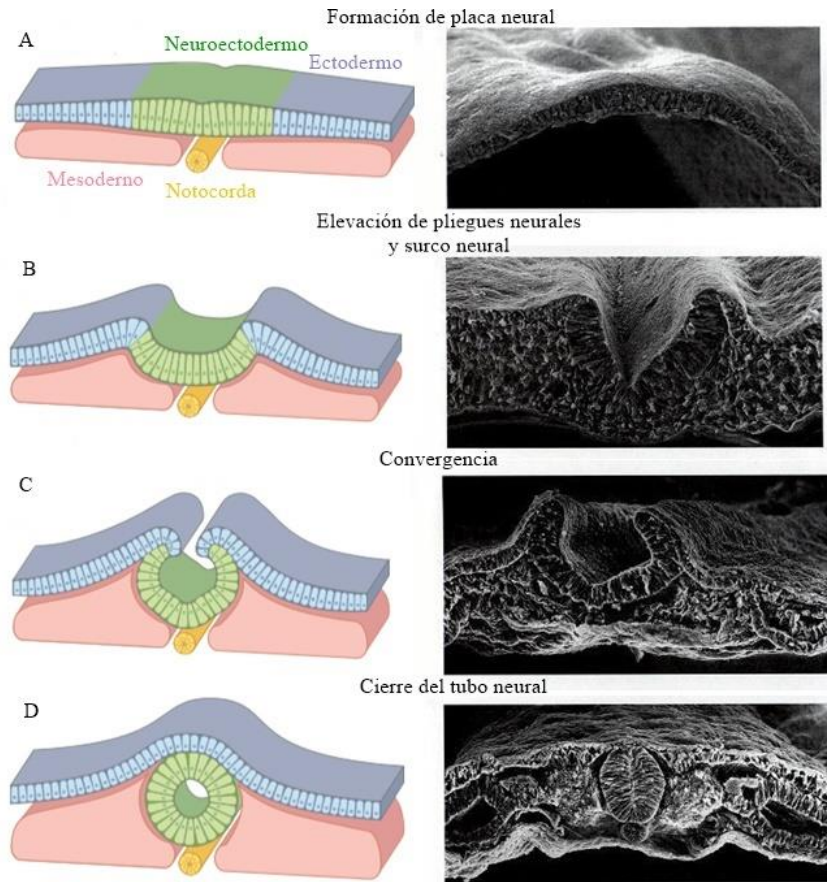


Figura 1. Neurulación. Ilustraciones e imágenes de microscopía electrónica de barrido donde se observa el proceso de neurulación donde A) se establece la placa neural por inducción de la notocorda. B) Los bordes se pliegan hacia adentro y se elevan, en el centro de la placa neural formando el surco neural. C) Los pliegues neurales convergen por la línea media dorsal del embrión. D) Se forma el tubo neural (Modificado de Wilde, et al., 2014; Gilbert & Barresi, 2016).

A partir del tubo neural se especifican las regiones diversas que conformarán al SNC de forma paralela en 3 niveles: anatómico, tisular y celular (Gilbert & Barresi, 2016).

- 1) Anatómico: El tubo neural y su cavidad aumentan de tamaño por la acción de movimientos de constricción para formar las vesículas cerebrales y la médula espinal, a partir de la región rostral y caudal respectivamente.
- 2) Tisular: Las poblaciones celulares dentro de la pared del tubo neural se acomodan para formar las diferentes regiones funcionales del cerebro y la médula espinal.
- 3) Celular: Las células del NE se diferencian hacia neuronas y células gliales (astrocitos y oligodendrocitos).

En el tubo neural existen dos ejes neurales primarios, uno de ellos es el eje antero-posterior (AP) donde la región anterior forma 3 vesículas cerebrales primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Más adelante, el prosencéfalo se subdivide en telencéfalo y diencéfalo, mientras el rombencéfalo se subdivide en metencéfalo y mielencéfalo; el mesencéfalo es la única vesícula cerebral primaria que no se subdivide y se mantiene. En la etapa adulta, las regiones y estructuras específicas del SNC se derivan de estas 5 vesículas cerebrales secundarias (Gilbert & Barresi, 2016).

El otro eje neural primario del tubo neural se establece desde la aparición de la placa neural y es llamado eje dorso-ventral (DV). En este eje hay un gradiente molecular que es originado desde la línea media dorsal y la línea media ventral, ambas estructuras son formadas por la señalización de diversas moléculas que secretan la notocorda y la región epidérmica (Patten & Placzek, 2000; Li, et al., 2005; Gilbert & Barresi, 2016).

Inicialmente en la notocorda se sintetiza al precursor de la proteína SHH, un morfógeno esencial en la polarización del tubo neural; cuando se tiene la forma activa de SHH se induce la diferenciación de un centro organizador secundario, la placa del piso del tubo neural. Las células de la placa del piso posteriormente secretan SHH en un gradiente molecular con la mayor concentración en la región ventral, debido al gradiente espacial de SHH es que se establecen una variedad de tipos celulares como progenitores y precursores neurales (Heussler & Suri, 2003; Choudhry et al., 2014; Gilbert & Barresi, 2016).

Mientras tanto, las células de la región dorsal del tubo neural son influenciadas por la expresión de miembros de la superfamilia de factores de crecimiento transformante β (TGF- β), siendo las BMPs como BMP4 y BMP7 fundamentales; ya que son expresadas inicialmente por el ectodermo epidérmico y tienen una función análoga con SHH induciendo la diferenciación de otro centro organizador secundario, la placa del techo del tubo neural. Al igual que su homólogo ventral, la placa del techo del tubo neural inicia una cascada de señalización que influye en la identidad de las células dorsales como células de la cresta neural e interneuronas; con la diferencia de utilizar otros morfógenos como BMPs y moléculas señalizadoras asociadas a BMPs como dorsalina-1 (DSL1), GDF7 y Activina, además de tener otras cascadas de señalización intracelular para complementar su acción

como la vía de señalización canónica de Wnt. En conjunto, la compleja interacción de diferentes moléculas, las diversas vías de señalización, el antagonismo y la expresión diferencial definen la regionalización del tubo neural en el eje dorso-ventral y antero-posterior (Gilbert & Barresi, 2016; Bianchi, 2017).

3.2. Desarrollo del mesencéfalo ventral

La formación del mesencéfalo ventral (MesV) es igual de intrincada que el resto del desarrollo del SNC al estar mediado por centros organizadores, vías de señalización y factores de transcripción. Además de las subdivisiones que tienen las vesículas cerebrales primarias y los ejes de simetría, se establecen varios dominios moleculares temporales dentro de las mismas, para promover la diferenciación terminal de cada región, principalmente por SHH, factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8), BMPs y WNT1 para definir estados proliferativos y neurogenéticos específicos de las NPCs durante la diferenciación, para que adquieran un linaje celular diverso y específico durante todo el proceso de regionalización y diferenciación (L. Puellas & Rubenstein, 2003; Gale & Li, 2008; Puellas, et al., 2012).

El mesencéfalo o cerebro medio está delimitado por estos dominios moleculares, siendo el organizador ístmico (IsO), un elemento esencial en la especificación del mesencéfalo. Este IsO funciona como un centro señalizador para la regionalización del mesencéfalo y rombencéfalo, mediante la expresión gradual del FGF8, ocurre una interacción co-represiva entre el factor de transcripción OTX2 (Orthodenticle Homeobox 2) que se expresa desde el telencéfalo hasta el borde mesencéfalo/metencéfalo y GBX2 (Gastrulation Brain Homeobox 2) que se expresa en el rombencéfalo, separando molecularmente al mesencéfalo del rombencéfalo anterior. Otros genes de la familia engrailed como En1 y En2, los factores de transcripción de la familia PAX (Paired Box) como PAX2 y PAX5 se expresan en el mesencéfalo y el IsO. PAX6 se expresa en el prosencéfalo delimitando el borde entre el mesencéfalo y prosencéfalo mientras que, Pax3/7 se expresa en la región del mesencéfalo (Gale & Li, 2008; Puellas et al., 2012; Nakamura, 2013) (Fig. 2).

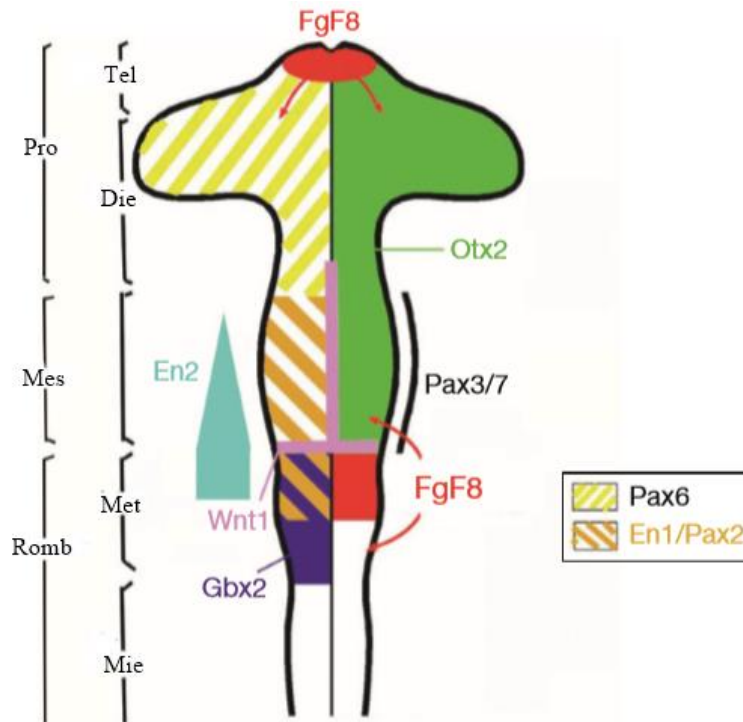


Figura 2. Vesículas cerebrales primarias y secundarias. Se muestran los dominios de expresión e interacción de diversos factores de transcripción durante la especificación de cada región. En el mesencéfalo (Mes) y organizador ístmico (IsO) se expresa En2, En1, Pax2 y, Pax 3/7. FGF8 se expresa en el IsO y la cresta neural. Pax 6 y Otx2 se expresan en Mes y prosencefalo (Pro) mientras Gbx2 se expresa en el metencefalo (Met). Wnt1 se expresa en el mesencéfalo y el borde posterior (Modificado de Nakamura, 2013).

3.3. Diferenciación de neuronas dopaminérgicas.

Conforme avanza el desarrollo del tubo neural y la regionalización del mesencéfalo, en el eje dorso-ventral se especifica a las células neuroepiteliales de la placa del piso con una expresión interactiva entre SHH y FOXA2 (Forkhead Box A2) en conjunto con OTX2, para activar la expresión de los factores de transcripción homeobox LIM como LMX1A y LMX1B y convertir el sitio aledaño a la línea media ventral en una zona proliferativa que define la identidad de NDA. Aquí la expresión de FOXA2 y MSX1 (Msh Homeobox 1) promueven la neurogénesis regulando la expresión de NGN2 (Neurogenina 2) mientras LMX1A y MSX1 determinan un destino dopaminérgico. Cuando estos progenitores de NDA se vuelven post-

mitóticos salen de la zona proliferativa y entran a una zona intermedia donde inicia la expresión de β -Tubulina III y de manera subsecuente el receptor nuclear, NURR1 (Nuclear receptor related 1 protein). Finalmente, las células Nurr1+ empiezan a expresar de manera diferencial TH (Tirosina hidroxilasa) y PITX3 (Pituitary homeobox 3), migrando por la periferia a diferentes estructuras y estableciendo los diferentes sub-grupos de NDA: grupo A9, pertenecientes a la sustancia nigra pars compacta (SNpc) y grupo A10 que pertenece al área ventral tegmental (Gale & Li, 2008; Arenas, Denham, & Villaescusa, 2015) (Fig. 3).

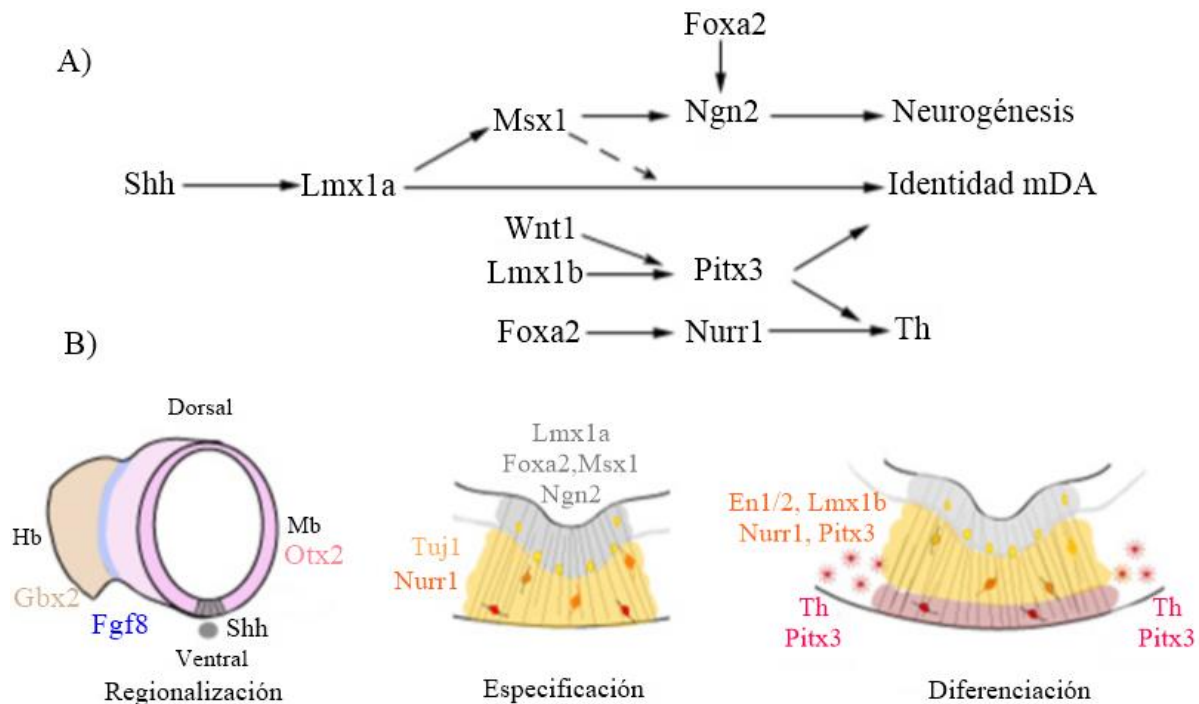


Figura 3. Diferenciación de neuronas dopaminérgicas, en el mesencéfalo ventral. A) La señalización de SHH activa la expresión de LMX1A y ambos son factores clave en la diferenciación de NDA, se regula con la interacción dinámica de MSX1, FOXA2 y NGN2 para especificar y diferenciar las poblaciones celulares de NDA del mesencéfalo ventral, WNT1 y LMX1B regulan la expresión de PITX3 mientras FOXA2 regula la expresión de NURR1 y en ambos casos se expresa TH como etapa final de diferenciación dopaminérgica. B) En el tubo neural ocurre regionalización por medio de SHH en la notocorda y placa del piso (gris), OTX2 y FGF8 se expresan desde el borde del rombencéfalo y mesencéfalo (rosa y anillo azul); la especificación ocurre en la línea media ventral y hay dos zonas: 1) la zona proliferativa (gris) y la zona intermedia (amarillo) donde migran progenitores neurales; en la diferenciación las células PITX3+ y TH+ migran a la zona periférica (rojo) donde terminan de madurar (Modificado de Gale & Li, 2008)

De esta manera, la identidad celular que se encuentra es principalmente de neuronas dopaminérgicas, las NDA de la SNpc proyectan hacia el estriado dorso-lateral y regulan funciones motoras. La degeneración de neuronas de la SNpc y presencia de inclusiones citoplásmicas llamadas cuerpos de Lewi están involucradas en la enfermedad de Parkinson (PD). Aunque no hay un mecanismo único que explique esta enfermedad, se sabe que la degeneración de NDA está relacionada con la pérdida de la neurotransmisión dopaminérgica en la vía nigroestriatal causando síntomas característicos de la PD como rigidez, acinesia, bradicinesia y temblor. En cambio, las NDA del área ventral tegmental (VTA) proyectan hacia el estriado ventro-medial, áreas corticales y el sistema límbico, regulando funciones conductuales; por otro lado, la degeneración de neuronas del VTA se asocian con síntomas no motores que preceden la enfermedad de Parkinson, junto con el surgimiento de demencia, ansiedad y depresión (Dauer & Przedborski, 2003; Gale & Li, 2008; Hernandez, et al., 2019; Krashia, et al., 2019).

3.4. Células troncales

Durante todo el desarrollo embrionario existen diversas poblaciones celulares con características muy particulares, tienen una alta capacidad de autorrenovación para perpetuarse a sí mismas y gran plasticidad de diferenciación: totipotencial cuando pueden generar todas las células de un organismo y tejidos extraembrionarios, pluripotencial cuando se generan todas las células embrionarias de un organismo y multipotencial cuando se generan células con linajes restringidos, para dar origen a diversos tipos celulares especializados. Estas células son llamadas células troncales (SCs, por sus siglas en inglés). Cuando el desarrollo del embrión entra en estado de blastocisto, se origina un pequeño grupo de células hacia el interior constituyendo una masa celular interna (ICM, por sus siglas en inglés), son células troncales pluripotentes (PSCs, por sus siglas en inglés) debido a que generan a todas las células, tejidos y órganos que conforman al embrión (Fig. 4) (Mayani, 2003; Biehl & Russell, 2009; Chagastelles & Nardi, 2011; van Hoof, et al., 2012; Boppart, et al., 2015; Gilbert & Barresi, 2016; Chávez-González, et al., 2017).

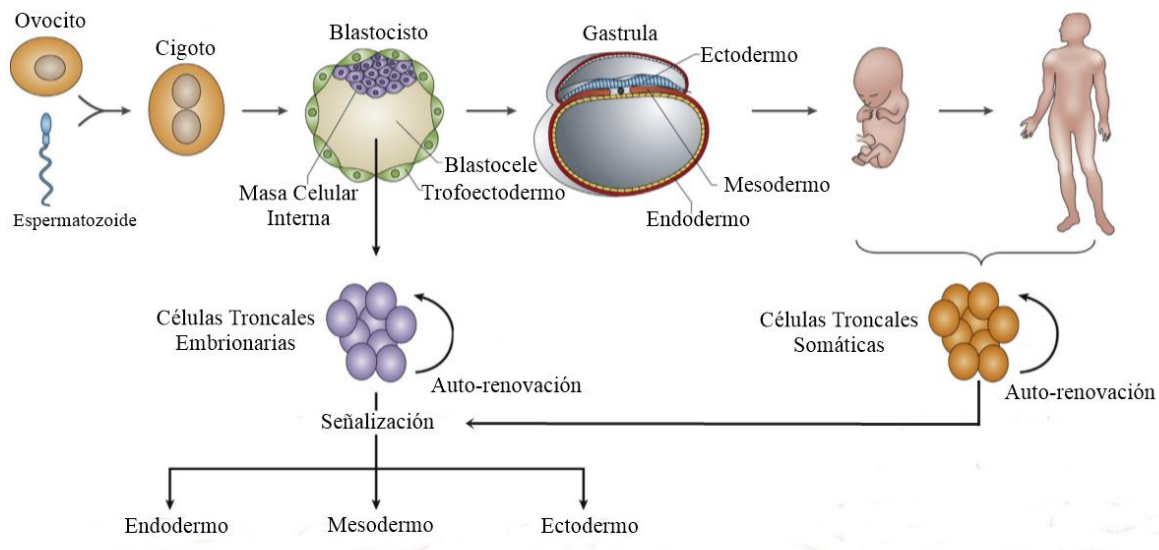


Figura 4. Clasificación y origen de las células troncales. Después de la fecundación se forma el cigoto, posteriormente se da origen al blastocisto, que se compone del trofoectodermo el cual dará origen a estructuras extraembrionarias y la masa celular interna (ICM) que dará origen a todas las estructuras embrionarias. Durante el desarrollo embrionario *in vivo* en la etapa de gastrulación surgen 3 capas embrionarias que darán origen a todas las células y órganos que conforman un organismo. En cambio, *in vitro* es posible aislar células de la ICM para obtener células troncales embrionarias pluripotentes y poder diferenciarlas a un destino celular específico de mesodermo, endodermo o ectodermo (Modificado de Boppart, et al., 2015)

Por tal motivo, para poder estudiar y comprender procesos del desarrollo embrionario, enfermedades asociadas y gestar avances en el área médica es necesario abordar desde una perspectiva *in vitro*, mecanismos clave durante el desarrollo embrionario *in vivo*. Por ejemplo, en el desarrollo del SNC existen células troncales conocidas como células troncales neurales (NSCs, por sus siglas en inglés) que desempeñan un papel esencial en el neurodesarrollo del organismo; como previamente se ha mencionado, las NSCs surgen a partir del tubo neural y debido a su grado de diferenciación (multipotencialidad) sólo generan células especializadas restringidas a tejido neural (Mayani, 2003; Chagastelles & Nardi, 2011; Bergström & Forsberg-Nilsson, 2012; Chávez-González et al., 2017;).

3.5. Cultivos bidimensionales

La manera tradicional de trabajar con células troncales *in vitro* es mediante cultivos, utilizando una superficie plana de vidrio o poliestireno que brinde soporte mecánico para formar una monocapa celular; usualmente esta superficie es cubierta por un sustrato parecido a la matriz extracelular, permitiendo una adhesión a la superficie y promueve la proliferación o diferenciación celular. En estas condiciones, los nutrientes y factores de crecimiento se distribuyen homogéneamente en el cultivo. (Gilbert & Barresi, 2016; Lopes, et al., 2017; Duval et al., 2017; Kapałczyńska et al., 2018; Centeno, et al., 2018).

Sin embargo, los cultivos celulares en monocapa o bidimensionales (2D) no representan el ambiente complejo, heterogéneo y dinámico que se encuentra *in vivo* como el microambiente celular, interacciones célula-matriz extracelular y célula-célula y la señalización que se da en gradiente y de forma espacio-temporal entre diferentes tejidos y células, por lo tanto, estas limitantes repercuten directamente en la interpretación que se le da a los ensayos *in vitro*. A través del tiempo, se han implementado metodologías y el uso de nuevas tecnologías para trabajar con cultivos 2D. Por ejemplo, mediante el uso de sustratos micro-modelados (micropatterning) donde se forman islas de adhesión celular en superficie de poliestireno, creando un ambiente micro-topográfico que tiene efectos en la respuesta a factores bioquímicos y sobre la morfología celular *in vitro* (Duval et al., 2017).

Existen diversos modelos de cultivos celulares entre los que se encuentran las líneas celulares establecidas, células pluripotentes troncales (embrionarias o reprogramadas), cultivos primarios (derivados de tejidos) y cultivos organotípicos (a partir de rebanadas de tejidos, para mantener las interacciones celulares presentes en una estructura tridimensional) (Fig. 5). Para el estudio del neurodesarrollo y neuropatologías ha sido esencial la generación de modelos *in vitro* que permitan recapitular de la mejor manera las características de interés, tal es el caso de la PD, donde la degeneración de NDA de la SNpc es la característica principal de esta patología (Lopes et al., 2017; Uysal, et al., 2017).

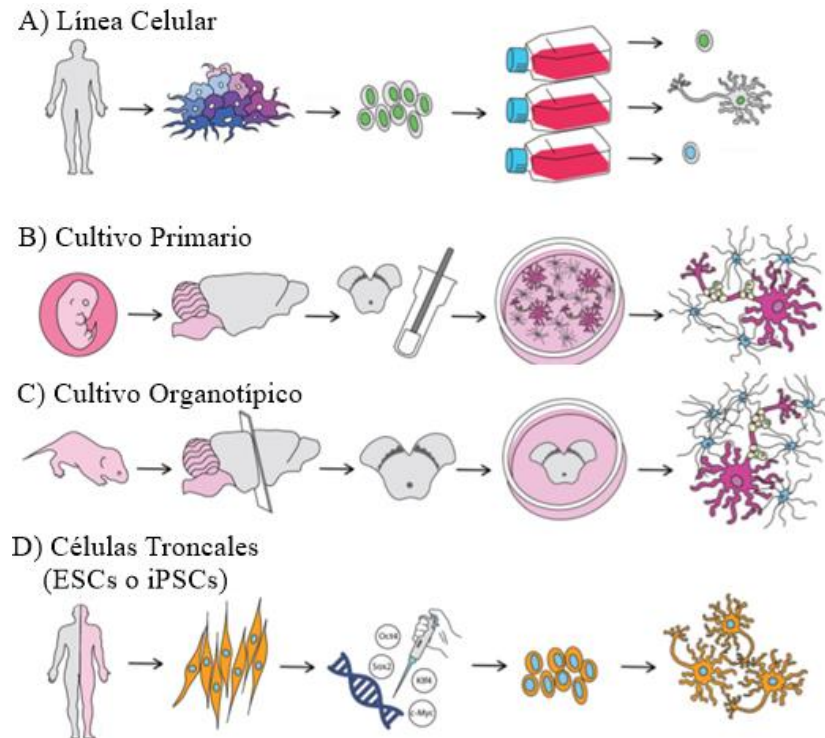


Figura 5. Modelos *in vitro* 2D. A) Línea celular con gran capacidad proliferativa y diferenciación específica. B) Cultivo primario de biopsias de tejido/órgano. C) Cultivo organotípico que mantiene las interacciones celulares. D) Cultivo celular de ESCs o iPSC para diferenciar hacia diversos linajes celulares (Modificado de Lopes et al., 2017).

En los cultivos neurales, las líneas celulares son un modelo conveniente para evaluar compuestos neuroprotectores o analizar los efectos de un gen de interés (al modificar una línea celular para sobreexpresar o subexpresar un gen asociado a PD), ya que el rango de proliferación y reproducibilidad es tan alto que permite estudiar una gran cantidad de variables. Sin embargo, no se representan todas las características neuronales que se encuentran *in vivo*, por ejemplo, no reproducen la morfología y fisiología neural totalmente a diferencia de cultivos primarios y organotípicos. Un ejemplo claro de este tipo de modelos *in vitro* para estudiar la PD es la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, aunque presenta marcadores relacionados a dopamina, no tiene un fenotipo neuronal ya que tiene una naturaleza oncogénica y no se presenta en neuronas (Lopes et al., 2017).

Los cultivos primarios se derivan de biopsias de tejidos u órganos para obtener células disociadas de manera mecánica, química o enzimática; las poblaciones celulares son

heterogéneas (cerca del 5% de las células expresan TH, en el caso del mesencéfalo) y con tasas de proliferación y supervivencia bajas. Estudiar el desarrollo del mesencéfalo o la PD mediante cultivos primarios, involucra obtener NPCs mediante tejido de embriones de rata o de ratón del mesencéfalo, generalmente se aíslan NPCs con células gliales y este modelo *in vitro* es usualmente utilizado para analizar la supervivencia de NDA, retracción de neuritas y regeneración celular. Para tratar de reproducir la degeneración que ocurre en la PD pueden utilizarse neurotoxinas a bajas dosis para inducir daño celular específico en NDA. Los cultivos primarios representan el fenotipo neuronal dopaminérgico con gran precisión, los niveles de expresión de marcadores neuronales, sinápticos, TH y DAT (transportador de dopamina) son altos; sin embargo, los cultivos primarios de NDA son de origen murino principalmente y hay claras diferencias a nivel fisiológico, anatómico, conductual, transcriptómico y respuesta a fármacos respecto al humano (Gaven, et al., 2014; Lopes et al., 2017; Uysal et al., 2017).

Los cultivos organotípicos son un modelo *in vitro* cuyo principal objetivo es mantener las interacciones celulares en una estructura tridimensional de la que son derivados. Por este motivo, los cultivos organotípicos se han vuelto populares recientemente en las neurociencias ya que se pueden mantener las conexiones de diferentes regiones anatómicas, se puede evaluar la actividad eléctrica mediante ensayos de electrofisiología. Al igual que los cultivos primarios, extrapolar los datos obtenidos en este modelo al humano es complicado (Humpel, 2015; Lopes et al., 2017).

Las células troncales pluripotentes (embrionarias o pluripotentes inducidas) tienen la particularidad de autorrenovarse indefinidamente y diferenciarse en cualquier tipo celular. Para la generación de NDA *in vitro* existen varios protocolos y metodologías para diferenciar a un destino dopaminérgico, particularmente el protocolo publicado por Kriks en el 2011 es una metodología relativamente fácil de replicar y eficiente para generar el fenotipo dopaminérgico (Kriks et al., 2011). Sin embargo, los cultivos *in vitro* carecen del microambiente, organización y heterogeneidad que se encuentra *in vivo* para la maduración neuronal y no recapitula todos los factores involucrados en el desarrollo del mesencéfalo y la PD. Este modelo *in vitro* junto con los anteriores, son considerados cultivos bidimensionales (2D) y por lo tanto, carecen de una representación rigurosa de las interacciones célula-célula/ célula-matriz extracelular que se observan *in vivo* lo cual influye

en las características celulares fenotípicas, en el caso de NDA influye en el fenotipo de NDA tipo A9 que se encuentran en la SNpc y A10 de la VTA (Takahashi & Yamanaka, 2006; Vazin & Freed, 2010; Kriks et al., 2011; Lopes et al., 2017).

3.6. Cultivos tridimensionales

Recientemente se han diseñado diversas metodologías para elaborar cultivos celulares tridimensionales (3D). Generalmente los cultivos celulares 3D son sistemas donde se forman agregados celulares con diversos nutrientes, factores y morfógenos con el fin de recrear las condiciones del microambiente celular *in vivo*; esto promueve la proliferación celular, migración celular, secreción de moléculas de matriz extracelular y diferenciación celular. Existen diferentes tipos de cultivos celulares 3D como: esferoides, andamios biopoliméricos, armazones pre-fabricados, formación de andamios con bases estructurales (BBBS, Building blocks-based scaffold formation por sus siglas en inglés), hidrogeles, cuerpos embrioides (en algunos casos) body-on-a-chip y organoides (Duval et al., 2017; Liu, et al., 2018).

Los esferoides son agregados celulares esféricos a microescala, con un radio promedio de 200 μm , presentan una zona proliferativa en la capa externa y una zona quiescente y/o apoptótica en la región interna, principalmente son derivados de células cancerosas y tumores; la principal limitación de este modelo es que no tiene una estructura tan compleja como un tejido y/u órgano (Mehta, Hsiao, Ingram, Luker, & Takayama, 2012; Duval et al., 2017)

Gracias a la ingeniería de tejidos, se han fabricado andamios que tienen la capacidad de producir una matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) la cual permite la adhesión y proliferación celular. En el caso de los andamios biopoliméricos, se usan para encapsular células con componentes bioquímicos y biofísicos, su función es analizar los efectos de la ECM en la morfología celular. Los andamios pre-fabricados se elaboran usando impresoras 3D, lo cual permite personalizar la micro-arquitectura y composición de la ECM. Sin embargo, su eficiencia en la supervivencia y maduración celular es limitada. Los andamios BBBS tratan de mejorar las deficiencias de los otros tipos de andamios al permitir un control más preciso en su fabricación, mejorando la supervivencia y proliferación celular (Carletti, et al., 2011; Duval et al., 2017).

Los hidrogeles son una variante de andamio que mimetiza un contenido tisular-líquido con propiedades bioquímicas y mecánicas; sin embargo, en su composición presentan mallas nanométricas que carecen de la micro-topografía necesaria para la proliferación y morfología celular propia de un tejido *in vivo*. Se ha tratado de mitigar esta deficiencia con biopolímeros degradables (Duval et al., 2017).

Los “body-on-a-chip” o también llamados “organ-on-a-chip” son plataformas donde se cultivan algún tejido específico en espacios tridimensionales. Estas construcciones son simplificadas a manera de circuitos cerrados para representar un sistema funcional y fiel a un órgano o tejido; este sistema guía el desarrollo de grupos celulares distintos. Los body-on-chip también han sido denominados como modelos *in-vitro* 4D, debido a que permiten la construcción de un sistema dinámico con un flujo circundante de moléculas que imitan la interacción sistémica de diferentes tejidos y órganos (Liu et al., 2018; Ronaldson-Bouchard & Vunjak-Novakovic, 2018).

Finalmente, los organoides, son una conformación de múltiples tipos celulares auto-organizados que asemejan la arquitectura de un tejido o un órgano *in vivo*. Este tipo de cultivos celulares 3D son útiles para representar el desarrollo de órganos como el cerebro, incluyendo el posible uso para modelar y evaluar terapias farmacológicas o celulares de diversas enfermedades, por ejemplo, la PD (Kelava & Lancaster, 2016; Liu et al., 2018).

3.7. Organoides

Un organoide es un cultivo celular 3D que contiene múltiples tipos celulares específicos y es generado a partir de tejido primario, células troncales embrionarias, células troncales pluripotentes inducidas o progenitores celulares; es capaz de autoorganizarse y exhibir una funcionalidad semejante al órgano o tejido *in vivo* del que se deriva o genera (Lancaster & Knoblich, 2014; Clevers, 2016; Fatehullah, et al., 2016; Monzel et al., 2017). Un organoide se genera a partir de un agregado celular que se desarrolla bajo los principios básicos de la Biología del Desarrollo; es decir, mecanismos morfogenéticos intrínsecos en estos agregados celulares desencadenan una configuración específica en diferentes dominios del agregado, los cuales se reorganizan y segregan (clasificación y ordenamiento celular) y a su vez, ésta restricción espacial influye en el destino de las células troncales o progenitores celulares; resultando en una estructura con una conformación y función similar a un órgano

o tejido manteniendo las características del desarrollo *in vivo* antes mencionadas (Fig. 6) (Lancaster & Knoblich, 2014).

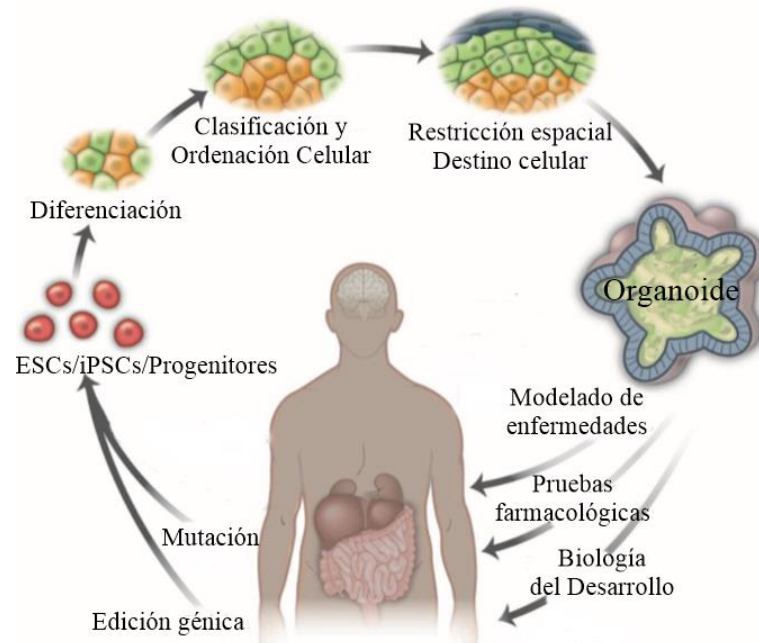


Figura 6. Generación y uso de organoides. Los organoides se derivan de células troncales pluripotentes o progenitores celulares en condiciones normales, con mutaciones o editadas genéticamente. Mediante diversos mecanismos celulares se generan estructuras similares a un órgano/tejido con el potencial de modelar enfermedades, hacer pruebas farmacológicas y estudiar la organogénesis (Modificado de Lancaster & Knoblich, 2014).

A pesar de que la historia de los cultivos celulares 3D tuvo sus cimientos en el siglo XX, en el año 2009 el laboratorio de Hans Clevers diseñó un sistema basado en células troncales derivadas de tejido primario intestinal y desarrolló un cultivo celular con una arquitectura y fisiología tipo cripta-vellosidad intestinal, dando inicio a los organoides dentro de los cultivos celulares 3D. Este organoide intestinal contenía poblaciones celulares distintas como células troncales, progenitores celulares y células diferenciadas (Sato et al., 2009; Fatehullah et al., 2016; Simian & Bissell, 2017).

Esta metodología fue usada de manera exitosa para generar cultivos celulares 3D de otros órganos como estómago, páncreas, colon, riñón, corazón, cerebro y copa óptica. La generación de organoides inicia con ESC o iPSC mediante una diferenciación específica y dirigida en donde las células se autoorganizan siguiendo una trayectoria de desarrollo específica y similar a la arquitectura 3D de un órgano *in vivo*, por lo cual el uso de organoides

y la diversidad celular que se puede generar con los mismos han sido objeto de estudio y refinamiento en años recientes (Fatehullah et al., 2016; Simian & Bissell, 2017; Liu et al., 2018) . Por ejemplo, el uso de organoides intestinales en combinación con derivados de la cresta neural permite modelar enfermedades gastrointestinales asociadas al sistema nervioso entérico, como el Síndrome de Hirschsprung que se caracteriza por una obstrucción en el intestino grueso, por fallas en el movimiento intestinal, a causa de problemas en la innervación en regiones intestinales (Workman et al., 2017). Por otro lado, los organoides mantienen un perfil transcriptómico similar al de un estado fetal, permitiendo estudiar mecanismos de diferenciación celular a lo largo de la embriogénesis. Algunos organoides pulmonares han servido para estudiar angiogénesis (Mondrinos, et al., 2014). Es posible derivar organoides de células reprogramadas a partir de pacientes, lo cual resulta interesante ya que esto permitió usar organoides gastrointestinales para analizar la interacción entre el microbioma y el tracto gastrointestinal para elucidar la influencia fisiológica que una tiene sobre la otra (Bartfeld et al., 2015; Schlaermann & Meyer, 2016). Incluso con los recientes avances en edición génica los organoides son una excelente opción, ya que han sido usados en estudios de cáncer, donde se ha visto que mediante la herramienta de edición genética con CRISPR/Cas9 se pueden introducir mutaciones seriales en organoides de colon para dar seguimiento al desarrollo del cáncer de colon (Matano et al., 2015). Es posible evaluar fenotipos que pueden ser difíciles de estudiar *in vitro*, tal es el caso de la microcefalia debida a una mutación en el gen *CDK5RAP2* y los organoides derivados de pacientes con esta afección permitió observar eventos de hipoplasia cerebral *in vitro* (Lancaster et al., 2013).

Los organoides han demostrado ser una herramienta con mucho potencial para estudiar y analizar características del desarrollo y enfermedades con mecanismos especie-específicos, también se abre la posibilidad de utilizarlos en terapia celular y trasplante de órganos y combinar este tipo de estudios con herramientas de edición génica. Debido a la gran variedad de organoides que se han ido generando, es posible evaluar estrategias de terapia celular y establecer biobancos de organoides, potenciales biomarcadores junto con el desarrollo de plataformas óptimas para pruebas toxicológicas y farmacológicas que facilitarán los análisis para terapias de algunas enfermedades (Fatehullah et al., 2016; Huch, et al., 2017).

3.8. Organoides cerebrales

Dentro de la amplia diversidad de organoides, de los que más atención han tenido son los organoides cerebrales. Durante muchos años, comprender el desarrollo y características del cerebro como su actividad neuronal, diversidad y distribución celular, expresión génica y vías de señalización ha sido complicado de poder abordar, debido a su complejidad y a la presencia de caracteres especie-específicos es difícil poder extrapolar descubrimientos y resultados de modelos animales y modelos *in vitro*. Por tal motivo, la generación de organoides cerebrales humanos, primates no humanos y murinos fue bastante innovador ya que en los últimos años han recibido gran atención dentro de diferentes áreas que buscan entender el neurodesarrollo y patologías del cerebro (Fig. 7) (Kelava & Lancaster, 2016; Trujillo & Muotri, 2018).

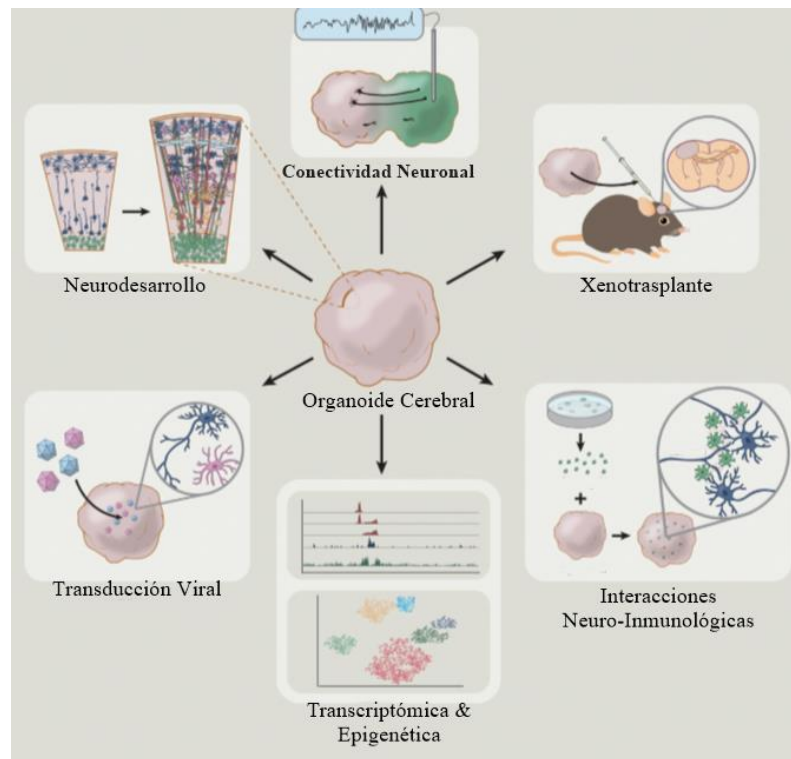


Figura 7. Aplicaciones de los organoides cerebrales. Los organoides cerebrales permiten estudiar el neurodesarrollo, conectividad sináptica, interacciones neuro-inmunológicas, epigenéticas, transcryptómicas y de transducción viral (Modificado de Amin & Pasca, 2018)

En el año 2013, se desarrolló una metodología para generar neuroectodermo a partir de cuerpos embrioides y embeberlos en matrigel (similar a la matriz extracelular) con

constante agitación, con lo que se pudo generar un pseudotejido cerebral. Estos primeros organoides cerebrales presentaban identidades neurales pertenecientes a las tres vesículas cerebrales primarias y por este motivo, fueron denominados posteriormente como “organoides cerebrales completos” u “organoides no dirigidos” (Lancaster et al., 2013; Kelava & Lancaster, 2016).

La metodología usada para generar organoides permite un amplio rango de autoorganización posibilitando que los progenitores neurales, neuronas excitadoras e inhibitoras y precursores de astrocitos y oligodendrocitos sea heterogénea. Por lo tanto, se han desarrollado metodologías más específicas donde el uso de pequeñas moléculas y factores de crecimiento permitió la formación de organoides cerebrales con identidades específicas llamados “organoides dirigidos”; disminuye la variabilidad impredecible de los organoides cerebrales completos (no dirigidos) para poder estudiar las diferentes regiones cerebrales y la organización de fenotipos celulares (Qian, et al., 2019).

Los organoides cerebrales de identidad cortical y de prosencéfalo han sido los más usados, sin embargo, la generación y estandarización de protocolos para obtener organoides de otras regiones cerebrales han empezado a explorarse. Por ejemplo, los primeros organoides de mesencéfalo surgieron en el 2016 y se derivaron de células troncales embrionarias humanas, se diferenciaron a una identidad neuronal compuesta principalmente por neuronas dopaminérgicas de tipo A9 y A10 que son características, presentaban funcionalidad electrofisiológica, el perfil transcriptómico se asemejaba al de un estado fetal (algo particular en los organoides) y además de la producción de dopamina el organoide de mesencéfalo presentaba neuromelanina, la cual es un pigmento café que se acumula en la SNpc y es una característica específica en los primates humanos y no humanos. Sin embargo, su función aún no está muy bien comprendida al igual que su relación con la PD. Posteriormente en el 2017 se generaron organoides de mesencéfalo derivados de células neuroepiteliales. Al igual que los producidos en 2016 presentaban poblaciones celulares heterogéneas y respuesta electrofisiológica. (Jo et al., 2016; Monzel et al., 2017).

La importancia de estandarizar metodologías y caracterizar organoides cerebrales, radica en su potencial para modelar eventos específicos relacionados al neurodesarrollo, a la evolución comparada entre especies, a la conectividad sináptica, enfermedades neurodegenerativas y trastornos mentales. La relación de agentes multifuncionales en

diversos mecanismos moleculares y de manera general, comprender la compleja naturaleza del cerebro.

4 Planteamiento del problema

Debido a la dificultad para establecer un modelo *in vitro* que represente la heterogeneidad celular y estructura tridimensional del mesencéfalo ventral humano, los organoides son una opción bastante asequible para esto.

Sin embargo, la metodología, la caracterización y la eficiencia para la generación de organoides de mesencéfalo no están bien establecidas. Por lo tanto, es importante reproducir un protocolo de organoides mesencefálicos que permitan desarrollar un modelo *in vitro* y compararlo con cultivos bidimensionales.

4.1 Pregunta de investigación

¿Los cultivos tridimensionales (3D) de organoides mesencefálicos recapitulan de mejor manera la expresión de marcadores específicos de linaje dopaminérgico del mesencéfalo, en comparación con los cultivos celulares bidimensionales (2D)?

4.2. Hipótesis

Los cultivos celulares tridimensionales (3D) representarán una organización celular y expresión de marcadores similar a la del mesencéfalo ventral durante el desarrollo embrionario *in vivo* mientras que los cultivos bidimensionales (2D) no lo harán.

4.3. Objetivo general

Estandarizar una metodología para la elaboración de organoides de mesencéfalo (MO) a partir de una línea celular troncal embrionaria humana (hESC).

4.4. Objetivos particulares

1) Caracterizar cultivos celulares adherentes 2D durante el proceso de diferenciación dopaminérgica.

2) Caracterizar cultivos celulares 3D (organoides) de mesencéfalo ventral.

3) Comparar las poblaciones celulares obtenidas con ambos métodos.

4.5 Estrategia experimental

Generación de cultivos celulares bidimensionales (2D) derivados de células troncales embrionarias humanas.

Se utilizó la línea celular H1 de células troncales embrionarias humanas (hESC) generada por James Thomson (Thomson J. A. 1998) para iniciar el protocolo de diferenciación dopaminérgica (Carballo O., et al., 2016) y obtener cultivos adherentes en monocapa de neuronas dopaminérgicas. Posteriormente, se caracterizó mediante inmunotinciones su identidad celular.

Generación de organoides cerebrales derivados de células troncales embrionarias humanas.

Se generaron los organoides de mesencéfalo ventral siguiendo el protocolo elaborado por Thomas Durcan y Nguyen Vi Mohamed, 2019. En este protocolo, se sigue un tratamiento progresivo con diversos medios suplementados con moléculas de inducción neuronal y diferenciación: 1) medio de inducción neuronal (MIN), 2) medio modelador de mesencéfalo (MPM), 3) medio de inducción de crecimiento tisular (TGIM) y 4) medio de diferenciación final (FDM); para direccionar al organoide a una identidad de tipo mesencéfalo ventral. La identidad celular se caracterizó mediante inmunotinciones y se comparó con los cultivos 2D de neuronas dopaminérgicas adherentes.

5 Metodología

5.1 Cultivo Celular bidimensional

Se utilizó la línea celular troncal embrionaria de humano H1, para la expansión, diferenciación dopaminérgica y generación de organoides de mesencéfalo. Para la expansión celular se mantuvieron las células H1 en cajas de 6 pozos Corning™ Costar™ previamente tratadas con matrigel reducido en factores de crecimiento durante 24 horas. Se usó el medio de cultivo de células feeder-free mTeSR™1 hasta tener una confluencia de ~ 75% para iniciar la diferenciación de NDA o la generación de organoides de mesencéfalo.

Para la diferenciación dopaminérgica se utilizó el protocolo elaborado por Kriks *et al.* en 2011, basado en el uso de moléculas pequeñas neurogénicas en diferentes días que inician una señalización celular que compromete las células embrionarias pluripotentes a un destino neuronal y dopaminérgico (Fig. 8).

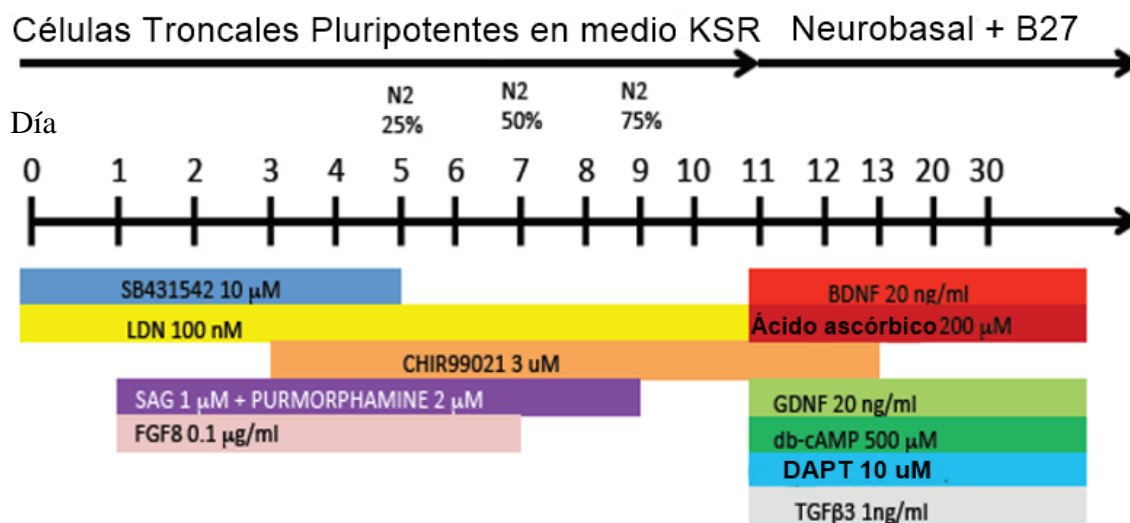


Figura 8. Protocolo de diferenciación de células troncales pluripotentes a neuronas dopaminérgicas (modificado de Kriks *et al* 2011)

5.2. Inmunofluorescencia en cultivos bidimensionales

Las hESC se mantuvieron en medio mTeSR™1, desde el día 0 y durante 2 o 3 días, posteriormente se les retiró el medio y se lavaron con PBS, finalmente se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 8 minutos a temperatura ambiente y se les dio un último lavado con PBS.

Los precursores neurales fueron resembrados en el día 9 sobre placas de 4 pozos tratados previamente con Poli-L-Ornitina durante 24 horas, fibronectina (1µg/mL) y laminina (5µg/mL) por otras 24 horas, posteriormente se fijó en los días 14, 31 y 63 con PFA al 4%.

Para la inmunotinción en los días 0, 14, 31 y 63 se permeabilizaron y bloquearon las células con una solución de PBS, tritón X-100 al 0.3% y suero normal de cabra al 10% durante una hora. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en una solución de PBS con suero normal de cabra al 10% durante toda la noche a 4°C usando las diluciones mostradas en la tabla 1.

Posteriormente, se retiraron los anticuerpos primarios y se dieron 3 lavados de 5 minutos con PBS y albúmina de suero bovino (BSA) al 0.1%. Se incubaron con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 568 en diluciones 1:1000 durante 2 horas a temperatura ambiente diluidos en PBS con BSA al 0.1%. Se dieron otros 3 lavados de PBS con BSA al 0.1% y se incubó con Hoechst en una dilución 1:100 con PBS durante 8 minutos y finalmente se le dio un lavado con PBS.

Anticuerpos primarios			
Células troncales embrionarias humanas línea H1 (Día 0)			
Anticuerpo	Especie	Marca	Dilución
NANOG	Conejo	PeptoTech (500-P236)	1:1000
OCT4	Ratón	B&D (611202)	1:500
SOX2	Conejo	Abcam (ab97959)	1:1000
SSEA4	Ratón	Abcam (ab16287)	1:500
Precusores dopaminérgicos (Día 14)			
Anticuerpo	Especie	Marca	Dilución
KI67	Ratón	Novocastra	1:500
Caspasa 3 Activa	Conejo	Cell Signaling Technology (D175)	1:400
MAP2	Ratón	Sigma (M4403)	1:500
LMX1a	Conejo	Abcam (ab31006)	1:500
Beta-tubulina III	Ratón	Covance (MMS-435P-100)	1:1000
Tirosina Hidroxilasa	Conejo	Pel-freez (401-01-0)	1:1000
FOXA2	Conejo	Millipore (07-633)	1:500
Nestina	Ratón	Millipore (MAB5326)	1:300
Neuronas dopaminérgicas (Día 31)			
Anticuerpo	Especie	Marca	Dilución
Calbindinina	Ratón	Sigma	1:2000
GIRK2	Conejo	Millipore (AB5200)	1:1000
MAP2	Ratón	Sigma (M4403)	1:500
PITX3	Conejo	Invitrogen 382850	1:500

Beta-tubulina III	Ratón	Covance (MMS-435P-100)	1:1000
Tirosina Hidroxilasa	Conejo	Pel-freez (401-01-0)	1:1000
Neuronas dopaminérgicas (D63)			
Anticuerpo	Especie	Marca	Dilución
Beta-tubulina III	Ratón	Covance (MMS-435P-100)	1:1000
Tirosina Hidroxilasa	Conejo	Pel-freez (401-01-0)	1:1000
Calbindinina	Ratón	Sigma	1:2000
GIRK2	Conejo	Millipore (AB5200)	1:1000
KI67	Ratón	Novocastra	1:500
Caspasa 3 Activa	Conejo	Cell Signaling Technology (D175)	1:400
GFAP	Conejo	Dako (140210)	1:1000
O4	Ratón	Millipore (MAB345)	1:25
Sinaptofisina	Ratón	Millipore (MAB5258)	1:500
Otx2	Conejo	Invitrogen (701948)	1:250

5.3. Cultivos celulares tridimensionales

Para la generación de organoides de mesencéfalo se utilizó un protocolo basado en el uso de moléculas pequeñas neurogénicas que especifican a mesencéfalo ventral (Mohamed et al., 2019). Durante diferentes días se induce en ESC una señalización que: 1) compromete las células a un destino neuroectodérmico, 2) dirige las células a linaje dopaminérgico, 3) promueve el crecimiento del cultivo celular 3D y 4) mantiene la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y otras poblaciones celulares. A partir del día 8 se mantienen en un agitador orbital a 70 rpm (Fig. 9).

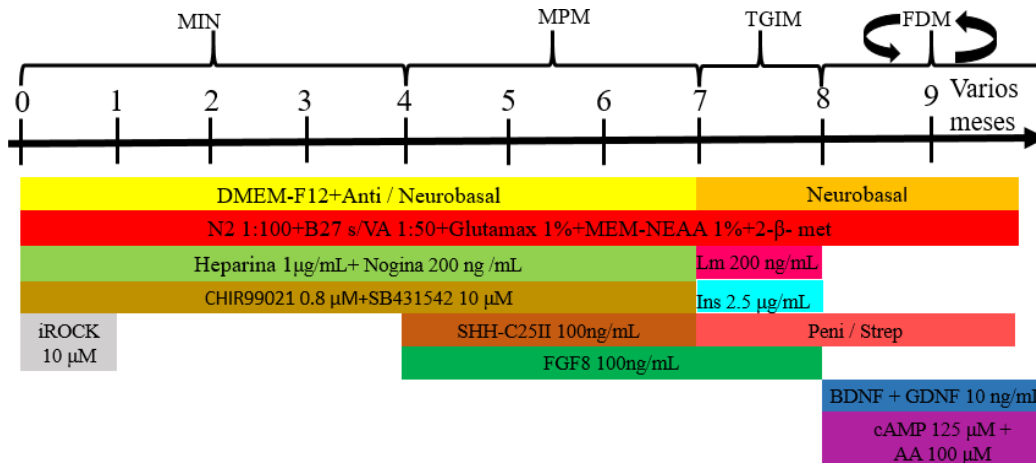


Figura 9. Protocolo de generación de organoide de mesencéfalo. El medio MIN induce el compromiso neuroectodérmico, el medio MPM guía las células a un linaje dopaminérgico, el medio TGIM suministra factores de crecimiento y el medio FDM permite la maduración del organoide de mesencéfalo en agitación constante (modificado de Mohammed *et al* 2019)

5.4. Inmunofluorescencia en cultivos 3D

En los días 14, 31 y 63 los organoides de mesencéfalo se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente y se les dio un lavado con PBS.

Posteriormente los organoides se trataron con una solución de sacarosa al 30% por toda la noche, al día siguiente se rebanaron en el criostato para hacer cortes de 20 µm de grosor.

Las rebandas de los organoides se coloraron en portaobjetos con TissueTek y los cubreobjetos se fijaron con polymount después de finalizar las inmunotinciones.

Para la inmunotinción, las células se permeabilizaron y bloquearon con una solución de PBS, tritón X-100 al 0.3% y suero normal de cabra al 10% durante una hora. Los anticuerpos primarios se diluyeron en una solución de PBS con suero normal de cabra al 10% durante toda la noche a 4°C con las diluciones marcadas en la tabla 2.

Después se retiraron los anticuerpos primarios y se dieron 3 lavados de 5 minutos con PBS y albúmina de suero bovino (BSA) al 0.1%. Las rebandas de hMO se incubaron con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 568 durante 2 horas a temperatura ambiente diluidos en PBS con BSA al 0.1%. Se dieron otros 3 lavados de PBS con BSA al 0.1% y se incubó con Hoechst en una dilución 1:100 con PBS durante 8 minutos y finalmente se le dio un lavado con PBS.

Organoide de mesencéfalo humano (Día 14)			
Anticuerpo	Especie	Marca	Dilución
KI67	Ratón	Novocastra	1:500
MSX1	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:100
SOX2	Conejo	Abcam (ab97959)	1:100
Vimentina	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:100
LMX1a	Conejo	Abcam (ab31006)	1:500
FOXA2	Conejo	Millipore (07-633)	1:500
OTX2	Conejo	Invitrogen (701948)	1:250
NeuN	Ratón	Millipore (MAB 377)	1:1000
Organoide de mesencéfalo humano (Día 31)			
Anticuerpo	Especie	Marca	Dilución
KI67	Ratón	Novocastra	1:500
Caspasa 3 Activa	Conejo	Cell Signaling Technology (D175)	1:400
MAP2	Ratón	Sigma (M4403)	1:500
Calbindinina	Ratón	Sigma	1:2000
FOXA2	Conejo	Millipore (07-633)	1:500
Nestina	Ratón	Millipore (MAB5326)	1:300
Beta-tubulina III	Ratón	Covance (MMS-435P-100)	1:1000
Tirosina Hidroxilasa	Conejo	Pel-freez (401-01-0)	1:1000
PITX3	Conejo	Invitrogen 382850	1:500
Sinaptofisina	Ratón	Millipore (MAB5258)	1:500
GIRK2	Conejo	Millipore (AB5200)	1:1000
Organoide de mesencéfalo humano (Día 63)			
Anticuerpo	Especie	Marca	Dilución
Calbindinina	Ratón	Sigma	1:2000

Girk2	Conejo	Millipore (AB5200)	1:1000
GFAP	Conejo	Dako (140210)	1:1000
O4	Ratón	Millipore (MAB345)	1:25
Beta-tubulina III	Ratón	Covance (MMS-435P-100)	1:1000
Tirosina Hidroxilasa	Conejo	Pel-freez (401-01-0)	1:1000

La caracterización se realizó mediante inmunotinciones en diferentes días para ambos cultivos celulares (Figura 10).

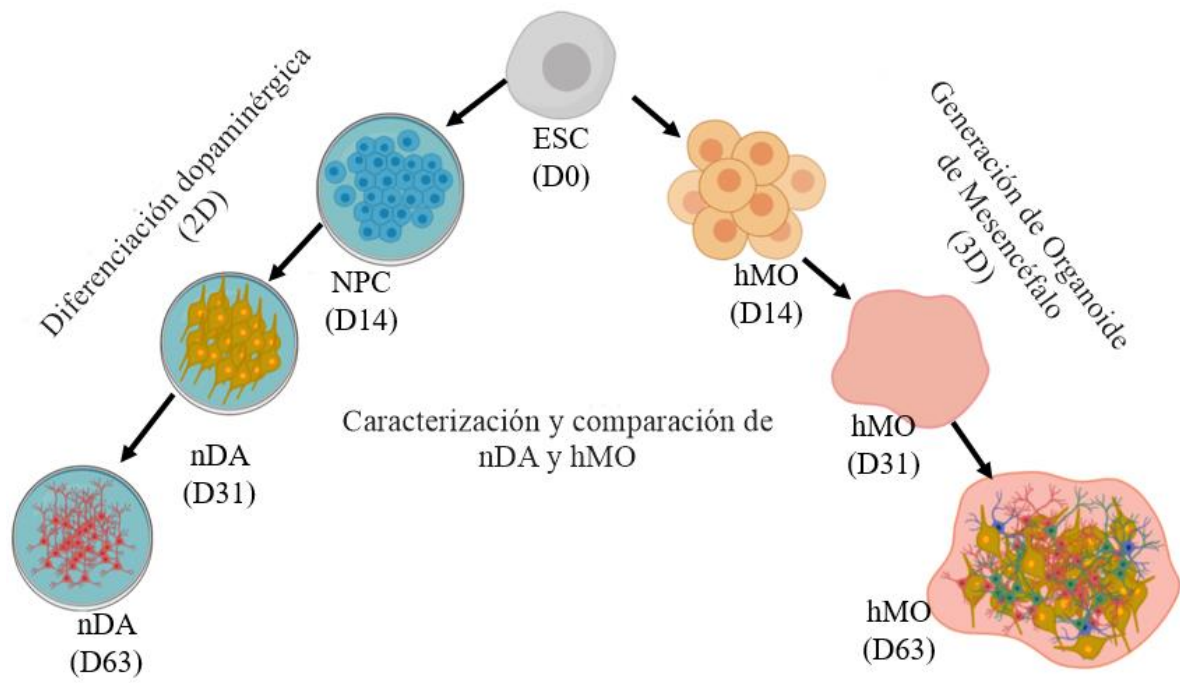


Figura 10. Estrategia experimental para la generación de cultivos celulares 2D y 3D. En los días 14, 31 y 63 se evaluaron diferentes marcadores de linaje dopaminérgico en cultivos adherentes 2D y cultivos de organoides de mesencéfalo 3D

6 Resultados

6.1. Caracterización de células troncales embrionarias humanas

La línea celular embrionaria humana H1 se expandió y caracterizó para llevar a cabo tanto la diferenciación dopaminérgica en cultivos adherentes 2D como la generación de organoides de mesencéfalo 3D.

Para comprobar la expresión de proteínas asociadas a pluripotencia en la línea celular H1, se realizaron inmunotinciones para 3 factores transcripcionales esenciales en el mantenimiento de la pluripotencia: NANOG, OCT4 y SOX2. También el antígeno glucolipídico de superficie etapa-específico SSEA4 (por sus siglas en inglés; Stage-Specific Embryonic Antigen 4). Las colonias de ESCs no diferenciadas suelen crecer como colonias compactas y presentan una mayor relación núcleo/citoplasma. En nuestros cultivos en expansión observamos colonias con morfología característica de células pluripotentes, las cuales fueron positivas para los 4 marcadores de pluripotencia mediante inmunotinciones (Figura 11). Observamos colonias pequeñas y de gran tamaño, pero manteniendo la morfología pluripotente característica antes descrita.

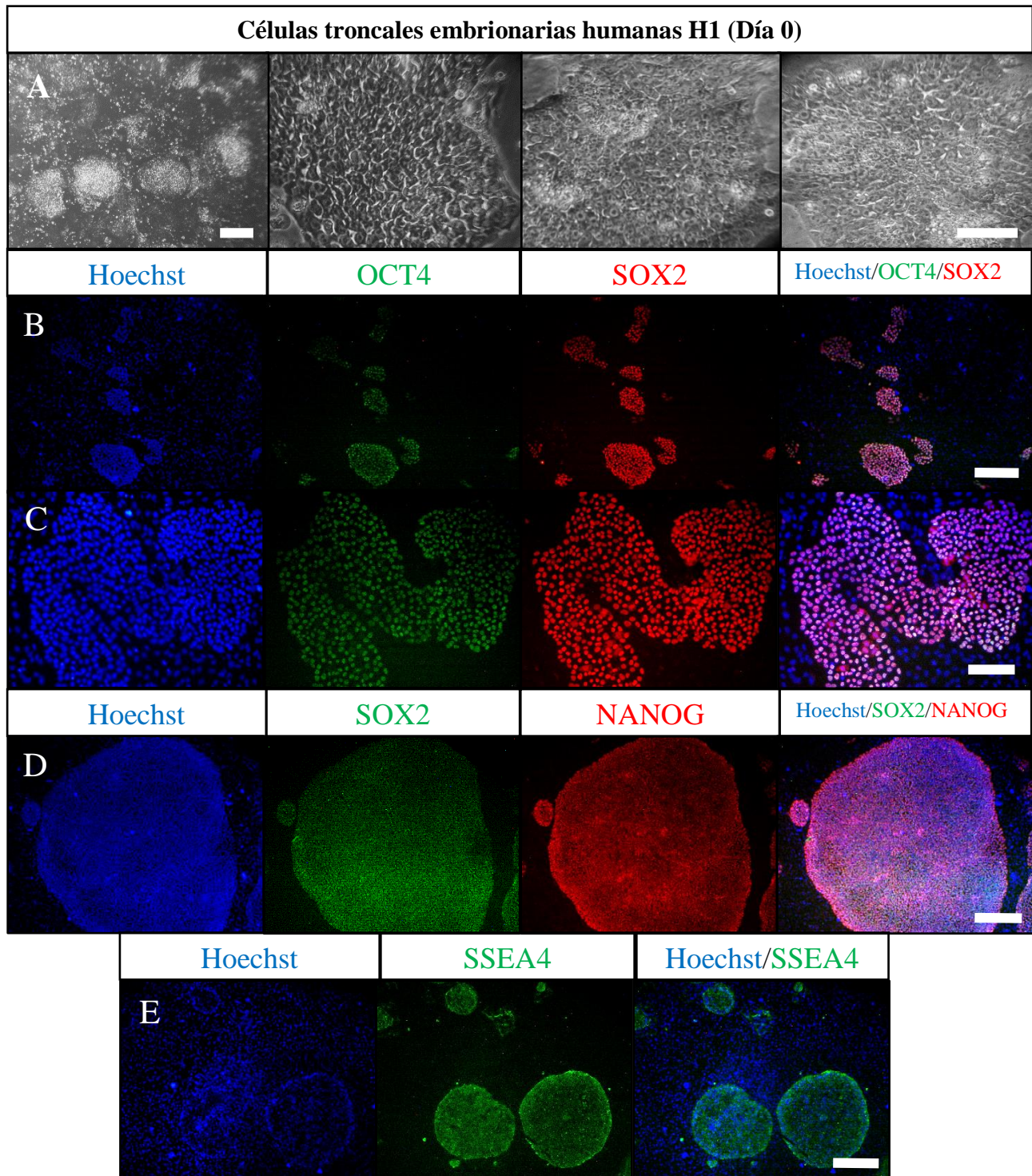


Figura 11. Estado de pluripotencia en células troncales embrionarias humanas (hESC). **A)** Imágenes de contraste de fases de colonias pluripotentes de hESC (izquierda) durante la expansión y aumento para observar la morfología de hESC (derecha) en el día 0. Escalas 500 μm y 100 μm . **B)** Inmunotinción para los marcadores de pluripotencia OCT4 (verde) y SOX2 (rojo) en diferentes colonias de hESC. Escala 500 μm . **C)** Las colonias de hESC con morfología irregular también expresan marcadores de pluripotencia como Oct4 y Sox2. Escala 200 μm . **D)** Colonias de hESC de gran tamaño expresan los marcadores de pluripotencia como SOX2 (verde) y NANOG (rojo). Escala 500 μm . **E)** Las colonias de hESC expresan el marcador de pluripotencia de membrana celular SSEA4 (verde). Escala 500 μm

6.2. Diferenciación dopaminérgica

6.2.1. Caracterización día 14

Para la generación de NDA se siguió el protocolo de Kriks (Kriks, et al. 2011). La primera etapa de este protocolo consiste en guiar a las células troncales pluripotentes a un destino neuroectodérmico, un compromiso neuronal y finalmente diferenciación a neurona dopaminérgica. Mediante el uso de moléculas como SB431542, LDN, CHIR99021, SAG, purmorfamina, FGF8, BDNF, GDNF, ácido ascórbico, cAMP, DAPT y TGFβ-3, por lo que se espera que desde el día 11 sean precursores neurales.

Los precursores dopaminérgicos al día 14 mostraron una morfología con núcleo reducido que es característico de precursor neural (Figura 12A)

Se realizaron inmunotinciones en el día 14 para marcadores de precursores neurales y neuronas dopaminérgicas como la proteína de filamento intermedio Nestina, el factor transcripcional de especificación dopaminérgica FOXA2, la proteína neuronal asociada a microtúbulos MAP2, el factor transcripcional de linaje dopaminérgico LMX1A, la proteína de microtúbulo neuronal Beta-tubulina III (TUJ1) y la enzima tirosina hidroxilasa (TH) que cataliza la síntesis del precursor de la dopamina (Figura 12). También se realizaron inmunotinciones para el marcador de proliferación celular Ki67 y el marcador apoptótico Caspasa-3 activa para poder observar el estado de proliferación y supervivencia celular del cultivo 2D.

Las inmunotinciones fueron positivas para FOXA2 y la marca de Nestina (Figura 12B), también se observaron células positivas para LMX1A y negativas para MAP2 (Figura 12C). Esto nos indicó que en este día de diferenciación hay células FOXA2+ y LMX1A+, marcas características de precursores neurales dopaminérgicos.

También había presencia de células TUJ1+/TH- (Figura 12D) y células Ki67-/Caspasa-3 activa+ (Figura 12E) destacando la pérdida en la tasa de proliferación en precursores neurales durante la diferenciación dopaminérgica.

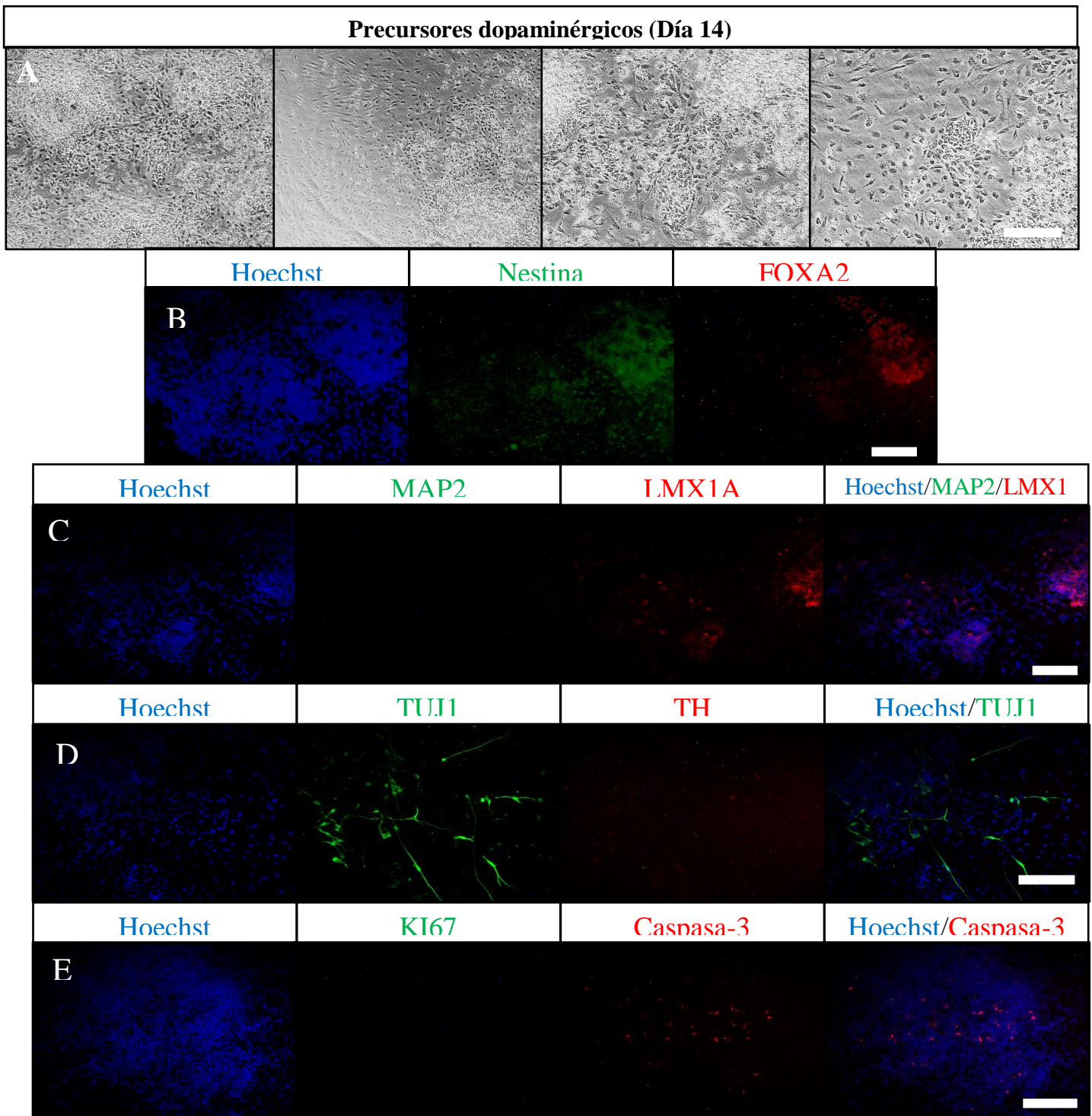


Figura 12. Caracterización de precursores neurales en diferenciación dopaminérgica al día 14. **A)** Imágenes de contraste de fases de precursores dopaminérgicos al día 14. Escala 200 μ m. **B)** Los precursores dopaminérgicos expresan Nestina (verde) y positivos para FOXA2 (rojos). Escala 200 μ m. **C)** Los precursores dopaminérgicos expresan Lmx1A (rojo), pero son negativos para Map2 (verde). Escala 200 μ m. **D)** TUJ1 (verde) está en algunos precursores neurales y no hay expresión de TH (rojo). Escala 200 μ m. **E)** Precursores neurales expresan Caspasa-3 Activa (rojo) y negativo para el marcador de proliferación celular KI67 (verde). Escala 200 μ m

6.2.2. Caracterización día 31

Para el día 31 de diferenciación dopaminérgica esperábamos neuronas dopaminérgicas inmaduras, ya que el cultivo se mantiene con moléculas de maduración neuronal y linaje dopaminérgico como GDNF, BDNF, ácido ascórbico, cAMP, DAPT y TGF β -3 desde el día 11 de diferenciación. Por lo tanto, se hicieron inmunotinciones para marcadores específicos de linaje dopaminérgico y neuronas dopaminérgicas como la proteína de transporte de calcio intracelular calbindina (Calb) para neuronas dopaminérgicas tipo A10 que se encuentran en el área ventral tegmental, el canal 2 de potasio interno regulado por proteína G (Girk 2; por sus siglas en inglés) para neuronas dopaminérgicas tipo A9 que de la SNpc y los factores de transcripción de linaje dopaminérgico PITX3, MAP2, TUJ1 y TH (Figura 13).

Observamos células Calb-/Girk2+ que indican neuronas dopaminérgicas tipo A9, este tipo celular se ha reportado en este protocolo de diferenciación. Hay presencia de células MAP2+/PITX3+ y células TUJ1+/TH- que son características de linaje neuronal dopaminérgico.

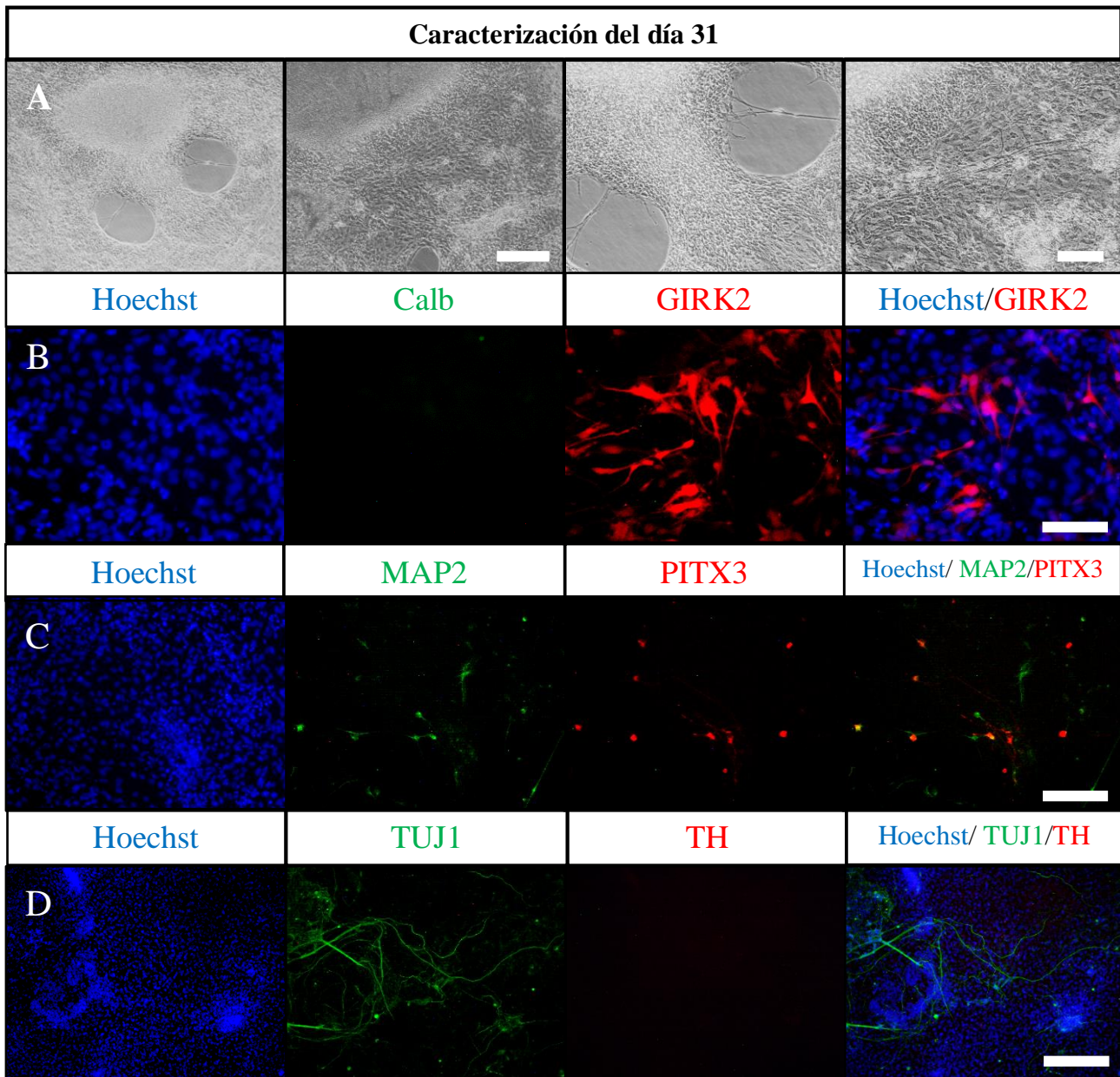


Figura 13. Caracterización del día 31. **A)** Imágenes de contraste de fases de neuronas dopaminérgicas muestran una morfología neural con algunas neuritas y proyecciones; escala 500 µm (izquierda) y 200 µm (derecha). **B)** GIRK2 es positivo y son negativas para Calbindina; escala 100 µm. **C)** Las neuronas dopaminérgicas presentan en baja proporción la marca para MAP2 y PITX3; escala 200 µm. **D)** TUJ1 es expresado por neuronas dopaminérgicas y son negativas para TH; escala 500 µm.

6.2.3. Caracterización del día 63

En los cultivos de este tiempo se observó una morfología neural y extensas proyecciones axonales, característico de neuronas maduras.

Se hicieron inmunotinciones con marcadores para neuronas dopaminérgicas, glía y actividad sináptica. Se usaron los marcadores para los dos tipos de neurona dopaminérgica: calbindina (A10) y GIRK2 (A9), los marcadores de glia O4 (oligodendrocitos) y GFAP (astrocitos), el marcador presináptico Sinaptofisina y el factor transcripcional OTX2. También se evaluaron los marcadores dopaminérgicos TUJ1 y TH; y los marcadores de proliferación celular y apoptosis KI67 y Caspasa-3 activada (Figura 14). TUJ1 es expresado considerablemente por neuronas dopaminérgicas y puede formar agregados axonales bastante gruesos, TH colocaliza con algunas neuronas TUJ1 positiva. Encontramos células negativas para Calbindina y positivas para GIRK2, también observamos células negativas para O4 y positivas para GFAP y células positivas para Sinaptofisina

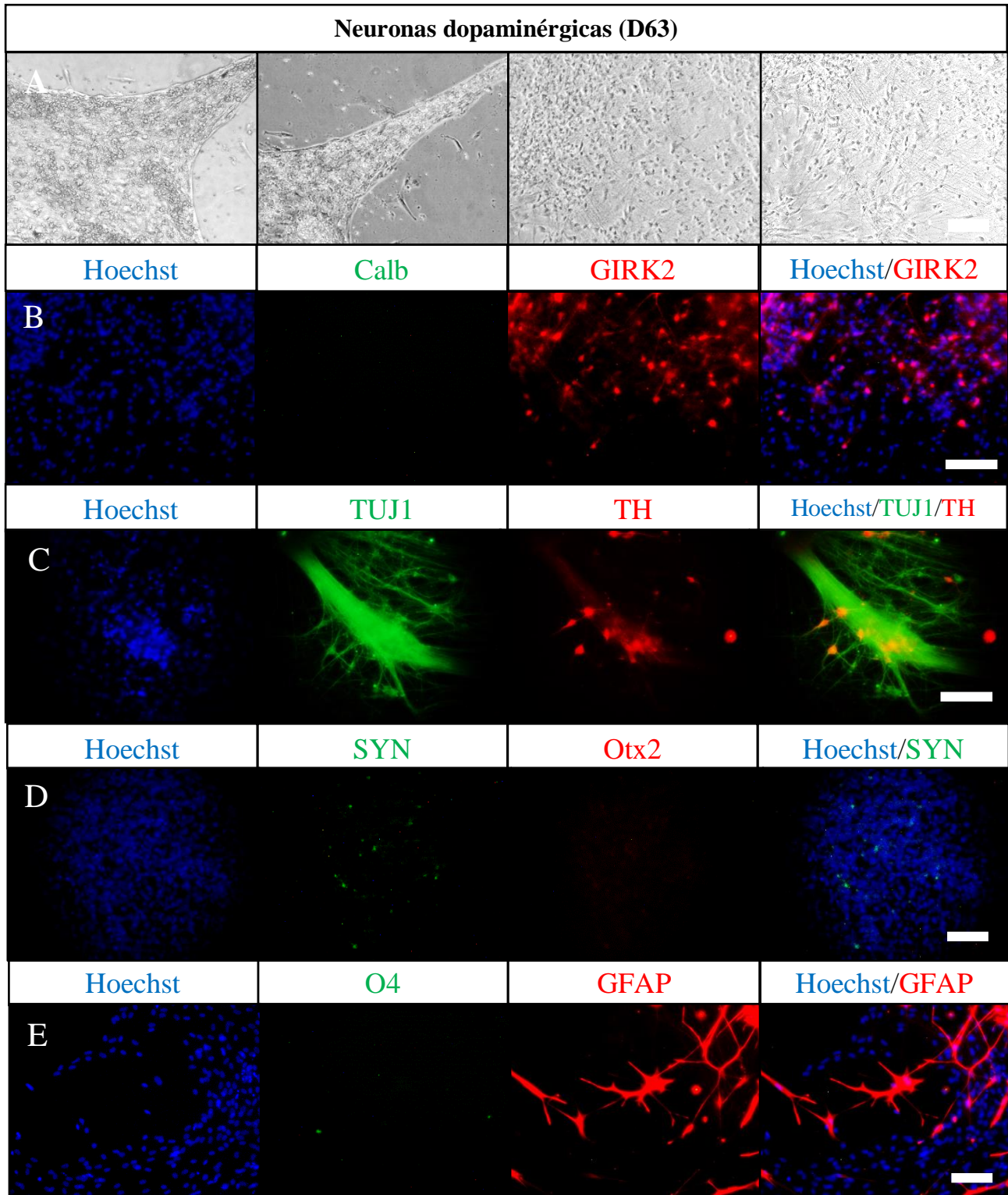


Figura 14. Caracterización celular del día 63. A) Imágenes de contraste de fases de neuronas dopaminérgicas maduras. Escala 200 μ m. B) Las neuronas dopaminérgicas expresan Girk2 (rojo) en gran proporción y son negativas para calbindina (verde). Escala 200 μ m. C) TUJ1 (verde) es expresado por neuronas dopaminérgicas, TH (rojo). Escala 200 μ m. D) El marcador presináptico sinaptofisina (verde) se expresa y el marcador OTX2 (rojo) es negativo. Escala 200 μ m. E) El marcador glial de linaje de astrocito GFAP (rojo) está en algunas células, sin embargo, el marcador de linaje de oligodendrocito O4 (verde) es negativo. Escala 200 μ m.

6.3. Generación de organoides de mesencéfalo humano

Se generaron los organoides de mesencéfalo humano (hMO) a partir de la expansión de la línea celular H1 como se describió en la sección 6.1. Debido a que éste es un protocolo que se implementó por primera vez en el laboratorio, comenzamos analizando características esenciales de un organoide como bordes translúcidos, brotes de neuroectodermo y crecimiento como indicador de su viabilidad, potencial de diferenciación y maduración. En el día 0, las hESC formaron un agregado celular al centro después de centrifugarlas en placas de 96 pozos de ultrabaja adherencia y fondo en forma de U, se mantuvieron en medio de inducción neural (MIN), que contiene noggina y SB431542 para guiar un compromiso neuroectodérmico, activándose la vía de WNT con CHIR99021, heparina y beta-mercaptoetanol. Al día 1 el agregado celular asemejó un cuerpo embrioide; posteriormente, en el día 4 cuando se puso el medio modelador de mesencéfalo (MPM) que tiene principalmente SHH y FGF8 recombinantes para guiar a las células a un destino de mesencéfalo, el hMO aumentó de tamaño y los bordes se volvieron translúcidos, indicando una formación adecuada. Posteriormente en el día 7 se retira el MPM y se adicionó el medio inductor de crecimiento tisular (TGIM) al que se le agrega insulina y laminina para promover el crecimiento durante un día. En esta etapa, el hMO es translúcido y puede presentar o no algunos brotes de neuroectodermo. Finalmente, en el día 8 se retira el medio TGIM y se transfiere el organoide a placas de cultivo de 6 pozos con el medio final de diferenciación (FDM) que utiliza BDNF y GDNF para favorecer la supervivencia neural y la diferenciación/maduración dopaminérgica. Los organoides se transfirieron a una densidad de cinco hMO por pozo, en este día fueron notables la presencia de brotes de neuroectodermo. Posteriormente, se dio un seguimiento al desarrollo del hMO hasta el día 63. Ya que corroboramos la eficiencia en la generación de hMO, escogimos los días 14, 31 y 63 para hacer la caracterización con inmunotinciones y compararlos con los mismos días elegidos para los cultivos 2D (Figura 15).

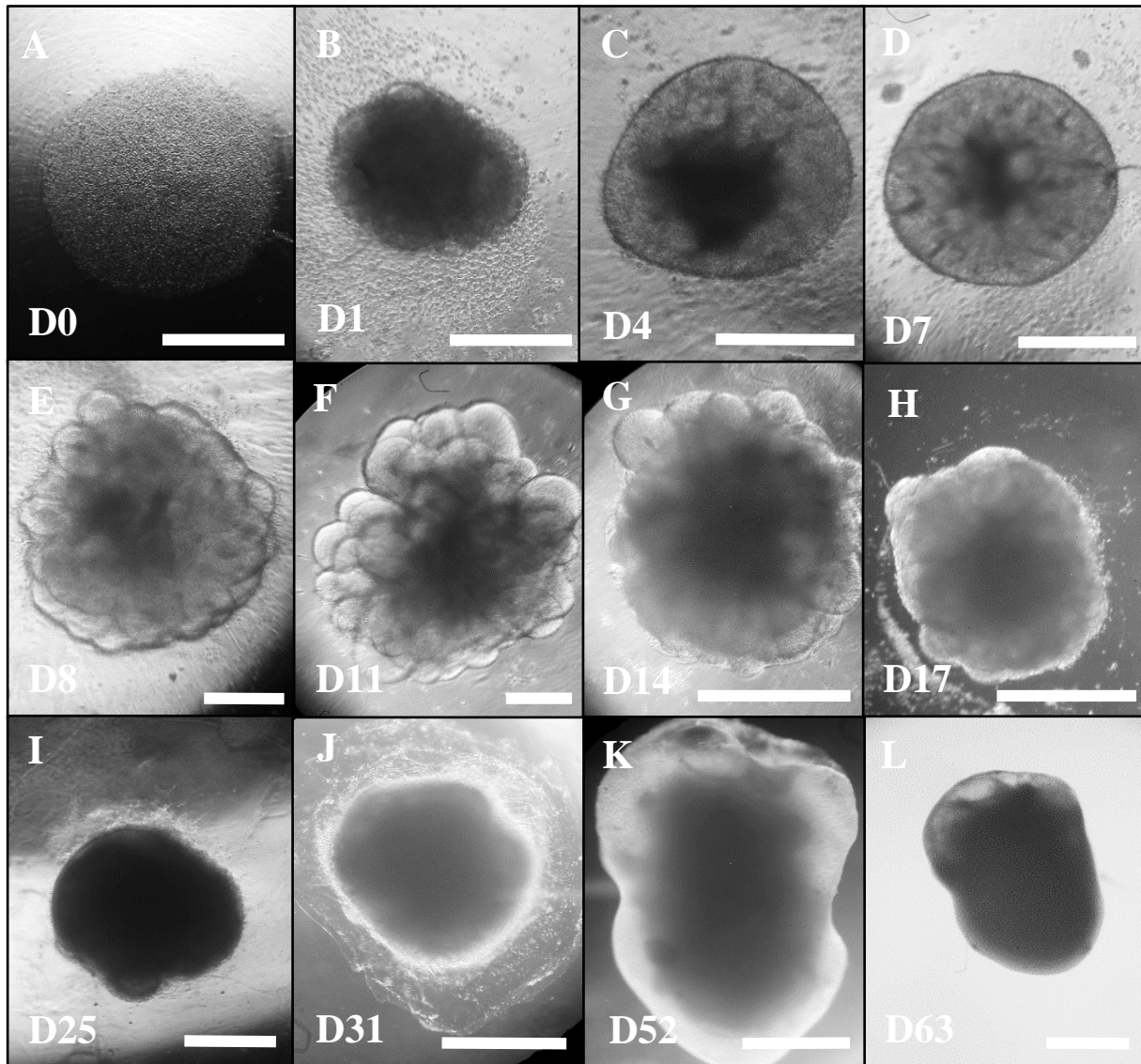


Figura 15. Generación de organoide de mesencéfalo humano. A) Día 0 del hMO, se forma un agregado celular al centro; escala 50 μm . B) Día 1 del hMO, se forma un cuerpo embrioides; escala 50 μm . C) Día 4 del hMO, los bordes se vuelven translúcidos y empieza a crecer de tamaño; escala 100 μm . D) Día 7 del hMO, se embebe en matrigel y se vuelve translúcido el centro y en algunos casos había brotes de neuroectodermo visibles; escala 100 μm . E) Día 8 del hMO, se transfiere el organoide a un agitador orbital y son más notables los brotes de neuroectodermo; escala 100 μm . F) Día 11 del hMO, los brotes de neuroectodermo crecen y aparecen en toda la superficie del organoide; escala 100 μm G) Día 14 del hMO, los brotes de neuroectodermo van disminuyendo tu tamaño y se vuelve opaco el centro del organoide; escala 500 μm H) Día 17 del hMO, los brotes de neuroectodermo disminuyen por completo; escala 500 μm I) Día 25 del hMO, los organoides empiezan a presentar proyecciones neurales en los bordes al utilizar el matrigel como sustrato; escala 500 μm J) Día 31 del hMO, las proyecciones neurales están más distribuidas sobre el matrigel; escala 500 μm K) Día 52 del hMO, los organoides pierden el matrigel y las proyecciones neurales, sin matrigel los organoides crecen más rápido; escala 1 mm L) Día 63 del hMO, el organoide alcanza su máximo tamaño; escala 1 mm

6.3.1. Caracterización al día 14

Al igual que los cultivos 2D, se realizaron tinciones de H&E (hematoxilina y eosina) para observar la morfología de los hMO al día 14. Observamos la presencia de rosetas neurales en todo el organoide, aunque en la periferia presentaban una forma más definida. Posteriormente, se hicieron inmunotinciones con marcadores para precursores neurales y neuronas dopaminérgicas como SOX2, LMX1A, Vimentina (VIM), FOXA2, TUJ1 y TH. También se realizaron tinciones para el marcador de proliferación celular KI67 y el marcador de apoptosis Caspasa-3 activa (Figura 16). El organoide presenta poblaciones celulares positivas para todos los marcadores utilizados, mostrando su identidad neuronal y especificación dopaminérgica.

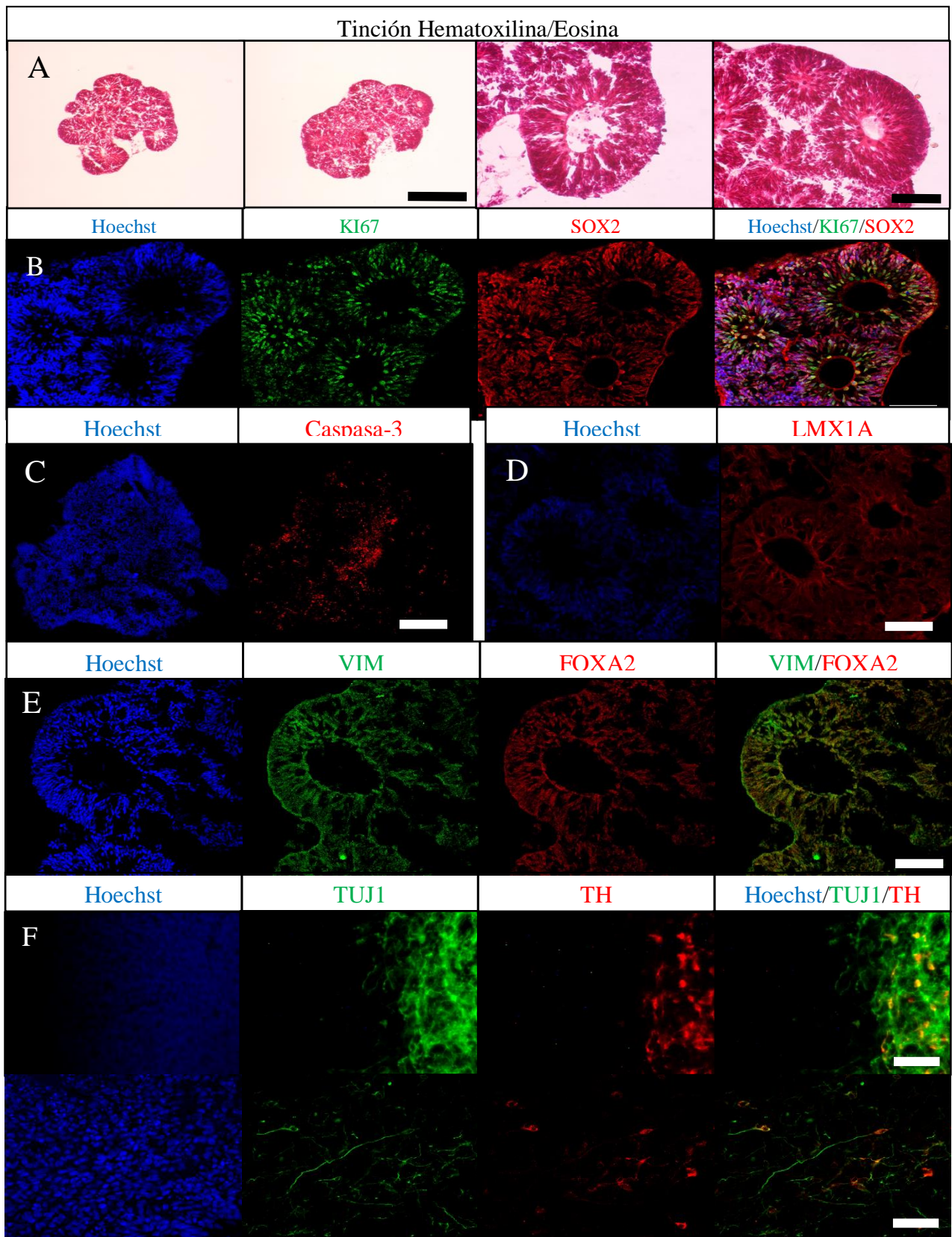


Figura 16. Caracterización del organoide de mesencéfalo humano día 14. **A)** Tinción de H&E de hMO en el día 14 muestran estructuras parecidas a rosetas neurales en los bordes. Escala 500 μm (izquierda) y 100 μm (derecha). **B)** hMO expresa Ki67 (verde), principalmente en la región luminal y también expresan el marcador neural Sox2 (rojo). Escala 100 μm . **C)** hMO expresa caspasa-3 activa (rojo) principalmente en el centro del organoide y rodeando las rosetas neurales. Escala 100 μm . **D)** hMO expresa Lmx1A (rojo). Escala 100 μm . **E)** hMO expresa vimentina (verde) y FoxA2 (rojo). Escala 100 μm . **F)** hMO expresa TUJ1 y TH en los bordes. Escala 200 μm

6.3.2. Caracterización al día31

Se hicieron inmunotinciones en los hMO al día 31 para marcadores de linaje de precursores neurales como nestina y linaje neuronal como MAP2. Nestina se observó en las rosetas neurales células. También evaluamos PITX3 y FOXA2 para linaje dopaminérgico; y TUJ1 y TH para neuronas dopaminérgicas (Figura 17).

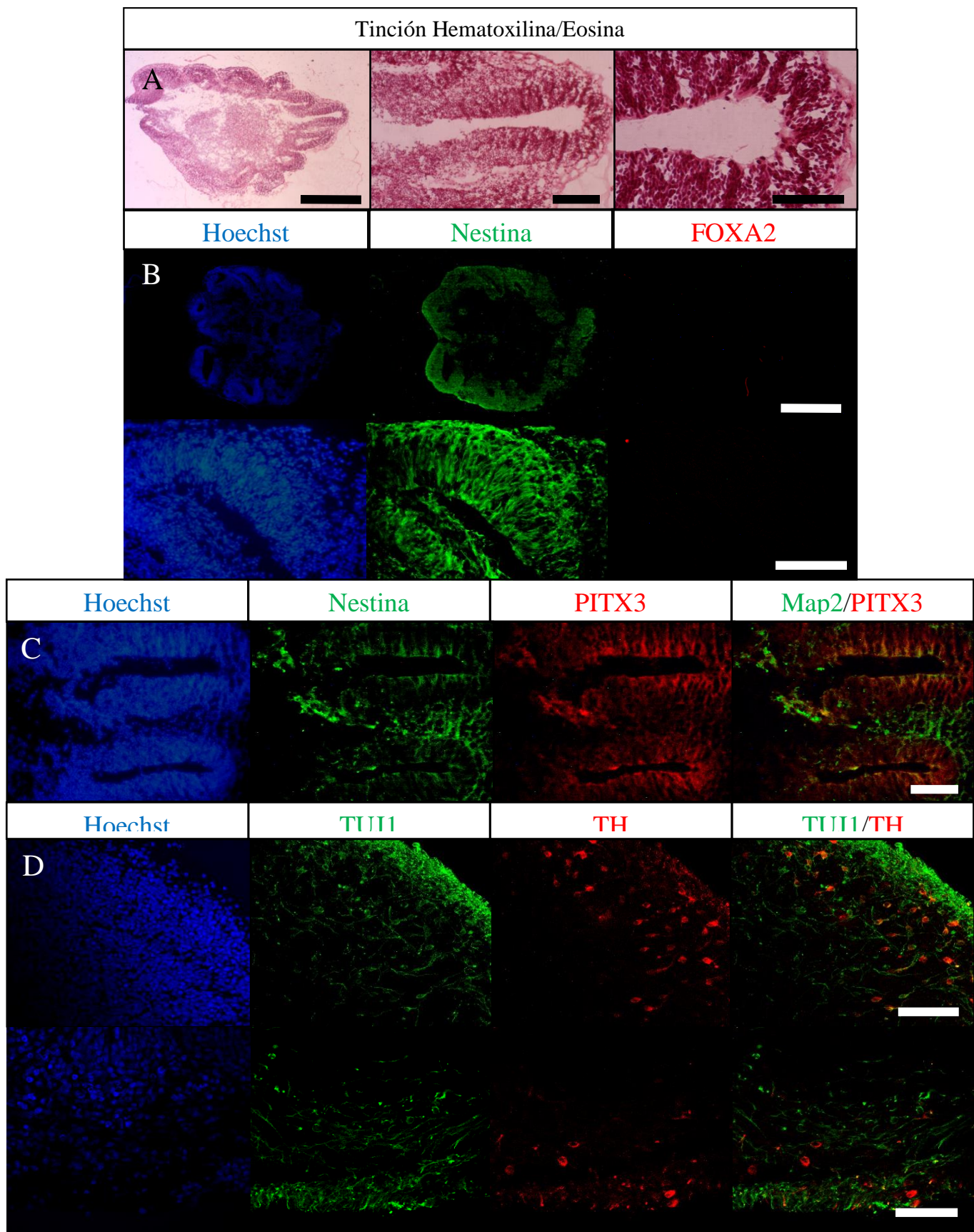


Figura 17. Caracterización del organoide de mesencéfalo humano al día 31. A) Tinciones con H&E de hMO en el día 31 las rosetas neurales son alargadas y el centro del organoide crece. Escala 500 μm (izquierda), 200 μm (centro), 100 μm (derecha) B) hMO expresa nestina (verde) en las rosetas neurales y es negativo para FOXA2 (rojo). Escala 100 μm . C) hMO expresa MAP2 (verde) y LMX1A (rojo) en las rosetas neurales. Escala 200 μm . D) hMO expresa TUJ1 (verde) y TH (rojo) en los bordes. Escala 50 μm .

Se realizaron inmunotinciones para Calbindina para tipo A10 y GIRK2 para tipo A9, encontramos células GIRK2+/Calb-. También había expresión de Sinaptofisina como marcador pre-sináptico. De forma interesante, observamos un arreglo espacial definido en las marcas de KI67 al centro de las rosetas neurales mientras que caspasa-3 activa está en la periferia de las rosetas neurales (Figura 18).

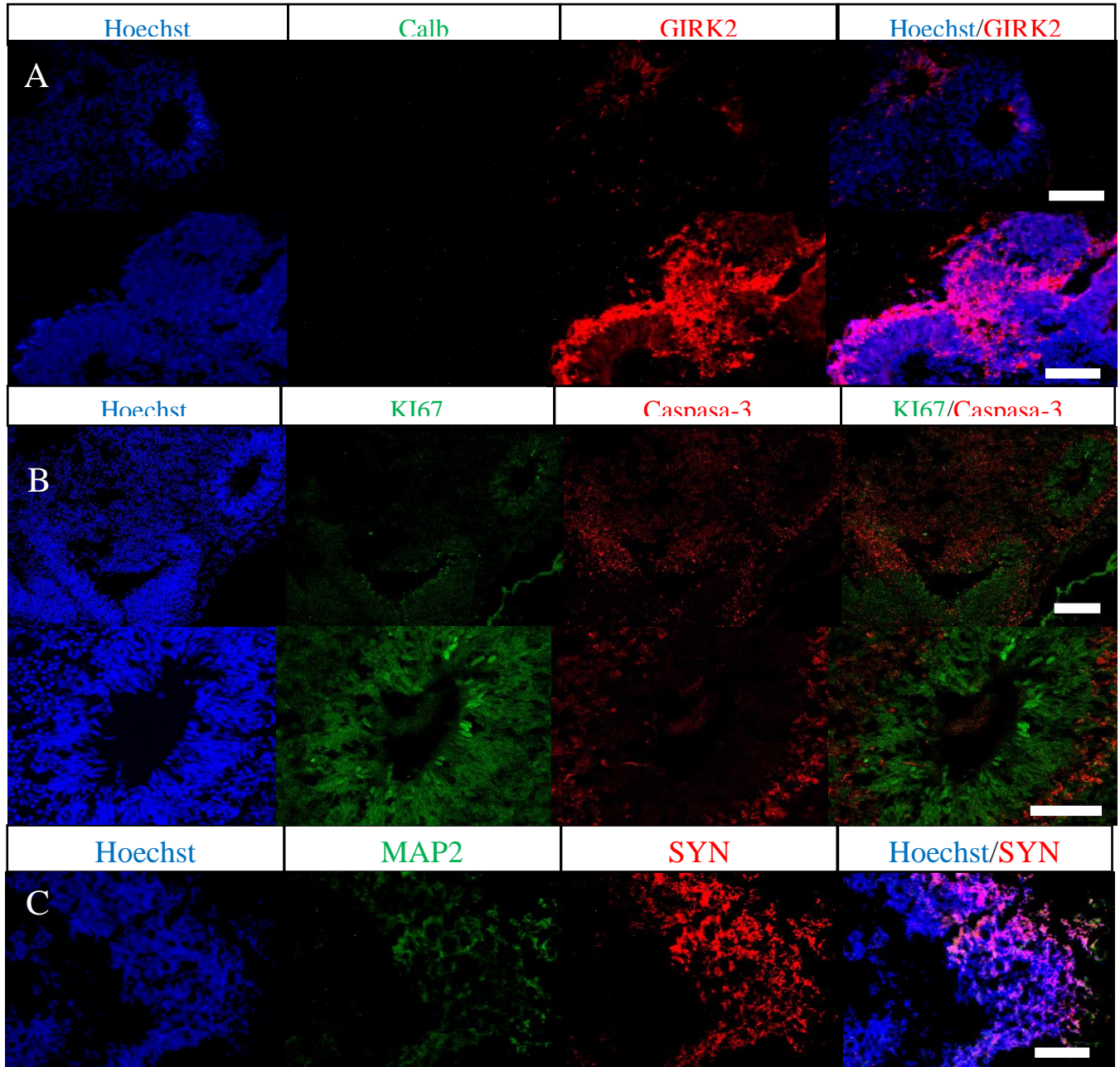


Figura 18. Caracterización del organoide de mesencéfalo humano al día 31. A) hMO día 31 expresa GIRK2 (rojo) en los bordes y en las rosetas neurales, no expresa calbindina (verde). Escala 200 μm B) hMO en día 31 expresa KI67 (verde) en las rosetas neurales y caspasa-3 activa (rojo) en el centro del organoide y alrededor de las rosetas neurales. Escala 100 μm (superior) y 50 μm (inferior) C) hMO día 31 expresa MAP2 (verde) y el marcador presináptico Sinaptofisina (verde). Escala 200 μm

6.3.3. Caracterización al día 63

Observamos que los hMO alcanzan un tamaño máximo, aproximado de entre 3 y 4 mm. Con tinción H&E observamos que las rosetas neurales de la periferia ya no están presentes (Figura 19A). Se hicieron inmunotinciones para linaje dopaminérgico como TUJ1 y TH donde obtuvimos células positivas para ambas marcas; y, neuronas dopaminérgicas tipo A10 (Calbindina) y A9 (GIRK2) donde observamos células positivas para GIRK2 y negativas para Calbindina, también se realizaron para glia con O4 y GFAP, siendo éste último el que se encontraba expresado (Figura 19). En la periferia del organoide había células GIRK2+/Calb-, TUJ1/+TH+ y en el centro del organoide había células GFAP+/O4-

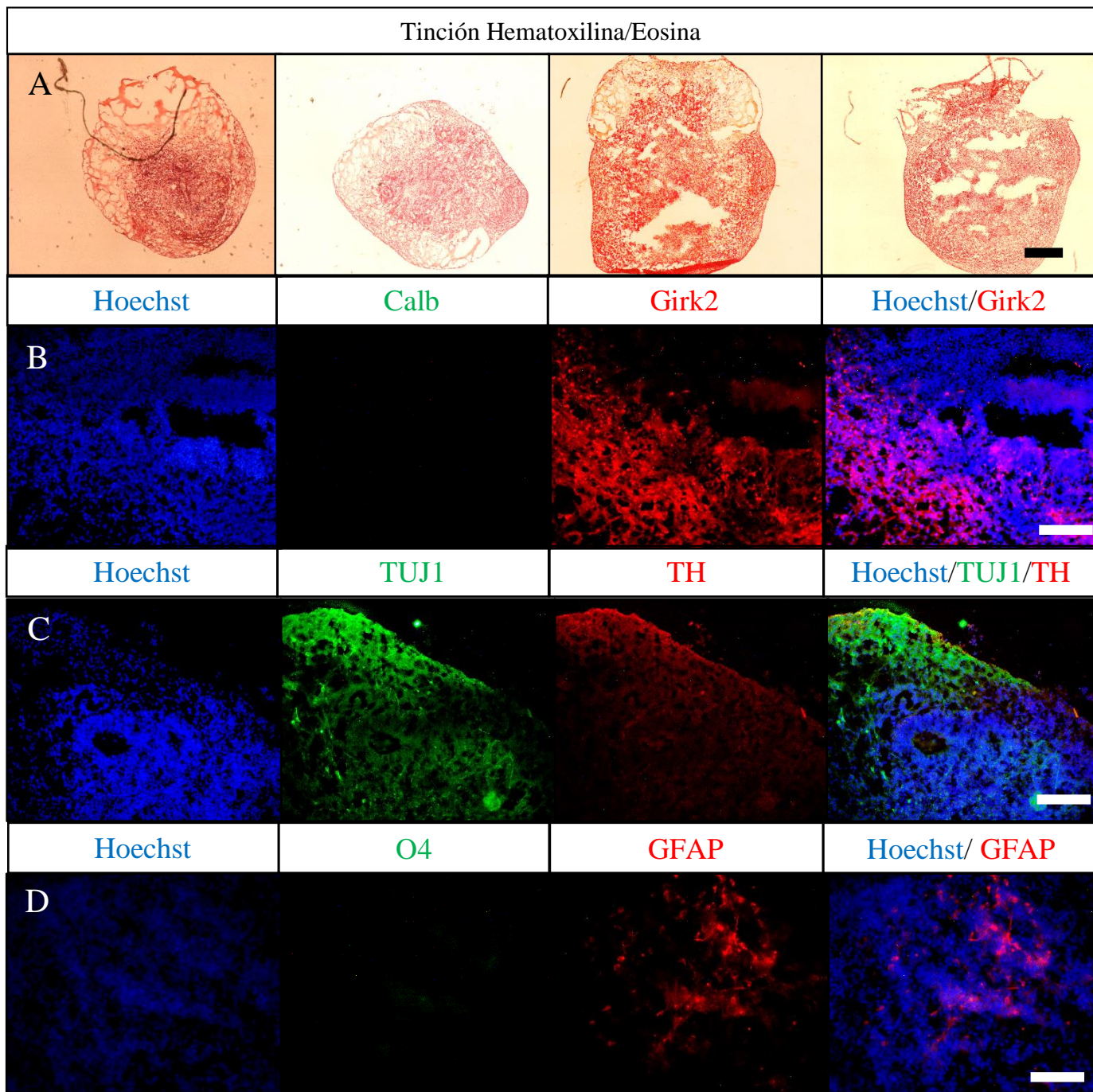


Figura 19. Caracterización del organoide de mesencéfalo humano día 63. A) Tinción con H&E del hMO al día 63, las rosetas neurales desaparecen. Escala 1 mm B) hMO al día 63 expresa GIRK2 (rojo) en los bordes y Calbindina- (verde). Escala 200 μ m. C) TUJ1 (verde) y TH (rojo) son expresados de manera variable en hMO al día 63. Escala 200 μ m D) GFAP (rojo) es expresando y O4 (verde) está ausente en el hMO al día 63. Escala 200 μ m

6.4. Comparación de los cultivos 2D y 3D

Los cultivos 2D y 3D fueron derivados de la misma línea celular troncal embrionaria que presenta los marcadores de pluripotencia OCT4, SOX2, NANOG y SSEA4.

En el día 14 los cultivos 2D no presentaron marca positiva de proliferación (KI67) mientras los cultivos 3D si presentaban esta marca. De forma interesante, observamos que los cultivos 3D presentaban marca positiva TH, mientras que, los cultivos 2D fueron negativos. De manera general, los cultivos 2D y 3D presentan marcas positivas para marcadores de precursor neural y de linaje dopaminérgico.

En el día 31, los cultivos 3D presentaron marca positiva para TH y el cultivo 2D fue negativo. Los demás marcadores de neurona y linaje dopaminérgico fueron positivos para ambos cultivos, con la principal diferencia de que los cultivos 3D tenían células TH+.

En el día 63, ambos cultivos tuvieron marcas positivas para neuronas dopaminérgicas y glía, indicando que la obtención de neuronas dopaminérgicas está presente en ambos cultivos.

Adicionalmente, observamos que los cultivos 3D presentaban estructuras parecidas a rosetas neurales que se encontraban distribuidas en la periferia de los hMO durante los días 14 y 31 y ya para el día 63 desaparecían, estas estructuras presentaban una distribución espacial del marcador de proliferación KI67 en el centro de las rosetas neurales y el marcador apoptótico Caspasa-3 activa en los bordes de estas estructuras (Tabla 3).

Marcador	Células troncales embrionarias (Día 0)
OCT4	+
SOX2	+
NANOG	+
SSEA4	+

Día 14		
Marcador	Cultivo 2D	Cultivo 3D
KI67	-	+
Caspasa-3 Activa	+	+
SOX2	ND	+
Vimentina	ND	+
LMX1a	+	+
FOXA2	+	+
MAP2	-	ND
Beta-tubulina III	+	+
Tirosina Hidroxilasa	-	+
Nestina	+	ND

Día 31		
Marcador	Cultivo 2D	Cultivo 3D
KI67	ND	+
Caspasa-3 Activa	ND	+
Calbindina	-	-
GIRK2	+	+
PITX3	ND	+
Sinaptofisina	+	+
MAP2	+	+
Beta-tubulina III	+	+
Tirosina Hidroxilasa	-	+
Nestina	ND	+
FOXA2	ND	-

Día 63		
Marcador	Cultivo 2D	Cultivo 3D
GFAP	+	+
O4	-	-
Calbindina	-	-
GIRK2	+	+
Sinaptofisina	+	ND
Map2	+	ND
Beta-tubulina III	+	+
Tirosina Hidroxilasa	+	+
OTX2	-	+

Tabla 3. Comparación por día y tipo de cultivo celular para diferentes marcadores de precursores neurales, neuronas dopaminérgicas y células gliales.

*Positivo (+), negativo (-) y no determinado (ND)

Con esta tabla pudimos observar que los cultivos 2D y 3D son heterogéneos y hay diferenciación dopaminérgica que presenta marcas positivas para precursores neurales, neuronas dopaminérgicas y glía. De manera interesante, los cultivos 3D presentan una distribución espacial definida de estos marcadores.

7 Discusión

7.1. Caracterización de la línea celular embrionaria H1

Las células troncales embrionarias (ESC) de la línea celular H1 que fueron utilizadas, presentaban una morfología esperada al tener un relación núcleo/citoplasma notablemente alto, las células se organizaron en colonias compactas de forma definida (Figura 11A). La irregularidad que observamos en la forma o tamaño de algunas colonias (Figura 11C, D) podría deberse al tipo de matriz utilizada; para el medio mTeSR™ se ha descrito que el uso de matrigel aumenta la eficiencia en la generación y mantenimiento de células troncales pluripotentes. Sin embargo, el manual de uso de Stem Cell Technologies sugiere que esto puede repercutir en la irregularidad de la forma de las colonias y se aconseja usar Vitronectin XF™ para obtener colonias más compactas y redondas (Hey, et al., 2018).

A pesar de encontrar colonias de morfologías diversas en nuestros cultivos, las ESC en este estudio expresaron 4 de los principales marcadores de pluripotencia: OCT4, SOX2, NANOG y SSEA4. OCT4 es un factor transcripcional que ha sido reportado como un marcador de pluripotencia durante el desarrollo embrionario temprano, que se mantiene expresado desde el estado de 4 células hasta la implantación del embrión. Oct4 es un regulador maestro en el mantenimiento de pluripotencia e *in vivo* establece la masa celular interna (ICM) donde sus niveles de expresión son más altos, por este motivo en las ESC al ser derivadas de la ICM debe haber expresión de este factor transcripcional (Niwa, et al., 2000; Pesce & Schöler, 2001).

Sox2 es otro factor transcripcional esencial en el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la pluripotencia de las células troncales, este último es un evento de sinergia entre OCT4, SOX2 y NANOG y gracias a este circuito regulador mantiene la capacidad de autorrenovación de las ESC (Zhang, 2014).

Los marcadores de superficie celular también son expresados en las ESC, como SSEA4 que está presente en etapas tempranas del desarrollo embrionario y se expresa en células troncales indiferenciadas humanas y de primates no humanos, teratocarcinomas y ESC (Zhao, et al., 2012). Por lo tanto, en conjunto, la presencia de estos 4 marcadores en las inmunotinciones demostró que el estado pluripotente de las colonias de hESC en este estudio son óptimas para los experimentos posteriores (Figura 11).

7.2. Diferenciación dopaminérgica y generación de organoides de mesencéfalo

Las NDA y los hMO presentaron diferencias notables en todos los días de caracterización, lo cual podría deberse principalmente al proceso de diferenciación, las condiciones y organización espacio-temporal de cada cultivo.

El protocolo de diferenciación dopaminérgica (Kriks et al., 2011) utiliza moléculas pequeñas que activan la vía de SHH y WNT, esto debería inducir la expresión de LMX1A, FOXA2 e incluso OTX2 generando poblaciones de precursores neurales de placa de piso que aparecen durante el desarrollo, es decir, un compromiso celular a neuronas dopaminérgicas. En la última etapa de diferenciación se usa un medio que contiene BDNF y GDNF, esto aumenta la supervivencia neural y la diferenciación/maduración dopaminérgica; cAMP y ácido ascórbico ayudan a la diferenciación neural y regulan el estado redox en neuronas, respectivamente; el DAPT promueve la diferenciación neural y TGF β -3 el desarrollo de axones y dendritas durante la diferenciación dopaminérgica (Figura 8). Este protocolo ha demostrado que se pueden obtener células positivas a TUJ1, TH y GIRK 2 en cultivos 2D adherentes en monocapa, siendo las marcas principales de neuronas dopaminérgicas tipo A9 (Kriks et al., 2011).

Por otro lado, el protocolo de generación de hMO usa 4 tipos de medios de diferenciación. 1) El medio de inducción neural (MIN) principalmente usa una inhibición dual con Noggin y SB431542 para guiar un compromiso neuroectodérmico, se activa la vía de WNT con CHIR99021 y heparina, beta-mercaptoetanol es utilizado para inhibir la muerte celular; 2) el medio modelador de mesencéfalo (MPM) contiene adicionalmente SHH y FGF8 recombinantes para guiar las células a un destino de mesencéfalo y se usa B27 sin vitamina A para evitar influencia dorsal de la identidad de los hMO; 3) el medio de inducción de crecimiento tisular (TGIM) contiene insulina y laminina para promover el crecimiento y 4) el medio de diferenciación final (FDM) utiliza BDNF y GDNF para favorecer la supervivencia neural y la diferenciación/maduración dopaminérgica, ácido ascórbico y cAMP, que ayudan a la diferenciación neural y regulan el estado redox en neuronas, respectivamente (Mohamed et al., 2019).

Las diferencias en ambos protocolos podrían ser la principal razón en las discrepancias de los resultados observados entre cultivos 2D y 3D. Una de las principales discrepancias entre ambos protocolos es el uso de matrigel ya que proporciona rigidez para permitir la estructuración del organoide, adicionalmente, también influye en la polarización y organización del organoides. El protocolo de diferenciación dopaminérgica de Kriks y de generación de organoides de Mohamed, utilizan varias moléculas pequeñas en común con excepción de aquellas que están más involucradas en ventralizar el organoide como SHH, Noggin y B27 sin vitamina A. Otra diferencia es el que los organoides de mesencéfalo están en agitación a 70 rpm, esto ayuda a mejorar la difusión de moléculas pequeñas, preservar la estructura tridimensional y favorecer el crecimiento del organoide (Lancaster & Benito-Kwiecinski, 2019).

Los días seleccionados para la caracterización fueron escogidos basándonos en los resultados previamente publicados por Kriks y por las condiciones publicadas por Mohamed de los hMO.

7.3. Caracterización de los cultivos 2D y 3D al día 14

En el día 14 de diferenciación dopaminérgica en 2D, mediante una evaluación al microscopio utilizando contraste de fases se pudo apreciar la morfología de precursores neurales ya que presentan una disminución en la relación del tamaño núcleo/citoplasma y se observó bipolaridad (Fig. 12A). Las inmunotinciones revelaron un pequeño grupo de precursores neurales positivos para FOXA2, la marca de nestina es poco notable (Figura 12B), también se observó que hay células positivas para LMX1A y negativas para MAP2 (Figura 12C). Esto nos indica que en este día de diferenciación hay células FOXA2+/LMX1A+ y con esto podemos decir que hubo presencia de precursores dopaminérgicos.

Este resultado es interesante porque Nestina es un marcador característico en células troncales neurales (NSC) o progenitores neurales, su expresión es reducida conforme las NSC o precursores neurales van diferenciándose en neuronas o glía, además de su función en la diferenciación también se ha visto que las células Nestina+ están involucradas en algunos casos con la autorrenovación y pueden llegar a co-localizar con KI67 o ser marcadas por BrdU (Suzuki, et al., 2010; Bernal & Arranz, 2018). MAP2 en cambio, es un marcador neural

presente en neuronas post-mitóticas y su expresión aumenta conforme avanza la diferenciación y maduración neuronal, se ha reportado su presencia en precursores neurales pero a niveles muy bajos (Soltani et al., 2005; Mohammad, et al., 2016). Tomando estos datos, podríamos decir que en el día 14 de diferenciación dopaminérgica en cultivo bidimensional, hubo precursores neurales FOXA2+/LMX1A+ que debido a esta etapa avanzada de diferenciación presentaron poca o nula expresión de Nestina. Sin embargo, esta etapa de la diferenciación no presentó el marcador MAP2 específico de neuronas, mostrando la transición y desarrollo de neuronas a través de un protocolo de compromiso y diferenciación neural bajo estas condiciones.

Esto contrasta un poco con lo visto en el hMO en el mismo día, principalmente los hMO mostraron estructuras parecidas a rosetas neurales (Figura 16A) donde principalmente se expresó SOX2 y FOXA2 (Figura 16 B, D). SOX2 se ha visto involucrado en el compromiso neural para aumentar la inducción y diferenciación neural (Zhang, 2014); específicamente en organoides de mesencéfalo se ha visto en la expresión de SOX2 desde el día 27 en el protocolo que seguimos (Monzel et al., 2017). FOXA2 resulta una marca interesante en hMO ya que estudios previos en cultivos 2D adherentes en monocapa han mostrado que FOXA2 se expresa durante todo el tiempo de vida de NDA y tienen un papel en el mantenimiento del programa dopaminérgico en neuronas dopaminérgicas y la ausencia de FOXA2 repercute en la expresión de otros marcadores dopaminérgicos, aun así muchos aspectos de FOXA2 permanecen desconocidos (Stott et al., 2013). Se ha reportado su presencia desde el día 4 en regiones específicas de neuroepitelio, cuando los organoides de mesencéfalo asemejan más un cuerpo embrioide; esta expresión puede mantenerse al día 45 e incluso migrar radialmente a regiones similares a la zona intermedia del mesencéfalo en desarrollo (Jo et al., 2016). En nuestro protocolo, esta marca desapareció en el día 31 (Figura 17 B); sin embargo, es posible que FOXA2 se siga expresando en niveles bajos de manera gradual conforme avanza su maduración, pero en etapas más avanzadas esto repercute en la expresión de algunos marcadores en el día 63 (Figura 18) como se discutirá más adelante. También se observó la presencia de Vimentina, que es otro marcador de progenitor neural y co-localizó con FOXA2, confirmando la identidad de progenitores y precursores neurales con compromiso dopaminérgico en organoides de mesencéfalo.

Sorprendentemente, los hMO en el día 31 presentaron marca de nestina en rosetas neurales (Figura 17B), algo que no se identificó en los cultivos 2D desde el día 14 y que conforme avanzó la diferenciación, fue disminuyendo su presencia. Esto indicó que los organoides cerebrales tienen la capacidad de mantener en regiones o estructuras específicas NSC o progenitores neurales.

Los cultivos 2D y 3D mostraron la expresión de TUJ1 en el día 14, sin embargo, en el cultivo 2D unas células son positivas y mostraron una morfología más parecida a precursores que a neuronas (Figura 12D). En cambio, los hMO mostraron una distribución de células TUJ1+ restringida a la periferia del organoide (Figura 16 F), incluso se observaron células positivas para TH. Por lo tanto, el cultivo 3D fue capaz de generar células TUJ1+/TH+ en una etapa más temprana de diferenciación, mientras que el cultivo 2D presentó, en la misma etapa, células TUJ1+/TH-, dejando claro el potencial de obtención de NDA con mayor eficiencia en los hMO. La presencia de células TUJ1+/TH+ en organoides de mesencéfalo se ha reportado desde el día 27 (Monzel et al., 2017) y en nuestro grupo de investigación solo se había reportado en el día 50 la presencia de este tipo de células; no se había caracterizado en etapas tempranas de nuestro protocolo para la obtención de los hMO (días 14) y resultó interesante que se puedan tener neuronas dopaminérgicas (Mohamed et al., 2019).

Otro punto a evaluar y comparar entre los cultivos 2D y 3D fue la proliferación y muerte celular, los cultivos 2D al día 14 fueron negativos para el marcador de proliferación celular Ki67 y positivo para la expresión de caspasa-3 activa la cual se activa cuando inicia una cascada de señalización apoptótica (Walters et al., 2009). Por otro lado, los hMO fueron positivos para Ki67 y Caspasa-3 activa en el día 14, resulta interesante la distribución de estas marcas en los hMO ya que en estas estructuras parecidas a rosetas neurales se observaron células Ki67+/Caspasa-3- y fuera de estas estructuras hubo células Ki67+/Caspasa3+ y células Ki67-/Caspasa-3+. Ambos marcadores han sido reportados en organoides cerebrales (Giandomenico et al., 2019; Kim et al., 2019) junto con el ensayo de TUNEL (Mansour et al., 2018) y se ha observado que debido a problemas de oxigenación y disponibilidad de medio de cultivo en el centro de los organoides cerebrales, éstos pueden volverse apoptóticos. En nuestros hMO la marca de Ki67 se encontraron en la región interna o luminal de estas rosetas neurales y esto correlaciona bastante con lo visto en el día 14 de los hMO, mientras las NDA de los cultivos 2D se mantuvieron sin esta marca de proliferación

y solo presentaron marca apoptótica. Esto nos indicó que los hMO no solo mantuvieron su capacidad proliferativa, a diferencia de los cultivos 2D, sino que las células KI67+ también se distribuyeron preferencialmente en estructuras restringidas como las rosetas neurales, similar a lo que se ha reportado en la zona ventricular del tubo neural, pudiendo ser estas rosetas neurales el nicho proliferativo de NSC, precursores y progenitores neurales en el organoide.

7.4. Caracterización de los cultivos 2D y 3D al día 31

En el día 31 los cultivos 2D mostraron cambios morfológicos y en la distribución celular en la superficie adherente, presentaron una morfología neural y en algunas regiones los bordes se despegaban y las células se agregaban, formando proyecciones neurales, debido a las condiciones de adherencia y polaridad que confiere la superficie de la placa de cultivo (Figura 13A). El protocolo de diferenciación indujo la presencia de células positivas para TUJ1, PITX3 y TH desde el día 25 (Kriks et al. 2011) y en nuestros resultados observamos que algunas células presentaron marca MAP2+/PITX3+ y TUJ1+/TH-; incluso se pudieron observar células GIRK2+/Calbindina- lo cual resulta inesperado porque TH es un marcador característico (Figura 13). A pesar de ello, TH no es específico de este linaje neural dopaminérgico ya que también se ha reportado su expresión en neuronas noradrenérgicas y adrenérgicas (Weihe, et al., 2006), por tal motivo, GIRK2 y Calbindina son otros marcadores que complementan la caracterización dopaminérgica (Reyes et al., 2012) Es posible que las neurona TUJ1+/TH- sean neuronas dopaminérgicas que aún no expresan TH pero sí Girk2, también es notable la presencia de neuronas TUJ1+ que tienen una morfología neural pero no tienen un arreglo complejo es de esperar de neuronas inmaduras.

En el caso de los hMO al día 31, presentaron un tamaño aproximado de 1 mm, perdiéndose los brotes de neuroectodermo y, en algunos casos, los organoides que conservaron el matrigel, presentaban proyecciones sobre esta matriz (Figura 15J); esto se ha reportado en organoides que son mantenidos en insertos celulares como los cultivos organotípicos (Giandomenico et al., 2019). Al hacerse el análisis tintorial con H&E pudimos notar que las rosetas neurales se mantuvieron en esta etapa de los hMO con la diferencia de que se habían alargado y no eran esféricas y el centro del organoide había crecido (Figura

17A). Estos cultivos 3D expresaron en gran medida MAP2 y PITX3 presente en las rosetas neurales (Figura 17C), al igual que en su contraparte 2D, con la excepción de no tener rosetas neurales o alguna estructura y organización más compleja. Al igual que en el día 14 se mantuvieron células TUJ1+/TH+ en los bordes y, aparentemente fueron más notorias y con morfología neural, siendo congruente con lo reportado en este protocolo al día 31 (Mohamed et al., 2019). De manera interesante, observamos células GIRK2+/Calbindina- en la región externa de las rosetas neurales (Figura 18A), lo cual no ha sido reportado, ya que la presencia de rosetas neurales varía dependiendo del protocolo. En trabajos donde se han realizado experimentos para la obtención de organoides de mesencéfalo, se ha reportado que las rosetas neurales se pierden días previos al día 31, además de que existen casos donde no han evaluado GIRK2.

Otro hecho interesante fue la presencia de KI67 en las rosetas neurales y Caspasa-3 Activa en la región externa de las mismas, algo que notamos desde el día 14, pero fue más evidente en el día 31 y es posible que esto se deba al crecimiento del hMO, lo cual genera menor acceso a nutrientes y oxígeno, junto con el cambio morfológico de las rosetas neurales (Figura 18B).

Como parte de la estandarización del protocolo de generación de hMO también caracterizamos la presencia de eventos sinápticos con el marcador Sinaptofisina (SYN). Ésta glucoproteína se presenta en vesículas pre-sinápticas que se expresa en neuronas que llevan a cabo transmisión sináptica (Calhoun et al., 1996), es decir, que la presencia de Sinaptofisina en los hMO (Figura 17C) nos indicó que hubo comunicación sináptica y tiene una actividad funcional, esto cumple con el requisito de recapitular una función del órgano que representa el organoide.

7.5. Caracterización de los cultivos 2D y 3D al día 63

El último día caracterizado fue el día 63, pudimos observar que las NDA tenían una morfología de neurona madura y se agregaron formando grupos con proyecciones axonales gruesas (Figura 14A). Las neuronas expresaron GIRK2 en mayor proporción que el día 31 (Figura 14B) y también fueron positivas para TUJ1 y TH. Las NDA TUJ1+/TH+ mostraban una morfología y arreglo particular (Figura 14C), el aumento en la expresión de TH es algo que se debe observar a partir del día 40 de diferenciación dopaminérgica según reportes previos (Fedele et al., 2017) y aunque no fueron positivas todas las células, sí fue notable el aumento en la marca respecto a los días anteriores.

Al igual que en los hMO se caracterizó el cultivo 2D para la marca pre-sináptica Sinaptofisina (SYN) y OTX2 (Figura 14D), encontrándose algunas células SYN+/OTX2- demostrando que el cultivo 2D también presentó neuronas con comunicación sináptica, aunque la proporción fue menor que en los hMO al día 31. Esto podría explicarse debido al grado de complejidad que los hMO adquieren en estructura y organización, respecto a los cultivos 2D, siendo evidente que estos factores promueven y facilitan la comunicación sináptica y maduración neuronal.

Por último, de acuerdo a la eficiencia de diferenciación del protocolo de *Kriks et al.* es posible encontrar diferenciación glial y para corroborar que nuestros resultados replicaran lo ya reportado, caracterizamos con O4 para oligodendrocitos y GFAP para astrocitos. Encontramos células GFAP+ que tenían una morfología similar a astrocitos dentro de los cultivos 2D y esto indicó que efectivamente hubo diferenciación astrocítica (Figura 14E).

Los hMO alcanzaron el máximo tamaño reportado para organoides cerebrales al día 63 (Kelava & Lancaster, 2016; Monzel et al., 2017; Smits et al., 2019) y la principal característica que observamos con tinción H&E fue la desaparición de rosetas neurales (Figura 19A). Debido a que el hMO ya estaba en etapa madura es muy posible que el centro fuera apoptótico y eso dañara el tejido del centro del hMO, dificultando el procesamiento de los cortes de hMO.

En los bordes del hMO observamos un aumento en la marca de GIRK2 (Figura 19B), aunque las marcas de TUJ1 y TH (Figura 19C) habían disminuido, GIRK2 aumentó su distribución en el hMO y esto posiblemente se haya debido a la pérdida de las rosetas

neurales, de ser correcta esta suposición sería posible que durante la maduración de los hMO las células en diferenciación se mantengan en áreas restringidas del organoide. Tomando en su totalidad todos los resultados observados en los hMO, podemos suponer que las rosetas neurales tienen una función importante en mantener a los precursores neurales en la región luminal, migran a la región externa de la roseta para empezar el compromiso dopaminérgico y una vez que el hMO madura y pierde las rosetas neurales los precursores neurales entran en diferenciación y empiezan a migrar a otras áreas del borde del hMO.

Finalmente, la caracterización glial del hMO reveló que en el centro de los organoides hubo células GFAP+/O4- con morfología de astrocitos (Figura 19D). Esto puede explicarse a partir de las condiciones en las que se encuentran los hMO, al ser de un tamaño considerablemente grande el medio de diferenciación final solo logra estar en contacto con la superficie del organoide y las moléculas pequeñas del medio no logran difundir al centro; esto también explicaría que los organoides cerebrales se vuelvan apoptóticos en su centro. Esto sugiere que las células de los bordes del organoide al estar en contacto con el medio de diferenciación siguen una trayectoria de diferenciación dopaminérgica adecuada en cambio, las células que se encuentran en el centro del organoide al no estar expuestas a todas las moléculas y reactivos del medio entran en diferenciación glial.

8. Conclusión

Los organoides de mesencéfalo pueden representar desde etapas tempranas poblaciones celulares de linaje dopaminérgico, con una distribución y polaridad restringida que no se encuentra en los cultivos 2D.

El hecho de que las poblaciones celulares de este linaje se encuentren en los bordes de los hMO sugiere que el medio de diferenciación final no está en contacto con el centro del organoide y esto deriva en que sólo las células de los bordes entren en un programa de diferenciación dopaminérgica adecuada, mientras que las células del centro al no estar expuestas de la misma manera pueden entrar en apoptosis o seguir un programa de diferenciación glial..

Otro evento interesante es la presencia de rosetas neurales, las cuales aparentemente tienen una función reguladora del tamaño de los hMO y de la distribución de las poblaciones celulares durante la diferenciación dopaminérgica. Ya que al desaparecer las células Girk2+ dejan de estar restringidas al área que rodea las rosetas neurales y empiezan a migrar a otras regiones del borde junto con las células TUJ1+/TH+, esto podría indicar un evento de migración celular definido en los organoides.

Además, la forma en la que se distribuyen las marcas de Ki67 y Caspasa-3 activada nos indica que estas rosetas neurales son los centros de proliferación del organoide donde se encuentran células troncales neurales y precursores neurales responsables del aumento en el tamaño de los organoides y que cuando desaparecen las rosetas neurales dejan de crecer al perder el nicho que mantiene a las NSC y precursores en ese estado.

La presencia de células gliales en el centro confirma la heterogeneidad del organoide y que ocurre diferenciación glial de manera paralela a la diferenciación neural, los cultivos 2D también presentan diferenciación glial pero no mantienen la cito-arquitectura de los hMO.

Finalmente, los hMO son un modelo que recapitula características del neurodesarrollo del mesencéfalo y complementan los estudios en cultivos 2D al mostrar tipologías espacio-temporales similares a las que ocurren en el desarrollo embrionario *in vivo* humano.

9. Perspectivas

Este trabajo abordó tanto la estandarización como la caracterización de los hMO mediante inmunotinciones, obteniendo resultados favorables y prometedores para modelar el neurodesarrollo y enfermedades asociadas a esta región del cerebro. Sin embargo, sería interesante caracterizar mediante otras técnicas como Western Blot y RT-PCR para conocer los niveles de expresión de proteínas y de RNA mensajeros específicos para complementar los resultados de este trabajo de manera cuantitativa.

Abordamos tres días diferentes de mantenimiento de los cultivos 2D y 3D (14, 31 y 63); sin embargo, para poder tener una caracterización más robusta sería conveniente caracterizar en etapas más tempranas y tardías, por ejemplo, al día 8 y al día 100 para poder comprender de mejor manera la trayectoria de diferenciación que sigue el hMO.

Generalmente, los estudios de organoides involucran el uso de RNA-seq para poder establecer de manera más precisa la identidad de las poblaciones celulares de los organoides. Sería interesante abordar desde esta técnica nuestros hMO para poder entender mejor la heterogeneidad de este modelo.

El campo de estudio de los organoides cerebrales es muy nuevo y el potencial que presentan es muy amplio. A pesar de ello, hay muchos puntos por refinar para optimizar estos modelos y por ello sería favorable para nuestros intereses perfeccionar la generación de organoides, su procesamiento y visualización; ya que puede ser complicado por las características tridimensionales de los organoides.

Este trabajo es un primer acercamiento en nuestro laboratorio a esta área novedosa, por lo tanto, es esencial conocer todas las ventajas y desventajas que tienen estos modelos para poder mejorarlos y utilizarlos en estudios más complejos que aporten contribuciones a la biología del desarrollo, al mecanismo de enfermedades y sus posibles tratamientos.

10. Referencias

- Arenas, E., Denham, M., & Villaescusa, J. C. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development*, *142*(11), 1918–1936. <https://doi.org/10.1242/dev.097394>
- Bartfeld, S., Bayram, T., Van De Wetering, M., Huch, M., Begthel, H., Kujala, P., ... Clevers, H. (2015). In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology*, *148*(1), 126-136.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.042>
- Bergström, T., & Forsberg-Nilsson, K. (2012). Neural stem cells: Brain building blocks and beyond. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *117*(2), 132–142. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.665096>
- Bernal, A., & Arranz, L. (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(12), 2177–2195. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2794-z>
- Bianchi, L. (2017). *Developmental Neurobiology* (1st ed.). New York, U.S.A: Garland Science.
- Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to Stem Cell Therapy. *Journal of Cardiovascular Nursing*, *24*(2), 98–103. <https://doi.org/10.1097/JCN.0b013e318197a6a5>
- Boppart, M. D., De Lisio, M., & Witkowski, S. (2015). Exercise and Stem Cells. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *135*, 423–456. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.005>
- Calhoun, M. E., Jucker, M., Martin, L. J., Thinakaran, G., Price, D. L., & Mouton, P. R. (1996). Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of Neurocytology*, *25*(12), 821–828. <https://doi.org/10.1007/bf02284844>
- Carballo-Molina, O. A., Sánchez-Navarro, A., López-Ornelas, A., Lara-Rodarte, R., Salazar, P., Campos-Romo, A., ... Velasco, I. (2016). Semaphorin 3C Released from a Biocompatible Hydrogel Guides and Promotes Axonal Growth of Rodent and Human Dopaminergic Neurons. *Tissue Engineering - Part A*, *22*(11–12), 850–861. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0008>

- Carletti, E., Motta, A., & Migliaresi, C. (2011). Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. In N. J. Clifton (Ed.), *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_2.
- Centeno, E. G. Z., Cimarosti, H., & Bithell, A. (2018). 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Molecular Neurodegeneration*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0258-4>
- Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: An overview. *Kidney International Supplements*, *1*(3), 63–67. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>
- Chávez-González, M. A., Chimal-Monroy, J., Flores-Figueroa, E., & Lamas, M. (2017). *Células troncales: biología y aplicaciones en biomedicina* (1st ed.). CDMX, México: UNAM.
- Choudhry, Z., Rikani, A. A., Choudhry, A. M., Tariq, S., Zakaria, F., Asghar, M. W., ... Mobassarrah, N. J. (2014). Sonic hedgehog signalling pathway: A complex network. *Annals of Neurosciences*, *21*(1), 28–31. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.210109>
- Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, *165*(7), 1586–1597. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*, *39*(6), 889–909. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3)
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, *32*(4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Fatehullah, A., Tan, S. H., & Barker, N. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature Cell Biology*, *18*(3), 246–254. <https://doi.org/10.1038/ncb3312>
- Fedele, S., Collo, G., Behr, K., Bischofberger, J., Müller, S., Kunath, T., ... Taylor, V. (2017). Expansion of human midbrain floor plate progenitors from induced pluripotent stem cells increases dopaminergic neuron differentiation potential. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05633-1>
- Gale, E., & Li, M. (2008). Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Molecular Brain*, *1*, 8. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-1-8>
- Gaven, F., Marin, P., & Claeysen, S. (2014). Primary Culture of Mouse Dopaminergic

- Neurons. *Journal of Visualized Experiments*, (91). <https://doi.org/10.3791/51751>
- Giandomenico, S. L., Mierau, S. B., Gibbons, G. M., Wenger, L. M. D., Masullo, L., Sit, T., ... Lancaster, M. A. (2019). Cerebral organoids at the air–liquid interface generate diverse nerve tracts with functional output. *Nature Neuroscience*, 22(4), 669–679. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0350-2>
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2016). *Developmental Biology* (11th ed.). Massachusetts, U.S.A: Sinauer Associates, Inc.
- Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>
- Hernandez, L. F., Obeso, I., Costa, R. M., Redgrave, P., & Obeso, J. A. (2019). Dopaminergic Vulnerability in Parkinson Disease: The Cost of Humans’ Habitual Performance. *Trends in Neurosciences*, 42(6), 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.03.007>
- Heussler, H. S., & Suri, M. (2003). Sonic hedgehog. *Molecular Pathology : MP*, 56(3), 129–131. <https://doi.org/10.1136/mp.56.3.129>
- Hey, C. A. B., Saltöková, K. B., Bisgaard, H. C., & Møller, L. B. (2018). Comparison of two different culture conditions for derivation of early hiPSC. *Cell Biology International*, 42(11), 1467–1473. <https://doi.org/10.1002/cbin.10966>
- Huch, M., Knoblich, J. A., Lutolf, M. P., & Martinez-Arias, A. (2017). The hope and the hype of organoid research. *Development*, 144(6), 938–941. <https://doi.org/10.1242/dev.150201>
- Humpel, C. (2015). Neuroscience forefront review organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*, 305, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.086>
- Jo, J., Xiao, Y., Sun, A. X., Cukuroglu, E., Tran, H. D., Göke, J., ... Ng, H. H. (2016). Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. *Cell Stem Cell*, 19(2), 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.005>
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., ... Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>
- Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016). Stem Cell Models of Human Brain Development. *Cell*

- Stem Cell*, 18(6), 736–748. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.022>
- Kim, H., Park, H. J., Choi, H., Chang, Y., Park, H., Shin, J., ... Kim, J. (2019). Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids. *Stem Cell Reports*, 12(3), 518–531. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.01.020>
- Krashia, P., Nobili, A., & D'amelio, M. (2019). Unifying hypothesis of dopamine neuron loss in neurodegenerative diseases: Focusing on alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00123>
- Kriks, S., Shim, J. W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., ... Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480(7378), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10648>
- Lancaster, M. A., & Benito-Kwiecinski, S. (2019). Brain Organoids: Human Neurodevelopment in a Dish. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035709>
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345(6194). <https://doi.org/10.1126/science.1247125>
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., ... Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467), 373–379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>
- Li, N., Hornbruch, A., Klafke, R., Katzenberger, B., & Wizenmann, A. (2005). Specification of dorsoventral polarity in the embryonic chick mesencephalon and its presumptive role in midbrain morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 233(3), 907–920. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20434>
- Liu, C., Oikonomopoulos, A., Sayed, N., & Wu, J. C. (2018). Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development*, 145(5), dev156166. <https://doi.org/10.1242/dev.156166>
- Lopes, F. M., Bristot, I. J., da Motta, L. L., Parsons, R. B., & Klamt, F. (2017). Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models. *NeuroMolecular Medicine*, 19(2–3), 241–255. <https://doi.org/10.1007/s12017-017-8454-x>
- Mansour, A. A., Gonçalves, J. T., Bloyd, C. W., Li, H., Fernandes, S., Quang, D., ... Gage,

- F. H. (2018). An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nature Biotechnology*, 36(5), 432–441. <https://doi.org/10.1038/nbt.4127>
- Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., ... Sato, T. (2015). Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*, 21(3), 256–262. <https://doi.org/10.1038/nm.3802>
- Mayani, H. (2003). A glance into somatic stem cell biology: Basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Archives of Medical Research*, 34(1), 3–15. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00450-2](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00450-2)
- Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). *Opportunities and Challenges for use of Tumor Spheroids as Models to Test Drug Delivery and Efficacy*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>
- Mohamed, N.-V., Mathur, M., da Silva, R. V., Beitel, L. K., Fon, E. A., & Durcan, T. M. (2019). Generation of human midbrain organoids from induced pluripotent stem cells. *MNI Open Research*, 3, 1. <https://doi.org/10.12688/mniopenres.12816.1>
- Mohammad, M. H., Al-Shammari, A. M., Al-Juboory, A. A., & Yaseen, N. Y. (2016). Characterization of neural stemness status through the neurogenesis process for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S94545>
- Mondrinos, M. J., Jones, P. L., Finck, C. M., & Lelkes, P. I. (2014). Engineering De Novo Assembly of Fetal Pulmonary Organoids. *Tissue Engineering Part A*, 20(21–22), 2892–2907. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0085>
- Monzel, A. S., Smits, L. M., Hemmer, K., Hachi, S., Moreno, E. L., van Wuelen, T., ... Schwamborn, J. C. (2017). Derivation of Human Midbrain-Specific Organoids from Neuroepithelial Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 8(5), 1144–1154. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.03.010>
- Nakamura, H. (2013). Midbrain Patterning: Isthmus Organizer, Tectum Regionalization, and Polarity. In J. Rubenstein & P. Rakic (Eds.), *Formation Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*. California, U.S.A: Elsevier Academic Press.
- Niwa, H., Miyazaki, J. I., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines

- differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4), 372–376. <https://doi.org/10.1038/74199>
- Patten, I., & Placzek, M. (2000). The role of sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(12), 1695–1708. <https://doi.org/10.1007/PL00000652>
- Pesce, M., & Schöler, H. R. (2001). Oct-4 : Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development . *Stem Cells*, 19(4), 271–278. <https://doi.org/10.1634/stemcells.19-4-271>
- Puelles, E., Martinez de la Torre, M., Watson, C., & Puelles, L. (2012). Midbrain. In C. Watson, G. Paxinos, & L. Puelles (Eds.), *The Mouse Nervous System* (1st ed., p. 814). California, U.S.A: Elsevier Academic Press.
- Puelles, L., & Rubenstein, J. L. R. (2003). Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends in Neurosciences*, 26(9), 469–476. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00234-0](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00234-0)
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., Mooney, R. D., ... White, L. E. (Eds.). (2018). *Neuroscience* (6th ed.). Massachusetts, U.S.A: Sinauer Associates, Inc.
- Qian, X., Song, H., & Ming, G. (2019). Brain organoids: advances, applications and challenges. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.166074>
- Reyes, S., Fu, Y., Double, K., Thompson, L., Kirik, D., Paxinos, G., & Halliday, G. M. (2012). GIRK2 expression in dopamine neurons of the substantia nigra and ventral tegmental area. *Journal of Comparative Neurology*, 520(12), 2591–2607. <https://doi.org/10.1002/cne.23051>
- Ronaldson-Bouchard, K., & Vunjak-Novakovic, G. (2018). Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development. *Cell Stem Cell*, 22(3), 310–324. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.011>
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., ... Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Schlaermann, P., & Meyer, T. F. (2016). A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gut*. <https://doi.org/10.1136/gutjnl->

2014-307949

- Simian, M., & Bissell, M. J. (2017). Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *Journal of Cell Biology*, 216(1), 31–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>
- Smits, L. M., Reinhardt, L., Reinhardt, P., Glatza, M., Monzel, A. S., Stanslowsky, N., ... Schwamborn, J. C. (2019). Modeling Parkinson's disease in midbrain-like organoids. *Npj Parkinson's Disease*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0078-4>
- Soltani, M. H., Pichardo, R., Song, Z., Sangha, N., Camacho, F., Satyamoorthy, K., ... Setaluri, V. (2005). Microtubule-associated protein 2, a marker of neuronal differentiation, induces mitotic defects, inhibits growth of melanoma cells, and predicts metastatic potential of cutaneous melanoma. *American Journal of Pathology*, 166(6), 1841–1850. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62493-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62493-5)
- Stott, S. R. W., Metzakopian, E., Lin, W., Kaestner, K. H., Hen, R., & Ang, S. L. (2013). Foxa1 and Foxa2 are required for the maintenance of dopaminergic properties in ventral midbrain neurons at late embryonic stages. *Journal of Neuroscience*, 33(18), 8022–8034. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4774-12.2013>
- Suzuki, S., Namiki, J., Shibata, S., Mastuzaki, Y., & Okano, H. (2010). The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 58(8), 721–730. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955609>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Trujillo, C. A., & Muotri, A. R. (2018). Brain Organoids and the Study of Neurodevelopment. *Trends in Molecular Medicine*, 24(12), 982–990. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.09.005>
- Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., & Sariboyaci, A. E. (2017). Cell and Tissue Culture. In D. Barh & V. Azevedo (Eds.), *Omics Technologies and Bio-engineering* (1st ed., p. 618). London, UK: Elsevier Inc.
- van Hoof, D., Krijgsveld, J., & Mummery, C. (2012). Proteomic analysis of stem cell differentiation and early development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*,

- 4(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008177>
- Vazin, T., & Freed, W. J. (2010). Human embryonic stem cells: Derivation, culture, and differentiation: A review. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 28(4), 589–603. <https://doi.org/10.3233/RNN-2010-0543>
- Walters, J., Pop, C., Scott, F. L., Drag, M., Swartz, P., Mattos, C., ... Clark, A. C. (2009). A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis. *Biochemical Journal*, 424(3), 335–345. <https://doi.org/10.1042/BJ20090825>
- Weihe, E., Depboylu, C., Schütz, B., Schäfer, M. K. H., & Eiden, L. E. (2006). Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(4–6), 659–678. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9053-9>
- Wilde, J. J., Petersen, J. R., & Niswander, L. (2014). Genetic, Epigenetic, and Environmental Contributions to Neural Tube Closure. *Annual Review of Genetics*, 48(1), 583–611. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092208>
- Workman, M. J., Mahe, M. M., Trisno, S., Poling, H. M., Watson, C. L., Sundaram, N., ... Wells, J. M. (2017). Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nature Medicine*, 23(1), 49–59. <https://doi.org/10.1038/nm.4233>
- Zhang, S. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 305. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.305>
- Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L., & Ma, L. (2012). Embryonic stem cell markers. *Molecules*, 17(6), 6196–6236. <https://doi.org/10.3390/molecules17066237>