



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**GENERACIÓN Y TRASPLANTE DE
ORGANOIDES DE MESENCÉFALO
HUMANO EN UN MODELO ANIMAL DE
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:

KARLA ITZEL SORIANO RODRÍGUEZ

Facultad de Medicina



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. J. IVÁN VELASCO VELÁZQUEZ**

(CIUDAD UNIVERITARIA, CDMX, 2022)



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.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El trabajo presentado a continuación fue realizado bajo la dirección y mentoría del Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez, en el Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, UNAM.

Se agradece la labor de la Dra. Itzel Escobedo Ávila, técnico académico del laboratorio, reconociendo su participación en el proceso inventivo y apoyo práctico para la realización de este proyecto. Asimismo, se hace constar la colaboración del Dr. Adolfo López Ornelas (Hospital Juárez de México) y el Dr. Jesús Enrique Estudillo Hernández (Instituto Nacional De Neurología y Neurocirugía).

Este proyecto fue apoyado por el donativo CONACYT con clave SALUD-2016-01-272815, y la beca CONACYT como Asistente de proyecto.

Se agradece al proyecto CONACYT 300461 por permitirnos hacer uso del microscopio confocal en el Instituto Nacional De Neurología y Neurocirugía.

Agradezco al Dr. Juan Martín Gómez González y su proyecto “Taller de Ciencia para Jóvenes 2015” del Centro de Geociencias, Campus UNAM-Juriquilla, proyecto PAPIME-PE100915, por haberme inspirado e impulsado a realizar una carrera en el campo de la investigación científica.

Agradezco a los miembros de mi jurado de tesis:

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dra. Sylvia Leticia Verdugo Díaz	Facultad de Medicina, UNAM.
Dr. Aurelio Campos Romo	Facultad de Medicina, UNAM.
Dr. Jesús Chimal Monroy	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi casa de estudios por más de diez años.

Al Dr. Iván Velasco por la confianza para permitirme desarrollar este proyecto en su laboratorio y por admitirme para formar parte de un maravilloso equipo de investigación.

A los miembros presentes y pasados del laboratorio AL-101 por compartir sus conocimientos conmigo, por sus invaluable aportaciones y por su amistad. Especialmente quiero agradecer Itzel Escobedo, Rolando Lara, Ángel Polanco, Juan Jair Santillán, Fernando Becerra, Margareht Reyes, Beetsi Urrieta y César Meléndez por todo el apoyo brindado.

A miembros de mis pasados laboratorios, Gisselle Gastellou, Martí Wilson, Brandon Bustos y Gabriela Gutiérrez, así como al Dr. Julián Valdés.

A mis compañeros de licenciatura, María José Blanco, Damián García, Mariana Filloy, Emmanuel Flores y María Eugenia Contreras por contribuir a mi crecimiento y aprendizaje juntos.

A mi familia: mi madre Verónica, mi tía Ana y mi hermano Emiliano por su apoyo y paciencia brindados en cada paso de mi carrera.

A Brandon Jiménez por su apoyo, sus palabras de aliento, por no permitir que me sintiera derrotada en ningún momento, y obviamente por todo tu cariño gracias, Santi.

Finalmente, a los compañeros de vida más fieles que podría desear, Nikita, Napoleón, Kevin y Misha, por levantarme el ánimo siempre que lo necesité.

Abreviaturas

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
AdSC	Células troncales de origen adulto
AP	Eje antero-posterior
CM	Corteza Motora
DA	Dopamina
DCX	Doblecortina
DV	Eje dorso-ventral
ECP	Estimulación cerebral profunda
EP	Enfermedad de Parkinson
EPAT	Enfermedad de Parkinson de aparición temprana
ESC	Células troncales embrionarias
FT	Factor de transcripción
GFP	Proteína verde fluorescente
GP	Globo pálido
ICM	Masa celular interna
iPSC	Células pluripotenciales inducidas
KSR	Medio Knock-out con reemplazo de suero
MCAO	Oclusión de la arteria media cerebral
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
ML	Eje medio-lateral
mNSS	Índice de severidad neurológica motora
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra hidro-piridina
NDA	Neuronas dopaminérgicas
NSC	Células troncales neurales
NST	Núcleo subtalámico
OC	Organoides cerebrales

OM	Organoides de mesencéfalo ventral
PFA	Paraformaldehido
PSC	Células troncales pluripotentes
SNpc	<i>Sustancia nigra pars compacta</i>
SNpr	<i>Sustancia nigra pars reticulada</i>
SNC	Sistema nervioso central
TH	Tirosina hidroxilasa

ÍNDICE

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1. Enfermedad de Parkinson	9
2.2. Células troncales embrionarias	17
2.3. Terapia celular como tratamiento para la EP	22
2.4. Organoides	24
2.5. Organoides cerebrales	29
2.6. Trasplante de organoides de cerebro	31
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	34
5.1. Objetivo general	34
5.2. Objetivos particulares	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1. Animales	35
6.2. Cultivo celular de hESCs	35
6.3. Diferenciación de hESCs a NDA	36
6.4. Generación de organoides de mesencéfalo ventral a partir de hESCs	37
6.5. Cirugía estereotáxica	38
6.5.1. Lesión para obtención de modelo animal de la EP	39
6.5.2. Trasplante	41
6.6. Pruebas conductuales en modelo animal de la EP.	41
6.6.1. Rotación inducida.	42
6.6.2. Prueba de ajuste de pasos.	42
6.7. Perfusión y obtención de cerebros.	43
6.8. Obtención de cortes histológicos y preparación.	45
6.9. Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.	45
7. RESULTADOS	47
7.1. Caracterización y expansión de hESCs H9-GFP en cultivo.	47

7.2. Diferenciación de hESCs H9-GFP a NDA.	48
7.3. Generación de organoides de mesencéfalo ventral a partir de células hESCs H9-GFP.	53
7.4. Obtención de modelo animal de EP.	56
7.5. Análisis funcional de los trasplantes de organoides de mesencéfalo ventral y neuronas dopaminérgicas en animales hemiparkinsonianos.	57
7.6 Evaluación de la supervivencia <i>in vivo</i> de los trasplantes.	59
8. DISCUSIÓN	61
9. CONCLUSIÓN	65
10. PERSPECTIVAS	66
11. MATERIAL SUPLEMENTARIO	67
12. REFERENCIAS	71

1. RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una afección caracterizada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas (NDA) de la *sustancia nigra*, lo que tiene por consecuencia la aparición de los principales síntomas motores: temblor, rigidez y bradicinesia. La EP es el segundo trastorno neurodegenerativo más común a nivel mundial y actualmente no tiene cura, su tratamiento consiste únicamente en el control de los síntomas motores.

Desde hace décadas se ha propuesto el uso de la terapia de remplazo celular como estrategia curativa en EP, sin embargo, a pesar de los múltiples ensayos preclínicos exitosos que se pueden encontrar en la literatura, las investigaciones hechas en pacientes en general no han presentado una mejora clara.

En este trabajo proponemos a los cultivos tridimensionales, específicamente a los organoides de mesencéfalo (OM) provenientes de células troncales embrionarias (ESC) humanas, como un nuevo recurso para realizar trasplantes en animales con deficiencias similares a la EP, esperando su recuperación conductual. Adicionalmente, estos trasplantes con células procedentes de OM fueron comparados con trasplantes de NDA obtenidas en cultivos en monocapa a partir de las mismas ESC, ya que este tipo de trasplantes ya ha sido realizado y reportado anteriormente como funcional.

A pesar de los favorables perfiles de expresión que mostraron los OM, los cuales incluían altos niveles de expresión de marcadores de precursores neuronales como Nestina, de linaje de mesencéfalo como FoxA2 y Lmx1a, y finalmente de TH, el marcador específico de NDA; el trasplante de estos cultivos no mostró ninguna mejoría en los animales hemiparkinsoníacos, ya que continuaron mostrando deficiencias conductuales asociadas con la pérdida de NDA hasta 14 semanas después del trasplante. Análisis post mortem indican que esto fue consecuencia de la baja supervivencia de las células trasplantadas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad degenerativa del sistema nervioso central (SNC) más común a nivel mundial, así como el desorden de movimiento más frecuente; afectando al 0.3% de la población mundial y más del 1% de la población mayor a 60 años, con una prevalencia que incrementa en un modo dependiente de la edad. (Bill y Foundation 2016; Kalia y Lang 2015; Lew 2007; Tysnes y Storstein 2017).

La manifestación neuropatológica característica de EP es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas (NDA) de la *sustancia nigra pars compacta* (SNpc) (Fig. 1B-D), las cuales en condiciones normales inervan a los núcleos basales del estriado, el caudado y el putamen. Dicha neurodegeneración puede ser fácilmente identificada de manera visual por la falta de pigmentación dada por la neuromelanina en el cerebro medio, o bien al realizar una tinción que identifica a la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) que se produce característicamente en las NDA (Fig. 1A) (Chinta y Andersen 2005; Dauer y Przedborski 2003; Poewe et al. 2017).

Otra característica patológica importante es la aparición de agregados proteicos en las neuronas afectadas llamados Cuerpos de Lewy, estos son inclusiones intracelulares de diámetro aproximado de 15 μm , formados principalmente por α -Sinucleína (comúnmente en formas modificadas oxidativamente) y ubiquitina, aunque también se pueden encontrar otras proteínas como Parkina y Neurofilamentos. La aparición de estos agregados comienza en la SNpc, y conforme la enfermedad progresa se ha visto que se expanden hacia regiones corticales del cerebro, e incluso a regiones fuera del SNC, donde el ejemplo más importante y caracterizado es el nervio vago (Samii, Nutt, y Ransom 2004; Tysnes y Storstein 2017; Wakabayashi et al. 1989).

Las NDA del cerebro medio o mesencéfalo son el mayor recurso de dopamina (DA) del SNC, dichas neuronas están divididas en tres sistemas anatómica y funcionalmente diferentes: sistema mesolímbico, sistema mesocortical y el sistema nigroestriatal. De estos, el más estudiado es el sistema nigroestriatal, el cual se origina en la SNpc y extiende sus fibras hacia los núcleos basales caudado-putamen, conocidos en conjunto como el estriado. Estos núcleos a su vez proyectan a la región locomotora mesencefálica, por lo cual, la vía nigroestriatal tiene un rol esencial en el control de

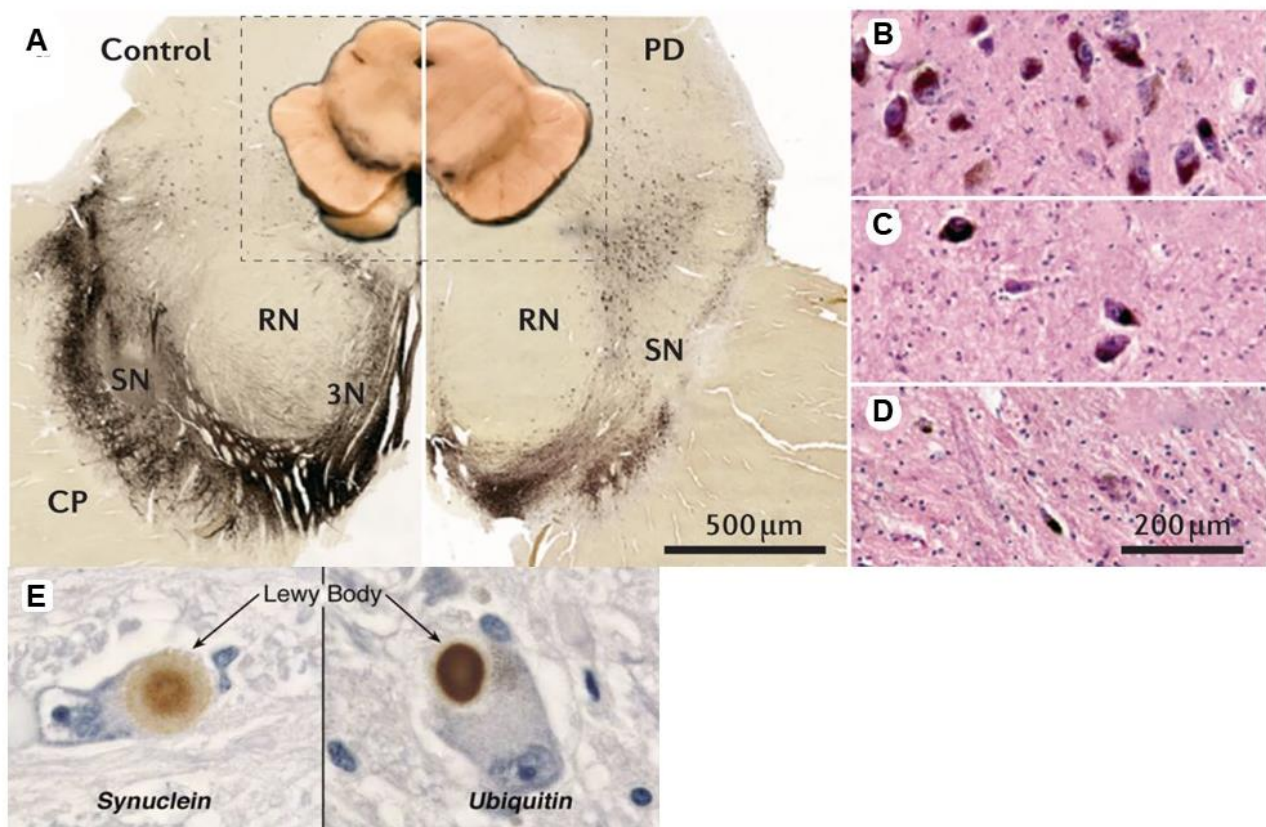


Figura 1. Características neuropatológicas de la Enfermedad de Parkinson. **A.** Comparación histopatológica de la pérdida de pigmentación de la SNpc del sujeto sano (panel izquierdo), contra un paciente de EP (panel derecho) que muestra una notable despigmentación en la zona, lo que asocia con la muerte de las neuronas dopaminérgicas. **B-D.** Tinción de hematoxilina y eosina en la SN, mostrando la densidad de las NDA en un sujeto sano (**B**), un sujeto con grado de degeneración intermedio (**C**), y en un paciente con EP en una etapa avanzada (**D**). **E.** Tinciones inmunohistoquímicas con α -Sinucleina (panel izquierdo) y ubiquitina (panel derecho) para mostrar los cuerpos de Lewy. [Modificada de Poewe et al. 2017, y Dauer y Przedborski 2003.].

movimientos voluntarios (Chinta y Andersen 2005; Juárez Olgúin et al. 2016; Ryczko y Dubuc 2017).

En condiciones patológicas de EP, la muerte de las NDA tiene como consecuencia una deficiencia de dopamina en los ganglios basales, la cual da lugar a un desorden del movimiento que incluye a los síntomas clásicos de síndromes parkinsonianos (Kalia y Lang 2015). Las manifestaciones clínicas de EP incluyen síntomas motores y no motores, dentro de los motores se encuentran los característicos y esenciales para el diagnóstico de la enfermedad: temblor en extremidades en estado de reposo, rigidez y bradicinesia.

El temblor de extremidades tiene una frecuencia de entre 3 y 5Hz, es el primer síntoma en aparecer en el 70% de los pacientes. Usualmente comienza en brazos, siendo asimétrico al inicio y conforme la enfermedad progresa se presenta de igual manera en ambos lados y posteriormente en las extremidades inferiores (Samii, Nutt, y Ransom 2004). La rigidez se refiere a la resistencia a movimientos pasivos del cuerpo, es decir movimientos efectuados por fuerzas ajenas al paciente. La bradicinesia es la lentitud al moverse, esta comienza a manifestarse como dificultades para realizar movimientos finos como escribir o abotonar y progresa hasta el punto de dificultarle al paciente realizar cualquier movimiento voluntario (Joseph 2008).

Acompañando estos síntomas también es posible observar hipocinesia que es la reducción en la amplitud de los movimientos voluntarios, y acinesia, es decir la ausencia de movimientos inconscientes normales como mover los brazos y balancear la cadera al caminar (Dauer and Przedborski 2003; de Lau and Breteler 2006; Samii, Nutt, and Ransom 2004). En etapas más avanzadas se pueden presentar además, disfagia, que es la dificultad para engullir alimentos e inestabilidad en la postura, lo que puede presentar un riesgo grave para la salud de los pacientes. Otros síntomas motores de menor frecuencia e importancia clínica son la disminución en la expresión facial, menor volumen al hablar, pasos más pequeños durante la caminata, la escritura

muestra una reducción de tamaño, y congelamiento, lo que significa que no pueden comenzar un movimiento voluntario (Dauer y Przedborski 2003).

Los síntomas no motores de EP incluyen depresión (en el 50% de los casos, y a niveles variables), ansiedad, apatía, fatiga constante, dificultad en el pensamiento abstracto, problemas de memoria. También se pueden presentar disfunciones autónomas, como la constipación debido a una reducción en el movimiento intestinal; hipotensión ortostática, que puede causar caídas y heridas; incremento en la sudoración y salivación (Lew 2007). Dichos síntomas no se observan en todos los pacientes de EP, y aunque se presentan previo a la aparición de los motores no pueden ser utilizados como marcadores preliminares de la EP, dado que son síntomas compartidos con otras patologías y que no todos los pacientes presentan (Connolly y Lang 2014).

Es preciso mencionar que los síntomas no motores se presentan mucho antes a la aparición de los síntomas motores característicos de EP, se calcula que pueden empezar hasta 20 años previo al diagnóstico de la enfermedad (Fig. 2). En etapas avanzadas de EP tanto los síntomas motores como los no motores se vuelven mucho más pronunciados, por lo que la calidad de vida del paciente se ve excesivamente reducida, desarrollando además nuevas complicaciones, por ejemplo, en algunos casos avanzados de EP se presenta demencia o psicosis (Poewe et al. 2017).

A pesar de que EP y sus síntomas motores fueron inicialmente descritos hace más de 200 años (Parkinson 1817), y que con los años se han descrito nuevas características patofisiológicas importantes de la enfermedad, a la fecha no se conoce completamente la etiología de la enfermedad, es decir la causa o causas de la neurodegeneración observada en la EP. Sin embargo, se han descrito múltiples factores de riesgo que pueden aumentar las probabilidades de padecer la enfermedad.

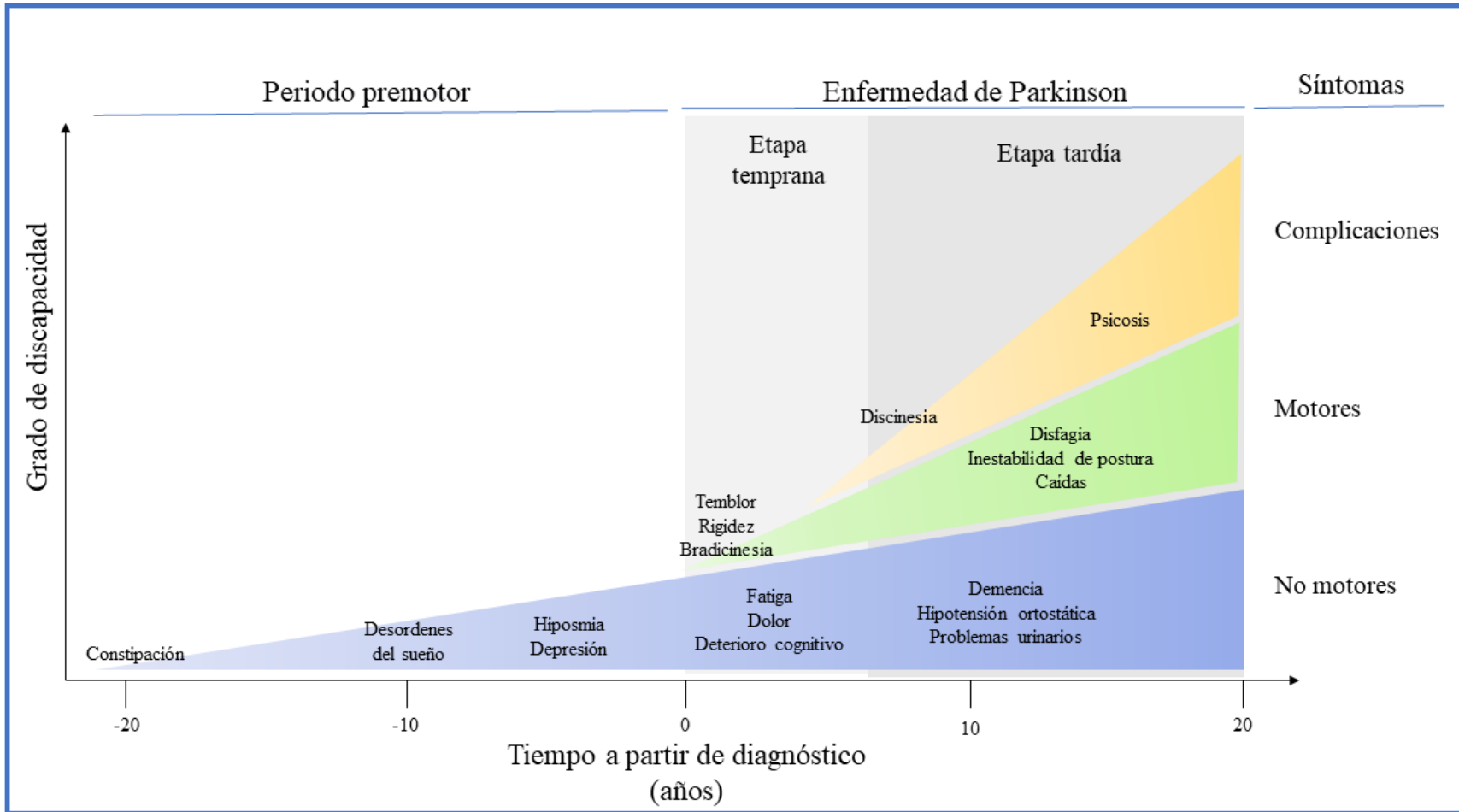


Figura 2. Avance de los síntomas clínicos de la Enfermedad de Parkinson, respecto al punto de diagnóstico. (Poewe et al. 2017).

Los factores riesgo mejor caracterizados son los genéticos, los cuales son causa de EP familiar o hereditaria (Kalia y Lang 2015). Solo el 10% de los casos de EP son familiares, y el restante 90% son casos esporádicos o idiopáticos, en los que no se conoce su etiología.

A la fecha se han encontrado múltiples factores genéticos que incrementan el riesgo de desarrollar EP, estos factores normalmente son simbolizados con las siglas PARK, dado a su conexión con la enfermedad, acompañados por un número (del 1 al 18) que indica el orden cronológico con el que fueron descritos. Entre estos, los más estudiados por su mayoritaria aparición en casos familiares, son los listados a continuación:

PARK1/PARK4: Incluye mutaciones o amplificaciones en el gen *SNCA*, que codifica para la proteína α -Sinucleína. Es característica de EP de aparición temprana (EPAT), normalmente previo a los 50 años de edad; y con un rápido progreso, normalmente acompañado por demencia y un declive cognitivo. Normalmente la proteína α -Sinucleína adopta estructuras ricas en α -hélices, sin embargo, bajo efecto de mutaciones forma β -plegadas estables que permiten la formación de oligómeros tóxicos, desencadenando la aparición de cuerpos de Lewy (Klein y Westenberger 2012).

PARK8: Mutaciones en el gen *LRRK2* (Cinasa con repeticiones ricas en leucina 2) son la causa más frecuente de EP hereditario de modo autosomal dominante y de EP esporádico. La presencia de cuerpos de Lewy es muy común pero no obligatoria en todos los pacientes con este tipo de mutaciones. El mecanismo patogénico de las mutaciones en *LRRK2* no se conoce completamente, sin embargo se le ha descrito una fuerte asociación al aumento en su actividad de cinasa; y por el contrario, una disminución en su expresión y/o actividad puede tener efecto neuroprotectores (Islam y Moore 2017; Tolosa et al. 2020).

PARK2: Mutaciones en el gen *Parkin* son la causa más común de EPAT heredada de manera autosómica recesiva. El producto, la proteína parkina tiene un dominio tipo ubiquitina que participa en procesos de degradación.

PARK6: Mutaciones del gen *PINK1*, es la segunda causa más común de EPAT, heredada de manera recesiva autosómica. Las proteínas PINK1 y Parkina trabajan juntas, encargándose de censar y eliminar mitocondrias dañadas por lisosomas.

Colectivamente, estas mutaciones explican menos de 5% de los casos de la EP, por lo que se requiere de más análisis tanto genéticos como fisiológicos para lograr describir otros factores implicados en la aparición de la EP, aunque es probable que la etiología en muchos casos sea multifactorial (Klein y Westenberger 2012).

Aunque el factor genético, como se ha descrito puede ser de gran influencia para desarrollar la EP familiar, también existen factores ambientales que pueden contribuir o disminuir las probabilidades de padecer esta enfermedad. Por ejemplo, la exposición a pesticidas ha sido relacionada con el desarrollo de EP. Por otro lado, la inyección intravenosa accidental de drogas contaminadas con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra hidro-piridina (MPTP), un fármaco que causa un daño selectivo a las NDA, genera un síndrome parkinsoniano, de hecho en la actualidad el MPTP es utilizado para la obtención de modelos animales de EP (Langston et al. 1983; Tysnes y Storstein 2017).

Por otra parte, se ha encontrado que el consumo de antioxidantes puede tener un efecto neuroprotector, lo que puede ayudar a prevenir la aparición de la EP e inclusive puede ser ayuda en pacientes en etapa temprana de la EP (de Lau y Breteler 2006).

Lamentablemente, el diagnóstico de la EP solo se puede realizar en una etapa avanzada de la enfermedad, cuando comienzan a manifestarse los síntomas motores. Para este momento, ya se ha perdido aproximadamente el 80% de la DA en el estriado, y el 50-60% de las neuronas de SNpc ya han muerto. Además, para este punto los

cuerpos de Lewy se han extendido hacia la corteza, la amígdala, el nervio vago y regiones del sistema nervioso periférico autónomo (Samii, Nutt, y Ransom 2004; Wakabayashi et al. 1989).

Una vez hecho un diagnóstico de la EP, se comienza un tratamiento centrado en el control de los síntomas motores, en la actualidad no existe ningún procedimiento que permita detener, retrasar y mucho menos restaurar la pérdida neuronal. El fármaco considerado como el estándar de oro por ser el más eficaz es la Levodopa, un precursor de la dopamina, sin embargo, los pacientes a quienes se les administra este fármaco durante varios años presentan efectos secundarios como discinesias, que son movimientos involuntarios. Además, después de alrededor de cinco años de uso continuo el paciente desarrolla resistencia al fármaco, presentando fluctuaciones motoras que se presentan como lapsos de tiempo intermitentes entre un buen y mal control de los síntomas motores, un fenómeno que se conoce como “on/off”. Por dichas problemáticas, posterior al diagnóstico, se inicia con la administración de inhibidores de la monoamino oxidasa B (encargada del catabolismo de la DA), posteriormente se prueba el uso de agonistas de la dopamina que son capaces de controlar los síntomas motores cuando aún no son tan pronunciados, con el objetivo retrasar la administración de levodopa tanto como sea posible (Lew 2007). Sin embargo, la elección del fármaco a utilizar dependerá de qué síntomas presenta el paciente, qué edad tiene y su respuesta previa a los otros fármacos (Connolly y Lang 2014).

Existe una alternativa no farmacológica pero ampliamente invasiva para casos avanzados de EP, la estimulación cerebral profunda (ECP), que consiste en la inserción de un electrodo en diferentes núcleos cerebrales. En animales modelos de EP y pacientes de esta ha sido posible realizar grabaciones electrofisiológicas para caracterizar la patología de la enfermedad desde su punto de vista electrofisiológico, en el cual fue posible observar que la actividad oscilatoria de neuronas de los núcleos

Globo Pálido (GP), Sustancia Nigra pars reticulada (SNpr), Núcleo subtalámico (NST) y Corteza motora (CM) está fuera de los rangos normales (Agnesi, Johnson, y Vitek 2013; Wichmann y DeLong 2016).

En pacientes con EP se han caracterizado oscilaciones entre 10 y 25Hz en GP y NST, las cuales pueden ser aumentadas hasta 60-80Hz bajo el tratamiento de Levodopa, cabe resaltar que ha sido posible recaudar estos datos gracias a que los electrodos implantados para ECP pueden ser utilizados también para realizar registros electrofisiológicos en estos núcleos blanco para el tratamiento. Bajo este contexto podemos decir que el propósito de ECP es reemplazar la actividad intrínseca en los núcleos cerebrales anteriormente mencionados, lo cual se logra con una estimulación de alta frecuencia constante, mostrando un gran índice de efectividad (Bratsos, Karponis, y Saleh n.d.; Wichmann y DeLong 2016).

No obstante, como se mencionó previamente, ninguno de los tratamientos para EP actualmente disponibles detiene o revierte la muerte neuronal, sino que únicamente ayudan al control de los síntomas motores. Por esto, se requieren nuevas estrategias terapéuticas que permitan una mejora significativa en la funcionalidad neurológica del paciente y, por tanto, en su calidad de vida.

2.2 Células troncales embrionarias

Por definición, una célula troncal se caracteriza por tener el potencial de diferenciarse a uno o más tipos celulares, y por su capacidad de autorrenovación, gracias a la cual la célula puede proliferar sin perder ninguna de estas cualidades. Las células troncales se pueden clasificar en base a su origen: embrionarias, fetales, adultas; o bien por su potencialidad, es decir a la cantidad de linajes celulares a los que pueden diferenciarse: pluripotencial, que da lugar cualquier tipo celular del embrión; multipotentes, su

diferenciación se restringe a tejidos, y unipotentes que solo pueden formar un tipo celular.

En específico las células troncales embrionarias (ESCs, por su siglas en inglés) se caracterizan por ser pluripotenciales, lo que le permite generar cualquier estirpe celular de las tres capas germinales del organismo adulto o en desarrollo (Fig3), y como se mencionó previamente también se caracterizan por su capacidad de autorrenovación, gracias a la cual la célula puede proliferar indefinidamente bajo las condiciones de cultivo adecuadas (Mo Li y Izpisua Belmonte 2018; Ying et al. 2008; Young 2011) Dichas características le confieren a las ESCs ser un recurso ilimitado de células especializadas, diferenciadas que pueden ser utilizadas potencialmente para el tratamiento de enfermedades, así como para estudiar los procesos de diferenciación y modelar el desarrollo.

Las ESCs se obtienen al aislar la masa celular interna (ICM) de embriones tempranos en etapa de blastocisto, previo a su implantación en el útero (Fig. 3). Este proceso fue inicialmente logrado a partir de embriones de ratón en 1981 (EvansyKaufman 1981), y tiempo después el Dr. James Thomson logró obtener células troncales embrionarias humanas (hESCs) a partir de embriones congelados que fueron producidos con propósitos clínicos de reproducción (Thomson 1998), desde entonces las líneas celulares que él derivó han sido ampliamente utilizadas con fines de investigación, incluyendo ensayos clínicos (Eguizabal et al. 2019; Guhr et al. 2018).

La potencialidad de una ESC recae principalmente en un pequeño grupo de factores transcripcionales (FTs) que en conjunto actúan como una red génica reguladora de pluripotencia, conformada por Oct4, Sox2 y Nanog (Fig. 4). Cada uno de estos factores es indispensable tanto *in vivo* como *in vitro* para lograr un estado de pluripotencia (Johnson et al. 2008).

Oct4 es una proteína de unión a DNA, proveniente del gen *Pou5f*, que se une tanto en regiones proximales al sitio de inicio de la transcripción, como en regiones distales, como son enhancers. Puede actuar en homodímeros, heterodímeros e incluso oligómeros junto con Sox2 para promover la expresión de genes relacionados con el mantenimiento de las ESC, incluidos los mismos miembros de la red de pluripotencia (Yeo y Ng 2013; Young 2011). Por otra parte, Nanog se encarga de estabilizar a las ESCs en cultivo previniendo el inicio de otras redes de expresión génica, es decir que evita un compromiso de diferenciación en las células (Chambers et al. 2007).

Además de estos FTs que actúan como reguladores maestros, existen otros factores característicos en las ESCs involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia por ejemplo c-Myc, Klf4, Rex1, los cuales pueden interactuar directamente con Oct4 y Nanog como cofactores para inducir la transcripción (Johnson et al. 2008).

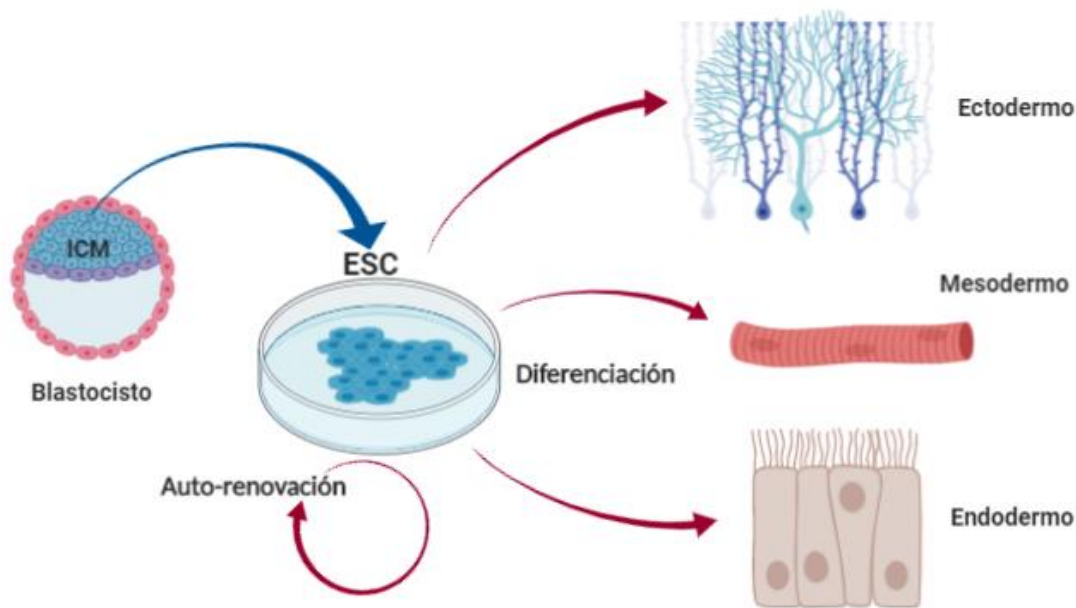


Figura 3. Las células troncales embrionarias (ESC) en cultivo se obtienen a partir de la masa celular interna (ICM) del blastocisto. Estas se caracterizan por sus capacidades de autorrenovación y de diferenciación hacia cualquier tipo celular proveniente de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo o endodermo. Imagen creada con Biorender.

De manera más puntual, c-Myc se ha visto involucrado en inducir la proliferación al unirse a genes relacionados con el ciclo celular (Meyer y Penn 2008). Mientras que Oct4, Sox2 y Nanog al interactuar indirectamente con la RNA Polimerasa se encargan de inducir la transcripción de genes relacionados al mantenimiento de la troncalidad. Además, c-Myc es necesario para asegurar dicha transcripción al mantener estable a la Polimerasa (Young 2011). Del mismo modo, Klf4 está altamente involucrado en el mantenimiento de las ESCs, es capaz de inducir la expresión de los tres miembros de la red de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog, así como la de c-Myc y la propia (Johnson et al. 2008).

Es importante recalcar que no solo factores intrínsecos de la célula participan en el mantenimiento de su estado de pluripotencia, es necesaria la participación de una señalización química adecuada. Desde la obtención de las primeras líneas de ESCs, estas han sido cultivadas sobre una capa de células “alimentadoras” inactivadas mitóticamente y en presencia de suero fetal. Estas células alimentadoras usualmente son fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, por sus siglas en inglés), los cuales producen y secretan los factores necesarios que en conjunto con el suero fetal son necesarios y suficientes para mantener el estado de pluripotencia de las ESCs. No obstante, ahora se conocen específicamente los factores señalizadores implicados en el mantenimiento de la pluripotencia tanto en células de ratón como en las humanas, por lo que estas pueden ser cultivadas sin MEFs (Eguizabal et al. 2019).

Específicamente las hESCs requieren la señalización de Activina/Nodal y Factor de Crecimiento Fibroblástico 2 (FGF2), producido por la capa alimentadora, del mismo modo requieren de Factor de crecimiento tipo insulina (IGF), que es producido por las mismas hESCs, es decir que este actúa por señalización autocrina. Estos factores en conjunto son suficientes para mantener el estado troncal de las hESCs promoviendo la expresión de la red de pluripotencia en ausencia de MEFs (Fig. 4). No obstante se requiere una superficie tratada con Matrigel para su adherencia, una matriz

extracelular formada principalmente por Laminina y Colágeno (Eguizabal et al. 2019; Hughes, Postovit, y Lajoie 2010; Johnson et al. 2008).

Por otra parte, factores epigenéticos también contribuyen al mantenimiento de la pluripotencia comenzando por el acomodo tan característico de ESCs que posee la cromatina. Sabemos, que la cromatina puede estar compacta o laxa dependiendo de las marcas epigenéticas que tenga, en el caso de las ESCs la mayor parte de la cromatina se encuentra en un estado bivalente en que hay marcas tanto de regulación positiva como negativa de la transcripción que permite que el genoma esté laxo sin necesidad de tener altos niveles de expresión, por consiguiente, las ESCs tienen un núcleo muy extenso en relación con el tamaño total de la célula. Esto permite que, ante el estímulo correcto, las células puedan empezar de manera rápida y eficiente los

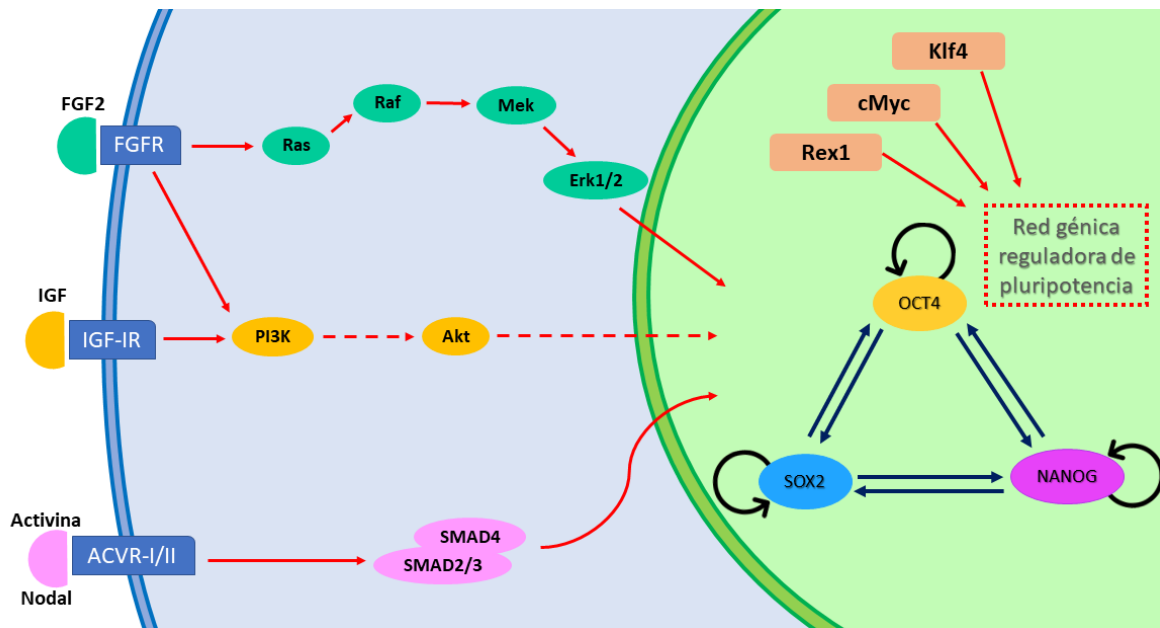


Figura 4. La red génica reguladora de pluripotencia, formada por los factores transcripcionales Oct4, Sox2 y Nanog, es la encargada de mantener la potencialidad en las células troncales embrionarias humanas. Dicha red es mantenida por retroalimentación positiva de los mismos factores que la conforman, e inducida por la participación de otros factores como Klf4, cMyc y Rex1. Así como por diferentes vías de señalización como Activina/Nodal por vía de las Smads; por señalización de IGF por medio de la vía PI3K-Akt y de FGF2 por la vía Mek/Erk.

programas de expresión clave en un proceso de diferenciación (Medvedev, Pokushalov, y Zakian 2012; Young 2011).

Por otro lado, aunque las ESCs humanas y de ratón provienen de una misma estructura del desarrollo que es el blastocisto pre-implantación, estas no poseen exactamente las mismas características, dado que las hESCs representan un estado más tardío del desarrollo, análogo a las células troncales tipo epiblasto (EpiSCs) de ratón obtenidas a partir del epiblasto, que corresponde solo a una porción de la ICM del blastocisto post-implantación. De modo que podemos establecer dos tipos de pluripotencia: “primed” o comprometida, y “naive” (Nichols y Smith 2009; Yeo y Ng 2013).

En resumen, todas estas características y propiedades que poseen las ESCs, les permiten proliferar indefinidamente y por consiguiente esto les confiere ser un recurso inagotable de células diferenciadas, especializadas que pueden utilizarse en el estudio de procesos de diferenciación y compromiso celular durante el desarrollo; así como usarse en el modelado y tratamiento de enfermedades.

2.3 Terapia celular como tratamiento para la EP

La terapia celular tiene como objetivo reemplazar células o tejidos que han sido dañados o perdidos por causas patológicas o accidentales, con el fin de recuperar su función en el organismo. Es una gran promesa para el presente y futuro de la medicina regenerativa, la cual ha sido ampliamente estudiada por años. Los primeros indicios de trasplantes celulares en cerebro se remontan a finales siglo XIX (Thompson 1890), aunque los mayores avances se dieron durante la segunda mitad del siglo XX.

Un hecho que marcó el inicio de la implementación de la terapia celular como tratamiento para EP fue la obtención del modelo animal de la enfermedad por una inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en la SNpc o bien en la vía nigroestriatal (Ungerstedt 1968; Ungerstedt y Arbuthnott 1970). A partir de estos modelos fue

posible realizar múltiples estudios preclínicos de trasplante en ratas a partir de tejido adrenal y tejido de mesencéfalo fetal proveniente de ratas (Bjorklund et al. 1981; Björklund et al. 1980; Björklund y Stenevi 1979; Freed et al. 1980, 1981; Hoffer et al. 1984; Perlow et al. 1979). Estos estudios tuvieron un gran éxito dado que mostraron una importante innervación en los núcleos caudado y putamen del estriado y supervivencia a largo plazo, además fueron capaces de reducir el índice de rotación de las ratas lesionadas con 6-OHDA, el cual se utiliza como medida de la afección causada por falta de NDA y de dopamina en el estriado.

Es gracias a estos avances que, en la década de 1980 se realizaron los primeros ensayos clínicos de terapia celular en pacientes con EP, en un inicio con tejido autólogo de médula adrenal ya que este es fuente normal de catecolaminas, incluyendo dopamina (Backlund et al. 1985; Lindvall et al. 1987). En estos ensayos no fue posible observar mejorías en los pacientes tratados, por lo que más adelante se abordó como nueva estrategia el uso de tejido mesencefálico fetal humano, para la cual se realizaron múltiples ensayos clínicos en pacientes de EP.

A partir de estos trasplantes realizados con tejido fetal se pudieron realizar importantes observaciones: las NDA fetales son capaces de sobrevivir y crecer, innervando el estriado receptor. En los casos más exitosos fue posible detener el tratamiento de levodopa gracias a una notoria recuperación en los pacientes, la cual se mantuvo por varios años. Sin embargo, algunos de los pacientes (15% en un ensayo y 56% en otro) presentaron discinesias causadas por el trasplante, algunas de las cuales requirieron de ECP para el control de las mismas (Lindvall et al. 1989, 1990).

Dado que estos resultados eran poco conclusivos, más adelante se realizaron estudios doble ciego en que hubo un grupo “Sham” de trasplante tipo placebo. Estos mostraron que no hay cambios significativos entre los pacientes Sham y los trasplantados con tejido fetal (Freed et al. 2001; Olanow et al. 2003). Como consecuencia a la falta de

éxito y la aparición de efectos adversos como las discinesias, los ensayos clínicos con tejido fetal se abandonaron.

El campo de estudio de la terapia celular ha sido revolucionado en más de una ocasión, la primera fue gracias a la obtención de las hESCs (Thomson 1998), ya que representan un recurso invaluable de células diferenciadas de origen humano que pueden ser utilizadas como base para la realización alotrasplantes. Posteriormente en 2006 y 2007 cuando se logran llevar células terminalmente diferenciadas de ratón y de origen humano respectivamente a un estado pluripotencial, conocidas como células pluripotenciales inducidas (iPSCs, por sus siglas en inglés), las cuales permitirían obtener células diferenciadas que sean paciente específicas por lo que se podrían realizar trasplantes autólogos (Takahashi et al. 2007; Takahashi y Yamanaka 2006).

De manera más objetiva hacia EP, en 2011 se publicó un protocolo de alta eficiencia para la diferenciación de células pluripotentes hacia neuronas dopaminérgicas específicas del mesencéfalo, dichas neuronas se trasplantaron en diferentes modelos animales mostrando mejorías funcionales en cada uno de ellos (Kriks et al. 2011). Sin embargo, NDA trasplantadas han mostrado tener muy variables niveles de supervivencia por lo que se han buscado múltiples estrategias que aumenten la eficiencia del trasplante en este sentido; o bien, recursos celulares diferentes para la obtención de neuronas mesencefálicas que reemplacen a la población perdida.

2.4 Organoides

Los modelos biológicos son sistemas experimentales que asemejan en uno o varios aspectos la fisiología humana ya sea en homeostasis o en enfermedad. Estos modelos se dividen en dos grupos básicos: animales para estudios *in vivo* que nos permiten estudiar una respuesta generalizada por parte del organismo, en estos hay que tener en cuenta la desventaja creada por las diferencias existentes entre el humano y el

modelo dado, además de la gran variabilidad que pueden presentar. Por otro lado, modelos mucho más sencillos son los sistemas *in vitro*, basados principalmente en cultivos en monocapa o bidimensionales (2D), los cuales aunque pueden tener un origen celular humano, carecen de importantes propiedades como la participación de la matriz extracelular, la comunicación intercelular entre diferentes tipos celulares, entre otros aspectos que imposibilitan una correcta representación de los tejidos (Yin et al. 2016).

Como una extensión a los modelos 2D *in vitro* y con la finalidad de evadir algunas de sus limitaciones, en la última década se han desarrollado formas de cultivo tridimensionales (3D) que pueden ser obtenidas a partir de células humanas, o de otras especies de interés, que asemejan de mejor manera aspectos estructurales y funcionales de tejidos observados *in vivo* en animales o en el humano. Estos novedosos cultivos se conocen como organoides.

Un organoide se caracteriza por ser un conjunto de diferentes tipos celulares terminalmente diferenciados o en un estado de progenitores que son tejido-específicos, los cuales se autoorganizan espacialmente de una manera similar a lo observado *in vivo* ya sea en tejido adulto o en desarrollo y que además, son capaces de mostrar algunas funciones específicas del órgano al que asemejan (Kim, Koo, y Knoblich 2020; Lancaster y Knoblich 2014). Estos se obtienen a partir de células pluripotenciales, ya sean ESCs o iPSCs, o bien de AdSC (Fig. 5) (Clevers 2016).

Como se discutió previamente las células troncales poseen un gran potencial que les permite no solo diferenciarse a múltiples linajes celulares sino también crear y ensamblarse en estructuras complejas, habilidad denominada autoorganización (Lancaster y Knoblich 2014; Yin et al. 2016). La reciente tecnología que representan los organoides ha revolucionado el uso de las células troncales gracias a que se aprovecha de esta capacidad de autoorganización.

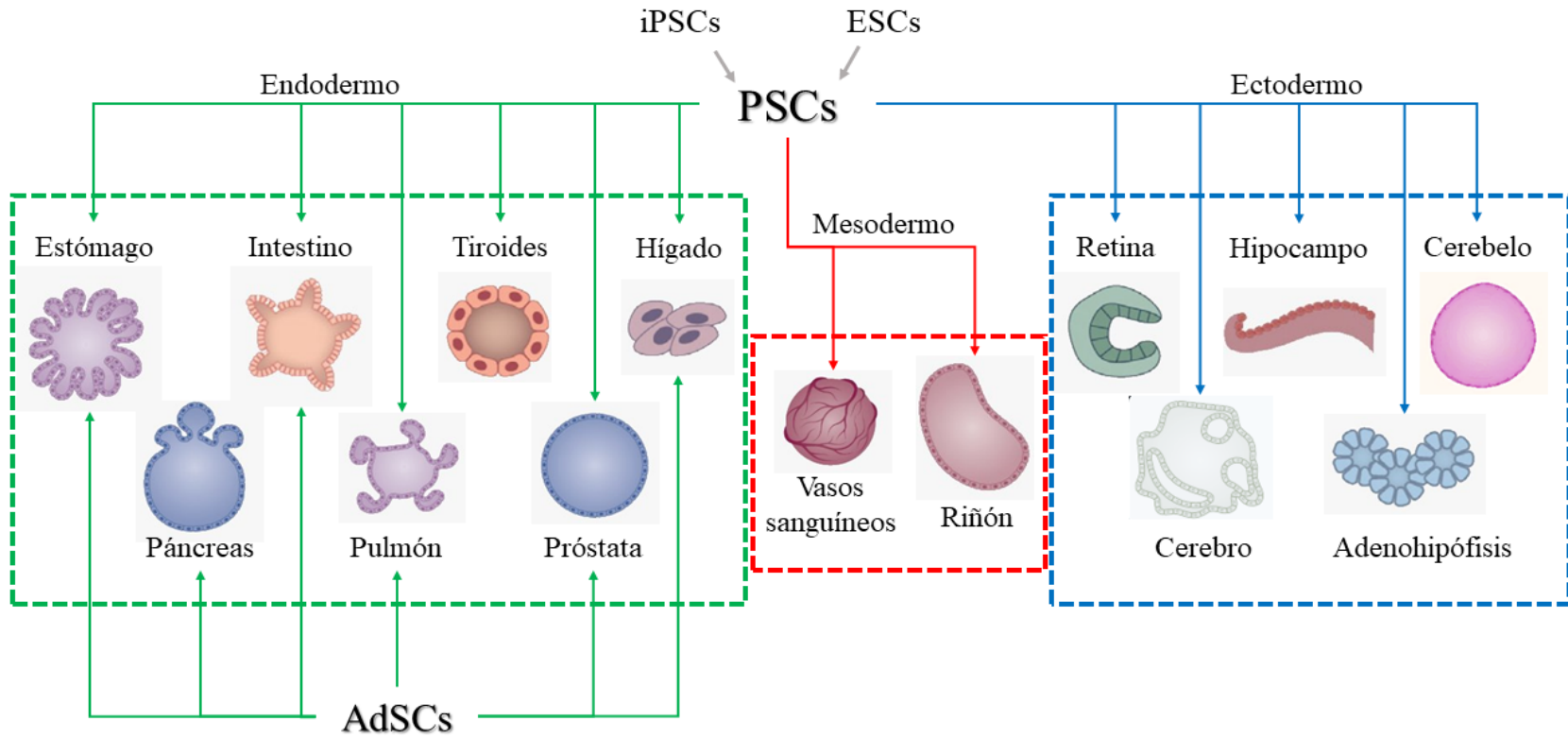


Figura 5. Esquema de los actuales modelos de organoides de las tres capas germinales, endodermo, mesodermo y ectodermo; lo cuales que pueden ser obtenidos a partir de células troncales pluripotentes (PSCs), ya sean embrionarias (ESCs) o inducidas (iPSCs), o algunos a partir de células troncales de origen adulto (AdSCs). Adaptada de Clevers 2016; Kim, Koo y Knoblich 2020.

El autoensamblamiento y la autoorganización de los organoides se basa en dos aspectos principales: 1) segregación de tipos celulares por su expresión diferencial de moléculas de adherencia y creación de dominios celulares de propiedades de adherencia similares, y 2) compromiso celular restringido por la localización espacial de la célula, es decir que dependiendo de la posición que tenga la célula dentro del cultivo 3D, tomará un destino de diferenciación en particular (Lancaster y Knoblich 2014).

Actualmente existen muchos protocolos para la obtención de organoides a partir de células pluripotentes y células troncales de origen adulto, gracias a los cuales hoy en día existen organoides que asemejan a una gran variedad de tejidos pertenecientes a las tres capas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo (Fig. 5) (Kim, Koo, y Knoblich 2020; Lancaster y Huch 2019; Yin et al. 2016).

Inicialmente los organoides fueron presentados por Toshiro Sato y colaboradores en 2009, lograron crear un modelo intestinal que presentaba características tanto histológicas como funcionales del intestino, que contenía múltiples tipos celulares y zonas que semejan al nicho de las criptas intestinales *in vivo* (Sato et al. 2009). Cabe resaltar que en este trabajo utilizaron Matrigel como matriz extracelular para el soporte de la estructura, y que dicha técnica se ha replicado para la formación de organoides de otros tejidos.

A partir de la publicación de este trabajo surgieron más modelos de cultivo 3D que asemejaban a tejidos del desarrollo o algún órgano en la etapa adulta del organismo, a los cuales en conjunto se les ha nombrado organoides. Hoy en día podemos encontrar organoides de retina, los cuales presentan un acomodo en multicapas que contiene conos y bastones característicos de esta región (Eiraku et al. 2011); organoides de pulmón que contienen células basales y ciliadas que expresan marcadores alveolares, estos han tomado gran relevancia en el estudio de enfermedades respiratorias (Leibel et al. 2020); organoides de la glándula tiroides,

capaces de producir y secretar hormonas tiroideas (Saito et al. 2018); organoides de hígado, ricos en vasos sanguíneos capaces de unirse a los de un hospedero después de un trasplante en un modelo murino (Takebe et al. 2013); organoides de riñón, que son los más complejos en cuanto a arquitectura y variabilidad celular se refiere, contiene poco más de 20 tipos celulares y son capaces de organizarse en estructuras tubulares como nefronas, glomérulos e incluso estructuras más complejas tipo uréteres (Taguchi et al. 2014; Takasato et al. 2015); organoides de vasos sanguíneos, útiles como modelo de vasculopatías causadas por un ambiente diabético (Wimmer et al. 2019); organoides tipo cáncer, derivados de células cancerígenas provenientes de múltiples tumores los cuales pueden ser utilizados en pruebas de fármacos (Clevers 2016; Li et al. 2014; Nadauld et al. 2014).

Así mismo, los organoides de origen neuroectodermal han sido ampliamente estudiados, comenzando con los organoides cerebrales (OCs), los cuales sirvieron como modelo de microcefalia causada por el virus Zika y por una mutación hereditaria (Lancaster et al. 2013). Más adelante, surgieron organoides de estructuras más específicas del SNC como adenohipófisis (Ozone et al. 2016), cerebelo (Balion et al. 2020; Silva et al. 2020), hipocampo (Sakaguchi et al. 2015) y tallo cerebral (Eura et al. 2020); o bien de regiones específicas del cerebro incluyendo de corteza cerebral (Camp et al. 2015a), mesencéfalo (Jo, Xiao, Sun, Cukuroglu, et al. 2016; Mohamed et al. 2019), telencéfalo (Watanabe et al. 2019), entre otros.

En general, los organoides presentan amplias ventajas sobre los cultivos en monocapa comenzando por su compleja morfología que puede modelar ciertas regiones específicas o estructuras complejas de los tejidos como ventrículos o túbulos, así como acomodos tridimensionales de diferentes tipos celulares semejante a lo observado *in vivo*. Se mantiene un microambiente y una matriz extracelular creada por el mismo organoide que promueve las interacciones celulares.

En conjunto estas características de los organoides permiten sean utilizados con múltiples fines, por ejemplo para estudiar aspectos moleculares del desarrollo y de organogénesis, realizar pruebas de fármacos, lo cual toma especial interés en organoides que asemejan al hígado y riñones, ya que estos órganos se encargan respectivamente de metabolizar y desechar cualquier droga del organismo; así como probar la respuesta a fármacos en iPSC de pacientes, lo que representa un acercamiento a la medicina personalizada. Una gran ventaja es que todos estos estudios pueden ser mucho más robustos que los análisis *in vivo*, ya que los organoides se pueden generar en grandes cantidades sin representar un dilema ético importante.

Por otro lado, también pueden ser utilizados para ensayar terapias génicas, por ejemplo, la fibrosis quística es una enfermedad causada por una variedad de mutaciones, las cuales se pueden corregir *in vitro* con el sistema de edición génica CRISPR-Cas9. Una vez hecha la corrección de la mutación en cuestión se pueden generar organoides intestinales que reemplacen al tejido dañado en un modelo murino de la enfermedad (Wong et al. 2012). Finalmente, esto nos presenta a los organoides como un recurso para su uso en terapias de reemplazo celular o tisular para diferentes patologías, lo cual es de gran relevancia en el presente trabajo.

2.5 Organoides cerebrales

Como se mencionó con anterioridad existen numerosos tipos de organoides que nos han permitido estudiar procesos de diferenciación o bien para mimetizar el desarrollo de ciertos órganos o estructuras.

En particular, los organoides de cerebro fueron introducidos por primera por Madeline Lancaster y colaboradores en 2013, cuyo trabajo muestra por primera vez la formación de cultivos neuronales tridimensionales más complejos que las neuroesferas y que asemejan ciertos aspectos del cerebro como formación de estructuras tipo ventrículos

que funcionan como centros proliferativos de células precursoras. Además, estos organoides demostraron ser útiles como modelo del desarrollo cerebral normal y en condiciones patológicas de microcefalia (Lancaster et al. 2013).

A partir de la publicación de este trabajo se ha logrado mejorar la generación de organoides cerebrales desde varios puntos de vista. Por ejemplo, un problema común en generación de organoides es la falta de oxigenación y suplemento de nutrientes en la zona más interna de la estructura, ya que el medio no penetra lo suficiente hasta esta región. Esto tiene como consecuencia que el interior eventualmente sufra de altos niveles de muerte celular, limitando el crecimiento del organoide. Para resolver esta cuestión se han generado OCs vascularizados con una buena capacidad de supervivencia a largo plazo (Pham et al. 2018; Shi et al. 2020).

Otro modo de mejorar la generación de organoides fue inducir la formación y enriquecimiento de microglía formada en el mismo organoide, lo cual puede tener beneficios al momento de crear modelos *in vitro* de enfermedades (Kwak et al. 2020; Ormel et al. 2018).

Además, se han podido desarrollar protocolos de generación de organoides específicos de ciertas regiones del SNC, como la corteza cerebral (Camp et al. 2015^a), cerebelo (Balion et al. 2020; Bonev et al. 2017; Qian et al. 2020; Silva et al. 2020), tallo cerebral (Eura et al. 2020), telencéfalo (Watanabe et al. 2019), mesencéfalo (Jo, Xiao, Sun, Cukuroglu, et al. 2016; Mohamed et al. 2019; Monzel et al. 2017), hipocampo (Sakaguchi et al. 2015), pituitaria anterior o adenohipófisis (Ozone et al. 2016), entre otros.

De manera más puntual al región del cerebro medio, se han publicado múltiples protocolos que permiten generar organoides de mesencéfalo ventral (OM) que expresan múltiples marcadores específicos de mesencéfalo tanto en desarrollo, como Pitx3, Lmx1a y Otx2, así como de neuronas maduras, como Tirosina Hidroxilasa (TH)

y GIRK2 (Mohamed et al. 2019; Monzel et al. 2017). Así mismo, presentan múltiples características funcionales como propiedades electrofisiológicas características de NDA, producción y secreción de dopamina, formación de sinapsis funcionales y producción de neuromelanina, característica del mesencéfalo y que no se había observado previamente en cultivos 2D de NDA (Jo, Xiao, Sun, Cukuroglu, et al. 2016).

En este sentido, los OCs han sido de gran ventaja para su uso en el modelado de desórdenes del desarrollo como la microcefalia (Lancaster et al. 2013), desórdenes neuropsiquiátricos como la esquizofrenia (Srikanth et al. 2018), discapacidad intelectual (Xu et al. 2019), y el espectro autista (Mariani et al. 2015). Así mismo, se han obtenido modelos de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Choi et al. 2014), los cuales pueden ser utilizados para pruebas de fármacos (Jorfi et al. 2018); la enfermedad de Huntington (Conforti et al. 2018) e inclusive de la EP. Estos últimos se han generado a partir de líneas celulares o de células derivadas de pacientes con específicas mutaciones génicas (Kim et al. 2019; H. Li et al. 2018; Smits et al. 2019), o bien por una inducción del modelo con uso de neurotóxicos como MPTP (Kwak et al. 2020).

Sin embargo, más allá de su uso en el modelado del desarrollo del SNC y de las enfermedades que le afectan, los OCs tienen un gran potencial para su aprovechamiento como recurso tisular en terapias de reemplazo celular.

2.6 Trasplante de Organoides de Cerebro

Los organoides presentan importantes ventajas sobre los cultivos 2D, ya que estos poseen una gran capacidad de autoorganización que permite la creación de una compleja estructuración tridimensional que asemeja de mejor manera a la arquitectura observada *in vivo*; contienen un microambiente y matriz extracelular más compleja

que cultivos en monocapa. Además, es de gran conveniencia su heterogeneidad celular ya que pueden contener células troncales neurales, precursores neurales, neuronas maduras e inmaduras, y células gliales. Por estas razones, es que se han considerado en múltiples ocasiones a los organoides cerebrales y de otro tejidos para su uso en terapias celulares (Wang et al. 2017).

Hasta el momento, han sido pocos los trabajos publicados en los que se presentan trasplantes de OCs después de algún tipo de lesión física. Dichos estudios preclínicos utilizan organoides regionalizados específicamente hacia la corteza cerebral o bien sin una regionalización en particular (Daviaud, Friedel, y Zou 2018; Kitahara et al. 2020; Wang et al. 2019; Wang et al. 2020).

Los trasplantes de organoides en corteza cerebral después de una lesión mecánica han demostrado tener una gran capacidad de integración, gracias a que rápidamente son vascularizados por el hospedero, lo que tiene como consecuencia bajos índices de muerte celular (Daviaud, Friedel, y Zou 2018; Mansour et al. 2018). Además, presentan una importante capacidad de migración y extensión, lo que permite la creación de nuevas conexiones sinápticas entre células del huésped y las células provenientes de organoide (Kitahara et al. 2020).

En un par de estudios, los OCs han demostrado promover una mejoría funcional después de lesiones específicas. Por ejemplo, en un modelo de infarto isquémico hecho por una oclusión de la arteria media cerebral (MCAO, por sus siglas en inglés) se trasplantaron organoides cerebrales 6 h después de la interrupción del flujo sanguíneo (Wang et al. 2019). En el grupo de animales trasplantados se encontraron múltiples cambios favorables, comparado con el grupo que solo se provocó MCAO: menor volumen de tejido dañado, mejorías progresivas en cuanto a la funcionalidad motora de los animales, lo cual fue evaluado con un índice de severidad neurológica (mNSS, por sus siglas en inglés). Además de abundante migración y diferenciación hacia distintos tipos neuronales por parte de las células del organoide trasplantado.

En otro estudio, se realizó una lesión mecánica en la corteza motora modelando una lesión traumática cerebral en un solo hemisferio, y posteriormente se insertaron OCs en la cavidad formada (Wang et al. 2020). Las células provenientes de dichos organoides mostraron una buena capacidad de diferenciación y maduración, además de un alto índice de migración. De manera más relevante, el trasplante fue capaz de recuperar de manera significativa la función motora en comparación a un grupo de animales que sufrió la lesión pero no recibió ningún trasplante, esto evaluado por mNSS.

Recientemente, se realizaron trasplantes de NDA diferenciadas en monocapa, pero con un antecedente de cultivo tridimensional (Kim et al. 2021). Inicialmente, se obtuvieron precursores neurales específicos de mesencéfalo a partir de organoides tempranos, los cuales se expandieron y fueron utilizados en un protocolo de diferenciación 2D. Con esta estrategia de cultivos mixtos lograron tener una mayor eficiencia de diferenciación en comparación a un protocolo clásico en monocapa, además las NDA obtenidas presentaban una mayor expresión de marcadores específicos de mesencéfalo. Finalmente, utilizaron dichas neuronas en trasplantes en animales hemiparkinsonianos, los cuales presentaron importantes mejorías en diferentes pruebas conductuales. Sin embargo, aún no se han realizado trasplantes directamente con las células provenientes del organoide, o bien un organoide completo. Por lo que, aún existe la incógnita si los organoides de mesencéfalo son un buen recurso de generar precursores neurales o NDA para trasplantes.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, el tratamiento más común de EP está basado en la administración de levodopa o L-Dopa, un precursor de dopamina que promueve una disminución en los síntomas motores que los pacientes presentan. Sin embargo, este fármaco no detiene

ni revierte la muerte neuronal, además de causar efectos adversos en los pacientes tras su uso prolongado. Por esta razón se requiere desarrollar tratamientos alternos que busquen restablecer el funcionamiento normal del tejido neural y mejorar así los síntomas asociados a la disminución de dopamina en modelos de la EP.

4. HIPÓTESIS

Las células provenientes de un organoide de mesencéfalo ventral, obtenido a partir de una línea celular de hESCs serán capaces de restaurar la función dopaminérgica disminuida en el modelo animal de la EP.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar la funcionalidad y supervivencia de células provenientes de organoides de mesencéfalo ventral trasplantadas en un modelo animal de la EP como estrategia de terapia de reemplazo celular para la enfermedad.

5.2. Objetivos particulares

- Realizar lesiones de la vía nigroestriatal en el cerebro de ratas para la obtención de un modelo animal de EP.
- Generar organoides de mesencéfalo ventral que contengan neuronas dopaminérgicas.
- Realizar trasplantes de organoides de mesencéfalo en un modelo animal de EP.
- Evaluar las posibles mejoras en el comportamiento característico de la deficiencia de dopamina, posterior al trasplante y compararlo contra un trasplante de neuronas dopaminérgicas diferenciadas en cultivo 2D.

- Evaluar la supervivencia de las células provenientes de los organoides de mesencéfalo ventral, posterior a su trasplante.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales

Los animales utilizados para realizar el presente trabajo fueron ratas de la cepa Wistar, de especie *Rattus norvegicus*, hembras de 230 a 250g de peso, obtenidos en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular.

6.2. Cultivo celular de hESC

Las hESC utilizadas fueron de la línea H9-GFP. Estas fueron cultivadas en condiciones adherentes en cajas cuya superficie fue previamente tratada por 24 h a 37°C con matrigel (BD Bioscience), un conjunto de proteínas que conforman una matriz extracelular que promueve la adherencia de las células a la superficie de la caja. Se cultivaron con medio mTESR1 (StemCell Technology) para su expansión.

Las células se mantienen incubando en condiciones estándar de cultivo: 37°C, con una concentración de CO₂ al 5%.

El medio fue suplementado uno o dos días con inhibidor de ROCK (Tocris Bioscience) a una concentración de 10 µM para mejorar la supervivencia de las células después de mantenerlas en criopreservación (Claassen, Desler, y Rizzino 2009; Watanabe et al. 2007).

6.3. Diferenciación de hESCs a NDA

Se siguió un protocolo de diferenciación mediado por moléculas pequeñas, previamente publicado (Kriks et al. 2011) y esquematizado a continuación (Fig. 6).

Este protocolo se debe comenzar con una confluencia de hESCs de aproximadamente 70%.

Inicialmente se mantienen las hESCs en un ambiente que promoverá la diferenciación hacia un linaje neural, específicamente hacia NDA. El medio base para esto es DMEM Knock-Out suplementado con Reemplazo de Suero (KSR) y otros factores necesarios para la diferenciación (Tabla suplementaria 1). Además, al medio fueron añadidas moléculas pequeñas de manera distintiva, dependiendo del día de diferenciación del protocolo, así como medio DMEM F-12 con suplemento N2 como se indica en la Figura 6.

Posteriormente, una vez que las células ya están comprometidas hacia un linaje dopaminérgico, se cambia a un medio de maduración neuronal, cuyo contenido se especifica en la Tabla suplementaria 2 y en la Figura 6.

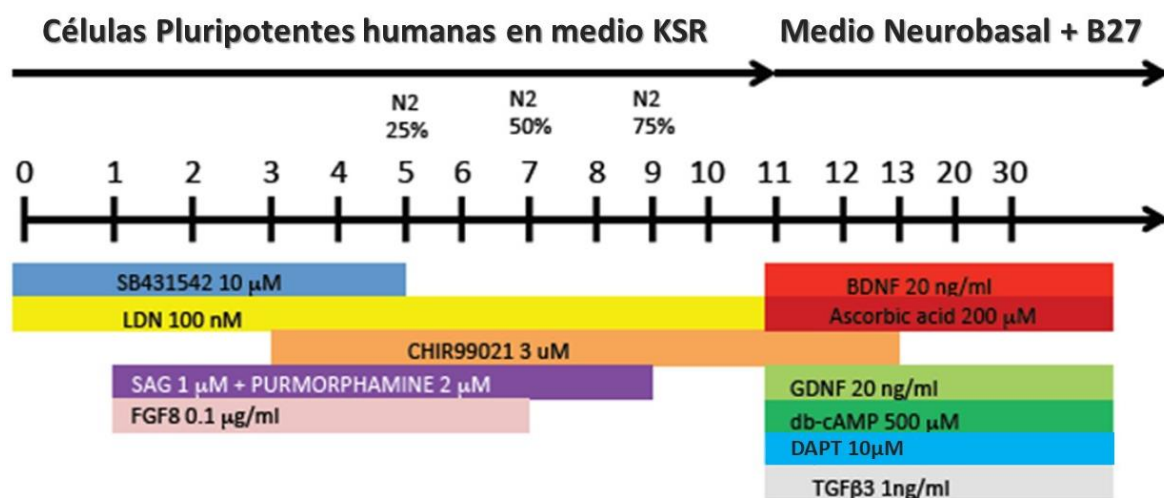


Figura 6. Esquema ilustrativo a modo de resumen del protocolo de diferenciación por moléculas pequeñas a neuronas dopaminérgicas, a partir de células troncales embrionarias humanas.

Cabe resaltar que, desde el inicio del protocolo y hasta en día 13 de diferenciación se requiere realizar cambio de medio diario a las células, después de transcurridos estos días, se deberá realizar dependiendo del consumo de medio por las células.

6.4. Generación de organoides de mesencéfalo ventral a partir de ESCs humanas

Se siguió un protocolo de diferenciación mediado por moléculas pequeñas (Fig. 7), previamente reportado (Mohamed et al. 2019). El contenido de todos los medios utilizados se encuentra especificado en las Tablas suplementarias 3 a 6.

Previo al inicio del protocolo se requiere tener a las hESCs en una suspensión de célula única, lo cual se logra con un tratamiento de Acutasa (Gibco), a partir de esta se tomará la cantidad necesaria para el inicio del protocolo.

En cajas de 96 pozos con fondo cónico de ultra baja adherencia (Corning) poner en cada pozo 10,000 células con 200 μ l de medio Medio de inducción Neural (MIN). Posteriormente la caja debe centrifugarse por 10 min a 1200 rpm a 37°C para promover que las células se agrupen. En este medio permanecerán por 4 días, de los cuales los primeros dos serán en presencia de iROCK.

Del día 4 a 7 de diferenciación, los cuerpos embrioides se mantendrán en Medio Modelador de Mesencéfalo (MPM, por sus siglas en inglés). En el día 7, se retira el medio y los organoides se recubren con una capa matrigel reducido en factores de crecimiento, el cual polimeriza por 30 min a 37°C para formar una matriz que sostendrá su estructura, transcurrida la media hora se añaden 200 μ l de Medio de Inducción de crecimiento tisular (TGIM).

En el día 8 del protocolo los organoides son transferidos a cajas de 6 pozos de ultra baja adherencia, y se añaden 2 ml de Medio de Diferenciación Final (FDM). Las cajas se pondrán en agitación orbital a 70 rpm, dentro de la incubadora a 37°C.

6.5. Cirugía estereotáxica

Previo a iniciar una cirugía estereotáxica se debe inducir al animal a un estado de anestesia con sevoflurano vaporizado (Pisa), y se rapa la cabeza desde arriba de los ojos y hasta las orejas. Dado que durante el estado de anestesia las ratas no parpadean, se coloca una pomada lubricante en los ojos para evitar la resequead.

A continuación, se sitúa al animal en el equipo estereotáxico: con la nariz conectada a una fuente constante de oxígeno con sevoflurano vaporizado al 4%, se colocan lápices estereotáxicos dentro de las orejas del animal para sujetar firmemente el cráneo, con cuidado de no dañar el oído interno. Revisar que la cabeza esté bien posicionada de manera recta en todos los ejes.

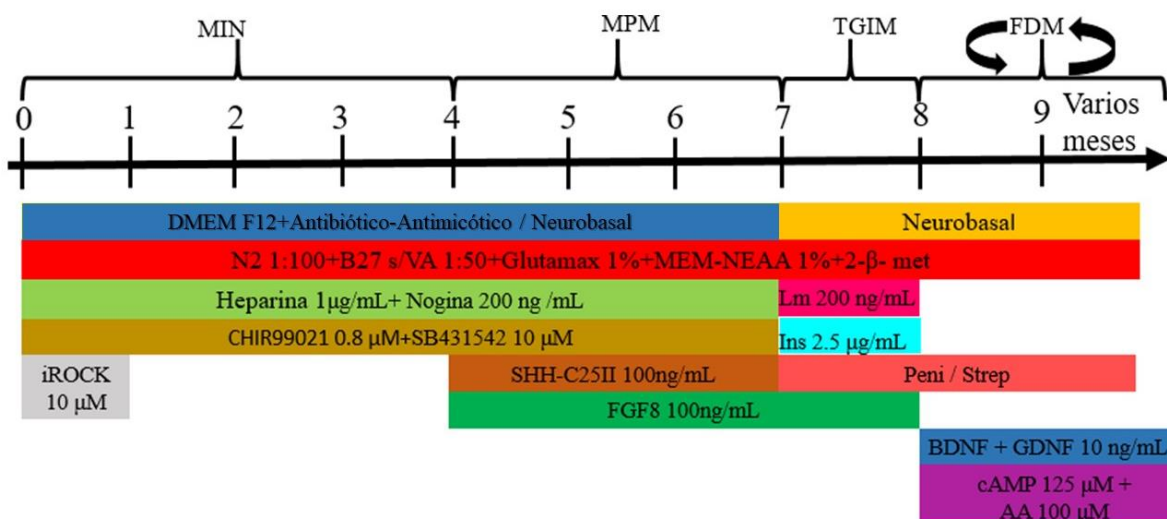


Figura 7. Esquema ilustrativo a modo de resumen del protocolo para la obtención de Organoides Cerebrales regionalizados hacia mesencéfalo ventral.

Posteriormente se realiza un procedimiento de asepsia en el que se limpia la zona rapada con yodopovidona (DermoDine) en solución y posteriormente con etanol al 70%. En seguida, se inyecta ~100 µl de lidocaína y epinefrina al 2% (Pisa) por sus efectos de analgésico local.

Con un bisturí se hace una incisión en la parte media del cuero cabelludo de aproximadamente 1 cm de largo, empezando a la altura en que terminan los ojos. Con ayuda del bisturí y de pinzas de disección retirar las capas de tejido conectivo que cubren al cráneo.

Buscar bregma, es decir el punto de intersección entre las fisuras sagital y coronal del cráneo (Fig. 8), y posicionar taladro dental sobre dicho punto. A partir de este punto se buscarán diferentes coordenadas en los ejes Anteroposterior (AP), y Mediolateral (ML), dependiendo la cirugía a realizar.

6.5.1. Lesión para obtención de modelo animal de la EP

Para poder obtener un modelo de EP en ratas se hace una inyección de solución de 6-OHDA, ya que esta molécula es capaz de inducir neurodegeneración específica a NDA tanto de somas como de sus procesos neuronales (Malmfors y Sachs 1968; Ungerstedt 1968).

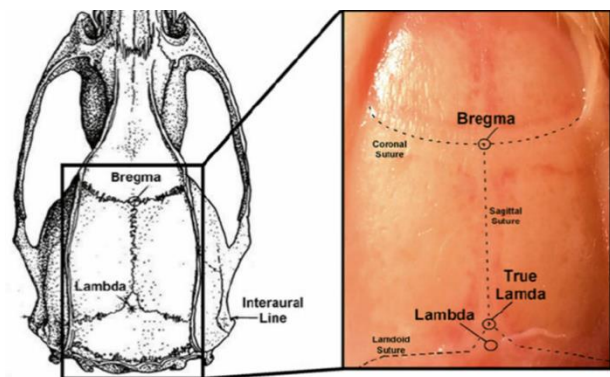


Figura 8. Esquema representativo de las fisuras craneales, mostrando a su intersección, el punto Bregma, en la parte superior. Modificada de (Benskey y Manfredsson 2016).

Se inyectaron 4µl de solución de 6-OHDA (Sigma) a 3 µg/µl, con ácido ascórbico a 200 ng/µl para evitar la rápida oxidación del fármaco durante la cirugía. Se administran 12µg de 6-OHDA en el fascículo medial de la vía nigroestriatal, donde el fármaco será internalizado específicamente por las NDA, y causará estrés oxidativo por el grupo hidroxilo (-OH) extra que tiene, lo que eventualmente tendrá por consecuencia la muerte celular de estas neuronas.

Posicionar el taladro sobre bregma, y con ayuda del equipo estereotáxico moverse en el eje AP -1mm, y en ML +1.5mm (del lado derecho). La inyección se realiza solo de un lado del cerebro, por lo que en realidad se obtiene un modelo hemiparkinsoniano. En estas coordenadas se hace un trépano en el cráneo con ayuda del taladro por el cual posteriormente se introducirá la cánula para la inyección.

Con apoyo de un microinyector y una jeringa de 10µl de capacidad (Hamilton) conectada a una cánula estéril (Sopira) cargar la solución de 6-OHDA, siempre en un volumen mayor al que se inyectará. Posicionar la cánula sobre bregma y moverse a las coordenadas previamente señaladas para corroborar que el trépano está bien hecho. Bajar cánula hasta estar en contacto con el cerebro del animal y posteriormente introducirla al cerebro hasta la coordenada DV -8mm. La inyección se realiza sobre el fascículo medial que inicia en SNpc y se dirige hacia el estriado, ésto para inducir una muerte retrógrada de las NDA de la vía nigroestriatal.

Programar microinyector para que deposite 4µl de solución a una velocidad de 1µl/min. Una vez transcurridos los 4min de la inyección, dejar reposar 3 minutos. Posteriormente se retira la cánula muy lentamente para evitar arrastrar la solución inyectada.

Limpiar el cráneo del animal y el cuero cabelludo adyacente al corte para retirar restos de sangre con ayuda de hisopos estériles. Finalmente se cierra la herida con grapas metálicas o bien con sutura no absorbible y se retira al animal de la anestesia inhalada,

permitiendo que despierte. Para evitar el dolor, posterior a la cirugía se administra como analgésico, tramadol vía oral (Pradol).

6.5.2. Trasplante

Previo al trasplante los organoides de mesencéfalo en su día 7 de diferenciación se disociaron con Tryple Express (ThermoFisher), se contaron las células viables con una tinción con azul de tripano y posteriormente se prepararon alícuotas con 5 μ l de volumen a una concentración de \sim 125,000 células por μ l de medio FDM.

A cada animal se le inyectaron 500,000 células, distribuidas en cuatro puntos de inyección, cada uno con 1 μ l de solución. Los puntos tienen las coordenadas estereotáxicas a partir de Bregma AP=1mm, ML=3.3mm y DV=-5.5, -5, -4.5, -4mm. El trasplante comenzó en el punto más profundo, inyectando la solución a una velocidad de 1 μ l/min y después de cada inyección esperar 3min antes de moverse al siguiente punto.

En los animales del grupo Sham, que es el control de manipulación, se inyectaron 4 μ l de medio FDM sin células, con el mismo procedimiento.

Al terminar el último punto de inyección se puede retirar la cánula lentamente, se cierra la cabeza y finalmente se retira al animal de la anestesia para administrar un analgésico vía oral al despertar.

6.6. Pruebas conductuales en modelo animal de la EP

El objetivo de las pruebas conductuales es evaluar si el animal en cuestión presenta o no un comportamiento característico de la deficiencia de dopamina.

6.6.1. Rotación inducida

Inducir a un estado de anestesia al animal para poner chaleco y conectar al sensor de rotación. Una vez despierto, se hace una inyección subcutánea en el lomo de apomorfina (Sigma) a una concentración de 1mg por kg de peso y se deja hacer efecto entre 2 y 3 minutos.

El lado lesionado intenta compensar la ausencia de dopamina con la sobreproducción de sus respectivos receptores por lo que, al inyectar la apomorfina, análogo de la dopamina, estos se activan e inducen una conducta de movimiento exacerbado en los animales solo en su lado derecho, lo que tiene por consecuencia un patrón de giro hacia su izquierda (Hudson et al. 1994).

A continuación, ya que las ratas están bajo efecto de la apomorfina, el cual se puede notar por un incremento en su motricidad y en su ansiedad, comenzar el programa “RotoRat” (SOF-801) que funciona como contador de giros, el cual se programa para contar durante 60min.

Ya que transcurrió una hora se cuentan las rotaciones que el animal dio en el sentido de las manecillas del reloj o hacia su derecha (CWF) y en sentido contrario o hacia su izquierda (CCF).

Los animales se consideran lesionados a partir de 300 giros CCF en una hora, aunque la cantidad es variable entre animales. De este modo, esta prueba puede utilizarse para contabilizar el grado de daño de tipo hemiparkinsoniano que tiene la rata, expresado en giros/min.

6.6.2. Prueba de ajuste de pasos

En esta prueba se usa para contabilizar el uso de la extremidad del lado lesionado contra la extremidad del lado sano, haciendo al animal caminar solo con una extremidad superior a la vez.

Tomar firmemente de la base de la cola al animal y dejar que explore para que se tranquilice. Posteriormente se colocan los dedos índice y medio alrededor del cuello del animal para controlar su movimiento. Con ayuda del pulgar o del anular se levanta una de las patas delanteras, de tal modo que solo una pata toque la superficie de la mesa a la vez. Con la otra mano se toman ambas extremidades inferiores y se levantan para que la rata se encuentre en ángulo y se recargue en una sola pata (Fig. 9).

Una vez que se tiene a la rata en la posición adecuada se empuja hacia adelante a una velocidad moderada, parecida la de su caminar, por una distancia de 90cm. Primero se hacen 5 ciclos de caminar con la pata derecha y después 5 ciclos con la pata izquierda, y esta rutina se repite tres veces, completando 15 ciclos con cada pata.

En cada ciclo de caminata de 90cm se cuenta el número de pasos que da con cada pata, y al final se promedia el número de pasos con cada extremidad. Al estar lesionada la rata dará menos pasos con su pata izquierda (contralateral a la lesión en el cerebro), lo que puede cuantificarse a modo de porcentaje respecto al número de pasos con la otra pata, que representa un 100%.



Figura 9. Ilustración que representa la sujeción necesaria para realizar la prueba de ajuste de pasos.

6.7. Perfusión y obtención de cerebro

Previo a iniciar el proceso de perfusión, se debe preparar solución salina fisiológica al 0.9% y PFA al 4% (modo de preparación y componentes descritos en la tabla

suplementaria 7), precalentados a $\sim 37^{\circ}\text{C}$. Además, se requiere tener listo para su uso material de disección para manejar el cuerpo del animal y la bomba de perfusión.

Los animales se sacrificaron por medio de una inyección intraperitoneal con $\sim 600\mu\text{l}$ de anestésico pentobarbital (Aranda), una vez que se interrumpe por completo su respiración se hacen cortes a la piel, musculatura y costillas para exponer completamente el interior de la caja torácica, dejando al corazón completamente a la vista y permisible a manipulación. A continuación, se coloca la cánula conectada a la bomba de perfusión en el ventrículo izquierdo del corazón para iniciar la inyección de solución salina en pulsos y a un ritmo constante, de esta manera la solución salina reemplazará la sangre en el cuerpo. Una vez colocada la aguja e iniciada la perfusión, cortar la aorta descendente que se encuentra detrás del hígado para permitir la salida de líquido.

La perfusión continuará por aproximadamente 30 minutos, hasta que 100ml de solución salina hayan sido utilizados en la perfusión (por cada rata), se debe observar un cambio notable de color en los tejidos causado por la ausencia de sangre.

Posteriormente, se cambiará la solución administrada por PFA al 4%. A partir de este momento se debe realizar la recolección de los desechos cuidadosamente para disponer de ellos correctamente. Del mismo modo se utilizarán 100ml de solución por cada animal para poder terminar la perfusión.

Una vez concluida la perfusión, se procede a extraer los cerebros de cada animal. Se corta la cabeza, separándola del resto del cuerpo y se corta la piel y musculo de la parte superior para exponer lo más posible el cráneo. Con tijeras finas cortar el cráneo por la mitad pasando entre los hemisferios y evitando dañar el cerebro. Con ayuda de unas pinzas retirar cuidadosamente el cráneo, jalándolo hacia los extremos a partir de la apertura de la línea media.

Una vez que se ha retirado toda la parte superior del cráneo y el cerebro ha quedado expuesto, con ayuda de espátulas retirar el cerebro de la cavidad. El órgano se debe lavar cuidadosamente con PBS estéril y posteriormente se introduce en una solución de sacarosa.

Para preservar de mejor manera el tejido, se usa una curva de sacarosa en la que el cerebro se mantiene en solución al 10% por 24 h, al 20% otras 24 h y finalmente al 30% hasta su uso. Se recomienda usar además azida de sodio al 0.1% y mantenerlo a 4°C para evitar contaminación de cualquier tipo.

6.8. Obtención de cortes y preparación

Una vez que el tejido (sea el cerebro de los animales o bien los organoides) fue expuesto a una curva de sacarosa, se puede utilizar para realizar cortes histológicos. Para esto el tejido se prepara embebiéndolo en Tissue-Tek (Sakura) y dejándolo solidificar a -80°C por 5 minutos. La muestra se monta sobre un soporte metálico para criostato con más Tissue-Tek y se deja solidificar dentro del criostato a -20°C.

Con ayuda del criostato, se obtuvieron cortes de 20 µm de grosor, las cuales se colocaron directamente en portaobjetos de vidrio de superficie cargada para realizar ahí las correspondientes pruebas de inmunofluorescencia. Conservar laminillas a 4°C hasta su uso.

6.9. Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.

Cultivos en monocapa: Retirar medio de cultivo y dar un lavado con PBS. Fijar células con PFA al 4% en PBS por 8 minutos. Lavar tres veces con PBS. Bloquear y permeabilizar células con solución de suero normal de cabra al 10% y Tritón al 0.3% en PBS 1X por 1 h. Incubar células con anticuerpos primarios en solución de suero de

cabra al 10% toda la noche a 4°C. Dar tres lavados de 5min con solución de Suero Bovino con Albumina (BSA) al 0.1% en PBS. Incubar anticuerpos secundarios en solución de SNC al 10% por 2 h. Lavar nuevamente con solución de BSA al 0.1% por 5min, tres veces. Finalmente, teñir núcleos con Hoechst por 8min. Dar un lavado final con solución de BSA 0.1%.

Cortes de organoides y de cerebros: Hidratar e incubar las muestras en laminillas con Tween-20 al 0.5% en PBS 1X, por 3min. Incubar muestras con Immunoretriever (BioSB) por 1hr a 60°C. Retirar y dejar secar las laminillas para marcar con pluma hidrofóbica los bordes de esta. Bloquear y permeabilizar tejido por 30min a temperatura ambiente con solución ASE: glicina 50 mM, Tritón 0.1%, Tween-20 0.05%, suero de cabra al 2% y BSA al 0.1%, en PBS. Incubar tejido con anticuerpos primarios toda la noche a 4°C en solución de glicina 10 mM, Tritón 0.1%, Tween-20 0.05% y peróxido de hidrógeno al 0.1%. Dar tres lavados de 5min con solución de Tween-20 al 0.5%. Incubar anticuerpos secundarios en solución de Tween-20 al 0.5% por 2 h a temperatura ambiente y lavar nuevamente tres veces. Finalmente, poner 20µl de solución de montaje con DAPI (Sigma) y colocar cubreobjetos de vidrio, dejar secar por 24 h antes de observar al microscopio.

Los anticuerpos utilizados y sus concentraciones para las pruebas de inmunofluorescencia se resumen en la Tabla 1.

Anticuerpo	Marca, catálogo	Concentración para monocapa	Concentración para tejido
Hoechst	ThermoFisher 62249	1:1000	-
Oct4	B&D 611202	1:1000	-
Nanog	PeptoTech 500-P236	1:1000	-
SSEA4	Abcam AB16287	1:1000	-
Sox2	Abcam AB97959	1:1000	-
Ki67	Novocastra	1:1000	1: 500
Nestina	Covance	1:1000	1:500
FoxA2	Millipore 07-633	1:1000	1:500
Lmx1a	Millipore 10533	1:1000	1:500
Otx2	Invitrogen 701948	1:500	1:250
β-tub III / Tuj1	Biologend 801202	1:1000	1:500
MAP2	Sigma M4403	1:1000	1:500
TH	Abcam AB152 / Peelfreeze P40101	1:1000	1:500
Pitx3	ThermoFisher 38-2850	-	1:500
Serotonina	Sigma S5545	-	1:500

Tabla 1. Lista de los anticuerpos utilizados en el presente trabajo, incluyendo su marca y la respectiva concentración utilizada para realizar evaluaciones de inmunofluorescencia en cultivos 2D o bien para tejido.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización y expansión de hESC H9-GFP

En el presente trabajo se utilizó la línea celular de hESC H9, la cual expresa la Proteína verde fluorescente (GFP) de manera constitutiva y en todas las células. Esto permitirá una rápida y fácil identificación de las células en los experimentos de trasplante.

Para poder realizar los protocolos de diferenciación hacia NDA y de generación de OM se requieren importantes cantidades de hESC H9-GFP para lo cual, estas se expandieron y se comprobó la expresión de los FT encargados del mantenimiento del estado de pluripotencia OCT4, SOX2 y NANOG, así como la expresión del glicoesfingolípido de superficie y también marcador de pluripotencia, el antígeno específico de estado embrionario SSEA4 por pruebas de inmunocitoquímica (Fig. 10). Por lo que el cultivo adherente con pasajes constantes de las células H9-GFP en medio mTesR1, permite su correcta expansión sin que las células pierdan su potencialidad ni la expresión de la proteína GFP.

7.2. Diferenciación de hESCs H9-GFP a NDA

Inicialmente se obtuvieron NDA a partir de hESCs por un protocolo de diferenciación utilizando moléculas pequeñas (Kriks et al. 2011) y se caracterizó la expresión de diferentes marcadores tanto de mesencéfalo como dopaminérgicos a diferentes tiempos del protocolo de diferenciación por pruebas de inmunohistoquímica.

En el día 7 del protocolo de diferenciación es posible observar la expresión de marcadores de diferenciación temprana hacia un linaje neural, como DOBLECORTINA (DCX) y NESTINA, además de la expresión del marcador específico de mesencéfalo, LMX1A (Fig. 11). Respecto a la morfología, para este momento las células han perdido el acomodo en colonias característico de las ESC, además ahora las células se observan más grandes y con una morfología fibroblastoide (Fig. 11). Con esto podemos concluir que al día 7 del protocolo de diferenciación, gran parte de las células ya están comenzando su proceso de diferenciación y están comprometidas hacia un linaje neural, sin embargo, son pocas las que están especificadas o regionalizadas hacia el mesencéfalo.

Más adelante en la diferenciación, en el día 11, en que se termina la especificación hacia mesencéfalo y el día 14 es posible observar aún marcadores de compromiso neural como NESTINA, así como de especificación hacia mesencéfalo como son LMX1A, FOXA2 y OTX2 (Fig. 12A). Además, es posible comenzar a observar la presencia de marcadores neuronales como el componente de citoesqueleto BETA-TUBULINA 3 (Tuj1) y el marcador de neuronas maduras MAP2 (Fig. 12B), pero aún no hay células positivas para la enzima TIROSINA HIDROXILASA (TH), el marcador por excelencia de NDA. En cuanto su morfología, la mayoría de las células ya redujeron su tamaño y algunas de estas comienzan a tener pequeñas proyecciones (Fig. 12).

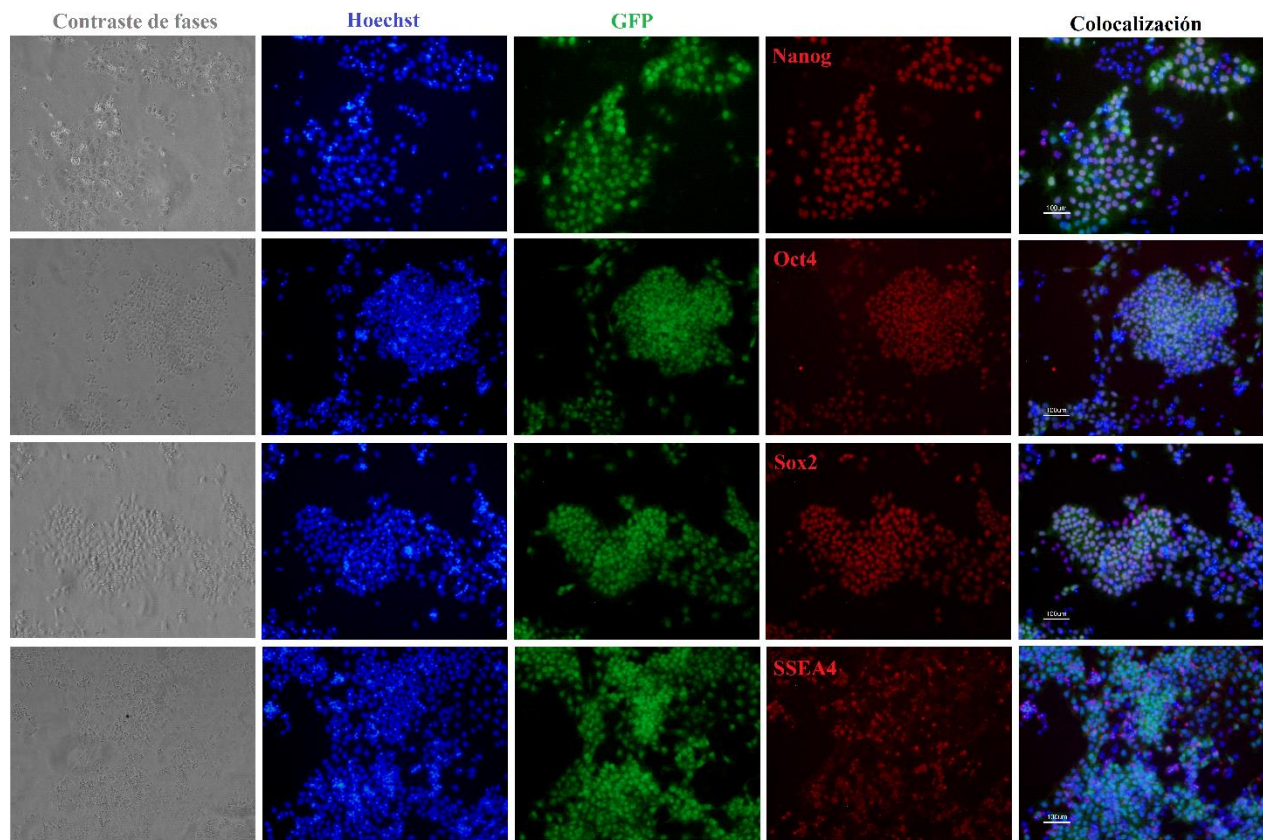


Figura 10. Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica a hESC H9-GFP, donde se encontró inmunoreactividad contra los marcadores de pluripotencia OCT4, SOX2, NANOG y SSEA4. Así como el mantenimiento en la expresión la proteína GFP.

En estadios más avanzados, en el día 28 de diferenciación es posible observar una morfología neuronal compleja, que incluye somas pequeños y múltiples proyecciones de gran longitud. Además, se puede confirmar su identidad como neuronas dopaminérgicas por la abundante expresión de TH y el receptor nuclear de NDA, NURR1 (Fig. 13); así mismo se ha perdido la expresión del marcador de diferenciación temprana FOXA2. Con esto podemos concluir una correcta especificación y maduración de las NDA obtenidas.

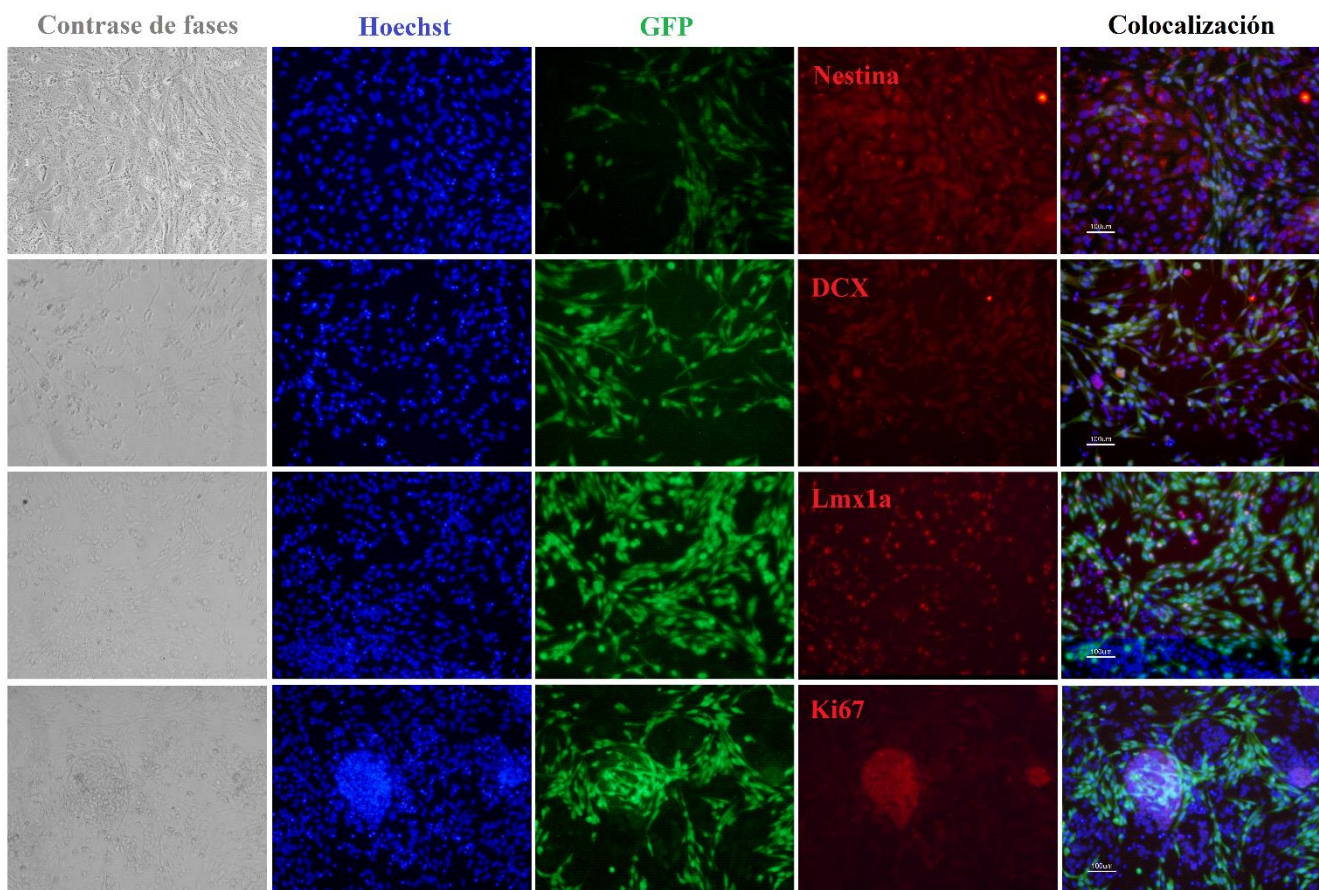


Figura 11. Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica a células H9-GFP en el día 7 del protocolo de diferenciación hacia Neuronas Dopaminérgicas, mostrando la expresión de NESTINA, DCX, LMX1A y KI67. Barra de escala = 100µm.

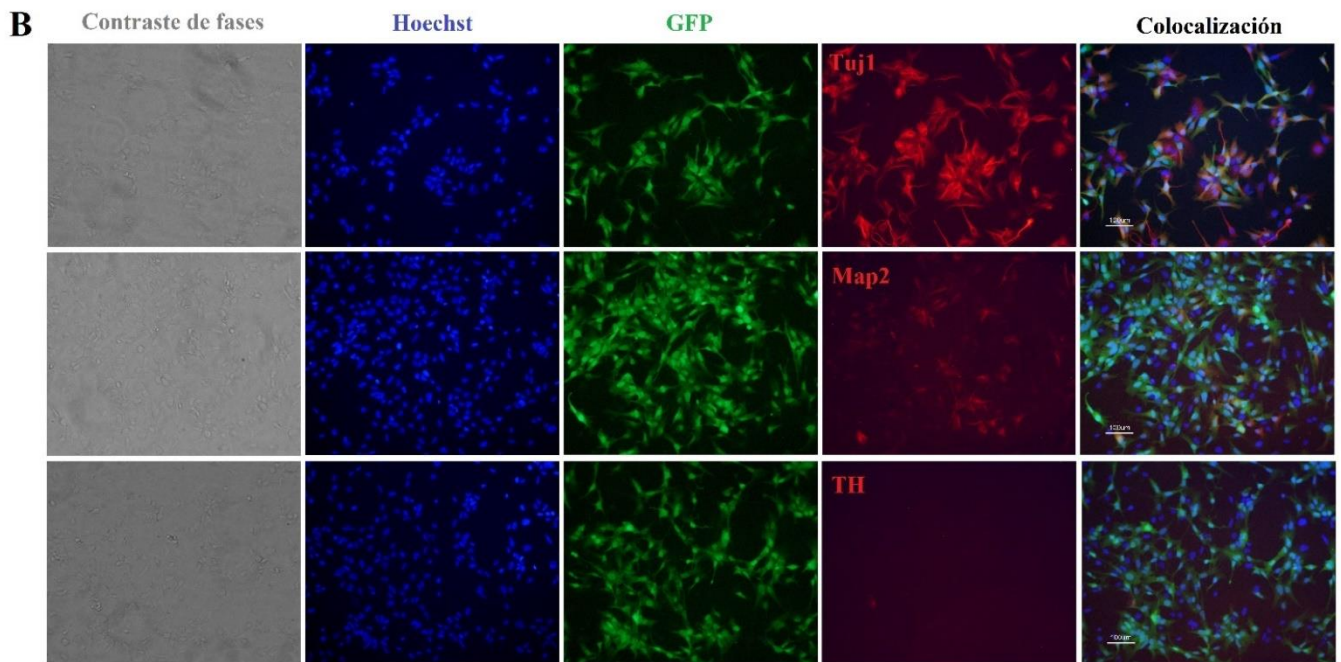
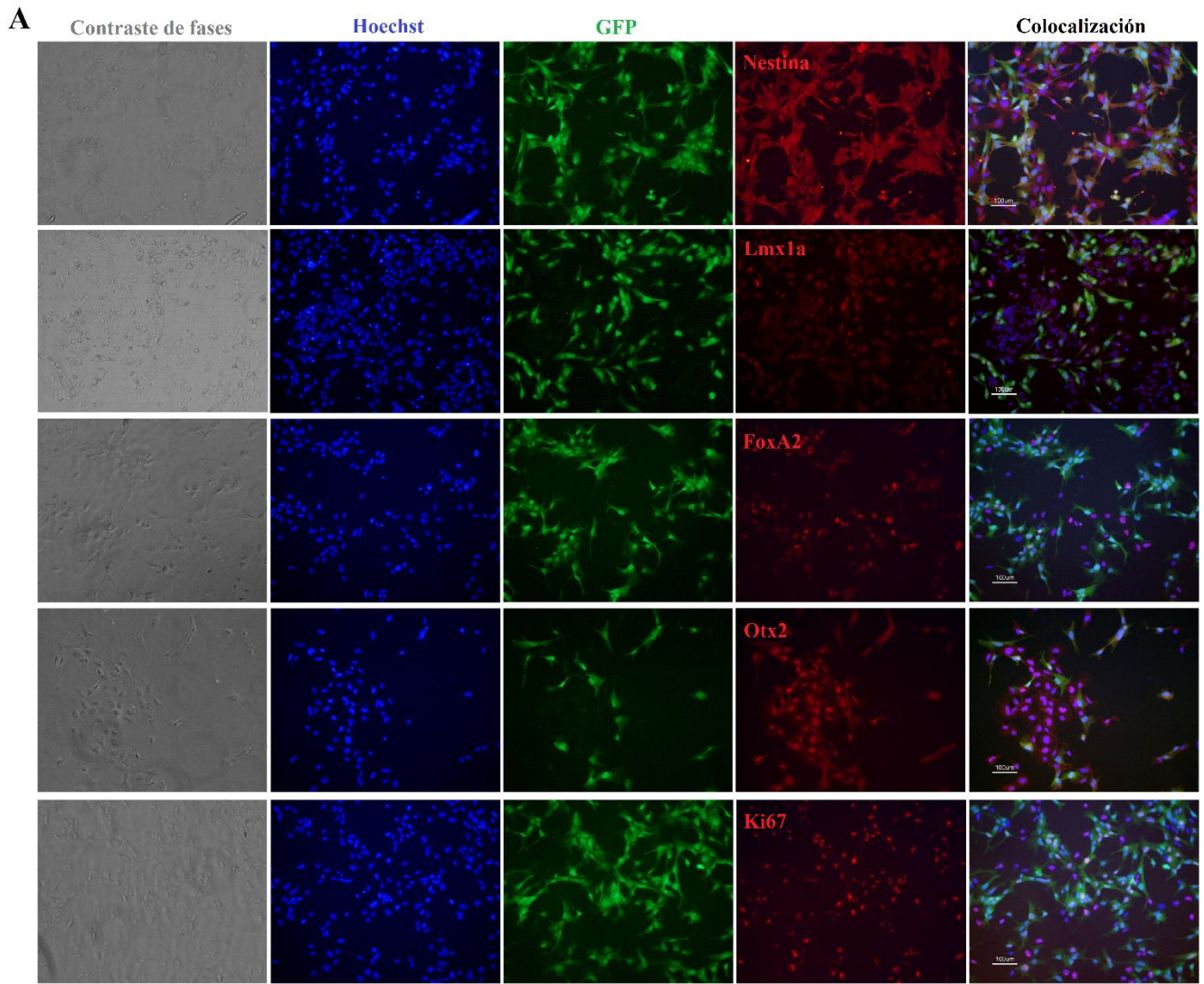


Figura 12. Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica a neuronas dopaminérgicas en día 11 del protocolo de diferenciación. **A.** Se muestra una alta expresión del marcador de precursores neurales NESTINA, marcadores de compromiso a mesencéfalo LMX1A, FOXA2 y OTX2, así como el marcador de proliferación KI67. **B.** Marcador neuronal temprano TUJ1 y uno tardío MAP2, así como el marcador específico de NDA, TH. Barra de escala =100µm.

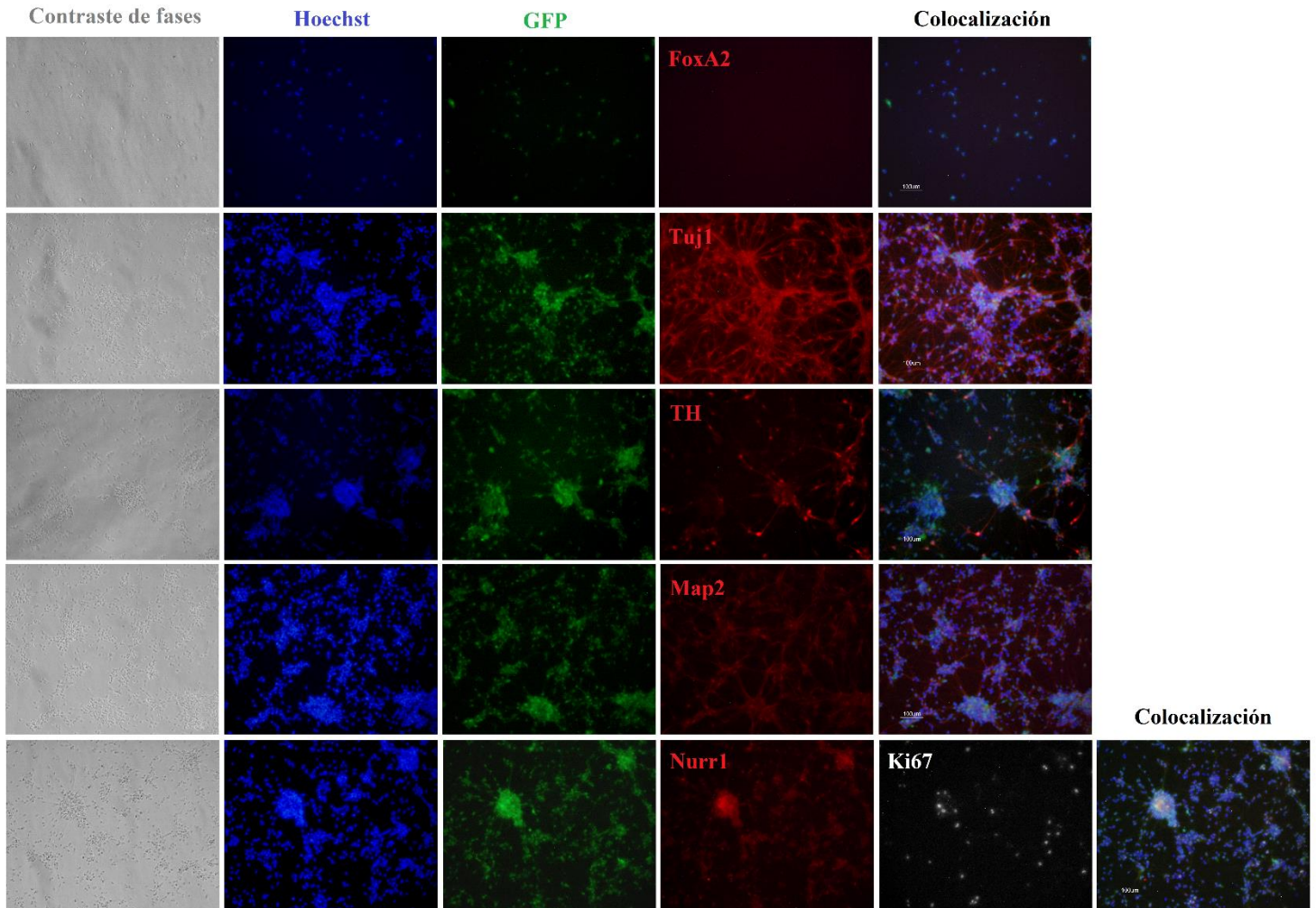


Figura 13. Imágenes representativas de ensayos de inmunocitoquímica a NDA en el día 28 de diferenciación. Las células muestran una alta expresión de los marcadores neuronales TUJ1 y MAP2, así como específicos de NDA mesencefálicas: TH y NURR1. Barra de escala = 100µm.

7.3. Generación de organoides de mesencéfalo ventral a partir de células hESC H9-GFP

Se obtuvieron OM a partir de la línea H9-GFP de hESC y se caracterizó su crecimiento a lo largo del proceso de diferenciación. Inicialmente, en el D0 las células se encuentran en el fondo del pozo sin formar ninguna estructura en particular, 24 h después ya es posible observar la formación de un cuerpo embrioide (EB, por sus siglas en inglés) el cual sufre de un continuo crecimiento en los subsecuentes días (Fig. 14). Alrededor del día 7 del protocolo de diferenciación se comienzan a observar brotes de tejido neuroectodermal, los cuales se pueden reconocer como esferas de baja densidad celular y de tamaño variable que sobresalen del organoide.

Al caracterizar estos OM por pruebas de inmunohistoquímica podemos observar tanto al día 7 como al 14 una alta expresión de NESTINA, indicativo de que los

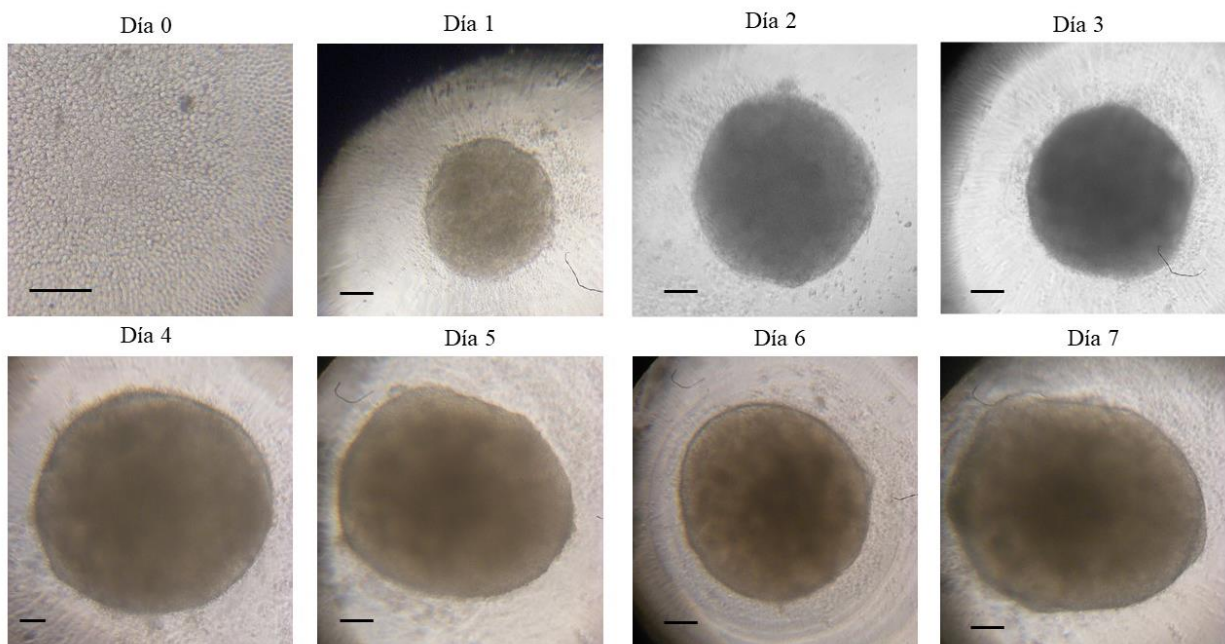


Figura 14. Imágenes representativas del crecimiento de los organoides de mesencéfalo desde el día 0 hasta el día 7 de diferenciación. En el día 0 se puede observar como las células están solo en suspensión, sin embargo, para el día 1 ya se han agregado formando un cuerpo embrioide que seguirá desarrollándose y creciendo por los siguientes días. Barra de escala = 100 μ m.

organoides obtenidos están conformados por precursores neurales, los cuales están especificados a una identidad de mesencéfalo, dado que expresan los marcadores FOXA2 y LMX1A (Fig. 15 y 16).

Adicionalmente, en el día 7 del protocolo de diferenciación los OM aún no muestran expresión de TH, sin embargo, si presentan una baja expresión de SEROTONINA, lo que representa una desventaja para los trasplantes, ya que se ha demostrado que la presencia de neuronas serotoninérgicas en trasplantes a animales con la EP puede

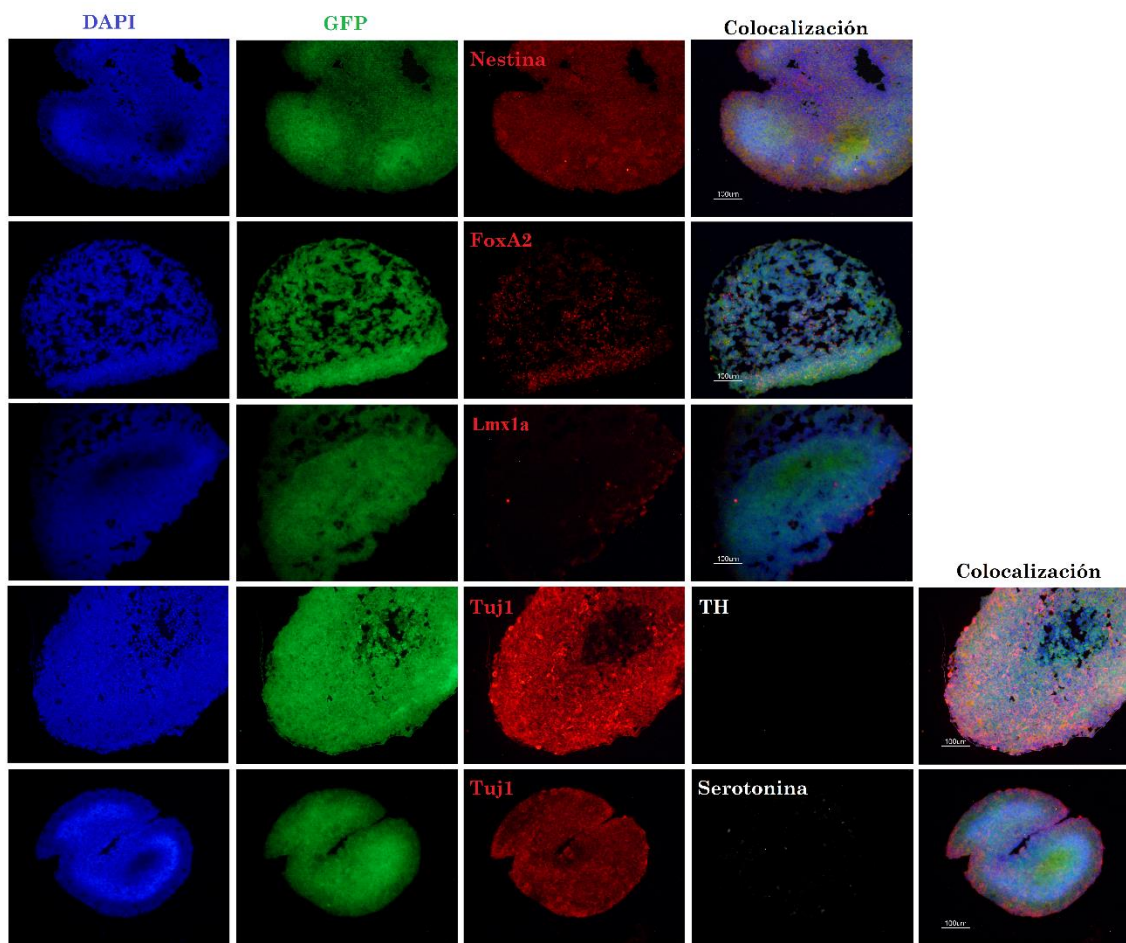


Figura 15. Imágenes representativas de organoides de mesencéfalo en el D7 de diferenciación, día en que se realizaron los trasplantes. Se observa la expresión de marcadores neuronales NESTINA y TUJ1, y específicos de mesencéfalo FOXA2 y LMX1A. Además de una pequeña cantidad de células con SEROTONINA. Barra de escala = 100µm.

tener un impacto negativo en su recuperación conductual, ya que tienden a causar discinesias (Carta et al. 2010; Politis et al. 2010) (Fig. 15).

Tan temprano como el día 14, algunos OM manifestaron la presencia de neuronas dopaminérgicas, como se muestra por la expresión de TH (Fig. 16), algo que no ocurrió con las NDA obtenidas en monocapa. La proporción de este subtipo neuronal aumentó continuamente en las subsecuentes semanas (Fig. 16 y 17).

Finalmente, en el día 28 de crecimiento de los OM, estos aún presentan una alta expresión tanto de NESTINA como FOXA2, asimismo en esta etapa de maduración los organoides exhiben una alta proporción de NDA lo cual se observa por la colocalización de los marcadores TH y TUJ1. No obstante, estas neuronas aún no

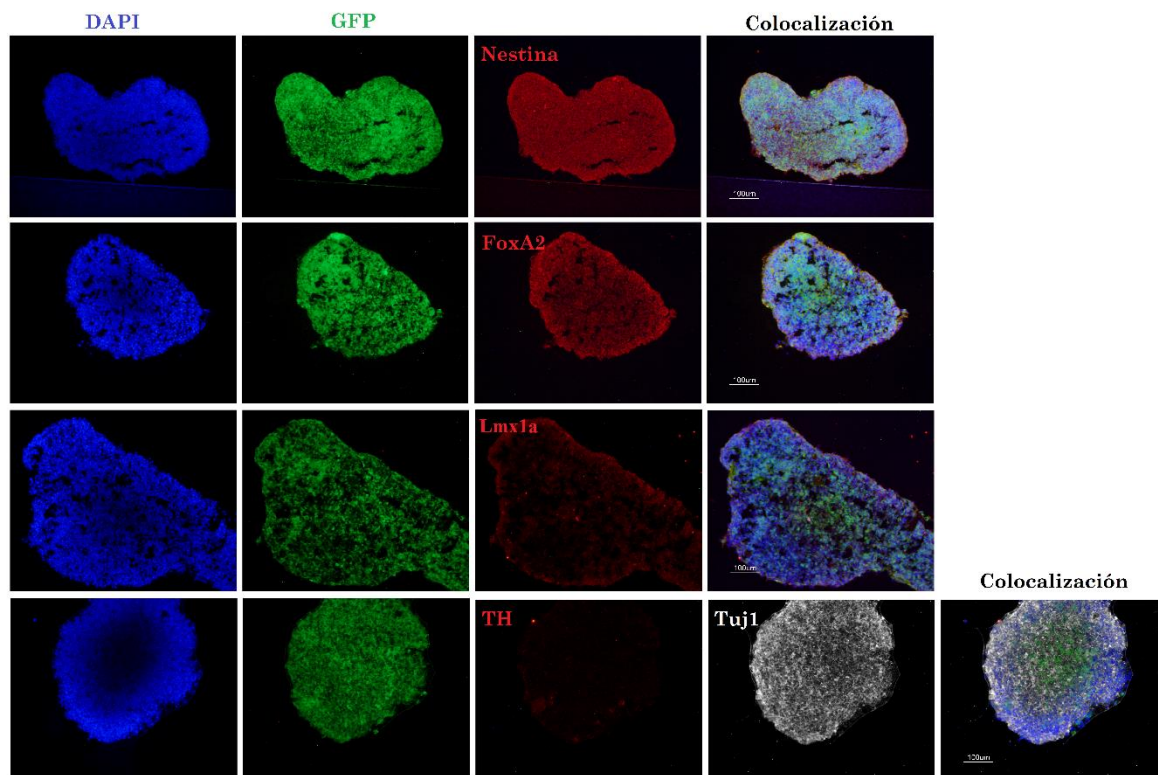


Figura 16. Imágenes representativas de organoides de mesencéfalo en el D14 de diferenciación. Se muestra la expresión del marcador de precursores neurales NESTINA, marcadores específicos de mesencéfalo FOXA2 y LMX1A. Algunos organoides mostraron una pequeña cantidad de células TH positivas. Barra de escala = 100 µm.

expresan PITX3, un factor de transcripción esencial para la maduración final de las NDA mesencefálicas (Fig. 17).

7.4. Obtención de modelo animal de EP

Los animales utilizados fueron sometidos a las pruebas conductuales previo a la cirugía de lesión para conocer su estado basal. Posteriormente se realizó la inyección unilateral de 6-OHDA a nivel del haz medial de la vía nigroestriatal para inducir una muerte retrograda específica de las NDA.

Un mes después de dicha cirugía se realizaron nuevamente las pruebas conductuales para comprobar la funcionalidad de los animales como modelo para la EP. Aquellos animales que fueron correctamente lesionados presentaron un patrón de giros

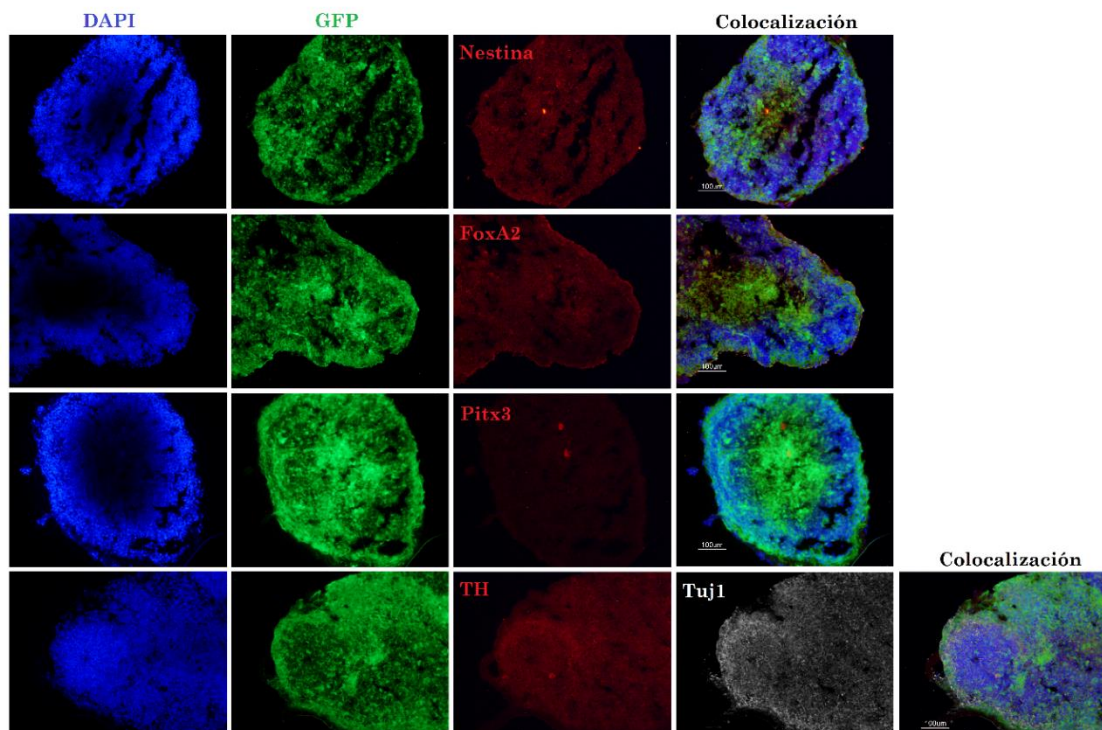


Figura 17. Imágenes representativas de OM en el D28 de diferenciación. Se muestra una alta expresión de los marcadores NESTINA, FOXA2, TUJ1 y TH. No hay núcleos positivos para PITX3. Barra de escala = 100 µm.

exacerbado posterior a la administración de apomorfina (Fig. 18), del mismo modo, su capacidad de uso de la extremidad superior contralateral al lado de lesión disminuyó considerablemente del 99.8% (previo a la lesión) al 21% (Fig. 19). Con esto podemos concluir que los animales presentan una conducta asociada a la pérdida unilateral de dopamina en el estriado, y por consiguiente pueden ser utilizados como modelos de la EP en los subsecuentes experimentos.

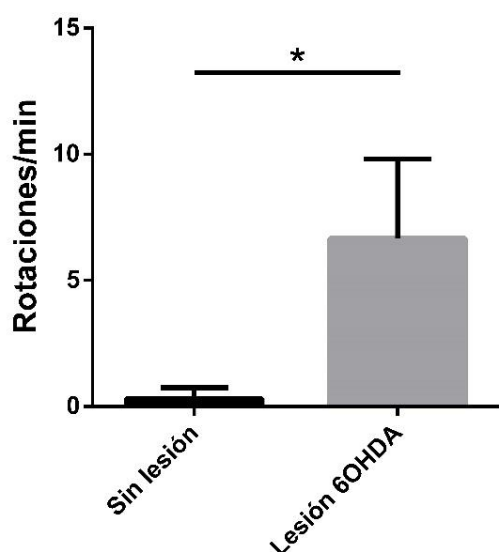


Figura 18. Prueba de rotación inducida por apomorfina. Se muestran los giros por minuto promedio en animales con y sin lesión. Análisis t-student, * $p < 0.0001$.

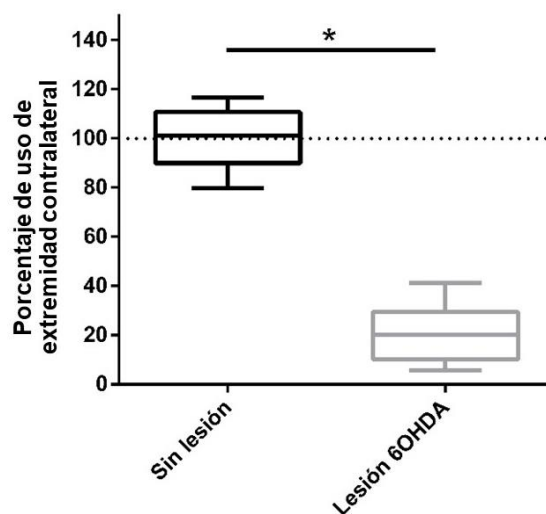


Figura 19. Prueba de pasos. Se muestra el porcentaje de uso de la extremidad contralateral al lado de lesión, donde el 100% representa un uso igual entre ambos lados. Análisis t-student, * $p < 0.0001$

7.5. Análisis funcional de los trasplantes de organoides de mesencéfalo ventral y neuronas dopaminérgicas en animales hemiparkinsonianos.

En ambos trasplantes se inyectaron un total de 500,000 células en cuatro puntos dentro del estriado, en el lado lesionado. Cabe resaltar que los trasplantes se realizaron al finalizar el periodo de modelado o establecimiento de patrón del mesencéfalo de cada

protocolo de diferenciación, en el caso de las NDA cultivadas en 2D es en el día 11, mientras que para los OM es el día 7.

Posterior al trasplante se realizó tanto la prueba de ajuste de pasos como la de rotación inducida cada dos semanas durante un total de 14 semanas para seguir el posible recuperación funcional en los animales trasplantados. El grupo que recibió células diferenciadas en monocapa presentaron una recuperación significativa en comparación con el grupo “Sham” a partir de la semana 6 post-trasplante, la cual persistió hasta la eutanasia de los animales. No obstante, el grupo que recibió el trasplante de células provenientes de OM continuó mostrando deficiencias

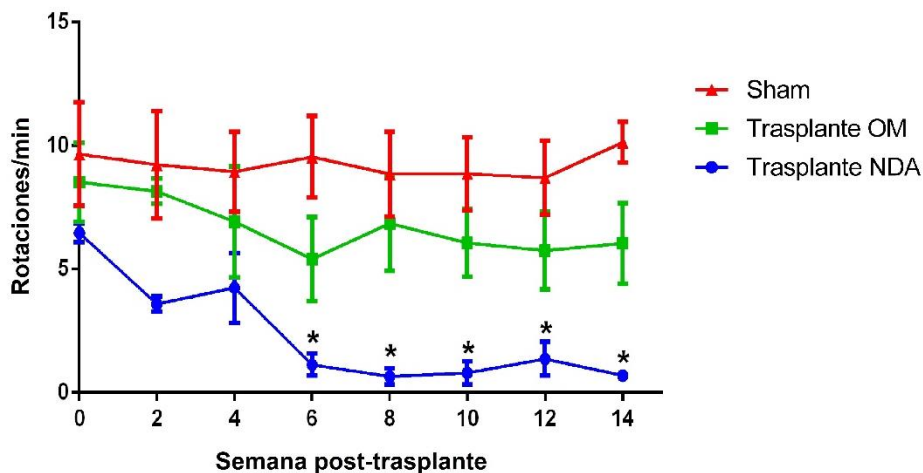


Figura 20. Prueba de rotación inducida por apomorfina. El grupo Trasplante con NDA mostró diferencias significativas respecto al grupo “Sham” a partir de la semana 6 post-trasplante. Análisis t-student, *p<0.05.

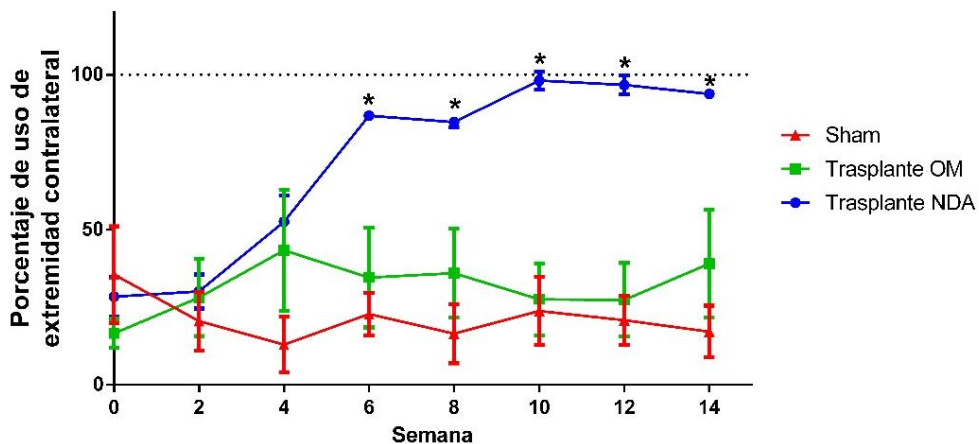


Figura 21. Prueba de rotación inducida por apomorfina. Los animales que recibieron trasplante de NDA mostraron una mejora significativa en su control motor a partir de la semana 6 post-trasplante. Análisis t-student, *p<0.005.

conductuales comparables al grupo “Sham” que representa un control de manipulación (Fig. 20 y 21).

7.6. Evaluación de la supervivencia *in vivo* de los trasplantes.

Al finalizar el análisis funcional de los diferentes grupos de trasplante, se extrajo el cerebro de los animales de los tres grupos para realizar las correspondientes pruebas de inmunohistoquímica en el tejido.

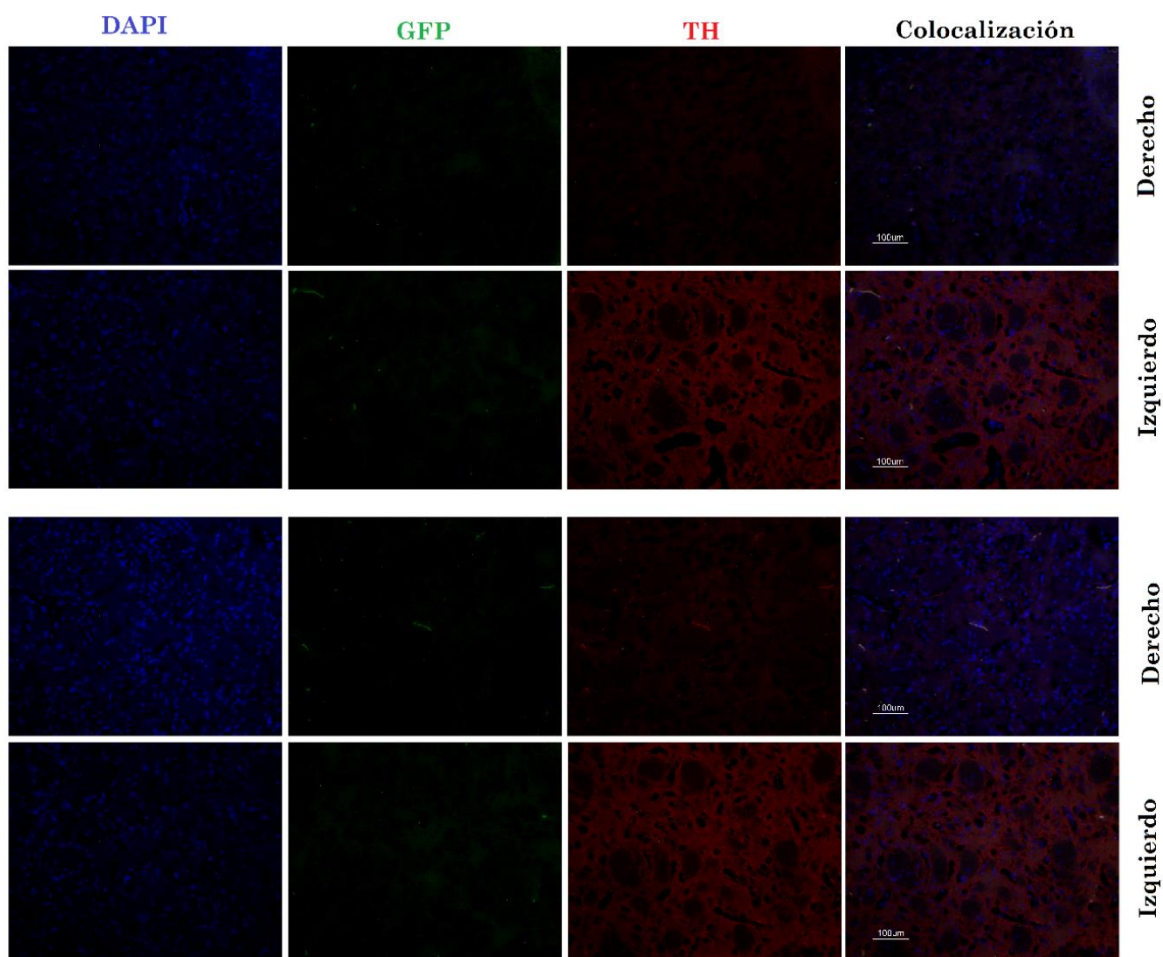


Figura 22. Imágenes representativas de una inmunohistoquímica contra TH en un animal Sham. Se muestra la tinción normal del estriado en el lado no lesionado (izquierdo), así como la falta de axones TH positivos en el lado que recibió la inyección de 6-OHDA (derecho). Barra de escala 100 µm.

Al evaluar el estriado en el grupo “Sham” se observa una tinción normal y abundante de TH en el hemisferio izquierdo, que representa el lado no lesionado del animal. Es posible distinguir los estriosomas sin tinción para TH y la matriz con las proyecciones de NDA. En el caso del lado lesionado, como es esperado no hay células ni proyecciones TH positivas, por lo que no es posible distinguir dichas estructuras (Fig. 22).

Respecto al grupo de animales que recibieron células provenientes de OM, no fue posible encontrar células GFP o TH positivas en el lado lesionado, indicativo de la falta de supervivencia de las células trasplantadas (Fig. 23). Por otro lado, en el caso de los trasplantes con NDA se observa una importante cantidad de células GFP positivas alrededor de los sitios de inyección. Adicionalmente, se puede confirmar la identidad de neuronas dopaminérgicas dado que algunas de las células co-expresan

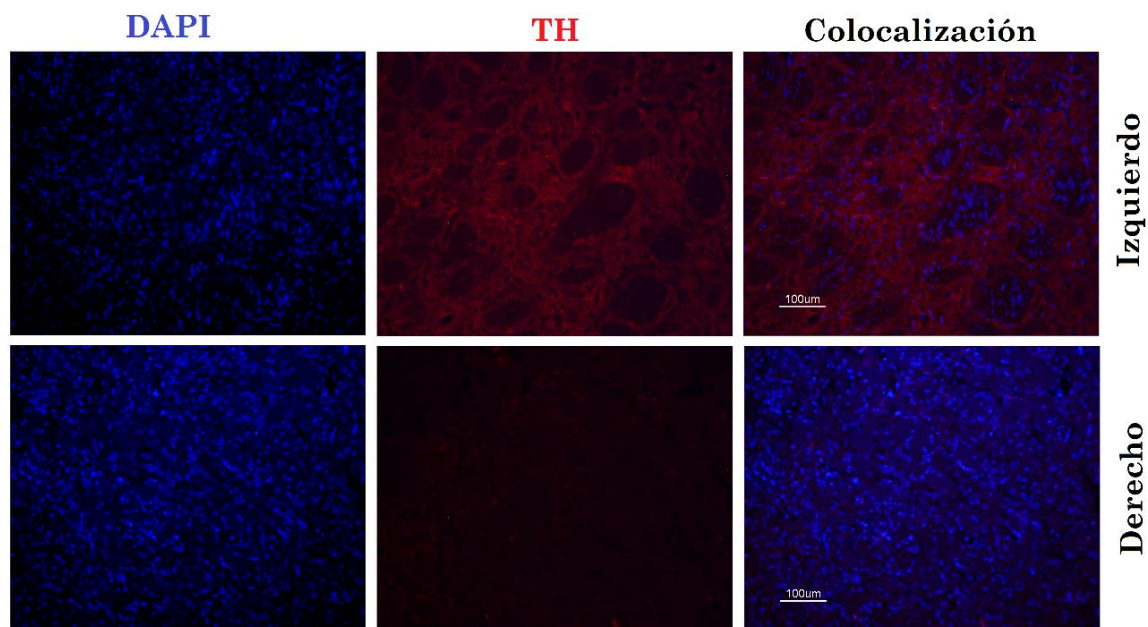


Figura 23. Imágenes representativas de ensayos de inmunohistoquímica contra TH en dos de los animales que recibieron trasplantes con células provenientes de OM. Se muestra la tinción normal del estriado en el lado no lesionado (izquierdo), sin la presencia de ninguna célula GFP positiva. Del lado lesionado y que recibió el trasplante (derecho) no se observan células GFP o TH positivas, indicativo de la falta de supervivencia del trasplante. Barra de escala 100 μm.

GFP, TH y TUJ1 (Fig. 24A), al igual que otros marcadores específicos del mesencéfalo como LMX1A y FOXA2 (Fig. 24B).

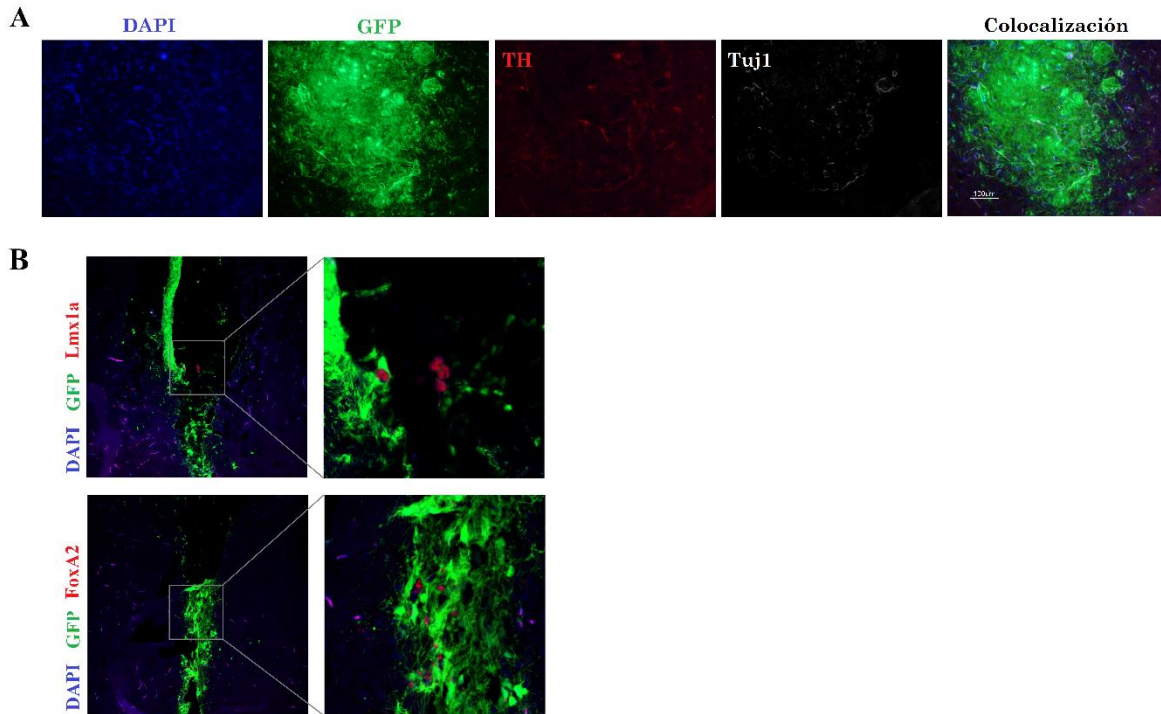


Figura 24. Imágenes representativas de pruebas de inmunohistoquímica en cerebros que recibieron los trasplantes de NDA diferenciadas en monocapa. **A.** Se muestra la expresión de TH y TUJ1 en las células trasplantadas GFP positivas. Barra de escala 100 µm. **B.** Imágenes con sus respectivos acercamientos muestran la expresión de los marcadores de mesencéfalo LMX1A y FOXA2 en núcleos de células GFP positivas.

8. DISCUSIÓN

Los cultivos tridimensionales conocidos como organoides, en general han mostrado importantes ventajas sobre los cultivos clásicos en monocapa, por ejemplo, la capacidad de autoorganización de las células dentro de un organoide permite la formación de una estructura compleja y de regiones específicas, asemejando a los tejidos observados *in vivo*. Un ejemplo es la formación de las zonas tipo ventriculares en los organoides de cerebro, en las cuales se forma una cavidad o lumen que se

equipara a los ventrículos, y que además está definido por una gran cantidad de células que expresan marcadores de precursores neurales, tal como ocurre en la zona subventricular. Sin embargo, la alta variabilidad de los protocolos actualmente disponibles no permite encontrar estas estructuras en todos los organoides generados, como se observó en el presente trabajo.

Otra ventaja de los organoides es su gran potencial de maduración, en algunos casos de cultivos tridimensionales se ha observado también una mayor eficiencia de diferenciación hacia un tipo celular en específico, e inclusive algunos muestran signos de maduración en días más tempranos que los cultivos 2D. Para ejemplificar esto, Jo y colaboradores en 2016 mostraron que los OM maduros son capaces de producir neuromelanina, un pigmento encontrado naturalmente en tejido de mesencéfalo, dicha característica se puede traducir como una mayor capacidad de maduración de los organoides (Jo, Xiao, Sun, Park, et al. 2016). No obstante, se ha demostrado que las neuronas que contienen neuromelanina son particularmente más susceptibles a la neurodegeneración (Carballo-Carbajal et al. 2019), lo que podría ocasionar una disminución de estas neuronas a largo plazo, pero esta posible pérdida ayudaría al establecimiento de modelos de EP.

Otra característica que hay que tomar en cuenta de este tipo de cultivos es la heterogeneidad celular, la cual puede ser ventajosa si se está interesado en estudiar las interacciones entre diferentes subtipos celulares. Además, al evaluar las poblaciones que comprenden a los organoides por secuenciación de RNA a nivel de célula única ha sido posible encontrar importantes similitudes con tejido fetal cerebral humano (Camp et al. 2015; Wray 2020) e inclusive algunas características epigenéticas (Amiri et al. 2018; Luo et al. 2016).

Por otra parte, los organoides también presentan algunas desventajas, por ejemplo, el cultivo a largo plazo de estructuras de gran tamaño presenta un importante índice de muerte celular en el interior del organoide debido a la falta de penetración del medio

cultivo, lo que tiene por consecuencia una disminución en la oxigenación y nutrición de las células en esta zona, causando un alto índice de muerte celular. Para superar este obstáculo se ha propuesto incluir la formación de vasos sanguíneos en los organoides, lo cual mostró un importante rescate en la muerte celular de organoides cerebrales corticales (Shi et al. 2020), sin embargo, este procedimiento no se ha descrito en organoides de otras regiones específicas como el mesencéfalo.

Es importante recalcar que la generación de organoides es una tecnología de reciente aparición, y que a la fecha continúa desarrollándose y progresando para obtener modelos más completos y de mayor similitud a órganos y tejidos *in vivo*. No obstante, la mayoría de los protocolos para la generación de organoides disponibles tienen como resultado una gran variabilidad tanto de un lote a otro, como de un organoide al siguiente. Por dicha variabilidad, podemos encontrar resultados inconsistentes en términos de morfología, maduración y propiedades de los organoides. Por ejemplo, el presente trabajo mostró notables diferencias en la caracterización de los OM respecto a trabajos preliminares realizados en el laboratorio en cuanto a estructura y niveles de expresión de ciertos marcadores (Polanco Maldonado A.L. 2020). Esto nos impulsa a mejorar nuestro protocolo con el objetivo de reducir su variabilidad.

Por otro lado, respecto al trasplante de cultivos tridimensionales, existen múltiples estudios en que se han realizados trasplantes de organoides cerebrales y corticales muestran la capacidad de estos cultivos de implantarse e interactuar con el tejido hospedero, además de promover una recuperación funcional en los animales. No obstante, una característica sumamente importante que estos trabajos comparten es la colocación o trasplante del organoide completo (Daviaud, Friedel, y Zou 2018; Mansour et al. 2018; Z. Wang et al. 2020), sin ningún tipo de disgregación celular o tratamiento enzimático como se realizó en este trabajo.

Adicionalmente, en un estudio publicado en Mayo de 2021, demostraron que células troncales neurales (NSC, por sus siglas en inglés) y precursores neurales provenientes

de Organoides de Mesencéfalo los cuales posteriormente fueron diferenciados hacia NDA en cultivos en monocapa son un gran recurso celular para el tratamiento de EP en modelos animales (Kim et al. 2021). En este artículo los autores muestran que los precursores neurales obtenidos de OM en el D18 son capaces de mantener su perfil de expresión fisiológico tras su aislamiento e incluso después de varias rondas de proliferación fuera del microambiente tridimensional del organoide, es decir que estas células al inducir su diferenciación mantuvieron altos niveles de expresión de marcadores de mesencéfalo como FoxA2, Lmx1A, Nurr1 y EN1, los cuales se encontraban en el 86-96% de las neuronas TH positivas, una muy alta eficiencia en comparación con protocolos 2D. Del mismo modo, señalan que al implantar las NDA generadas a partir de estos cultivos mixtos (3D seguido de 2D) en animales hemiparkinsonianos hay un completo rescate de las deficiencias conductuales asociadas a la EP. Además, las NSC provenientes de sus cultivos son capaces de diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo* a astrocitos, lo que tuvo un efecto neurotrófico en los trasplantes, dado que mostraron mejor supervivencia, mayor expresión de marcadores específicos de cerebro medio y una importante maduración sináptica de las NDA implantadas, esto al ser comparados con trasplantes realizados con NSC procedentes de cultivos en monocapa.

En conjunto, todos estos resultados previamente publicados sugieren que los OM podrían tener la capacidad de favorecer la recuperación de animales parkinsonianos bajo las condiciones adecuadas. Sin embargo, aquí nosotros no observamos ningún signo de recuperación o mejorías en las pruebas conductuales en el grupo de animales que recibieron los trasplantes de OM, por lo cual surgieron dos hipótesis al respecto. La primera es que la falta de compromiso celular y/o madurez de las células inyectadas impidió que estas finalizaran su diferenciación y maduración final, por lo tanto, no encontraríamos neuronas del subtipo dopaminérgico en el cerebro hospedero. La segunda es que las células trasplantadas no sobrevivieron a

consecuencia del extenso estrés tanto enzimático como mecánico al que estuvieron expuestas para obtener una suspensión de célula única. Posteriormente, al evaluar el tejido receptor de los trasplantes por pruebas de inmunohistoquímica corroboramos la veracidad de la segunda hipótesis al encontrar una muy baja o inclusive nula supervivencia de las células trasplantadas provenientes de OM.

Posiblemente, la implantación de un OM completo promoverá en gran medida la supervivencia de las células, ya que reduciríamos el estrés al que se someten las células. No obstante, hay que tener en cuenta múltiples factores, entre ellos está el hecho de que las regiones afectadas en EP son zonas profundas del cerebro, por lo que se requerirían protocolos quirúrgicos más invasivos. Por ejemplo, en el caso en que se busque implantar OM completos y de un tamaño considerable sería necesario realizar un orificio con la suficiente profundidad que permita colocar el organoide directamente en el estriado, esto implicaría remover una porción importante de la corteza cerebral, lo que podría tener importantes efectos adversos en la capacidad motora y/o sensorial del animal. Otra posibilidad por considerar es realizar los trasplantes con OM lo suficientemente jóvenes y por lo tanto pequeños, de tal modo que sea posible introducirlos en una cánula e inyectarlos del mismo modo en que se hace con las células en suspensión, las desventajas que esto podría representar es que al usar cultivos jóvenes no podríamos asegurar su diferenciación específica ni su maduración después de haber hecho el trasplante. Sin duda, esto abre una gran cantidad de interrogantes para discutir y continuar investigando y evaluando la posibilidad de usar cultivos tridimensionales en estrategias de terapia celular.

9. CONCLUSIÓN

Nuestros cultivos de Organoides de Mesencéfalo mostraron un compromiso celular hacia el linaje de mesencéfalo más rápido que los cultivos monocapa de NDA, así

como una mayor proporción de neuronas TH positivas en tiempos más tardíos. A pesar de estos favorables perfiles de expresión de marcadores de mesencéfalo y en especial de la proteína TH que mostraron los organoides en diferentes etapas en comparación cultivos clásicos en monocapa de neuronas dopaminérgicas, las células provenientes de estos cultivos tridimensionales no fueron capaces de recuperar el fenotipo parkinsoniano de animales lesionados unilateralmente con 6-OHDA. Esto ocurrió, muy probablemente, a consecuencia de la alta mortalidad celular posterior al trasplante, causado por el estrés mecánico y enzimático al que se sometieron las células.

10. PERSPECTIVAS

El presente trabajo presenta una caracterización temprana de cultivos de OM, los cuales mostraron algunas discrepancias respecto a experimentos previos realizados en el laboratorio, por lo que es necesario determinar los perfiles de expresión de ciertos marcadores utilizando otras pruebas además de inmunohistoquímicas, por ejemplo, por RT-qPCR, Western Blot e inclusive por pruebas de electrofisiología para evaluar la madurez y funcionalidad de las neuronas obtenidas en los diferentes tipos de cultivos. Adicionalmente, será importante realizar cuantificaciones de dichas pruebas en diferentes lotes de OM para realizar un análisis y tener una mejor comprensión de la variabilidad de nuestros cultivos. Además, será pertinente hacer ajustes al protocolo de generación de organoides que permitan reducir la alta variabilidad que hemos encontrado tras múltiples replicas experimentales realizadas por diferentes miembros del laboratorio, o en caso de ser necesario considerar alguno de los otros protocolos ya publicados para la obtención de OM (Berger et al. 2018; Kim et al. 2019; Kwak et al. 2020; Monzel et al. 2017; Nickels et al. 2020).

En cuanto a los experimentos de trasplante será preciso realizar cirugías en las que se implanten OM enteros, ya sea usando una cánula o bien retirando una porción de la corteza cerebral como se discutió previamente, para posteriormente evaluar si este tipo de trasplante promueve la supervivencia de las células. Asimismo, será pertinente utilizar los OM en otro día más avanzado del protocolo de diferenciación, en que el compromiso celular hacia NDA del mesencéfalo sea mayor.

11. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Medio KSR	
Suplemento	Concentración
Medio Knock Out (Gibco)	78%
Reemplazo de suero (Gibco)	20%
NEAA (Gibco)	1%
L-Glutamina (Gibco)	1%
β -mercaptoetanol (Gibco)	0.1mM
bFGF (Preprotech)	10ng/ml

Tabla suplementaria 1. Contenido base de medio KSR para diferenciación de ESCs humanas a NDA.

NEAA: Aminoácidos no esenciales.

Medio de maduración neuronal	
Suplemento	Concentración
Medio Neurobasal (Gibco)	98%
Suplemento B27 (Gibco)	2%
BDNF (Preprotech)	20ng/ml
GDNF (Preprotech)	20ng/ml
Ácido ascórbico (Sigma)	200 μ M
AMP cíclico (Sigma)	500 μ M
TGF β 3 (Preprotech)	10ng/ml
DAPT (Sigma)	10 μ M

Tabla suplementaria 2. Contenido de medio de maduración neuronal para protocolo de diferenciación de hESCs a NDA.

Medio de Inducción Neural (MIN)	
Suplemento	Concentración
Medio Neuro basal (Gibco)	~50%
Medio DMEM-F12 (Gibco)	~50%
Antibiótico-Antimicótico (Gibco)	0.5%
Suplemento B27 sin Vit.A (Gibco)	0.5%
Suplemento N2 (Gibco)	1%
Glutamax (Gibco)	1%
NEAA (Gibco)	1%
2-mercaptoetanol (Gibco)	0.35%
Heparina (Sigma)	1µg/ml
SB431542 (Selleck Chemicals)	10µM
Noggin (Preprotech)	200ng/ml
CHIR99021 (Selleck Chemicals)	0.8µM
Inhibidor de ROCK (Preprotech)	10µM

Tabla suplementaria 3. Contenido de medio de inducción neural para la generación de organoides de mesencéfalo a partir de hESC.

Medio Modelador de Mesencéfalo (MPM)	
Suplemento	Concentración
Medio Neuro basal (Gibco)	~50%
Medio DMEM-F12 (Gibco)	~50%
Antibiótico-Antimicótico (Gibco)	0.5%
Suplemento B27 sin Vit.A (Gibco)	0.5%
Suplemento N2 (Gibco)	1%
Glutamax (Gibco)	1%

Tabla suplementaria 4. Contenido de medio modelador de mesencéfalo para la generación de OM a partir de hESC.

NEAA (Gibco)	1%
2-mercaptoetanol (Gibco)	0.35%
Heparina (Sigma)	1µg/ml
SB431542 (Selleck Chemicals)	10µM
Noggin (Preprotech)	200ng/ml
CHIR99021 (Selleck Chemicals)	0.8µM
SHH-C25II (Preprotech)	100ng/ml
FGF8 (Preprotech)	100ng/ml

Medio de Inducción de Crecimiento Tisular (TGIM)	
Suplemento	Concentración
Medio Neuro basal (Gibco)	~96%
Suplemento B27 sin Vit.A (Gibco)	0.5%
Suplemento N2 (Gibco)	1%
Glutamax (Gibco)	1%
NEAA (Gibco)	1%
2-mercaptoetanol (Gibco)	0.35%
Insulina (Sigma)	2.5µg/ml
Laminina (Sigma)	200ng/ml
CHIR99021 (Selleck Chemicals)	0.8µM
Penicilina/Estreptomicina (Gibco)	0.1%

Tabla suplementaria 5. Contenido de medio de inducción de crecimiento tisular para la generación de OM a partir de hESC.

Medio de Diferenciación Final (FDM)	
Suplemento	Concentración
Medio Neurobasal (Gibco)	~96%
Suplemento B27 sin Vit.A (Gibco)	0.5%
Suplemento N2 (Gibco)	1%
Glutamax (Gibco)	1%
NEAA (Gibco)	1%
2-mercaptoetanol (Gibco)	0.35%
BDNF (Preprtech)	2.5µg/ml
GDNF (Preprotech)	200ng/ml
Ácido ascórbico (Sigma)	100ng/ml
db-cAMP (Sigma)	100ng/ml
Penicilina/Estreptomicina (Gibco)	0.1%

Tabla suplementaria 6. Contenido de medio de diferenciación final para la generación de OM a partir de hESC.

Reactivo	Para 250ml	Para 500ml
PFA	10g	20g
PBS 10X	25ml	50ml
NaOH 42%	200µl	400µl
H₂O bidestilada	~225ml	~450ml

Tabla suplementaria 7. Contenido de solución de PFA 4%. Ajustar pH a 7.4 antes de aforar al volumen deseado.

12. REFERENCIAS

- Agnesi, Filippo, Matthew D. Johnson, y Jerrold L. Vitek. 2013. "Deep Brain Stimulation. How Does It Work?" In *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier B.V., 39–54.
- Amiri, Anahita et al. 2018. "Transcriptome and Epigenome Landscape of Human Cortical Development Modeled in Organoids." *Science* 362(6420).
- Backlund, E. O. et al. 1985. "Transplantation of Adrenal Medullary Tissue to Striatum in Parkinsonism. First Clinical Trials." *Journal of Neurosurgery* 62(2): 169–73.
- Balion, Zbigniew et al. 2020. "Cerebellar Cells Self-Assemble into Functional Organoids on Synthetic, Chemically Crosslinked ECM-Mimicking Peptide Hydrogels." *Biomolecules* 10(5).
- Benskey, Matthew J., y Fredric P. Manfredsson. 2016. "Intraparenchymal Stereotaxic Delivery of RAAV and Special Considerations in Vector Handling." In *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., 199–215.
- Berger, Emanuel et al. 2018. "Millifluidic Culture Improves Human Midbrain Organoid Vitality and Differentiation." *Lab on a Chip* 18(20): 3172–83.
- Bill, Funding, y Melinda Gates Foundation. 2016. "Articles Global , Regional , and National Burden of Parkinson ' s Disease , 1990 – 2016 : A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." : 939–53.
- Björklund, Anders et al. 1980. "Reinnervation of the Denervated Striatum by Substantia Nigra Transplants: Functional Consequences as Revealed by Pharmacological and Sensorimotor Testing." *Brain Research* 199: 307–33.
- Björklund, Anders, y Ulf Stenevi. 1979. "Reconstruction of the Nigrostriatal Dopamine Pathway by Intracerebral Nigral Transplants." *Brain Research*

177(3): 555–60.

- Bjorklund, Anders, Ulf Stenevi, SB Dunnett, y S Iversen. 1981. “Functional Reactivation of the Deafferented Neostriatum by Nigral Transplants.” *Nature* 289: 497–99.
- Bonev, Boyan et al. 2017. “Multiscale 3D Genome Rewiring during Mouse Neural Development.” *Cell* 171(3): 557-572.
- Bratsos, Sosipatros P, Dimitrios Karponis, and Sohag N Saleh. “Efficacy and Safety of Deep Brain Stimulation in the Treatment of Parkinson’s Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.” *Cureus* 10(10).
- Camp, J. Gray et al. 2015a. “Human Cerebral Organoids Recapitulate Gene Expression Programs of Fetal Neocortex Development.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(51): 15672–77.
- . 2015b. “Human Cerebral Organoids Recapitulate Gene Expression Programs of Fetal Neocortex Development.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(51): 15672–77.
- Carballo-Carbajal, Iria et al. 2019. “Brain Tyrosinase Overexpression Implicates Age-Dependent Neuromelanin Production in Parkinson’s Disease Pathogenesis.” *Nature Communications* 2019 10:1 10(1): 1–19.
- Carta, Manolo et al. 2010. “Role of Serotonin Neurons in the Induction of Levodopa- and Graft-Induced Dyskinesias in Parkinson’s Disease.” *Movement Disorders* 25(SUPPL. 1): 174–79.
- Chambers, Ian et al. 2007. “Nanog Safeguards Pluripotency and Mediates Germline Development.” *Nature* 450(7173): 1230–34.

- Chinta, Shankar J., y Julie K. Andersen. 2005. "Dopaminergic Neurons." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37(5 SPEC. ISS.): 942–46.
- Choi, Se Hoon et al. 2014. "A Three-Dimensional Human Neural Cell Culture Model of Alzheimer's Disease." *Nature* 515(7526): 274–78.
- Claassen, David A., Michelle M. Desler, y Angie Rizzino. 2009. "ROCK Inhibition Enhances the Recovery and Growth of Cryopreserved Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Molecular Reproduction and Development* 76(8): 722–32.
- Clevers, Hans. 2016. "Modeling Development and Disease with Organoids." *Cell* 165(7): 1586–97.
- Conforti, P. et al. 2018. "Faulty Neuronal Determination and Cell Polarization Are Reverted by Modulating HD Early Phenotypes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(4): E762–71.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1801898115www.pnas.org (September 3, 2020).
- Connolly, Barbara S., y Anthony E. Lang. 2014. "Pharmacological Treatment of Parkinson Disease: A Review." *JAMA - Journal of the American Medical Association* 311(16): 1670–83.
- Dauer, William, y Serge Przedborski. 2003. "Parkinson's Disease, Mechanisms and Models." *Neuron* 39: 889–909.
- Daviaud, Nicolas, Roland H. Friedel, y Hongyan Zou. 2018. "Vascularization and Engraftment of Transplanted Human Cerebral Organoids in Mouse Cortex." *eneuro*.
- Eguizabal, C et al. 2019. "Two Decades of Embryonic Stem Cells: A Historical

- Overview.” *Human reproduction open* 2019(1): 1–17.
- Eiraku, Mototsugu et al. 2011. “Self-Organizing Optic-Cup Morphogenesis in Three-Dimensional Culture.” *Nature* 472(7341): 51–58.
- Eura, Nobuyuki et al. 2020. “Brainstem Organoids From Human Pluripotent Stem Cells.” *Frontiers in Neuroscience* 14: 538.
- Evans, M. J., y M. H. Kaufman. 1981. “Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos.” *Nature* 292(5819): 154–56.
- Freed, Curt R. et al. 2001. “Transplantation of Embryonic Dopamine Neurons for Severe Parkinson’s Disease.” *New England Journal of Medicine* 344(10): 710–19.
- Freed, William J et al. 1980. “Restoration of Dopaminergic Function by Grafbng of Fetal Rat Substantia Nigra to the Caudate Nucleus : Long-Term Behavioral , Biochemical , and Histochemical Studies.” *Annals of Neurology* 8: 510–19.
- . 1981. “Transplanted Adrenal Chromaffin Cells in Rat Brain Reduce Lesion-Induced Rotational Behavior.” *Nature* 292: 351–52.
- Guhr, Anke et al. 2018. “Recent Trends in Research with Human Pluripotent Stem Cells: Impact of Research and Use of Cell Lines in Experimental Research and Clinical Trials.” *Stem Cell Reports* 11(2): 485–96.
- Hoffer, Barry, William Freed, Lars Olson, y Richard Jed Wyatt. 1984. “Transplantation of Dopamine-Containing Tissues to the Central Nervous.” *Neurosurgery* 31(CN_suppl_1): 404–16.
- Hudson, John L et al. 1994. "Conditioned Apomorphine-Induced Turning in 6-OHDA-Lesioned Rats". *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 49(1): 147-54.

- Hughes, Chris S., Lynne M. Postovit, y Gilles A. Lajoie. 2010. “Matrigel: A Complex Protein Mixture Required for Optimal Growth of Cell Culture.” *Proteomics* 10(9): 1886–90.
- Islam, Shariful, y Darren J Moore. 2017. “Mechanisms of LRRK2-Dependent Neurodegeneration: Role of Enzymatic Activity and Protein Aggregation.” *Biochem Soc Trans* 45(1): 163–72.
- Jo, Junghyun, Yixin Xiao, Alfred Xuyang Sun, Engin Cukuroglu, et al. 2016. “Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons.” *Cell Stem Cell* 19(2): 248–57.
- Jo, Junghyun, Yixin Xiao, Alfred Xuyang Sun, Jae Hyeon Park, et al. 2016. “Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons.” *Cell Stem Cell* 19(2): 248–57.
- Johnson, B.V. et al. 2008. “Understanding Pluripotency—How Embryonic Stem Cells Keep Their Options Open.” *Molecular Human Reproduction* 14(9): 513–20.
- Jorfi, Mehdi et al. 2018. “Human Neurospheroid Arrays for In Vitro Studies of Alzheimer’s Disease.” *Scientific Reports* 8(1): 1–13.
- Joseph, Jankovic. 2008. “Parkinson’s Disease Clinical Features and Diagnosis.” *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 368–76.
- Juárez Olguín, Hugo, David Calderón Guzmán, Ernestina Hernández García, and Gerardo Barragán Mejía. 2016. “The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016.

- Kalia, Lorraine V, y Anthony E Lang. 2015. "Parkinson's Disease." *The Lancet* 386(9996): 896–912. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3) (August 16, 2019).
- Kim, Hongwon et al. 2019. "Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids." *Stem Cell Reports* 12(3):518-531.
- Kim, Jihoon, Bon Kyoung Koo, y Juergen A. Knoblich. 2020. "Human Organoids: Model Systems for Human Biology and Medicine." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*: 1–14.
- Kim, Seung Won et al. 2021. "Neural Stem Cells Derived from Human Midbrain Organoids as a Stable Source for Treating Parkinson's Disease: Midbrain Organoid-NSCs (Og-NSC) as a Stable Source for PD Treatment." *Progress in Neurobiology* 204: 102086.
- Kitahara, Takahiro et al. 2020. "Axonal Extensions along Corticospinal Tracts from Transplanted Human Cerebral Organoids." *Stem Cell Reports* 15(2): 467–81.
- Klein, Christine, y Ana Westenberger. 2012. "Genetics of Parkinson's Disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(1): 663–97.
- Kriks, Sonja et al. 2011. "Dopamine Neurons Derived from Human ES Cells Efficiently Engraft in Animal Models of Parkinson's Disease." *Nature* 480(7378): 547–51.
- Kwak, Tae Hwan et al. 2020. "Generation of Homogeneous Midbrain Organoids with in Vivo - like Cellular Composition Facilitates Neurotoxin-Based Parkinson's Disease Modeling." *Stem Cells* 38(6): 727–40.
- Lancaster, Madeline A. et al. 2013. "Cerebral Organoids Model Human Brain Development and Microcephaly." *Nature* 501(7467): 373–79.
- Lancaster, Madeline A., y Meritxell Huch. 2019. "Disease Modelling in Human

- Organoids.” *DMM Disease Models and Mechanisms* 12(7).
- Lancaster, Madeline A., y Juergen A. Knoblich. 2014. “Organogenesis in a Dish: Modeling Development and Disease Using Organoid Technologies.” *Science* 345(6194): 283–92.
- Langston, J., P Ballard, J. Tetrud, y I Irwin. 1983. “Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis.” *Science* 219(4587): 979–80.
- de Lau, Lonneke, y Monique Breteler. 2006. “Epidemiology of Parkinson Disease Epidemiology of Parkinson ’ s Disease.” *The Lancet Neurology* 5(6): 525–35.
- Leibel, Sandra L. et al. 2020. “Generation of Complete Multi–Cell Type Lung Organoids From Human Embryonic and Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells for Infectious Disease Modeling and Therapeutics Validation.” *Current Protocols in Stem Cell Biology* 54(1): e118.
- Lew, Mark. 2007. “Overview of Parkinson’s Disease.” *Pharmacotherapy* 27(12 Part 2):
- Li, Hong, Houbo Jiang, Boyang Zhang, y Jian Feng. 2018. “Modeling Parkinson’s Disease Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells.” *Journal of Parkinson’s Disease* 8(4): 479–93.
- Li, Mo, y Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2018. “Deconstructing the Pluripotency Gene Regulatory Network.” 20: 382–92.
- Li, Xingnan et al. 2014. “Oncogenic Transformation of Diverse Gastrointestinal Tissues in Primary Organoid Culture.” *Nature Medicine* 20(7): 769–77.
- Lindvall, Olle et al. 1989. “Human Fetal Dopamine Neurons Grafted Into the Striatum in Two Patients With Severe Parkinson ’ s Disease.” *Arch Neurol* 46(6): 615–31.

- . 1990. “Grafts of Fetal Dopamine Neurons Survive and Improve Motor Function in Parkinson’s Disease.” *Science* 247(4942): 574–77.
- Lindvall, Olle, Erik-olof Backlund, Lars Farde, y S Goran Sedvall. 1987. “Transplantation in Parkinson’s Disease : Two Cases of Adrenal Medullary Grafts to the Putamen.” : 457–68.
- Luo, Chongyuan et al. 2016. “Cerebral Organoids Recapitulate Epigenomic Signatures of the Human Fetal Brain.” *Cell Reports* 17(12): 3369–84.
- Malmfors, Torbjörn, y Charlotte Sachs. 1968. “Degeneration of Adrenergic Nerves Produced by 6-Hydroxydopamine.” *European Journal of Pharmacology* 3(1): 89–92.
- Mansour, Abed Alfatah et al. 2018. “An in Vivo Model of Functional and Vascularized Human Brain Organoids.” *Nature Publishing Group* (April).
- Mariani, Jessica et al. 2015. “FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders.” *Cell* 162(2): 375–90.
- Medvedev, S P, E A Pokushalov, y S M Zakian. 2012. “Epigenetics of Pluripotent Cells.” *Acta Naturae* 4(4): 28–46.
- Meyer, Natalie, y Linda Z. Penn. 2008. “Reflecting on 25 Years with MYC.” *Nature Reviews Cancer* 8(12): 976–90.
- Mohamed, Nguyen-Vi et al. 2019. “Generation of Human Midbrain Organoids from Induced Pluripotent Stem Cells.” *MNI Open Research* 3(May): 1.
- Monzel, Anna S. et al. 2017. “Derivation of Human Midbrain-Specific Organoids from Neuroepithelial Stem Cells.” *Stem Cell Reports* 8(5):1144-1154.
- Nadauld, Lincoln D. et al. 2014. “Metastatic Tumor Evolution and Organoid

- Modeling Implicate TGFBR2 as a Cancer Driver in Diffuse Gastric Cancer.” *Genome biology* 15(8): 428.
- Nichols, Jennifer, y Austin Smith. 2009. “Naive and Primed Pluripotent States.” *Cell Stem Cell* 4(6): 487–92.
- Nickels, Sarah Louise et al. 2020. “Reproducible Generation of Human Midbrain Organoids for in Vitro Modeling of Parkinson’s Disease.” *Stem Cell Research* 46: 101870.
- Olanow, C Warren et al. 2003. “A Double-Blind Controlled Trial of Bilateral Fetal Nigral Transplantation in Parkinson ’ s Disease.” *American Neurological Association* 54: 403–14.
- Ormel, Paul R. et al. 2018. “Microglia Innately Develop within Cerebral Organoids.” *Nature Communications* 9(1): 1–14.
- Ozone, Chikafumi et al. 2016. “Functional Anterior Pituitary Generated in Self-Organizing Culture of Human Embryonic Stem Cells.” *Nature Communications* 7(1): 1–10.
- Parkinson, J. 1817. “On the Shaking Palsy.” *Sherwood, Heely and Jones*: 223–36.
- Perlow, Mark J. et al. 1979. “Brain Grafts Reduce Motor Abnormalities Produced by Destruction of Nigrostriatal Dopamine System.” *Science* 204(4393): 643–47.
- Pham, Missy T. et al. 2018. “Generation of Human Vascularized Brain Organoids.” *NeuroReport* 29(7): 588–93.
- Poewe, Werner et al. 2017. “Parkinson Disease - Only Suppl Info 1: Imaging Biomarkers.” *Nature Reviews Disease Primers* 3: 1–21.
- Politis, Marios et al. 2010. “Serotonergic Neurons Mediate Dyskinesia Side Effects in Parkinson ’ s Patients with Neural Transplants.” : 1–8.

- Qian, Xuyu et al. 2020. “Sliced Human Cortical Organoids for Modeling Distinct Cortical Layer Formation.” *Cell Stem Cell* 26(5): 766-781.e9.
- Ryczko, Dimitri, y Réjean Dubuc. 2017. “Dopamine and the Brainstem Locomotor Networks: From Lamprey to Human.” *Frontiers in Neuroscience* 11:295.
- Saito, Yoshiyuki et al. 2018. “Development of a Functional Thyroid Model Based on an Organoid Culture System.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 497(2): 783–89.
- Sakaguchi, Hideya et al. 2015. “Generation of Functional Hippocampal Neurons from Self-Organizing Human Embryonic Stem Cell-Derived Dorsomedial Telencephalic Tissue.” *Nature Communications* 6(1): 1–11.
- Samii, Ali, John G Nutt, y Bruce R Ransom. 2004. “Parkinson’s Disease.” *The Lancet* 363(9423): 1783–93.
- Sato, Toshiro et al. 2009. “Single Lgr5 Stem Cells Build Crypt-Villus Structures in Vitro without a Mesenchymal Niche.” *Nature* 459(7244): 262–65.
- Shi, Yingchao et al. 2020. “Vascularized Human Cortical Organoids (VOrganoids) Model Cortical Development in Vivo” ed. Bing Ye. *PLOS Biology* 18(5): e3000705.
- Silva, Teresa P. et al. 2020. “Scalable Generation of Mature Cerebellar Organoids from Human Pluripotent Stem Cells and Characterization by Immunostaining.” *Journal of visualized experiments : JoVE* (160).
- Smits, Lisa M. et al. 2019. “Modeling Parkinson’s Disease in Midbrain-like Organoids.” *npj Parkinson’s Disease* 5:5.
- Srikanth, Priya et al. 2018. “Shared Effects of DISC1 Disruption and Elevated WNT Signaling in Human Cerebral Organoids.” *Translational Psychiatry* 8(1): 77.

- Taguchi, Atsuhiko et al. 2014. "Redefining the in Vivo Origin of Metanephric Nephron Progenitors Enables Generation of Complex Kidney Structures from Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 14(1): 53–67.
- Takahashi, Kazutoshi et al. 2007. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors." *Cell* 131(5): 861–72.
- Takahashi, Kazutoshi, y Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126(4): 663–76.
- Takasato, Minoru et al. 2015. "Kidney Organoids from Human IPS Cells Contain Multiple Lineages and Model Human Nephrogenesis." *Nature* 526(7574): 564–68.
- Takebe, Takanori et al. 2013. "Vascularized and Functional Human Liver from an iPSC-Derived Organ Bud Transplant." *Nature* 499(7459): 481–84.
- Thompson, WG. 1890. "SUCCESSFUL BRAIN GRAFTING." *Science* ns-16(392): 78–79.
- Thomson, James A. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282: 1145–47.
- Tolosa, Eduardo, Miquel Vila, Christine Klein, and Oliver Rascol. 2020. "LRRK2 in Parkinson Disease: Challenges of Clinical Trials." *Nature Reviews Neurology* 16: 97–107.
- Tysnes, Ole Bjørn, y Anette Storstein. 2017. "Epidemiology of Parkinson's Disease." *Journal of Neural Transmission* 124: 901–5.
- Ungerstedt, Urban. 1968. "6-Hydroxidopamina Induced Generation of Central Monoamine Neurons". *European Journal of Pharmacology* 5(1):107-10.

- Ungerstedt, Urban, y Gordon W Arbuthnott. 1970. "Quantitative Recording of Rotational Behavior in Rats after 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Dopamine System". *Brain research* 24(3):485-93.
- Wakabayashi, Koichi et al. 1989. "Lewy Bodies in the Enteric Nervous System in Parkinson's Disease." *Archives of Histology and Cytology* 52: 191–94.
- Wang, Shu Na et al. 2019. "Cerebral Organoids Repair Ischemic Stroke Brain Injury." *Translational Stroke Research*: 1–18.
- Wang, Zhi et al. 2017. "Organoid Technology for Brain and Therapeutics Research." *CNS Neuroscience and Therapeutics* 23(10): 771–78.
- . 2020. "Cerebral Organoids Transplantation Improves Neurological Motor Function in Rat Brain Injury." *CNS Neuroscience & Therapeutics* 26(7): 682–97.
- Watanabe, Kiichi et al. 2007. "A ROCK Inhibitor Permits Survival of Dissociated Human Embryonic Stem Cells." *Nature Biotechnology* 25(6):681-6.
- Watanabe, Momoko et al. 2019. "TGF β Superfamily Signaling Regulates the State of Human Stem Cell Pluripotency and Competency to Create Telencephalic Organoids." *BioRxiv*.
- Wichmann, Thomas, y Mahlon R Delong. 2016. "Deep Brain Stimulation for Movement Disorders of Basal Ganglia Origin: Restoring Function or Functionality?" *Neurotherapeutics* 13(2):264-83.
- Wimmer, Reiner A. et al. 2019. "Human Blood Vessel Organoids as a Model of Diabetic Vasculopathy." *Nature* 565(7740): 505–10.
- Wong, Amy P. et al. 2012. "Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Mature Airway Epithelia Expressing Functional CFTR Protein." *Nature Biotechnology* 30(9): 876–82.

- Wray, Selina. 2020. “Modelling Neurodegenerative Disease Using Brain Organoids.” *Seminars in Cell and Developmental Biology* 111:60-66.
- Xu, Ranjie et al. 2019. “OLIG2 Drives Abnormal Neurodevelopmental Phenotypes in Human iPSC-Based Organoid and Chimeric Mouse Models of Down Syndrome.” *Cell Stem Cell* 24(6): 908-926.e8.
- Yeo, Jia Chi, y Huck Hui Ng. 2013. “The Transcriptional Regulation of Pluripotency.” *Cell Research* 23(1): 20–32.
- Yin, Xiaolei et al. 2016. “Engineering Stem Cell Organoids.” *Cell Stem Cell* 18(1): 25–38.
- Ying, Qi Long et al. 2008. “The Ground State of Embryonic Stem Cell Self-Renewal.” *Nature* 453(7194): 519–23.
- Young, Richard A. 2011. “Control of the Embryonic Stem Cell State.” *Cell* 144(6): 940–54.