



universidad  
de león



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**MODELOS CELULARES TRIDIMENSIONALES  
EN EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE  
PARKINSON**

**THREE-DIMENSIONAL CELL MODELS IN THE  
STUDY OF PARKINSON'S DISEASE**

**Autor: Íñigo Garay Echevarría**

Tutora: Rosalía Fernández Alonso

Co-tutor: Alberto Vázquez Jiménez

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Julio, 2023**

## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Resumen/Abstract</b> .....  | <b>I</b>  |
| <b>Índice de abreviaturas</b> .....  | <b>II</b> |
| <b>1. Introducción</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1.Etiología .....  | 2         |
| 1.2.Modelos animales .....   | 4         |
| 1.3.Modelos celulares bidimensionales .....                                      | 6         |
| <b>2. Hipótesis y objetivo</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>3. Materiales y métodos</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>4. Modelos celulares tridimensionales</b> .....                               | <b>10</b> |
| 4.1.Origen y progreso de los modelos celulares 3D .....                          | 10        |
| 4.2.Derivación de organoides cerebrales mesencefálicos .....                     | 13        |
| 4.3.Organoides mesencefálicos en el estudio de la EP .....                       | 14        |
| <b>5. Estrategias terapéuticas utilizadas en la enfermedad de Parkinson ....</b> | <b>18</b> |
| 5.1.Estrategias terapéuticas convencionales .....                                | 19        |
| 5.2.Nuevas estrategias terapéuticas .....  | 19        |
| <b>6. Ensayos clínicos en proceso</b> .....                                      | <b>20</b> |
| <b>7. Discusión</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>8. Conclusiones</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>9. Referencias bibliográficas</b> .....                                       | <b>25</b> |

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en el mundo, después de la enfermedad de Alzheimer. A lo largo de esta última década se ha observado un incremento de casos de EP, una enfermedad actualmente incurable y para la que los tratamientos son solo paliativos. Esto pone de manifiesto la necesidad de investigar sobre el origen y los mecanismos moleculares que subyacen a esta patología, con la finalidad de hallar estrategias terapéuticas eficaces.

Los modelos animales y los modelos celulares bidimensionales han sido tradicionalmente utilizados para el estudio de la EP. No obstante, éstos presentan una serie de limitaciones, como las consideraciones éticas y el coste, en el caso de los primeros, y la falta de complejidad estructural y heterogeneidad celular, en el caso de los segundos, y no consiguen recapitular algunos de los aspectos que definen a esta patología neurodegenerativa.

En este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado una exhaustiva revisión bibliográfica sobre el uso de los distintos modelos utilizados en el estudio y tratamiento de la EP, teniendo en cuenta sus ventajas y limitaciones, y destacando la importancia de los nuevos modelos celulares tridimensionales por su capacidad para recapitular la mayoría de los aspectos de la enfermedad. A pesar de mostrar ciertas limitaciones, estos modelos 3D tienen por delante un futuro muy prometedor en la investigación y tratamiento de la EP.

**Palabras clave:** Enfermedad de Parkinson, iPSCs, modelos tridimensionales, organoides, organoide de mesencéfalo

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease worldwide, after Alzheimer's disease. Throughout the last decade, an increase in PD cases has been observed, although PD is yet incurable and for which treatments are only palliative. This highlights the need to understand the origin and molecular mechanisms underlying this pathology, in order to eventually find effective therapeutic strategies.

Animal models and two-dimensional cellular models have traditionally been used to investigate PD. However, they present a series of drawbacks, such as ethical issues and cost in the case of the former, and the lack of structural complexity and cellular heterogeneity in the case of the latter, and they fail to recapitulate some of the aspects that define this neurodegenerative pathology.

In this Final Degree Project, an exhaustive bibliographical review has been carried out, compiling relevant information about the different models used in the study and treatment of PD, considering the advantages and limitations of each model, and highlighting the relevance of the new three-dimensional cellular models due to their ability to recapitulate most aspects of PD. Despite showing certain limitations, these 3D models are very promising for disease modeling and drug discovery in the field of PD.

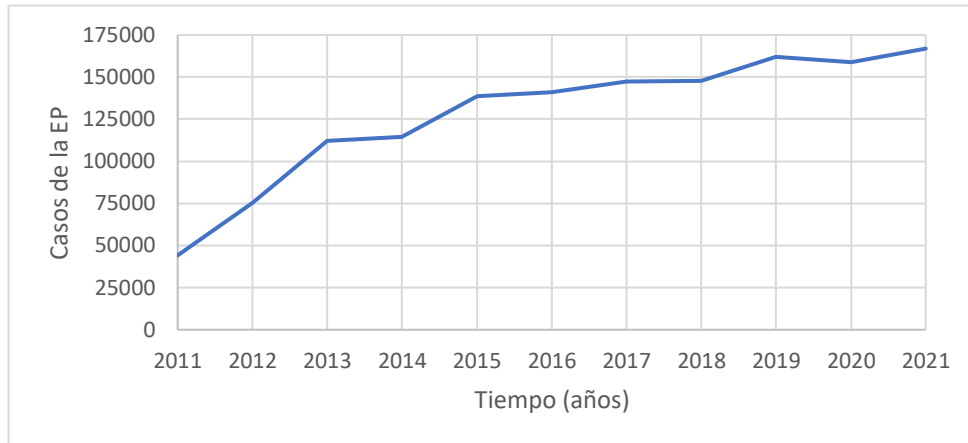
**Key words:** Parkinson's disease, iPSCs, three-dimensional models, organoids, midbrain organoid

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|                                |  |                        |  |
|--------------------------------|--|------------------------|--|
| <b><math>\alpha</math>-sin</b> | $\alpha$ -sinucleína   | <b>MPP<sup>+</sup></b> | 1-metil-4-fenilpiridinio                   |
| <b>2D</b>                      | Bidimensional  | <b>MPTP</b>            | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina |
| <b>3D</b>                      | Tridimensional   | <b>NA</b>              | Noradrenalina                              |
| <b>AcA</b>                     | Ácido ascórbico  | <b>nDA</b>             | Neurona dopaminérgica                      |
| <b>BDNF</b>                    | Factor neurotrófico derivado del cerebro                       | <b>NHP</b>             | Primates no humanos                        |
| <b>cAMP</b>                    | Adenosín monofosfato cíclico                                   | <b>OOAC</b>            | Órgano-en-un-chip                          |
| <b>DA</b>                      | Dopamina   | <b>PBMC</b>            | Célula mononuclear de la sangre periférica |
| <b>DAT</b>                     | Transportador de dopamina                                      | <b>RA</b>              | Ácido retinoico                            |
| <b>DDC</b>                     | Dopamina descarboxilasa  | <b>ROS</b>             | Especies reactivas del oxígeno             |
| <b>EB</b>                      | Cuerpo embrioide   | <b>SeV</b>             | Vector viral Sendai                        |
| <b>ECM</b>                     | Matriz extracelular  | <b>SHH</b>             | <i>Sonic Hedgehog</i>                      |
| <b>EP</b>                      | Enfermedad de Parkinson  | <b>simBO</b>           | Organoide de cerebro simplificado          |
| <b>ESC</b>                     | Célula troncal embrionaria                                     | <b>SNpc</b>            | Sustancia negra <i>pars compacta</i>       |
| <b>FGF8</b>                    | Factor de crecimiento de fibroblasto 8                         | <b>TH</b>              | Tirosina hidrolasa                         |
| <b>GDNF</b>                    | Factor neurotrófico de las células derivadas de la línea glial | <b>TRAP</b>            | Temblores, rigidez, acinesia y postura     |
| <b>hESC</b>                    | Célula troncal embrionaria humana                              | <b>UPS</b>             | Sistema ubiquitina-proteasoma              |
| <b>hiPSC</b>                   | Células troncales pluripotentes inducidas humanas              |                        |  |
| <b>hMO</b>                     | Organoide de mesencefalo humano                                |                        |  |
| <b>iPSC</b>                    | Célula troncal pluripotente inducida                           |                        |  |
| <b>L-DOPA</b>                  | L-dihidroxifenilalanina  |                        |  |
| <b>MAO-B</b>                   | Monoamino oxidasa B  |                        |  |
| <b>mDA</b>                     | Neurona dopaminérgica mesencefálica                            |                        |  |
| <b>MEF</b>                     | Fibroblasto embrionario de ratón                               |                        |  |
| <b>MHB</b>                     | Frontera mesencefalo-rombencéfalo                              |                        |  |
| <b>MO</b>                      | Organoide de mesencefalo                                       |                        |  |

## 1. Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial después de la enfermedad de Alzheimer. Actualmente, más de 1,2 millones de personas en Europa padecen la EP y se espera que este número llegue a duplicarse en 2030 (Feigin *et al.*, 2017). Por otro lado, en lo que respecta a España, las cifras de casos representados en la **Figura 1** muestran un aumento del 272% desde 2011, es decir, los pacientes de la EP se han cuadruplicado en una década (Consulta Interactiva del SNS, 2023).



**Figura 1.** Casos de la EP en España desde el año 2011 hasta el 2021 (Consulta Interactiva del SNS, 2023)

La EP es una patología asociada a la edad, ya que en personas mayores de 60 años se puede observar una prevalencia del 1% y en aquellas mayores de 80 años ésta asciende hasta el 4%. Por otro lado, el sexo biológico también supone un factor de riesgo: los hombres presentan una mayor probabilidad de padecer esta enfermedad, ya que la EP afecta el doble a la población masculina que a la femenina (Cerri *et al.*, 2019).

La EP es una sinucleinopatía, es decir, una enfermedad degenerativa debida al depósito patológico de  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin), caracterizada por la pérdida progresiva y temprana de neuronas dopaminérgicas (nDAs) en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc), localizada en los ganglios basales del mesencéfalo. Esta pérdida es debida a la formación de acumulaciones proteicas denominadas cuerpos de Lewy (LBs), donde se acumula, mayoritariamente la  $\alpha$ -sin (Tolosa *et al.*, 2021). La muerte prematura de las nDAs y la consecuente disminución de dopamina desencadenan los síntomas motores característicos del parkinsonismo. No obstante, la EP tiene asociada determinados síntomas no motores que pueden aparecer incluso décadas antes que los motores (Kalia y Lang, 2015).

Entre los síntomas motores, cuatro de ellos se consideran los síntomas motores cardinales de la EP: temblores, rigidez, acinesia/bradicinesia (ausencia o lentitud de movimiento) e

inestabilidad postural (TRAP). Además de estos síntomas clásicos, se pueden manifestar otros trastornos motores, como anomalías posturales, alteraciones en la manera de caminar, disminución de la frecuencia de parpadeo, micrografía a la hora de escribir, impedimentos en el habla o una reducción de la expresión facial (hipomimia), entre otros (Balestrino y Schapira, 2020).

Por otro lado, entre los síntomas no motores se encuentran la reducción de la capacidad olfativa (hiposmia), trastornos del sueño, depresión, incontinencia y cambios cognitivos, entre otros. Como se mencionó anteriormente, estos síntomas pueden padecerse incluso antes de que aparezcan los clásicos síntomas motores, por lo que, a este periodo previo se le denomina fase prodromal (Armstrong y Okun, 2020). Los síntomas no motores son el aspecto que más complicaciones puede conllevar con respecto a la calidad de vida, ya que éstos no responden a la terapia dopaminérgica de igual manera que los síntomas motores (Jankovic y Tan, 2020). Esta fase prodromal proporciona una ventana en la que la aplicación de terapias puede tener el potencial de prevenir o retrasar el desarrollo y progresión de la enfermedad (Kalia y Lang, 2015).

### **1.1. Etiología**

La EP es una enfermedad idiopática, cuya causa es desconocida, aunque inicialmente se pensaba que era provocada por un factor ambiental (Kalia y Lang, 2015). No obstante, gracias a la investigación se ha determinado que la etiología de esta enfermedad involucra tanto factores ambientales como genéticos (Kalinderi *et al.*, 2016).

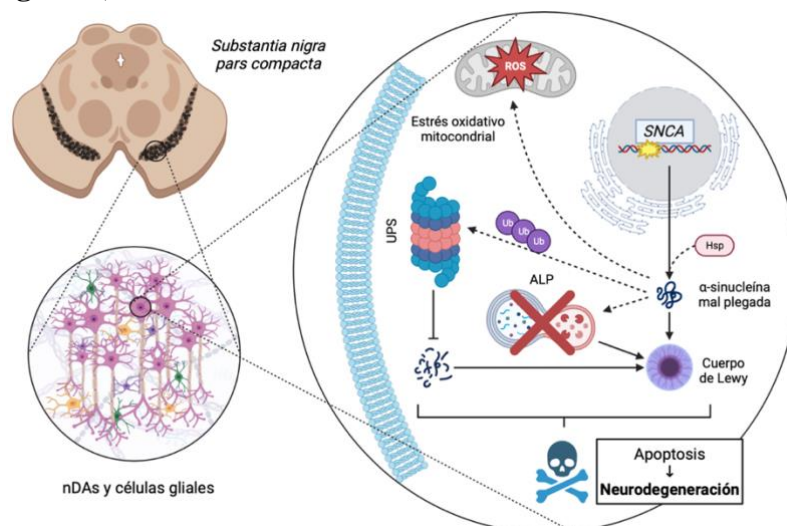
Las causas ambientales que se han relacionado con la EP engloban el estrés, la inactividad física, las lesiones en la cabeza y la exposición a pesticidas o neurotoxinas (Marras *et al.*, 2019). Entre estas últimas se encuentran la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), el insecticida rotenona y el herbicida paraquat, además de la exposición a metales pesados (hierro, cobre, plomo, aluminio y zinc) (Kouli *et al.*, 2018).

Por otro lado, estudios epidemiológicos recientes han manifestado que la EP presenta cierta heredabilidad, por lo que, el componente genético juega un papel importante (Zhang *et al.*, 2018). Por lo tanto, a pesar de ser una enfermedad idiopática, existe un 15% de pacientes que padecen la EP y que presentan historial familiar, además de un 5-10% que presentan una forma monogénica de la EP con herencia mendeliana (Deng *et al.*, 2018). Dentro del factor genético, se puede distinguir entre EP autosómica dominante y recesiva (Zhang *et al.*, 2018).

En el primer caso, mutaciones en la proteína  $\alpha$ -sin codificada por el gen *SNCA* se relacionaron con el desarrollo de la versión dominante de la enfermedad. No obstante, se han

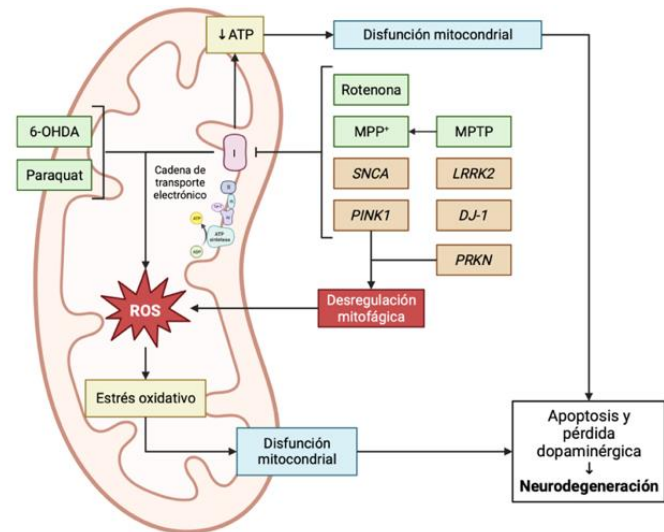
identificado otros genes, como el que codifica para la proteína ‘*leucine-rich repeat kinase 2*’ (LRRK2), cuyas mutaciones son la principal causa de la EP familiar (Zhang *et al.*, 2018). Además, mutaciones en la enzima glucocerebrosidasa, codificada por el gen *GBA*, dan lugar a la enfermedad de Gaucher, cuyos pacientes pueden desarrollar síntomas parkinsonianos (Jankovic y Tan, 2020). En el caso de la EP recesiva, los síntomas se pueden presentar de forma temprana o juvenil. Se identificaron mutaciones en tres genes que podrían estar relacionados con la forma recesiva de la enfermedad, todos relacionados con la homeostasis mitocondrial (*PRKN*, *PINK1* y *DJ-1*) (Kouli *et al.*, 2018).

Si nos centramos en los signos o alteraciones moleculares, en la EP la  $\alpha$ -sin adopta una conformación de lámina- $\beta$  patológica que facilita la unión de monómeros de esta proteína dando lugar a la formación de oligómeros, protofibrillas y fibrillas que, al final, resultarán en los LB (Calabresi *et al.*, 2023). Las proteínas chaperonas son capaces de unirse a los oligómeros de  $\alpha$ -sin reduciendo la toxicidad de estos mediante su degradación por sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) o intentando plegarlas correctamente. No obstante, se ha observado que en la EP el UPS se encuentra alterado, contribuyendo a su patología y a la consecuente acumulación de LB (Maiti *et al.*, 2017). Por otro lado, la vía lisosomal-autofágica juega un papel importante en la degradación de orgánulos dañados y de proteínas mal plegadas que son demasiado grandes para atravesar el proteasoma, como los oligómeros o las fibrillas de  $\alpha$ -sin (Maiti *et al.*, 2017). Sin embargo, esta vía se ve alterada en la EP promoviendo la acumulación de  $\alpha$ -sin en los LB y, consecuentemente, el avance de esta sinucleinopatía (Zeng *et al.*, 2018b) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Localización de nDAs en el mesencéfalo y esquema de la patofisiología de la EP. Las nDAs se localizan en la SNpc junto con las células gliales, que sirven de soporte a estas neuronas. Cuando hay una mutación en el gen *SNCA*, que codifica para la  $\alpha$ -sin, esta proteína se encuentra mal plegada, lo cual desencadena la acción de las chaperonas que intentarán degradar esta proteína mediante la vía UPS (sistema ubiquitina-proteasoma) o se degradará por la vía ALP (vía lisosomal autofágica). No obstante, ambas vías se encuentran modificadas en la EP, dando lugar a la acumulación de esta proteína  $\alpha$ -sin en cuerpos de Lewy (LBs). Elaborado con BioRender.

Por otro lado, en la **Figura 3** se observa que la patogénesis de la EP también está asociada con la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo. Por un lado,  $\alpha$ -sin es una proteína asociada a la mitocondria al igual que ocurre con las proteínas *PINK1*, *LRRK2* y *DJ-1*, cuyas mutaciones producen una deficiencia en el complejo I de la cadena de transporte electrónico. Esto da lugar a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales activan la vía apoptótica intrínseca. Por otro lado, *PRKN* y *PINK1* son proteínas involucradas en la mitofagia o degradación de la mitocondria por autofagia que, cuando se encuentran mutadas dan lugar a la acumulación de mitocondrias dañadas. En ambos casos, el resultado es la apoptosis o muerte celular de las neuronas dando lugar a la neurodegeneración característica de la EP (Bose y Beal, 2016).



**Figura 3.** Alteraciones de las vías apoptóticas provocadas por la disfunción mitocondrial en la EP. Tanto los factores ambientales o neurotoxinas (recuadro verde) como los factores genéticos (recuadro marrón) provocan un estrés oxidativo en la mitocondria. La mayoría de ellos provocan una inhibición del complejo I de la cadena de transporte electrónico provocando una disminución en la producción de ATP. Además, existen otros factores ambientales (6-OHDA y paraquat) que directamente generan un estrés oxidativo. En ambos casos, se llega a una disfunción mitocondrial que resulta en la apoptosis de nDAs. Realizada con BioRender basado en Bose y Beal (2016).

## 1.2. Modelos animales de la enfermedad de Parkinson

Durante décadas se han establecido diversos modelos pre-clínicos, incluyendo modelos animales y celulares, para el estudio de los mecanismos involucrados en la EP (Ke *et al.*, 2021).

Los modelos experimentales de la EP actuales se pueden clasificar en dos grupos principales: tóxicos y genéticos (Blesa *et al.*, 2016).

En primer lugar, los modelos neurotóxicos se basan en la inducción de la degeneración de las nDAs mediante la introducción de toxinas que llevan a la muerte celular (Chia *et al.*, 2020). Se ha descubierto que algunos análogos estructurales de la dopamina, como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y el MPTP, pueden dañar de forma selectiva las nDAs e inducir fenotipos similares a la EP. Además, estudios epidemiológicos han confirmado que la exposición crónica a químicos agrícolas, como el herbicida paraquat y el pesticida rotenona incrementan el riesgo de desarrollar la EP. Esto ha permitido el desarrollo de numerosos modelos de la EP inducidos por estas neurotoxinas que permiten explorar los mecanismos de esta enfermedad (Zeng *et al.*, 2018a).



El modelo MPTP se ha utilizado en el estudio de la neurodegeneración dopaminérgica, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y la neuroinflamación en la EP (Konnova y Swanberg, 2018). El modelo 6-OHDA es un buen candidato para convertirse en un modelo para estudios de terapias de reemplazo celular y factores neuroprotectores (Valadez-Barba *et al.*, 2021). Por último, el modelo de rotenona se ha utilizado para investigar el carácter neuroprotector de la melatonina en ratas, mientras que el de paraquat se podría utilizar para el estudio de las etapas tempranas de la EP ya que este herbicida provoca una neurodegeneración crónica (Chia *et al.*, 2020).

En lo que respecta a los modelos genéticos, desde que Polymeropoulos y sus colaboradores descubrieron en 1997 la primera mutación genética en el gen *SNCA* relacionada con la EP (Polymeropoulos *et al.*, 1997), varios genes se han asociado con esta patología como factores de riesgo (Lopes *et al.*, 2017). Para estudiar estos casos de EP con base genética se puede llevar a cabo la sobreexpresión de  $\alpha$ -sin y *LRRK2*, o el *knock-out/knock-down* de *PRKN*, *PINK1* y *DJ-1* (Chia *et al.*, 2020). Estas mutaciones genéticas se pueden inducir en animales mediante sistemas de edición génica, generando modelos de animales transgénicos o ser inducidas por transfección viral en la SNpc (Konnova y Swanberg, 2018).

Utilizando el modelo de  $\alpha$ -sin, a pesar de no conocerse al completo la función fisiológica de  $\alpha$ -sin, se ha observado que está implicada en el tráfico y reciclaje de las vesículas sinápticas, que contienen los neurotransmisores, en la neurona presináptica (Bridi y Hirth, 2018). Por tanto, estos modelos de ratones transgénicos son útiles a la hora de estudiar la poco conocida función de  $\alpha$ -sin y la relación de la EP con otras sinucleinopatías (Chia *et al.*, 2020), además de suponer una potente herramienta preclínica para investigar posibles estrategias terapéuticas (Raza *et al.*, 2019).

Dentro de la EP autosómica dominante, las mutaciones en el gen *LRRK2* son la causa genética más común de la EP (Valadez-Barba *et al.*, 2021). A pesar de no replicar todas las características identificativas de la EP, estos modelos se utilizan en el estudio de la relación entre las diferentes mutaciones genéticas y los factores ambientales implicados en la EP (Konnova y Swanberg, 2018)

Por último, respecto a la EP autosómica recesiva, las mutaciones en los genes *PRKN*, *PINK1* y *DJ-1* producen una pérdida de función, sin embargo, ninguno de los modelos exhibe la pérdida de células dopaminérgicas ni los síntomas motores (Konnova y Swanberg, 2018).

En cuanto a las especies animales más utilizadas como modelos de estudio de enfermedades humanas, como la EP, se suelen utilizar tres grupos: roedores, primates no humanos (NHP) y especies no mamíferas (Konnova y Swanberg, 2018). Los roedores se utilizan ampliamente en

el campo de la biomedicina debido a su fácil cuidado en el laboratorio y la disponibilidad de ratones transgénicos, además de los protocolos experimentales robustos asociados (Chia *et al.*, 2020). Por otro lado, los NHP han proporcionado ideas cruciales para entender mejor el mecanismo de la EP ya que son parientes cercanos de los humanos, tanto genética como fisiológicamente. Por último, las especies no mamíferas, como *Caenorhabditis (C.) elegans*, *Drosophila melanogaster* y el pez zebra (*Danio rerio*) se han utilizado ya que presentan ciclos de vida cortos, bajos costes de mantenimiento, facilidad en la manipulación genética y, sobre todo, presentan una neuropatología y comportamiento definidos (Chia *et al.*, 2020).

La gran variedad y heterogeneidad de estos modelos animales suponen una gran ventaja, unida a la capacidad de poder estudiar aspectos específicos de la EP en cada uno de ellos (Chia *et al.*, 2020). No obstante, las cuestiones éticas implicadas en el uso de animales de experimentación junto con el fracaso de varios ensayos clínicos recientes dirigidos a enfermedades neurodegenerativas (Fisher y Bannerman, 2019; Slanzi *et al.*, 2020; Vitek *et al.*, 2021), han visibilizado la imperiosa necesidad de encontrar nuevas herramientas para llevar a cabo una mejor investigación de la EP (Cetin *et al.*, 2022). Por lo tanto, el desarrollo de modelos *in vitro* con una mayor relevancia fisiológica puede salvar las brechas entre los actuales modelos animales y los humanos, facilitando el descubrimiento de dianas farmacológicas prometedoras, además de permitir estudiar la etiología y patología de varias enfermedades neurodegenerativas, como la EP (Slanzi *et al.*, 2020).

En comparación con los modelos animales (*in vivo*), los modelos celulares (*in vitro*) permiten realizar los experimentos en cortos periodos de tiempo, es decir, generan la patología de manera rápida. Además, los modelos celulares son, en líneas generales, menos costosos y no presentan tantos problemas éticos como el uso de modelos animales. Por lo tanto, los modelos celulares ofrecen la posibilidad de estudiar vías de señalización y responder a preguntas específicas rápidamente, además de que se pueden considerar herramientas indispensables tanto a la hora de estudiar la patogénesis de la EP como en el descubrimiento y desarrollo de fármacos (Falkenburger *et al.*, 2016).

### **1.3. Modelos celulares bidimensionales**

Los modelos 2D de crecimiento en monocapa fueron los primeros en ser desarrollados con el fin de estudiar los mecanismos celulares y moleculares relacionados con la EP (Valadez-Barba *et al.*, 2021). Los modelos celulares 2D consisten en el cultivo de células en superficies planas y adherentes hechas de plástico o cristal y recubiertas de sustratos para promover la adhesión celular y/o la diferenciación (Centeno *et al.*, 2018). Asimismo, estos modelos ofrecen

un método rápido y simple que también es económico y fácil de manipular, reproducir y analizar los resultados (Louit *et al.*, 2023). Para el estudio de la EP se han seleccionado algunas líneas celulares que presentan una serie de características genéticas y moleculares adecuadas para llevar a cabo estos experimentos. Entre ellas se encuentran las líneas celulares SH-SY5Y, PC12 y LUMHES, las cuales presentan un alto carácter proliferativo, gran reproducibilidad, son fáciles de manipular genéticamente y algunas presentan la maquinaria dopaminérgica, además de proceder de humanos (Ferrari *et al.*, 2020). Dentro de éstas, la línea celular SH-SY5Y procedente de neuroblastoma (cáncer que se forma en células inmaduras del tejido nervioso) y la PC12 de feocromocitoma (tumor de la médula suprarrenal de la glándula adrenal) se han y se siguen utilizando. Además, las células humanas mesencefálicas de Lund (LUHMES) son una línea celular inmortalizada comúnmente utilizada en estos estudios (Falkenburger *et al.*, 2016) (**Tabla 1**).

Por un lado, la línea celular SH-SY5Y es una selección poblacional de la línea SK-N-SH que fue establecida en 1970 mediante una biopsia de médula ósea de un neuroblastoma metastásico procedente de una niña de 4 años (Biedler *et al.*, 1978). Esta línea celular presenta un fenotipo catecolaminérgico ya que tiene la maquinaria necesaria para la síntesis de DA y noradrenalina (NA). Sin embargo, no se puede considerar esta línea celular como completamente dopaminérgica ya que presenta más propiedades catecolaminérgicas, en vez de propiedades únicamente dopaminérgicas. No obstante, esta línea celular se ha utilizado en varias ocasiones para el modelado de la EP (Xicoy *et al.*, 2017).

La línea celular PC12 fue establecida a partir de un feocromocitoma de la médula adrenal de una rata que fue originada en la cresta neural (Greene y Tischler, 1976). Estas células tienen la característica que, cuando están diferenciadas, presentan una gran similitud con las terminaciones nerviosas adrenérgicas (Ke *et al.*, 2021).

Por último, la línea celular LUHMES es un subclon de la línea celular humana mesencefálica MESC2.10 aislada del mesencéfalo ventral de un feto de 8 semanas y que fue inmortalizada introduciendo un gen v-myc controlado por tetraciclina (Lotharius *et al.*, 2002). Esta línea celular presenta marcadores dopaminérgicos y una morfología neuronal típica cuando se diferencian con tetraciclina, adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y GDNF (Ferrari *et al.*, 2020). Además de lo anterior, estas células exhiben actividad eléctrica, secretan DA y expresan  $\alpha$ -sin (Ke *et al.*, 2021). La principal ventaja de esta línea celular es su origen humano no oncogénico, aunque eso hace que presenten un crecimiento más lento (Lopes *et al.*, 2017).

**Tabla 1.** Líneas celulares comúnmente utilizadas en el estudio de la EP con sus ventajas y desventajas

| Línea celular  | Origen                           | Características   | Ventajas   | Desventajas  | Ref.  |
|----------------|----------------------------------|---|--|--|---|
| <b>SH-SY5Y</b> | Neuroblastoma humano             | Propiedades catecolaminérgicas, actividad DA $\beta$ H y TH                                 | Se diferencian a células parecidas a las neuronales con fenotipos colinérgico (acetilcolina), dopaminérgico (DA) y noradrenérgico (NA) | Su origen tumoral puede influir en la diferenciación, crecimiento, viabilidad y estabilidad genómica | Biedler <i>et al.</i> , 1978; Ross y Biedler, 1985; Lopes <i>et al.</i> , 2017; Xicoy <i>et al.</i> , 2017      |
| <b>PC12</b>    | Feocromocitoma de rata           | Similitud con las terminaciones nerviosas adrenérgicas                                      | Fácil manejo y homogeneidad<br>Síntesis, secreción y acumulación de catecolaminas (DA, NA y adrenalina)                                | De origen no humano y derivada de un tumor que puede alterar ciertas vías                            | Smirnova <i>et al.</i> , 2016; Ke <i>et al.</i> , 2021  |
| <b>LUHMES</b>  | Mesencéfalo ventral fetal humano | Morfología neuronal típica, actividad eléctrica y dopaminérgica, expresión de $\alpha$ -sin | Larga supervivencia tras la diferenciación<br>Mayor sensibilidad a toxinas que otras líneas celulares                                  | Baja eficiencia de transfección  | Smirnova <i>et al.</i> , 2016; Tong <i>et al.</i> , 2017; Ferrari <i>et al.</i> , 2020; Ke <i>et al.</i> , 2021 |

Otra serie de estudios sobre la EP utiliza directamente tejido humano como material, es decir, muestras de cerebro *post-mortem*. La disponibilidad de este material es muy limitada y eso hace que los análisis a partir de estas muestras sean muy restringidos (Torrent *et al.*, 2015). Sin embargo, el reciente descubrimiento de la tecnología iPSC, descubierta por Takahashi y Yamanaka en 2006 (Takahashi y Yamanaka, 2006), ha revolucionado el modelado de las enfermedades humanas. Esta metodología permite reprogramar células somáticas diferenciadas de un individuo para obtener células con características pluripotentes comparables a las células troncales embrionarias que dan lugar a todos los tipos celulares de un individuo adulto. Las células obtenidas mediante esta reprogramación se denominan células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) y, a partir de ellas, podemos obtener cualquier tipo celular mediante un proceso de diferenciación dirigida (Ferrari *et al.*, 2020). Debido al papel crucial de las nDAs en la EP, es interesante generar nDAs humanas *in vitro*, lo cual ha sido posible gracias a esta tecnología (Yeap *et al.*, 2023). Por lo tanto, la obtención de estas células *in vitro* nos permite comprender la patogénesis de la EP y avanzar hacia el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y fármacos contra dicha enfermedad (Slanzi *et al.*, 2020).

No obstante, esta tecnología iPSC presenta una serie de limitaciones ya que las neuronas derivadas de iPSCs presentan algunas características embrionarias que difieren de las neuronas

en el cerebro adulto. Además, estas neuronas han crecido fuera de su ambiente natural en el cerebro, es decir, han crecido en placas de cultivo, y el medio de cultivo no suele ser capaz de recapitular la complejidad de los factores a los que están expuestas las células *in vivo*. Por otro lado, cuando se diferencian estas iPSCs en una placa, la mayor parte de ellas pertenecen a poblaciones neuronales, es decir, se obtienen únicamente neuronas. Sin embargo, para que las neuronas funcionen y se comporten de igual manera que en el organismo, estas necesitan de la presencia de células gliales, como astrocitos, oligodendrocitos, microglía y otros subtipos neuronales (Mohamed *et al.*, 2019). A pesar de estas limitaciones, los modelos basados en iPSCs presentan una mayor similitud fenotípica con la EP, nos permiten estudiar los efectos celulares de algunas mutaciones, cuantificar el estrés oxidativo celular y mitocondrial, y analizar fármacos o moléculas con potencial neuroprotector (Valadez-Barba *et al.*, 2021).

Los cultivos celulares bidimensionales (2D) han supuesto el método más usado para la investigación *in vitro* durante mucho tiempo y gracias a ellos se han podido llevar a cabo grandes avances (Cacciamali *et al.*, 2022) relacionados con el estudio de moléculas neuroprotectoras, como la cisteamina (Siddu *et al.*, 2020), o investigar mecanismos neurodegenerativos subyacentes (Fanizza *et al.*, 2022). No obstante, estos modelos 2D no permiten una reproducción de la EP con alto nivel de complejidad ya que los tejidos y órganos están constituidos por diferentes tipos celulares, que interactúan en un ambiente tridimensional (Louit *et al.*, 2023). Además, una de las mayores influencias en el comportamiento celular es la matriz extracelular (ECM), que es una red fibrosa de macromoléculas que rodea a las células (Gattazzo *et al.*, 2014) y son las conexiones célula-ECM las que permiten regular diversos aspectos como la diferenciación, migración, supervivencia o adhesión de las células (Langhans, 2018). Por lo tanto, la falta de las interacciones entre células neuronales y gliales no permiten representar con precisión lo que ocurre en el entorno 3D del cerebro. A esto se le suma el desafío de mantener estos cultivos 2D durante largos periodos de tiempo, dado que en 2D las células tienden a despegarse de la placa (Yeap *et al.*, 2023).

Por todo lo descrito anteriormente, es altamente prioritario desarrollar una nueva metodología capaz de reproducir las condiciones 3D que ocurren en el cerebro de un paciente de la EP, que pueda vencer ciertas limitaciones inherentes a los modelos animales y los modelos celulares 2D.

## **2. Hipótesis y objetivo**

Este Trabajo de Fin de Grado (TFG) parte de la hipótesis de que los modelos 3D permiten el estudio *in vitro* de la EP de forma más precisa y recapitulan mejor los eventos moleculares

que tienen lugar en esta enfermedad, que los cultivos celulares 2D o los modelos animales desarrollados hasta el momento.

El objetivo general de este TFG es dar una visión actualizada y comparativa de los diferentes modelos tridimensionales existentes, teniendo en cuenta las ventajas y limitaciones de éstos frente a otros modelos o estrategias de estudio para el estudio de la EP. Para ello, en primer lugar, se describirá la historia de estos modelos 3D y después se detallarán las estrategias que se utilizan actualmente, destacando el uso de los organoides. Posteriormente, se compararán los modelos animales y celulares 2D con los 3D a la hora de investigar la EP y, finalmente, se describirán los avances que estos modelos 3D han permitido junto con un protocolo para la formación de estos organoides.

### **3. Materiales y métodos**

Para realizar este TFG, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica haciendo uso de la base de datos del NCBI (*'National Center for Biotechnological Information'*), el motor de búsqueda PubMed y la editorial Elsevier. Para poder obtener información lo más actualizada posible se ha filtrado la búsqueda para que los artículos escogidos hayan sido publicados desde el 2015 en adelante y, de esta manera, dar un pequeño margen para poder encontrar una gran variedad de artículos y no restringir la búsqueda.

Por otro lado, se han consultado algunos artículos previos a 2015 ya que se consideran artículos de referencia e importantes en este campo de estudio. Además, a la hora de realizar la búsqueda bibliográfica, se han utilizado las palabras claves en inglés: *'Parkinson's disease'*, *iPSC*, *'three-dimensional models'*, *'organoids'* y *'midbrain organoids'*. Por lo tanto, esto ha permitido una búsqueda específica y relacionada con el tema a tratar en este TFG.

El procesador de texto utilizado ha sido Microsoft Word perteneciente al paquete Office 365 y la aplicación Mendeley se ha utilizado como gestor bibliográfico para el citado de artículos y la elaboración de la bibliografía.

## **4. Modelos celulares tridimensionales**

### **4.1. Origen y progreso de los modelos celulares 3D**

El uso de cultivos celulares tridimensionales como modelos de investigación se remonta al inicio del siglo XX. En 1906, Ross Harrison tomó fragmentos de tubo neural de rana y los depositó en una gota de líquido linfático de rana colocada sobre un cubreobjetos estéril. Una vez que la linfa coaguló, invirtió el cubreobjetos sobre un portaobjetos de vidrio que poseía una depresión, creando así un cultivo en gota colgante (*'hanging drop'*) (Harrison, 1906) (Simian y Bissell, 2017). A mediados de siglo, un conjunto de estrategias experimentales permitió

concluir que algunos tipos celulares, cultivados en suspensión, eran capaces de organizarse y originar agregados que recapitulaban algunas características del tejido de origen (Simian y Bissell, 2017). Este tipo de cultivos generados a partir de células capaces de organizarse en agregados más o menos esféricos, es lo que conocemos como esferoides (Hoarau-Véchet *et al.*, 2018). El cultivo en esferoides es relativamente simple y se puede realizar con o sin matriz extracelular (ECM). En este sentido, a lo largo del siglo anterior, se ha ido comprendiendo la relevancia funcional y estructural de los componentes de la ECM, lo que ha llevado a implementar técnicas y estrategias para incluir algunos componentes de la misma en los cultivos celulares (Sakalem *et al.*, 2021). Así, ha surgido, por ejemplo, el uso de andamios o ‘*scaffolds*’ e hidrogeles, que proporcionan el soporte estructural de los cultivos celulares 3D (Jensen y Teng, 2020), y recapitulan las interacciones célula-ECM (Langhans, 2018). Actualmente, la mayoría de las técnicas de cultivos 3D se clasifican en: sin andamiaje (‘*scaffold-free*’) y basados en andamiaje (‘*scaffold-based*’), además de los cultivos híbridos (Langhans, 2018). Como ya se ha mencionado, la utilización de estos andamios permite imitar el microambiente en el que las células residen naturalmente, proporcionando los requisitos mecánicos, físicos y bioquímicos para el crecimiento y la función celular. No obstante, si el tamaño del esferoide es muy grande pueden aparecer centros hipóxicos y necróticos debido a la pobre difusión de oxígeno y nutrientes (Däster *et al.*, 2016; Loutit *et al.*, 2023).

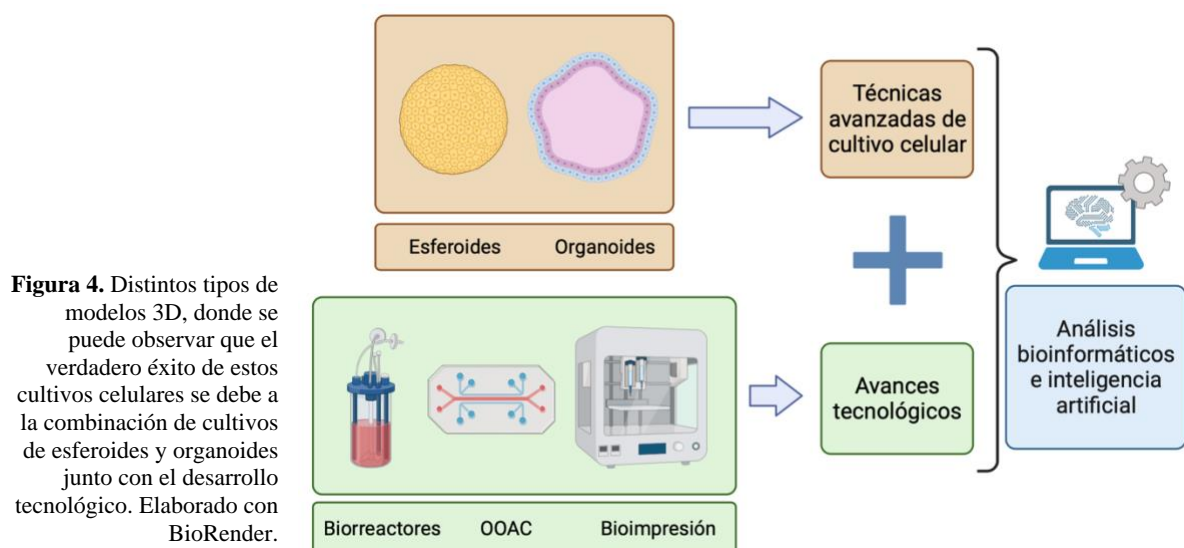
Ya a finales del siglo XX, la comunidad científica se centró en el cultivo de los denominados organoides. A diferencia de los esferoides, los organoides se generan a partir de células progenitoras específicas de tejido o de células troncales, y requieren la adición de ECM y factores de crecimiento para formar ‘*mini-clusters*’ de células que se autoorganizan y diferencian en células funcionales, recapitulando la estructura y función del órgano que se pretende estudiar (Corrò *et al.*, 2020). Hasta el momento, se han utilizado distintos tipos celulares para generar organoides *in vitro* incluyendo células troncales embrionarias (ESCs), células troncales adultas e iPSCs (Chhibber *et al.*, 2020). Los organoides recapitulan, pues, las características estructurales y funcionales de un órgano en concreto y presentan una serie de ventajas sobre el resto de modelos celulares descritos: recapitulan la heterogeneidad y la polarización celular, la estructura tisular, permiten la introducción de modificaciones genéticas y posibilitan las aplicaciones específicas de pacientes. Esto se traduce en un modelo más eficiente tanto en el estudio de enfermedades como en el cribado de fármacos (Silva-Pedrosa *et al.*, 2023). Además, tanto los esferoides como los organoides presentan mejor estabilidad y permiten que las células sean cultivadas durante más tiempo que en su antecesor, los modelos 2D (Antoni *et al.*, 2015). Por lo tanto, los modelos celulares 3D cierran la brecha entre los

cultivos tradicionales 2D en monocapa y los modelos animales, y constituyen una plataforma ideal para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que intervienen en el desarrollo de los distintos órganos y las alteraciones que pueden provocar patologías (Simian y Bissell, 2017) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Diferencias entre los modelos animales, los celulares 2D y los 3D.

|   | Modelos animales | Modelos celulares |           |
|---|------------------|-------------------|-----------|
|   |                  | 2D                | 3D        |
| <b>Recapitulación de la EP</b>                | Media            | Baja              | Alta      |
| <b>Complejidad</b>                            | Alta             | Baja              | Media     |
| <b>Tiempo</b>                                 | Mucho            | Poco              | Medio     |
| <b>Modelado de enfermedad</b>                 | Asequible        | Limitado          | Asequible |
| <b>Screening de fármacos</b>                  | Bajo             | Medio             | Alto      |
| <b>Interacciones célula-célula/célula-ECM</b> | Sí/Sí            | Limitadas/No      | Sí/Sí     |
| <b>Vascularización</b>                        | Presente         | Ausente           | Ausente   |
| <b>Coste</b>                                  | Alto             | Bajo              | Medio     |
| <b>Cuestiones éticas</b>                      | Muchas           | Pocas             | Media     |

Además de los mencionados avances en las técnicas de cultivo celular, la bioingeniería ha hecho una contribución importante en el contexto de los modelos celulares 3D. Así, en la actualidad podemos encontrar modelos que combinan la relevancia funcional de los esferoides y los organoides con la tecnología de biorreactores, órganos-en-un-chip (OOAC) o bioimpresión (Monteduro *et al.*, 2023) (Figura 4).



**Figura 4.** Distintos tipos de modelos 3D, donde se puede observar que el verdadero éxito de estos cultivos celulares se debe a la combinación de cultivos de esferoides y organoides junto con el desarrollo tecnológico. Elaborado con BioRender.



Los biorreactores son dispositivos capaces de transmitir la tecnología 3D aplicada a los cultivos celulares en un sistema de flujo dinámico que permite aplicar diversos estímulos a un sustrato biológico y evaluar sus efectos. A pesar de estar dando resultados interesantes, estos sistemas se encuentran limitados por la falta de directrices en términos de caudal/velocidad de uso y volumen de cultivo. Además, muchos biorreactores no permiten medir parámetros importantes como el oxígeno, pH o temperatura (Cacciamali *et al.*, 2022).

Un órgano-en-un-chip (OOAC) consiste en un modelo artificial en miniatura de un órgano humano en un chip microfluídico (Fang y Eglén, 2017). Estos OOACs ofrecen posibilidades novedosas para recrear modelos funcionales de tejido humano *in vitro* y reproducir la fisiología humana a escala pequeña (Louit *et al.*, 2023). Además, estos biochips permiten sustituir a los modelos animales en varios campos de la biomedicina (Cacciamali *et al.*, 2022).

La bioimpresión 3D se lleva a cabo usando una “biotinta”, que contiene un tipo celular, un biomaterial y una biomolécula que se colocan capa a capa de forma automatizada siguiendo un patrón preestablecido (Zhou *et al.*, 2018). Este modelo permite ajustar el tamaño, la forma y la porosidad del constructo que permanecerá estable y promueve el crecimiento y la comunicación celular (Sensharma *et al.*, 2017). No obstante, la bioimpresión de 3D en células neurales es algo raro debido a la fragilidad de estas células (Knowlton *et al.*, 2018).

Cada una de estas metodologías tendrá que ser evaluada para elegir la estrategia más adecuada para el objetivo del experimento que se quiera llevar a cabo (Jensen y Teng, 2020).

## **4.2. Obtención de organoides cerebrales mesencefálicos**

El modelado de la EP mediante modelos celulares avanzados *in vitro* es una herramienta poderosa para estudiar los mecanismos de la enfermedad y dilucidar aspectos inexplorados de ese trastorno neurodegenerativo. Como ya se ha indicado, los enfoques que utilizan cultivos de neuronas cultivadas en 2D no tienen en cuenta características relevantes como la interacción entre los distintos tipos celulares del cerebro en un microambiente espacialmente organizado (Smits *et al.*, 2019). Los cultivos basados en organoides son una herramienta prometedora para modelar distintos aspectos de las enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de la EP. Los organoides de cerebro son agregados de subtipos celulares neuronales y no neuronales que dan lugar a diferentes regiones cerebrales de manera organizada (Lancaster *et al.*, 2013). A partir de los experimentos iniciales de cultivo en 3D, Lancaster y colaboradores aprovecharon la propiedad de autoorganización intrínseca de las células troncales pluripotentes y las introdujeron en una matriz denominada Matrigel, utilizada inicialmente por Sato *et al.* (2009). Esta matriz induce la polarización estructural y la formación de yemas neuroepiteliales

(Lancaster y Knoblich, 2014; Wang *et al.*, 2018) capaces de adquirir identidades correspondientes a varias regiones cerebrales e incluso de formar cavidades llenas de líquido que se asemejan a los ventrículos cerebrales. Para mejorar el suministro de nutrientes y el intercambio de oxígeno, los organoides cerebrales se pueden cultivar en biorreactores permitiendo que los organoides alcancen tamaños de varios milímetros de diámetro (Lancaster y Knoblich, 2014; Kelava y Lancaster, 2016). Asimismo, su composición puede representar regiones específicas del cerebro, como el mesencéfalo, dando lugar a organoides de mesencéfalo (MOs) (Chlebanowska *et al.*, 2020).

Para obtener organoides con características propias del mesencéfalo se requiere, además del cultivo 3D, la modificación de una serie de vías de señalización siguiendo un patrón temporal específico que resumiremos en el punto 4.3. Estos organoides están compuestos por nDAs del mesencéfalo (mDAs), que producen y secretan dopamina proporcionando un método sólido para investigar mecanismos patogénicos relevantes en la EP, estudiar el desarrollo y avance de la enfermedad y evaluar la eficacia de nuevos fármacos (Chlebanowska *et al.*, 2020).

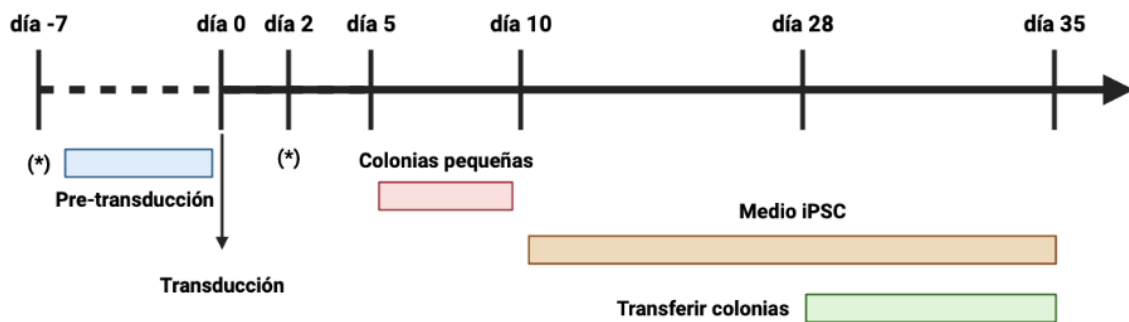
Gracias al descubrimiento de los factores de Yamanaka (OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) (Takahashi y Yamanaka, 2006), ahora es posible obtener iPSCs a partir de pacientes de EP y utilizarlas para originar organoides mesencefálicos (Yap *et al.*, 2015), que constituyen una herramienta genética inigualable para el estudio de la patogénesis de la EP a nivel molecular. En este sentido, la utilización de iPSCs solventa los problemas éticos que acarrear las anteriormente usadas células embrionarias (Mohamed *et al.*, 2019) y minimiza el uso de los modelos animales de los que se hablaba anteriormente, evitando así los conflictos éticos sobre el bienestar animal, además de que permiten omitir la extracción de biopsias cerebrales, que pueden ser demasiado invasivas (Yeap *et al.*, 2023).

### **4.3. Organoides mesencefálicos en el estudio de la EP**

En este apartado se resumen los pasos más importantes del proceso de formación de organoides mesencefálicos a partir de células iPSCs derivadas de pacientes con EP.

El primer paso es el establecimiento de la línea de iPSCs humanas (hiPSCs) y para ello, Chlebanowska *et al.* (2020) extrajeron células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) de voluntarios sanos y pacientes de Parkinson. Para llevar a cabo la reprogramación de las PBMCs se utilizó el vector viral Sendai (SeV) y, después, estas células se transfirieron a una placa con fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), que actuarán como *'feeders'*. Como se puede ver en la **Figura 5**, entre los días 5 y 10 tras la transducción, se pueden observar las primeras colonias de hiPSCs y, finalmente, alrededor del día 28, las colonias de iPSCs están

listas para ser transferidas. Una vez se ha establecido la línea celular, ésta ha de ser caracterizada. Para ello se comprueba que las iPSCs generadas presentan actividad fosfatasa alcalina y marcadores de pluripotencia, como NANOG y OCT, y la telomerasa (TERT). Además, eran capaces de formar teratomas *in vivo* y en dichos tumores era posible distinguir las tres capas germinales (Chlebanowska *et al.*, 2020).



**Figura 5.** Cronograma para la reprogramación de iPSCs a partir de PBMC. (\*) = Cultivar células en placas. Elaboración propia realizada con BioRender.com y basada en Chlebanowska *et al.*, (2020).

Una vez caracterizadas las células troncales, estas se utilizarán como fuente para la obtención de nDAs de la SNpc, siguiendo protocolos que modulan las vías de señalización implicadas en desarrollo embrionario de esta región cerebral como son Sonic Hedgehog (SHH), ácido retinoico (RA), Noggin y el factor de crecimiento de fibroblasto 8 (FGF8). *In vivo*, las nDAs de la SNpc se desarrollan tras un complejo periodo de regionalización y especificación de progenitores durante el desarrollo embrionario y la formación del tubo neural. La medialínea ventral de este tubo neural se considera la *floor plate* a partir de la cual se generan todos los tipos de nDAs. En este trabajo nos centraremos en el protocolo descrito por Yeap *et al.* (2023) para la obtención de nDAs, (**Figura 6**), aunque existen multitud de protocolos con ligeras variantes que vamos a mencionar en algunos casos. En términos generales, podemos distinguir principalmente tres pasos:

### 1. Especificación de la placa de suelo mesencefálica

El primer paso es generar agregados celulares de células troncales denominados cuerpos embrioides (EBs), que se verán sometidos a un tratamiento con factores inhibidores de la vía SMAD (Noggin) y activadores de la vía Wnt (CHIR99201), para así promover la diferenciación neuroectodérmica. Esto se lleva a cabo porque la inhibición de la vía SMAD permite el desarrollo neural en embriones en etapas tempranas (Thompson y Chan, 2016), mientras que la activación de la vía Wnt a través del inhibidor de la glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK3) CHIR99201 es importante en la inducción del linaje de células de la cresta neural (Law y Zheng, 2022). Posteriormente, estos EBs se diferencian hacia un destino mesencefálico a través de la

adición de factores como SHH y FGF8 (Jo *et al.*, 2016). FGF8, por sí mismo, es necesario y suficiente para la formación del organizador ístmico (IsO), que define la frontera mesencéfalo-rombencéfalo (MHB). Este IsO, a su vez, es un centro señalizador que produce FGF8, estableciendo así un gradiente en el que las células próximas, sometidas a mayor concentración de FGF8, adquieren un destino rombencefálico, mientras que las más distales se diferenciarán hacia mesencéfalo. Por otro lado, SHH se une e inactiva a la proteína Patched, liberando y promoviendo así la acumulación de la proteína Smoothed, que dará lugar a la traslocación de Gli1 y Gli2 al núcleo. Esto provocará la expresión de factores de transcripción como FOXA2, que es crucial en el desarrollo del mesencéfalo ventral donde se diferencian las nDAs mesencefálicas (mDAs) (Yeap *et al.*, 2023).

## 2. Neurogénesis de mDAs

En el día 7, los organoides empiezan a expresar marcadores de progenitores de mDAs, como FOXA2, OTX2, CORIN y LMX1A, entre otros (Jo *et al.*, 2016). A su vez, a estos esferoides se les añade Matrigel para promover su crecimiento y organización tridimensional, y se transfieren a una placa de cultivo con medio suplementado con factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico de las células derivadas de la línea glial (GDNF) y ácido ascórbico (AcA) (Kim *et al.*, 2019), además de cAMP y un inhibidor de la vía Notch (DAPT) (Sozzi *et al.*, 2022). Además, Kim *et al.* (2019) para lograr un ambiente similar al de un cerebro envejecido, mantienen estos factores neurotróficos hasta 60 días sin presencia de antioxidantes.

Por otro lado, el factor de transcripción WNT1 tiene un papel esencial en la especificación, diferenciación y mantenimiento de los progenitores de mDAs ya que este activa la vía OTX2-WNT1-LMX1A/MSX1 asegurando así el destino celular de las mDAs. Al igual que WNT1, OTX2 y LMX1A también están involucrados en la determinación del destino de las mDAs (Yeap *et al.*, 2023). Por un lado, LMX1A induce la expresión de MSX1 que, a su vez, activan los factores NGN2 y MASH1, encargados de la neurogénesis de mDAs (Hulme *et al.*, 2022). A pesar de que estos dos factores son críticos en la neurogénesis de mDAs, no permiten la diferenciación a mDAs que expresan TH, enzima necesaria para la producción de dopamina. Por otro lado, LMX1A controla la especificación de las mDAs al cooperar con FOXA2, ya que este factor induce la diferenciación de nDAs en la SNpc y otros tipos celulares, pero es LMX1A quien selecciona las nDAs reprimiendo a las otras células (Yeap *et al.*, 2023).

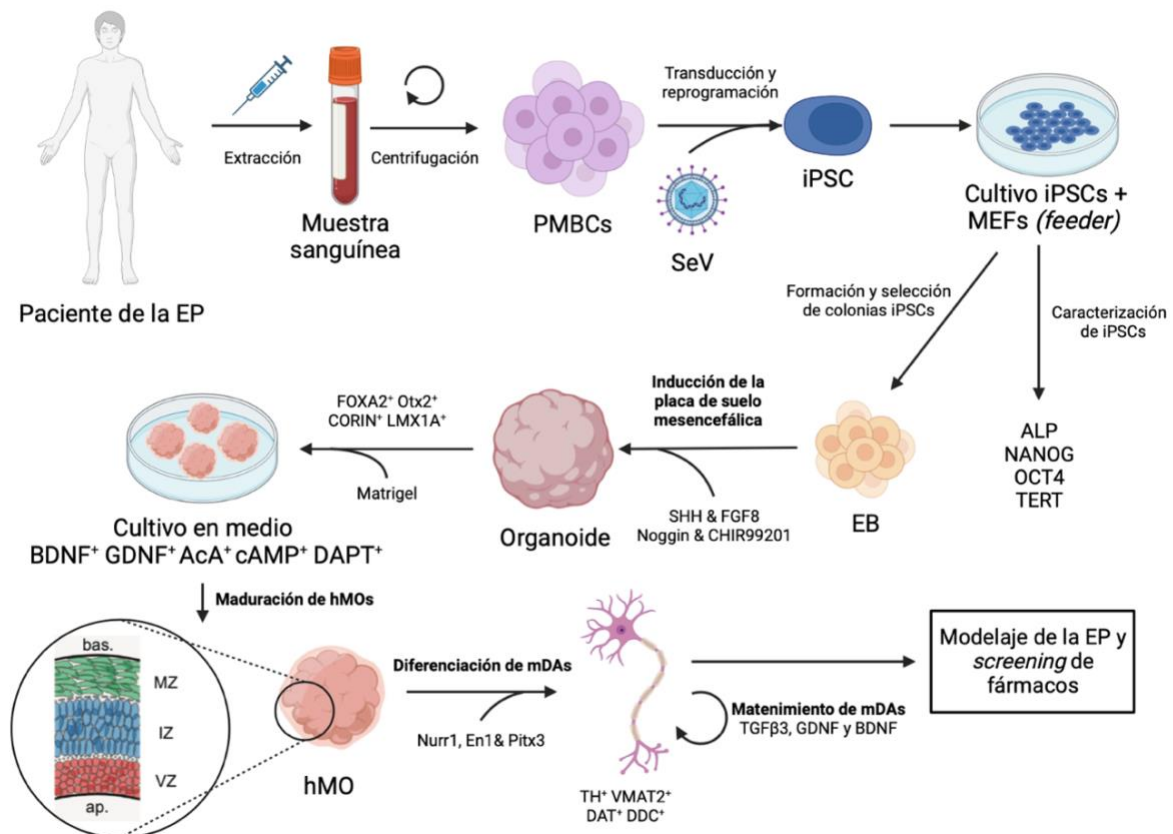
Después de 35 días de cultivo, estos MOs humanos (hMOs) presentaban tres capas: la zona proliferativa ventral (VZ), donde se encuentran los progenitores neurales; la zona intermedia

(IZ), en donde residen las mDAs inmaduras, y la zona del manto (MZ), en la que las mDAs expresan genes asociados con la biosíntesis dopaminérgica (Jo *et al.*, 2016).

### 3. Maduración y supervivencia de mDAs

Para llevar a cabo la diferenciación de las células neurales a mDAs es necesaria la inducción de *NURR1*, *EN1* y *PITX3* (Yeap *et al.*, 2023). Por un lado, *NURR1* es una proteína que se expresa en los progenitores de mDAs post-mitóticos (Chlebanowska *et al.*, 2020) y que es esencial para la expresión de TH, además de regular la expresión de marcadores específicos de mDAs, como el transportador vesicular de neurotransmisores (VMAT2), el transportador de dopamina (DAT) y la dopamina descarboxilasa (DDC). *EN1* presenta gran relevancia en la diferenciación de mDAs, además de participar en la formación y mantenimiento de la MHB. Por último, *PITX3* es esencial en el desarrollo y supervivencia en la SNpc de las nDAs A9-específicas. *PITX3* induce la expresión de marcadores de mDAs como VMAT2, DAT o la aldehído deshidrogenasa, que incrementa la expresión de TH y receptores de dopamina a través de una vía dependiente de RA (Yeap *et al.*, 2023). Finalmente, tras la diferenciación de las mDAs, la supervivencia y mantenimiento de estas se lleva a cabo gracias a factores neurotróficos, como el factor de crecimiento transformante (TGFβ3), GDNF y BDNF (Yeap *et al.*, 2023).

La prueba de concepto de este protocolo la encontramos por ejemplo en el estudio liderado por Kim *et al.* (2019) en el que se generaron MOs derivados de hiPSCs isogénicas que contenían la mutación G2019S en el gen *LRRK2*. Este estudio demostró la expresión de diversos marcadores de nDAs como VMAT2, TH, *NURR1* y *DAT*, junto con otros marcadores mesencefálicos sugiriendo que estos organoides, desde el día 45, se asemejan al mesencéfalo dopaminérgico maduro. Por lo tanto, este modelo 3D se puede utilizar para realizar un estudio más preciso de la EP inducida por *LRRK2*, ya que estos organoides consiguieron recapitular diversos fenotipos característicos de la EP. Los resultados de este estudio y otros similares indica que los MOs son capaces de recrear la patología de la EP de manera más completa que los modelos animales y los tradicionales modelos 2D. Por lo tanto, los organoides 3D presentan un modelo alternativo para el estudio de la patología y el análisis de fármacos en enfermedades neurológicas (Kim *et al.*, 2019).



**Figura 6.** Metodología para la reprogramación de iPSCs a partir de PMBCs y posterior formación de hMOs para el estudio de la EP. A partir de una muestra sanguínea de un paciente de la EP, se pueden obtener las PMBCs tras una centrifugación. Después, siguiendo el protocolo de Chlebanowska *et al.*, (2020) y mediante la transducción del vector viral Sendai, se consigue la reprogramación de estas PMBCs a iPSCs. Tras obtener las iPSCs es necesario cultivarlas con fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), que actuarán como ‘feeder’ para que las colonias de iPSCs crezcan. Finalmente, se caracterizan midiendo la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y de la telomerasa (TERT), junto con los marcadores de pluripotencia (NANOG y OCT4). Por otro lado, las iPSCs formarán cuerpos embrioides (EBs) que se verán sometidos a un tratamiento con SHH, FGF8, Noggin y CHIR99201, promoviendo así el desarrollo neuroectodermal. Posteriormente, estos organoides que expresan marcadores como FOXA2, OTX2, CORIN y LMX1A, se cultivan en un medio con factores neurotróficos (BDNF y GDNF) para inducir la maduración de estos hMOs. Esto provocará la diferenciación de tres capas en el hMO: MZ, IZ y VZ. Finalmente, para la diferenciación de las células neuronales del hMO a nDAs es necesario la adición de los factores NURR1, EN1 y PITX3, lo cual provocará la diferenciación a neuronas que expresan proteínas como TH, VMAT2, DAT y DDC. Para el mantenimiento de estas, las nDAs requieren de TGFβ3, GDNF y BDNF. Esto permitirá su supervivencia en el organoide y poder llevar a cabo el modelado de la EP y realizar evaluaciones de fármacos. Elaboración propia realizada con BioRender.com y basada en Yeap *et al.* (2023).

## 5. Estrategias terapéuticas utilizadas en la enfermedad de Parkinson

A lo largo de cinco décadas, la combinación de levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina) con el inhibidor de la enzima aminoácido aromático descarboxilasa, carbidopa, ha sido el mejor tratamiento disponible para la EP (Witt y Fahn, 2016). A pesar de que actualmente no exista otra terapia neuroprotectora disponible para el tratamiento de la EP, se han conseguido algunos avances significantes, aún en fase experimental (Rai y Singh, 2020).

Gracias a los modelos 3D, en específico a los organoides simplificados de cerebro (simBOs), se descubrió que el tratamiento con el inhibidor de LRRK2, PFE-360, aliviaba el fenotipo de la EP. Los simBOs están compuestos por neuronas maduras y células gliales, se

generan en poco tiempo y presentan unas características más homogéneas que los organoides convencionales (Ha *et al.*, 2020).

### **5.1. Estrategias terapéuticas convencionales**

Actualmente, para combatir la EP existen terapias quirúrgicas, como la estimulación cerebral profunda (DBS), que es una terapia reversible capaz de reducir los temblores, la rigidez y la bradiquinesia mediante el envío de pulsos eléctricos a determinadas zonas del cerebro (Emamzadeh y Surguchov, 2018).

Por otro lado, el pilar de las terapias farmacológicas actuales se basa en el uso de fármacos dopaminérgicos que ayudan a restaurar la concentración de dopamina. De esta manera, se mejoran las funciones motoras, aunque estos fármacos no son capaces de lidiar con las manifestaciones no motoras de la EP. Entre estos se encuentran la levodopa, receptores agonistas de dopamina, inhibidores de MAO-B, inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa, anticolinérgicos y amantadina. Estos medicamentos tratan de aliviar los síntomas motores de la EP ya que, actualmente, no existe cura (Liu y Cheung, 2020). No obstante, algunos síntomas de la EP no responden a estos fármacos, por lo que se promovió la investigación de una perspectiva multidisciplinaria no farmacológica, de modo que cada vez hay más evidencias de que la fisioterapia, la terapia ocupacional, la logopedia, el ejercicio y la nutrición pueden aliviar algunos de los síntomas de la EP y mejorar la vida de los pacientes (Kalia y Lang, 2015; Bloem *et al.*, 2021).

### **5.2. Nuevas estrategias terapéuticas**

Los fármacos mencionados anteriormente permiten controlar los síntomas de la EP, pero ninguno altera el curso de la enfermedad ralentizando o, incluso, deteniendo la neurodegeneración (Stoddard-Bennett y Pera, 2019). Por ello, se están desarrollando otros enfoques para hacer frente a la EP, como nuevos compuestos experimentales o el reposicionamiento de fármacos (Zahoor *et al.*, 2018). Por otro lado, el trasplante de células dopaminérgicas derivadas de células troncales, que consiste en reemplazar las neuronas afectadas por unas generadas a partir de células pluripotentes, ha demostrado que ayuda a aliviar y mejorar los síntomas motores y no motores de la EP (Zeng y Qin, 2022). Estas células pluripotentes se han utilizado en diversos ensayos relacionados con daño neural (Stoddard-Bennett y Pera, 2019), ocurriendo el primer ensayo clínico con ESCs humanas (hESCs) en 2010 (Lebkowski, 2011). A partir de este suceso, estas ESCs se han utilizado en ensayos preclínicos y clínicos como terapia en trastornos neurales (Stoddard-Bennett y Pera, 2019).

No obstante, tanto el trasplante de tejido fetal humano de mesencéfalo ventral como las hESCs conllevan unas implicaciones éticas, además de una limitación de la disponibilidad de tejidos y requiere una fuerte inmunosupresión. Por lo tanto, las nDAs derivadas de iPSCs se posicionan como una estrategia prometedora frente a la EP, ya que estas iPSCs presentan ciertas ventajas frente a los métodos anteriormente mencionados (Stoddard-Bennett y Pera, 2019).

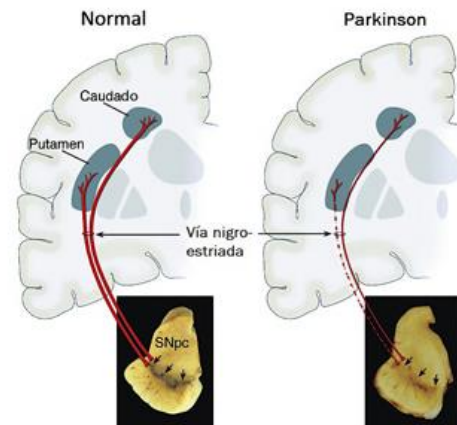
El primer ensayo clínico de trasplante de nDAs generadas a partir de iPSCs para tratar la EP comenzó el 1 de agosto de 2018 por un grupo en el Hospital Universitario de Kioto encabezado por Takahashi. Se escogieron pacientes en una etapa intermedia de la EP para que las células injertadas secreten dopamina y estimular así las neuronas estriadas en el cerebro implicadas en la vía nigroestriada de la dopamina (**Figura 7**).

Este grupo utilizó PBMCs procedentes de individuos sanos y que presentasen homocigosidad en el antígeno de leucocitos humano (HLA) para así evitar la interferencia genética entre pacientes (Takahashi y Price-Evans, 2019). El protocolo escogido por Takahashi y su grupo para la

diferenciación de las PMBCs fue el descrito por Doi *et al.* (2014), en el que se inhiben las señales de la proteína morfogenética ósea (BMP) y activina para diferenciar las iPSCs a células neurales y, más tarde, éstas se especifican a la identidad de mesencéfalo ventral añadiendo Wnt y SHH (Doi *et al.*, 2014). Además, se seleccionaron aquellas células progenitoras dopaminérgicas que expresaban el marcador de superficie celular CORIN<sup>+</sup>. De esta manera, se reduce el riesgo de tumorigénesis y también se eliminan las células inmaduras que podrían proliferar en el cerebro (Takahashi y Price-Evans, 2019). Finalmente, 5 millones de estas células fueron administradas en la SNpc a través de dos agujeros perforados en el cráneo (Normile, 2018).

## 6. Ensayos clínicos en proceso

Los tratamientos actuales para la EP se centran en el alivio de los síntomas a través de la restauración de la actividad dopaminérgica pero no indagan en la neurodegeneración progresiva (Liu y Cheung, 2020). El modelado de la EP utilizando modelos 3D tendrá una gran importancia



**Figura 7.** Esquema de la vía nigroestriada en un cerebro sano (izquierda) y en uno que padece la EP (derecha). En la EP, la vía nigroestriada se encuentra afectada debido a la pérdida de nDAs en la SNpc, lo cual también conlleva la despigmentación de esta región por la ausencia de neuromielina presente en las nDAs (Dauer y Przedborski, 2003).



para el esclarecimiento de rutas neuronales y la identificación de dianas terapéuticas, además de nuevos modelos para el análisis de futuros fármacos (Marotta *et al.*, 2020).

Actualmente se encuentran 2 estudios clínicos registrados en la plataforma ClinicalTrials.gov para investigar la EP haciendo uso de la tecnología iPSC. Por un lado, el Centro Clínico de los Institutos Nacionales de Salud (CC) y el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre, registrados en ClinicalTrials.gov con el identificador NCT01143454, tiene como objetivo caracterizar la etiología e historia de enfermedades raras y poco comunes, como la EP, cuyos síntomas están asociados al riesgo de disfunción cardiovascular (Characterization of Patients With Uncommon Presentations and/or Uncommon Diseases Associated With the Cardiovascular System - ClinicalTrials.gov, sin fecha). Por otro lado, la Organización Médica Hadassah, con identificador de ClinicalTrials.gov NCT00874783, se ha propuesto desarrollar hiPSCs a partir de cultivos celulares de biopsias de piel o de pelo de pacientes que serán utilizadas para el modelado de enfermedades neurodegenerativas como la EP, además de probar fármacos, la investigación básica y el desarrollo de tecnologías que permitan utilizar estas hiPSCs para futuras terapias de trasplante (Development of iPS From Donated Somatic Cells of Patients With Neurological Diseases - ClinicalTrials.gov, sin fecha).

## **7. Discusión**

Como se ha comentado anteriormente, los modelos 3D suponen una herramienta importante en el futuro de la investigación de enfermedades neurodegenerativas, como la EP, debido a su carácter tridimensional que permite tener en cuenta ciertas interacciones célula-célula y célula-ECM aproximándose más a las condiciones naturales de la enfermedad y permitiendo así estudiar con más precisión la patofisiología de la EP.

Sin embargo, para explotar todo el potencial de los organoides, se deben abordar algunas limitaciones que estos presentan. Entre estas se encuentra el alto coste que supone generar y mantener estos organoides, ya que requieren de ciertos factores y condiciones que incrementan los gastos.

Dejando de lado el aspecto económico, estos MOs presentan una alta variabilidad entre tandas debido a los protocolos utilizados, que pueden afectar a la reproducibilidad de estos modelos 3D. Esta variabilidad se puede deber a la heterogeneidad en el fondo genético de las hiPSCs, variaciones en el cultivo y los protocolos de diferenciación de hiPSCs y/o variabilidad entre lotes. Diversos estudios han demostrado que esta variabilidad se podría reducir utilizando citoquinas que guíen y restrinjan la diferenciación de los organoides hacia un destino específico (Galet *et al.*, 2020). Nickels *et al.* (2020) demostraron que el refinamiento de los protocolos de

hMOs podían reducir significativamente la variabilidad de la línea celular y de lotes (Nickels *et al.*, 2020). Además, puede ocurrir que no sean tan eficientes como se espera dando lugar a estructuras con una distribución irregular de las nDAs en el organoide no representando, de esta manera, al mesencéfalo (McComish *et al.*, 2022).

Las limitaciones que más afectan a estos modelos 3D son la falta de vascularización y la ausencia de otros tipos celulares presentes en el mesencéfalo (McComish *et al.*, 2022). El sistema nervioso central y el desempeño del circuito neural son altamente dependientes de un suministro adecuado de sangre, el cual se ve regulado por el sistema neurovascular (Ahmad *et al.*, 2020). Por lo tanto, al no tener vasos sanguíneos, las células de estos organoides se ven privadas tanto de oxígeno como de nutrientes principalmente en el centro, formándose así un núcleo necrótico (Galet *et al.*, 2020) y limitando procesos de neurogénesis, proliferación, diferenciación y apoptosis resultando en una pobre recapitulación de la EP. Para intentar solucionar la falta de vascularización, dos posibles estrategias se han desarrollado (Ma *et al.*, 2022). La primera consiste en el co-cultivo de esferoides neuronales con vasos sanguíneos perfundibles (Shin *et al.*, 2022), mientras que la segunda trata de generar organoides de vasos sanguíneos y de cerebro por separado para luego co-cultivar ambos organoides (Sun *et al.*, 2022). Por otro lado, la ausencia de la microglía, un tipo celular clave en el desarrollo cerebral supone una gran limitación en el modelado de enfermedades neurodegenerativas como la EP (Ma *et al.*, 2022). Sin embargo, el año pasado se desarrolló un protocolo innovador en el que se generaban organoides corticales humanos que contenían microglía (mhCOs) a través de la expresión del factor de transcripción específico mieloide PU.1 sin la necesidad del co-cultivo, como se había intentado en anteriores protocolos (Cakir *et al.*, 2022).

Otro de los desafíos a los que se enfrentan estos cultivos 3D es el envejecimiento *in vitro* ya que la mayoría de organoides de cerebro representan un desarrollo cerebral embrionario, a diferencia de las enfermedades neurodegenerativas que se manifiestan mucho más tarde (Ma *et al.*, 2022), por lo que, a la hora de reprogramar estas células a un estado parecido al embrionario, las características de senescencia neuronal han de reproducirse en el modelo *in vitro* también (Valadez-Barba *et al.*, 2021), lo cual puede suponer un obstáculo a tener en cuenta a la hora de estudiar la EP *in vitro* (Galet *et al.*, 2020). No obstante, para esquivarlo y poder reproducir fenotipos de envejecimiento en placas, estrategias como la inhibición de la telomerasa alterando así la longitud de los telómeros han demostrado la expresión de marcadores de daño genético ( $\gamma$ H2AX) y de estrés oxidativo en cultivos 2D de mDAs derivadas de iPSCs (Vera *et al.*, 2016).

Por otra parte, respecto a futuras terapias involucrando el uso de hiPSCs, es importante investigar nuevas maneras de introducir estas células ya que actualmente es necesario perforar

el cráneo e inyectar estas células directamente en el cerebro, lo cual supone una metodología altamente invasiva y que requiere de un alto nivel de habilidad, junto con los riesgos que puede conllevar esta intervención quirúrgica. Por lo tanto, es necesario seguir investigando metodologías menos invasivas, además de refinar los protocolos de generación de organoides para intentar de esta manera reducir los costes y los tiempos de producción.

A pesar de las limitaciones mencionadas anteriormente, estos modelos 3D, en específico los organoides, permiten recapitular las condiciones que tienen lugar en los cerebros de pacientes de la EP con mayor similitud a lo que ocurre *in vivo*, lo cual permite estudiar los mecanismos y vías involucradas en esta enfermedad neurodegenerativa de forma más precisa para así descubrir nuevos aspectos patofisiológicos y dianas terapéuticas de la EP con el fin de desarrollar fármacos o terapias novedosas que sean capaces de acercar a la comunidad científica hacia una cura para la EP.

## 8. Conclusiones

**Primera.** Los modelos celulares 3D han supuesto un gran e innovador avance en la investigación de la EP puesto que permiten obtener una versión más realista y precisa de lo que ocurre en el cerebro de pacientes de la EP.

**Segunda.** Los modelos animales son todavía necesarios en la investigación de la EP, ya que suponen un ambiente *in vivo* que posibilita una imagen más global y aproximada de lo que puede ocurrir en un paciente de la EP.

**Tercera.** El estudio en profundidad de la EP y el descubrimiento de nuevas estrategias para el tratamiento y, potencialmente, para la cura de la enfermedad, requiere la combinación de diferentes modelos experimentales incluyendo modelos *in vivo* y modelos *in vitro* 2D y 3D.

## 9. Referencias bibliográficas

- Ahmad, A., Patel, V., Xiao, J. y Khan, M. M. (2020) "The Role of Neurovascular System in Neurodegenerative Diseases", *Molecular Neurobiology*, 57(11), pp. 4373-4393. doi:10.1007/S12035-020-02023-Z.
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. y Noel, G. (2015) "Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo", *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), pp. 5517-5527. doi:10.3390/IJMS16035517.
- Armstrong, M. J. y Okun, M. S. (2020) "Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review", *JAMA*, 323(6), pp. 548-560. doi:10.1001/JAMA.2019.22360.
- Balestrino, R. y Schapira, A. H. V. (2020) "Parkinson disease", *European journal of neurology*, 27(1), pp. 27-42. doi:10.1111/ENE.14108.
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. y Freedman, L. S. (1978) "Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones.", *Cancer research*, 38(11 Pt 1), pp. 3751-7.
- Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., Rey, N. L. del, Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A. y Rey, N. L. del (2016) "Animal Models of Parkinson's Disease", *Challenges in Parkinson's Disease*. doi:10.5772/63328.
- Bose, A. y Beal, M. F. (2016) "Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease", *Journal of Neurochemistry*, 139, pp. 216-231. doi:10.1111/JNC.13731.
- Bridi, J. C. y Hirth, F. (2018) "Mechanisms of  $\alpha$ -Synuclein Induced Synaptopathy in Parkinson's Disease", *Frontiers in neuroscience*. doi:10.3389/FNINS.2018.00080.
- Cacciamali, A., Villa, R. y Dotti, S. (2022) "3D Cell Cultures: Evolution of an Ancient Tool for New Applications", *Frontiers in Physiology*, 13, p. 1346. doi:10.3389/FPHYS.2022.836480/BIBTEX.
- Cakir, B., Tanaka, Y., Kiral, F. R., Xiang, Y., Dagliyan, O., Wang, J., Lee, M., Greaney, A. M., Yang, W. S., duBoulay, C., Kural, M. H., Patterson, B., Zhong, M., Kim, J., Bai, Y., Min, W., Niklason, L. E., Patra, P. y Park, I.-H. (2022) "Expression of the transcription factor PU.1 induces the generation of microglia-like cells in human cortical organoids", *Nature Communications*, 13(1), p. 430. doi:10.1038/s41467-022-28043-y.
- Calabresi, P., Mechelli, A., Natale, G., Volpicelli-Daley, L., Di Lazzaro, G. y Ghiglieri, V. (2023) "Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction", *Cell Death & Disease*, 14(3), pp. 1-16. doi:10.1038/s41419-023-05672-9.
- Cerri, S., Mus, L. y Blandini, F. (2019) "Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference?", *Journal of Parkinson's Disease*, 9(3), p. 501. doi:10.3233/JPD-191683.
- Cetin, S., Knez, D., Gobec, S., Kos, J. y Pišlar, A. (2022) "Cell models for Alzheimer's and Parkinson's disease: At the interface of biology and drug discovery", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, p. 112924. doi:10.1016/J.BIOPHA.2022.112924.
- *Characterization of Patients With Uncommon Presentations and/or Uncommon Diseases Associated With the Cardiovascular System - Full Text View - ClinicalTrials.gov* (sin fecha). Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01143454?term=iPSC&cond=Parkinson+Disease&draw=2&rank=3> (Accedido: 21 de junio de 2023).
- Chhibber, T., Bagchi, S., Lahooti, B., Verma, A., Al-Ahmad, A., Paul, M. K., Pendyala, G. y Jayant, R. D. (2020) "CNS organoids: an innovative tool for neurological disease modeling and drug neurotoxicity screening", *Drug discovery today*, 25(2), pp. 456-465. doi:10.1016/J.DRUDIS.2019.11.010.
- Chia, S. J., Tan, E. K. y Chao, Y. X. (2020) "Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease", *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21(7), p. 2464. doi:10.3390/IJMS21072464.
- Chlebanowska, P., Tejchman, A., Sułkowski, M., Skrzypek, K. y Majka, M. (2020) "Use of 3D Organoids as a Model to Study Idiopathic Form of Parkinson's Disease", *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), p. 694. doi:10.3390/IJMS21030694.
- *Consulta Interactiva del SNS* (2023). Disponible en: <https://pestadistico.inteligenciadegestion.sanidad.gob.es/publicoSNS/C/base-de-datos-de-clinicos-de-atencion-primaria-bdcap/problemas-de-salud> (Accedido: 10 de junio de 2023).
- Corrò, C., Novellademunt, L. y Li, V. S. W. (2020) "A brief history of organoids", *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 319(1), pp. C151-C165. doi:10.1152/AJPCELL.00120.2020.
- Däster, S., Amatruda, N., Calabrese, D., Ivanek, R., Turrini, E., Droeser, R. A., Zajac, P., Fimognari, C., Spagnoli, G. C., Iezzi, G., Mele, V., Muraro, M. G., Däster, S., Amatruda, N., Calabrese, D., Ivanek, R., Turrini, E., Droeser, R. A., Zajac, P., Fimognari, C., Spagnoli, G. C., Iezzi, G., Mele, V. y Muraro, M. G. (2016) "Induction of hypoxia and necrosis in multicellular tumor spheroids is associated with resistance to chemotherapy treatment", *Oncotarget*, 8(1), pp. 1725-1736. doi:10.18632/ONCOTARGET.13857.
- Dauer, W. y Przedborski, S. (2003) "Parkinson's disease: mechanisms and models", *Neuron*, 39(6), pp. 889-909. doi:10.1016/S0896-6273(03)00568-3.

- Deng, H., Wang, P. y Jankovic, J. (2018) "The genetics of Parkinson disease", *Ageing Research Reviews*, 42, pp. 72-85. doi:10.1016/j.arr.2017.12.007.
- *Development of iPSC From Donated Somatic Cells of Patients With Neurological Diseases - Full Text View - ClinicalTrials.gov* (sin fecha). Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00874783?term=iPSC&cond=Parkinson+Disease&draw=2&rank=2> (Accedido: 21 de junio de 2023).
- Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., Sekiguchi, K., Nakagawa, M., Parmar, M. y Takahashi, J. (2014) "Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation", *Stem cell reports*, 2(3), pp. 337-350. doi:10.1016/J.STEMCR.2014.01.013.
- Emamzadeh, F. N. y Surguchov, A. (2018) "Parkinson's disease: Biomarkers, treatment, and risk factors", *Frontiers in Neuroscience*, 12(AUG), p. 612. doi:10.3389/FNINS.2018.00612/BIBTEX.
- Falkenburger, B. H., Saridaki, T. y Dinter, E. (2016) "Cellular models for Parkinson's disease", *Journal of Neurochemistry*, pp. 121-130. doi:10.1111/JNC.13618.
- Fang, Y. y Eglén, R. M. (2017) "Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development", *Slas Discovery*, 22(5), p. 456. doi:10.1177/1087057117696795.
- Fanizza, F., Campanile, M., Forloni, G., Giordano, C. y Albani, D. (2022) "Induced pluripotent stem cell-based organ-on-a-chip as personalized drug screening tools: A focus on neurodegenerative disorders", *Journal of Tissue Engineering*, 13. doi:10.1177/20417314221095339.
- Feigin, V. L., Krishnamurthi, R. V., Theadom, A. M., Abajobir, A. A., Mishra, S. R., Ahmed, M. B., Abate, K. H., Mengistie, M. A., Wakayo, T., Abd-Allah, F., Abdulle, A. M., Abera, S. F., Mohammed, K. E., Abyu, G. Y., Asgedom, S. W., Atey, T. M., Betsu, B. D., Mezgebe, H. B., Tuem, K. B., Woldu, M. A., Aichour, A. N., Aichour, I., Aichour, M. T., Akinyemi, R. O., Alabed, S., Al-Raddadi, R., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Ansari, H., Anwari, P., Ärnlöv, J., Fereshtehnejad, S., Weiderpass, E., Havmoeller, R., Asayesh, H., Avila-Burgos, L., Avokpaho, E. F. G. A., Afrique, L. E. R. A. S., Azarpazhooh, M. R., Barac, A., Barboza, M., Barker-Collo, S. L., Bärnighausen, T., Farvid, M. S., Mohammed, S., Bedi, N., Beghi, E., Giussani, G., Bennett, D. A., Hay, S. I., Goulart, A. C., Santos, I. S., Bensenor, I. M., Lotufo, P. A., Berhane, A., Jeemon, P., Bhaumik, S., Dandona, L., Dandona, R., Kumar, G. A., Birlik, S. M., Biryukov, S., Casey, D., Foreman, K. J., Goldberg, E. M., Khalil, I. A., Kyu, H. H., Manhertz, T., Mokdad, A. H., Naghavi, M., Nguyen, G., Nichols, E., Smith, M., Murray, C. J. L., Roth, G. A., Stanaway, J. D., Vos, T., Ellenbogen, R. G., Jakovljevic, M., Tirschwell, D. L., Zunt, J. R., Boneya, D. J., Hambisa, M., Bulto, L. N. B., Carabin, H., Castañeda-Orjuela, C. A., Catalá-López, F., Tabarés-Seisdedos, R., Chen, H., Chitheer, A. A., Chowdhury, R., Christensen, H., Deveber, G. A., Dharmaratne, S. D., Do, H. P., Nguyen, C. T., Nguyen, Q. L., Nguyen, T. H., Nong, V. M., Dokova, K., Dorsey, E. R., Eskandarieh, S., Fischer, F., Majeed, A., Steiner, T. J., Rawaf, S., Shakir, R., Shoman, H., Geleijnse, J. M., Gillum, R. F., Gona, P. N., Gughani, H. C., Gupta, R., Hachinski, V., Hamadeh, R. R., Hankey, G. J., Hareri, H. A., Heydarpour, P., Sahraian, M. A., Kasaeian, A., Malekzadeh, R., Roshandel, G., Sepanlou, S. G., Hotez, P. J., Javanbakht, M., Jonas, J. B., Kalkonde, Y., Kandel, A., Karch, A., Kastor, A., Rahman, M., Keiyoro, P. N., Khader, Y. S., Khan, E. A., Khang, Y., Khoja, A. T. A., Tran, B. X., Khubchandani, J., Kim, D., Kim, Y. J., Kivimaki, M., Kokubo, Y., Kosen, S., Kravchenko, M., Piradov, M. A., Varakin, Y. Y., Defo, B. K., Kulkarni, C., Kumar, R., Larsson, A., Lavados, P. M., Li, Y., Liang, X., Liben, M. L., Lo, W. D., Logroscino, G., Loy, C. T., Mackay, M. T., Meretoja, A., Szeoke, C. E. I., Abd El Razek, H. M., Mantovani, L. G., Massano, J., Mazidi, M., McAlinden, C., Mehata, S., Mehndiratta, M. M., Memish, Z. A., Mendoza, W., Mensah, G. A., Wijeratne, T., Miller, T. R., Mohamed Ibrahim, N., Mohammadi, A., Moradi-Lakeh, M., Velasquez, I. M., Musa, K. I., Ngunjiri, J. W., Ningrum, D. N. A., Norrving, B., Stein, D. J., Noubiap, J. J. N., Ogbo, F. A., Renzaho, A. M. N., Owolabi, M. O., Pandian, J. D., Parmar, P. G., Pereira, D. M., Petzold, M., Phillips, M. R., Poulton, R. G., Pourmalek, F., Qorbani, M., Rafay, A., Rai, R. K., Rajsic, S., Ranta, A., Rezai, M. S., Rubagotti, E., Sachdev, P., Safiri, S., Sahathevan, R., Samy, A. M., Santalucia, P., Sartorius, B., Satpathy, M., Sawhney, M., Saylan, M. I., Shaikh, M. A., Shamsizadeh, M., Sheth, K. N., Shigematsu, M., Silva, D. A. S., Sobngwi, E., Sposato, L. A., Stovner, L. J., Stovner, L. J., Abdulkader, R. S., Tanne, D., Thrift, A. G., Topor-Madry, R., Truelsen, T., Ukwaja, K. N., Uthman, O. A., Vasankari, T., Venketasubramanian, N., Vlassov, V. V., Wadilo, F., Wallin, M. T., Westerman, R., Wiysonge, C. S., Wolfe, C. D., Xavier, D., Xu, G., Yano, Y., Yimam, H. H., Yonemoto, N., Yu, C., Zaidi, Z. y Zaki, M. E. (2017) "Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015", *The Lancet Neurology*, 16(11), pp. 877-897. doi:10.1016/S1474-4422(17)30299-5/ATTACHMENT/CD9DB039-439A-4F44-9963-3AA014FE39DC/MMC1.PDF.
- Ferrari, E., Cardinale, A., Picconi, B. y Gardoni, F. (2020) "From cell lines to pluripotent stem cells for modelling Parkinson's Disease", *Journal of Neuroscience Methods*, 340. doi:10.1016/J.JNEUMETH.2020.108741.

- Fisher, E. M. C. y Bannerman, D. M. (2019) "Mouse models of neurodegeneration: Know your question, know your mouse", *Science translational medicine*, 11(493). doi:10.1126/SCITRANSLMED.AAQ1818.
- Galet, B., Cheval, H. y Ravassard, P. (2020) "Patient-Derived Midbrain Organoids to Explore the Molecular Basis of Parkinson's Disease", *Frontiers in Neurology*, 11. doi:10.3389/fneur.2020.01005.
- Gattazzo, F., Urciuolo, A., & Bonaldo, P. (2014). "Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), 2506–2519. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2014.01.010>
- Greene, L. A. y Tischler, A. S. (1976) "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), p. 2424. doi:10.1073/PNAS.73.7.2424.
- Ha, J., Kang, J. S., Lee, M., Baek, A., Kim, S., Chung, S.-K., Lee, M.-O. y Kim, J. (2020) "Simplified Brain Organoids for Rapid and Robust Modeling of Brain Disease", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. doi:10.3389/fcell.2020.594090.
- Harrison, R. G. (1906) "Observations on the living developing nerve fiber", <https://doi.org/10.3181/00379727-4-98>. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 4(1), pp. 140-143. doi:10.3181/00379727-4-98.
- Hoarau-Véchet, J., Rafii, A., Touboul, C. y Pasquier, J. (2018) "Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?", *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), p. 181. doi:10.3390/IJMS19010181.
- Hulme, A. J., Maksour, S., St-Clair Glover, M., Miellet, S. y Dottori, M. (2022) "Making neurons, made easy: The use of Neurogenin-2 in neuronal differentiation", *Stem Cell Reports*, 17(1), pp. 14-34. doi:10.1016/J.STEMCR.2021.11.015.
- Jankovic, J. y Tan, E. K. (2020) "Parkinson's disease: Etiopathogenesis and treatment", *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 91(8), pp. 795-808. doi:10.1136/JNNP-2019-322338.
- Jensen, C. y Teng, Y. (2020) "Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?", *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, p. 33. doi:10.3389/FMOLB.2020.00033/BIBTEX.
- Jo, J., Xiao, Y., Xuyang, A., Tan, K., Je, S. y Correspondence, H.-H. N. (2016) "Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons". doi:10.1016/j.stem.2016.07.005.
- Kalia, L. V. y Lang, A. E. (2015) "Parkinson's disease", *The Lancet*, 386(9996), pp. 896-912. doi:10.1016/S0140-6736(14)61393-3.
- Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S. y Fidani, L. (2016) "The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects", *Acta Neurologica Scandinavica*, 134(5), pp. 314-326. doi:10.1111/ANE.12563.
- Ke, M., Chong, C. M., Zhu, Q., Zhang, K., Cai, C. Z., Lu, J. H., Qin, D. y Su, H. (2021) "Comprehensive Perspectives on Experimental Models for Parkinson's Disease", *Aging and disease*, 12(1), pp. 223-246. doi:10.14336/AD.2020.0331.
- Kelava, I. y Lancaster, M. A. (2016) "Stem Cell Models of Human Brain Development", *Cell stem cell*, 18(6), pp. 736-748. doi:10.1016/J.STEM.2016.05.022.
- Kim, H., Park, H. J., Choi, H., Chang, Y., Park, H., Shin, J., Kim, Junyeop, Lengner, C. J., Lee, Y. K. y Kim, Jongpil (2019) "Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids", *Stem Cell Reports*, 12(3), pp. 518-531. doi:10.1016/J.STEMCR.2019.01.020.
- Knowlton, S., Anand, S., Shah, T. y Tasoglu, S. (2018) "Bioprinting for Neural Tissue Engineering", *Trends in Neurosciences*, 41(1), pp. 31-46. doi:10.1016/J.TINS.2017.11.001.
- Konnova, E. A. y Swanberg, M. (2018) "Animal Models of Parkinson's Disease", *Exon Publications*, pp. 83-106. doi:10.15586/CODONPUBLICATIONS.PARKINSONSDISEASE.2018.CH5.
- Kouli, A., Torsney, K. M. y Kuan, W.-L. (2018) "Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis", *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, pp. 3-26. doi:10.15586/CODONPUBLICATIONS.PARKINSONSDISEASE.2018.CH1.
- Lancaster, M. A. y Knoblich, J. A. (2014) "Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells", *Nature protocols*, 9(10), pp. 2329-2340. doi:10.1038/NPROT.2014.158.
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P. y Knoblich, J. A. (2013) "Cerebral organoids model human brain development and microcephaly", *Nature*, 501(7467), pp. 373-379. doi:10.1038/nature12517.
- Langhans, S. A. (2018) "Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning", *Frontiers in Pharmacology*, 9(JAN), p. 6. doi:10.3389/FPHAR.2018.00006/BIBTEX.
- Law, S. M. y Zheng, J. J. (2022) "Premise and peril of Wnt signaling activation through GSK-3 $\beta$  inhibition", *iScience*, 25(4). doi:10.1016/J.ISCI.2022.104159/ATTACHMENT/709FF17A-5AF4-4893-9424-52CF608022B7/MMC1.PDF.

- Lebkowski, J. (2011) "GRNOPC1: the world's first embryonic stem cell-derived therapy. Interview with Jane Lebkowski.", *Regenerative medicine*, 6(6 Suppl), pp. 11-13. doi:10.2217/RME.11.77/FORMAT/EPUB.
- Liu, Z. y Cheung, H. H. (2020) "Stem Cell-Based Therapies for Parkinson Disease", *International journal of molecular sciences*, 21(21), pp. 1-17. doi:10.3390/IJMS21218060.
- Lopes, F. M., Bristot, I. J., da Motta, L. L., Parsons, R. B. y Klamt, F. (2017) "Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models", *NeuroMolecular Medicine*, 19(2-3), pp. 241-255. doi:10.1007/s12017-017-8454-x.
- Lotharius, J., Barg, S., Wiekop, P., Lundberg, C., Raymon, H. K. y Brundin, P. (2002) "Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line", *The Journal of biological chemistry*, 277(41), pp. 38884-38894. doi:10.1074/JBC.M205518200.
- Louit, A., Galbraith, T. y Berthod, F. (2023) "In Vitro 3D Modeling of Neurodegenerative Diseases", *Bioengineering*, 10(1). doi:10.3390/BIOENGINEERING10010093.
- Ma, C., Seong, H., Li, X., Yu, X., Xu, S. y Li, Y. (2022) "Human Brain Organoid: A Versatile Tool for Modeling Neurodegeneration Diseases and for Drug Screening", *Stem Cells International*, pp. 1-20. doi:10.1155/2022/2150680.
- Maiti, P., Manna, J., Dunbar, G. L., Maiti, P. y Dunbar, G. L. (2017) "Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments", *Translational neurodegeneration*, 6(1). doi:10.1186/S40035-017-0099-Z.
- Marotta, N., Kim, S. y Krainc, D. (2020) "Organoid and pluripotent stem cells in Parkinson's disease modeling: an expert view on their value to drug discovery", *Expert opinion on drug discovery*, 15(4), pp. 427-441. doi:10.1080/17460441.2020.1703671.
- Marras, C., Canning, C. G. y Goldman, S. M. (2019) "Environment, lifestyle, and Parkinson's disease: Implications for prevention in the next decade", *Movement Disorders*, 34(6), pp. 801-811. doi:10.1002/MDS.27720.
- McComish, S. F., MacMahon Copas, A. N. y Caldwell, M. A. (2022) "Human Brain-Based Models Provide a Powerful Tool for the Advancement of Parkinson's Disease Research and Therapeutic Development", *Frontiers in Neuroscience*, 16, p. 851058. doi:10.3389/FNINS.2022.851058/BIBTEX.
- Mohamed, N. V., Larroquette, F., Beitel, L. K., Fon, E. A. y Durcan, T. M. (2019) "One Step Into the Future: New iPSC Tools to Advance Research in Parkinson's Disease and Neurological Disorders", *Journal of Parkinson's disease*, 9(2), pp. 265-281. doi:10.3233/JPD-181515.
- Monteduro, A. G., Rizzato, S., Caragnano, G., Trapani, A., Giannelli, G., & Maruccio, G. (2023). Organs-on-chips technologies – A guide from disease models to opportunities for drug development. *Biosensors and Bioelectronics*, 231, 115271. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2023.115271>
- Nickels, S. L., Modamio, J., Mendes-Pinheiro, B., Monzel, A. S., Betsou, F. y Schwamborn, J. C. (2020) "Reproducible generation of human midbrain organoids for in vitro modeling of Parkinson's disease", *Stem Cell Research*, 46, p. 101870. doi:10.1016/j.scr.2020.101870.
- Normile, D. (2018) "First-of-its-kind clinical trial will use reprogrammed adult stem cells to treat Parkinson's", *Science*. doi:10.1126/SCIENCE.AAU9466.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I. y Nussbaum, R. L. (1997) "Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease", *Science*, 276(5321), pp. 2045-2047. doi:10.1126/SCIENCE.276.5321.2045.
- Rai, S. N. y Singh, P. (2020) "Advancement in the modelling and therapeutics of Parkinson's disease", *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 104, p. 101752. doi:10.1016/J.JCHEMNEU.2020.101752.
- Raza, C., Anjum, R. y Shakeel, N. ul A. (2019) "Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies", *Life Sciences*, 226, pp. 77-90. doi:10.1016/J.LFS.2019.03.057.
- Ross, R. A. y Biedler, J. L. (1985) "Presence and regulation of tyrosinase activity in human neuroblastoma cell variants in vitro.", *Cancer research*, 45(4), pp. 1628-32.
- Sakalem, M. E., De Sibio, M. T., da Costa, F. A. da S. y de Oliveira, M. (2021) "Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine", *Biotechnology Journal*, 16(5), p. 2000463. doi:10.1002/BIOT.202000463.
- Sensharma, P., Madhumathi, G., Jayant, R. D. y Jaiswal, A. K. (2017) "Biomaterials and cells for neural tissue engineering: Current choices", *Materials Science and Engineering: C*, 77, pp. 1302-1315. doi:10.1016/J.MSEC.2017.03.264.
- Shin, N., Kim, Y., Ko, J., Choi, S. W., Hyung, S., Lee, S., Park, S., Song, J., Jeon, N. L. y Kang, K. (2022) "Vascularization of iNSC spheroid in a 3D spheroid-on-a-chip platform enhances neural maturation", *Biotechnology and Bioengineering*, 119(2), pp. 566-574. doi:10.1002/bit.27978.



- Siddu, A., David, L. S., Lauinger, N., Chen, X., Saint-Pierre, M., Alpaugh, M., Durcan, T. y Cicchetti, F. (2020) "Beneficial effects of cysteamine in Thy1- $\alpha$ -Syn mice and induced pluripotent stem cells with a SNCA gene triplication", *Neurobiology of disease*, 145. doi:10.1016/J.NBD.2020.105042.
- Silva-Pedrosa, R., Salgado, A. J., & Ferreira, P. E. (2023). "Revolutionizing Disease Modeling: The Emergence of Organoids in Cellular Systems". *Cells*, Vol. 12, Page 930, 12(6), 930. <https://doi.org/10.3390/CELLS12060930>.
- Simian, M. y Bissell, M. J. (2017) "Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions", *The Journal of cell biology*, 216(1), pp. 31-40. doi:10.1083/JCB.201610056.
- Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B., Zenaro, E. y Constantin, G. (2020) "In vitro Models of Neurodegenerative Diseases", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. doi:10.3389/fcell.2020.00328.
- Smirnova, L., Harris, G., Delp, J., Valadares, M., Pamies, D., Hogberg, H. T., Waldmann, T., Leist, M. y Hartung, T. (2016) "A LUHMES 3D dopaminergic neuronal model for neurotoxicity testing allowing long-term exposure and cellular resilience analysis", *Archives of Toxicology*, 90(11), pp. 2725-2743. doi:10.1007/s00204-015-1637-z.
- Smits, L. M., Reinhardt, L., Reinhardt, P., Glatza, M., Monzel, A. S., Stanslowsky, N., Rosato-Siri, M. D., Zanon, A., Antony, P. M., Bellmann, J., Nicklas, S. M., Hemmer, K., Qing, X., Berger, E., Kalmbach, N., Ehrlich, M., Bolognin, S., Hicks, A. A., Wegner, F., Sternecker, J. L. y Schwamborn, J. C. (2019) "Modeling Parkinson's disease in midbrain-like organoids", *npj Parkinson's Disease*, 5(1), pp. 1-8. doi:10.1038/s41531-019-0078-4.
- Sozzi, E., Nilsson, F., Kajtez, J., Parmar, M. y Fiorenzano, A. (2022) "Generation of Human Ventral Midbrain Organoids Derived from Pluripotent Stem Cells", *Current protocols*, 2(9). doi:10.1002/CPZ1.555.
- Stoddard-Bennett, T. y Pera, R. R. (2019) "Treatment of Parkinson's Disease through Personalized Medicine and Induced Pluripotent Stem Cells", *Cells*, 8(1). doi:10.3390/CELLS8010026.
- Sun, X.-Y., Ju, X.-C., Li, Y., Zeng, P.-M., Wu, J., Zhou, Y.-Y., Shen, L.-B., Dong, J., Chen, Y.-J. y Luo, Z.-G. (2022) "Generation of vascularized brain organoids to study neurovascular interactions", *eLife*, 11. doi:10.7554/eLife.76707.
- Takahashi, J. y Price-Evans, A. (2019) "Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson's disease: an interview with Jun Takahashi", *Regenerative medicine*, 14(2), pp. 93-95. doi:10.2217/RME-2018-0158.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006) "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", *Cell*, 126(4), pp. 663-676. doi:10.1016/J.CELL.2006.07.024.
- Thompson, R. y Chan, C. (2016) "Signal transduction of the physical environment in the neural differentiation of stem cells", *Technology*, 4(1), pp. 1-8. doi:10.1142/S2339547816400070.
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W. y Poewe, W. (2021) "Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease", *The Lancet. Neurology*, 20(5), p. 385. doi:10.1016/S1474-4422(21)00030-2.
- Tong, Z.-B., Hogberg, H., Kuo, D., Sakamuru, S., Xia, M., Smirnova, L., Hartung, T. y Gerhold, D. (2017) "Characterization of three human cell line models for high-throughput neuronal cytotoxicity screening", *Journal of Applied Toxicology*, 37(2), pp. 167-180. doi:10.1002/jat.3334.
- Torrent, R., De Angelis Rigotti, F., Dell'Era, P., Memo, M., Raya, A. y Consiglio, A. (2015) "Using iPSCs toward the Understanding of Parkinson's Disease", *Journal of Clinical Medicine*, 4(4), p. 548. doi:10.3390/JCM4040548.
- Valadez-Barba, V., Juárez-Navarro, K., Padilla-Camberos, E., Díaz, N. F., Guerra-Mora, J. R. y Díaz-Martínez, N. E. (2021) "Enfermedad de Parkinson: actualización de estudios preclínicos con el uso de células troncales pluripotentes inducidas", *Neurología*. doi:10.1016/J.NRL.2021.01.005.
- Vera, E., Bosco, N. y Studer, L. (2016) "Generating Late-Onset Human iPSC-Based Disease Models by Inducing Neuronal Age-Related Phenotypes through Telomerase Manipulation", *Cell Reports*, 17(4), pp. 1184-1192. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.062.
- Vitek, M. P., Araujo, J. A., Fosse, M., Greenberg, B. D., Howell, G. R., Rizzo, S. J. S., Seyfried, N. T., Tenner, A. J., Territo, P. R., Windisch, M., Bain, L. J., Ross, A., Carrillo, M. C., Lamb, B. T. y Edelmayer, R. M. (2021) "Translational animal models for Alzheimer's disease: An Alzheimer's Association Business Consortium Think Tank", *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 6(1). doi:10.1002/TRC2.12114.
- Wang, X., Allen, W. E., Wright, M. A., Sylwestrak, E. L., Samusik, N., Vesuna, S., Evans, K., Liu, C., Ramakrishnan, C., Liu, J., Nolan, G. P., Bava, F. A. y Deisseroth, K. (2018) "Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states", *Science*, 361(6400). doi:10.1126/SCIENCE.AAT5691/SUPPL\_FILE/AAT5691\_WANG\_SM\_TABLE-S2.XLSX.
- Witt, P. A. L. y Fahn, S. (2016) "Levodopa therapy for Parkinson disease", *Neurology*, 86(14 Supplement 1), pp. S3-S12. doi:10.1212/WNL.0000000000002509.
- Xicoy, H., Wieringa, B. y Martens, G. J. M. (2017) "The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review", *Molecular neurodegeneration*, 12(1), pp. 1-11. doi:10.1186/S13024-017-0149-0.

- Yap, M. S., Nathan, K. R., Yeo, Y., Lim, L. W., Poh, C. L., Richards, M., Lim, W. L., Othman, I. y Heng, B. C. (2015) "Neural Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells for Nontherapeutic Applications: Toxicology, Pharmacology, and In Vitro Disease Modeling", *Stem cells international*. doi:10.1155/2015/105172.
- Yeap, Y. J., Teddy, T. J. W., Lee, M. J., Goh, M. y Lim, K. L. (2023) "From 2D to 3D: Development of Monolayer Dopaminergic Neuronal and Midbrain Organoid Cultures for Parkinson's Disease Modeling and Regenerative Therapy", *International journal of molecular sciences*, 24(3) doi:10.3390/ijms24032523.
- Zahoor, I., Shafi, A. y Haq, • Ehtishamul (2018) "Pharmacological Treatment of Parkinson's Disease", *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, pp. 129-144. doi:10.15586/CODONPUBLICATIONS.PARKINSONSDISEASE.2018.CH7.
- Zeng, X. S., Geng, W. S. y Jia, J. J. (2018a) "Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment", *ASN neuro*, 10. doi:10.1177/1759091418777438.
- Zeng, X. S., Geng, W. S., Jia, J. J., Chen, L. y Zhang, P. P. (2018b) "Cellular and molecular basis of neurodegeneration in Parkinson disease", *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(APR), p. 351713. doi:10.3389/FNAGI.2018.00109/BIBTEX.
- Zeng, X. y Qin, H. (2022) "Stem Cell Transplantation for Parkinson's Disease: Current Challenges and Perspectives", *Aging and Disease*, 13(6), p. 1652. doi:10.14336/AD.2022.0312.
- Zhang, P. L., Chen, Y., Zhang, C. H., Wang, Y. X. y Fernandez-Funez, P. (2018) "Genetics of Parkinson's disease and related disorders", *Journal of Medical Genetics*, 55(2), pp. 73-80. doi:10.1136/JMEDGENET-2017-105047.
- Zhou, X., Cui, H., Nowicki, M., Miao, S., Lee, S. J., Masood, F., Harris, B. T. y Zhang, L. G. (2018) "Three-Dimensional-Bioprinted Dopamine-Based Matrix for Promoting Neural Regeneration", *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(10), pp. 8993-9001. doi:10.1021/ACSAMI.7B18197/SUPPL\_FILE/AM7B18197\_SI\_001.PDF.