



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Evaluación del uso de organoides cerebrales derivados de iPSC humanas en la investigación farmacológica de la enfermedad de Alzheimer

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2026

Autora: Laura González Párraga

Tutor: Javier Sáez Valero

Modalidad: Revisión bibliográfica

ÍNDICE DE CONTENIDOS:

1	Introducción.....	3
1.1	Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer	3
1.2	Modelos preclínicos en la enfermedad de Alzheimer	6
2	Objetivos	13
3	Justificación	13
4	Material y métodos	14
4.1	Diseño	14
4.2	Estrategia de búsqueda.....	14
4.3	Selección final de los artículos	16
5	Resultados	17
5.1	Definición	17
5.2	Desarrollo.....	17
5.3	Uso en la investigación farmacológica de la enfermedad de Alzheimer.....	21
6	Discusión y conclusión	31
7	Bibliografía.....	36

1 Introducción

1.1 Neuropatología de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer disease*) se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas y constituye actualmente la causa más frecuente de demencia en la población mundial. Se estima que entre el 60 % y el 80 % de los casos de demencia en personas mayores de 65 años están asociados a esta patología. Desde el punto de vista clínico, su evolución suele dividirse en una fase preclínica, seguida de un deterioro cognitivo leve y, finalmente, demencia debida a AD.^{1,2}

Una fracción menor, menos del 5% de todos los casos de AD, se relaciona con variantes de inicio precoz de la enfermedad, en las que los signos clínicos surgen antes de los 65 años y es conocida como enfermedad de Alzheimer familiar (FAD, del inglés *Familial Alzheimer's Disease*). Parte de estos casos de inicio temprano presentan un patrón hereditario autosómico dominante en los genes que codifican *APP* (codificadora de la proteína precursora amiloide o APP), *PSEN1* (presenilina1 o PS1) y *PSEN2* (presenilina 2 o PS2).² Muchos de los casos de inicio temprano, aunque se sospecha puedan tener componente genético, no son FAD debidos a las mutaciones descritas.^{2,3}

En contraste, la mayoría de los casos de AD son de inicio tardío, lo que quiere decir que aparece a partir de los 65 años y de forma esporádica. En estos casos, no se trata de una enfermedad hereditaria y no muestra una causa genética única; aunque la evidencia actual respalda la existencia de factores de riesgo de carácter genético, siendo el más significativo la detección del alelo $\epsilon 4$ en el gen *APOE* que codifica la apolipoproteína E (apoE).^{1,2}

A nivel neuropatológico, la AD se caracteriza por una serie de alteraciones estructurales que reflejan la progresión del proceso neurodegenerativo. Entre ellas destacan las denominadas lesiones positivas, asociadas a la acumulación anómala de proteínas, que incluyen depósitos extracelulares conocidos como placas amiloides y agregados intracelulares denominados ovillos neurofibrilares. También puede observarse hilos de neuropilo, neuritas distróficas y otros tipos de depósitos presentes en el tejido cerebral de

pacientes afectados. Por otro lado, las lesiones negativas (por pérdida), relacionadas con procesos degenerativos, como la marcada atrofia cerebral producida por la pérdida neuronal y de las conexiones sinápticas.^{3,4} Asimismo, se ha descrito la participación de otros mecanismos que contribuyen al daño neuronal, entre los que destacan la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la afectación de las neuronas colinérgicas.^{5,6}

Entre estos cambios, sin duda los más diferenciales que caracterizan la AD son:

a) Placas seniles

Las placas seniles hacen referencia a los depósitos extracelulares del péptido β -amiloide o $A\beta$.⁷

Este péptido $A\beta$ se genera por la fragmentación de la proteína transmembrana denominada proteína precursora amiloide (APP del inglés *amyloid precursor protein*), que puede ser procesada por distintas vías. En condiciones fisiológicas, el procesamiento de la proteína APP ocurre principalmente a través de la vía no amiloidogénica, en la que actúan las enzimas α -secretasa y γ -secretasa, que no generan fragmentos amiloides. No obstante, también tiene lugar la vía amiloidogénica, en la que la β -secretasa actúa en conjunto con la γ -secretasa, generando el referido $A\beta$ de unos 36-43 aminoácidos, siendo la forma mayoritaria el $A\beta_{40}$ (de 40 aminoácidos). Estos péptidos se producen de forma normal y son eliminados eficazmente, por lo que no resultan tóxicos en condiciones fisiológicas.^{8,9}

El componente catalítico de la γ -secretasa es la PS1 (o su homóloga PS2), cuyas mutaciones se asocian a FAD. Como se ha comentado anteriormente, las mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* determinan las formas FAD, al alterar el procesamiento y generación de los péptidos $A\beta$ y facilitar la formación de las isoformas $A\beta_{42}$ (42 residuos) frente a las $A\beta_{40}$. Aunque el $A\beta$ no es tóxico *per se* y tiene actividades biológicas conocidas, la generación de un exceso de $A\beta$, y en particular de $A\beta_{42}$, favorece la formación de oligómeros con alto potencial amiloidogénico y neurotóxico, que finalmente da lugar a agregados

insolubles que tienden a agruparse formando las placas amiloides (Figura 1).^{8,9}

De este modo, el péptido A β , mayormente en su forma de oligómero soluble con participación de una alta proporción de A β 42, es el efector de la neurotoxicidad, produciendo daño en dendritas y axones, provocando la pérdida de sinapsis y finalmente el deterioro cognitivo. Cuando A β se acumula, especialmente las placas más densas, en el hipocampo, corteza del cerebro y amígdala, activa la microglía y astrocitos, contribuyendo patológicamente a la AD.¹⁰

b) Ovillos neurofibrilares (NFT del inglés *neurofibrillary tangles*)

Se denomina ovillos neurofibrilares a los filamentos anormales de la proteína citoesquelética tau hiperfosforilada. La proteína tau se une a los microtúbulos para estabilizarlos y mantener su estructura en las neuronas y ello lo controla mediante fosforilación/desfosforilación. Cuando tau se vuelve hiperfosforilada de forma anómala, forma los NFT.¹¹

Estos NFT se forman a partir de los filamentos helicoidales apareados (PHF del inglés *paired helical filaments*) al enroscarse entre sí, y se pueden acumular en el interior de la célula nerviosa, dendritas y axones. Esto tiene como consecuencia un deterioro de microtúbulos citoesqueléticos y el colapso del citoplasma llevando a la muerte neuronal.¹²

En las primeras etapas de la AD, la acumulación de tau patológica en neuronas afecta a la función sináptica antes de que ocurra la muerte celular. Esto se traduce en pérdida de memoria temprana, alteración de la comunicación entre neuronas y reducción de sinapsis funcionales. Mecanismos asociados incluyen estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y fallos en el transporte axonal, procesos que pueden interactuar con la acumulación de tau y A β en sitios sinápticos, contribuyendo al deterioro cognitivo progresivo.¹³

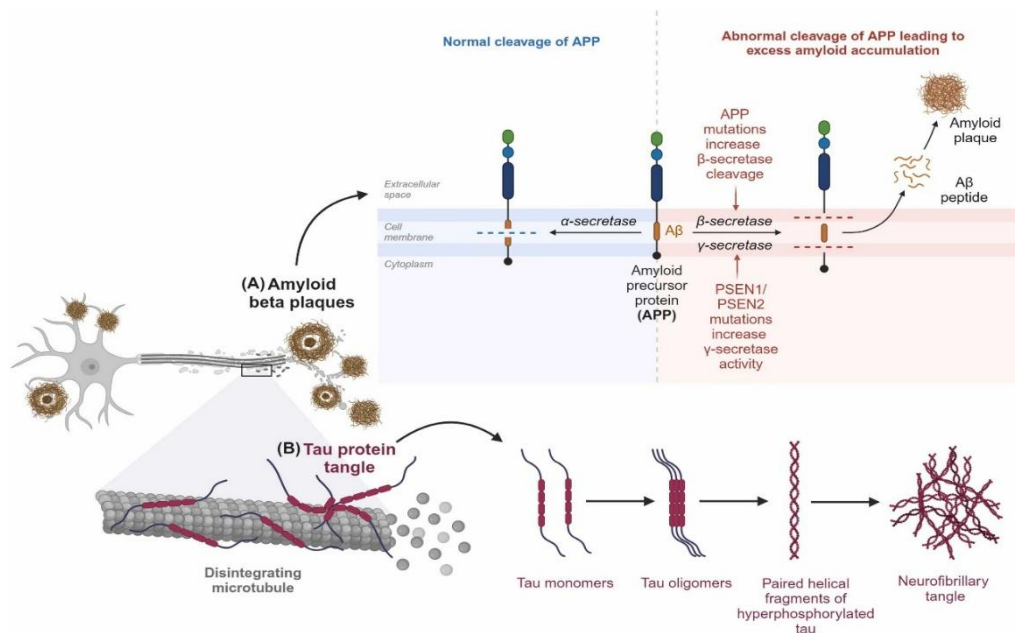


Figura 1. Neuropatología de la AD. Esta figura ilustra la formación de placas seniles y NFT. Se acumulan placas seniles compuestas por péptido A β , producto de la escisión anómala de la APP por la β -secretasa y la γ -secretasa; en condiciones normales, la APP es escindida por la α -secretasa en conjunto con la γ -secretasa, evitando la formación de fragmentos amiloides. Mutaciones en genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* favorecen este procesamiento patológico. Paralelamente, la proteína tau cuando está hiperfosforilada patológicamente, se desprende de los microtúbulos para producir los NFT.¹⁴

1.2 Modelos preclínicos en la enfermedad de Alzheimer

Los modelos experimentales de la AD son fundamentales para profundizar en su patogénesis, estudiando los mecanismos implicados, y para evaluar el potencial de nuevas terapias. La mayor parte de las investigaciones hacen uso de ratones transgénicos, en particular modelos transgénicos basados en la sobreexpresión de la proteína APP y PS1 humanas, por lo tanto son modelos de FAD. Además, suelen complementarse con la sobreexpresión de mutaciones en tau, las cuales no están presentes en la AD, pero sí en otras tauopatías, ya que, de lo contrario, los roedores no desarrollarían patología tau.¹⁵

Más allá del modelo específico que se utilice, todos los investigadores comparten un mismo objetivo: encontrar una terapia capaz de frenar o eliminar el avance de la enfermedad. Para lograrlo, es fundamental elegir un modelo experimental que reproduzca de la forma más fiel posible el daño

cerebral característico de esta enfermedad, con el propósito de desarrollar un tratamiento efectivo y seguro.

a) Modelos animales

Desde hace mucho tiempo, los modelos animales, dada su capacidad de manipulación, han sido ampliamente utilizados como sistemas experimentales para estudiar los mecanismos biológicos y la evolución de diversas enfermedades, incluida la AD. El objetivo principal al usar estos modelos es imitar lo más fielmente posible una condición que también se presenta en humanos. Aunque no siempre es posible, ya que en muchas ocasiones los animales no presentan la patología en cuestión, se espera que los hallazgos obtenidos en estos estudios puedan aplicarse a la comprensión y tratamiento de dichas condiciones en personas.¹⁵

Para realizar los experimentos, se puede trabajar tanto con modelos animales no transgénicos, que no han sido modificados genéticamente y pueden presentar la patología de forma natural, así como con modelos transgénicos, en los que se introduce una modificación genética específica para estudiar mecanismos de la enfermedad o inducir condiciones patológicas particulares.¹⁶

En el caso de los modelos no transgénicos, se utilizan principalmente para analizar aspectos específicos que no se limitan únicamente al origen de la enfermedad, como por ejemplo, las interacciones entre distintas proteínas o las alteraciones en el comportamiento.¹⁶ En la mayor parte de los casos, y refiriéndonos a patologías neurológicas, para generar determinados síntomas, se provocan lesiones específicas en zonas concretas del cerebro. Ya concretando en la AD, también es posible inducir el déficit en ciertos neurotransmisores, con el fin de afectar las neuronas colinérgicas de manera semejante a lo que ocurre en la patología, o también se puede administrar la proteína A β directamente en el cerebro para reproducir el daño característico amiloide.¹⁷ Por otro lado, hay modelos animales que manifiestan síntomas

similares de forma natural, sin requerir manipulaciones humanas. Un ejemplo de esto se observa en los perros, que al envejecer pueden desarrollar síntomas similares a la demencia en humanos, acompañado por la acumulación de placas A β , aunque no desarrollan NFT.¹⁸ Por ello, se emplean perros de edad avanzada para probar tratamientos destinados a disminuir la acumulación de A β y, como consecuencia, favorecer la mejora de las funciones cognitivas.¹⁹ Por otro lado, en los primates no humanos como el mono Rhesus, se refleja tanto la neuropatología como los deterioros cognitivos típicos de la AD. No obstante, más allá de cuestiones éticas, el uso de estos modelos resulta muy costoso y exige condiciones de mantenimiento estrictas para los animales experimentales, además de la desventaja de una vida útil bastante prolongada, lo que hace que no siempre sea una alternativa rentable y viable.²⁰

Pero dado que ningún animal más allá del hombre sufre AD, los modelos animales más empleados para el estudio de la AD son los modelos transgénicos. Estos modelos empleados se desarrollan a partir de información obtenida de las variantes hereditarias, FAD, que son considerablemente menos comunes que las formas esporádicas, pero no presentan diferencias clínicas ni histopatológicas significativas con la AD esporádica. Por ello, los genes más empleados en la obtención de modelos transgénicos son aquellos que codifican para *APP*, *PSEN1* y, en menor medida, *PSEN2*.²¹

Los modelos transgénicos pueden generarse mediante diferentes estrategias. Una de ellas consiste en introducir genes humanos mutados en embriones de otros organismos, habitualmente ratones, empleando promotores que favorecen una elevada expresión en el sistema nervioso. Alternativamente, en los modelos knock-in se sustituye el gen original del animal por su equivalente humano mutado, conservando los mecanismos de regulación propios del organismo, lo que permite mantener niveles de expresión fisiológicos. Por otro lado, los modelos knock-out se basan en la inactivación específica de determinados genes, con el objetivo de estudiar la pérdida de su función.²²

La mayor parte de los modelos transgénicos empleados en el estudio de la AD corresponden a ratones, esto se debe a que su genética está altamente estudiada, lo que facilita su manipulación experimental. Además, presentan ventajas prácticas como un ciclo de vida reducido y menores costes de mantenimiento. Aunque estos animales no desarrollan de forma natural la AD, resultan una buena alternativa para incorporar mutaciones genéticas y lograr que se expresen las proteínas implicadas en la patología, como la A β y tau.²³

Además de los ratones, las ratas también se emplean en el estudio de la AD, debido a la presencia de ciertas características fisiológicas, morfológicas y genéticas comparables a las humanas. Sin embargo, los ratones siguen siendo el modelo más utilizado, principalmente por la amplia disponibilidad de herramientas de manipulación genética y la existencia de numerosas líneas transgénicas bien caracterizadas.²⁴

Además de los modelos murinos, también se emplean otros organismos como *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Caenorhabditis elegans* (gusano redondo) y *Danio rerio* (pez cebra). Estas especies ofrecen ventajas experimentales, ya que su menor complejidad genética y su rápido ciclo de vida facilitan la realización de estudios en menos tiempo. Sin embargo, debido a su menor grado de similitud con la fisiología humana, su uso suele ser complementario y más limitado en comparación con modelos de mamíferos.^{25,26}

A pesar de los avances obtenidos gracias al uso de modelos animales en la AD, una de sus principales limitaciones es su incapacidad para reproducir con fidelidad la fisiopatología humana, ya que no constituyen sistemas biológicamente equivalentes al sistema nervioso humano. Esta discrepancia entre especies limita la validez traslacional y la aplicabilidad clínica de los resultados obtenidos. En este sentido, diversos estudios han señalado diferencias anatómicas, genéticas y fisiológicas relevantes entre los modelos animales y el cerebro humano. Aunque estos modelos ofrecen ventajas importantes, como su facilidad de manejo y la posibilidad de manipulación experimental, no logran reflejar completamente procesos clave como

determinadas variantes genéticas o la complejidad de las vías de señalización. Además, pocos modelos reproducen adecuadamente el envejecimiento, un factor fundamental en el desarrollo de la enfermedad.²⁷

b) Modelos celulares

El desarrollo de modelos celulares fisiológicamente relevantes representa una herramienta clave para investigar los mecanismos de las enfermedades en un contexto que refleje con mayor fidelidad la biología humana. Disponer de sistemas que reproduzcan niveles de expresión génica cercanos a los fisiológicos y que incluyan los tipos celulares específicamente afectados, permite profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la AD. Asimismo, estos modelos facilitan la traslación de los hallazgos a un contexto humano y contribuyen al desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces.²⁸

En las investigaciones recientes sobre la AD, se recurre con mayor frecuencia a diversos tipos de células madre, incluyendo las células madre embrionarias (ESCs del inglés *Embryonic Stem Cells*), las células madre mesenquimales (MSCs del inglés *Mesenchymal Stem Cells*), las células madre neurales (NSCs del inglés *Neural Stem Cells*) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs del inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*).²⁹

De todas ellas, las iPSCs han adquirido un papel especialmente relevante como modelos celulares en la AD. Por el contrario, los otros tipos de células madre han sido estudiados principalmente con fines terapéuticos en enfermedades neurológicas, aunque su aplicación en esta patología presenta limitaciones. Estas dificultades se relacionan, entre otros factores, con la complejidad de trasladar las terapias celulares a la práctica clínica y con el carácter difuso del daño cerebral en la AD, que no se restringe a una única región.²⁹

En este contexto, las iPSC han supuesto un avance significativo. En 2007, se publicó la descripción de la generación de iPSC a partir de células

somáticas humanas, como fibroblastos de la piel o células sanguíneas, mediante la introducción de factores de transcripción específicos, conocidos como factores de Yamanaka. Este proceso permite reprogramar células diferenciadas hacia un estado pluripotente, dotándolas de la capacidad de diferenciarse posteriormente en diversos tipos celulares.³⁰ La diferenciación se logra mediante la aplicación secuencial de medios de cultivo específicos, factores de crecimiento y pequeñas moléculas moduladoras. Estas estrategias *in vitro* pueden organizarse según la dimensionalidad del cultivo: los sistemas 2D generan poblaciones celulares relativamente simples y fáciles de analizar, mientras que los modelos 3D presentan una mayor complejidad estructural, reproduciendo con mayor fidelidad las interacciones celulares y la organización tisular característica de procesos como el desarrollo neuronal.³¹ Dentro de los modelos 2D, se han diferenciado iPSC en diversos tipos celulares, incluyendo neuronas,³² astrocitos,³³ oligodendrocitos³⁴ y microglía.³⁵ Por otro lado, dentro de los modelos 3D, destacan los organoides cerebrales, los cuales pueden incluir uno o diversos tipos de células cerebrales derivadas de iPSC. Estos modelos tridimensionales han permitido reproducir depósitos de A β y NFT, estructuras que se observan con baja frecuencia en cultivos celulares 2D.³¹

Actualmente en las investigaciones basadas en iPSC para la AD, se generan líneas de individuos sanos y de pacientes, que posteriormente se diferencian en los tipos celulares de interés y luego se comparan para identificar fenotipos asociados al estado patológico. Aunque la comparación entre líneas presenta desafíos técnicos (ver a continuación comentario sobre líneas isogénicas), estas aproximaciones permiten estudiar tanto formas FAD como esporádicas de la enfermedad, utilizando controles de edad y sexo similares. La capacidad de generar células cerebrales a partir de iPSC de un individuo concreto ofrece además un importante potencial para la medicina personalizada, al permitir la investigación de alteraciones específicas de cada paciente que puedan contribuir a la patología.³⁶

Si bien los modelos derivados de iPSC de pacientes capturan la complejidad genética individual de la AD, la variabilidad genética entre los diferentes

donantes puede dificultar la comparación e interpretación de los resultados experimentales. Para eliminar la variabilidad genética interindividual y aislar el efecto de una mutación específica, se emplean líneas isogénicas, generadas a partir de la misma base genética y que difieren únicamente en la presencia o ausencia de la mutación de interés. La comparación entre la línea control y la línea mutada isogénicas, permite analizar de manera precisa los efectos de estas mutaciones específicas. La introducción de la tecnología CRISPR/Cas9 ha sido fundamental para desarrollar estas líneas, ya que posibilita introducir o corregir mutaciones concretas en genes implicados en la AD de forma dirigida, sin alterar el resto del genoma. Esta estrategia permite atribuir con mayor certeza los fenotipos observados a la mutación específica y no a otras variaciones genéticas.^{37,38,39,40} En el estudio de la AD esporádica (no causada por una mutación genética clara), una estrategia experimental consiste en exponer las células a A β exógeno, principalmente A β 42, y comparar las respuestas entre células tratadas y no tratadas.⁴¹

A pesar de que puede resultar difícil que A β u otros tratamientos lleguen a las células más profundas de los organoides, estos modelos permiten reproducir con mayor fidelidad las complejas interacciones celulares y la organización estructural del cerebro, lo que confiere a los organoides un mayor potencial como modelo traslacional para la investigación de la AD.⁴²

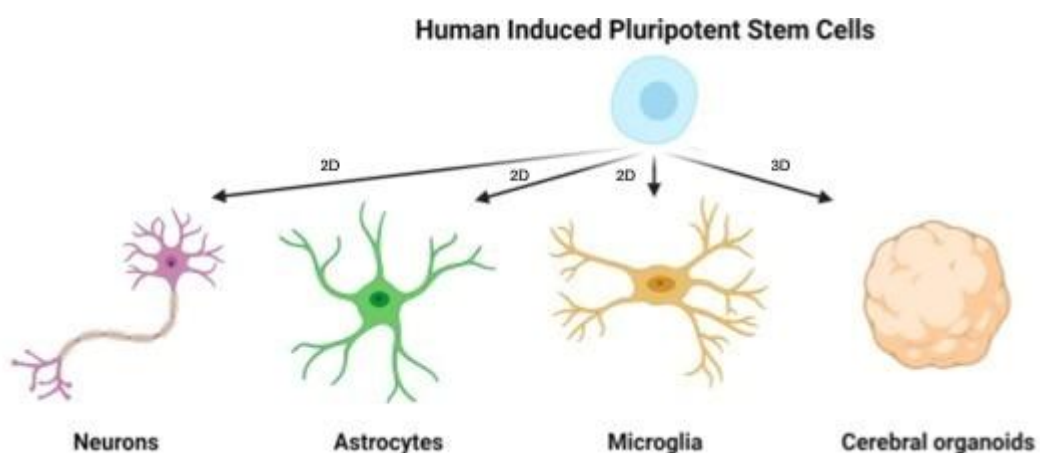


Figura 2. Esta figura muestra la diferenciación de las iPSC en los diferentes modelos 2D o 3D.³¹

2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo se basa en analizar el uso de organoides cerebrales derivados de iPSC humanas en la investigación farmacológica de la AD, considerando su potencial para el avance en la comprensión de la patología, así como su utilidad para el testaje de nuevas estrategias terapéuticas.

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

- Exponer brevemente el proceso de obtención de organoides cerebrales derivados de iPSC humanas con relevancia para el estudio de la AD.
- Analizar estudios recientes que han empleado organoides cerebrales derivados de iPSC humanas para reproducir mecanismos patológicos clave de la AD.
- Examinar investigaciones recientes que han empleado organoides cerebrales derivados de iPSC humanas como plataforma para la evaluación de nuevas vías terapéuticas en la AD.
- Discutir sobre las dificultades actuales y las perspectivas futuras del desarrollo farmacológico basado en estos modelos.

3 Justificación

La AD constituye la patología neurodegenerativa más prevalente y la principal causa de demencia. Esta patología de relevancia clínica afecta no solo a los pacientes, sino que también tiene un impacto considerable en sus familias y en la sociedad en su conjunto. Asimismo, el progresivo envejecimiento de la población mundial contribuye a un aumento sostenido de la incidencia de la enfermedad, lo que supone un desafío creciente para los sistemas de salud pública.^{43,44,45}

A pesar de la implementación de múltiples enfoques y el uso de una amplia variedad de modelos experimentales, la prevalencia de la AD continúa incrementándose, y aún no existen terapias efectivas disponibles. Aunque diversas estrategias han mostrado resultados prometedoras en modelos de AD en roedores, dichos efectos no se han traducido en beneficios clínicos,

evidenciando las limitaciones de los modelos preclínicos tradicionales. En este contexto, las tecnologías basadas en iPSC humanas, en concreto los organoides cerebrales, han revolucionado la investigación preclínica, constituyendo un enfoque clave para avanzar en la comprensión y el estudio de la enfermedad.^{46,47}

4 Material y métodos

4.1 Diseño

Para la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado, se llevó a cabo una revisión bibliográfica sistemática. Este enfoque metodológico consiste en una evaluación crítica, estructurada y reproducible de la literatura científica existente sobre un tema en concreto, con la finalidad de sintetizar la mejor evidencia científica actual y de responder a los objetivos planteados.

La búsqueda de los artículos científicos se centralizó en la base de datos Medline, a través de PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), considerada como la principal fuente bibliográfica a nivel mundial en el campo de las ciencias de la salud.

4.2 Estrategia de búsqueda

La estrategia de búsqueda en Medline se diseñó combinando descriptores de ciencias de la salud (MeSH) con términos de lenguaje libre (keywords) en los campos de título y resumen ([tiab]) para maximizar la sensibilidad de la recuperación. La ecuación de búsqueda final empleada fue la siguiente:

((("brain organoid"[tiab] OR "cerebral organoid"[tiab] OR "neural organoid"[tiab]) AND ("Alzheimer Disease"[Mesh] OR "Alzheimer"[tiab] OR "AD"[tiab]) AND ("Induced Pluripotent Stem Cells"[Mesh] OR "induced pluripotent stem cell"[tiab] OR "iPSC"[tiab]))

La estrategia se estructuró en tres bloques temáticos para garantizar la máxima recuperación de información. En el primer bloque, referido a los

organoides, se hizo uso de lenguaje libre con la etiqueta [tiab] (título y resumen), ya que actualmente no existe un término MeSH específico que englobe todas sus variantes; además, se aplicó el truncamiento mediante un asterisco (organoid*) para localizar tanto el singular como el plural del término. En el segundo bloque, dedicado al Alzheimer, se combinó el descriptor oficial "Alzheimer Disease"[Mesh] con términos de lenguaje libre en el título y resumen, asegurando así la obtención de artículos recientes que aún no han sido etiquetados bajo el descriptor oficial. Finalmente, el tercer bloque sobre células madre pluripotentes inducidas, se integró el término controlado "Induced Pluripotent Stem Cells"[Mesh] junto con términos de lenguaje libre en el título y resumen para recuperar estudios que hacen uso de la terminología completa o el acrónimo técnico más común actualmente, evitando la pérdida de evidencia por variaciones de nomenclatura.

Estos tres bloques se combinaron haciendo uso del operador booleano AND.

Concepto	Términos de Búsqueda
Concepto 1: Brain Organoids	"brain organoid*" [tiab] OR "cerebral organoid*" [tiab] OR "neural organoid*" [tiab]
Concepto 2: Alzheimer	"Alzheimer Disease" [Mesh] OR "Alzheimer*" [tiab] OR "AD" [tiab]
Concepto 3: iPSC	"Induced Pluripotent Stem Cells" [Mesh] OR "induced pluripotent stem cell*" [tiab] OR "iPSC*" [tiab]
Ecuación Final	(Concepto 1) AND (Concepto 2) AND (Concepto 3)

Tras la búsqueda de la ecuación anterior, y para garantizar la pertinencia, actualidad y calidad de los artículos científicos analizados en este trabajo, se aplicaron una serie de filtros. En primer lugar, se hizo uso de los filtros *Abstract* y *Full Text*, lo que permitió realizar una evaluación preliminar de la pertinencia de los artículos y posteriormente un análisis crítico más profundo de los resultados. En cuanto al idioma, la búsqueda se limitó a publicaciones en inglés y español, garantizando el acceso a la producción científica internacional y regional, sin afectar la exactitud en la interpretación de información.

Asimismo, se hizo uso del filtro *Humans*, ya que el enfoque del estudio está dirigido al modelado de la enfermedad de Alzheimer mediante iPSC humanas; esto permitió asegurar que los trabajos seleccionados se basaran en procesos biológicos humanos y no en modelos animales. Por último, la búsqueda se restringió a publicaciones correspondientes a los últimos cinco años (2021-2026), un criterio importante teniendo en cuenta la constante evolución de la tecnología de los organoides cerebrales, garantizando que el trabajo recoja los avances más recientes y precisos hasta la fecha actual.

4.3 Selección final de los artículos

Tras la ejecución de la estrategia de búsqueda explicada anteriormente en la base de datos Medline, se identificaron un total de 67 artículos. El proceso de selección de los artículos se estructuró en dos etapas. En primer lugar, se filtraron los artículos mediante la lectura del título y del resumen (*Abstract*) para evaluar su adecuación temática. Posteriormente, aquellos artículos que resultaron de interés fueron seleccionados para una lectura crítica del texto completo, con el fin de extraer información pertinente para cumplir los objetivos propuestos en la investigación. Finalmente, se analizaron un total de 51 artículos.

5 Resultados

5.1 Definición

Los organoides cerebrales son estructuras tridimensionales generadas a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que, en condiciones de cultivo adecuadas, se autoorganizan de manera espontánea y reproducen, a pequeña escala, aspectos clave del desarrollo y la organización del cerebro humano.^{48,49} Están formados por distintos tipos celulares cerebrales que interactúan entre sí y siguen programas de diferenciación propios del tejido cerebral, lo que les permite adquirir funciones especializadas similares a las del cerebro real.⁴⁸ Gracias a su arquitectura 3D, que favorece interacciones celulares reales, los organoides cerebrales constituyen una herramienta valiosa para el estudio de la AD.^{49,50} En particular, cuando se generan a partir de iPSC de pacientes con esta patología, pueden reproducir (con inducción en casos de AD esporádico o directamente para FAD) alteraciones moleculares, celulares y funcionales características, como la acumulación de A β , la hiperfosforilación de tau, la disfunción sináptica y la muerte neuronal.^{48,49} Asimismo, la aplicación de tecnologías de edición génica como CRISPR/Cas9 permite introducir o corregir mutaciones asociadas a la enfermedad, facilitando la obtención de modelos isogénicos y el análisis más preciso de los mecanismos moleculares implicados en la AD.⁵⁰

5.2 Desarrollo

El desarrollo de organoides puede realizarse principalmente mediante dos estrategias: el método guiado y el método no guiado, que difieren en el grado de control externo sobre la diferenciación celular. Independientemente de la estrategia empleada para la generación de organoides, el proceso se fundamenta en una serie de etapas iniciales comunes que incluyen la obtención de células somáticas y su reprogramación a iPSC.⁵¹

Como se menciona anteriormente, el primer paso es la obtención de células somáticas. Los fibroblastos de origen cutáneo, los cuales se obtienen a

través de una biopsia cutánea, representan la fuente principal de iPSC entre las células somáticas humanas. Tras su obtención, las células somáticas son sometidas a un proceso de reprogramación celular con el fin de que vuelvan a un estado pluripotente, es decir, con la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse en distintos tipos celulares derivados de las tres capas germinales. Esta reprogramación se logra normalmente, y como se explicó anteriormente, mediante la expresión de los factores de Yamanaka (OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) en las células, generalmente a través de vectores virales que transportan los genes que codifican dichos factores. La expresión de estos factores permite modificar la expresión génica celular y restablecer un estado pluripotente.^{51,52}

Una vez obtenidas y caracterizadas, las iPSC pueden cultivarse en condiciones tridimensionales (3D) que favorecen su agregación y posterior diferenciación. A partir de este punto, el destino celular y la organización tisular dependerán de la estrategia de diferenciación usada, ya sea mediante un enfoque guiado o no guiado.

El método de diferenciación no guiado se apoya en la capacidad natural de las células para organizarse y diferenciarse por sí mismas, sin necesidad de añadir señales externas específicas. El proceso comienza cultivando las iPSC en suspensión para que formen los cuerpos embrioides (EB), que son agregados celulares tridimensionales donde las células empiezan a interactuar y organizarse de manera similar a un embrión temprano. Estos EB se trasladan a unos pocillos en medio de inducción neural, lo que genera el tejido neuroectodérmico, es decir, capas de células que recuerdan al tejido que dará lugar al sistema nervioso en el desarrollo embrionario. A continuación, estas estructuras se encapsulan en gotas individuales de Matrigel que, tras solidificarse, se cultivan en un medio de diferenciación sin agitación. Posteriormente, las gotas se transfieren a un biorreactor rotatorio que favorece la viabilidad a largo plazo de los organoides, mejorando la difusión de oxígeno, nutrientes y desechos y promoviendo su desarrollo continuo. Los organoides cerebrales obtenidos por este método presentan niveles de organización similares a los de regiones cerebrales y gran

diversidad celular, aunque el control sobre la diferenciación y su reproducibilidad es limitado. Un ejemplo clásico de este enfoque es el protocolo descrito por Lancaster et al. (2013), utilizado ampliamente para estudiar el desarrollo cerebral temprano.^{51, 53, 54, 55}

Por otro lado, el método de diferenciación guiado hace uso de determinados factores para dirigir a las células hacia regiones cerebrales concretas, como el prosencéfalo, el mesencéfalo o el cerebelo. En la mayoría de los protocolos de diferenciación, la inducción neuronal comienza con la inhibición de la vía de señalización SMAD, una ruta de comunicación molecular que utilizan las células para recibir y transmitir señales que influyen en su destino y en los tipos celulares que pueden generar. Al bloquear esta vía, se evita que las células se diferencien hacia tejidos derivados del mesodermo o del endodermo, favoreciendo en cambio su desarrollo hacia linajes neuronales. Posteriormente, se añaden moléculas señalizadoras que guían la diferenciación hacia tipos celulares o regiones cerebrales específicas. Aunque este método ofrece mayor reproducibilidad y control, genera organoides más específicos y menos complejos, por lo que se emplea principalmente para estudiar funciones o patologías regionales concretas.^{51, 53, 56}

En conjunto, mientras que el método guiado prioriza la precisión y el control, el método no guiado permite la formación espontánea de un organoide cerebral más completo y diverso, siendo el más adecuado para modelar el desarrollo global del cerebro humano.⁵⁷

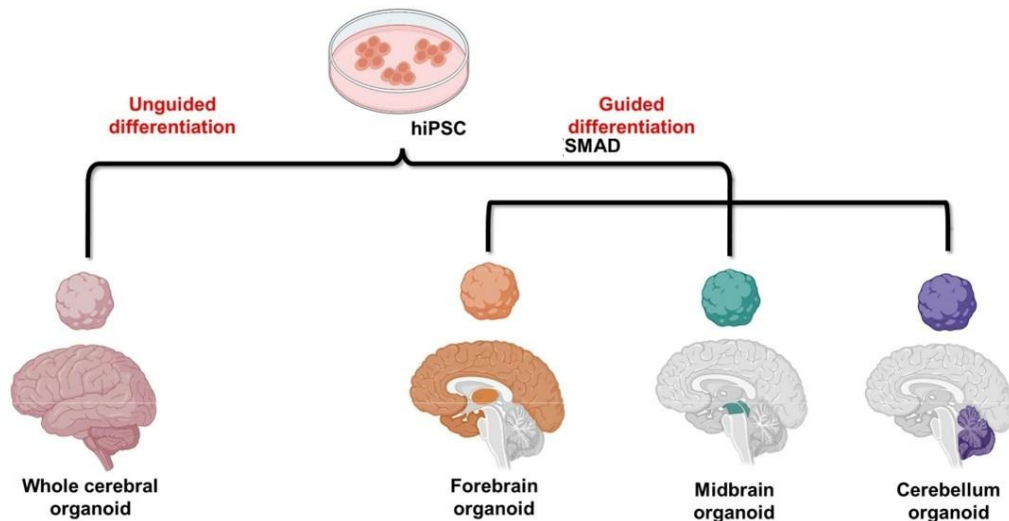


Figura 3. Esquema de los métodos de generación de organoides cerebrales. El método no guiado permite la formación de organoides cerebrales completos, mientras que el método guiado dirige la diferenciación hacia regiones cerebrales específicas, como prosencéfalo, mesencéfalo y cerebelo.⁵⁶

Los organoides cerebrales que derivan de iPSC de pacientes con la AD se pueden generar principalmente a partir de casos de FAD, ya que la presencia de mutaciones bien conocidas en *PSEN1*, *PSEN2* y *APP* permite estudiar de forma directa el impacto de estas alteraciones genéticas en el desarrollo y la progresión de la patología, favoreciendo además la aparición temprana de los cambios patológicos característicos de la enfermedad en este modelo *in vitro*.^{58,59}

Cuando se pretende analizar la función de variantes de riesgo como el alelo *APOE4*, también se emplean líneas derivadas de AD esporádica.⁵⁹ Cuando se realizan cultivos originados de pacientes AD esporádicos (con variantes de riesgo o no), muchas veces se requiere la inducción con tratamiento exógeno de A β 42 recombinante, ya que no siempre desarrollan fácilmente la patología en cultivo.^{58,59} De cualquier modo, dado que en estos casos la enfermedad está influida por múltiples factores genéticos y ambientales adicionales, resulta difícil establecer una relación causal directa con dicha variante.⁵⁹ Por este motivo, es frecuente recurrir a estrategias de edición genética mediante CRISPR/Cas9 para introducir esta variante en células de

individuos sanos, permitiendo estudiar su contribución en un contexto genético controlado.^{58,59} Los organoides generados en estos contextos reproducen rasgos neuropatológicos característicos de la enfermedad, como un aumento en la producción de A β , hiperfosforilación de tau, disfunción sináptica, disminución de la actividad neuronal y muerte celular, así como un aumento de la proporción A β 42/A β 40 en comparación con organoides derivados de individuos sanos. De manera más general, los organoides también pueden obtenerse a partir de células de personas sanas y modificarse mediante CRISPR/Cas9, tanto para introducir mutaciones específicas como para corregirlas en líneas procedentes de pacientes, con el objetivo de reducir la variabilidad interindividual y permitir comparaciones experimentales más precisas.^{58,59}

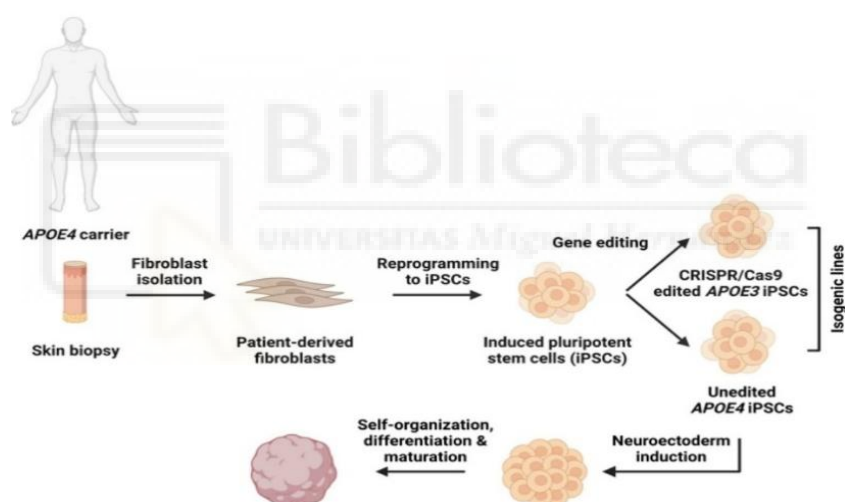


Figura 4. Edición de iPSC derivadas de un paciente APOE4 mediante la tecnología de edición CRISPR/Cas9 para convertirlas a APOE3 y generar pares isogénicos, que posteriormente se diferencian y cultivan como organoides.⁵⁹

5.3 Uso en la investigación farmacológica de la Enfermedad de Alzheimer

En el marco de la investigación farmacológica de la AD, los organoides cerebrales se han consolidado como una herramienta experimental clave para el estudio de los mecanismos patológicos de la enfermedad, ya que permiten modelar procesos patológicos humanos en sistemas tridimensionales controlados. A partir del análisis de los artículos

seleccionados, los estudios pueden agruparse en tres enfoques principales: el modelado de mutaciones genéticas conocidas, la identificación de posibles nuevos mecanismos moleculares implicados en la enfermedad y la incorporación de microglía para aumentar la complejidad fisiológica del modelo y estudiar su papel en la patología.

Modelado de mutaciones genéticas conocidas

Una parte de los estudios revisados emplea organoides cerebrales derivados de iPSC humanas portadoras de variantes patogénicas o de riesgo genético para reproducir su efecto, validando el modelo como plataforma experimental para el análisis de los mecanismos patológicos y la evaluación de intervenciones terapéuticas.^{60,61,62,63,64,65}

En este contexto, se han generado organoides cerebrales a partir de iPSC de pacientes portadores de mutaciones, sobre todo en *PSEN1*, comparándolos con líneas isogénicas sanas. Los organoides mutantes presentaron acumulaciones compactas de A β , con un aumento de la proporción A β 42/A β 40, defectos en la organización tisular y alteraciones en el desarrollo neuronal. Además, la respuesta de estos organoides a inhibidores de β - y γ -secretasa (terapias que se han ensayado para disminuir la generación de A β), reduciendo los niveles de péptidos A β , respalda su utilidad como plataforma preclínica para la evaluación de compuestos dirigidos a dianas moleculares bien caracterizadas.⁶² Así, los organoides con mutaciones en *PSEN1/2* permiten estudiar tanto las consecuencias celulares directas de las mutaciones causales de FAD, como la eficacia de potenciales tratamientos farmacológicos, reproduciendo con fidelidad los procesos patológicos observados *in vivo*.

Más allá de las mutaciones causales, algunos estudios han explorado el impacto de variantes genéticas de riesgo, destacando el papel del alelo APOE4, principal factor de riesgo genético en la AD esporádica. Una parte de los estudios se centra en generar organoides cerebrales derivados de

iPSC humanas con genotipos APOE3 y APOE4 isogénicos, lo que permite estudiar el efecto del alelo APOE4. Los resultados muestran que los organoides APOE4 se asocian con un aumento de la fosforilación de tau y de la acumulación amiloide, así como con la presencia de marcadores de estrés celular, incluyendo especies reactivas como el peróxido de hidrógeno, lo que sugiere un aumento del estrés oxidativo neuronal. En contraste, en los organoides APOE3 estos marcadores se mantienen bajos o prácticamente indetectables.⁶⁰ De la misma manera, se ha estudiado el efecto del alelo APOE4 durante las etapas iniciales del desarrollo neuronal, con el fin de observar cómo afecta esta variante genética desde etapas tempranas. Para ello, se evaluó la influencia del alelo APOE4 en la formación de redes neuronales y se evidenció que los organoides APOE4 presentan un desequilibrio en la proporción de neuronas excitatorias e inhibitorias y un aumento de astrocitos, asociado a disfunción en la actividad de red neuronal. Esto sugiere que APOE4 no solo actúa en fases avanzadas de la AD, sino que puede afectar al desarrollo cerebral desde etapas tempranas, lo que es clave para desarrollar estrategias preventivas.⁶¹ De forma complementaria, se ha estudiado el efecto de neuronas y astrocitos APOE4 en organoides cerebrales con el fin de observar los efectos de cada uno. Las iPSC empleadas procedían de una línea parental APOE3, a partir de la cual se generaron células APOE4 mediante edición CRISPR/Cas9. Con ellas se obtuvieron cuatro tipos de organoides: neuronas APOE3/astrocitos APOE4, neuronas APOE4/astrocitos APOE3, ambos APOE4 y ambos APOE3 (control). Para ello, se indujo previamente la diferenciación hacia astrocitos y posteriormente se cocultivaron con iPSC de organoides cerebrales estándar. En estos modelos, las neuronas APOE4 fueron suficientes para incrementar la producción de A β , mientras que la presencia simultánea de astrocitos y neuronas APOE4 fue necesaria para observar un aumento significativo de tau fosforilada. Además, los organoides con astrocitos APOE4 mostraron una marcada acumulación de lípidos y colesterol. Todo ello destaca la relevancia de las interacciones entre tipos celulares para reproducir de forma más completa los mecanismos de la enfermedad.⁶⁴

Otra parte de los estudios genera organoides cerebrales derivados de iPSC humanas con inactivación completa del gen *APOE* mediante CRISPR/Cas9 con el fin de establecer y validar un modelo experimental que nos permita estudiar la función basal de la proteína apoE, nos sirva como referencia para comparar diferentes isoformas y entender qué cambios son patológicos y detectar vías implicadas en la patogénesis de la AD que podrían explorarse terapéuticamente.⁶⁵ Los datos obtenidos muestran que la ausencia (KO) de apoE en organoides cerebrales genera un desequilibrio en la proporción de neuronas excitatorias e inhibitorias y un aumento de astrocitos. Además, la falta de apoE muestra una desregulación del metabolismo de los lípidos con una mayor síntesis de colesterol en neuronas y una acumulación excesiva de lípidos en astrocitos, lo que pone de manifiesto el papel esencial de APOE en la homeostasis cerebral.⁶³ Estos modelos basados en mutaciones del gen *APOE* muestran que los organoides cerebrales permiten recrear tanto disfunciones metabólicas como alteraciones sinápticas y de comunicación célula-célula, contribuyendo al entendimiento de cómo variantes genéticas de riesgo predisponen al desarrollo de la AD. En conjunto, la evidencia disponible indica que los organoides cerebrales constituyen una herramienta robusta para el modelado funcional de mutaciones asociadas a la AD, permitiendo no solo reproducir características patológicas humanas, sino también evaluar la respuesta a intervenciones dirigidas.

Identificación de nuevos mecanismos moleculares

Además del modelado de mutaciones conocidas, los organoides cerebrales se han consolidado como una herramienta especialmente valiosa para la exploración de mecanismos moleculares emergentes implicados en la fisiopatología de la AD. Los estudios analizados emplean estos sistemas tridimensionales para investigar procesos celulares tempranos en un contexto humano complejo, lo que permite detectar alteraciones que pueden pasar desapercibidas en modelos bidimensionales o animales.^{66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83}

Una línea relevante de investigación ha puesto de manifiesto la implicación de procesos de estrés celular y muerte neuronal en la progresión patológica de la AD. En particular, un proceso de muerte celular desencadenado por el exceso de hierro y el daño oxidativo en los lípidos conocido como ferroptosis, ha sido identificado como un mecanismo potencialmente asociado a la acumulación patológica de A β en el cerebro de pacientes post-mortem. En este sentido, se generaron organoides cerebrales derivados de iPSC humanas, incluyendo líneas con la mutación *PSEN1* y controles isogénicos sanos, con el fin de confirmar y profundizar lo que previamente se había estudiado en cerebros post-mortem. Se analizaron las proteínas y genes relacionados con la ferroptosis, así como marcadores de estrés oxidativo y peroxidación lipídica, como ferritina y ferroportina. Los organoides con la mutación mostraron un aumento significativo de estos marcadores, indicando mayor estrés oxidativo y activación de la ferroptosis. Además, la inhibición farmacológica de la ferroptosis mediante ferrostatina-1, redujo la formación de agregados A β y normalizó los niveles de ferritina, lo que respalda la contribución de este proceso a los cambios patológicos observados.⁷⁰ Asimismo, la activación de factores reguladores de la respuesta al estrés y la inflamación se han relacionado con la patología de la AD. Algunos estudios han demostrado una asociación entre la vía c-Jun y esta patología, poniendo de manifiesto que se trata de una ruta molecular que responde al estrés y a procesos neurodegenerativos, contribuyendo a la neuropatología de la enfermedad. Para estudiar esto, se generaron organoides cerebrales derivados de iPSC de pacientes con FAD (mutación *PSEN1*) y de controles isogénicos. Los organoides cerebrales derivados de pacientes con AD mostraron una activación sostenida y elevada de c-Jun en comparación con controles sanos. Esta activación provocó la activación de regiones del ADN normalmente silenciadas, generando señales interpretadas por la célula como daño y desencadenando una respuesta inmunitaria innata perjudicial para las neuronas. Como consecuencia, se observó mayor muerte neuronal, menor formación de nuevas neuronas y alteraciones en el desarrollo del tejido cerebral. La reducción experimental

de la actividad de c-Jun revirtió la activación anómala de secuencias de ADN que normalmente permanecen inactivas, así como la activación de la respuesta inmune innata y de vías de muerte celular. Como consecuencia, disminuyó la muerte neuronal y se restauraron parcialmente los defectos de neurogénesis, indicando que c-Jun actúa como regulador clave de los cambios patológicos observados.⁷⁵ Todo ello sugiere nuevas posibles dianas farmacológicas en etapas tempranas de la enfermedad.

Otros trabajos se han centrado en estudiar modificaciones en la actividad neuronal y en la regulación génica asociadas a la AD. En este contexto, se ha estudiado el efecto del gen *BIN1*, cuyas variantes genéticas se han asociado con un aumento en la probabilidad de desarrollar AD. Para ello, se generaron organoides cerebrales los cuales fueron editados mediante la tecnología CRISPR/Cas9 para obtener diversas variantes de *BIN1*, *BIN1* funcional, reducido (haploinsuficiencia; una copia funcional y la otra inactivada) y ausente. Se observó que *BIN1* se expresa principalmente en neuronas excitatorias y que su disminución o ausencia provoca que los canales de calcio tipo L (de larga duración de activación “long-lasting” y activación de alto voltaje) sean más activos, aumentando la entrada de Ca^{2+} en las neuronas. Este exceso de señalización de calcio altera la excitabilidad y la comunicación neuronal, y se asocia con una reducción en la formación de sinapsis y cambios en la expresión de genes dependientes de la actividad neuronal, fenómenos similares a los observados en la AD. Además, al tratar los organoides con nifedipina, un bloqueador de los canales de calcio tipo L, se pudo recuperar parcialmente estas alteraciones y cambios de expresión génica. Este resultado apoya la hipótesis de que los efectos detectados en las neuronas están mediados, al menos en parte, por la desregulación de la señalización de calcio causada por la reducción de *BIN1*.⁷³

De igual modo, los organoides han permitido evaluar intervenciones experimentales orientadas a mejorar la maduración neuronal o reducir la acumulación de productos patológicos, demostrando su utilidad para la identificación preliminar de estrategias terapéuticas. En este sentido, se han

generado organoides cerebrales derivados de iPSC de pacientes con FAD y líneas control, con el fin de identificar genes que podrían contribuir a la patología. Al analizar la expresión génica de los organoides, se observó que el gen *TMSB4X*, que codifica la proteína timosina beta 4 (Tβ4), estaba disminuido en los organoides con FAD. Al tratar estos organoides con Tβ4, se produjo una mejora en la formación y maduración de las neuronas, acompañado de una reducción de la acumulación de Aβ. Este enfoque apunta a que Tβ4 podría desempeñar un papel en la modulación de defectos del desarrollo neuronal y de ciertas características patológicas de la AD.⁶⁶

Además, diversos estudios han investigado variantes genéticas y modificaciones de proteínas implicadas en la AD para analizar su impacto funcional en los mecanismos patológicos subyacentes. En una de estas investigaciones, se estudió si las mutaciones en el extremo N-terminal de APP pueden contribuir a la patología de la AD, en particular a la asociada a tau, dado que la mayoría de las mutaciones conocidas en APP se concentran en la región central de la proteína, implicada en la generación Aβ. Para ello, se generaron organoides cerebrales derivados de iPSC humanas a partir de líneas control e isogénicas, a las cuales se les introdujo la mutación APP V225A (extremo N-terminal) mediante CRISPR/Cas9. Los resultados mostraron que los organoides con la mutación presentan un aumento de la fosforilación y agregación de tau, acompañado de daño sináptico. Estos hallazgos sugieren que mutaciones en el extremo N-terminal de APP pueden promover neurodegeneración dependiente de tau a través de mecanismos que no dependen exclusivamente de la producción de Aβ, ampliando el modelo clásico de la cascada amiloide sin contradecirlo.⁶⁹

Asimismo, varios estudios han sugerido que la variante *APOE3* Christchurch (APOECh) podría ralentizar la progresión de la AD. Para investigar esto, se generaron inicialmente organoides cerebrales derivados de iPSC de pacientes con mutación *PSEN1*. A partir de esta misma línea celular, una fracción fue modificada genéticamente para expresar APOE3Ch, mientras que otra permaneció sin editar (APOE3). Ambas poblaciones fueron posteriormente diferenciadas a microglía y cocultivadas con los organoides,

con el fin de estudiar el efecto de la variante (recordemos que apoE es sintetizada en células de origen glial, astrocitos o microglía). Los organoides con microglía APOE3Ch mostraron una menor acumulación de tau fosforilada, asociada a una reducción en su propagación y en la formación de agregados, en comparación con aquellos que presentaban microglía APOE3 convencional.⁶⁸ Estos resultados sugieren el potencial de la variante APOE3Ch para proteger a las neuronas y ralentizar la progresión de la AD, lo que podría guiar futuras estrategias terapéuticas.

Por otra parte, investigaciones centradas en procesos de neurodesarrollo han identificado déficits en la diferenciación neuronal y en la regulación de la expresión génica asociados a proteínas específicas, lo que sugiere que determinadas alteraciones patológicas pueden originarse en etapas tempranas del desarrollo celular. Una de las investigaciones revisadas se centra en el gen *GRIN3A*, que codifica la proteína GluN3A, una subunidad del receptor NMDA fundamental para la transmisión sináptica. Inicialmente, mediante el análisis de múltiples bases de datos de expresión génica de cerebros de pacientes con AD, se identificó que el gen *GRIN3A* presenta alteraciones asociadas a la presencia de tau patológica. Cabe destacar que, dado que estos cerebros también presentan patología amiloide, estos análisis muestran correlación pero no permiten atribuir la alteración exclusivamente a tau. Para profundizar en el efecto específico de la tauopatía, se generaron organoides cerebrales derivados de iPSC humanas, a los que se indujo la tauopatía mediante tratamiento con PHF-tau. Los resultados mostraron que la exposición a tau patológica reduce los niveles de GluN3A, asociándose con pérdida de función sináptica. Estos hallazgos destacan la importancia de *GRIN3A* como posible biomarcador de tauopatía y como diana terapéutica.⁷¹

Del mismo modo, se estudió el efecto del gen *NUP153*, que codifica la proteína NUP153, esencial para que las células madre neuronales puedan diferenciarse en nuevas neuronas. Con el objetivo de examinar su relación con la AD, se generaron organoides cerebrales derivados de iPSC de pacientes con FAD y de controles sanos. Los organoides de personas con

FAD mostraron una disminución de NUP153, provocando una menor neurogénesis. Con el fin de confirmar plenamente esta relación, se introdujo el gen *NUP153* en los organoides, lo que resultó en una mejora en la formación de neuronas. Este estudio sugiere que esta proteína es clave para la formación y función de nuevas neuronas, destacando su relevancia como otro posible biomarcador y objetivo terapéutico.⁷² Estas observaciones amplían la comprensión de la AD más allá de los mecanismos clásicos y refuerzan la utilidad de los organoides como plataforma para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

En conjunto, los estudios revisados evidencian que el uso de organoides cerebrales facilita la identificación de rutas moleculares implicadas en la enfermedad en un entorno experimental humano tridimensional, contribuyendo tanto a la generación de hipótesis mecanísticas como al desarrollo inicial de intervenciones farmacológicas.

Incorporación de microglía y aumento de la complejidad del modelo

Una limitación importante de los primeros modelos de organoides cerebrales fue la ausencia de microglía, componente esencial del sistema inmune del sistema nervioso central y actor clave en la fisiopatología de la AD. La mayoría de las células del sistema nervioso provienen del neuroectodermo, mientras que la microglía se origina del mesodermo, por lo que los organoides de iPSC no la contienen de forma natural por las condiciones de diferenciación, y la microglía debe diferenciarse separadamente. La microglía participa en la eliminación de agregados proteicos, la regulación sináptica y la respuesta inflamatoria, procesos directamente relacionados con la progresión de la enfermedad. Por ello, varios estudios recientes han desarrollado estrategias para incorporarla a los organoides, con el objetivo de mejorar la fidelidad fisiológica del modelo y ampliar su utilidad en investigación farmacológica.^{84,85,86,87,88,89}

Existen diferentes formas de añadir microglía en los organoides cerebrales. Una opción es agregar directamente microglía ya madura mediante cocultivo, es decir, cultivando estas células junto al organoide una vez formado. Otra alternativa consiste en usar progenitores de microglía, que son células aún inmaduras derivadas de iPSC con la capacidad de diferenciarse en microglía funcional. Estas se introducen en el organoide ya formado o en desarrollo, donde terminan de diferenciarse e integrarse en el tejido. Finalmente, el enfoque más fisiológico consiste en introducir conjuntamente al cultivo, progenitores de microglía y células neuronales inmaduras, ambas derivadas de iPSC, permitiendo que se desarrollen de forma simultánea y se integren desde las primeras etapas, imitando mejor el desarrollo del cerebro humano.^{87,88} Aunque algunos trabajos se centran en optimizar estos procedimientos de integración celular, su contribución resulta relevante al sentar las bases técnicas para modelos experimentales más representativos del tejido cerebral humano.

Una vez incorporada, la microglía permite analizar interacciones funcionales con características patológicas de la AD. Se ha observado su participación en la fagocitosis de agregados de A β y en la modulación del daño neuronal asociado al comparar organoides cerebrales con microglía y sin ella.⁸⁹ De manera similar, al generar organoides cerebrales con microglía mediante cocultivo y compararlos con organoides sin microglía, se evidenció que la microglía puede favorecer la formación de conexiones neuronales y de protegerlas frente al daño, así como de reducir los niveles de tau fosforilada, lo que indica que la microglía estimula la actividad de las neuronas y reduce la muerte celular.⁸⁶ No obstante, es importante señalar que, aunque la microglía inicialmente actúa para proteger al cerebro, su activación sostenida por la presencia constante de A β y NFT provoca una respuesta inmune prolongada. Esto conduce a inflamación persistente, favoreciendo la pérdida de neuronas y acelerando el deterioro cognitivo típico de la AD. Para estudiar esto, se generaron organoides cerebrales derivados de iPSC de pacientes con FAD, que se cocultivaron con microglía durante periodos prolongados con el fin de observar los efectos crónicos sobre la patología. Estos

organoides mostraron una neuropatología típica de la AD, que se acompañaba con una mayor activación de genes relacionados con la inflamación, una menor capacidad fagocítica y una mayor muerte neuronal.⁸⁴

Desde una perspectiva farmacológica, la inclusión de microglía amplía considerablemente el potencial de los organoides como plataforma de ensayo, permitiendo evaluar compuestos dirigidos a procesos inflamatorios o inmunomoduladores que no podrían estudiarse adecuadamente en modelos neuronales aislados.

En conjunto, la incorporación de microglía representa un paso significativo hacia modelos más completos y fisiológicamente relevantes de la AD. No obstante, persisten retos relacionados con la estandarización de los protocolos de integración celular, la maduración funcional de la microglía y la reproducibilidad experimental, aspectos que deberán abordarse para consolidar su aplicación en estudios farmacológicos a gran escala.



6 Discusión y conclusión

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar de forma sistemática el uso de organoides cerebrales en la investigación farmacológica de la AD. A partir de los estudios seleccionados, los resultados evidencian que estos modelos tridimensionales se han consolidado como herramientas experimentales versátiles que permiten abordar múltiples dimensiones de la patología, desde la validación de factores genéticos hasta la identificación de nuevas posibles rutas moleculares y el estudio de la neuroinflamación. No obstante, su potencial debe interpretarse considerando las limitaciones metodológicas propias de esta tecnología emergente.

En primer lugar, la evidencia revisada confirma la utilidad de los organoides como plataformas de modelado de mutaciones asociadas a la AD. Los estudios analizados muestran que estos sistemas son capaces de reproducir fenotipos celulares característicos, incluyendo acumulación de A β ,

alteraciones estructurales y cambios en la diferenciación neuronal. Este hallazgo respalda su aplicación en la validación funcional de variantes genéticas y en la evaluación preliminar de compuestos terapéuticos dirigidos a dianas moleculares específicas. Desde una perspectiva traslacional, esta capacidad representa una ventaja relevante frente a modelos animales, que no reproducen fielmente la genética humana. Sin embargo, la diversidad de protocolos experimentales observada dificulta la comparación directa entre estudios, lo que sugiere la necesidad de avanzar hacia una mayor estandarización metodológica para consolidar su utilidad farmacológica.

En segundo lugar, los trabajos orientados al descubrimiento de nuevos mecanismos moleculares ponen de manifiesto la capacidad exploratoria de los organoides. La identificación de alteraciones en procesos metabólicos, sinápticos, oxidativos o de muerte celular refleja la complejidad multifactorial de la AD y amplía el marco conceptual más allá de las hipótesis clásicas centradas en β -amiloide y tau. Este aspecto resulta especialmente relevante desde el punto de vista farmacológico, ya que el fracaso clínico de múltiples terapias dirigidas a mecanismos tradicionales ha impulsado la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. No obstante, la heterogeneidad de resultados observada sugiere que estos hallazgos deben interpretarse como generadores de hipótesis más que como evidencias concluyentes, requiriendo validación adicional mediante modelos complementarios o estudios clínicos.

Asimismo, la incorporación de microglía en organoides representa un avance significativo hacia modelos más fisiológicamente representativos. La evidencia analizada resalta el papel de la neuroinflamación en la progresión de la enfermedad y demuestra que las interacciones entre células neuronales y del sistema inmunitario pueden modular la acumulación proteica y la supervivencia celular. Este enfoque integrador refuerza la idea de que la AD debe entenderse como una patología multicelular y no exclusivamente neuronal. Desde el punto de vista terapéutico, ello abre la posibilidad a desarrollar estrategias dirigidas a la modulación inmunitaria. Sin embargo, la relativa novedad de estos modelos implica que aún existe

escasa estandarización en su generación y caracterización, lo que limita la comparabilidad de resultados.

Por otra parte, el análisis crítico de la literatura evidencia una serie de limitaciones metodológicas relevantes que deben considerarse al interpretar los resultados obtenidos con organoides cerebrales. En primer lugar, un problema importante es que los organoides cerebrales no envejecen como lo hace el cerebro humano adulto. En lugar de eso, conservan características más parecidas a un cerebro en desarrollo, como formas inmaduras de ciertas proteínas, y no muestran señales típicas de envejecimiento, por ejemplo acumulación de daño en el ADN o estrés celular. Esto dificulta estudiar enfermedades como la AD en toda su complejidad, ya que los organoides pueden reproducir algunos aspectos de la enfermedad, pero en un contexto todavía “joven”. Son útiles para investigar mecanismos tempranos y factores genéticos, pero menos adecuados para analizar su progresión y etapas tardías, que dependen del envejecimiento. Esto se debe en parte a que, al reprogramar las células para crearlos, se pierden rasgos asociados a la edad y el tejido neuronal resultante no alcanza una maduración completa, lo que hace más difícil reproducir procesos neurodegenerativos avanzados y reflejar fielmente lo que ocurre en el cerebro real.⁹⁰

Además, diversos estudios señalan limitaciones estructurales relacionadas con la ausencia de vascularización funcional en los organoides. Esta carencia restringe la difusión de oxígeno y nutrientes hacia las regiones internas del tejido, generando zonas de hipoxia que pueden alterar la viabilidad celular. Como consecuencia, pueden aparecer áreas de necrosis, limitarse el crecimiento y la maduración del organoide, y reducir su estabilidad en cultivos prolongados. Esto también puede influir en la interpretación de los resultados experimentales, ya que algunas alteraciones observadas podrían deberse a estas condiciones artificiales y no únicamente al fenómeno biológico que se pretende estudiar. Asimismo, la representación incompleta de componentes fisiológicos complejos, como la barrera hematoencefálica, reduce la capacidad del modelo para reproducir íntegramente el microambiente cerebral humano. Esta limitación dificulta el

estudio preciso de procesos como el transporte de moléculas, la interacción con el sistema inmunitario o la evaluación de fármacos, ya que estas funciones dependen de estructuras y dinámicas que no están plenamente presentes en los organoides.^{91,92}

Adicionalmente, se han descrito problemas asociados a la variabilidad experimental y a la reproducibilidad. Los organoides derivados de diferentes líneas celulares pueden desarrollarse y funcionar de manera distinta debido a la variación genética entre individuos, así como a diferencias en su capacidad de diferenciación y organización celular. Además, factores técnicos como la variabilidad entre lotes, el uso de reactivos complejos como Matrigel y la falta de protocolos completamente estandarizados contribuyen a esta heterogeneidad, incluso dentro de un mismo experimento. Como resultado, los fenómenos observados, incluyendo rasgos patológicos relacionados con la AD, pueden variar entre organoides y, en algunos casos, estas diferencias pueden influir más en los resultados que las variables biológicas que se pretenden estudiar, lo que dificulta la comparación entre estudios y la obtención de conclusiones reproducibles. Una forma de reducir esta variabilidad es usar CRISPR/Cas9 para crear líneas celulares isogénicas, modificando genes específicos de manera controlada y permitiendo comparar los efectos de variantes genéticas sin que influyan las diferencias entre individuos. A ello, también se suma la simplificación anatómica inherente a estos sistemas, que no reproducen completamente la conectividad ni la organización regional del cerebro humano.^{93,94,95}

En conjunto, estas limitaciones no anulan su utilidad, pero sí invitan a interpretar los resultados con cautela y a situar estos modelos como parte de un enfoque experimental multimodal. Desde una perspectiva global, los organoides cerebrales no deben entenderse como sustitutos de otros sistemas, sino como recursos complementarios que enriquecen la investigación.

Su principal contribución reside en la capacidad de modelar procesos humanos específicos y generar conocimiento mecanístico, mientras que la

validación farmacológica completa requiere integración con modelos animales y estudios clínicos.

Finalmente, es importante destacar algunas limitaciones de este trabajo. La diversidad metodológica entre los estudios analizados, así como la variedad de objetivos experimentales, dificulta la comparación directa de resultados y la obtención de conclusiones cuantitativas. Además, al tratarse de un campo todavía emergente, las técnicas y los protocolos están en constante evolución, lo que puede influir en la validez de algunas interpretaciones con el paso del tiempo. No obstante, el análisis cualitativo realizado permite ofrecer una visión global actualizada del papel de los organoides en la investigación farmacológica de la AD.

En conclusión, la evidencia analizada indica que los organoides cerebrales representan una herramienta prometedora para el estudio mecanístico y la exploración terapéutica en la AD, especialmente en el ámbito del modelado genético y el descubrimiento de nuevas dianas moleculares. Sin embargo, su aplicación en la práctica depende de la superación de limitaciones técnicas y de su integración con otras técnicas experimentales. Futuras investigaciones orientadas a mejorar la maduración tisular, la vascularización y la estandarización metodológica serán clave para consolidar su papel en el desarrollo farmacológico de esta patología.

7 Bibliografia

1. 2024 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2024 May;20(5):3708-3821. doi: 10.1002/alz.13809. Epub 2024 Apr 30. PMID: 38689398; PMCID: PMC11095490.
2. Rostagno AA. Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 21;24(1):107. doi: 10.3390/ijms24010107. PMID: 36613544; PMCID: PMC9820480.
3. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*. 2020 Dec 8;25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789. PMID: 33302541; PMCID: PMC7764106.
4. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep;1(1):a006189. doi: 10.1101/cshperspect.a006189. PMID: 22229116; PMCID: PMC3234452.
5. Singh SK, Srivastav S, Yadav AK, Srikrishna S, Perry G. Overview of Alzheimer's Disease and Some Therapeutic Approaches Targeting A β by Using Several Synthetic and Herbal Compounds. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7361613. doi: 10.1155/2016/7361613. Epub 2015 Dec 28. PMID: 27034741; PMCID: PMC4807045.
6. Spires-Jones TL, Hyman BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2014 May 21;82(4):756-71. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.004. PMID: 24853936; PMCID: PMC4135182.
7. Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010 Jan-Feb;77(1):32-42. doi: 10.1002/msj.20157. PMID: 20101720; PMCID: PMC2918894.
8. Weggen S, Behr D. Molecular consequences of amyloid precursor protein and presenilin mutations causing autosomal-dominant Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2012 Mar 30;4(2):9. doi: 10.1186/alzrt107. PMID: 22494386; PMCID: PMC3334542.
9. Cras P, Kawai M, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg B, Perry G. Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 1;88(17):7552-6. doi: 10.1073/pnas.88.17.7552. PMID: 1652752; PMCID: PMC52339.
10. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*. 2017 Sep;38(9):1205-1235. doi: 10.1038/aps.2017.28. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28713158; PMCID: PMC5589967.
11. Brion JP, Anderton BH, Authellet M, Dayanandan R, Leroy K, Lovestone S, Octave JN, Pradier L, Touchet N, Tremp G. Neurofibrillary tangles and tau phosphorylation. *Biochem Soc Symp*. 2001;(67):81-8. doi: 10.1042/bss0670081. PMID: 11447842.
12. Engelhardt E, Resende EPF, Gomes KB. Physiopathological mechanisms underlying Alzheimer's disease: a narrative review. *Dement Neuropsychol*. 2024 Dec 16;18:e2024VR01. doi: 10.1590/1980-5764-DN-2024-VR01. PMID: 39697643; PMCID: PMC11654088.

13. Wu M, Zhang M, Yin X, Chen K, Hu Z, Zhou Q, Cao X, Chen Z, Liu D. The role of pathological tau in synaptic dysfunction in Alzheimer's diseases. *Transl Neurodegener.* 2021 Nov 10;10(1):45. doi: 10.1186/s40035-021-00270-1. PMID: 34753506; PMCID: PMC8579533.
14. Metaxas A, Kempf SJ. Neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: elucidation of the molecular mechanism by immunohistochemistry and tau protein phospho-proteomics. *Neural Regen Res.* 2016 Oct;11(10):1579-1581. doi: 10.4103/1673-5374.193234. PMID: 27904486; PMCID: PMC5116834.
15. Sanchez-Varo R, Mejias-Ortega M, Fernandez-Valenzuela JJ, Nuñez-Díaz C, Caceres-Palomo L, Vegas-Gomez L, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Garcia-Leon JA, Moreno-Gonzalez I, Vizuite M, Vitorica J, Baglietto-Vargas D, Gutierrez A. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: An Integrative Analysis. *Int J Mol Sci.* 2022 May 12;23(10):5404. doi: 10.3390/ijms23105404. PMID: 35628216; PMCID: PMC9142061.
16. Salas-Castillo S, Fornaguera-Trías J. Alzheimer's disease: Animal models as an alternative to understand the pathology and to search more successful therapeutics. *Revista de la Asociación Costarricense de Ciencias Neurológicas.* 2013;26(2):44-54. ISSN 1011-5684.
17. Philipson O, Lord A, Gumucio A, O'Callaghan P, Lannfelt L, Nilsson LN. Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. *FEBS J.* 2010 Mar;277(6):1389-409. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07564.x. Epub 2010 Feb 3. PMID: 20136653.
18. Obulesu M, Rao DM. Animal models of Alzheimer's disease: an understanding of pathology and therapeutic avenues. *Int J Neurosci.* 2010 Aug;120(8):531-7. doi: 10.3109/00207451003760080. PMID: 20615056.
19. Chambers JK, Mutsuga M, Uchida K, Nakayama H. Characterization of Aβ_{N3} deposition in the brains of dogs of various ages and other animal species. *Amyloid.* 2011 Jun;18(2):63-71. doi: 10.3109/13506129.2011.570385. PMID: 21557687.
20. Laurijssens B, Aujard F, Rahman A. Animal models of Alzheimer's disease and drug development. *Drug Discov Today Technol.* 2013 Sep;10(3):e319-27. doi: 10.1016/j.ddtec.2012.04.001. PMID: 24050129.
21. Sarasa M, Pesini P. Natural non-transgenic animal models for research in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2009 Apr;6(2):171-8. doi: 10.2174/156720509787602834. PMID: 19355852; PMCID: PMC2825666.
22. Epis R, Gardoni F, Marcello E, Genazzani A, Canonico PL, Di Luca M. Searching for new animal models of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2010 Jan 10;626(1):57-63. doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.063.
23. Zhong MZ, Peng T, Duarte ML, Wang M, Cai D. Updates on mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2024 Mar 11;19(1):23. doi: 10.1186/s13024-024-00712-0. PMID: 38462606; PMCID: PMC10926682.
24. Londra F, Grasso L, Herrera MI. Revisión de modelos en roedores para la investigación en enfermedades de Alzheimer y Parkinson: su importancia en la psicología comparada. *VII Congreso Internacional de Investigación y Práctica Profesional en Psicología; XXII Jornadas de*

Investigación XI Encuentro de Investigadores en Psicología del MERCOSUR. Universidad de Buenos Aires; 2015. Disponible en: <https://www.aacademica.org/000-015/536.pdf>

25. Götz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jul;9(7):532-544. doi:10.1038/nrn2420.
26. Newman M, Musgrave FI, Lardelli M. Alzheimer disease: Amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2007 Mar;1772(3):285-297. doi:10.1016/j.bbadis.2006.12.001.
27. Collins HM, Greenfield S. Rodent Models of Alzheimer's Disease: Past Misconceptions and Future Prospects. *Int J Mol Sci*. 2024;25(11):6222. doi:10.3390/ijms25116222.
28. Arber C, Lovejoy C, Wray S. Stem cell models of Alzheimer's disease: progress and challenges. *Alzheimers Res Ther*. 2017 Jun 13;9(1):42. doi: 10.1186/s13195-017-0268-4. PMID: 28610595; PMCID: PMC5470327.
29. Duncan T, Valenzuela M. Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2017 May 12;8(1):111. doi: 10.1186/s13287-017-0567-5. PMID: 28494803; PMCID: PMC5427593.
30. Esteves F, Brito D, Rajado AT, Silva N, Apolónio J, Palma Roberto V, Araújo I, Nóbrega C, Castelo-Branco P, Bragança J. Reprogramming iPSCs to study age-related diseases: models, therapeutics, and clinical trials. *Mech Ageing Dev*. 2023 Sep;214:111854. doi:10.1016/j.mad.2023.111854.
31. Barak M, Fedorova V, Pospisilova V, Raska J, Vochyanova S, Sedmik J, Hribkova H, Klimova H, Vanova T, Bohaciakova D. Human iPSC-Derived Neural Models for Studying Alzheimer's Disease: from Neural Stem Cells to Cerebral Organoids. *Stem Cell Rev Rep*. 2022 Feb;18(2):792-820. doi: 10.1007/s12015-021-10254-3. Epub 2022 Feb 2. PMID: 35107767; PMCID: PMC8930932.
32. Hu W, Qiu B, Guan W, Wang Q, Wang M, Li W, Gao L, Shen L, Huang Y, Xie G, Zhao H, Jin Y, Tang B, Yu Y, Zhao J, Pei G. Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell*. 2015 Aug 6;17(2):204-12. doi: 10.1016/j.stem.2015.07.006. PMID: 26253202.
33. Tcw J, Wang M, Pimenova AA, Bowles KR, Hartley BJ, Lacin E, Machlovi SI, Abdelaal R, Karch CM, Phatnani H, Slesinger PA, Zhang B, Goate AM, Brennand KJ. An Efficient Platform for Astrocyte Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017 Aug 8;9(2):600-614. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.06.018. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28757165; PMCID: PMC5550034.
34. Nistor GI, Totoiu MO, Haque N, Carpenter MK, Keirstead HS. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia*. 2005 Feb;49(3):385-96. doi: 10.1002/glia.20127. PMID: 15538751.
35. Muffat J, Li Y, Yuan B, Mitalipova M, Omer A, Corcoran S, Bakiasi G, Tsai LH, Aubourg P, Ransohoff RM, Jaenisch R. Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Med*. 2016

- Nov;22(11):1358-1367. doi: 10.1038/nm.4189. Epub 2016 Sep 26. PMID: 27668937; PMCID: PMC5101156.
36. Penney J, Ralvenius WT, Tsai LH. Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol Psychiatry*. 2020 Jan;25(1):148-167. doi: 10.1038/s41380-019-0468-3. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31391546; PMCID: PMC6906186.
 37. Ramos DM, Skarnes WC, Singleton AB, Cookson MR, Ward ME. Tackling neurodegenerative diseases with genomic engineering: A new stem cell initiative from the NIH. *Neuron*. 2021 Apr 7;109(7):1080-1083. doi: 10.1016/j.neuron.2021.03.022. PMID: 33831364; PMCID: PMC8985232.
 38. Raffaele I, Cipriano GL, Anchesi I, Oddo S, Silvestro S. CRISPR/Cas9 and iPSC-Based Therapeutic Approaches in Alzheimer's Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2025 Jun 25;14(7):781. doi: 10.3390/antiox14070781. PMID: 40722885; PMCID: PMC12291668.
 39. Schrauben M, Dempster E, Lunnon K. Applying gene-editing technology to elucidate the functional consequence of genetic and epigenetic variation in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2020 Sep;30(5):992-1004. doi: 10.1111/bpa.12881. PMID: 32654206; PMCID: PMC8018012.
 40. Yang W, Tu Z, Sun Q, Li XJ. CRISPR/Cas9: Implications for Modeling and Therapy of Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci*. 2016 Apr 28;9:30. doi: 10.3389/fnmol.2016.00030. PMID: 27199655; PMCID: PMC4848312.
 41. Manelli AM, Bulfinch LC, Sullivan PM, LaDu MJ. Abeta42 neurotoxicity in primary co-cultures: effect of apoE isoform and Abeta conformation. *Neurobiol Aging*. 2007 Aug;28(8):1139-47. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.024. Epub 2006 Jul 11. PMID: 16837105; PMCID: PMC3752940.
 42. Cerneckis J, Bu G, Shi Y. Pushing the boundaries of brain organoids to study Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 2023 Aug;29(8):659-672. doi: 10.1016/j.molmed.2023.05.007. Epub 2023 Jun 21. PMID: 37353408; PMCID: PMC10374393.
 43. Xu L, Wang Z, Li M, Li Q. Global incidence trends and projections of Alzheimer disease and other dementias: an age-period-cohort analysis 2021. *J Glob Health*. 2025 May 23;15:04156. doi: 10.7189/jogh.15.04156. PMID: 40406980; PMCID: PMC12100573.
 44. Hao M, Chen J. Trend analysis and future predictions of global burden of alzheimer's disease and other dementias: a study based on the global burden of disease database from 1990 to 2021. *BMC Med*. 2025 Jul 1;23(1):378. doi: 10.1186/s12916-025-04169-w. PMID: 40597083; PMCID: PMC12220445.
 45. Baviskar PS, Mahajan HS. Unveiling Alzheimer's disease (1901-2025): Historical insights, global burden, biological mechanisms, diagnostics, and therapeutic strategies. *Ageing Res Rev*. 2026 Jan;114:102990. doi: 10.1016/j.arr.2025.102990. Epub 2025 Dec 10. PMID: 41386339.
 46. Penney J, Ralvenius WT, Tsai LH. Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol Psychiatry*. 2020 Jan;25(1):148-167. doi: 10.1038/s41380-019-0468-3. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31391546; PMCID: PMC6906186.

47. Flores-Cuadra JA, Madrid A, Fernández PL, Pérez-Lao AR, Oviedo DC, Britton GB, Carreira MB. Critical Review of the Alzheimer's Disease Non-Transgenic Models: Can They Contribute to Disease Treatment? *J Alzheimers Dis.* 2021;82(s1):S227-S250. doi: 10.3233/JAD-200870. PMID: 33216029.
48. Barak M, Fedorova V, Pospisilova V, Raska J, Vochyanova S, Sedmik J, Hribkova H, Klimova H, Vanova T, Bohaciakova D. Human iPSC-Derived Neural Models for Studying Alzheimer's Disease: from Neural Stem Cells to Cerebral Organoids. *Stem Cell Rev Rep.* 2022 Feb;18(2):792-820. doi: 10.1007/s12015-021-10254-3. Epub 2022 Feb 2. PMID: 35107767; PMCID: PMC8930932.
49. Bubnys A, Tsai LH. Harnessing cerebral organoids for Alzheimer's disease research. *Curr Opin Neurobiol.* 2022 Feb;72:120-130. doi: 10.1016/j.conb.2021.10.003. Epub 2021 Nov 21. PMID: 34818608.
50. Shima S, Kondo T, Inoue H. iPSC-derived neural organoids in dementia research: Recent advances and future directions. *Neurosci Res.* 2025 Dec;221:104980. doi: 10.1016/j.neures.2025.104980. Epub 2025 Nov 3. PMID: 41192771.
51. Guo X, Wang X, Wang J, Ma M, Ren Q. Current Development of iPSC-Based Modeling in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2025 Apr 16;26(8):3774. doi: 10.3390/ijms26083774. PMID: 40332425; PMCID: PMC12027653.
52. Albert K, Niskanen J, Kälvälä S, Lehtonen Š. Utilising Induced Pluripotent Stem Cells in Neurodegenerative Disease Research: Focus on Glia. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 21;22(9):4334. doi: 10.3390/ijms22094334. PMID: 33919317; PMCID: PMC8122303.
53. Wang W, Tan S, Zuo X, Gao X, Ma L, Sun R, Liang G, Yin L, Pu Y, Zhang J. Brain Organoids in Neurodegenerative Disease Modeling: Advances, Applications and Future Perspectives. *Mol Neurobiol.* 2025 Nov 22;63(1):142. doi: 10.1007/s12035-025-05293-7. PMID: 41273627.
54. Chen X, Shi Y. Generating Homogeneous Brain Organoids from Human iPSCs. *Methods Mol Biol.* 2024;2794:157-167. doi: 10.1007/978-1-0716-3810-1_13. PMID: 38630227.
55. Karmirian K, Holubiec M, Goto-Silva L, Fernandez Bessone I, Vitória G, Mello B, Alloatti M, Vanderborght B, Falzone TL, Rehen S. Modeling Alzheimer's Disease Using Human Brain Organoids. *Methods Mol Biol.* 2023;2561:135-158. doi: 10.1007/978-1-0716-2655-9_7. PMID: 36399268.
56. Acharya P, Choi NY, Shrestha S, Jeong S, Lee MY. Brain organoids: A revolutionary tool for modeling neurological disorders and development of therapeutics. *Biotechnol Bioeng.* 2024 Feb;121(2):489-506. doi: 10.1002/bit.28606. Epub 2023 Nov 28. PMID: 38013504; PMCID: PMC10842775.
57. D'Antoni C, Mautone L, Sanchini C, Tondo L, Grassmann G, Cidonio G, Bezzi P, Cordella F, Di Angelantonio S. Unlocking Neural Function with 3D In Vitro Models: A Technical Review of Self-Assembled, Guided, and Bioprinted Brain Organoids and Their Applications in the Study of Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci.*

- 2023 Jun 28;24(13):10762. doi: 10.3390/ijms241310762. PMID: 37445940; PMCID: PMC10341866.
58. Sainz A, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Panicker M, Ruiz A, Matute C. Pros and Cons of Human Brain Organoids to Study Alzheimer's Disease. *Aging Dis.* 2024 Dec 3;16(6):3483-3504. doi: 10.14336/AD.2024.1409. PMID: 39812548; PMCID: PMC12539529.
 59. Cerneckis J, Bu G, Shi Y. Pushing the boundaries of brain organoids to study Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 2023 Aug;29(8):659-672. doi: 10.1016/j.molmed.2023.05.007. Epub 2023 Jun 21. PMID: 37353408; PMCID: PMC10374393.
 60. Stanton AE, Bubnys A, Agbas E, James B, Park DS, Jiang A, Pinals RL, Liu L, Truong N, Loon A, Staab C, Cerit O, Wen HL, Mankus D, Bisher ME, Lytton-Jean AKR, Kellis M, Blanchard JW, Langer R, Tsai LH. Engineered 3D immuno-glial-neurovascular human miBrain model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2025 Oct 21;122(42):e2511596122. doi: 10.1073/pnas.2511596122. Epub 2025 Oct 17. PMID: 41105712; PMCID: PMC12557797.
 61. Meyer-Acosta KK, Diaz-Guerra E, Varma P, Aruk A, Mirsadeghi S, Muniz-Perez A, Rafati Y, Hosseini A, Nieto-Estevez V, Giugliano M, Navara C, Hsieh J. APOE4 impacts cortical neurodevelopment and alters network formation in human brain organoids. *Stem Cell Reports.* 2025 Jul 8;20(7):102537. doi: 10.1016/j.stemcr.2025.102537. Epub 2025 Jun 19. PMID: 40541173; PMCID: PMC12277819.
 62. Vanova T, Sedmik J, Raska J, Amruz Cerna K, Taus P, Pospisilova V, Nezvedova M, Fedorova V, Kadakova S, Klimova H, Capandova M, Orviska P, Fojtik P, Bartova S, Plevova K, Spacil Z, Hribkova H, Bohaciakova D. Cerebral organoids derived from patients with Alzheimer's disease with PSEN1/2 mutations have defective tissue patterning and altered development. *Cell Rep.* 2023 Nov 28;42(11):113310. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113310. Epub 2023 Oct 20. PMID: 37864790.
 63. Zhao J, Ikezu TC, Lu W, Macyszko JR, Li Y, Lewis-Tuffin LJ, Martens YA, Ren Y, Zhu Y, Asmann YW, Ertekin-Taner N, Kanekiyo T, Bu G. APOE deficiency impacts neural differentiation and cholesterol biosynthesis in human iPSC-derived cerebral organoids. *Stem Cell Res Ther.* 2023 Aug 21;14(1):214. doi: 10.1186/s13287-023-03444-y. PMID: 37605285; PMCID: PMC10441762.
 64. Huang S, Zhang Z, Cao J, Yu Y, Pei G. Chimeric cerebral organoids reveal the essentials of neuronal and astrocytic APOE4 for Alzheimer's tau pathology. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Jun 13;7(1):176. doi: 10.1038/s41392-022-01006-x. PMID: 35691989; PMCID: PMC9189105.
 65. Martens YA, Xu S, Tait R, Li G, Zhao XC, Lu W, Liu CC, Kanekiyo T, Bu G, Zhao J. Generation and validation of APOE knockout human iPSC-derived cerebral organoids. *STAR Protoc.* 2021 Jun 5;2(2):100571. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100571. PMID: 34151296; PMCID: PMC8190508.
 66. Zeng PM, Sun XY, Li Y, Wu WD, Huang J, Cao DD, Qian PJ, Ju XC, Luo ZG. Thymosin beta 4 as an Alzheimer disease intervention target identified using human brain organoids. *Stem Cell Reports.* 2025 Sep

- 9;20(9):102601. doi: 10.1016/j.stemcr.2025.102601. Epub 2025 Aug 14. PMID: 40816274; PMCID: PMC12447315.
67. D'Aiuto L, Caldwell JK, Edwards TG, Zhou C, McDonald ML, Di Maio R, Joel WA, Hyde VR, Wallace CT, Watkins SC, Wesesky MA, Shemesh OA, Nimgaonkar VL, Bloom DC. Phosphorylated-tau associates with HSV-1 chromatin and correlates with nuclear speckles decondensation in low-density host chromatin regions. *Neurobiol Dis.* 2025 Mar;206:106804. doi: 10.1016/j.nbd.2025.106804. Epub 2025 Jan 14. PMID: 39818277; PMCID: PMC12001802.
 68. Sun GG, Wang C, Mazzarino RC, Perez-Corredor PA, Davtyan H, Blurton-Jones M, Lopera F, Arboleda-Velasquez JF, Shi Y. Microglial APOE3 Christchurch protects neurons from Tau pathology in a human iPSC-based model of Alzheimer's disease. *Cell Rep.* 2024 Dec 24;43(12):114982. doi: 10.1016/j.celrep.2024.114982. Epub 2024 Nov 28. PMID: 39612244; PMCID: PMC11753789.
 69. Chen J, Li S, Zhang F, Chen J, Cai C, Guo Y, Lei Z, Zeng LH, Zi D, Shen Y, Tan J. The pathogenic APP N-terminal Val225Ala mutation alters tau protein liquid-liquid phase separation and exacerbates synaptic damage. *Mol Psychiatry.* 2025 Jun;30(6):2316-2334. doi: 10.1038/s41380-024-02837-6. Epub 2024 Nov 18. PMID: 39558004.
 70. Majerníková N, Marmolejo-Garza A, Salinas CS, Luu MDA, Zhang Y, Trombetta-Lima M, Tomin T, Birner-Gruenberger R, Lehtonen Š, Koistinaho J, Wolters JC, Ayton S, den Dunnen WFA, Dolga AM. The link between amyloid β and ferroptosis pathway in Alzheimer's disease progression. *Cell Death Dis.* 2024 Oct 28;15(10):782. doi: 10.1038/s41419-024-07152-0. PMID: 39468028; PMCID: PMC11519607.
 71. Lee SE, Park S, Kang R, Lee T, Yu WJ, Chang S, Park JC. Hippocampal tau-induced GRIN3A deficiency in Alzheimer's disease. *FEBS Open Bio.* 2024 Dec;14(12):2059-2071. doi: 10.1002/2211-5463.13904. Epub 2024 Oct 13. PMID: 39396906; PMCID: PMC11609574.
 72. Colussi C, Bertozzi A, Leone L, Rinaudo M, Sollazzo R, Conte F, Paccosi E, Nardella L, Aceto G, Li Puma DD, Ripoli C, Vita MG, Marra C, D'Ascenzo M, Grassi C. Nucleoporin 153 deficiency in adult neural stem cells defines a pathological protein-network signature and defective neurogenesis in a mouse model of AD. *Stem Cell Res Ther.* 2024 Sep 3;15(1):275. doi: 10.1186/s13287-024-03805-1. PMID: 39227892; PMCID: PMC11373261.
 73. Saha O, Melo de Farias AR, Pelletier A, Siedlecki-Wullich D, Landeira BS, Gadaut J, Carrier A, Vreulx AC, Guyot K, Shen Y, Bonnefond A, Amouyel P, Tcw J, Kilinc D, Queiroz CM, Delahaye F, Lambert JC, Costa MR. The Alzheimer's disease risk gene BIN1 regulates activity-dependent gene expression in human-induced glutamatergic neurons. *Mol Psychiatry.* 2024 Sep;29(9):2634-2646. doi: 10.1038/s41380-024-02502-y. Epub 2024 Mar 22. PMID: 38514804; PMCID: PMC11420064.
 74. Fertan E, Böken D, Murray A, Danial JSH, Lam JYL, Wu Y, Goh PA, Alić I, Cheetham MR, Lobanova E, Zhang YP, Nižetić D, Klenerman D. Cerebral organoids with chromosome 21 trisomy secrete Alzheimer's disease-related soluble aggregates detectable by single-molecule-

- fluorescence and super-resolution microscopy. *Mol Psychiatry*. 2024 Feb;29(2):369-386. doi: 10.1038/s41380-023-02333-3. Epub 2023 Dec 15. PMID: 38102482; PMCID: PMC11116105.
75. Scopa C, Barnada SM, Cicardi ME, Singer M, Trotti D, Trizzino M. JUN upregulation drives aberrant transposable element mobilization, associated innate immune response, and impaired neurogenesis in Alzheimer's disease. *Nat Commun*. 2023 Dec 4;14(1):8021. doi: 10.1038/s41467-023-43728-8. PMID: 38049398; PMCID: PMC10696058.
 76. Muok L, Liu C, Chen X, Esmonde C, Arthur P, Wang X, Singh M, Driscoll T, Li Y. Inflammatory Response and Exosome Biogenesis of Choroid Plexus Organoids Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 21;24(8):7660. doi: 10.3390/ijms24087660. PMID: 37108817; PMCID: PMC10146825.
 77. Sahlgren Bendtsen KM, Hall VJ. The Breakthroughs and Caveats of Using Human Pluripotent Stem Cells in Modeling Alzheimer's Disease. *Cells*. 2023 Jan 27;12(3):420. doi: 10.3390/cells12030420. PMID: 36766763; PMCID: PMC9913971.
 78. Wenzel TJ, Murray TE, Noyovitz B, Narayana K, Gray TE, Le J, He J, Simtchouk S, Gibon J, Alcorn J, Mousseau DD, Zandberg WF, Klegeris A. Cardiolipin released by microglia can act on neighboring glial cells to facilitate the uptake of amyloid- β (1-42). *Mol Cell Neurosci*. 2023 Mar;124:103804. doi: 10.1016/j.mcn.2022.103804. Epub 2022 Dec 30. PMID: 36592800.
 79. Lim JY, Lee JE, Park SA, Park SI, Yon JM, Park JA, Jeun SS, Kim SJ, Lee HJ, Kim SW, Yang SH. Protective Effect of Human-Neural-Crest-Derived Nasal Turbinate Stem Cells against Amyloid- β Neurotoxicity through Inhibition of Osteopontin in a Human Cerebral Organoid Model of Alzheimer's Disease. *Cells*. 2022 Mar 18;11(6):1029. doi: 10.3390/cells11061029. PMID: 35326480; PMCID: PMC8947560.
 80. Lambert E, Saha O, Soares Landeira B, Melo de Farias AR, Hermant X, Carrier A, Pelletier A, Gadaut J, Davoine L, Dupont C, Amouyel P, Bonnefond A, Lafont F, Abdelfettah F, Verstreken P, Chapuis J, Barois N, Delahaye F, Dermaut B, Lambert JC, Costa MR, Dourlen P. The Alzheimer susceptibility gene BIN1 induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects. *Acta Neuropathol Commun*. 2022 Jan 8;10(1):4. doi: 10.1186/s40478-021-01285-5. PMID: 34998435; PMCID: PMC8742943.
 81. Zhao J, Lu W, Ren Y, Fu Y, Martens YA, Shue F, Davis MD, Wang X, Chen K, Li F, Liu CC, Graff-Radford NR, Wszolek ZK, Younkin SG, Brafman DA, Ertekin-Taner N, Asmann YW, Dickson DW, Xu Z, Pan M, Han X, Kanekiyo T, Bu G. Apolipoprotein E regulates lipid metabolism and α -synuclein pathology in human iPSC-derived cerebral organoids. *Acta Neuropathol*. 2021 Nov;142(5):807-825. doi: 10.1007/s00401-021-02361-9. Epub 2021 Aug 28. Erratum in: *Acta Neuropathol*. 2022 Jan;143(1):119-121. doi: 10.1007/s00401-021-02380-6. PMID: 34453582; PMCID: PMC8500881.

82. Chen X, Sun G, Tian E, Zhang M, Davtyan H, Beach TG, Reiman EM, Blurton-Jones M, Holtzman DM, Shi Y. Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure. *Adv Sci (Weinh)*. 2021 Sep;8(18):e2101462. doi: 10.1002/adv.202101462. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34337898; PMCID: PMC8456220.
83. Pérez MJ, Ivanyuk D, Panagiotakopoulou V, Di Napoli G, Kalb S, Brunetti D, Al-Shaana R, Kaeser SA, Fraschka SA, Jucker M, Zeviani M, Viscomi C, Deleidi M. Loss of function of the mitochondrial peptidase PITRM1 induces proteotoxic stress and Alzheimer's disease-like pathology in human cerebral organoids. *Mol Psychiatry*. 2021 Oct;26(10):5733-5750. doi: 10.1038/s41380-020-0807-4. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32632204; PMCID: PMC8758476.
84. Becerra-Calixto A, Banerjee A, Fan H, Tan C, Lee E, McCullough LD, Lee J. A neuroimmune cerebral assembloid model to study the pathophysiology of familial Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2025 Oct 8;22(1):227. doi: 10.1186/s12974-025-03544-x. PMID: 41063316; PMCID: PMC12509420.
85. Rao C, Semrau S, Fossati V. Decoding microglial functions in Alzheimer's disease: insights from human models. *Trends Immunol*. 2025 Apr;46(4):310-323. doi: 10.1016/j.it.2025.02.011. Epub 2025 Mar 19. PMID: 40113535; PMCID: PMC11993344.
86. Chen X, Sun G, Feng L, Tian E, Shi Y. Human iPSC-derived microglial cells protect neurons from neurodegeneration in long-term cultured adhesion brain organoids. *Commun Biol*. 2025 Jan 9;8(1):30. doi: 10.1038/s42003-024-07401-0. PMID: 39789340; PMCID: PMC11718079.
87. Sabogal-Guaqueta AM, Mitchell-Garcia T, Hunneman J, Voshart D, Thiruvalluvan A, Foijer F, Kruyt F, Trombetta-Lima M, Eggen BJL, Boddeke E, Barazzuol L, Dolga AM. Brain organoid models for studying the function of iPSC-derived microglia in neurodegeneration and brain tumours. *Neurobiol Dis*. 2024 Dec;203:106742. doi: 10.1016/j.nbd.2024.106742. Epub 2024 Nov 22. PMID: 39581553.
88. Mrza MA, He J, Wang Y. Integration of iPSC-Derived Microglia into Brain Organoids for Neurological Research. *Int J Mol Sci*. 2024 Mar 9;25(6):3148. doi: 10.3390/ijms25063148. PMID: 38542121; PMCID: PMC10970489.
89. Takata M, Nishimura K, Harada K, Iwasaki R, Ando M, Yamada S, Ginhoux F, Takata K. Analysis of A β -induced neurotoxicity and microglial responses in simple two- and three-dimensional human iPSC-derived cortical culture systems. *Tissue Cell*. 2023 Apr;81:102023. doi: 10.1016/j.tice.2023.102023. Epub 2023 Jan 14. PMID: 36709697.
90. Venkataraman L, Fair SR, McElroy CA, Hester ME, Fu H. Modeling neurodegenerative diseases with cerebral organoids and other three-dimensional culture systems: focus on Alzheimer's disease. *Stem Cell Rev Rep*. 2022 Feb;18(2):696-717. doi: 10.1007/s12015-020-10068-9. Epub 2020 Nov 12. PMID: 33180261; PMCID: PMC7658915.
91. Bi FC, Yang XH, Cheng XY, Deng WB, Guo XL, Yang H, Wang Y, Li J, Yao Y. Optimization of cerebral organoids: a more qualified model for Alzheimer's disease research. *Transl Neurodegener*. 2021 Aug

- 9;10(1):27. doi: 10.1186/s40035-021-00252-3. PMID: 34372927; PMCID: PMC8349709.
92. Wray S. Modelling neurodegenerative disease using brain organoids. *Semin Cell Dev Biol.* 2021 Mar;111:60-66. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.05.012. Epub 2020 Jun 5. PMID: 32513498.
 93. Lee JH, Yoo G, Choi J, Park SH, Shin H, Prasad R, Lee Y, Ahn MR, Cho IJ, Sun W. Cell-line dependency in cerebral organoid induction: cautionary observations in Alzheimer's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Brain.* 2022 May 16;15(1):46. doi: 10.1186/s13041-022-00928-5. PMID: 35578344; PMCID: PMC9109296.
 94. Costamagna G, Comi GP, Corti S. Advancing Drug Discovery for Neurological Disorders Using iPSC-Derived Neural Organoids. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 6;22(5):2659. doi: 10.3390/ijms22052659. PMID: 33800815; PMCID: PMC7961877.
 95. Hernández D, Rooney LA, Daniszewski M, Gulluyan L, Liang HH, Cook AL, Hewitt AW, Pébay A. Culture Variabilities of Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Are a Major Issue for the Modelling of Phenotypes Observed in Alzheimer's Disease. *Stem Cell Rev Rep.* 2022 Feb;18(2):718-731. doi: 10.1007/s12015-021-10147-5. Epub 2021 Mar 16. PMID: 33725267.

