



Universidad
Rey Juan Carlos

GRADO EN BIOLOGÍA
CURSO ACADÉMICO 2023/24
Trabajo de Fin de Grado

**CARACTERIZACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN NEURAL
DE DOS LÍNEAS DE CÉLULAS MADRE HUMANAS**

Autor: Jason Adrián Jaramillo Gil
Director: Víctor Briz Herrezuelo
Tutora URJC: Emma Barahona Martín

Índice

1. Abreviaturas.....	2
2. Resumen.....	3
3. Introducción.....	4
4. Materiales y métodos.....	6
4.1. Aspectos éticos.....	6
4.2. Cultivos celulares.....	7
4.2.1. Células madre neurales humanas (línea celular hNS1).....	7
4.2.2. Células madre neurales humanas (organoides cerebrales humanos, línea celular AND-2).....	8
4.3. Inmunocitoquímica.....	9
4.3.1. Células madre neurales humanas (línea celular hNS1).....	9
4.3.2. Células madre neurales humanas (organoides cerebrales humanos, línea celular AND-2).....	11
4.4. Cuantificación celular.....	11
4.5. Análisis estadístico.....	13
5. Resultados.....	13
5.1. Caracterización de las células hNS1.....	13
5.2. Caracterización de los organoides cerebrales (células AND-2).....	15
5.3. Sinaptogénesis para la línea celular AND-2.....	17
6. Discusión.....	18
Diferenciación neural de la línea celular hNS1.....	19
Diferenciación neural de la línea celular AND-2.....	21
Sinaptogénesis de la línea celular AND-2.....	24
7. Conclusiones.....	26
8. Bibliografía.....	27

1. Abreviaturas

– # –

- **2D:** Cultivos celulares en dos dimensiones.
- **3D:** Cultivos celulares en tres dimensiones.

– B –

- **BMPs:** Proteínas morfogénicas óseas

– C –

- **CO₂:** Dióxido de carbono.

– D –

- **DIV:** Días in vitro.
- **DMEM:** *Dulbecco's modified eagle medium.*

– E –

- **EBs:** *Embryoid bodies* (cuerpos embrioides).
- **EGF:** *Epidermal growth factor.*

– F –

- **FBS:** Suero fetal bovino.
- **FGF2:** *Fibroblast growth factor.*

– G –

- **GFAP:** *Glial fibrillary acidic protein.*

– H –

- **HBSS:** Solución salina equilibrada de Hanks.
- **hCOs:** Organoides cerebrales humanos.
- **hECs:** Células madre embrionarias humanas.
- **hiPSCs:** Células madre pluripotentes inducidas humanas.

- **hNSCs:** Células madre neurales humanas.
- **hPSCs:** Células madre pluripotentes humanas.

– I –

- **ICC:** Inmunocitoquímica.
- **IMF:** Intensidad media de fluorescencia.
- **ISCI:** Instituto de Salud Carlos III.

– M –

- **MAP2:** *Microtubule-associated protein 2.*

– N –

- **NEAA:** Aminoácidos no esenciales.
- **NHS:** *Normal horse serum.*

– P –

- **PBS:** Tampón fosfato salino.
- **PFA:** Paraformaldehído.
- **PLL:** Poli-L-lisina.
- **P/S:** Penicilina/Estreptomina.
- **PSD95:** *Postsynaptic density protein 95.*

– S –

- **SNC:** Sistema nervioso central.
- **SOX2:** *SRY-Box Transcription Factor 2.*

2. Resumen

Existen dos modelos de cultivos celulares para estudiar el sistema nervioso *in vitro*: los cultivos 2D, o en monocapa, que limitan la recreación de la estructura cerebral; y los modelos de organoides en suspensión 3D capaces de recrear la morfogénesis cerebral. Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), en cambio, las células madre multipotentes dan lugar a linajes celulares más restringidos.

En el presente estudio se investigaron dos líneas celulares de células madre neurales humanas: hNS1 y organoides cerebrales de la línea AND-2, ambos modelos en monocapa. La línea hNS1, inmortalizada mediante el gen v-myc, muestra propiedades de crecimiento y autorrenovación y se diferencia de manera rápida al eliminar los mitógenos del medio de cultivo. Estudios con organoides, aunque todavía escasos, revelan formación de sinapsis y aplicaciones potenciales en terapias neurales.

Las dos líneas celulares utilizadas fueron cultivadas con protocolos específicos usando distintos medios de proliferación y diferenciación, seguidos de análisis mediante inmunocitoquímica para marcadores neurales y sinápticos a varios tiempos de diferenciación *in vitro*. Se utilizó un método de cuantificación semi-automática de elaboración propia mediante el software Fiji/ImageJ para cuantificar células y evaluar la expresión de diferentes marcadores celulares de proliferación celular, precursores neuronales, neuronas y células gliales. Los resultados mostraron diferencias significativas en la dinámica de proliferación y diferenciación. También se evaluó la sinapsis en la línea AND-2 pero no se encontraron resultados significativos. Las células hNS1 mostraron una rápida diferenciación hacia neuronas maduras con niveles estables de células gliales. Por otro lado, las células AND-2, bajo diferentes medios, exhiben variaciones en la proliferación y diferenciación neuronal, pero siguen manteniendo un cierto nivel de pluripotencia.

Ambas líneas celulares permiten estudiar el neurodesarrollo y trastornos del mismo y muestran potencial para terapias celulares y reducción del uso de modelos animales. Además, el método semi-automático de cuantificación elaborado permite reducir el tiempo empleado para el análisis de los resultados, permitiendo el avance en estudios con cultivos celulares de una manera más rápida.

3. Introducción

El cultivo celular es una técnica que se basa en la obtención de células individuales a partir de un tejido, ya sea por métodos mecánicos o enzimáticos, y su posterior incubación en un medio de cultivo líquido o sólido. Esta tecnología, ideada por Harrison en 1907, permite el estudio de la fisiología celular bajo condiciones controladas y ha demostrado ser muy útil para estudiar mecanismos que antes era imposible estudiar (González & Aguilar, 2009).

Hay dos modelos de cultivos celulares diferentes para modelizar *in vitro* el sistema nervioso. Los modelos en dos dimensiones (2D) consisten en células neurales (precursores neurales, neuronas y/o glía) dispuestas en monocapa, adheridas a la superficie de la placa a través de sustratos (polímeros peptídicos, habitualmente) permitiendo estudiar la diferenciación celular, el neurodesarrollo y los mecanismos moleculares implicados en las enfermedades. A pesar de ello, estos modelos son limitados hasta cierto punto, pues no permiten reproducir la compleja estructura del cerebro humano. Los modelos en tres dimensiones (3D), que consisten en cultivos organoides en suspensión, sí permiten recrear la morfogénesis y organogénesis cerebral y su complejidad estructural (Lancaster & Knoblich, 2014).

Las células madre son células no diferenciadas tienen capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en células especializadas. Se pueden clasificar en función de su potencial de diferenciación en: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes, pero las más usadas actualmente son las células madre pluripotentes y multipotentes (Singh et al., 2016).

Es importante entender las características de cada tipo celular para conocer sus posibles aplicaciones. Las células madre pluripotentes (hPSCs) tienen capacidad para diferenciarse en las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). En este tipo se incluyen las células madre embrionarias humanas (hECSs) y las células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSCs, en inglés) (Martínez-Morales & Liste 2012).

Las hECSs fueron aisladas por primera vez de la masa celular interna del blastocisto en 1998 por James Thomson. (Thomson et al., 1998). Posteriormente, se desarrollaron las técnicas de reprogramación que permitieron la generación de hiPSCs a partir de células somáticas adultas. Estas células tienen la capacidad de autorrenovarse durante largos periodos de tiempo y diferenciarse en diversos linajes celulares (Soler et al., 2007).

Las células multipotentes dan lugar a linajes celulares más restringidos, en función de su capa germinal de origen. En este tipo se incluyen las células madre neurales humanas

(hNSCs) que pueden diferenciarse a todas las células del SNC y presentan menos riesgo de formación de tumores que las células pluripotentes (Martínez-Morales et al., 2013).

La línea celular hNS1 presenta propiedades óptimas de crecimiento y autorrenovación. Se diferencia de manera fácil y rápida hacia los tres linajes principales del sistema nervioso central (SNC) tras la eliminación del mitógeno del medio de cultivo. Se ha demostrado que la inmortalización con el gen v-myc es más eficaz que otros genes para perpetuar hNSCs (Villa et al., 2000).

Esta línea celular mantiene una identidad de precursores neurales y presenta capacidad de autorrenovación en presencia de mitógenos (FGF2 y EGF), y al eliminarlos se diferencian a neuronas y astrocitos (Sandoval et al., 2019). Así mismo, se observa un aumento de la sinapsis con el paso del tiempo (Liste et al., 2007).

Por otro lado, las tecnologías de organoides permiten investigar mecanismos de enfermedades cerebrales y descubrir nuevos fenotipos patológicos. La neurogénesis y migración neuronal dependen de los progenitores corticales, que son más abundantes en la corteza cerebral humana que en los roedores. Por eso, los modelos murinos replican sólo parcialmente los defectos corticales humanos. Los organoides cerebrales pueden replicar diversas células madre y progenitores corticales humanos (Sidhaye et al., 2021).

La diferenciación de organoides cerebrales a diferentes tipos de neuronas es posible. Se ha demostrado que la mayoría de las neuronas de las capas superficiales del cerebro requieren aproximadamente 8 semanas de diferenciación *in vitro* y un tiempo parecido es necesario para la astrogénesis. En organoides cultivados en monocapa tras su disociación, se han registrado picos de calcio espontáneos. Además, utilizando marcadores presinápticos, como la Sinapsina 1, y postsinápticos, como PSD95, se han observado grandes puntos del marcador presináptico adyacentes a los puntos del marcador postsinápticos. Estos resultados confirman la presencia de sinapsis en organoides cerebrales cultivados en monocapa (Paşca et al., 2015).

Se han desarrollado varios métodos para diferenciar células madre en neuronas y otras células del sistema nervioso. La vía de señalización SMAD es crucial durante la inducción neural y es modulada por factores de crecimiento como las proteínas morfogénicas óseas y los factores de crecimiento transformante beta, entre otros. La inhibición de SMAD, mediante antagonistas como Noggin y el fármaco SB431542, facilita la diferenciación neuronal. La

inhibición dual de SMAD con Noggin y SB431542 permite una eficiente inducción neuronal en cultivos adherentes en siete días (Chambers et al., 2009).

En este trabajo, nos propusimos poner a punto un método de diferenciación a cultivos mixtos de neuronas y astrocitos en 2D a partir de distintas líneas de células madre neurales. La hipótesis de trabajo es que en las líneas celulares utilizadas habrá inicialmente una mayor proporción de células que expresen marcadores de proliferación celular y de progenitores neurales, que irán disminuyendo a medida que se diferencian a neuronas y glía. A la vez, se espera que vaya aumentando la expresión de aquellos marcadores de neuronas diferenciadas, células gliales y de sinapsis.

Para ello, se utilizaron dos modelos celulares diferentes en dos experimentos independientes: células madre neurales humanas de la línea celular inmortalizada hNS1 y células madre neurales humanas procedentes de organoides cerebrales disgregados de la línea celular embrionaria AND-2.

El principal objetivo fue la caracterización de ambas líneas celulares mediante el análisis de la expresión de diferentes marcadores celulares a través de técnicas inmunocitoquímicas.

Los objetivos específicos son:

- **Objetivo 1:** Cuantificación de los niveles de expresión de los distintos marcadores celulares de proliferación celular, precursores neuronales, neuronas y células gliales para ambas líneas celulares (hNS1 y AND-2).
- **Objetivo 2:** Cuantificación de la sinaptogénesis mediante el análisis de los niveles de expresión de marcadores presinápticos, postsinápticos y de su colocalización para la línea celular AND-2.

4. Materiales y métodos

4.1. Aspectos éticos

Este estudio fue realizado entre los meses de marzo a junio del año 2024. Las dos líneas celulares utilizadas en este estudio fueron proporcionadas por la Dra. Isabel Liste Noya (Unidad de Regeneración Neural del Instituto de Salud Carlos III).

Los tejidos humanos originales, de donde proceden las células madre neurales humanas de la línea celular hNS1, fueron donados para investigación con el consentimiento por escrito de los donantes. Este proceso se realizó conforme a las directivas de la Unión Europea (UE), la Declaración de Helsinki y siguiendo las pautas éticas de la Red Europea de Trasplante y Restauración del Sistema Nervioso Central (NECTAR) y la Ley de Investigación Biomédica Española (julio de 2007). Las declaraciones éticas sobre el origen fetal humano de las células utilizadas en este estudio se pueden encontrar en los informes originales que describen la línea celular hNS1 (Villa et al., 2000).

Las células madre embrionarias humanas de la línea celular AND-2 fueron obtenidas del "Biobanco de células madre de Granada" (ISCIII, España). El uso de esta línea celular fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y el Comité Nacional de Garantías para el Uso y Donación de Células y Tejidos Humanos.

4.2. Cultivos celulares

4.2.1. Células madre neurales humanas (línea celular hNS1)

Las células hNS1, anteriormente llamadas HNSC.100, son una línea celular multipotente no transformada. Esta línea celular ya ha sido caracterizada en estudios previos y es obtenida a partir del prosencéfalo fetal humano e inmortalizada mediante infección retroviral con el gen v-myc. (Sandoval et al., 2019). Esta línea celular cuenta con grandes ventajas, por ello es muy usada en investigación y el desarrollo de fármacos. Son fáciles de cultivar y diferenciar, tienen un fenotipo estable, produciendo una población homogénea de células de origen humano, y proporcionan un suministro ilimitado de precursores neuronales, neuronas y células gliales sin necesidad de preparar tejido primario (Rosca et al., 2022).

Para el caso de la línea celular hNS1 se trabajó con cultivos celulares en monocapa (2D). Las células hNS1 fueron cultivadas en placas multipocillo P24 (VWR®) de plástico, tratadas previamente con poli-L-lisina (PLL; 10µg/mL; Sigma) para facilitar su adherencia, sembradas en medio de proliferación hNS1, compuesto por medio N2 [Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM/F12 con GlutaMAX-I (Gibco) con 0,26 % AlbumaMAX (Gibco), 5 mM HEPES (Gibco), 0,6 % glucosa (Merck), 1x suplemento N2 (Gibco), 1x aminoácidos no esenciales (NEAA, Gibco) y 0,5% Penicilina/Estreptomicina (P/S; Lonza)] suplementado con 20 ng/mL de los factores de crecimiento: Epidermal Growth Factor (EGF, PeproTech) y Fibroblast Growth Factor; FGF2; PeproTech). La incubación (HeraCell) con PLL se produjo durante toda la noche a 37 °C y en presencia de un 5 % de CO₂.

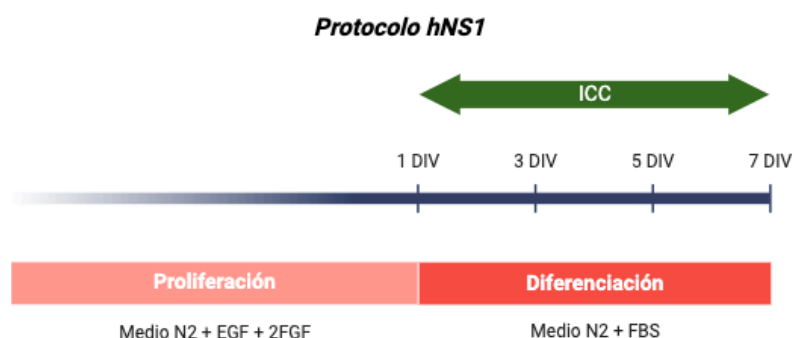


Figura 1: Representación esquemática del protocolo utilizado para la línea celular hNS1.

Las hNS1 fueron sembradas a una densidad aproximada de 80.000 células por pocillo y a las 24 h en medio de proliferación fueron cambiadas a medio de diferenciación hNS1 (medio N2 suplementado con 0,5 % de suero fetal bovino (FBS; HyClone) descomplementado). Todos los medios fueron filtrados antes de su uso. A partir de aquí el medio se fue cambiando cada 2 - 3 días. Las células fueron incubadas (en incubador HeraCell) a 37 °C y en presencia de un 5 % de CO₂. En total se sembraron 12 pocillos x 4 placas P24, es decir, la mitad de la placa para cada día, haciendo un total de 48 pocillos.

4.2.2. Células madre neurales humanas (organoides cerebrales humanos, línea celular AND-2)

Los organoides cerebrales humanos (hCOs) son generados a partir de hPSCs que pueden replicar la complejidad celular y estructural del cerebro humano en desarrollo (González-Sastre et al., 2024).

La línea celular AND-2 fue obtenida a partir de organoides cerebrales de 2 semanas de edad, obtenidos siguiendo el protocolo descrito en González-Sastre et al. (2024). Dichos organoides fueron disgregados mediante un proceso de separación enzimática mediante Tripsina-EDTA (Gibco) al 0,025 % para eliminar las uniones célula-célula y célula-matriz durante 10 minutos a 37 °C. Previo a la tripsinización, los organoides fueron lavados durante 20 minutos en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS).

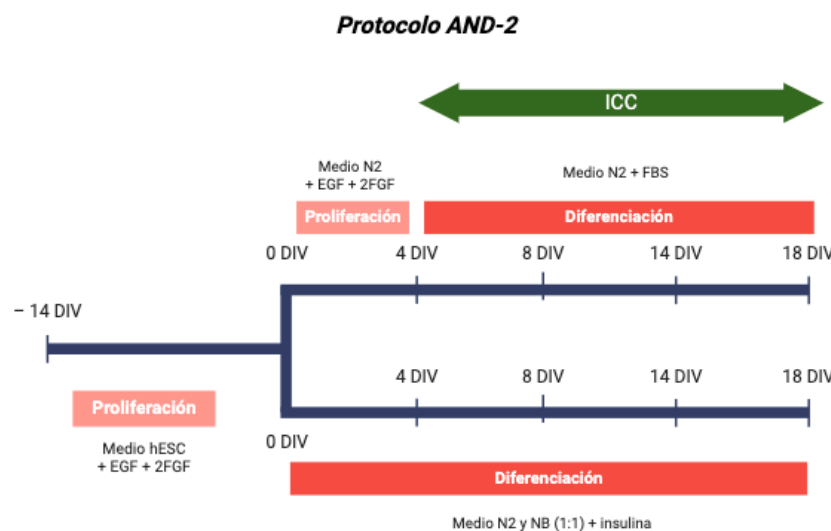


Figura 2: Representación esquemática del protocolo utilizado para la línea celular AND-2.

Una vez disgregados, los organoides también se cultivaron en monocapa (2D), pero a diferencia de las hNS1, las placas multipocillo P24 fueron tratadas con poli-L-lisina (PLL; 10

$\mu\text{g/mL}$; Sigma) y laminina ($1 \mu\text{g/mL}$; Sigma). Las células AND-2 fueron sembradas a una densidad aproximada de 90.000 células, bien en medio de proliferación con la misma composición que se usó para las hNS1 o en medio de diferenciación (organoides).

A los cuatro días *in vitro* (4 DIV) en estas condiciones, las células en medio de proliferación, con la misma composición que se usó para las hNS1, fueron expuestas a medio de diferenciación también con la misma composición que se usó para las hNS1 (medio N2/FBS); las células que estaban en medio de diferenciación de organoides se mantuvieron con el mismo medio (N2/NB). Todos los medios fueron filtrados antes de su uso. A partir de aquí, el medio también se fue cambiando cada 3 - 4 días hasta su fijación. Las células fueron incubadas a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y en presencia de un 5 % de CO_2 . En este caso también se sembraron 12 pocillos x 4 placas P24, es decir, la mitad de la placa para cada día, haciendo un total de 48 pocillos.

4.3. Inmunocitoquímica

4.3.1. Células madre neurales humanas (línea celular hNS1)

Para el caso de las células hNS1, éstas fueron fijadas en los días 0, 3, 5 y 7 (días *in vitro*, DIV) para su posterior caracterización mediante técnicas inmunocitoquímicas (ICQ). Para ello fueron lavadas en tampón fosfato salino 1x (PBS) y tratadas con paraformaldehído al 4 % (PFA, Sigma) durante 10 minutos. Tras dicha fijación, las células se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h con solución de bloqueo [0,25 % Triton X-100 (BioRad), 5 % de suero normal de caballo (*Normal Horse Serum*, NHS, Gibco) y PBS]. El Triton mejora la penetración de los anticuerpos en las células y el suero reduce las uniones inespecíficas.

A continuación las células se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (tabla 1) diluidos en solución de anticuerpo [0,25 % Triton X-100 (BioRad), 1 % de suero normal de caballo (*Normal Horse Serum*, NHS, Gibco) y PBS] durante toda la noche a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y en agitación a unas 60 rpm para asegurar que el anticuerpo cubriera todo el pocillo. Al día siguiente las células se lavaron con solución de lavado [0,25 % Triton X-100 (BioRad) y PBS] 3 veces durante 10 minutos dejándolas en agitación. En la tabla 1 también se muestra el tipo de marcador que representa cada anticuerpo.

Finalmente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 2) diluido en solución de anticuerpo durante 1 h a T° ambiente, en agitación y en oscuridad para evitar la degradación de los fluoróforos. En cada placa se dejó al menos un pocillo para utilizarlo como control negativo, incubado sólo con los anticuerpos secundarios diluidos en solución

de anticuerpo. La tinción de los núcleos celulares se realizó con Hoechst (0,1 µg/mL; Invitrogen) diluido en PBS 1x durante 10 minutos a temperatura ambiente.

La cuantificación de la sinaptogénesis se realizó para las placas fijadas en los dos últimos días (5 y 7 DIV) ya que no se espera sinapsis para los primeros días, donde las neuronas no están tan maduras. Para ello, se reservaron dos pocillos en cada día para la incubación del marcador presináptico (Sinaptofisina, Sigma) y postsináptico (PSD95, Abcam).

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados para la ICQ

Anticuerpo	Referencia	Dilución	Hospedador	Marcaje
Ki-67	MA5/14520 (Fisher)	1:500	Conejo	Proliferación celular
MAP2	M4403 (Millipore)	1:500	Ratón	Neuronas diferenciadas
Sox2	AB5603 (Millipore)	1:500	Conejo	Precursor neural y pluripotencia
GFAP	556327 (BioScience)	1:1000	Ratón	Células gliales
Nestina	N5413 (Sigma)	1:500	Conejo	Precursor neural
Vimentina	SC6260 (Santa Cruz)	1:100	Ratón	Precursor neural
Sinaptofisina	S5768 (Sigma)	1:200	Ratón	Marcador presináptico
PSD95	Abcam (AB18258)	1:100	Conejo	Marcador postsináptico

Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados para la ICQ

Anticuerpo	Referencia	Dilución	Hospedador	Marcaje
Alexa Fluor 488 Verde	A21202 (Invitrogen)	1:500	Burro	Anti-Ratón
Alexa Fluor 555 Rojo	A31572 (Invitrogen)	1:500	Burro	Anti-Conejo
Alexa Fluor 488 Verde	A21206 (Invitrogen)	1:500	Burro	Anti-Conejo
Alexa Fluor 555 Rojo	A31570 (Invitrogen)	1:500	Burro	Anti-Ratón

Para la visualización de la expresión de los marcadores utilizados en la ICC se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DMI8 TL LED) equipado con una cámara

digital (Leica K5). El procesamiento de las imágenes digitalizadas se realizó mediante el software Leica LAS X, capturando 3 campos al azar de cada pocillo, teniendo dos pocillos para cada condición. Esto hace un total de 6 réplicas para cada condición.

4.3.2. Células madre neurales humanas (organoides cerebrales humanos, línea celular AND-2)

Las placas utilizadas para el cultivo de los organoides se fijaron en los días 4, 8, 14 y 18 DIV y se siguió el mismo procedimiento que con las células hNS1: lavado con PBS 1x, fijación con PFA al 4 % durante 10 minutos y bloqueo a T° ambiente durante 1 h con solución de bloqueo. A continuación, las células AND-2 se incubaron con los mismos anticuerpos que en el caso de las células hNS1 (tabla 1) durante toda la noche a 4 °C y en agitación a unas 60 rpm. Finalmente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 2) diluido en solución de anticuerpo durante 1 h a T° ambiente, en agitación y en oscuridad. La tinción de los núcleos celulares se realizó con Hoechst (0,1 µg/mL, Invitrogen) diluido en PBS 1x durante 10 minutos a temperatura ambiente.

La cuantificación de la sinaptogénesis se realizó para todos los días (4, 8, 14 y 18 DIV). Para ello, se reservó un pocillo en cada día para la incubación del marcador presináptico (Sinaptofisina, Sigma) y postsináptico (PSD95, Abcam).

4.4. Cuantificación celular

A la hora de la cuantificación manual de células positivas para los marcadores celulares tras técnicas inmunocitoquímicas es necesario invertir gran cantidad de tiempo. Es por ello, que durante la realización de dicha cuantificación en una primera prueba se quiso desarrollar un método de cuantificación automática que ayude a reducir el tiempo empleado al menos en parte. La cuantificación celular se realizó mediante el plugin StarDist del software Fiji/ImageJ (<https://imagej.net/>). Este plugin utiliza inteligencia artificial para detectar los núcleos celulares (marcados mediante Hoechst) a partir de imágenes de microscopía. Para una mayor eficiencia en el conteo celular se automatizó una parte del proceso por cuenta propia gracias a la herramienta “Record Macro” del software. Esta herramienta permite guardar en un script el código de cada paso realizado de manera manual. Se realizó todo el proceso en el primer campo del primer pocillo de manera manual para obtener el script y se hicieron los cambios necesarios para generalizar el código. El resultado final fue un script generalizado que hiciera de manera automática los siguiente: (1) segmentación de los núcleos a partir de la imagen teñida con Hoechst (Figura 3 C), (2) guardar en un archivo .zip los ROI (región de interés) de cada célula delimitada (Figura 3 D), (3) guardar en un archivo .xls el número de células y variables de interés como la intensidad media de fluorescencia (IMF, Figura 3 D),

(4) superposición de la imagen de cada anticuerpo sobre la imagen con los núcleos (Figura 3 E) y (5) guardado de la misma.

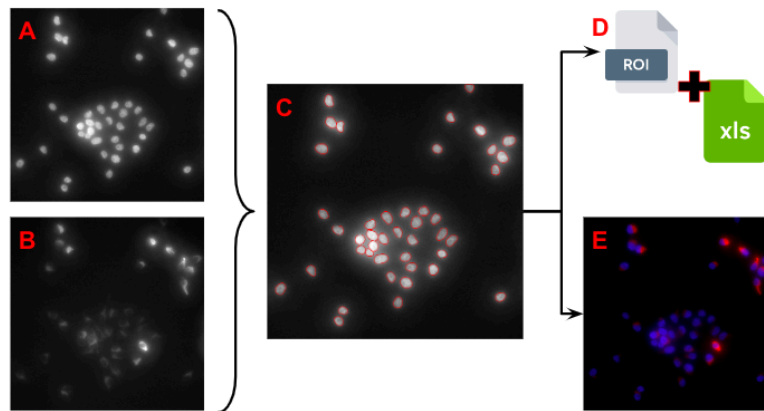


Figura 3: Descripción gráfica del método propio de cuantificación automática. Las imágenes de ejemplo corresponden a las células hNS1 en el día 0 de diferenciación y para el marcador Vimentina. A) Imagen de inmunocitoquímica para el canal Hoechst (tinción de núcleos celulares). B) Imagen de inmunocitoquímica para el canal del anticuerpo secundario que marca el anticuerpo primario Nestina. C) Imagen generada por el script para la visualización de las células que ha delimitado automáticamente. D) Guardado de archivos .roi y .xls. E) Imagen de la superposición de los canales Hoechst y Nestina para la visualización de las células positivas.

Finalmente, a partir de las imágenes superpuestas se realizó el conteo de células positivas para cada marcador de manera manual. Se tuvo en cuenta el número de células apoptóticas, restando éstas del número total de células cuantificadas. Fueron consideradas células apoptóticas aquellas con núcleos picnóticos, es decir, núcleos condensados.

Para la cuantificación de los marcadores MAP2 y GFAP, además del conteo de células positivas, se registró la IMF, ya que su expresión no está sólo concentrada en el núcleo de las células, sino también en las neuritas. La IMF se utilizó como una medida de la expresión de los marcadores MAP2 y GFAP y se calculó mediante el cociente de la intensidad total de la fotografía dividida por su área, a través del software Fiji/ImageJ.

Para los marcadores sinápticos utilizados en las células AND-2, Sinaptofisina (marcador presináptico) y PSD95 (marcador postsináptico), se realizó un conteo de puntos verdes y rojos respectivamente, y además, se contaron los puntos amarillos, que indicaban la presencia de ambos marcadores (colocalización) y, por lo tanto, la presencia de sinápsis.

Los datos obtenidos sobre las células positivas para cada marcador en función del número total de células (células positivas/células totales) se organizaron en una base de datos Excel (.xls). Para el experimento de las hNS1, se realizó una media de las réplicas de cada marcador para cada día. En el caso de los organoides, la media de los marcadores se realizó para cada día y para cada medio por separado. Todos los datos se representaron en gráficas de líneas, mediante el programa GraphPad Prism 10.2.3 para ver la tendencia de los marcadores según el paso de los días de diferenciación *in vitro*.

4.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos también se utilizó el software GraphPad Prism 10.2.3. Para poder determinar la significancia de los datos, se realizó un análisis de la varianza *one-way* (ANOVA) para el caso de las hNS1; y un análisis de la varianza *two-way* (ANOVA) para el caso de los organoides, ya que se compararon dos factores (días *in vitro* y medio de cultivo utilizado). A continuación se utilizó un test *post-hoc* de Tukey en aquellas diferencias significativas. Aquellas comparaciones en las que el valor del P-value sea menor a 0,05 son asumidas como diferencias significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$).

5. Resultados

5.1. Caracterización de las células hNS1

Las células hNS1 fueron caracterizadas mediante la cuantificación de los niveles de expresión de los distintos marcadores neurales a través de técnicas ICQ: Ki-67 (proliferación celular), Sox2 (precursor neural), Nestina y Vimentina (precursores neuronales), MAP2 (neuronas) y GFAP (células gliales) (ver figura 4A). Las células se analizaron a diferentes tiempos de diferenciación (0, 3, 5 y 7 DIV).

Según lo esperado, las células presentaron altos niveles de expresión para los marcadores de proliferación celular y precursores neuronales (expresados en porcentaje de células positivas) en los primeros días de la diferenciación. Se observó una tendencia decreciente y significativa en la expresión de los marcadores de proliferación y de precursores neurales Ki-67 (figura 4B), Sox2 (figura 4C) y Nestina (figura 4D) entre el primer y el séptimo día de diferenciación (0 y 7 DIV). Sin embargo, se registró un ligero incremento, aunque no significativo, entre los días 3 y 5 DIV para los marcadores Nestina ($p = 0,9122$) y Ki-67 ($p = 0,0698$). Además, el marcador Vimentina no mostró diferencias significativas en ninguno de los días manteniendo un alto porcentaje de células positivas en torno al 90% (figura 4E). No obstante, se puede apreciar un cambio notable en la localización del marcaje de Vimentina (pasando del citoplasma a las neuritas) acorde con el cambio morfológico de las células al diferenciarse.

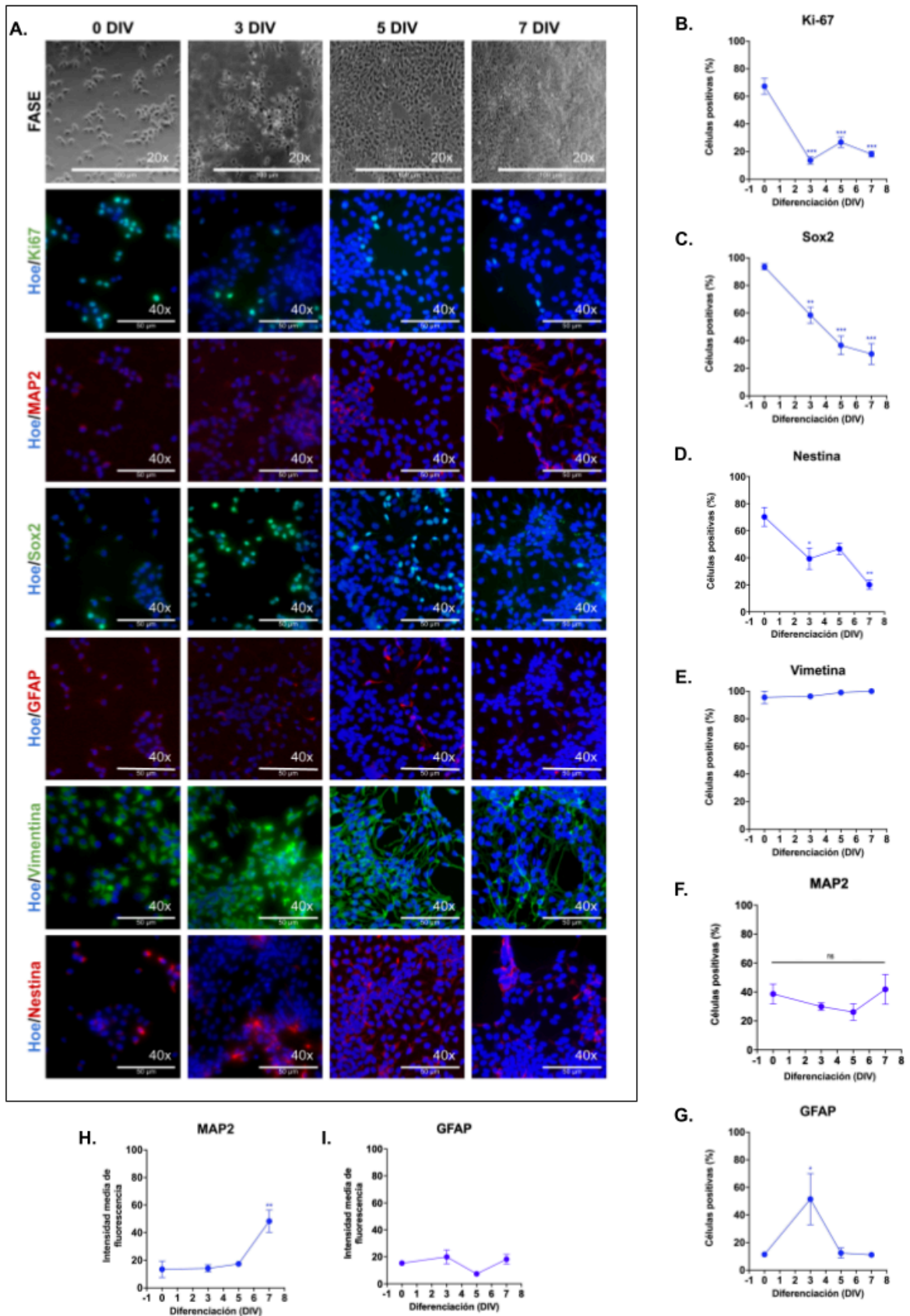


Figura 4: Caracterización de las células hNS1. A) Imágenes representativas de las células hNS1 en contraste de fase e inmunorreactividad para Ki67 (verde), MAP2 (rojo), Sox2 (verde), GFAP (rojo), Vimentina (verde) y Nestina (rojo) a diferentes días de diferenciación (0, 3, 5 y 7 DIV). Los núcleos celulares aparecen en azul con la tinción de Hóechst (Hoe). Barra de escala: 100 μ m (contraste de fase en 20x) y 50 μ m (inmunofluorescencia en 40x). B - G) Representación gráfica de los niveles de expresión de los distintos marcadores. H - I) Representación gráfica de los niveles de IMF para los marcadores MAP2 y GFAP. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Los asteriscos indican las diferencias significativas (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001) comparando los diferentes días de diferenciación con día 0 DIV utilizando el análisis de varianza one-way ANOVA seguido de la prueba de post-hoc Tukey.

En cuanto al marcador MAP2, no hubo diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para ninguna combinación de los días de diferenciación (figura 4F). No obstante, se observó un incremento en la IMF con una diferencia significativa ($p = 0,001$) entre el primer y último día de diferenciación (0 y 7 DIV, figura 4H). Esto indica que la expresión de MAP2, medida en términos de IMF, aumenta con el avance de la diferenciación.

En cambio, con el marcador GFAP ocurrió lo contrario que con MAP2. La intensidad media de fluorescencia de GFAP entre los diferentes días no mostró diferencias significativas, manteniéndose estable por debajo del 20% (figura 4I). Sin embargo, la expresión del marcador GFAP medida en porcentaje de células positivas, aumentó de manera significativa entre los días 0 y 3 DIV (figura 4G). A partir del 3 DIV la expresión comenzó a disminuir pero sin diferencias significativas con respecto al primer día (0 DIV).

Conforme va avanzando su diferenciación, las células presentan una morfología más ramificada con mayores extensiones de sus neuritas, como se puede observar en las fotografías de los marcadores MAP2 o Vimentina (figura 4A, 3^o y 6^o fila respectivamente).

5.2. Caracterización de los organoides cerebrales (células AND-2)

La línea celular AND-2 (organoides cerebrales disociados y cultivados en monocapa) fue caracterizada mediante la cuantificación de los niveles de expresión de los marcadores neurales a través de técnicas ICQ (los mismos utilizados para las hNS1). Las células se analizaron a diferentes tiempos de diferenciación (4, 8, 14 y 18 DIV).

Las células AND-2 también presentaron altos niveles de expresión para los marcadores de proliferación celular y precursores neuronales (expresados en porcentaje de células positivas) en los primeros días de la diferenciación, pero hay algunas diferencias con respecto a las hNS1. Se observó una tendencia decreciente y significativa, al menos entre el primer y último día de diferenciación (4 y 18 DIV), en el nivel de expresión de los marcadores neurales Ki-67 ($p = 0,002$, figura 5B), Nestina ($p < 0,001$, figura 5D) y Vimentina ($p = 0,03$, figura 5E) en presencia del medio N2/FBS. Además, a pesar de que el marcador Sox2 no mostró diferencias significativas entre ninguno de los días para el mismo medio, sí hubo diferencias significativas entre ambos medios (N2/FBS y N2/NB) entre los días 4 y 18 DIV (figura 5C).

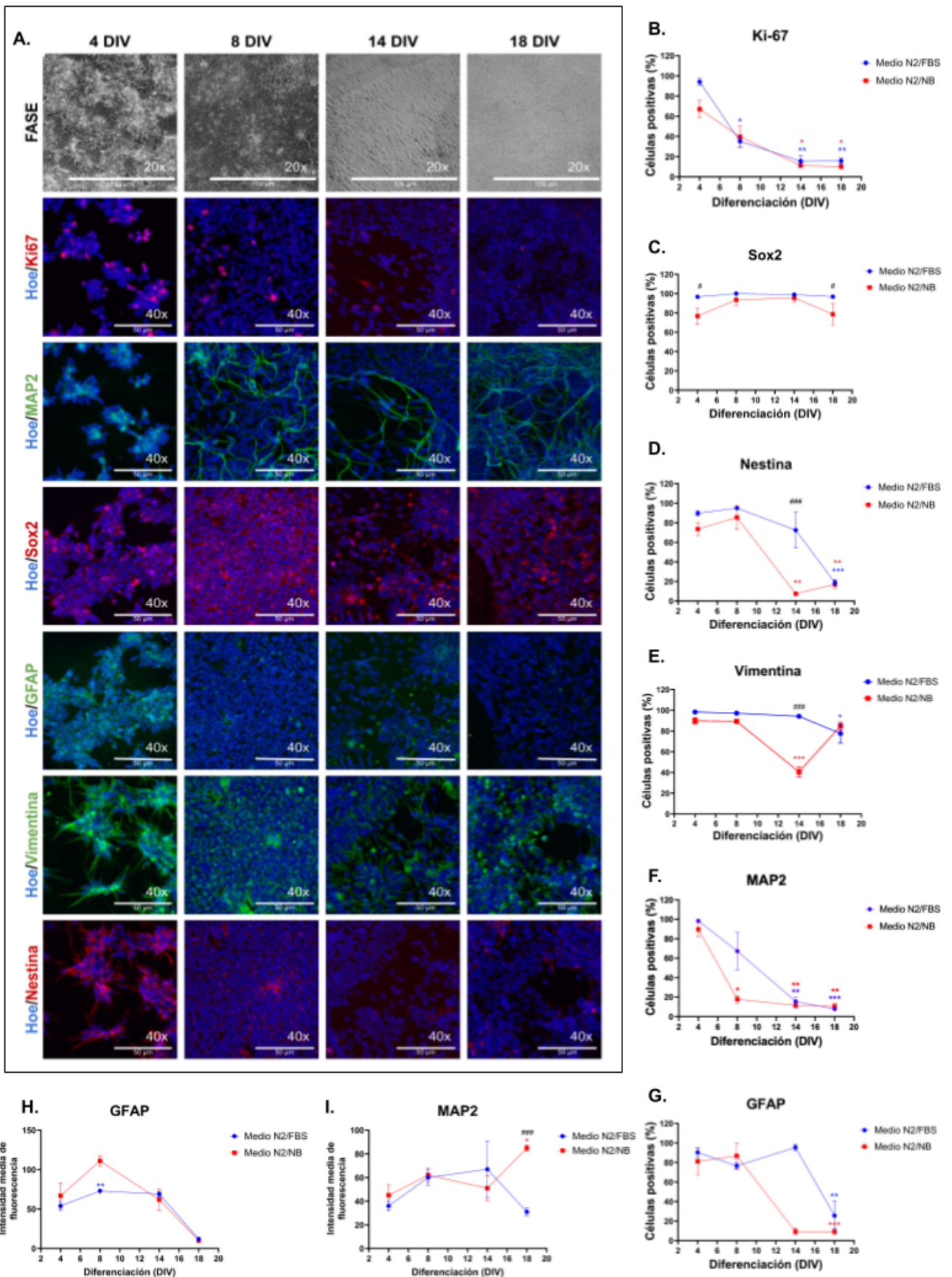


Figura 5: Caracterización de las células AND-2. **A)** Imágenes representativas de las células AND-2 (tomando de ejemplo las imágenes del medio N2/NB) en contraste de fase e inmunorreactividad para Ki67 (rojo), MAP2 (verde), Sox2 (rojo), GFAP (verde), Vimentina (verde) y Nestina (rojo) a diferentes días de diferenciación (4, 8, 14 y 18 DIV). Los núcleos celulares aparecen en azul con la tinción de Hóechst (Hoe). Barra de escala: 100 μ m (contraste de fase en 20x) y 50 μ m (inmunofluorescencia en 40x). **B - G)** Representación gráfica de los niveles de expresión de los distintos marcadores y medios. **H - I)** Representación gráfica de los niveles de IMF para los marcadores MAP2 y GFAP. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Los asteriscos indican las diferencias significativas (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001) comparando los diferentes días de diferenciación con el día 4 DIV utilizando el análisis de varianza one-way ANOVA seguido de la prueba de post-hoc Tukey. Las almohadillas indican las diferencias significativas (# p <0,05; ## p <0,01; ### p <0,001) entre los diferentes medios (proliferación y diferenciación) utilizando el análisis de varianza one-way ANOVA seguido de la prueba de post-hoc Tukey.

Algo parecido ocurrió en el medio N2/NB, donde se observó una disminución significativa en la expresión de los marcadores Ki-67 ($p = 0,02$) y Nestina ($p = 0,002$) al menos entre los días 4 y 18 DIV. La expresión del marcador Vimentina en presencia del medio N2/NB tuvo una disminución significativa ($p < 0,001$) entre los días 4 y 14 DIV, a partir del cual empieza a aumentar de nuevo su expresión.

En cuanto al porcentaje de células positivas para MAP2, se observó una disminución significativa con el paso del tiempo para ambos medios (figura 5F). Además, su diferencia de IMF también fue significativa entre los días 4 y 18 DIV comparando ambos medios, donde se observó una tendencia creciente con el avance de los días de diferenciación (figura 5I).

El marcador GFAP presentó una disminución en el nivel de su expresión de células positivas con el paso del tiempo, siendo significativa dicha diferencia entre el primer y último día (4 y 18 DIV) para ambos medios (figura 5G). Teniendo en cuenta la IMF, sólo hubo un aumento significativo en presencia del medio N2/FBS entre los días 4 y 8 DIV. A partir de ahí, la intensidad media parece decrecer (figura 5H).

Conforme va avanzando su diferenciación, las células presentan una morfología más ramificada con mayores extensiones de sus neuritas, como se puede observar en las fotografías del marcador MAP2 (figura 5A, 3º fila).

5.3. Sinaptogénesis para la línea celular AND-2

Para la cuantificación de la sinaptogénesis en las células AND-2, no se cuantificó el número de células positivas, sino el número de puntos verdes (marcador Sinaptofisina, presináptico) y rojos (marcador PSD95, postsináptico) encontrados. Además se contó el número de puntos amarillos, es decir, el número de ambos marcadores en el mismo lugar (colocalización). Ninguno de los dos marcadores (figura 6A y 6B), ni ambos marcadores juntos (puntos amarillos, figura 6C) tuvo diferencias significativas. No obstante, hay una cierta tendencia decreciente para los casos de PSD95 y sinapsis. Las imágenes representativas aparecen representadas en la figura 6D - F.

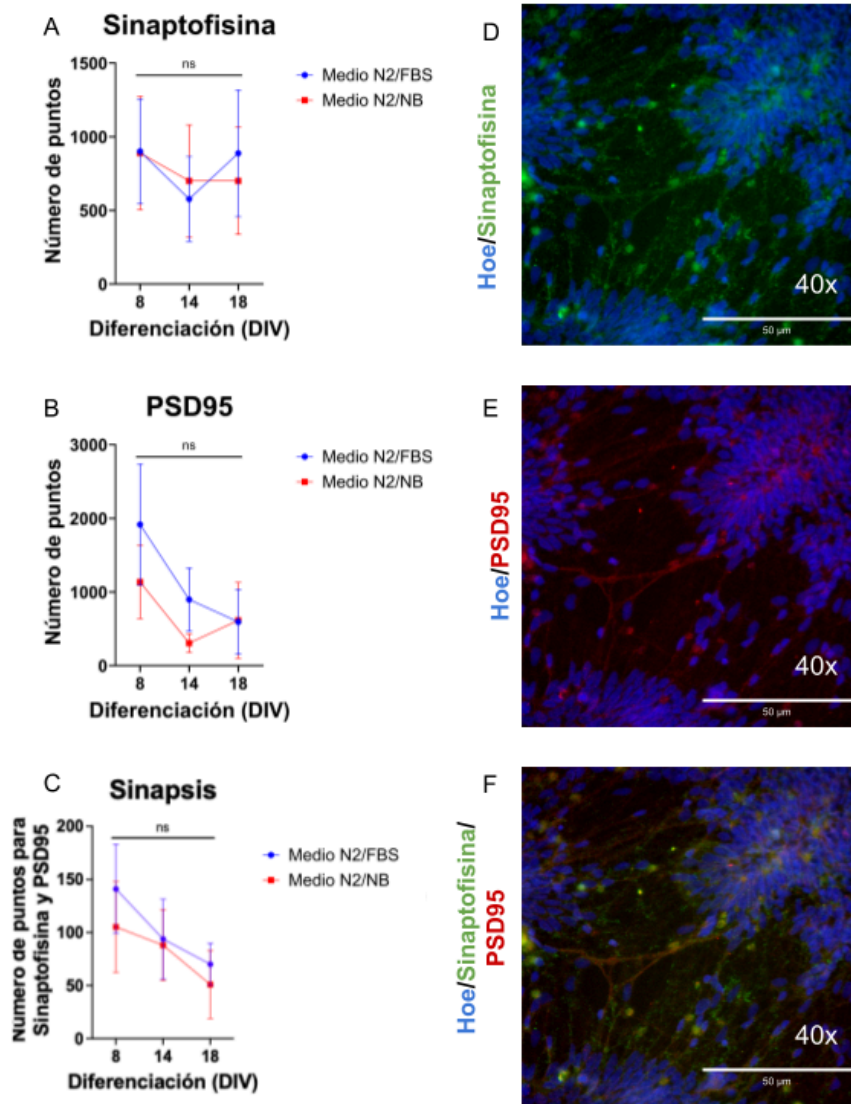


Figura 6: Caracterización de la sinaptogénesis para las células AND-2.

A - C) Representación gráfica de los niveles de expresión de los distintos marcadores y medios. Los datos se representan como la media \pm error estándar (SEM). Los asteriscos indican las diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los diferentes días de diferenciación utilizando el análisis de varianza one-way ANOVA seguido de la prueba de post-hoc Tukey. Se utilizó el análisis de varianza one-way ANOVA seguido de la prueba de post-hoc Tukey. **D - F)** Imágenes representativas de las células AND-2 a 40x (tomando de ejemplo las imágenes del medio N2/NB) de la inmunorreactividad para los marcadores presinápticos (Sinaptofisina, **6D**), postsinápticos (PSD95, **6E**) y colocalización de ambos (**6F**). Los núcleos celulares aparecen en azul con la tinción de Hóchst.

Barra de escala: 50 μ m.

6. Discusión

Los modelos *in vitro*, desde sus inicios, han demostrado ser muy útiles para el estudio celular en mamíferos (Carrel, 1912) y son buenas alternativas para analizar los efectos de las sustancias químicas que afectan al desarrollo del cerebro (Rosca et al., 2022). El desarrollo del SNC es complejo, incluyendo etapas muy coordinadas como proliferación,

migración, diferenciación y muerte celular, entre otros. El SNC en desarrollo tiene ventanas específicas de vulnerabilidad, y cualquier perturbación puede causar daños permanentes y difíciles de reparar (Mahajan et al., 2019). Además, la caracterización de líneas celulares puede ser útil para crear nuevos modelos celulares de enfermedades, alternativos a la experimentación animal, y estudiar trastornos que afectan al neurodesarrollo.

Durante el desarrollo embrionario, las células madre se originan a partir de la capa germinal ectodermo que rodea los ventrículos. Desde esta región, migran hacia la corteza y se diferencian en neuronas o células gliales. Los modelos neurológicos actuales que estudian el desarrollo del cerebro utilizan: (1) células madre o progenitores neurales obtenidos de tejidos fetales en cultivo (como la línea celular AND-2 utilizada en este trabajo), (2) líneas inmortalizadas de células madre neuronales (como la línea celular hNS1), y (3) progenitores y células estromales hematopoyéticas (Soler et al., 2007).

En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo la caracterización de la diferenciación neural de las líneas celulares hNS1 y AND-2. Las células hNS1 ya han sido caracterizadas por varios estudios anteriores (Liste et al., 2007; Coronel et al., 2019; Villa et al., 2000). En cuanto a la línea AND-2 hay menos información sobre su caracterización en lo relativo al neurodesarrollo. En el presente trabajo se siguió un protocolo adaptado de González-Sastre et al. (2024), tomando como punto de partida organoides con dos semanas de madurez.

Diferenciación neural de la línea celular hNS1

Para abordar el primer objetivo de este estudio, se analizaron los niveles de expresión de diversos marcadores celulares a través de técnicas inmunocitoquímicas, centrándonos en marcadores de proliferación celular (Ki-67), precursores neuronales (Sox2, Nestina, Vimentina) y neuronas maduras (MAP2), así como en el marcador de células gliales, GFAP.

Para estudiar la **proliferación** en la línea celular hNS1 se utilizó el marcador Ki-67, una proteína nuclear que se expresa en todas las fases del ciclo celular, excepto en la fase G0, cuando las células no se están dividiendo activamente (Sun & Kaufman, 2018). Se observó una disminución en la expresión del marcador de Ki-67, tras la eliminación de los factores FGF2 y EGF. Esta disminución significativa al tercer día de diferenciación, sin los mitógenos, sugiere una disminución en la división celular y una transición activa hacia la diferenciación. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores donde se demuestra que la línea celular inmortalizada hNS1 prolifera en presencia de los mitógenos FGF2 y EGF y deja de dividirse al suprimir los mismos, llevando a su diferenciación (Villa et al., 2000).

Para la identificación de **precursores neuronales** en el cultivo celular de la línea hNS1, se emplearon los marcadores Sox2, Nestina y Vimentina. Se observó una disminución significativa en los niveles de Sox2 y Nestina a partir del tercer día de diferenciación, acorde al progreso de la diferenciación neural. En un estudio previo se ha corroborado esta tendencia al observar altos niveles de células positivas para los marcadores Nestina y Sox2 en células hNS1 durante su fase proliferativa. Conforme avanza la diferenciación celular se observa una reducción gradual en la expresión de Nestina y Sox2 (Coronel et al., 2019), en consonancia con nuestros resultados. Por otro lado, el marcador Vimentina no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo, manteniéndose un alto porcentaje de células positivas (en torno al 90%). Además, se ha de destacar que la Vimentina muestra una expresión muy marcada en las neuritas de las neuronas diferenciadas (Fig. 4A, DIV 5 - 7). Estos resultados contrastan con estudios previos (Sandoval et al., 2019), y sugieren que tal vez la Vimentina no sea un marcador tan específico de precursores neurales como Sox2 y Nestina.

Por otro lado, se observó un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células hNS1 positivas para GFAP hasta el tercer día *in vitro*, seguido de una disminución y estabilización en niveles bajos durante los días siguientes. En contraste, la IMF de GFAP no mostró variaciones significativas entre los días, indicando una estabilidad por debajo del 20% en el nivel de expresión de GFAP. Estos hallazgos indican que durante la diferenciación celular, las células hNS1 mantienen bajos niveles de **células gliales** y no se puede concluir que aumenten de forma significativa con el tiempo. Este resultado contrasta con estudios previos, donde se observa un incremento significativo en los niveles de GFAP en células hNS1 en torno al día 4 - 5 de diferenciación y utilizando condiciones similares a las nuestras (Liste et al., 2007; Sandoval et al., 2019).

Una posible estrategia para incrementar la cantidad de células gliales en el cultivo es la adición del suplemento G5. Este suplemento contiene biotina, EGF, insulina y otros componentes con actividad antioxidante. El suplemento G5 es empleado para inducir el crecimiento y la expresión de células gliales tanto en cultivos primarios como en líneas celulares de tumores gliales (gliomas) (González & Aguilar, 2009).

Finalmente, se empleó el marcador MAP2 para evaluar la expresión de **neuronas** en el cultivo de la línea celular hNS1. Aunque el porcentaje de células positivas para MAP2 no presentó diferencias significativas a lo largo del tiempo, se observó un aumento significativo en la IMF en el séptimo día de diferenciación (7 DIV). Estos hallazgos sugieren un incremento progresivo de neuronas maduras con el tiempo, destacando la IMF como un

método más efectivo para cuantificar este incremento, ya que que MAP2 se encuentra principalmente concentrada en las neuritas.

La discrepancia entre los métodos de cuantificación puede deberse a la naturaleza de las mediciones. El método basado en la IMF podría ser más sensible a detectar cambios en la expresión total de MAP2, reflejando mejor la acumulación de esta proteína en los axones. En cambio, el cálculo del porcentaje de células positivas para MAP2 puede dar lugar a errores en la cuantificación manual ya que, en algunos casos, la proximidad de los axones hacía difícil distinguir si las neuritas pertenecían a una misma o a diferentes células. Este problema es más evidente en el caso de los organoides, donde la densidad de conexiones dificulta la cuantificación precisa mediante el método basado en el porcentaje de células positivas (ver últimos dos días en la figura 5A, marcador MAP2 en la tercera fila).

En nuestros experimentos, se observó que las células hNS1 se diferencian de manera rápida y eficiente al suprimir los mitógenos, y dan lugar a redes de neuronas maduras cuya interconexión incrementa con el tiempo de diferenciación. Sin embargo, las células gliales parecen mantener niveles constantes a lo largo del tiempo. Nuestro estudio ha comprobado algunas de las ventajas de las células hNS1, como su facilidad de cultivo y rápida diferenciación en neuronas. A pesar de estas ventajas, la proporción de células gliales se mantuvo en niveles bajos y constantes. Esta limitación podría abordarse mediante la adición del suplemento G5, como se mencionó anteriormente.

Diferenciación neural de la línea celular AND-2

Continuando con el primer objetivo, también se quiso caracterizar la diferenciación neural de la línea celular AND-2 en presencia de dos medios diferentes: N2/FBS y N2/NB. De la misma manera que con las hNS1, se analizaron los niveles de expresión de diversos marcadores celulares a través de técnicas inmunocitoquímicas. Los marcadores celulares fueron los mismos empleados en las células hNS1.

Para estudiar la **proliferación** en la línea celular AND-2 se utilizó el marcador Ki-67. La disminución significativa encontrada entre los días 4 y 18 de diferenciación para este marcador sugiere que en esta línea celular también cesa la división al suprimir los mitógenos FGF2 y EGF. Esta disminución se produce de manera más pronunciada y significativa en presencia del medio N2/FBS, donde se encuentra una diferencia significativa a partir del octavo día de diferenciación (8 DIV), a pesar de haber continuado los 4 primeros días en medio de proliferación. Tal vez por esta razón, se parte de un mayor número de células en proliferación a 4 DIV (casi del 100% frente al 70% en medio N2/NB). En presencia del medio

N2/NB no se encontraron diferencias significativas hasta el día 14 DIV. Estos resultados sugieren que al suprimir los mitógenos, las células AND-2 en presencia del medio N2/FBS cesan más rápidamente su división celular.

A continuación, las células comenzarían una transición activa hacia la diferenciación celular, como lo demuestra la disminución en la expresión de los marcadores de **precursores neurales**. Dicha disminución es bastante significativa en ambos medios para el marcador Nestina a partir de 14 DIV. No obstante, hay diferencias significativas entre ambos medios para el día 14 de diferenciación. Así, en presencia del medio N2/NB, la expresión de precursores neurales decae más rápidamente. En el estudio realizado por González-Sastre et al. (2024) se utilizó el medio N2/NB y obtuvieron resultados parecidos, reportando una disminución en los niveles de expresión del marcador Ki-67 y aumento de los marcadores de precursores neurales, aunque en este caso empleando organoides cerebrales cultivados en monocapa.

Algo parecido se encontró para el marcador de Vimentina en presencia del medio N2/NB, donde se encontró una disminución significativa a partir de 14 DIV. Por el contrario, el medio N2/FBS mantiene el porcentaje de células positivas para Vimentina elevado por más tiempo, y no disminuye de manera significativa hasta el día 18 DIV, sugiriendo que se mantienen los precursores neurales por más tiempo en dicho medio. También puede interpretarse que Vimentina no es un marcador de precursores tan sensible como Nestina a la diferenciación, lo que se asemeja a lo observado en células hNS1.

En vista de los resultados anteriores, se puede afirmar que las células AND-2 en presencia del medio N2/FBS cesan más rápidamente su proliferación pero mantienen precursores neuronales durante más tiempo en comparación con el medio N2/NB. Al trabajar con cultivos *in vitro*, es esencial considerar tanto la proliferación celular como la presencia de precursores neuronales para simular adecuadamente las características del cerebro en desarrollo. El ciclo celular y la proliferación de las células madre neurales están intrínsecamente ligados a su capacidad de autorrenovación, lo cual es fundamental para mantener la densidad celular y asegurar la generación de diversos tipos de neuronas y células gliales durante el desarrollo cerebral (Hernández et al., 2024).

Continuando con los marcadores de precursores neurales, el porcentaje de células positivas para Sox2 no pareció cambiar a lo largo del tiempo de diferenciación, manteniéndose en niveles altos para ambos medios. El marcador Sox2 también es indicador de pluripotencia. Es decir, las células AND-2 al tratarse de células pluripotentes, pueden mantener dicho

estado a lo largo del tiempo en presencia de un ambiente idóneo para la diferenciación y desarrollar diversos linajes celulares. Esto demuestra que a partir de estos cultivos en monocapa se puede volver a obtener cultivos de organoides cerebrales en 3D combinando la inhibición dual de SMAD con CHIR generando tejido neuroepitelial. A partir de aquí, se puede volver a comenzar el proceso que nosotros hemos descrito, disgregando los organoides y generando un suministro ilimitado de precursores neuronales, neuronas y células gliales (González-Sastre et al., 2024).

Por otro lado, al igual que con las hNS1 se empleó el marcador MAP2 para evaluar la expresión de neuronas maduras en el cultivo de la línea celular AND-2. En cuanto al porcentaje de células positivas entre los diferentes días para el marcador MAP2 se observó una disminución significativa con respecto al primer día. Sin embargo, el análisis de la IMF mostró un aumento significativo entre los días 4 y 18 DIV en presencia del medio N2/NB. Esta aparente discrepancia puede explicarse por los cambios en el patrón de expresión de MAP2 con la diferenciación; así, en los primeros días, la expresión de MAP2 es baja en intensidad y se restringe al citoplasma de la mayoría las células, mientras que a medida que las neuronas maduran la expresión de MAP2 aumenta, especialmente en las prolongaciones neuríticas, solo en aquellas que se diferencian claramente a neuronas. Por lo tanto, este resultado puede confirmar que con el paso del tiempo y la diferenciación aumenta la proporción de neuronas maduras en el cultivo de AND-2. Estos hallazgos concuerdan con lo encontrado por González-Sastre et al. (2024). Además, un estudio previo ha mostrado que células hiPSCs son significativamente positivas para MAP2 en el día 21 de diferenciación, con al menos un 10 % de células GFAP positivas (Pistollato et al., 2017).

Continuando con la diferenciación celular, se quiso cuantificar también la expresión del marcador GFAP de células gliales. Los resultados son algo sorprendentes ya que tanto para el porcentaje de células positivas como para la IMF parece haber una disminución significativa en ambos medios, lo que estaría indicando una disminución en la cantidad de glía con el paso del tiempo. A pesar de ello, la IMF mostró un aumento significativo entre los días 4 y 8 DIV en presencia del medio N2/FBS, a partir del octavo día de diferenciación disminuyó. Esto contrasta con estudios previos donde se observó un aumento en los niveles de GFAP con el paso de la diferenciación, aunque dichas observaciones se realizaron en un periodo de tiempo más prolongado (Paşca et al., 2015). Por tanto, es posible que se requieran periodos más largos de diferenciación, y tal vez la adición de factores de crecimiento como GDNF, para obtener una mayor proporción de glía. (Jaumotte et al., 2014).

Al igual que se discutió para las hNS1, también sería de utilidad realizar ensayos que incluyeran el suplemento G5 para comprobar si con esta estrategia se ve un aumento significativo en la expresión de GFAP con el paso del tiempo. (González & Aguilar, 2009).

En resumen, los hallazgos encontrados para la línea celular AND-2 sugieren que el protocolo desarrollado en el presente trabajo, adaptado de González-Sastre et al. (2024), permite el desarrollo de cultivos en monocapa a partir de organoides cerebrales de 2 semanas de edad. Dicha línea celular, en presencia del medio N2/FBS parece cesar más rápidamente la división celular pero mantienen precursores neuronales durante más tiempo. Para el medio N2/NB puede decirse que la proporción de precursores neuronales es la que disminuye de manera rápida llevando a un aumento de neuronas maduras, como así lo demuestra la alta IMF de MAP2 para dicho medio en el último día de diferenciación (18 DIV). Además en ambos medios se mantiene un estado de pluripotencia lo que es una ventaja ya que se puede obtener un reservorio ilimitado gracias a la capacidad de autorrenovación que la pluripotencia ofrece. La proporción de glía en ambos medios disminuyó, utilizando los dos métodos de cuantificación (porcentaje de células positivas e IMF).

Sinaptogénesis de la línea celular AND-2

A pesar de la poca información sobre la línea celular AND-2, en un estudio se analizó el marcador de vesículas sinápticas, Sinapsina 1 en cultivos 3D de esta misma línea celular. La sinapsina es una proteína neuronal crucial en la regulación de la liberación de neurotransmisores en la sinapsis. A lo largo del proceso de maduración (unos dos meses), los niveles de Sinapsina 1 aumentaron sugiriendo un aumento de la sinapsis con el tiempo (González-Sastre et al., 2024).

En nuestro caso, se cuantificó la sinaptogénesis mediante los marcadores Sinaptofisina (marcador presináptico) y PSD95 (marcador postsináptico). En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas por lo tanto no se puede afirmar la existencia de sinaptogénesis en nuestros cultivos celulares. Estos resultados contrastan con otros estudios previos, en donde se han encontrado tendencias crecientes y significativas a partir de los 7 DIV en cultivos mixtos de glía y neuronas derivados de hiPSC (Pistollato et al., 2020). Es importante destacar que estos resultados fueron obtenidos mediante la cuantificación de la IMF de los marcadores exclusivamente en las neuritas, por lo que habría que tenerse en cuenta para la cuantificación de la sinaptogénesis en futuros experimentos.

Además, se analizó la cantidad total de puntos amarillos con el paso del tiempo, como una medida de la colocalización de ambos marcadores. En este caso tampoco se encontraron

diferencias significativas. Además, para ambos marcadores y para su colocalización se observó una tendencia decreciente, a pesar de no ser significativa. Esta tendencia decreciente fue totalmente inesperada ya que, lo lógico, es que según avanza la diferenciación y aumenta la cantidad de neuronas maduras haya mayores niveles de sinaptogénesis. Estos hallazgos también contrastan con los de Pistollato et al., (2020) en donde hubo una tendencia creciente con el paso del tiempo. Es posible que se requieran tiempos más largos de maduración para observar efectos en la sinaptogénesis. Además de lo comentado anteriormente sobre el método de cuantificación, sería interesante probar si añadiendo factores neurotróficos como el BDNF y GDNF al medio de cultivo se favorece la sinaptogénesis, como se ha descrito previamente (Pistollato et al. 2020).

La investigación sobre organoides cerebrales aún es incipiente, pero está en constante evolución gracias a las nuevas metodologías que van surgiendo. La tecnología de organoides cerebrales tiene el potencial de desarrollar ensayos funcionales para el análisis de fenotipos más complejos. Es fundamental que la comunidad científica llegue a un consenso sobre procedimientos estandarizados de protocolos, controles de calidad y gestión de datos (Sidhaye et al., 2021). Además, los organoides cerebrales fueron desarrollados evitando la previa formación de cuerpos embrionarios (EB), evitando las limitaciones que eso conlleva: estrés celular y apoptosis durante la disociación de las colonias celulares. (González-Sastre et al., 2024). Otra ventaja del uso de estos modelos *in vitro* es que pueden contribuir a reducir el uso de animales en la investigación y desarrollo de terapias para el sistema nervioso central (Rosca et al., 2022).

En resumen, en el presente estudio, hemos desarrollado un protocolo para diferenciar células madre neurales de la línea celular AND-2, proporcionando un modelo *in vitro* robusto que puede ser de gran utilidad para el estudio de procesos del neurodesarrollo (como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular) y los efectos de diferentes sustancias químicas en el desarrollo cerebral. Además, puede ser de utilidad para otros campos de estudios más recientes como los efectos de la radiación electromagnética en el desarrollo cerebral, lo que podría arrojar luz sobre los mecanismos subyacentes y las potenciales implicaciones para la salud (Hernández et al., 2024). No obstante, como se ha indicado, este protocolo requiere aún de optimización, en especial en lo relativo a favorecer la formación de sinapsis y la maduración completa de las neuronas.

En el presente estudio, hemos desarrollado una aproximación inicial hacia la automatización del conteo de células positivas. Esta metodología tiene el potencial de agilizar la obtención de resultados, reduciendo el tiempo necesario para los análisis y mejorando la eficiencia en

estudios relacionados con cultivos celulares, terapias con células madre e incluso estudios relacionados con el cáncer.

Algunas de las limitaciones de este estudio relacionadas con los organoides fueron sembrar una alta densidad de los mismos que dificultó la cuantificación, tanto manual como automática. Para futuros estudios se recomienda sembrar menor densidad de células y seguir mejorando el método de la cuantificación automática. Por otra parte, diferenciarlos en cultivos en monocapa (2D) limita la recreación de la arquitectura celular propia del cerebro en desarrollo y la complejidad y funcionalidad de los circuitos neuronales *in vivo* (Paşca et al., 2015).

Este trabajo está relacionado con el siguiente Objetivo de Desarrollo Sostenible: 3. Salud y bienestar, concretamente 3b, que promueve actividades de investigación que contribuyan al avance de la salud y bienestar mundial.

7. Conclusiones

La línea celular hNS1:

- Presenta una reducción en la proliferación celular y una transición activa hacia la diferenciación a partir del tercer día tras la eliminación de los mitógenos, evidenciada por la disminución en la expresión del marcador Ki-67.
- Presenta una progresiva disminución de los niveles de los marcadores de precursores neurales desde el tercer día en medio de diferenciación.
- Mantiene los niveles de glía constantes durante el periodo de diferenciación (en presencia del medio N2/FBS).
- Muestra un incremento en la diferenciación hacia neuronas, destacándose la intensidad media de fluorescencia como un método más eficaz para cuantificar dicho incremento.

La línea celular AND-2:

- En presencia del medio N2/FBS, cesa la proliferación más rápidamente pero mantiene los precursores neuronales durante un tiempo más prolongado en comparación con el medio N2/NB.
- Es capaz de mantener un estado de pluripotencia a lo largo del tiempo en un entorno adecuado para la diferenciación, permitiendo un suministro ilimitado de células.

- Presenta un aumento de neuronas maduras interconectadas entre sí asociado a un incremento en la IMF del marcador MAP2, siendo éste por tanto un método válido para la cuantificación de la madurez neuronal.
- Muestra una disminución de glía con el paso del tiempo bajo nuestras condiciones experimentales, observándose esta disminución tanto en el porcentaje de células positivas como en la intensidad media de fluorescencia.
- No muestra diferencias en la sinaptogénesis en el periodo de diferenciación estudiado.

8. Bibliografía

Carrel, A. (1912). On the permanent life of tissues outside of the organism. *The Journal of experimental medicine*, 15(5), 516.

Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature biotechnology*, 27(3), 275-280.

Coronel, R., Lachgar, M., Bernabeu-Zornoza, A., Palmer, C., Domínguez-Alvaro, M., Revilla, A., ... & Liste, I. (2019). Neuronal and glial differentiation of human neural stem cells is regulated by amyloid precursor protein (APP) levels. *Molecular neurobiology*, 56, 1248-1261.

González, E. A. H., & Aguilar, E. J. (2009). Evolución del medio de cultivo en el estudio de las células madre neuronales. *Rev Med UV*.

González-Sastre, R., Coronel, R., Bernabeu-Zornoza, A., Mateos-Martínez, P., Rosca, A., López-Alonso, V., & Liste, I. (2024). Efficient generation of human cerebral organoids directly from adherent cultures of pluripotent stem cells. *Journal of Tissue Engineering*, 15, 20417314231226027.

Hernández, J. A., Rosca, A., Suárez, S., Coronel, R., Suarez, O. J., Peran-Ramos, P., ... & Ramos, V. (2024). Background levels and brain organoid impact of RF field exposure in a healthcare environment. *Frontiers in Antennas and Propagation*, 2, 1357649.

Jaumotte, J. D., & Zigmond, M. J. (2014). Comparison of GDF5 and GDNF as neuroprotective factors for postnatal dopamine neurons in ventral mesencephalic cultures. *Journal of Neuroscience Research*, 92(11), 1425-1433.

- Lancaster, M.A., Knoblich, J.A., 2014. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 9, 2329–2340.
- Liste, I., Garcia-Garcia, E., Bueno, C., & Martinez-Serrano, A. (2007). Bcl-XL modulates the differentiation of immortalized human neural stem cells. *Cell Death & Differentiation*, 14(11), 1880-1892.
- Mahajan, G., Lee, M. Y., & Kothapalli, C. (2019). Biophysical and biomechanical properties of neural progenitor cells as indicators of developmental neurotoxicity. *Archives of toxicology*, 93(10), 2979-2992.
- Martínez-Morales, P. L., & Liste, I. (2012). Stem Cells as *In Vitro* Model of Parkinson' s Disease. *Stem cells international*, 2012(1), 980941.
- Martínez-Morales, P. L., Revilla, A., Ocaña, I., González, C., Sainz, P., McGuire, D., & Liste, I. (2013). Progress in stem cell therapy for major human neurological disorders. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9, 685-699.
- Paşca, A. M., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Tian, Y., Makinson, C. D., Huber, N., ... & Paşca, S. P. (2015). Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature methods*, 12(7), 671-678.
- Pistollato, F., Canovas-Jorda, D., Zagoura, D., & Price, A. (2017). Protocol for the differentiation of human induced pluripotent stem cells into mixed cultures of neurons and glia for neurotoxicity testing. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (124), e55702.
- Pistollato, F., de Gyves, E. M., Carpi, D., Bopp, S. K., Nunes, C., Worth, A., & Bal-Price, A. (2020). Assessment of developmental neurotoxicity induced by chemical mixtures using an adverse outcome pathway concept. *Environmental Health*, 19, 1-26.
- Rosca, A., Coronel, R., Moreno, M., González, R., Oniga, A., Martín, A., ... & Liste, I. (2020). Impact of environmental neurotoxic: current methods and usefulness of human stem cells. *Heliyon*, 6(12).

- Sandoval, L., Rosca, A., Oniga, A., Zambrano, A., Ramos, J. J., González, M. C., ... & Motas, M. (2019). Effects of chlorpyrifos on cell death and cellular phenotypic specification of human neural stem cells. *Science of The Total Environment*, 683, 445-454.
- Sidhaye, J., & Knoblich, J. A. (2021). Brain organoids: an ensemble of bioassays to investigate human neurodevelopment and disease. *Cell Death & Differentiation*, 28(1), 52-67.
- Singh, V. K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N., & Chandra, R. (2016). Describing the stem cell potency: the various methods of functional assessment and in silico diagnostics. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 134.
- Soler, B., Gigoux, J. P., Tagle, P., Von Bernhardi, R., & Fadic, R. (2007). Células Madre: Proyecciones de su uso en Neurología. *Cuadernos de Neurología*. XXXI.
- Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127, 175-186.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*, 282(5391), 1145-1147.
- Villa, A., Snyder, E. Y., Vescovi, A., & Martínez-Serrano, A. (2000). Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Experimental neurology*, 161(1), 67-84.