



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Generación de organoides polarizados de mesencéfalo a partir de células troncales pluripotentes

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. ANGEL LIZANDRO POLANCO MALDONADO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. ITZEL ESCOBEDO AVILA

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO

Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS Delegación Puebla

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, AGOSTO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Generación de organoides polarizados de mesencéfalo a partir de células troncales pluripotentes

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biól. ANGEL LIZANDRO POLANCO MALDONADO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. ITZEL ESCOBEDO AVILA

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO

Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS Delegación Puebla

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

ENTIDAD INSTITUTO DE
FISIOLOGÍA CELULAR

OFICIO CPCB/520/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

LIC. DIANA GONZÁLEZ NIETO
Directora de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión (virtual) ordinaria del día 28 de marzo de 2022, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **POLANCO MALDONADO ANGEL LIZANDRO** con número de cuenta **311300732** con la tesis titulada **“Generación de organoides polarizados de mesencéfalo a partir de células troncales pluripotentes”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ITZEL ESCOBEDO AVILA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
Vocal: DR. VÁZQUEZ VICTORIO GENARO
Vocal: DRA. LOPEZ HUERTA VIOLETA GISSELLE
Vocal: DRA. ACOSTA TORRES LAURA SUSANA
Secretario: DRA. GUERRA CRESPO MAGDALENA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 3 de mayo 2022
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, por permitirme ser parte del programa de Maestría en Ciencias Biológicas.

Agradezco el apoyo otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM PAPIIT-UNAM IN212719 e IN2119122

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 272815) por la financiación para este proyecto, así como una beca para la realización de esta tesis.

Agradezco a mi tutora principal, la Dra. Itzel Escobedo Avila y a mi comité académico, la Dra. Magdalena Guerra Crespo y la Dra. Rosana Pelayo Camacho por el apoyo y asesoramiento desde mi incorporación al programa.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a mi familia, mi padre Mauricio Polanco Sierra y mi madre Gabriela Maldonado Ramos. Sin su apoyo no hubiera podido ni siquiera pensar en hacer un posgrado.

Agradezco a mi hermana Alejandra Polanco Maldonado y mi cuñado Bernardo Alanis. Por su apoyo y consejos en mi trayectoria académica y laboral, sobre todo por brindarme espacio para asuntos profesionales y sus consejos.

Agradezco a todos mis amigos, en esta ocasión no pondré ni un solo nombre porque solo ellos saben quiénes son y siempre me brindaron su apoyo cada que lo necesite.

Agradezco al Dr. Iván Velasco por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio y brindarme asesoramiento.

Agradezco al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT) y al laboratorio de micro y nanotecnología (uNTec) por el apoyo y soporte técnico.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, aunque fuera a distancia me gustó conocerlos.

Agradezco a la profesora Giselle Ochoa y al profesor Jorge Ramírez, siempre mis ejemplos a seguir desde que era niño.

Agradezco al profesor Saul Cano Colín, si no fuera por su guía y consejos desde que estaba en la licenciatura no me hubiera motivo a continuar este camino.

Finalmente, este trabajo y futuros trabajos están y estarán siempre dedicados a mi madre. La persona que más aportó y apoyo sin dudar mis decisiones.

What we do in life... echoes in eternity.

ÍNDICE

Contenido

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Desarrollo del sistema nervioso central	4
1.2 Desarrollo del mesencéfalo y formación de neuronas dopaminérgicas	6
1.3 Células troncales y organoides cerebrales como modelo de estudio del mesencéfalo	10
2. ANTECEDENTES	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3.1 Justificación	17
3.2 Pregunta de investigación	17
3.3 Hipótesis	17
3.4 Objetivo general	17
3.5 Objetivos particulares	17
4. MÉTODOS	18
4.1 Estrategia experimental	18
4.2 Diseño del prototipo del dispositivo de microfluídica	19
4.3 Fabricación del dispositivo de microfluídica	22
4.4 Generación de organoides de mesencéfalo polarizados	23
5. RESULTADOS	26
5.1 Diseño final del dispositivo de microfluídica	26
5.2 Prueba colorimétrica del dispositivo de microfluídica	27
5.3 Prueba de difusión en cultivos celulares 2D y 3D con calceína AM	30
6. DISCUSIÓN	36
7. CONCLUSIÓN	39
8. PERSPECTIVAS	39
9. REFERENCIAS	41

ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso (por sus siglas en inglés; Bone Morphogenetic Proteins)
DV	Dorso-ventral
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)
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)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PLO	Poli-L-ornitina
PSCs	Células troncales pluripotentes (por sus siglas en inglés; Pluripotent Stem Cells)
SHH	Sonic Hedgehog
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

RESUMEN

Durante el desarrollo del sistema nervioso central, se forma un eje dorsoventral como resultado de una señalización en centros organizadores con los morfógenos Sonic Hedgehog (SHH) desde la notocorda en la región ventral y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) desde el ectodermo dorsal. Estos morfógenos proporcionan una identidad neuronal a cada región del sistema nervioso central y específicamente en el mesencéfalo, inicia el programa de diferenciación hacia neuronas dopaminérgicas.

Dentro de los modelos de estudio para el desarrollo del mesencéfalo existe un tipo de cultivos celulares tridimensionales (3D) conocidos como organoides. Los organoides son cultivos celulares derivados de células pluripotentes o multipotentes con la capacidad de autoorganizarse y adquirir un arreglo celular parecido al desarrollo embrionario *in vivo*. Los organoides de mesencéfalo tienen particularmente una identidad ventral compuesta de neuronas dopaminérgicas tipo A10 y A9, el pigmento celular neuromelanina que es exclusivo de primates y actividad electrofisiológica, principalmente.

Sin embargo, no existen modelos celulares que representen la compleja estructura e identidad del mesencéfalo completo y con ello se dificulta el estudio del neurodesarrollo de esta región cerebral.

Por tal motivo, nosotros diseñamos y elaboramos dispositivos de microfluídica que pudieran generar un doble gradiente para difundir los morfógenos SHH y BMP4, con el objetivo de que puedan usarse para recrear la señalización de los centros organizadores del eje dorsoventral en la neurulación y generar organoides de mesencéfalo a partir de células pluripotentes humanas para obtener un modelo celular con un arreglo similar al mesencéfalo dorsal y ventral.

ABSTRACT

During central nervous system development, a dorsoventral axis forms due to morphogens signaling from organizing centers that involves Sonic Hedgehog (SHH) in the ventral notochord and bone morphogenetic proteins (BMPs) in the dorsal ectoderm. Providing a neuronal identity to each region of the central nervous system and specifically the midbrain, this initiates differentiation program towards dopaminergic neurons generation.

Brain organoids are Three-dimensional (3D) cell cultures derived from pluripotent or multipotent cells with the ability to self-organize and acquire a cell arrangement resembling embryonic development *in vivo*. Midbrain organoids particularly have a ventral identity composed of A10 and A9 dopaminergic neurons, the cellular pigment neuromelanin that is unique to primates, and electrophysiological activity.

However, there are no cellular models with the complex structure and identity of the whole midbrain, making it difficult to study the neurodevelopment in this brain region.

For this reason, we designed and elaborated microfluidic devices that could diffuse the SHH and BMP4 morphogens in a double gradient manner, with the objective to recreate the signalization of the organizing centers resembling the dorsoventral axis along neurulation and generated midbrain organoids from human pluripotent cells to obtain dorsoventral midbrain organoids.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Desarrollo del sistema nervioso central

Durante el desarrollo embrionario en vertebrados se forman 3 capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo; a través de diferentes mecanismos celulares y moleculares cada una dará origen a todos los tipos celulares, tejidos y órganos que conforman a un 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 más dorsal del ectodermo (neuroectodermo) mediante un evento de inducción neural (Gilbert & Barresi, 2016; Purves et al., 2018). Este proceso de la formación del sistema nervioso central se denomina neurulación e inicia en la notocorda, una estructura cilíndrica localizada en la región ventral adyacente al neuroectodermo, teniendo la función de inducir cambios mediante una señalización que guía el adecuado desarrollo de diferentes estructuras (los grupos de células que tienen esta función son conocidos como centros organizadores). Desde la notocorda hasta el neuroectodermo se expresa el morfógeno Sonic Hedgehog (SHH), posteriormente se establece la placa neural, compuesta de células epiteliales columnares pseudoestratificadas indiferenciadas (neuroepitelio). Debido a su alto grado de plasticidad, se les consideran los primeros precursores neurales que preceden a las células progenitoras neurales del sistema nervioso (Bergström & Forsberg-Nilsson, 2012; Gilbert & Barresi, 2016; Götz & Huttner, 2005).

De igual manera, en el ectodermo epidérmico de la región dorsal y la placa del techo se induce una señalización antagonista a SHH de miembros de la superfamilia de factores de crecimiento transformante β (TGF- β), específicamente, las proteínas morfogenéticas del hueso 4 y 7 (BMP4 Y BMP7). En conjunto, establecen un eje dorsoventral en el tubo neural por la acción de este doble gradiente e influenciando la identidad de cada región cerebral a lo largo de la neurulación (Bianchi, 2017; Choudhry et al., 2014; Gilbert & Barresi, 2016; Heussler & Suri, 2003; Li et al., 2005; Patten & Placzek, 2000).

La placa neural empieza a plegarse y se eleva hasta formar pliegues neurales, que migran hacia la línea media dorsal y forman el tubo neural, de forma simultánea se forma un surco neural en el centro de la placa neural (Figura 1). Del tubo neural se deriva el sistema nervioso central (SNC), y la médula espinal, mientras que el sistema nervioso periférico se

genera a partir de la cresta neural, localizada debajo del ectodermo suprayacente que da origen a la epidermis (Gilbert & Barresi, 2016).

Mediante una serie de especificaciones a nivel molecular, celular y tisular se generan las 3 vesículas cerebrales primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo; de las cuales derivan todas las estructuras que conforman al SNC.

La interacción del eje anteroposterior y dorsoventral se relaciona con otras vías de señalización, moléculas y factores transcripcionales, por ejemplo, la vía de señalización WNT, para ejercer influencia en las poblaciones celulares y definir la identidad de cada una de las estructuras del tubo neural y sus derivados (Figura 1) (Bianchi, 2017; Choudhry et al., 2014; Gilbert & Barresi, 2016; Heussler & Suri, 2003; Li et al., 2005; Patten & Placzek, 2000).

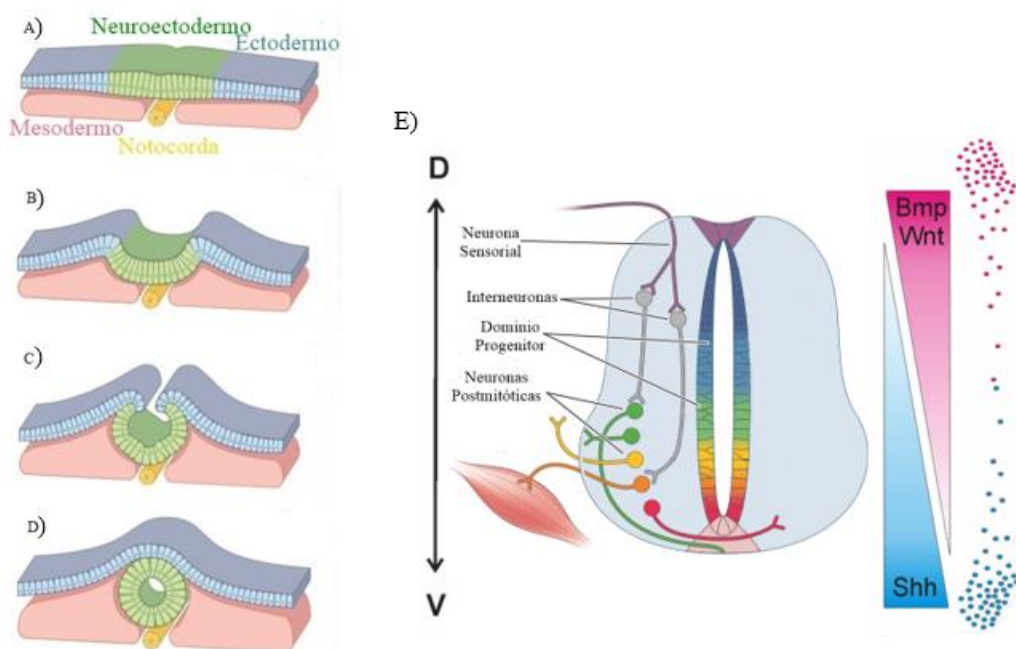


Figura 1. Formación del sistema nervioso central. A) Establecimiento de la placa neural (verde) por inducción de la notocorda (amarillo). B) Los bordes neurales se pliegan y elevan, en el centro de la placa neural se forma el surco neural. C) Los pliegues neurales convergen por la línea media dorsal del embrión. D) Cierre del tubo neural. E) Establecimiento de diferentes poblaciones celulares: neuronas sensoriales, interneuronas, progenitores neurales y neuronas postmitóticas; debido a la influencia de la señalización dorsoventral entre BMP 4, BMP 7, WNT y Sonic Hedgehog. (Modificado de Wilde, *et al.* 2014; Gilbert & Barresi, 2016)

1.2 Desarrollo del mesencéfalo y formación de neuronas dopaminérgicas

El mesencéfalo o cerebro medio está delimitado e influenciado durante su desarrollo por diferentes dominios moleculares, celulares, centros organizadores y estructurado en un eje anteroposterior y un eje dorsoventral. El organizador ístmico (IsO), es un elemento esencial durante la regionalización del mesencéfalo y el rombencéfalo, de este se expresa gradualmente el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8), de mayor a menor concentración desde el borde del mesencéfalo-rombencéfalo (MHB) hacia el prosencéfalo. De igual manera, se expresa el factor de transcripción OTX2 (Orthodenticle homeobox 2) que tiene una función antagonista con FGF8 y el factor de transcripción de la familia PAX (Paired Box), PAX6, delimitando el borde del prosencéfalo y mesencéfalo. Debido a esto, los genes de la familia engrailed como EN1 y EN2, los factores de transcripción de PAX2 y PAX5, y la vía de señalización WNT se activan en el IsO y el mesencéfalo, mientras que, los factores de transcripción PAX3 y PAX7 se expresan exclusivamente en el mesencéfalo. Esta compleja interacción entre factores de transcripción, morfógenos y vías de señalización le da identidad al mesencéfalo (Figura 2) (Gale & Li, 2008; Nakamura, 2013; Puelles & Rubenstein, 2003).

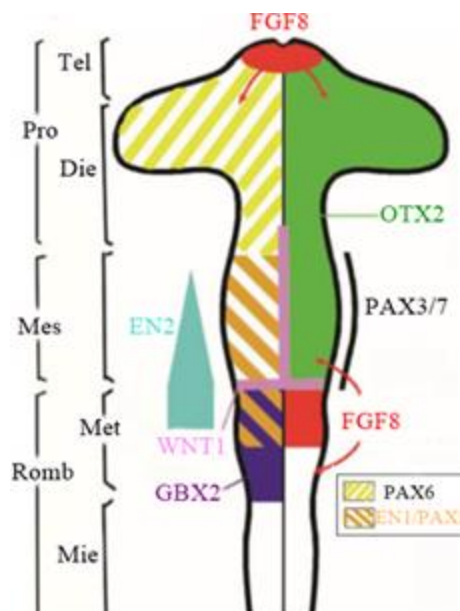


Figura 2. Desarrollo del mesencéfalo ventral. Señalización anteroposterior del tubo neural, los dominios moleculares y la señalización anteroposterior del tubo neural influye en el desarrollo del mesencéfalo ventral. En el mesencéfalo (Mes) y organizador ístmico (IsO) se expresa EN2, EN1, PAX2, PAX5. Por su parte, WNT1, PAX3 y PAX7 se expresa en el mesencéfalo, mientras que FGF8 se expresa en el IsO y la cresta neural, PAX6 y OTX2 se expresan en mesencéfalo y prosencéfalo (Pro). Finalmente, GBX2 se expresa en el metencéfalo (Met). (Modificado de Gale & Li, 2008; Nakamura, 2013)

Subsecuentemente a este proceso, las células neuroepiteliales de la placa del piso del mesencéfalo ventral (MesV) entran en un proceso de diferenciación a neuronas dopaminérgicas (DAN), el linaje celular predominante del mesencéfalo y principal tipo celular afectado en la enfermedad de Parkinson (PD). Como ya se ha mencionado, la notocorda es un centro organizador involucrado en la diferenciación dopaminérgica, el cuál después de expresar SHH inicia una cascada de señalización con diferentes pasos (Figura 3). Primeramente, se induce la expresión del factor de transcripción FOXA2 (Forkhead Box 2) y los factores de transcripción LIM como LMX1A y LMX1B, convirtiendo a la línea media ventral en una zona de proliferación que definirá la identidad de las DAN, posteriormente se expresa el factor de transcripción MSX1 que junto a FOXA2 induce la neurogénesis mediante la regulación de neurogenina 2 (NGN2). Estos progenitores dopaminérgicos migran a una zona intermedia en la placa del piso donde se vuelven postmitóticos y empiezan a expresar β -tubulina III y el receptor nuclear NURR1 (nuclear receptor related protein 1), finalmente, las células NURR1+ migran a una zona periférica (zona ventricular) donde expresan tirosina hidroxilasa (TH) y el factor de transcripción PITX3 (pituitary homeobox 3) para llegar a diferentes estructuras y establecer subgrupos de DAN. Por ejemplo, el subgrupo de DAN A9 en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) que proyecta al estriado dorsolateral, regulan funciones motoras, este subgrupo es susceptible de una neurodegeneración en la PD, la que se caracteriza por presentarse en la mayoría de los casos, inclusiones citoplásmicas llamadas cuerpos de Lewy en las DAN A9. Por otro lado, el subgrupo de DAN A10 en el área ventral tegmental, que proyecta al estriado ventromedial, áreas corticales y el sistema límbico, regula funciones conductuales y asociadas con síntomas no motores de la PD (Arenas et al., 2015; Dauer & Przedborski, 2003; Gale & Li, 2008; Krashia et al., 2019).

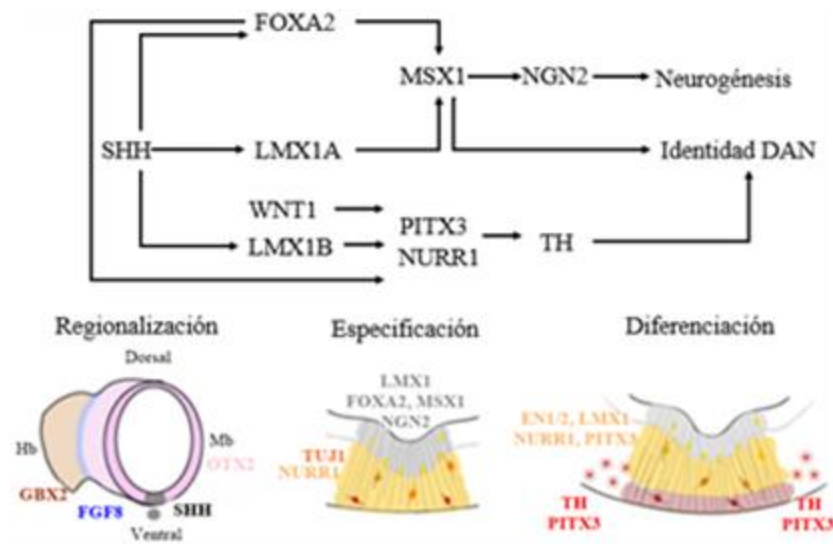


Figura 3. Diferenciación dopaminérgica. En la diferenciación dopaminérgica del mesencéfalo ventral, la expresión de SHH regula la expresión de FOXA2, LMX1A y LMX1B, posteriormente, se induce la expresión de MSX1, que junto a FOXA2 activan la expresión de NGN2 para regular la neurogénesis (zona proliferativa en gris). Mientras tanto, MSX1 y LMX1A determinan la identidad de neuronas dopaminérgicas (zona intermedia en amarillo), LMX1B actúa junto a WNT1 y FOXA2 para regular la expresión de PITX3 y NURR1 que al final del proceso de diferenciación inducen la expresión de tirosina hidroxilasa (zona de migración en rojo) para terminar de definir las neuronas dopaminérgicas (Modificado de Gale & Li, 2008; Nakamura, 2013)

En cuanto al mesencéfalo dorsal, el colículo superior, el colículo inferior y la sustancia gris periacueductal son las áreas principales del eje rostro-dorsal del mesencéfalo con la función de control motivacional, atención, regulación motora y sensorial; teniendo neuronas excitadoras (glutamatérgicas) e inhibitoras (GABAérgicas) como el tipo neuronal dominante (Arimura et al., 2019).

No se conoce muy bien el desarrollo embrionario del mesencéfalo dorsal, pero se han podido detectar progenitores neurales en una zona mitótica de la superficie ventricular. Así mismo, la expresión de PAX6 y la vía de cinasas-Jun N-Terminal activa (JNK) se ha observado en neuronas post-mitóticas que migran de esta región a la zona ventricular (zona de interfase) donde se dividen en subgrupos que empiezan a adquirir características de identidad de neuronas glutamatérgicas expresando principalmente Neurog2, TBR2 y NeuroD

(Figura 4). Otros subgrupos pueden tener identidad de neuronas GABAérgicas con linajes ASCL1- y GATA2- positivos en la zona de interfase o GAD67 en los límites de la zona ventricular y la zona de interfase. Finalmente por migración celular regulada por la vía de JNK se piensa que llegan al mesencéfalo dorsal y terminan su maduración (Arimura et al., 2019).

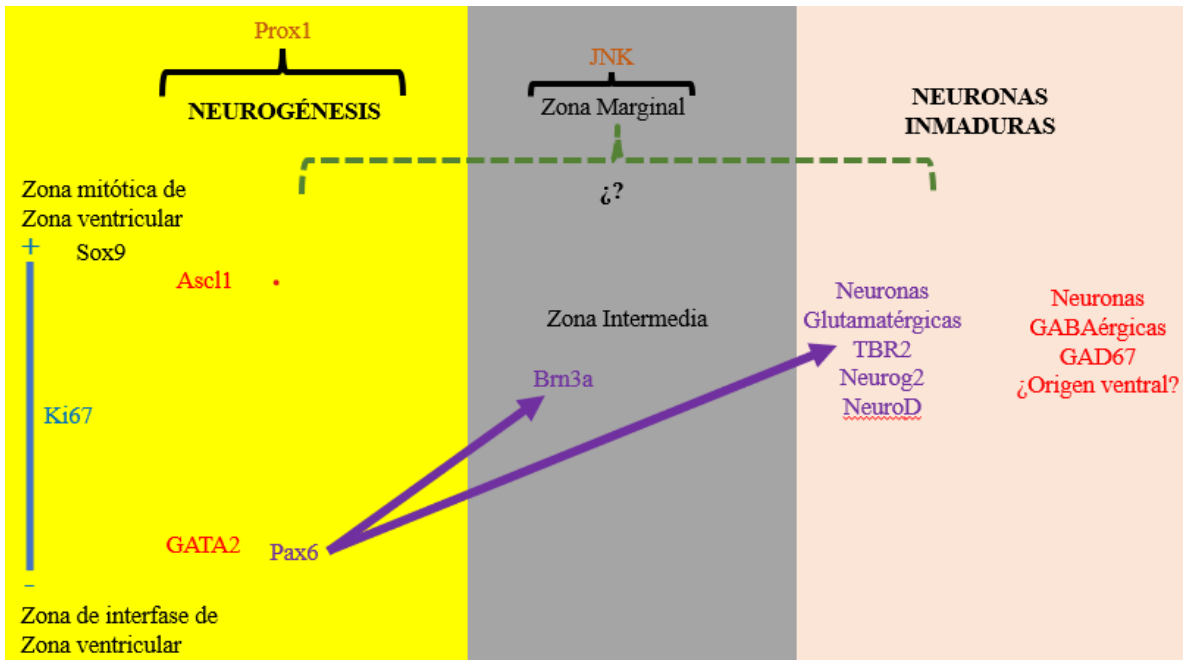


Figura 4. Desarrollo del mesencéfalo dorsal. En el desarrollo del mesencéfalo dorsal se han encontrado dos regiones en la zona ventricular definidas por la presencia del marcador de proliferación celular Ki67 y reguladas por Prox1: 1) la zona mitótica, donde se ha observado la expresión de Sox9 y el marcador GABAérgico Ascl1, y 2) la zona de interfase donde se ha observado el marcador GABAérgico GATA2. En esta misma zona se ha visto la expresión de Pax6 como regulador de la diferenciación glutamatérgica en la Zona intermedia y en la fase de neuronas inmaduras. Todas las regiones del mesencéfalo dorsal se han observado están influenciadas por la vía de cinasas-Jun N-Terminal activa (JNK). Por otro lado, el origen de las neuronas GABAérgicas GAD67 parece ser en la región ventral del mesencéfalo (Modificado de Arimura, 2019)

1.3 Células troncales y organoides cerebrales como modelo de estudio del mesencéfalo

Las células troncales tienen una alta capacidad de autorrenovación para perpetuarse a sí mismas y una gran plasticidad de diferenciación. De acuerdo con estas características, se clasifican en: totipotencial cuando pueden generar todas las células embrionarias y extraembrionarias, pluripotencial cuando pueden generar todas las células embrionarias y multipotencial cuando pueden generar linajes celulares restringidos. A partir de estas características y la posibilidad de aislarlas, mantenerlas y diferenciarlas *in vitro*, han surgido diferentes protocolos y métodos para poder estudiar el desarrollo embrionario, causas de enfermedades, fármacos, terapia y regeneración celular (Biehl & Russell, 2009; Chagastelles & Nardi, 2011; Gilbert & Barresi, 2016; Mayani, 2003).

Tal es el caso del mesencéfalo y la PD, donde los estudios en modelos animales, cultivos primarios y cultivos de líneas celulares se han complementado con los avances en el área de células troncales embrionarias (ESC), las cuales son células pluripotentes que se derivan de la masa celular interna del blastocisto en el desarrollo embrionario; células troncales neurales (NSC), que son células multipotenciales restringidas a un linaje neuronal y células pluripotentes inducidas (iPSC), que son células troncales pluripotentes que pueden obtenerse mediante un proceso de reprogramación celular de fibroblastos. Las ESC, NSC e iPSC pueden utilizarse en protocolos específicos para estudiar el neurodesarrollo y neuropatologías al ser tratados con moléculas neurogénicas específicas (Bergström & Forsberg-Nilsson, 2012; Lopes et al., 2017).

La mayoría de los estudios *in vitro* del desarrollo embrionario del mesencéfalo y la PD se han realizado en cultivos celulares bidimensionales (2D) permitiendo estudiar aspectos fenotípicos, fisiológicos, moleculares y genéticos. Sin embargo, los cultivos celulares 2D tienen deficiencias y limitaciones en representar el microambiente tridimensional, la organización, la heterogeneidad celular, las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular y la señalización celular que se encuentran en estructuras embrionarias *in vivo*. Por este motivo, el uso de cultivos celulares tridimensionales (3D) es una alternativa que ha ido evolucionando constantemente en el área de las células troncales y la biología del desarrollo (Duval et al., 2017; Lopes et al., 2017; Uysal et al., 2017).

Los organoides son un tipo de cultivo celular tridimensional 3D que contiene múltiples tipos celulares y es generado a partir de tejido primario, células troncales pluripotentes y multipotentes, además de tener la capacidad de autoorganizarse y exhibir una funcionalidad similar al órgano o tejido *in vivo* del que se deriva (Clevers, 2016; Fatehullah et al., 2016; Lancaster & Knoblich, 2014). Actualmente existen diferentes tipos de organoides, por ejemplo, hepático, gastrointestinal y glandular entre otros; de igual importancia, desde el 2013 han surgido los organoides cerebrales que han mostrado potencial para estudiar aspectos relacionados al desarrollo, fisiología y patologías del cerebro (Lancaster et al., 2013; Matano et al., 2015; Sato et al., 2009; Schlaermann et al., 2016).

Originalmente, la metodología para generar organoides cerebrales se basaba en la capacidad de autoorganización y los mecanismos morfogenéticos intrínsecos de las células, guiándose inespecíficamente por una matriz extracelular sintética (matrigel) y moléculas neurogénicas que comprometen las células a un linaje neuroectodérmico. El resultado eran organoides cerebrales que presentaban progenitores neurales y neuronas pertenecientes a las tres vesículas cerebrales primarias. Posteriormente, estos organoides fueron denominados como “organoides de cerebro completo” u “organoides no dirigidos” (Miura & Pasca, 2019; Pasca, 2019).

En consecuencia, se han implementado variaciones metodológicas en la generación de organoides, buscando especificar y asemejar de mejor manera regiones cerebrales específicas (Figura 5). El uso de moléculas neurogénicas involucradas en vías de señalización para la diferenciación de un linaje neuronal específico o una sola región cerebral ha permitido la generación de “organoides de región específica” u “organoides dirigidos”, capaces de tener una organización e identidad celular similar al de una sola región cerebral (por ejemplo, el mesencéfalo) (Kim et al., 2019; Miura & Pasca, 2019; Monzel et al., 2017; Xiang et al., 2019).

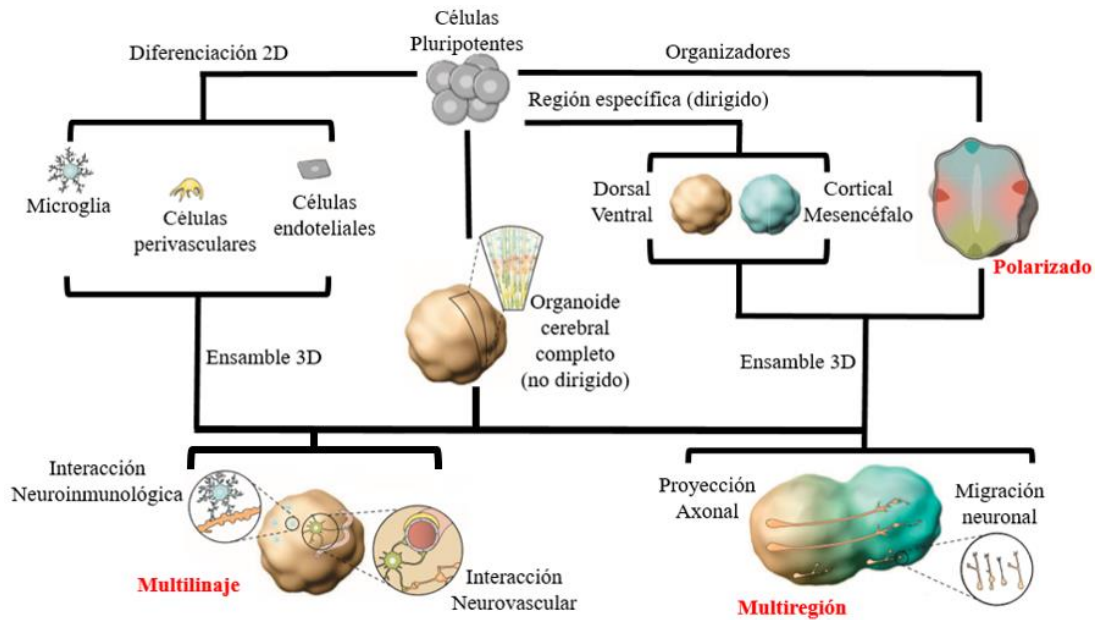


Figura 5. Tipos de organoides cerebrales. Los organoides cerebrales pueden generarse a partir de células pluripotenciales o multipotenciales. Mediante el uso de moléculas pequeñas neurogénicas se crea una identidad cerebral completa (no dirigida) o regionalizada (dirigida), que en combinación con cultivos *in vitro* bidimensionales se forma un ensamble 3D resultando en un organoide multilínea que permite estudiar interacciones neuroinmunológicas y neurovasculares. Por otro lado, en un ensamble 3D también es posible al fusionar organoides regionalizados de diferente origen o utilizando moléculas con función organizadora (organoide polarizado), crear organoides multirregión para estudiar proyección axonal y migración neuronal.

La experimentación con organoides cerebrales dirigidos y no dirigidos ha demostrado que es posible recrear interacciones tridimensionales entre poblaciones celulares de diferente linaje o de diferentes regiones cerebrales, dando origen a “organoides de ensamble 3D”. En este tipo de organoides es posible estudiar interacciones neuroinmunológicas (organoides cerebrales multilínea) y migración neuronal (organoides cerebrales multirregión) (Pasca, 2019).

De igual manera, el avance biotecnológico y la innovación de ingeniería en dispositivos de microfluídica indican que es posible simular la actividad de centros organizadores con precisión en espacio y tiempo, activando vías de señalización parecidas a las del desarrollo embrionario *in vivo* (Manfrin et al., 2019; Ronaldson-Bouchard & Vunjak-Novakovic, 2018). Esto abre la posibilidad de generar “organoides polarizados” con una estructura y organización celular influenciada por un eje anteroposterior o dorsoventral con mayor exactitud.

Por otra parte, los organoides de mesencéfalo humano (hMO) mantienen características que asemejan el desarrollo embrionario *in vivo* del mismo, con presencia de estructuras parecidas a rosetas compuestas de células troncales neurales y precursores neurales. Debido a la especificación y regionalización que activa la vía de SHH estos precursores neurales de placa de piso de mesencéfalo se comprometen a un linaje dopaminérgico generando neuronas dopaminérgicas inmaduras y maduras. Incluso hay reportes que indican la presencia de DAN tipo A9 y A10 con actividad electrofisiológica, otra característica que se ha observado es la presencia de neuromelanina, un pigmento que se acumula en la SNpc que es exclusiva de primates y cuya función es desconocida (Jo et al., 2016; Monzel et al., 2017).

Las DAN de organoides de mesencéfalo también presentan complejas interacciones con otros tipos celulares (glia, neuronas gabaérgicas y serotoninérgicas) en un ambiente tridimensional, mientras que el perfil transcriptómico de los hMO comparte niveles de expresión parecidos a los del estado prenatal, un estado que no había podido ser caracterizado en cultivos celulares 2D. Al igual que los demás organoides cerebrales, los hMO presentan actividad electrofisiológica en DAN y los demás tipos de neuronas (Jo et al., 2016; Lisa Maria Smits & Schwamborn, 2020).

Como se había mencionado previamente, el mesencéfalo y las DAN se asocian a la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial, la PD y los hMO permiten estudiar los componentes relacionados con el desarrollo de esta región cerebral y características patológicas de la PD. Por ejemplo, mediante modificación genética se han generado hMO con la mutación G2019S del gen LRRK2 asociado a PD, mostrando una reducción considerable en el número de DAN y la red neuronal dentro de los hMO, una reducción en el tamaño de neuritas de las DAN e incluso se pudo tratar estos hMO con un inhibidor de LRRK2 mostrando la susceptibilidad de los organoides a pruebas terapéuticas (Lisa M. Smits et al., 2019). Son escasos los reportes de hMO, sin embargo, han dejado claro su potencial uso y han abierto el camino para optimizar y mejorar los protocolos para generar organoides con mayor reproducibilidad y precisión para representar el desarrollo del mesencéfalo (Kim et al., 2019; Lisa M. Smits et al., 2019; Lisa Maria Smits & Schwamborn, 2020).

2. ANTECEDENTES

Mohammed *et al.* en el 2019 desarrollaron un protocolo para generar organoides de mesencéfalo ventral humano (hMO) donde se podían obtener células positivas para TH, TUJ1 y MAP2 desde el día 30 y 50 de diferenciación. En nuestro grupo de investigación evaluamos estos marcadores junto a otros como LMX1A, OTX2, Calbindina, GIRK2, KI67 y SOX2 en diferentes días de diferenciación. Observamos que los hMO presentaron poblaciones celulares de precursores neurales y linaje dopaminérgico; así como poblaciones celulares positivas para los marcadores de linaje dopaminérgico FOXA2, LMX1A, nestina, OTX2, β -Tubulina III y TH desde el día de diferenciación 14, algo que no se había reportado en cultivos celulares 2D y organoides de mesencéfalo (Figura 6). 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.

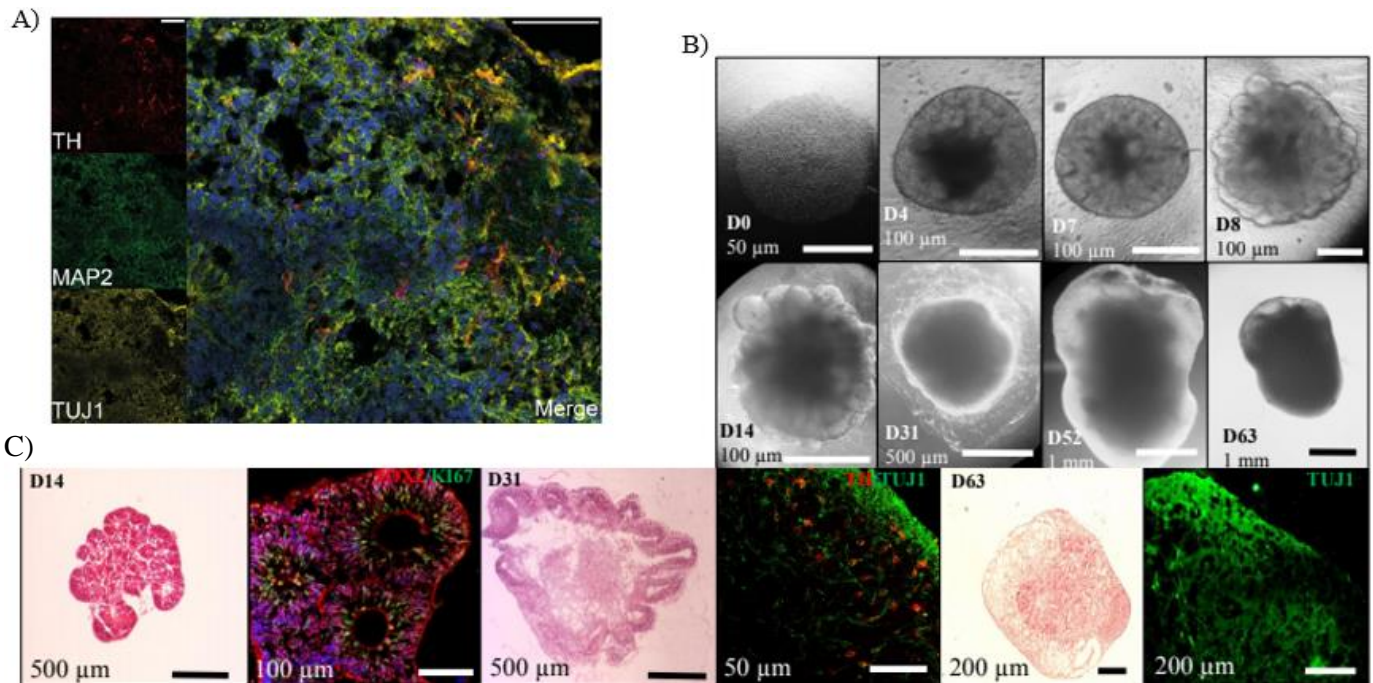


Figura 6. Organoides de mesencéfalo ventral humano. A) hMO presenta marca de TH, MAP2 y TUJ1 en el día 50 de diferenciación, en el protocolo de Mohammed *et al.* 2019. B) Imágenes de campo claro de la generación de hMO del día 0 al día 63, mostrando las etapas de crecimiento de organoides cerebrales dadas por Lancaster *et al.* 2019 que son: Cuerpo embrioide (día 4) y brotes de neuroectodermo (día 8). C) También notamos la presencia de estructuras parecidas a rosetas neurales con tinción H&E y mediante inmunotinciones vimos la marca de SOX2, KI67 (precursor neural) en el día 14 de diferenciación y TH/TUJ1 (linaje dopaminérgico) en el día 31 y 63 de diferenciación. Modificado de Mohammed *et al.* 2019 y tesis de licenciatura Angel Polanco, 2020

Recientemente, el uso de la biotecnología y microfluídica ha demostrado, que es posible complementar y mejorar los modelos celulares existentes para recrear las vías de señalización del desarrollo *in vivo*, siendo tecnologías y herramientas con uso potencial para la generación de organoides cerebrales (Figura 7). Por ejemplo, se han usado agregados celulares embebidos en organoides corticales que sobreexpresan SHH con un sistema dependiente de doxiciclina, creando un efecto ventralizante en la identidad del organoide cerebral (Cederquist et al., 2019). También se han utilizado dispositivos de microfluídica en cultivos celulares 2D de ESC para difundir a manera de gradiente un inhibidor de la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK3i) creando un efecto caudalizante (Rifes & Kikerby, 2020).

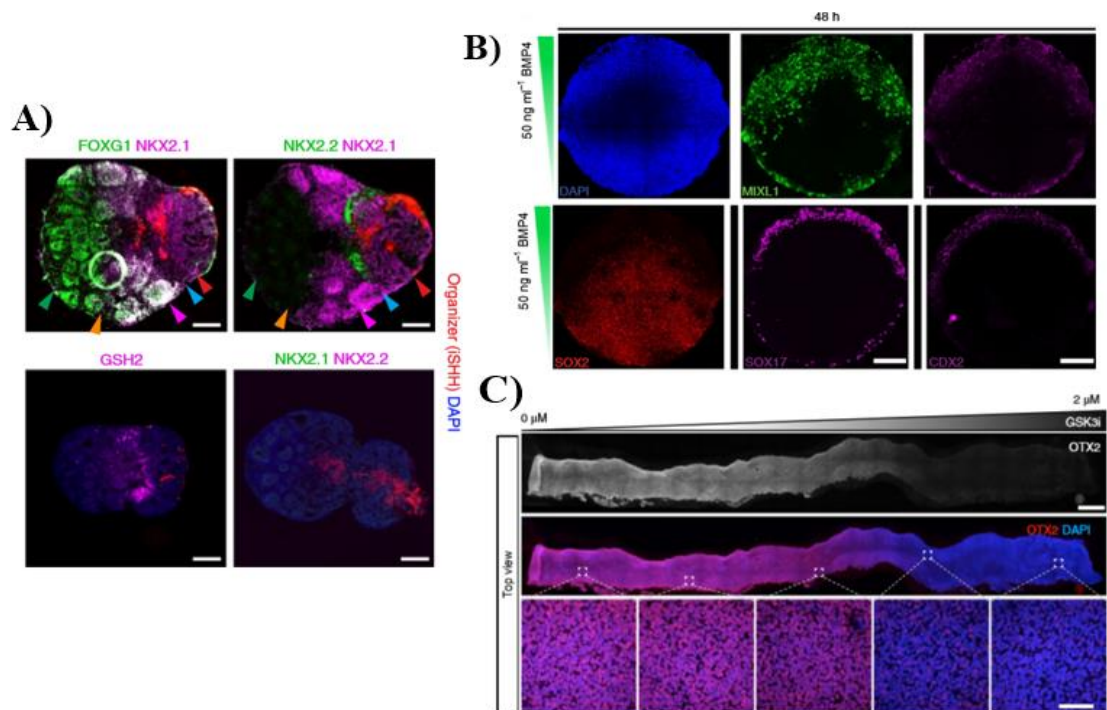


Figura 7. Uso de la biotecnología microfluídica en los cultivos celulares. A) Organoide cortical polarizado mostrando el organizador que sobreexpresa SHH (en rojo) y las poblaciones celulares corticales FOXG1 (verde), FOXG1/NKX2.1 (blanco) y NKX2.1 (morado) en un arreglo similar a las capas corticales. B) Colonia de hESC expuesta a un gradiente de BMP4 durante 48 horas, mostrando una distribución asimétrica de marcadores de línea primitiva. C) Estructura parecida a tejido generada a partir de hESC al ser expuesta a un gradiente de WNT mostrando una caudalización correspondiente a la regionalización del del tubo neural (Modificado de Cederquist *et al.* 2019, Manfrin *et al.* 2019 y Rifes *et al.* 2020)

Struder *et al.* en 2019 fueron los primeros en generar organoides cerebrales polarizados al recrear la vía de señalización de SHH. Colocaron agregados celulares que

sobreexpresaban SHH en la región ventral de organoides corticales difundiendo a manera de gradiente el morfógeno, causando que las poblaciones celulares corticales fueran seccionadas y específicas en un eje dorsoventral, sin embargo, en etapas maduras de diferenciación los agregados celulares se incorporaban al organoide cortical y se dispersaban por toda la superficie, perdiendo la capacidad de sobreexpresar SHH desde un solo punto del organoide (Cederquist et al., 2019).

Ese mismo año del 2019, Lutolf *et al* diseñaron un dispositivo de microfluídica con la capacidad de distribuir a manera de gradiente BMP4 en colonias de hESC, como resultado las colonias de hESC tuvieron una diferenciación similar a la línea primitiva *in vivo*, donde se podían distinguir diferentes dominios celulares dependiendo de la exposición al gradiente de concentración (Manfrin et al., 2019).

En 2020, Kikerby *et al.* utilizaron un dispositivo de microfluídica para generar un gradiente de WNT1 en hESC recreando una de las vías de señalización principales en el desarrollo del tubo neural, como resultado de esta exposición, se formó una estructura parecida a tejido con poblaciones celulares pertenecientes a prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo distribuidas en un eje caudal similar al del tubo neural (Rifes et al., 2020).

En este trabajo, desarrollamos un dispositivo de microfluídica que permitiera difundir dos morfógenos (SHH y BMP4) para recrear el eje dorsoventral que se forma durante la neurulación en organoides de mesencéfalo derivados de células troncales pluripotentes como la línea celular H9.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 Justificación

Debido al potencial que han mostrado los organoides en el estudio del desarrollo del mesencéfalo, es necesario optimizar la generación de organoides de mesencéfalo (hMO) utilizando herramientas de microfluídica.

3.2 Pregunta de investigación

¿Es posible recrear la señalización de SHH y BMP4 presentes durante la formación del mesencéfalo *in vivo*, mediante un dispositivo de microfluídica?

3.3 Hipótesis

Modelar la señalización dorsoventral de SHH y BMP4 usando dispositivos de microfluídica, permitirá obtener organoides de mesencéfalo polarizados.

3.4 Objetivo general

Establecer un protocolo para generar organoides de mesencéfalo derivados de PSC humanas en un gradiente dorsoventral que modelen la identidad celular del mesencéfalo.

3.5 Objetivos particulares

- Generar organoides de mesencéfalo humano derivados de PSC.
- Diseñar un dispositivo de microfluídica que genere un doble gradiente
- Evaluar que el dispositivo de microfluídica genere un doble gradiente
- Difundir morfógenos ventralizantes (SHH) y dorsalizantes (BMP4) a manera de gradiente en los organoides de mesencéfalo humano que asemejen la formación del eje dorsoventral del mesencéfalo.

4. MÉTODOS

4.1 Estrategia experimental

- Diseñar un dispositivo de microfluídica que pueda difundir un doble gradiente en un cultivo celular 3D
- Comprobar la difusión del doble gradiente en cultivos celulares 2D (monocapa adherente) con calceína AM.
- Definir la difusión y concentración óptima de los morfógenos para la generación de hMO.
- Generar hMO derivados de la línea celular H9 en el dispositivo de microfluídica.

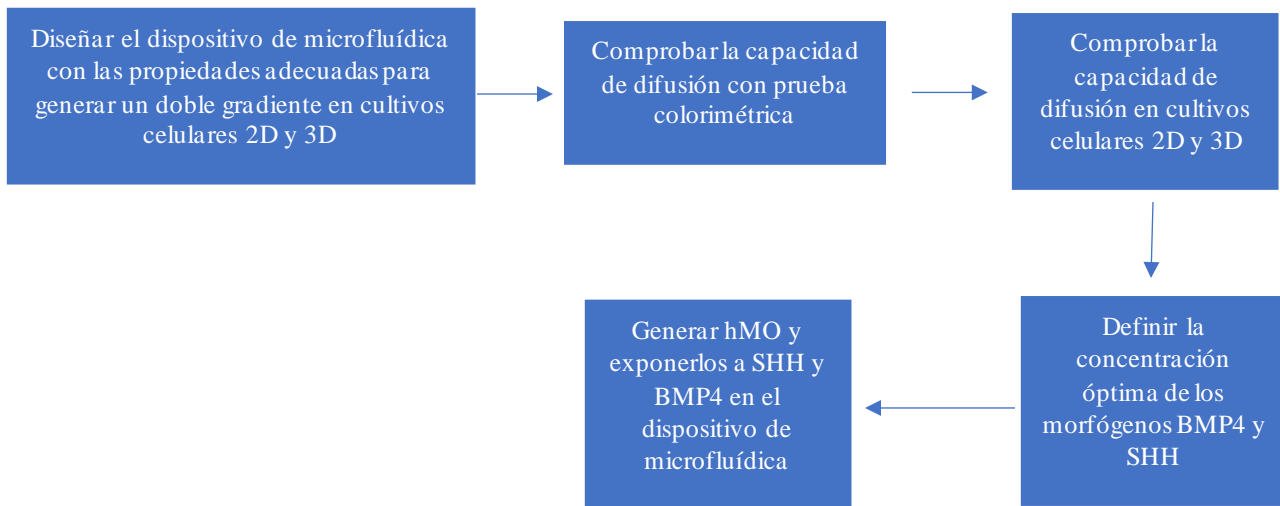


Figura 8. Estrategia experimental para la generación de organoides polarizados de mesencéfalo a partir de células troncales pluripotentes

4.2 Diseño del prototipo del dispositivo de microfluídica

Dentro de la amplia gama de materiales de nanotecnología en el diseño y fabricación de dispositivos de microfluídica, uno de los más utilizados es el polidimetilsiloxano (PDMS), un elastómero de silicona con alta maleabilidad, permeabilidad a gas, transparencia óptica, flexibilidad y bio-compatibilidad (no es citotóxico) (Halldorsson et al., 2015).

Por tal motivo, se utilizó PDMS como la materia prima en el prototipo inicial y en colaboración con el Laboratorio de Micro y Nanotecnología (uNTec) de LaNSBioDyT, UNAM, a cargo de los Dres. Mathieu Hauefeuille, Diego Zamarron Hernández y Aarón Cruz Ramírez se diseñó la primera versión del chip de microfluídica (Figura 9).

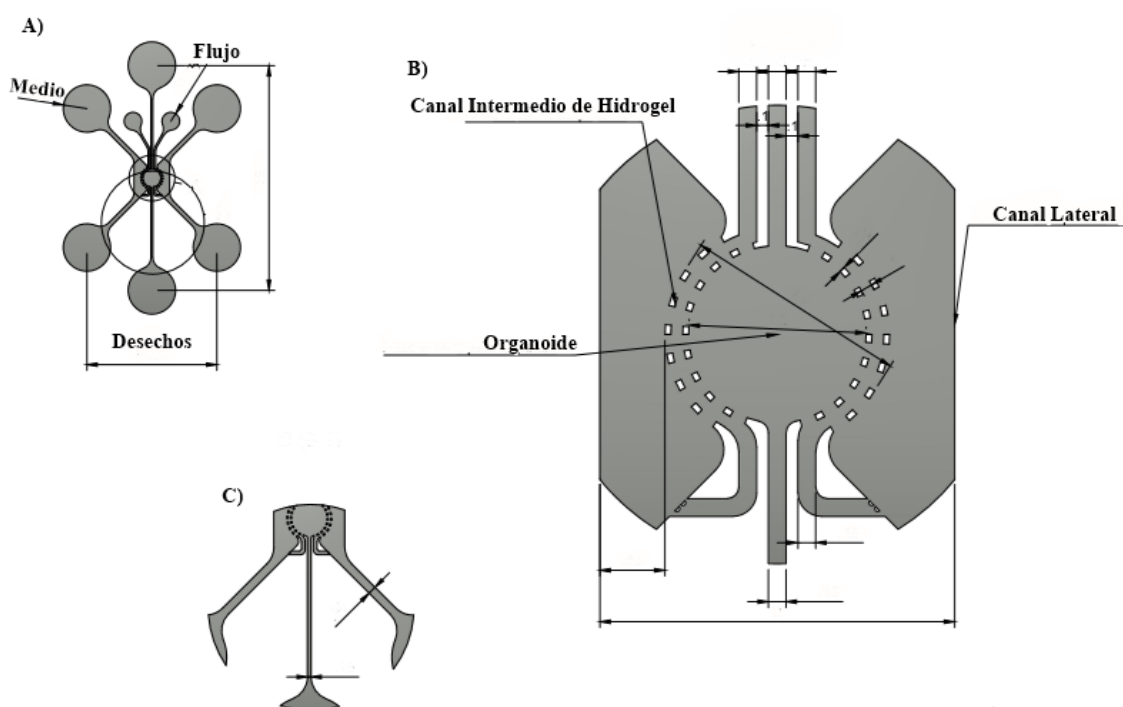


Figura 9. Diseño del prototipo inicial del dispositivo de microfluídica en el software Inventor. A) Vista general del dispositivo de microfluídica, donde se observan los pozos laterales donde se coloca el medio de cultivo, el pozo superior de flujo que se encarga de retirar el medio de cultivo hacia los pozos de desecho. B) Acercamiento al canal central del dispositivo de microfluídica, se muestra el canal intermedio de hidrogel donde se forma la barrera que distribuye a manera de gradiente el medio de cultivo celular y el pozo central donde se encuentra el organoide. C) Segunda versión de la forma de los pozos de desechos.

El diseño inicial del dispositivo de microfluídica fue modificado de acuerdo a las sugerencias del equipo de LaNSBioDyT, ya que a pesar de cumplir con la difusión no era

posible tener un flujo constante que mantuviera en equilibrio la difusión con respecto al tiempo.

Por tal motivo, el nuevo diseño de este prototipo está basado en el chip de gradiente comercial Fluidic 834 de la empresa alemana ChipShop, con modificaciones (detalles geométricos y dimensiones) para adaptar los propósitos del proyecto y se realizó mediante el software Autodesk Inventor que es utilizado en el diseño de herramientas y productos para impresión 3D. En la figura 10, se muestran dos canales de entrada donde el medio de cultivo se coloca con cada morfógeno respectivamente y a través de la bifurcación de tres bloques se llega a la zona de gradiente donde hay una interfase de hidrogel y la cámara del organoide que permite difundir a manera de gradiente los morfógenos que se añaden a cada medio de cultivo hacia el organoide y mediante un canal de salida se distribuye un flujo encargado de retirar los desechos del medio de cultivo (Figura 10).

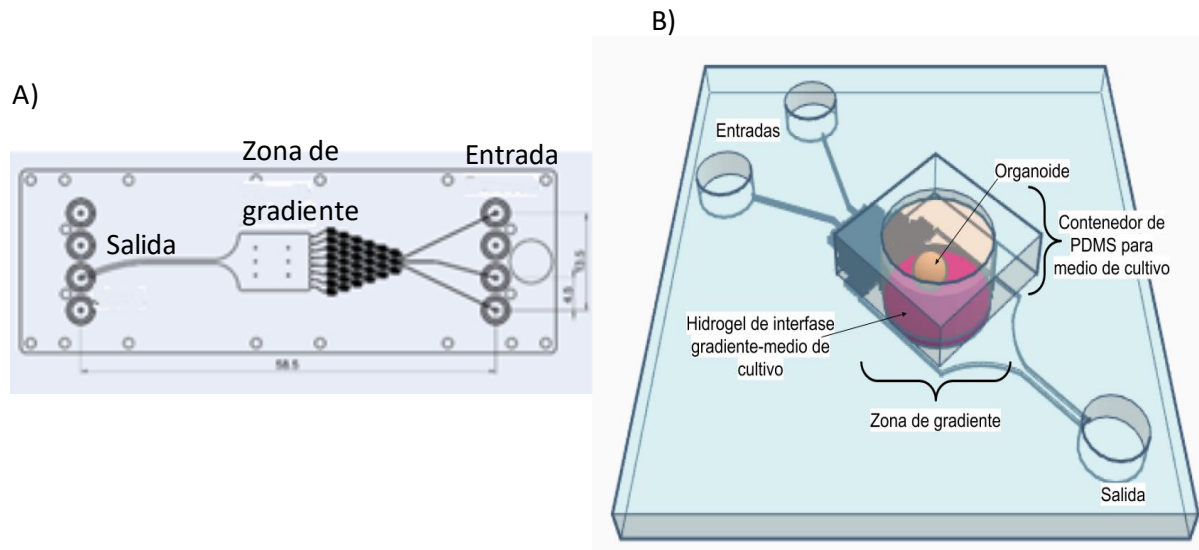


Figura 10. Diseño del segundo prototipo del dispositivo de microfluídica. A) Chip de gradiente comercial (Fluidic 834) utilizado como base para diseñar una segunda versión del dispositivo de microfluídica para organoides. B) Diseño del prototipo en inventor adaptado para PPGT+ y elaborar el molde maestro en silicona o resina.

Una vez obtenido el diseño final, se hicieron pruebas de difusión simuladas en el programa COMSOL Multiphysics, un software que permite hacer simulaciones con propiedades eléctricas, mecánicas, fluídicas, acústicas y químicas, siendo utilizado en este caso para asegurar la estabilidad de la difusión en el diseño del dispositivo de microfluídica previo a su fabricación (Figura 11).

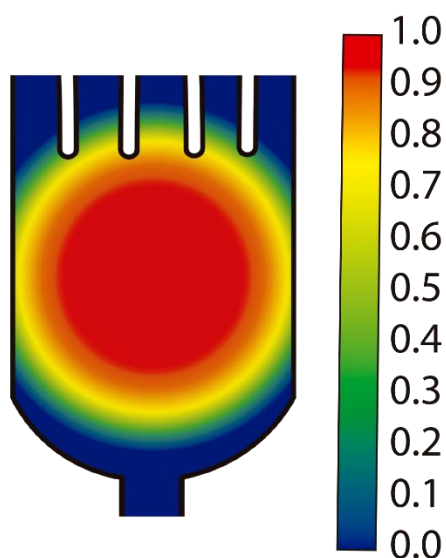


Figura 11. Simulación de difusión en COMSOL Multiphysics. Se simuló la estabilización del gradiente de difusión en el diseño final del dispositivo de microfluídica con respecto al tiempo, en la barra lateral se muestra un gradiente de color de menor (azul) a mayor (rojo) estabilización, misma que es cuantificada en términos de estabilidad (0, no hay estabilidad y 1, hay estabilidad). Se utilizó agua como fluido en la simulación.

Al tener la versión final del dispositivo de microfluídica, se hicieron pruebas de simulación de la estabilidad de difusión en periodos de tiempo cortos (2 segundos) y se observó que la generación del gradiente es rápida y estable siempre y cuando el flujo sea constante, sin pérdida de difusión (Figura 11).

Para comprobar las simulaciones de COMSOL Multiphysics se fabricó el diseño final del dispositivo de microfluídica para pruebas colorimétricas y poner a prueba la estabilidad de difusión mostrada en el modelo computacional.

4.3 Fabricación del dispositivo de microfluídica

Para este tipo de estructuras nanométricas se utilizó Photonic Professional GT+ (PPGT+), donde los parámetros fueron adaptados para la resolución y volumen necesarios en el programa Nanoscribe. Este proceso de polimerización por absorción de dos fotones (fotopolimerización) consiste en polimerizar una resina o silicona de forma lineal por absorción de luz UV.

Una vez que se obtuvo el molde, se realizaron réplicas de PDMS mediante una proporción 10:1 de la base y el agente curante respectivamente. Se eliminaron burbujas de aire con sellado a vacío y se colocó el PDMS en el molde, manteniéndolo a 60° durante una hora en un horno para la solidificación. Se realizaron perforaciones para las entradas y salidas del chip y finalmente, por descarga corona (ionización mediada por gas) se unió electrostáticamente a un portaobjetos (Figura 12).

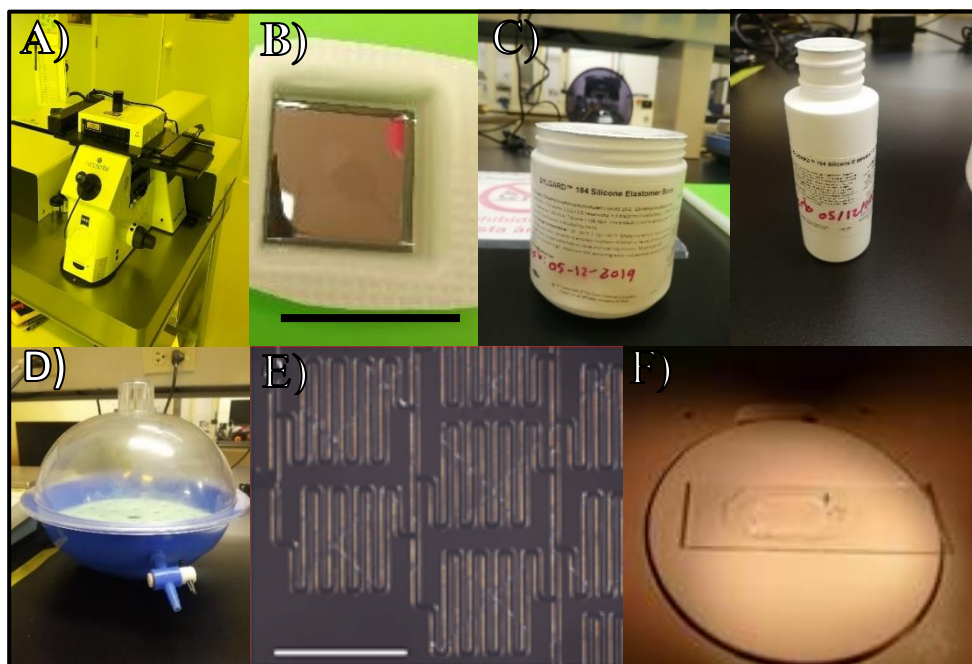


Figura 12. Proceso de fabricación del dispositivo de microfluídica. A) PPGT+ de LANSBIODyT B) Molde de resina fabricado con el diseño hecho en el software Inventor y PPGT+, barra de escala 5 mm. C) Agente curante y base del PDMS, usando el kit SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer D) Cámara de vacío para eliminar burbujas de aire de la mezcla de PDMS E) Acercamiento a la bifurcación de tres bloques (serpentines) del molde maestro del dispositivo de microfluídica, barra de escala 1 mm. F) Dispositivo de microfluídica de PDMS sobre un portaobjetos, el cual corresponde al diseño final a evaluar.

4.4 Generación de organoides de mesencéfalo polarizados

Para la generación de organoides de mesencéfalo se utilizó un protocolo basado en el uso de moléculas pequeñas neurogénicas que dirigen la especificación a mesencéfalo ventral (Mohamed et al., 2019). Del día 0 al día 4 con el medio de inducción neural (MIN) se dirige las células a linaje dopaminérgico neural, que contiene noggina y SB431542 para guiar un compromiso neuroectodérmico, activándose la vía de WNT con CHIR99021, heparina y beta-mercaptoetanol (Tabla 1). Al día 1 se forma un agregado celular que asemeja un cuerpo embrioides; posteriormente, en el día 4 cuando se pone 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 aumenta de tamaño y los bordes se vuelven translúcidos, indicando una formación adecuada (Tabla 2). Posteriormente en el día 7 se retira el MPM y se añade el medio inductor de crecimiento tisular (TGIM) al que se le agrega insulina y laminina para promover el crecimiento durante un día (Tabla 3). 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 transfieren los organoides 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 y se mantienen en un agitador orbital a 70 rpm (Tabla 4). Para la generación de organoides de mesencéfalo polarizados se modificó el intervalo de tiempo del día 4 al día 7, en esta etapa se usa el medio de cultivo MPM donde se especifica el linaje dopaminérgico con SHH, colocando el hMO en el dispositivo de microfluídica en esta ventana de tiempo se generó el doble gradiente de SHH y BMP4 (Fig. 13).

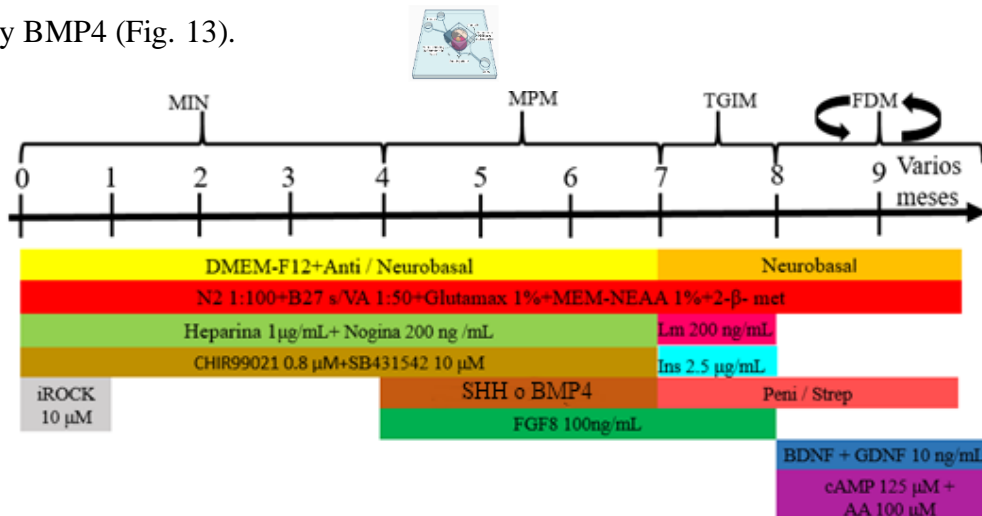


Figura 13. Protocolo de generación de organoide de mesencéfalo. El medio MIN induce el compromiso neuroectodérmico, el medio MPM guía las células a un linaje dopaminérgico, el medio TGIM suministra factores de crecimiento y el medio FDM permite la maduración del organoide de mesencéfalo en agitación constante (modificado de Mohammed *et al* 2019)

Tabla 1		
Medio de Inducción Neural		
Reactivo	Marca	Catálogo
DMEM-F12	Gibco	10-565-018
Neurobasal	Thermo Fisher	21103-049
Antibiótico/antimicótico	Gibco	15240-062
Suplemento N2	Gibco	17504-044
B27 sin vitamina A	Invitrogen	12587010
Glutamax	Gibco	35050-061
MEM-NEAA	Invitrogen	11140050
2-mercaptoetanol	Gibco	21985023
Heparina	Sigma Aldrich	H3149
SB431542	Selleck Chemicals	S1067
Nogina	PeptoTech	120-10C
CHIR99021	Selleck Chemicals	S2924
Inhibidor Rock	Tocris Bioscience	1254

Tabla 2		
Medio de Modelador de Mesencéfalo		
Reactivo	Marca	Catálogo
DMEM-F12	Gibco	10-565-018
Neurobasal	Thermo Fisher	21103-049
Antibiótico/antimicótico	Gibco	15240-062
Suplemento N2	Gibco	17504-044
B27 sin vitamina A	Invitrogen	12587010
Glutamax	Gibco	35050-061
MEM-NEAA	Invitrogen	11140050
2-mercaptoetanol	Gibco	21985023
Heparina	Sigma Aldrich	H3149
SB431542	Selleck Chemicals	S1067
Nogina	PeptoTech	120-10C
CHIR99021	Selleck Chemicals	S2924
SHH-C25II	PeptoTech	100-45
FGF8	PeptoTech	100-25

Tabla 3		
Medio de Inductor de Crecimiento Tisular		
Reactivo	Marca	Catálogo
Neurobasal	Thermo Fisher	21103-049
Suplemento N2	Gibco	17504-044
B27 sin vitamina A	Invitrogen	12587010
Glutamax	Gibco	35050-061
MEM-NEAA	Invitrogen	11140050
2-mercaptoetanol	Gibco	21985023
Insulina	Sigma Aldrich	I9278
Laminina	Sigma Aldrich	L2020
FGF8	PeptoTech	100-25
Penni/Strep	Sigma Aldrich	P0781

Tabla 4		
Medio de Diferenciación Final		
Reactivo	Marca	Catálogo
Neurobasal	Thermo Fisher	21103-049
Suplemento N2	Gibco	17504-044
B27 sin vitamina A	Invitrogen	12587010
Glutamax	Gibco	35050-061
MEM-NEAA	Invitrogen	11140050
2-mercaptoetanol	Gibco	21985023
BDNF	PeptoTech	450-02
GDNF	PeptoTech	450-10
Ácido ascórbico	PeptoTech	100-25
Penni/Strep	Sigma Aldrich	P0781
db-cAMP	Sigma Aldrich	D0627

5. RESULTADOS

5.1 Diseño final del dispositivo de microfluídica

Se pensó en un diseño que cumpliera con la función de generar un doble gradiente con difusión estable de acuerdo con COMSOL Multiphysics y que fuera apropiado para las condiciones de cultivo celular *in vitro* (temperatura, acidez del medio de cultivo, mantenimiento de ESC y hMO) y se fabricaron réplicas en PDMS utilizando el molde de resina impreso en 3D (Figura 14).

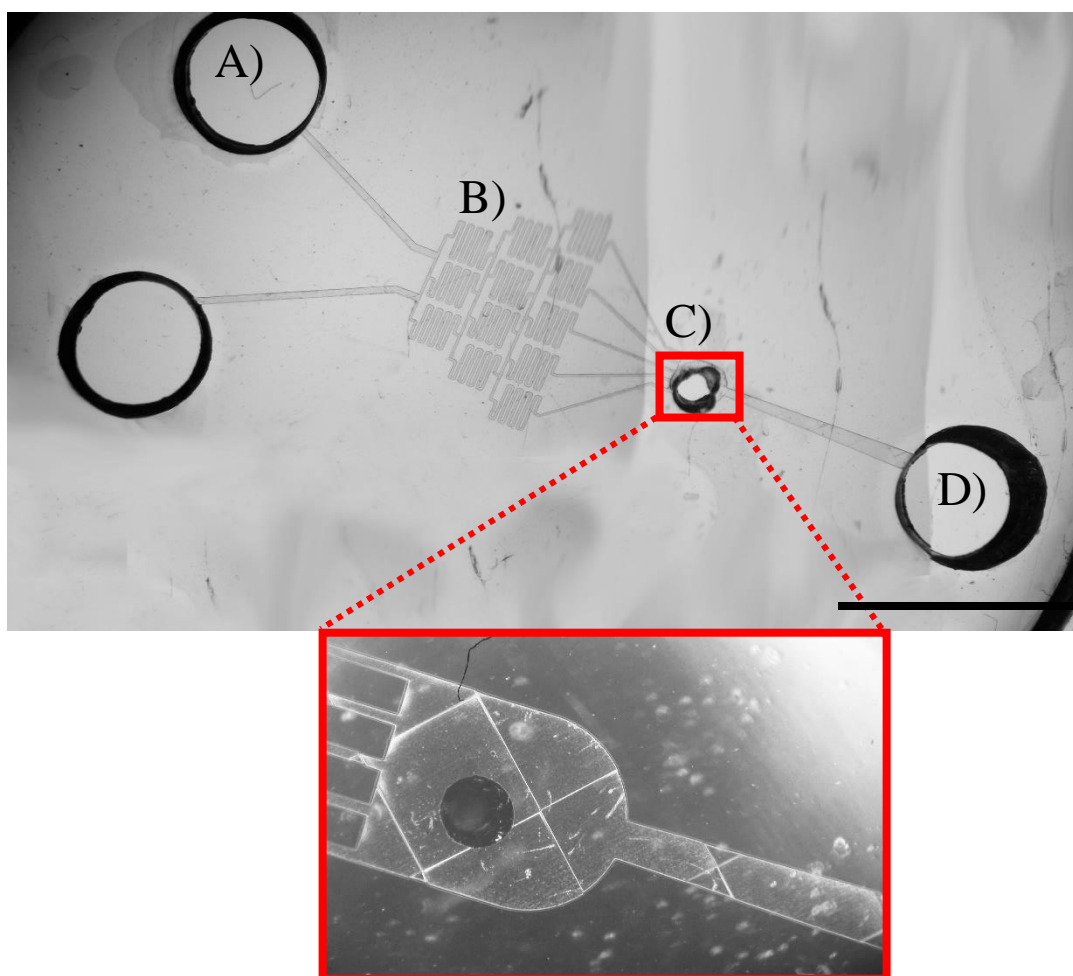


Figura 14. Diseño final del dispositivo de microfluídica. A) Se diseñaron dos inlets o reservorios para poner el medio de cultivo e iniciar la difusión gradual. B) Los serpentines se encargan de la dilución seriada para la difusión adecuada a la zona del gradiente. C) Zona de gradiente, donde se pueden colocar ESC en monocapa o hMO y ser expuestos a la difusión de morfógenos. D) El outlet o canal de salida, donde el flujo generado por el diseño del dispositivo de microfluídica mantiene estable la difusión con respecto al tiempo. Barra de escala, 3 mm.

5.2 Prueba colorimétrica del dispositivo de microfluídica

Una vez que se obtuvo el diseño preliminar del dispositivo de microfluídica adecuado para los objetivos de este proyecto, se realizaron pruebas con colorantes artificiales (rojo y verde) para corroborar la capacidad del dispositivo de microfluídica de difundir a manera de gradiente. Se inyectaron manualmente los colorantes artificiales en los reservorios y se observó la generación de dos gradientes de color en la zona de los tres bloques y la cámara donde se ubica el organoide, demostrando que el dispositivo de microfluídica es funcional (Figura 15).

Durante las pruebas, se generaron burbujas de aire dentro de la zona de gradiente e inicialmente la difusión de los colorantes no pudo ser llevada a cabo por capilaridad, problema que se pudo resolver con lavados de etanol.

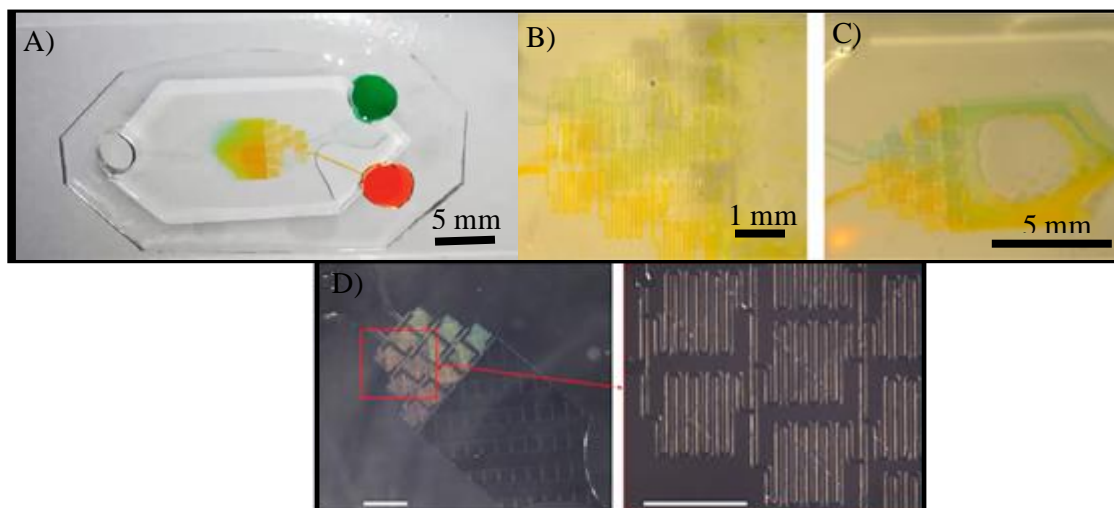


Figura 15. Prueba de difusión del dispositivo de microfluídica. A) Prueba colorimétrica con colorantes artificiales (rojo y verde) mostrando la generación del gradiente en la zona de la cámara del organoide. B) Problema de difusión por capilaridad en la bifurcación de tres bloques. C) Burbuja de aire generada dentro de la zona de gradiente. D) Prueba colorimétrica con doble gradiente (verde y rojo) en la zona de serpentines.

Debido a las proporciones de los hMO y para mantener estable el doble gradiente, se modificó el diseño del área de gradiente en COMSOL Multiphysics (Figura 14). Se redujo el área a 1.5 mm^2 para que pueda cumplir con la estabilización del gradiente a largo plazo y una cavidad de $350 \text{ }\mu\text{m}$ en donde se coloca el organoide, para evaluar que ambos cambios no perturben el doble gradiente se repitieron las pruebas de difusión colorimétrica (figura 16).

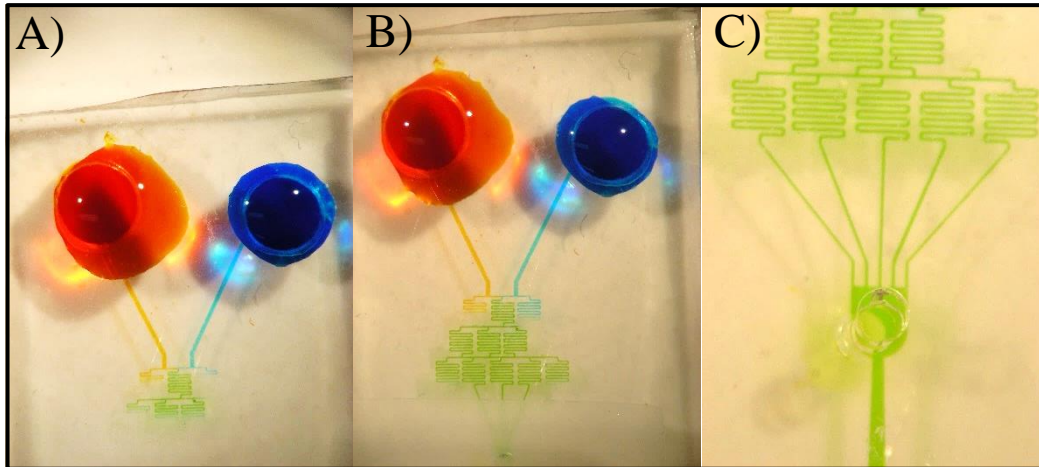


Figura 16. Prueba de difusión del dispositivo de microfluídica en el rediseño. A) Prueba colorimétrica con colorantes artificiales (rojo y verde) en cada inlet mostrando la generación del gradiente. B) Problema de difusión por capilaridad en la bifurcación de tres bloques, generado por burbuja de aire. C) Debido a la burbuja de aire generada al principio de los serpentines, solo se puede observar la mezcla de ambos colorantes en toda la zona del gradiente del organoide

Al generarse una burbuja de aire al inicio de los serpentines, la dilución seriada fue interrumpida, el colorante rojo (izquierda) y el colorante azul (derecha) no pudieron difundirse de manera individual en sus serpentines correspondientes, en el serpentín intermedio del primer bloque no se generó una burbuja por lo que la difusión seriada pudo hacerse, sin embargo en el serpentín intermedio de inicio son la mezcla de ambos colorantes por lo que no fue posible observar el efecto de difusión deseada.

Sin embargo, se pudo corroborar que con el rediseño del dispositivo de microfluídica se pudieron conservar las características de difusión por capilaridad y no representa cambios en el funcionamiento del chip.

Para corroborar la capacidad del dispositivo de microfluídica de difundir a manera de gradiente con la cavidad que servirá como cámara para el organoide polarizado. Se utilizó el equipo Fluigent EZ El MFCSTTM-EZ el cual es un controlador de flujo microfluídico modular con diferentes rangos de presión para poder observar de manera precisa el grado de difusión (Figura 17).

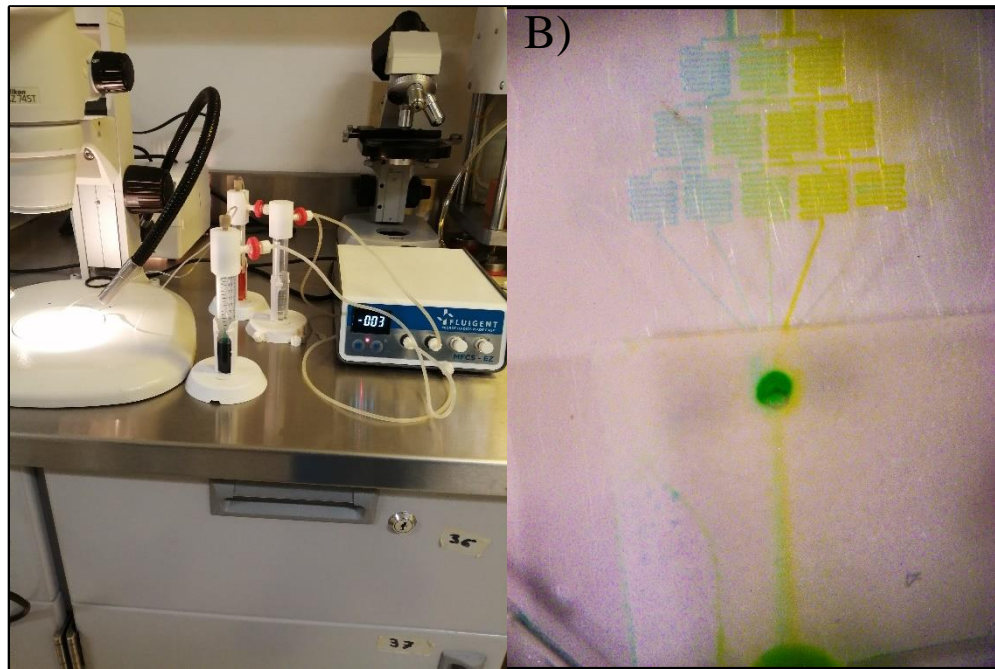


Figura 17. Prueba de difusión regulada en el dispositivo de microfluídica. A) Equipo Fluigent EZ El MFCSTTM-EZ con presión de 30 mbar en ambos colorantes, para eliminar la formación de burbujas. B) Doble gradiente generado por ambos colorantes en la sección de serpentines y difusión seriada hasta la zona de gradiente del dispositivo de microfluídica.

Después de un lavado de etanol se reinició el experimento con los parámetros ajustados para evitar el problema de la burbuja. Ambos colorantes pudieron difundirse desde los serpentines hasta la cámara de gradiente generando un doble gradiente, a diferencia de las pruebas pasadas se pudo observar una dilución seriada en los serpentines correspondientes a cada colorante y la mezcla de ambos, llegando a la zona del gradiente del organoide.

5.3 Prueba de difusión en cultivos celulares 2D y 3D con calceína AM

Se trataron los chips con diluciones graduales de EtOH y medio de cultivo mTesR para asegurar la difusión completa sin obstrucciones. En caso de presentar algún problema de difusión, es posible solucionarlo aumentando la concentración de EtOH (Figura 17)

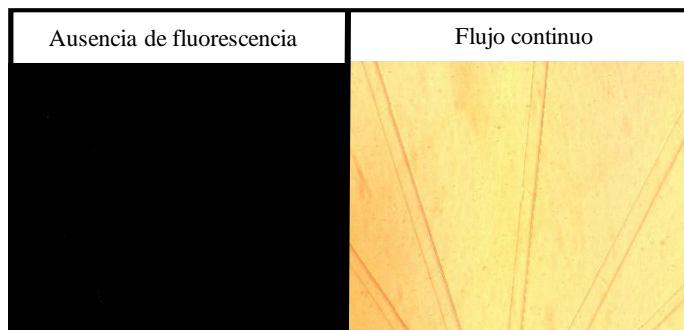


Figura 17. Ausencia de auto fluorescencia y obstrucción en el dispositivo de microfluídica. Se muestran los canales directos a la zona del gradiente sin bloqueo y de color translúcido mostrando la difusión de mTesR después de 5 días de tratamiento, adicional a esto se muestra que no hay auto fluorescencia previa al ensayo de calceína

Se sembraron células H9 WT en la cavidad de la zona del gradiente, colocando 100,000 células en 50 μ L y se adicionó calceína AM 10 μ M en el inlet derecho. Observamos que 5 minutos después de agregar la calceína, ésta penetró las membranas celulares siendo catabolizada por estereasas citoplásmicas y generando así la fluorescencia que nos permitió observar la difusión de la calceína por efecto del gradiente del chip de microfluídica, (Figura 18).

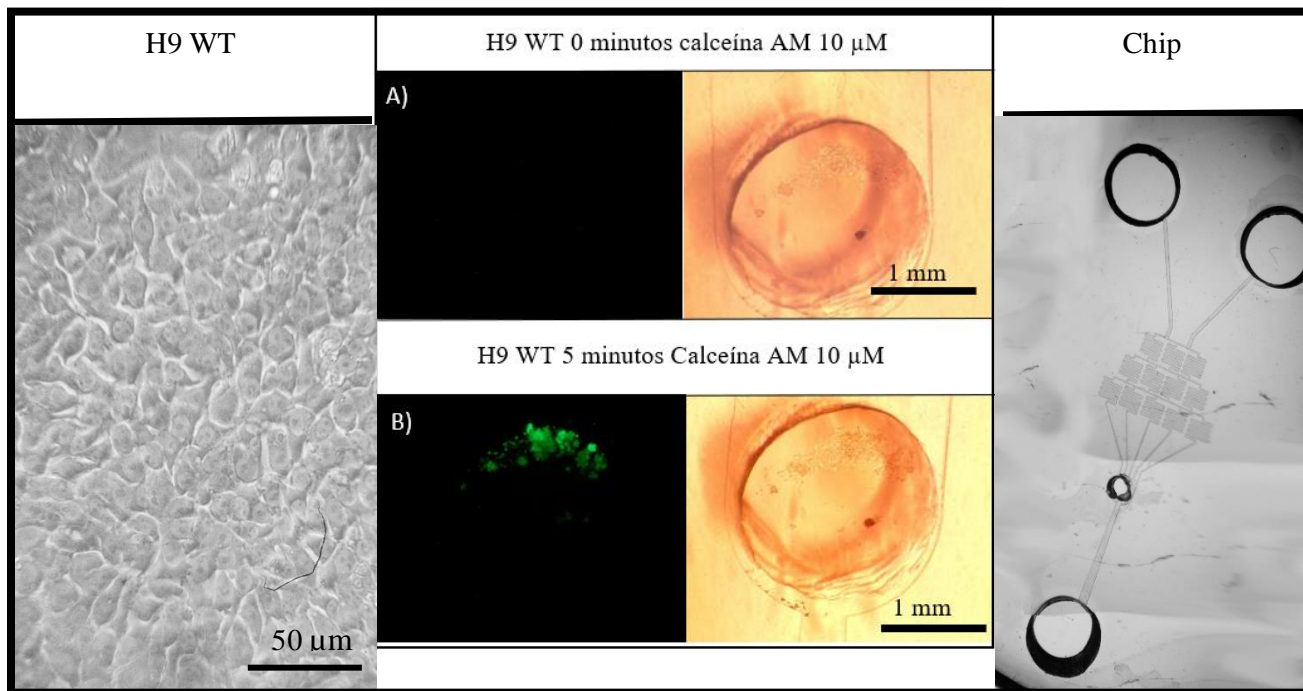


Figura 18. Ensayo de calceína en el chip de microfluídica en células H9 WT. Las células H9 WT se colocaron en la zona de gradiente, siendo sometidas a 5 minutos de calceína 10 μ M

La prueba de calceína demostró la capacidad de difusión del chip de microfluídica, a 0.1 μM de calceína AM se puede observar la penetración gradual del reactivo, misma que se refleja en fluorescencia e indica la capacidad del chip de generar un doble gradiente, ya que se colocó en el inlet derecho del dispositivo de microfluídica (Figura 19).

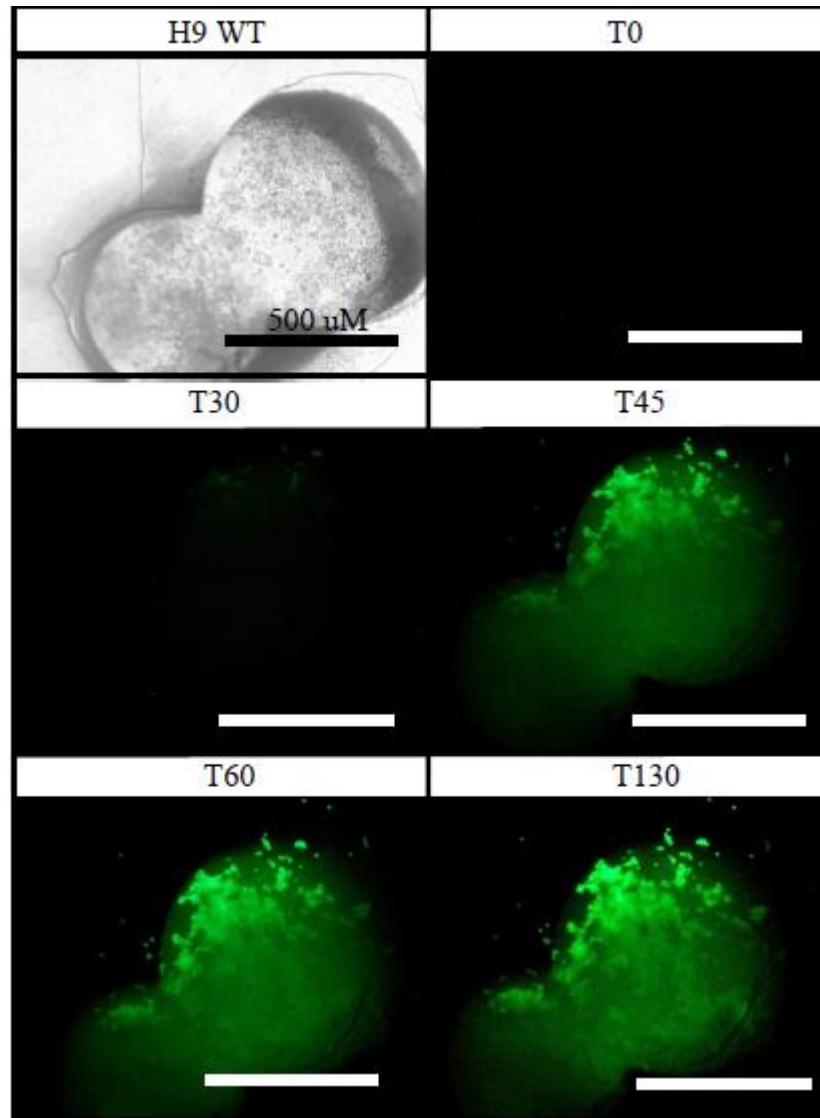


Figura 19. Ensayo de calceína en el chip de microfluídica en células H9 WT. las células lograron llegar a la zona de gradiente, siendo expuestas a calceína 0.1 μM . Barra de escala, 500 μm

Dependiendo la concentración de calceína puede variar el periodo de tiempo en el que llega a la zona de gradiente donde se encuentran las células, pero con esta prueba podemos asegurar que el doble gradiente del dispositivo de microfluídica no representa problemas de manipulación o diseño, siendo funcional para la etapa de generación de organoides de mesencéfalo con los morfógenos ventralizantes (SHH) y dorsalizantes (BMP4).

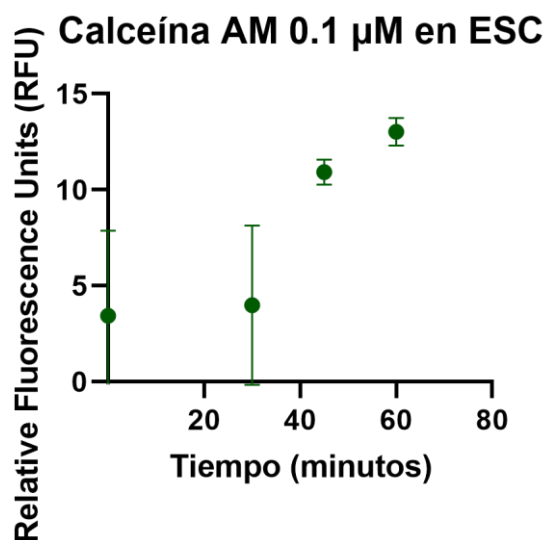


Figura 20. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en la prueba de difusión de calceína AM 0.1 μ M en ESC. Se puede observar un aumento gradual en la intensidad de fluorescencia.

En la figura 20 se puede observar de forma cuantitativa la capacidad de difusión del dispositivo de microfluídica con respecto al tiempo en cultivos celulares 2D de ESC. En intervalos de tiempo de 15 minutos se pudo observar un aumento de la intensidad de fluorescencia a partir de los 30 minutos, indicando que la presencia de calceína en ESC aumento con el tiempo y fue catabolizado por esterasas citoplásmicas. Debido a la capacidad de difusión del dispositivo de microfluídica la concentración de calceína fue aumentando junto con la intensidad de fluorescencia.

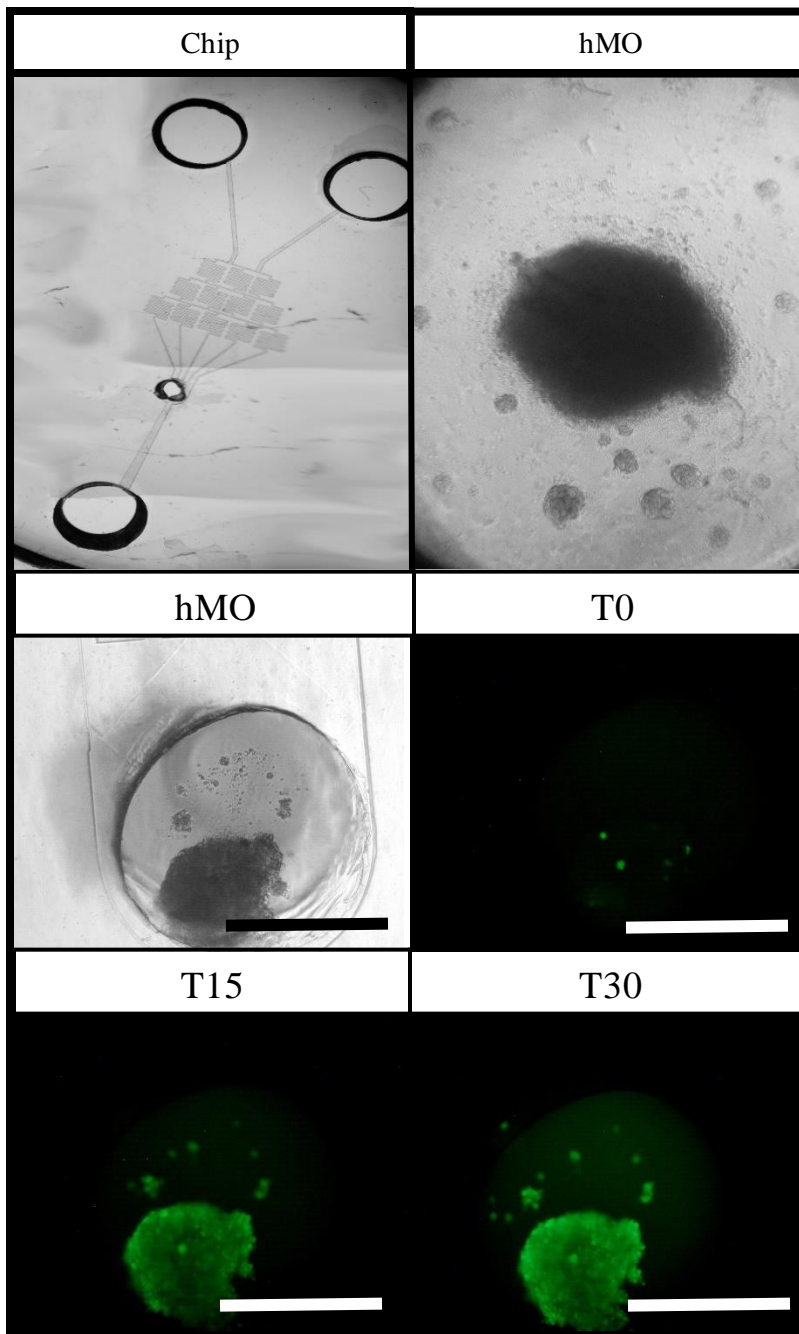


Figura 21. Ensayo de calceína en el chip de microfluídica en células del hMO. El hMO se colocó en la zona de gradiente, siendo expuestas a calceína $0.1 \mu\text{M}$ en intervalos de 15 minutos. Barra de escala, $500 \mu\text{m}$

Después de confirmar el efecto de gradiente en el dispositivo de microfluídica en cultivos celulares 2D, se evaluó su capacidad de difusión en organoides de mesencéfalo día 4 con calceína AM $0.1 \mu\text{M}$ en intervalos de tiempo de 15 minutos. Pudiendo confirmar un efecto parecido en el gradiente de fluorescencia.

Calceína AM 0.1 μM en hMO

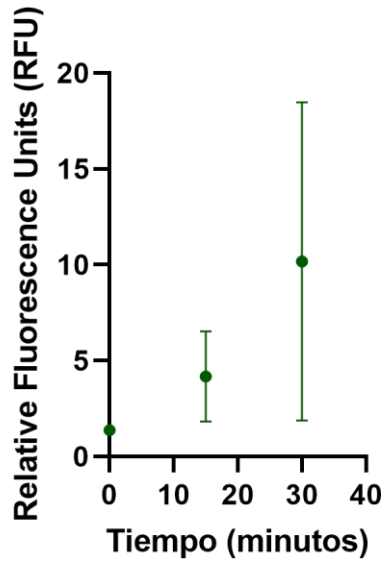


Figura 22. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en la prueba de difusión de calceína AM 0.1 μM en hMO. Se puede observar un aumento gradual en la intensidad de fluorescencia

Al igual que el cultivo celular 2D, se cuantificó la intensidad de fluorescencia relativa en los ensayos de calceína AM 0.1 μM en hMO. Se observó una intensidad gradual en intervalos de 15 minutos que confirma la capacidad de difusión del dispositivo de microfluídica en cultivos celulares 3D.

El tratamiento con los morfógenos SHH y BMP4 en hMO se está llevando a cabo para evaluar y caracterizar los efectos del doble gradiente generado.

6. DISCUSIÓN

Durante las pruebas colorimétricas, se identificaron burbujas de aire dentro de la zona de los serpentines, siendo el problema inicial en la generación del doble gradiente. Este se pudo resolver con el controlador de presión utilizando los parámetros de 10 mbar para el color amarillo y 30 mbar para el color verde, con esto fue posible generar una variedad de mezclas entre los colorantes mostrando una exitosa capacidad de difusión. Existen trampas de burbujas (microdiseños internos) que combinan la tensión superficial y la fuerza hidrodinámica para romper las burbujas que se formen en el dispositivo de microfluídica, pero por el tipo de diseño no es posible implementarlas.

La densidad y tensión superficial creada por el medio de cultivo complica su difusión; previamente se había intentado con 100% mTesR y este ensayo se probó con 50% EtOH y 50% mTesR, en ambos casos se bloqueaba la difusión. Por lo que concluimos que la concentración adecuada para el tratamiento del chip debe ser menor o igual a 75% EtOH y 25% mTesR e ir aumentando la concentración del medio de cultivo gradualmente (en periodos de tiempo de una hora). La tensión superficial creada y las burbujas de aire dentro del dispositivo de microfluídica no son ajenos a este tipo de tecnología. En estudios de flujo de fluido se ha estudiado la orientación preferencial de los líquidos cuando una fuerza física o química altera el estado de equilibrio, aunque en nuestro caso buscábamos una difusión constante y estable, controlada por las fuerzas de tensión superficial (De Groot et al., 2016; Zhang et al., 2020). Es aquí donde el diseño del dispositivo de microfluídica ayuda a generar un gradiente estable, ya que se ha podido observar en dispositivos de microfluídica que tener aberturas u orificios (inlets, outlets y zona de gradiente) puede mejorar el intercambio de flujo, mantener estable la difusión y evitar bloqueos en el dispositivo de microfluídica. Por tal motivo, las diluciones seriadas del medio de cultivo mTesR fueron la solución adecuada para tratar el dispositivo de microfluídica y mantener su capacidad funcional en estado óptimo.

La calceína AM ha sido utilizada en cultivos celulares 3D como ensayo de viabilidad celular, observándose fluorescencia en los bordes celulares y en condiciones de toxicidad celular la señal de fluorescencia es débil o ausente (Bulin et al., 2017; Du et al., 2020). En nuestro trabajo, decidimos utilizar calceína AM para demostrar la capacidad de difusión del chip de microfluídica, ya que, al penetrar la membrana celular, ser metabolizado por esterasas citoplásmicas que generan una señal de fluorescencia es la mejor forma de probar la viabilidad de los hMO y la capacidad de difusión (a mayor concentración de calceína, mayor señal de fluorescencia) en el dispositivo de microfluídica. Inicialmente se probó una concentración de calceína AM de 10 μM , observando una intensidad de fluorescencia alta en 5 minutos, posteriormente se probó la concentración de 0.1 μM , se pudo observar en diferentes intervalos de tiempo la penetración gradual del reactivo, misma que se refleja en fluorescencia e indica la capacidad de generar el doble gradiente, ya que se colocó en el inlet derecho del dispositivo de microfluídica. Dependiendo de la concentración puede variar el intervalo de tiempo de fluorescencia, pero con esta prueba podemos asegurar que el doble gradiente del dispositivo de microfluídica no representa problemas de manipulación o diseño, siendo funcional para la etapa de generación de organoides de mesencéfalo con los morfógenos ventralizantes (SHH) y dorsalizantes (BMP4). Cabe destacar, que ambas pruebas de calceína AM se hicieron en ambos inlets para corroborar el efecto de gradiente.

En cuanto al diseño del dispositivo de microfluídica, es único en su tipo, aunque ya hay ejemplos de este tipo de acercamientos con más de un gradiente en el área de la biología celular. Kilinc *et al.* en 2016 diseñaron un dispositivo de microfluídica capaz de distribuir a diferentes concentraciones el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el inhibidor BIBX en cámaras individuales con la línea celular A431 de carcinoma epidermoide que sobreexpresa el receptor de EGF en cámaras celulares que segmentan para evaluar el potencial mitogénico de la activación de la vía Ras/MAPK y la activación de apoptosis vía caspasas a grandes concentraciones de EGF. Estrictamente, este dispositivo no genera un doble gradiente pero permite exponer células adherentes a diferentes concentraciones de diferentes moléculas para estudiar la interacción de diferentes vías de señalización paralelamente (Kilinc et al., 2016).

El único reporte que se tiene de organoides de mesencéfalo con uso de microfluídica fue en 2018 donde generaron organoides de mesencéfalo a partir de células neuroepiteliales de donadores sanos y fueron transferidos al dispositivo de microfluídica que consistía de una placa de 24 pozos interconectados con una bomba peristáltica que se encarga de distribuir de mejor manera el medio de cultivo y el oxígeno, promoviendo la diferenciación dopaminérgica en el organoide de mesencéfalo y la supervivencia celular. Este acercamiento trató de ofrecer una alternativa al problema metódico de este tipo de cultivo celular 3D que involucra apoptosis celular y gliogénesis en la zona central o núcleo del organoide (Berger et al., 2018). Sin embargo, no hay reportes de dispositivos de microfluídica en cultivos celulares 3D como los organoides que tengan como objetivo estudiar vías de señalización involucradas en el desarrollo embrionario del SNC como el dispositivo de microfluídica que hemos logrado desarrollar.

Como se mencionó previamente solo hay un par de ejemplos con este tipo de enfoque en cultivos celulares 2D. Manfrin *et al.* en 2019 generaron dispositivos de microfluídica con PDMS compuestos de 4 cámaras con una geometría restringida para mantener colonias de PSC aisladas sin intercambio de medio y con barreras de hidrogel para la difusión de BMP4, midiendo la actividad directa de SMAD1 fosforilada (pSMAD) y después de 12 horas de exposición se generó una locación asimétrica de pSMAD, MXL1, SOX17, CDX2 y BRACHYURY, teniendo la mayor expresión en cercanías a la barrera de hidrogel. Esta expresión es parecida a la de las células de la línea primitiva donde BMP4 es esencial en el desarrollo embrionario (Manfrin et al., 2019). Rifes *et al.* 2020 lograron recrear el eje rostro-caudal durante el desarrollo del tubo neural en una monocapa de PSC expuestas al inhibidor de glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3i) a manera de gradiente, usando un dispositivo de microfluídica con difusión lineal que permite ir de 0% a 100% de concentración. Sin embargo, la difusión es de una sola molécula y no de dos como se propone en nuestro dispositivo de microfluídica, por lo que solo es posible estudiar el efecto de una de las vías de señalización involucradas en el establecimiento del eje rostro-caudal (vía de WNT).

De esta manera, es visible que la recreación de centros organizadores y las vías de señalización involucradas en la polarización de alguna estructura son un área poco explorada pero con un potencial interesante para comprender los mecanismos de desarrollo y más aún,

en conjunto con los cultivos celulares 3D podrían darnos aspectos claves para entender la compleja interacción de diferentes vías de diferenciación que ocurren durante el desarrollo embrionario.

7. CONCLUSIÓN

Generar un doble gradiente con dispositivos de microfluídica muestra ser una alternativa viable para poder recrear la señalización dada por centros organizadores durante el desarrollo embrionario. Dando no solo la opción de formar un eje dorsoventral en cultivos celulares, sino que puede ser utilizado para formar el eje anteroposterior o el mantenimiento de co-cultivos que necesiten la presencia de diferentes medios de cultivo.

Es necesario conocer los límites experimentales del dispositivo de microfluídica en el mantenimiento prolongado de cultivos celulares, ya que en este trabajo solo hemos confirmado su funcionalidad en periodos de tiempo corto.

Concluimos que la recreación de la señalización de morfógenos con doble gradiente es posible con el uso de la microfluídica para cultivos celulares.

8. PERSPECTIVAS

Debido a la contingencia sanitaria provocada por SARS-CoV-2 este trabajo tuvo un retraso experimental de año y medio. Por tal motivo, se han propuesto las siguientes perspectivas a futuro con base en los resultados obtenidos y presentados en este texto.

- Probar la capacidad del dispositivo de microfluídica en condiciones *in vitro* a largo plazo, por ejemplo, de 7 a 14 días para confirmar el mantenimiento estable del gradiente de difusión.
- Generar los hMO en 4 condiciones diferentes: 1) Con SHH sin dispositivo de microfluídica; 2) Con SHH con dispositivo de microfluídica; 3) Con BMP4 con dispositivo de microfluídica; 4) Con SHH y BMP4 con dispositivo de microfluídica.
- Caracterizar las 4 condiciones de los hMO con inmunotinciones para marcadores de precursor neuronal (Ki67, Sox2, Nestina), precursor dopaminérgico (FOXA2, LMX1A), neurona dopaminérgica (TUJ1, TH, GIRK2), neurona GABAérgica (GAD y rGABA) y neurona glutamatérgica (vGLUT1 y vGLUT2).
- Caracterizar las 4 condiciones de hMO con Western Blot para marcadores de precursor neuronal (Ki67, Sox2, Nestina), precursor dopaminérgico (FOXA2, LMX1A), neurona dopaminérgica (TUJ1, TH, GIRK2), neurona

GABAérgica (GAD y rGABA) y neurona glutamatérgica (vGLUT1 y vGLUT2).

- Caracterizar las 4 condiciones de hMO con PCR para marcadores de precursor neuronal (Ki67, Sox2, Nestina), precursor dopaminérgico (FOXA2, LMX1A), neurona dopaminérgica (TUJ1, TH, GIRK2), neurona GABAérgica (GAD y rGABA) y neurona glutamatérgica (vGLUT1 y vGLUT2).

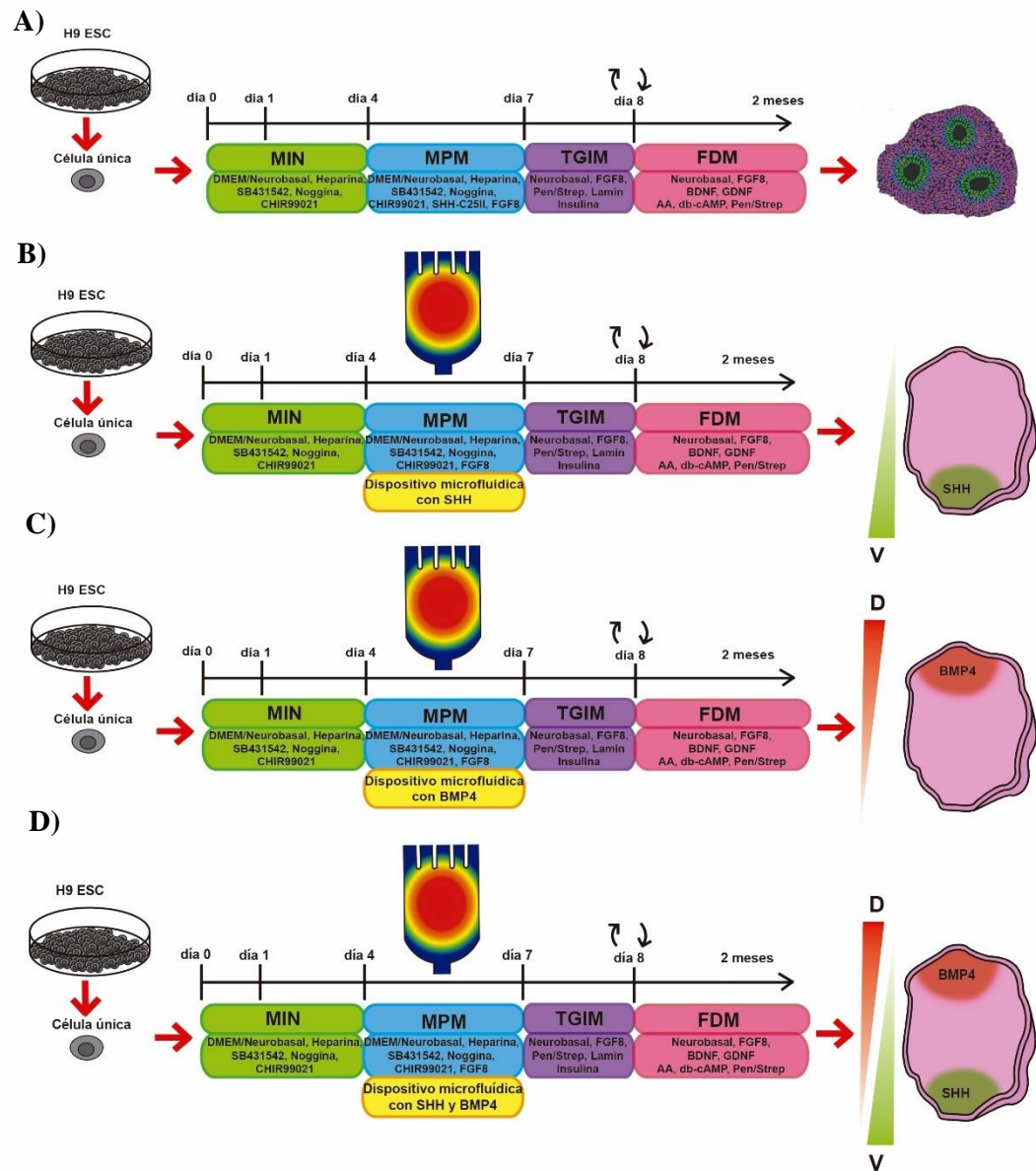


Figura 23. Condiciones experimentales para futuros experimentos. A) Generar hMO sin los morfógenos SHH y BMP4 como control negativo. B) Generar hMO con SHH y con el dispositivo de microfluídica para confirmar la adecuada generación de los organoides cerebrales. C) Generar hMO con BMP4 y con el dispositivo de microfluídica para caracterizar la influencia del morfógeno dorsal en los organoides cerebrales. D) Generar hMO con los morfógenos SHH y BMP4 con los dispositivos de microfluídica y caracterizar la influencia del eje dorsoventral.

9. 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>
- Arimura, N., Dewa, K. ichi, Okada, M., Yanagawa, Y., Taya, S. ichiro, & Hoshino, M. (2019). Comprehensive and cell-type-based characterization of the dorsal midbrain during development. *Genes to Cells*, *24*(1), 41–59. <https://doi.org/10.1111/gtc.12656>
- Berger, E., Magliaro, C., Paczia, N., Monzel, A. S., Antony, P., Linster, C. L., Bolognin, S., Ahluwalia, A., & Schwamborn, J. C. (2018). Millifluidic culture improves human midbrain organoid vitality and differentiation. *Lab on a Chip*, *18*(20), 3172–3183. <https://doi.org/10.1039/c8lc00206a>
- Bergström, T., & Forsberg-Nilsson, K. (2012). Neural stem cells: Brain building blocks and beyond. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, *117*(2), 132–142. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.665096>
- Bianchi, L. (2017). *Developmental Neurobiology* (1st ed.). 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>
- Bulin, A. L., Broekgaarden, M., & Hasan, T. (2017). Comprehensive high-throughput image analysis for therapeutic efficacy of architecturally complex heterotypic organoids. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16622-9>
- Cederquist, G. Y., Ascioffa, J. J., Tchieu, J., Walsh, R. M., Cornacchia, D., Resh, M. D., & Studer, L. (2019). Specification of positional identity in forebrain organoids. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0085-3>
- 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>
- Choudhry, Z., Rikani, A. A., Choudhry, A. M., Tariq, S., Zakaria, F., Asghar, M. W., Sarfraz, M. K., Haider, K., Shafiq, A. A., & 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)
- De Groot, T. E., Vesperat, K. S., Berthier, E., Beebe, D. J., & Theberge, A. B. (2016). Surface-tension driven open microfluidic platform for hanging droplet culture. *Lab on a Chip*, *16*(2), 334–344. <https://doi.org/10.1039/c5lc01353d>
- Du, Y., Li, X., Niu, Q., Mo, X., Qui, M., Ma, T., Kuo, C. J., & Fu, H. (2020). Development of a miniaturized 3D organoid culture platform for ultra-high-throughput screening. *Journal of Molecular Cell Biology*, *12*(8), 630–643. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa036>
- 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>
- 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>
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2016). *Developmental Biology* (11th ed.). 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>
- Halldorsson, S., Lucumi, E., Gómez-Sjöberg, R., & Fleming, R. M. T. (2015). Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors and Bioelectronics*, *63*, 218–231. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.029>
- Heussler, H. S., & Suri, M. (2003). Sonic hedgehog. *Molecular Pathology: MP*, *56*(3), 129–131. <https://doi.org/10.1136/mp.56.3.129>
- Jo, J., Xiao, Y., Sun, A. X., Cukuroglu, E., Tran, H. D., Göke, J., Tan, Z. Y., Saw, T. Y., Tan, C. P., Lokman, H., Lee, Y., Kim, D., Ko, H. S., Kim, S. O., Park, J. H., Cho, N. J., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Shin, J. H., ... 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>
- Kilinc, D., Schwab, J., Rampini, S., Ikpekha, O. W., Thampi, A., Blasiak, A., Li, P., Schwamborn, R., Kolch, W., Matallanas, D., & Lee, G. U. (2016). A microfluidic dual gradient generator for conducting cell-based drug combination assays. *Integrative Biology (United Kingdom)*, *8*(1), 39–49. <https://doi.org/10.1039/c5ib00209e>
- Kim, H., Park, H. J., Choi, H., Chang, Y., Park, H., Shin, J., Kim, J., Lengner, C. J., Lee, Y. K., & 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>
- 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., Hurler, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & 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>
- 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>
- Manfrin, A., Tabata, Y., Paquet, E. R., Vuaridel, A. R., Rivest, F. R., Naef, F., & Lutolf, M. P. (2019). Engineered signaling centers for the spatially controlled patterning of human pluripotent stem cells. *Nature Methods*, *16*(7), 640–648. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0455-2>
- Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., Watanabe, T., Kanai, T., & 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)
- Miura, Y., & Paşca, S. P. (2019). Polarizing brain organoids. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0084-4>
- 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>
- Monzel, A. S., Smits, L. M., Hemmer, K., Hachi, S., Moreno, E. L., van Wuelen, T., Jarazo, J., Walter, J., Brüggemann, I., Boussaad, I., Berger, E., Fleming, R. M. T., Bolognin, S., & 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*. Elsevier Academic Press.
- Pasca, S. P. (2019). Assembling human brain organoids. *Science*, *363*(6423), 126–127. <https://doi.org/10.1126/science.aau5729>
- 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>
- 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->

- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A. -S., Mooney, R. D., Platt, M. L., & White, L. E. (Eds.). (2018). *Neuroscience* (6th ed.). Sinauer Associates, Inc.
- Rifes, P., Isaksson, M., Parmar, M., Kirkeby, A., & Laurell, T. (2020). Modeling neural tube development by differentiation of human embryonic stem cells in a microfluidic WNT gradient. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0525-0>
- Rifes, P., & Kikerby, A. (2020). Modeling neural tube development by differentiation of human embryonic stem cells in a microfluidic WNT gradient. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0525-0>
- 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., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & 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., Toelle, B., Berger, H., Schmidt, S. C., Glanemann, M., Ordemann, J., Bartfeld, S., Mollenkopf, H. J., & Meyer, T. F. (2016). A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gut*, 65(2), 202–213. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307949>
- Smits, Lisa M., Reinhardt, L., Reinhardt, P., Glatza, M., Monzel, A. S., Stanslowsky, N., Rosato-Siri, M. D., Zanon, A., Antony, P. M., Bellmann, J., Nicklas, S. M., Hemmer, K., Qing, X., Berger, E., Kalmbach, N., Ehrlich, M., Bolognin, S., Hicks, A. A., Wegner, F., ... 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>
- Smits, Lisa Maria, & Schwamborn, J. C. (2020). Midbrain Organoids: A New Tool to Investigate Parkinson's Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00359>
- 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). Elsevier Inc.
- Xiang, Y., Tanaka, Y., Cakir, B., Patterson, B., Kim, K. Y., Sun, P., Kang, Y. J., Zhong, M., Liu, X., Patra, P., Lee, S. H., Weissman, S. M., & Park, I. H. (2019). hESC-Derived Thalamic Organoids Form Reciprocal Projections When Fused with Cortical Organoids. *Cell Stem Cell*, 24(3), 487-497.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.12.015>
- Zhang, Y., Gan, Y., Zhang, L., Zhang, D., & Chen, H. (2020). Surface-tension-confined channel with biomimetic microstructures for unidirectional liquid spreading. *Micromachines*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/mi11110978>