

**ALTERACIONES EN EL NICHU NEUROVASCULAR
DURANTE EL DESARROLLO DEL CEREBRO
ESQUIZOFRÉNICO**

Tesis

**Entregada A La Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Doctor en Ciencias con mención en
Biología Molecular, Celular y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Bárbara Sofía Casas Atala

Octubre, 2020

Directora de Tesis Dra:

Verónica Palma Alvarado

Co-director de Tesis Dr:

Stevens Rehen

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

BÁRBARA SOFÍA CASAS ATALA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Director de Tesis:

Dra. Verónica Palma

.....

Co-Director de Tesis

Dr. Stevens Rehen

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Tulio Núñez

.....

Dr. Christian González

.....

Dra. Lorena Varela-Nallar

.....

Dra. Viviana Montecinos

.....

A mi familia, que amo con locura

RESUMEN BIOGRÁFICO



“Durante esta corta trayectoria científica he sentido siempre un grado de orgullo al decir que mis logros académicos son producto del esfuerzo personal y la educación pública. Sin embargo, esto sería faltar a la verdad, puesto que soy una persona privilegiada y es gracias a mis privilegios que estoy aquí parada frente a ustedes.

Mi privilegio no recae en haber nacido en una cuna de oro y obtener ganancias a partir de pitutos. Mi privilegio no recae solo en haber tenido un hogar, amor incondicional, comida caliente y salud. Para mí, mi privilegio recae en haber nacido en una familia, con unos padres que me entregaron principios y valores que no son los que entrega este sistema. En que las relaciones no se basan en la competencia, sino en relaciones fraternas, en que la bondad de la gente suele ser contraria al dinero que acuñan, en que todo puede ser discutido con argumentos, en que la única posesión de valor es la propia voluntad. Bajo ese espíritu y en mi condición de amiga, hija, compañera, hermana, madre, mujer parte de este planeta... es que considero un deber luchar contra aquellos que atentan contra la dignidad de las personas, contra aquellos que construyen su fortuna en base al hambre, la sed, la enfermedad, la vejez, la ignorancia, la opresión machista, la masacre de los pueblos ancestrales... en base al sufrimiento ajeno.

El otro día mi hijo me hizo un dibujo. Era una especie figura circular, más parecida a una papa con ojos con pestañas, pies, una sonrisa y un brazo levantado agarrando una especie de palo o bandera, me dijo que era yo en una marcha, gritando vamos compañeros.

Bueno hijo, te prometo que mi brazo estará siempre en alto, pues para eso tengo raíces muy fuertes.”

Extracto discurso Premiación FWIS L’Óreal-UNESCO. Diciembre del 2019.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis corresponde a la finalización de un proceso de 5 años. Quienes me conocen sabrán cuánto ha pasado en este tiempo y lo agradecida que estoy de todas las personas que he conocido en este proceso.

Quisiera agradecer a mi tutora, Verónica Palma, por todo su apoyo. Por siempre creer en mí y embarcarnos en este proyecto que en un comienzo parecía una idea loca y hoy tiene todo el sentido del mundo. Más importante, quisiera agradecer el cariño, la paciencia y la empatía, el hacer del laboratorio un lugar grato, una segunda casa.

Quisiera agradecer a todos mis compañeros de laboratorio por su constante ayuda y simpatía. Han sido muchos años y guardo con cariño los momentos compartidos con cada uno. Quisiera agradecer también a los compañeros de los laboratorios de Biología del Desarrollo (Allende y Glavic) y a los auxiliares y técnicos, por tanta buena onda, celebraciones y risas. La ciencia siempre es algo complicado y lleno de fracasos, pero la verdad es que lo pasé muy bien durante todo este tiempo y sé que gran parte es por las hermosas personas que he conocido. Un agradecimiento especial a las mamis VP, Catalina Prieto, Daniela Carrillo y Sofía Puvogel, porque realmente hacer un doctorado con guagua es otra cosa y poder compartirlo con ustedes fue lo mejor.

Agradezco enormemente a mi co-tutor Stevens Rehen, por su generosa colaboración, sin la cual nada de esto habría sido posible (y en qué mejor lugar que Rio de Janeiro!). Agradezco a los miembros de su laboratorio, en especial a Marcelo y Gaby, por toda la ayuda y la calidez con la que me recibieron en cada visita.

Quisiera agradecer a los Dres Fernando Ezquer y Marcelo Ezquer, por facilitarme sus instalaciones de laboratorio en la Universidad del Desarrollo y a sus postdoctorados Markus Uhrig y Benjamín Erranz, por iniciarme en el cultivo de hiPSC y su ayuda con los protocolos de diferenciación. Agradezco también a Nicole Tischler por abrirme las puertas de su laboratorio en la Fundación Ciencia y Vida cuando pasamos por algunas emergencias en el laboratorio.

Agradezco enormemente a mi familia. Durante todos estos años de formación académica he aprendido muchísimo, pero las cosas realmente importantes las he aprendido siempre de mis padres. Les agradezco por su amor infinito y por acompañarme en esta locura que es abrirse camino en la ciencia en Chile, por soportar mis momentos más pesados nacidos desde la frustración y el cansancio. Por construir un hogar fraterno y llenar mis días de felicidad, por cuidar a mis hijos cuando yo no he podido. Porque nada de esto hubiese sido posible sin ustedes.

Agradezco a Emiliano (o mejor Nano), por ser el mejor compañero del mundo. Las palabras se me hacen pocas para decir lo mucho que te amo y lo mucho que agradezco tu apoyo. Desde pipetear a mi lado, viajar juntos, quedarnos hasta tarde, llorar los fracasos y celebrar las victorias. Todo es más feliz cuando estoy contigo.

Quisiera agradecer a mis hijos, Gustavo y Eloísa, por ser el propulsor que me impulsa a hacer más cosas de las que me creía capaz. Por ser mi premio y mi refugio al final del día.

Agradezco a todos los donantes que participaron en este estudio. A los pacientes con esquizofrenia y sus familiares y amigos, por su generosidad y su lucha diaria, ya que son el origen y el destino de esta investigación.

Finalmente agradezco a CONICYT por haber financiado mis estudios de doctorado, congresos, gastos y otros, con dinero de todos los chilenos; a IBRO-LARC por las ayudas de viaje; y a L'Oreal UNESCO por haberme otorgado el Premio FWIS 2019. Espero haber sido una buena elección para todos ellos.

ÍNDICE

INFORME DE APROBACIÓN.....	i
RESUMEN BIOGRÁFICO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
RESUMEN EJECUTIVO	xvii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Bases estructurales, celulares y moleculares de la interdependencia neurovascular en el Sistema Nervioso Central	1
1.1. Desarrollo embrionario de la vasculatura cerebral	1
1.2. El Nicho Neurovascular	6
2. Repensando la esquizofrenia en cuanto a su origen y etiología	11
2.1. Síntomas y factores de riesgo de la esquizofrenia.....	11
2.2. La esquizofrenia: Una enfermedad del neurodesarrollo	13
2.3. Angiogénesis y esquizofrenia: La propuesta visionaria de Bleuler al día de hoy..	16
3. Uso de células troncales pluripotentes inducidas humanas para estudiar desordenes psiquiátricos	17
II. HIPÓTESIS	22
III. OBJETIVOS	22
1. Objetivo General	22
2. Objetivos Específicos.....	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1. Cultivo Celular	23
1.1. Generación de hiPSC	24
1.2. Generación de NSC.....	25

1.3.	Generación de Neuroesferas	26
1.4.	Generación de NPC.....	26
1.5.	Generación de Astrocitos.....	27
1.6.	Generación de BEC	27
2.	Colección de medio condicionado (MC).....	28
3.	Proteoma angiogénico	29
4.	Extracción de RNA y síntesis de cDNA	29
5.	PCR cuantitativo (qPCR)	30
6.	Western Blot.....	31
7.	Inmunofluorescencia.....	32
8.	Modelo tridimensional de reclutamiento de células endoteliales.....	32
9.	Ensayo de formación de túbulos y ramificaciones.....	34
10.	Ensayo de angiogénesis en membrana corioalantoidea (CAM) de embrión de pollo 35	
11.	Análisis estadístico	36
V.	RESULTADOS.....	37
1.	Analizar la diferencia en la expresión de moléculas angiogénicas de células troncales neurales y células del linaje neural, derivadas de hiPSC SZP e hiPSC Ctrl.....	37
1.1.	Las NSC secretan una gran variedad de moléculas angiogénicas	39
1.2.	Las NSC SZP presentan perfil angiogénico desbalanceado.	41
1.3.	Células del linaje neural derivados de NSC SZP presentan un perfil angiogénico desbalanceado.....	44
2.	Evaluar las diferencias en la formación de vasos inducido por parte de NSC y células del linaje neural derivadas de hiPSC SZP e hiPSC Ctrl.	50
2.1.	Estudios de la vascularización temprana en modelos mixtos tridimensionales revelan una deficiencia en el reclutamiento de EC por parte de NSC SZP.	50
2.2.	Las NSC SZP inducen una menor angiogénesis <i>in vitro</i>	53
2.3.	Las NSC SZP inducen una menor angiogénesis <i>in vivo</i>	57
2.4.	Células del linaje neural derivadas de NSC SZP presentan deficiencias en la inducción de la angiogénesis <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	59
3.	Analizar las diferencias funcionales entre células endoteliales derivadas de hiPSC SZP e hiPSC Ctrl.	64
3.1.	hiPSC pueden ser diferenciadas en células endoteliales con características de microvasculatura cerebral	64

3.2.	BEC SZP presentan un desbalance en la expresión de moléculas asociadas a su función angiogénica y de barrera	67
1.1.	BEC SZP generan menor angiogénesis en respuesta a VEGFA	72
VI.	DISCUSIÓN	75
1.	Las NSC son reguladoras claves de la angiogénesis	75
2.	La vía de señalización de VEGFA está desregulada en SZP	76
3.	Inducción disfuncional de la angiogénesis en SZP	82
4.	Alteración endotelial y BHE	90
5.	Significancia biomédica	98
6.	Células derivadas de hiPSC como modelo de desarrollo cerebral temprano en esquizofrenia	99
VII.	CONCLUSIONES	102
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	103
IX.	ANEXOS	118
	ANEXO 1: Materiales y Métodos	118
	ANEXO 2: Resultados Objetivo 1	121
	ANEXO 3: Resultados Objetivo 2	123
	ANEXO 4: Resultados Objetivo 3	125
	PUBLICACIONES	127
	FINANCIAMIENTO	128

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Rol dual de las moléculas angiogénicas secretadas por las NSC derivadas de hiPSC	40
Tabla S1. Líneas celulares derivadas de hiPSC.....	118
Tabla S2. Partidores usados para qPCR	119
Tabla S3. Anticuerpos utilizados en Western Blot e inmunofluorescencia.....	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vascularización del cerebro.....	3
Figura 2. Formación de la Unidad Neuro-vascular y la BHE.....	5
Figura 3. Vasculogénesis y angiogénesis	8
Figura 4. Los factores de riesgo genéticos y ambientales convergen en el neurodesarrollo.....	14
Figura 5. Modelamiento de enfermedades neuropsiquiátricas mediante el uso de hiPSC.....	19
Figura 6. NSC y linajes derivados.....	38
Figura 7. Las NSC SZP presentan un desbalance en la secreción de moléculas angiogénicas.....	42
Figura 8. Neuroesferas SZP presentan un desbalance en la secreción de factores angiogénicos.....	45
Figura 9. Células derivadas de NSC SZP exhiben un desbalance en la secreción de moléculas angiogénicas.....	48
Figura 10. Estudio de vascularización temprana en Nsp.....	52
Figura 11. El MC de NSC SZP es menos angiogénico <i>in vitro</i>	54
Figura 12. VEGFA es relevante para la angiogénesis <i>in vitro</i> inducida por NSC.....	56

Figura 13. MC de NSC SZP induce menos angiogénesis in vivo que el MC de NSC Ctrl..	58
Figura 14. MC de Nsp SZP induce una menor angiogénesis <i>in vitro</i> que el MC de Nsp Ctrl.....	61
Figura 15. MC de NPC SZP induce una menor angiogénesis in vitro que el MC de NPC Ctrl.....	61
Figura 16. MC de Atrocitos SZP induce la formación de una mayor cantidad de vasos de menor calibre que el MC de Astrocitos Ctrl.....	63
Figura 17. hiPSC pueden ser diferenciadas a BEC.....	66
Figura 18. Las BEC SZP presentan alteraciones en la expresión de moléculas asociadas a su función angiogénica y de barrera.....	68
Figura 19. Las BEC SZP presentan un desbalance en la secreción de moléculas angiogénicas.....	71
Figura 20. Las BEC SZP generan menos angiogénesis en respuesta a VEGFA.....	73
Figura 21. Posible desregulación en el nicho neurovascular en SZP durante el desarrollo cerebral.....	101
Figura S1. Optimización de los tiempos de incubación en el ensayo de formación de túbulos y ramificaciones usando BEC.....	120
Figura S2. Caracterización de NSC Ctrl y NSC SZP.....	121

Figura S3. Caracterización de Astrocitos SZP.....	122
Figura S4. Las HUVEC expresan marcadores clásicos de BEC.....	123
Figura S5. Efecto de VEGFA sobre el diámetro de los vasos en el ensayo CAM.....	124
Figura S6. Las BEC SZP presentan variaciones en la expresión de receptores neuroangiogénicos.....	125
Figura S7. Los niveles de mRNA de moléculas angiogénicas y de barrera varían entre BEC Ctrl y BEC SZP.....	126

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés, Brain-Derived Neurotrophic Factor)

BEC: Células Endoteliales Cerebrales (del inglés, Brain Endothelial Cells)

BHE: Barrera Hemato-Encefálica

Bvz: Bevacizumab

CAM: membrana corioalantoidea (del inglés, Chorioallantoic Membrane)

Ctrl: Sujeto control

DMS-5: Manual Diagnóstico y Estadístico de los Desórdenes Mentales N°5

FGFb: Factor de crecimiento fibroblástico básico (del inglés basic Fibroblast Growth Factor),

FLT-1, VEGFR1: Receptor el receptor tipo 1 de VEGFA

hiPSC: Células pluripotentes inducidas humanas (del inglés, human induced Pluripotent Stem Cells)

HUVEC: Células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (del inglés, Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

KDR, VEGFR-2, FLK-1: Receptor de tirosina-quinasa tipo 2 de VEGFA

MC: Medio Condicionado

MEC: Matriz Extracelular

NEM: Medio de expansión neural (del inglés, Neural Expansion Medium)

NPC: Células Precursoras Neuronales (del inglés, Neuron Precursor Cells)

NSC: Células Troncales Neurales (del inglés Neural Stem Cells)

Nsp: Neuroesfera

NVU: Unidad Neurovascular (del inglés, Neuro-Vascular Unit)

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, Phosphate-Buffered Saline)

PCAP: del inglés Pial Capillary Anastemotic Plexus

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase chain reaction)

PEDF, Serpin F1: Factor derivado del epitelio pigmentario (del inglés, Pigment Epithelium-Derived Factor)

PNVP: Plexo vascular perineural (del inglés, Perineural Vascular Plexus)

qPCR: PCR cuantitativo (del inglés quantitative PCR)

SZP: Paciente con esquizofrenia

TEER: Resistencia Eléctrica Transepitelial (del inglés, Transepithelial Electrical Resistance)

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial (del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor)

RESUMEN

La formación de vasos sanguíneos en el cerebro ocurre de manera simultánea a la formación de neuronas y glías durante el desarrollo embrionario, generándose el nicho neurovascular. Las señales presentes en este nicho son importantes para el desarrollo neural y vascular, así como para la formación y mantención de la barrera hematoencefálica. Por tanto, alteraciones en la comunicación neurovascular podrían tener una importante contribución al desarrollo de enfermedades del neurodesarrollo, como la esquizofrenia.

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica, la que se caracteriza por sintomatología psicótica, deficiencias en la conectividad cerebral y pérdidas de materia gris. Creciente evidencia ha ligado anomalías vasculares a esta enfermedad, tales como un déficit en el Factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGFA) en cerebros post mortem y plasma sanguíneo adulto, hipoperfusión en la corteza, neuroinflamación y disfunción de la barrera hematoencefálica.

El uso de células troncales pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) se ha ampliado como una nueva estrategia para estudiar desordenes psiquiátricos, debido a que conservan la diversidad genética de los donantes y recapitulan procesos del desarrollo *in vitro*. Es por ello por lo que, en la presente tesis se quiso evaluar si, **al recapitular el neurodesarrollo en la esquizofrenia mediante hiPSC, una desregulación funcional tanto del linaje neural como endotelial, componentes principales del nicho neurovascular, conlleva a una angiogénesis deficiente.**

Para ello se comparó entre células derivadas de hiPSC obtenidas de esquizofrénicos (SZP) e hiPSC obtenidas de controles sanos (Ctrl), la diferencia en la expresión de moléculas angiogénicas por parte de células del linaje neural; sus diferencias en la inducción de la formación de vasos; y las diferencias fenotípicas y funcionales entre células endoteliales cerebrales (BEC).

Los resultados de esta tesis indican que es posible observar diferencias entre células derivadas de hiPSC SZP y Ctrl tanto a nivel molecular como funcional. Las células neurales SZP presentan alteraciones en el perfil de moléculas secretadas y son deficientes al inducir la formación de vasos, mientras que las BEC SZP poseen diferencias en la expresión y secreción de moléculas asociadas a su función angiogénica y de barrera. Importammente, la vía de señalización de VEGFA pareciese estar alterada en SZP.

El estudio de células derivadas de hiPSC SZP muestra hallazgos similares a lo encontrado en pacientes y revela alteraciones en vías que podrían estar actuando de forma sinérgica en el nicho neurovascular.

ABSTRACT

The formation of blood vessels in the brain, as well as neurogenesis and gliogenesis, occur simultaneously during embryonic development. The result is the formation of the neurovascular niche, which brings together physical and molecular signals from both systems. Such signals are important for both neural and vascular development, as well as for the formation and maintenance of the blood-brain barrier. Therefore, alterations in neurovascular communication could have an important contribution for the development of neurodevelopmental diseases, such as schizophrenia.

Schizophrenia is a psychiatric disease characterized by psychotic symptoms, deficiencies in brain connectivity and loss of gray matter. Increasing evidence links vascular abnormalities to this disease. Abnormalities such as vascular endothelial growth factor A (VEGFA) deficiency in postmortem brains and adult blood plasma, hypoperfusion in the neocortex, neuroinflammation, and blood-brain barrier dysfunction.

The use of human induced pluripotent stem cells (hiPSC) has been expanded as a new strategy to study psychiatric disorders. hiPSC conserve the genetic diversity of donors and recapitulate developmental processes *in vitro*. In this study we aim to evaluate whether, when recapitulating neurodevelopment in schizophrenia using hiPSC, an angiogenic deficit occurs as a consequence of a functional dysregulation of both neural and endothelial lineages; both of the latter being main components of the neurovascular niche. To such an end, we compare differences between cells obtained from schizophrenia derived patients (SZP) hiPSC with those obtained from healthy control derived (Ctrl) hiPSC cells. Specifically, we compare differences in the expression of angiogenic molecules by cells of the neural lineage, their differences in the induction of vessel formation and phenotypic and functional differences between brain endothelial cells (BEC).

The results of this study indicate that it is possible to observe differences between cells derived from SZP hiPSC with those derived from Ctrl hiPSC, at both the molecular and functional level. SZP neural cells present alterations in the profile of secreted molecules and are deficient in inducing the formation of vessels. In addition, SZP BECs have differences in the expression and secretion of molecules associated with their angiogenic and barrier function. Furthermore, the VEGFA signaling pathway appears to be altered in SZP.

The study of cells derived from SZP hiPSC results in similar findings to those found in SZP revealing alterations in pathways that could be acting synergistically in the neurovascular niche.

RESUMEN EJECUTIVO

En base a la creciente evidencia de que en la esquizofrenia podría existir una patología vascular y que ésta es una enfermedad del neurodesarrollo, la presente tesis tiene como objetivo determinar si al recapitular el neurodesarrollo de la esquizofrenia mediante células troncales pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), los componentes del nicho neurovascular generan una angiogénesis deficiente.

Los resultados de esta tesis indican que es posible observar diferencias entre células de pacientes esquizofrénicos (hiPSC SZP) y de sujetos controles (hiPSC Ctrl) al derivarlas a los distintos componentes celulares del nicho neurovascular. Las células del linaje neural derivadas de hiPSC SZP presentan alteraciones en el perfil de moléculas angiogénicas secretadas y son deficientes al inducir la formación de vasos, tanto in vitro como in vivo. Mientras que las células endoteliales cerebrales (BEC) derivadas de hiPSC SZP poseen diferencias en la expresión y secreción de moléculas asociadas a su función angiogénica y de barrera. Importantemente, la vía de señalización de VEGFA pareciese estar alterada en las células derivadas de hiPSC SZP.

Se concluye que el nicho neurovascular puede ser modelado mediante hiPSC y que al recapitularlo en la esquizofrenia existe una angiogénesis deficiente, debida a la desregulación de sus distintos componentes celulares.

I. INTRODUCCIÓN

En el cerebro coexisten estructuras del sistema nervioso y vascular, las cuales se desarrollan, modulan y adaptan mutuamente. La comunicación entre estos dos sistemas se remonta a etapas embrionarias y de ella depende la formación de estructuras corticales relevantes para el desarrollo y la adultez. ¿Pueden deficiencias en el establecimiento de esta estrecha comunicación subyacer el desencadenamiento de complejas enfermedades del neurodesarrollo como la esquizofrenia, un trastorno mental severo que históricamente se ha abordado como una enfermedad crónica del sistema nervioso? La presente tesis se construye sobre esta interrogante.

1. Bases estructurales, celulares y moleculares de la interdependencia neurovascular en el Sistema Nervioso Central

1.1. Desarrollo embrionario de la vasculatura cerebral

Los vasos sanguíneos transportan oxígeno y nutrientes a través del cuerpo, permitiendo el correcto desarrollo de los órganos y manteniendo la homeostasis del organismo. El sistema nervioso también se extiende por todo el cuerpo, valiéndose de esta gran red de vasos sanguíneos que le suplementan oxígeno y nutrientes, así como también factores neurotróficos que permiten su supervivencia. En el cerebro, esta conexión se desarrolla durante la formación de la red vascular cerebral, la cual es compleja e importante por su aporte en factores durante el desarrollo y en la satisfacción de la alta demanda de glucosa y oxígeno durante toda la vida ¹.

La generación de vasos en el cerebro comienza con un proceso de vasculogénesis alrededor de la semana 6 a 7 de gestación humana, en el cual las células troncales neurales (NSC, del inglés Neural Stem Cells) que residen en el tubo neural secretan señales que permiten el reclutamiento de angioblastos y células endoteliales a su periferia para formar el plexo vascular perineural (PNVP, del inglés Perineural Vascular Plexus) o PCAP (del inglés Pial Capillary Anastemotic Plexus), la cual recubrirá el cerebro en desarrollo y posteriormente madurará para formar la piamadre (Figura 1A-B) ^{2,3}.

Es desde el PNVP que, a partir de la semana 8, se forma la vasculatura intracerebral, mediante un proceso de angiogénesis, definida como la formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes. La vasculatura intracerebral se compone por la vasculatura intracerebral extrínseca, que a su vez incluye los vasos perforantes y el espacio de Virchow Robin, y la microvasculatura intrínseca, la cual está compuesta por los capilares que se encuentran entre los vasos perforantes y son los que constituyen la barrera hematoencefálica (BHE)^{2,4,5}.

Para dichos procesos de vasculogénesis y posterior angiogénesis, la principal señal derivada del tubo neural corresponde al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor), el cual es conocido por ser un factor maestro regulador de los procesos de formación de vasos sanguíneos⁶. La formación de estos nuevos vasos es guiada por el VEGF secretado por las NSC, así como por un conjunto de otros factores que se encuentran presentes en el cerebro embrionario, el cual esta a su vez en activa neurogénesis (Figura 1C)¹.

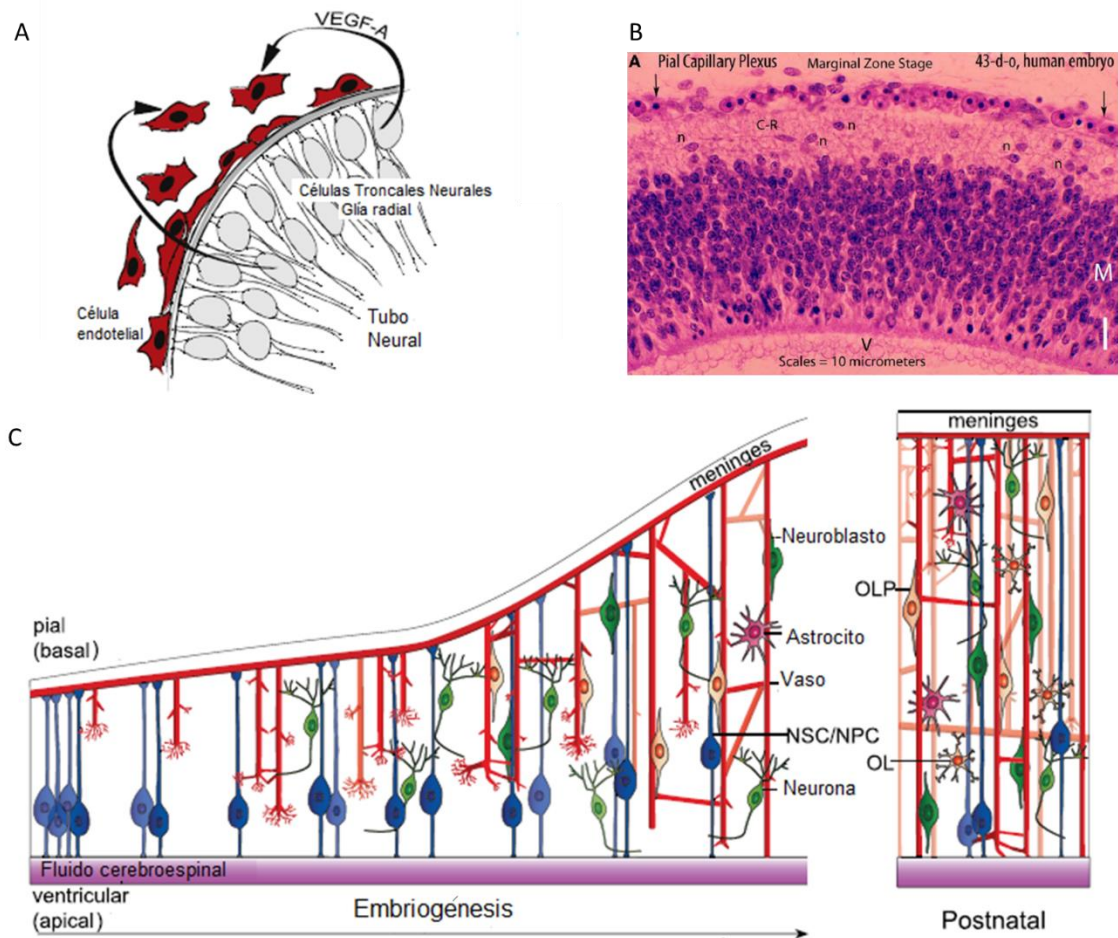


Figura 1. Vascularización del cerebro. (A) Las células troncales neurales (NSC), llamadas glía radial en el contexto del neurodesarrollo, secretan VEGFA para reclutar células endoteliales a la superficie del tubo neural. Modificado de ¹. (B) Sección de la corteza cerebral teñida con hematoxilina/eosina de un embrión de 43 días (7 semanas) muestra el plexo capilar (Pial Capillary Plexus, flechas negras) que recubre la corteza aún no vascularizada. CR= Células Cajal-Retzius; n= neuronas; V= ventrículo. Barra= 10mm.² (C) La neurogénesis comienza alrededor de la semana 7-8 de gestación en la zona germinal de la corteza. Durante la neurogénesis las NSC/NPC dan origen a neuroblastos, luego neuronas, astrocitos y células precursoras de oligodendrocitos (OLP), oligodendrocitos (OL). Simultáneamente se forma la PNVP y se extienden brotes angiogénicos de manera radial hacia el ventrículo. Dichos vasos forman nuevos vasos y generan una rica red vascularizada. Modificado de ⁷.

BHE es el nombre con el que se describen las características específicas que poseen las células endoteliales ubicadas en el cerebro (BEC), las cuales hacen posible la estricta regulación del tráfico celular y molecular entre la sangre y el cerebro, asegurando la entrega de nutrientes, la remoción de productos de desecho y la protección frente a agentes externos mediante transportadores de eflujo^{8,9}. La BHE se compone de BEC que forman el lumen vascular, dentro de un contexto multicelular que incluye la lámina basal, pericitos, astrocitos y neuronas, llamado la unidad neurovascular (NVU, del inglés Neurovascular unit), la cual puede además contener microglías y oligodendrocitos (Figura 2). La NVU se constituye de manera temprana en el desarrollo y conserva cierta plasticidad para adaptarse a las necesidades neuronales⁴.

Las características de BHE no son intrínsecas de todas las células endoteliales, sino que son inducidas tempranamente por el microambiente producido por las células del sistema nervioso central. Además de su migración, las NSC inducen la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 y una menor permeabilidad en las BEC a medida que invaden el neuroepitelio. Se ha reportado que luego del comienzo de la angiogénesis en el cerebro, las BEC presentan una disminución en las fenestraciones y fugas y una mayor expresión de moléculas de unión estrecha como, Claudina-5 (CLN5) y Ocludina (OCLN) (Figura 2 B-C)^{1,10}.

Si bien la secreción de VEGFA y otros factores angiogénicos por parte del tejido neural es fundamental para la generación e invasión de los vasos en cerebro, las NSC inducen las propiedades de BHE, mediante la activación de la vía de señalización

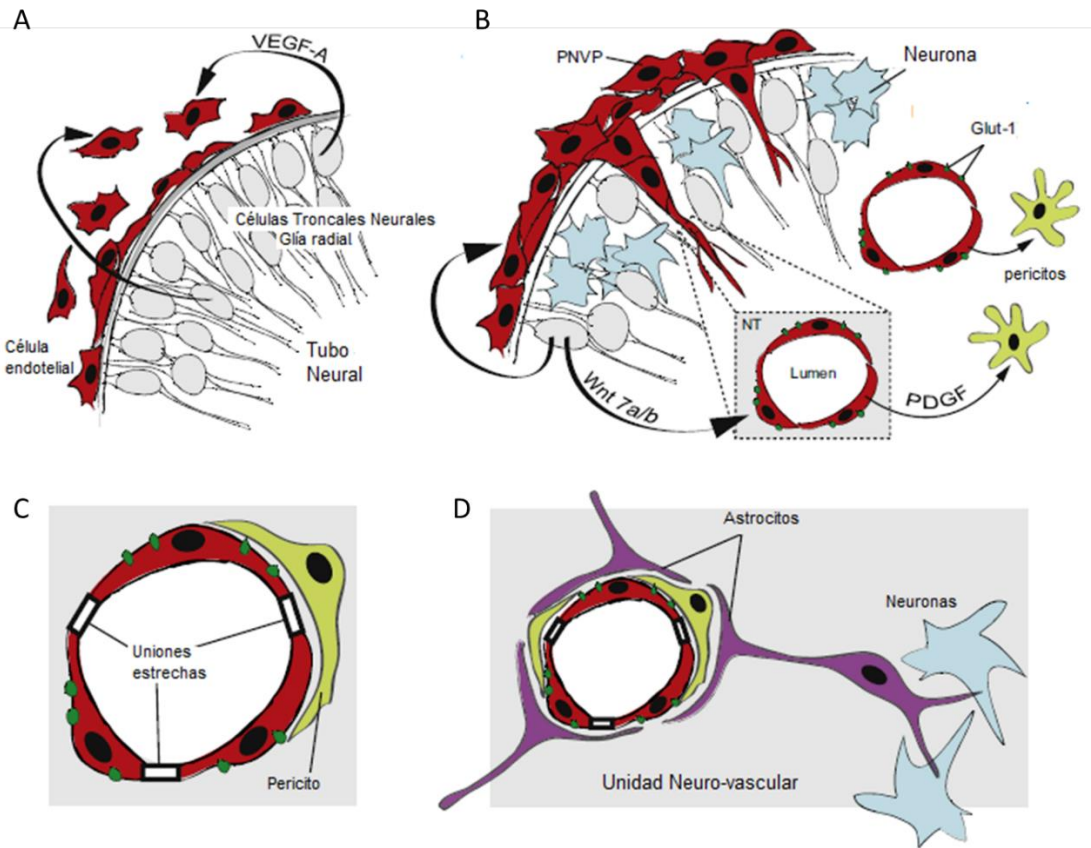


Figura 2. Formación de la Unidad Neuro-vascular y la BHE. (A) El VEGFA secretado por las NSC permite el reclutamiento de células endoteliales y formación del PNVP. (B) En paralelo a la neurogénesis, los brotes angiogénicos invaden el tubo neural desde el PNVP. La señalización de Wnt7a/b favorece la migración e induce la expresión de proteínas de transporte de membrana específicas de BHE (como Glut-1) en las células endoteliales. Los vasos sanguíneos reclutan pericitos a través de la vía de señalización PDGF. (C) En las células endoteliales se expresan proteínas de unión estrecha. Los pericitos favorecen el mantenimiento de la BHE. (D) Al inicio de la gliogénesis, los astrocitos se diferencian y proyectan procesos para envolver los vasos sanguíneos, favoreciendo la estabilización de la BHE. Los astrocitos también se asocian con neuronas. Todos estos elementos constituyen la NVU. Modificado de ¹.

canónica Wnt/beta-catenin, en particular, a través de los ligandos Wnt7a y Wnt7b. Interesantemente, esta vía se mantiene activa durante el desarrollo embrionario y disminuye durante la adultez^{1,10}.

Se ha identificado que la disrupción de la BHE constituye un evento temprano en la fisiopatología de diversas enfermedades que afectan el sistema nervioso, tales como: el Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, desorden neurocognitivo asociado a VIH-1 y traumatismo encefalocraneano, entre otras¹¹; haciendo relevante la comprensión de su formación y mantenimiento para comprender su implicancia en otras enfermedades.

1.2. El Nicho Neurovascular

Por mucho tiempo se ha reconocido una similitud entre las redes vasculares y neuronales, tanto por su coincidencia morfológica, su codependencia y, por la conservación de vías de señalización capaces de regular ambos procesos^{12,13}. Dado que durante el desarrollo del cerebro, los procesos de formación de vasos y neuronas (y posteriormente glías) coinciden de manera temporal y espacial, se reconoce la existencia de un nicho neurovascular que permite la comunicación cruzada entre el sistema vascular y nervioso, su correcto desarrollo y la adecuada estructuración de la NVU. Los elementos estructurales, celulares y moleculares que componen el nicho neurovascular son dinámicos y están afectados a la sumatoria de señales presentes en nicho^{11,14}.

Durante el desarrollo, la formación de vasos ocurre través de dos procesos claves: la vasculogénesis y la angiogénesis (Figura 3A). La vasculogénesis corresponde a la formación de vasos *de novo* mediante el reclutamiento y diferenciación de hemangioblastos provenientes del mesodermo a células endoteliales y células del linaje hematopoyético para generar islas de sangre, las cuales se fusionan para formar plexos vasculares ¹⁵. A nivel molecular, este proceso es guiado por tres factores claves. El primero es el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb), el cual regula la generación de hemangioblastos y permite la diferenciación a células endoteliales. Luego VEGF, siendo el más importante VEGFA, el cual señala mediante el receptor tirosina-quinasa tipo 2 de VEGFA (KDR, VEGFR-2, FLK-1) presente en hemangioblastos, angioblastos y células endoteliales, para promover la diferenciación, migración, proliferación y formación de capilares. Además, VEGFA señala a través del receptor tipo 1 de VEGFA (FLT-1, VEGFR1) que participa en el ensamblaje de células endoteliales en estructuras capilares y la formación de interacciones célula-célula. Finalmente, la señalización de Angiopoyetina-1 (ANG1) a través de su receptor tirosina-quinasa, TIE2, favorece la estabilización de los vasos formados mediante el reclutamiento de células de soporte (ej: pericitos, células de musculatura lisa) y por tanto el establecimiento de plexos vasculares maduros (Figura 3B)^{16,17}.

Por su parte la angiogénesis contribuye a la formación de nuevos vasos, los cuales pueden formarse por brote de nuevos capilares ("*sprouting*") o por intususcepción, que implica la división de un vaso en dos vasos paralelos (Figura 3A)¹⁶. En el desarrollo

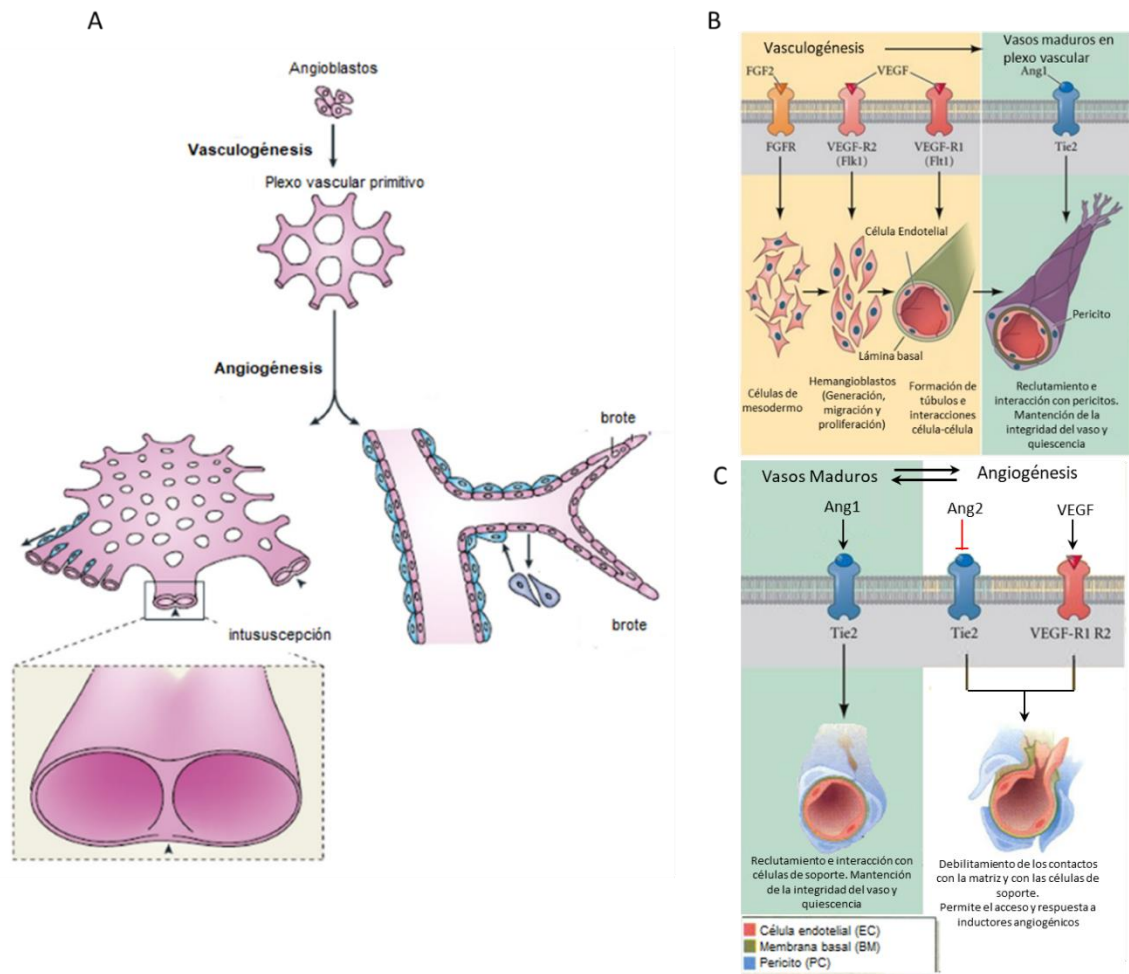


Figura 3. Vasculogénesis y angiogénesis. (A) La vasculogénesis es la formación de vasos *de novo* mediante la diferenciación de angioblastos mesodermales y la formación de plexos vasculares primitivos. La angiogénesis es la formación de vasos a partir de vasos preexistentes y puede ocurrir mediante brotes angiogénicos o intususcepción. Modificado de ¹⁸. (B) En la vasculogénesis, FGF2, VEGF y ANG1 permiten la diferenciación de células mesodermales en células endoteliales, las que luego forman túbulos que son estabilizados mediante interacciones célula-célula y el reclutamiento de células de soporte. Modificado de ¹⁹. (C) Para que ocurra la angiogénesis las uniones célula-célula y célula-matriz de los vasos deben debilitarse y permitir el acceso y respuesta de las células endoteliales a inductores angiogénicos. ANG2 y VEGF son importantes inductores angiogénicos. Modificado de ¹⁷.

nervioso, luego de la formación del PNVP, los vasos son formados e ingresan al cerebro mediante un proceso de angiogénesis en brote. La angiogénesis es un proceso complejo que comienza en presencia de un estímulo angiogénico e implica una serie de pasos consecutivos tales como: la desestabilización de los vasos por pérdida de las células de soporte y contactos con la matriz y lámina basal; migración células endoteliales; alineamiento de las células endoteliales y formación de lúmenes; proliferación de las células endoteliales; habilitación del flujo sanguíneo; estabilización de los vasos formados (Figura 3C)¹⁵⁻¹⁷. Por lo anterior, el control molecular de la angiogénesis en brote implica la presencia de moléculas que favorecen la desestabilización de los vasos, factores quimioattractantes, factores de crecimiento y metaloproteinasas, entre otras, junto con moléculas que permitan recuperar la estabilidad y reformar la lámina basal; es decir, un intrincado balance entre señales pro-angiogénicas y anti-angiogénicas ²⁰.

A partir de la semana gestacional 8 comienza la neurogénesis de manera paralela a la angiogénesis, por lo que los vasos formados permiten la entrega de factores tróficos y nutrientes necesarios para la formación y migración de las neuronas. Uno de los principales eventos que ocurre al formarse los vasos es la disminución de la hipoxia, que hasta el momento favorecía la proliferación de NSC, para entonces pasar a favorecer la diferenciación. Se ha reportado ampliamente que la presencia de las BEC y factores derivados de ellas tiene un impacto importante en la proliferación de las NSC, la regulación del proceso de diferenciación a neuronas y la migración de estas últimas, sin embargo, no todos los factores implicados en estos procesos han sido determinados.

Algunos de dichos factores derivados de endotelio son: VEGFA, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés brain-derived neurotrophic factor), el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, del inglés Pigment epithelium-derived factor o Serpin F1), Efrina-B2 (EFNB2), laminina, entre otros^{7,21}. Cabe destacar que todos ellos también ejercen funciones en la vasculatura.

Se ha observado que varios complejos de señalización ligando-receptor, que originalmente estaban descritos como reguladores de la guía axonal, se encuentran también implicados en procesos de angiogénesis. Dentro de estos encontramos el receptor neuropilina (NRP), capaz de unir a semaforina (SEMA) y VEGF; el receptor de efrina (EPH) capaz de unir efrinas; el receptor roundabouts (ROBO) el cual une Slits y UNC5 el cual une netrinas (NTN). Estos receptores son expresados tanto en las BEC como en neuronas y pueden tener funciones atractivas o repulsivas según el contexto y/o microambiente^{13,22}. Es por ello por lo que alteraciones en los factores presentes en el nicho neurovascular pueden tener consecuencias en el correcto desarrollo cerebral, tanto del tejido neural como la red vascular asociada a él, y, en consecuencia, en el funcionamiento del cerebro. En esta tesis exploraremos esta hipótesis centrándonos particularmente en la esquizofrenia, uno de los trastornos de salud mental más inhabilitante.

2. Repensando la esquizofrenia en cuanto a su origen y etiología

2.1. Síntomas y factores de riesgo de la esquizofrenia

Acorde al Manual Diagnóstico y Estadístico de los Desórdenes Mentales N°5 (DMS-5) publicado por la Asociación Americana de Psiquiatría, la esquizofrenia es un desorden mental severo y crónico, caracterizado por perturbaciones en el pensamiento, la percepción y el comportamiento. Su prevalencia a nivel mundial asciende a cerca del 1% de la población y los síntomas típicos aparecen entre la adolescencia y la cuarta década de vida, siendo el rango etario más frecuente para la aparición del primer episodio psicótico alrededor de los 20-25 años²³. El término esquizofrenia significa “mente dividida” y fue acuñado por el psiquiatra Eugen Bleuler en 1908, para referirse a la enfermedad anteriormente conocida como demencia precoz. En las revisiones del trabajo de Bleuler, se reconoce que el concepto de mente dividida se refiere más bien a una separación entre el pensamiento y el afecto, más que una división en la personalidad²⁴. El diagnóstico de la esquizofrenia es complejo y se basa en la presencia de diferentes criterios, siendo uno de ellos la presencia dentro de un corto plazo de síntomas “positivos” (ej: alucinaciones y delirios), síntomas “negativos” (ej: expresión emocional disminuida y abulia) y síntomas “cognitivos” (déficit en funciones ejecutivas). Además, el diagnóstico incluye la presencia de una deficiencia en el funcionamiento laboral, interpersonal y/o autocuidado, junto con una duración de los síntomas mayor a 6 meses^{23,25}.

Físicamente, la esquizofrenia se caracteriza por deficiencias en la conectividad cerebral y pérdidas de materia gris a lo largo de todo el cerebro, existiendo una distribución anormal de neuronas en la corteza prefrontal. Actualmente, se reconoce que la esquizofrenia es una enfermedad de etiología múltiple, en la cual diferentes factores, tanto genéticos como ambientales confluyen para aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad^{26,27}.

A nivel genético, se considera que esta enfermedad posee una alta herencia, cercana al 80% acorde a análisis estadísticos de gemelos monocigóticos y dicigóticos²⁸. A la fecha, se han identificado más de 100 alteraciones genéticas asociadas de manera significativa con la presencia de la enfermedad. Por tanto, no existe uno o algunos genes responsables del desencadenamiento de ésta, sino que un gran número de alteraciones, las que varían desde alelos comunes con baja penetrancia (que contribuyen en baja proporción al riesgo) y alelos raros con alta penetrancia^{29,30}.

A nivel ambiental, se han asociado al desencadenamiento de la esquizofrenia factores obstétricos (diabetes, preeclampsia, malnutrición, infecciones, hipoxia) y otros eventos durante la niñez, adolescencia y adultez, tales como: infecciones virales, abuso de sustancias, traumas infantiles, situaciones de estrés, migración, entre otros³¹. Reconociéndose que estos últimos eventos actúan como gatillantes sobre sujetos con predisposición o mayor riesgo de desarrollar la enfermedad³².

2.2. La esquizofrenia: Una enfermedad del neurodesarrollo

Desde hace más de tres décadas que se ha propuesto que la esquizofrenia corresponde a una enfermedad del neurodesarrollo. Dada su complejidad, la esquizofrenia no calzaba con ninguno de los modelos imperantes para explicar enfermedades mentales (metabólico, postraumático, neurodegenerativo), por lo que se propuso que una “perturbación” temprana en el desarrollo cerebral podría alterar eventos de maduración cerebral más tardíos³³. Originalmente este modelo del neurodesarrollo permitió ligar la evidencia epidemiológica de alteraciones prenatales y postnatales tempranas con la esquizofrenia. Sin embargo, análisis genéticos y transcriptómicos recientes, han mostrado que muchos de los genes asociados con esquizofrenia influyen procesos tempranos del neurodesarrollo, tales como diferenciación, maduración, migración y sinapsis neuronal^{29,34}.

La visión actual indica que existe como base una heterogeneidad genética (la cual incrementa en mayor o menor medida el riesgo) que interactúa entre sí y con diversos factores ambientales, los cuales convergen en el desarrollo del cerebro, afectando vías y procesos que, frente a eventos propios del desarrollo u otros riesgos ambientales, desencadenan la enfermedad (Figura 4)^{29,35}.

Los tratamientos actuales para la enfermedad incluyen psicoterapia y terapias farmacológicas. Desde el punto de vista farmacológico, los tratamientos siguen la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia, la cual indica que existe una hiperactividad dopaminérgica que es responsable de los síntomas positivos, por lo que los antipsicóticos

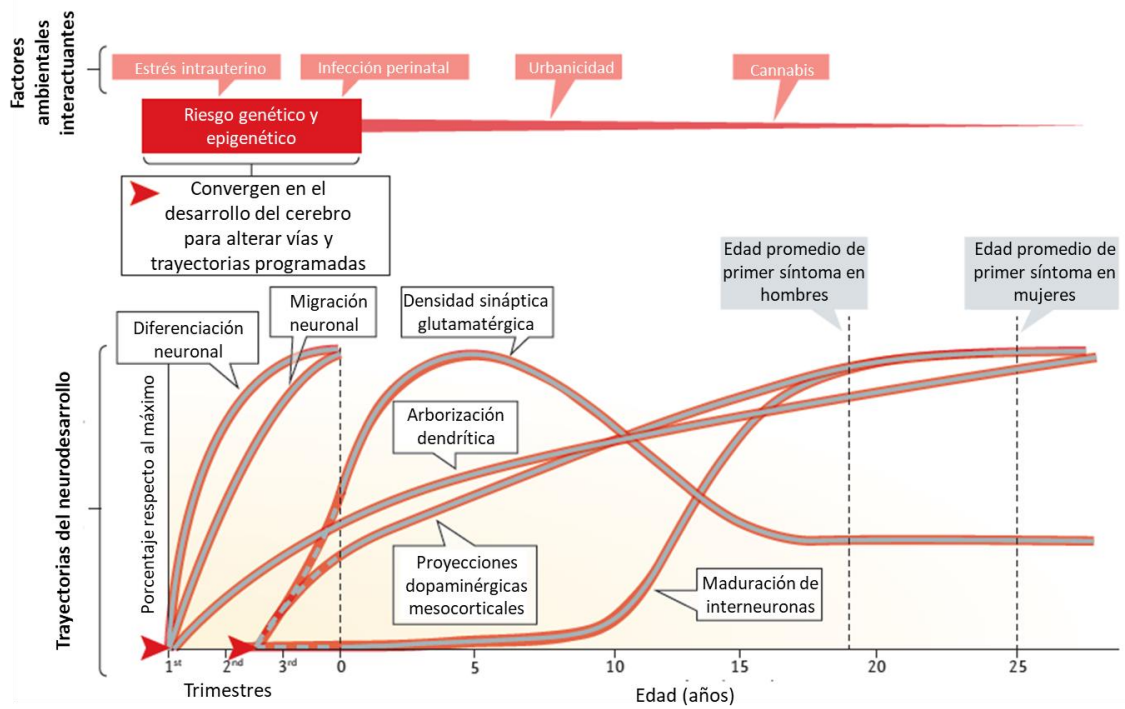


Figura 4. Los factores de riesgo genéticos y ambientales convergen en el neurodesarrollo y desencadenamiento de la esquizofrenia. En la gráfica de abajo se muestran las trayectorias temporales de algunos procesos del neurodesarrollo (curvas grises). En el eje X se muestra el tiempo (prenatal en trimestres y postnatal en años) y el eje Y muestra el porcentaje relativo al máximo desarrollo del proceso. Se indica la edad promedio del desencadenamiento de la esquizofrenia en hombres y mujeres. Los factores de riesgo genético y epigenético convergen en el neurodesarrollo teniendo un impacto en el desarrollo temprano del cerebro, alterando ciertas trayectorias programadas (representado como líneas rojas sobre las curvas grises que muestran un aumento o disminución en su desarrollo). Diferentes factores ambientales aumentan el riesgo en distintas temporalidades; las líneas discontinuas representan trayectorias iniciales que aún no han sido bien definidas. Figura traducida de ²⁹.

de primera generación son antagonistas dopaminérgicos. Debido a la gran presencia de síntomas extrapiramidales (los cuales afectan el movimiento, la postura y el tono muscular) se desarrollaron los antipsicóticos de segunda generación, los cuales bloquean tanto receptores de dopamina como de serotonina, o un subgrupo de estos. Los antipsicóticos de segunda generación tampoco están exentos a efectos adversos y pueden causar desbalances metabólicos (incremento de la glucosa, lípidos, ganancia de peso)³⁶. La observación de que una disminución de las vías dopaminérgicas puede explicar los síntomas negativos y el entendimiento de que la alteración en la señalización de dopamina es un efecto de una desregulación sináptica generalizada en la esquizofrenia ha llevado a replantear los blancos farmacológicos. En esta línea se ha propuesto el uso de moduladores GABA, agentes glutamatérgicos, agentes colinérgicos, neuropéptidos, entre otros, que podrían ser usados en conjunto para tratar la diversidad de síntomas presentes en los pacientes³⁷. Pese a estos esfuerzos, entre el 10 y el 30% de los pacientes muestra poca o ninguna mejoría en sus síntomas luego del tratamiento³⁶.

A pesar de que en la actualidad se reconoce que la esquizofrenia es un desorden sistémico, los mecanismos que desencadenan y predicen la evolución de esta enfermedad siguen siendo mayoritariamente desconocidos y las terapias se enfocan primariamente en los síntomas relacionados con la transmisión nerviosa^{37,38}. Esto hace importante estudiar otros aspectos, más allá del funcionamiento neuronal, que podrían afectar al desarrollo de la enfermedad y potencialmente servir como blancos terapéuticos.

Debido a la importancia que tiene la señalización del nicho neurovascular en el correcto desarrollo del cerebro, cabe preguntarse si es que, de forma concomitante al desarrollo neuronal aberrante que causa la esquizofrenia, pueda existir una alteración en la producción de factores que guían la normal angiogénesis cerebral. Dichas alteraciones en la angiogénesis podrían derivar en un menor aporte de factores tróficos provenientes del sistema vascular, impactando a su vez en el correcto desarrollo del cerebro.

2.3. Angiogénesis y esquizofrenia: La propuesta visionaria de Bleuler al día de hoy

Tal como fuera descrito por Bleuler en 1911 “La fragilidad de los vasos sanguíneos que aparece en muchos esquizofrénicos, tanto agudos como crónicos, parece indicar una real patología vascular”³⁹. Creciente evidencia clínica ha permitido ligar la esquizofrenia con diversas deficiencias en el sistema vascular, en particular con la vasculatura cerebral, observándose regiones con aumento del flujo sanguíneo cerebral o hiperperfusión y otras regiones con disminución en el flujo o hipoperfusión, las cuales podrían asociarse con la presencia de síntomas positivos y negativos, respectivamente⁴⁰⁻⁴². Además se ha propuesto una vinculación entre la esquizofrenia y una disrupción de la BHE asociada a neuroinflamación y estrés oxidativo⁴³.

A nivel molecular, se ha observado que los niveles sanguíneos de VEGFA en esquizofrénicos adultos y que el mRNA de VEGFA en cerebros *post-mortem* de esquizofrénicos son menores que en individuos sanos⁴⁴⁻⁴⁶. Uno de los receptores de VEGFA, VEGFR2 (KDR) también se ha encontrado disminuido en la corteza prefrontal

post-mortem de esquizofrénicos ⁴⁷. FGF2, otro factor angiogénico y vasculogénico importante, también está alterado en esquizofrenia a nivel plasmático ⁴⁸. Sumado a esto, se ha reportado que en biopsias de cerebros de pacientes con esquizofrenia existen niveles mayores de Semaforina 3A (SEMA3A), el cual es un quimiorepelente en guía axonal y tiene características anti-angiogénicas^{49,50}.

Cabe destacar que todas estas observaciones han sido realizadas mediante el análisis de tejido adulto o *post-mortem* de pacientes. Por lo tanto, se desconoce cuál es el estado de las señales que guían la angiogénesis y vascularización durante el desarrollo embrionario. Dado el alto número de mutaciones y variantes presentes en los pacientes con esquizofrenia, existe escasa evidencia del impacto que tienen a nivel funcional, sobre todo en procesos no abordados como el angiogénico. Es por ello que se hace relevante poder encontrar medios para evaluar dichas alteraciones y su potencial impacto en el desarrollo del cerebro.

3. Uso de células troncales pluripotentes inducidas humanas para estudiar desordenes psiquiátricos

Debido a las dificultades para obtener tejido cerebral de pacientes esquizofrénicos y más aún proveniente de estadios embrionarios, la mayor parte de los estudios relativos a esta enfermedad se han realizado a partir de tejido cerebral *post-mortem*. Es por ello que el uso de células troncales pluripotentes inducidas humanas (hiPSC, del inglés human induced Pluripotent Stem Cells) representa una nueva estrategia para estudiar desordenes psiquiátricos.

Tal y como fuera descrito por Takahashi y Yamanaka en el año 2006, las iPSC son células pluripotentes que exhiben la misma morfología, propiedades de crecimiento y expresión de marcadores que las células troncales embrionarias, pero que han sido obtenidas a partir de una célula somática adulta mediante un proceso de reprogramación ⁵¹. Las células somáticas pueden ser reprogramadas mediante la expresión de factores de transcripción maestros, característicos de células embrionarias, los cuales inducen la pluripotencia en dichas células adultas. Desde su descripción hasta ahora los cuatro factores más comunes para realizar la reprogramación son Oct3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4, también llamados factores OSMK (pudiendo Klf4 y c-Myc ser reemplazados por Nanog y Lin28 en algunos trabajos). Diferentes tipos de células pueden ser reprogramadas, siendo los fibroblastos los más utilizados dada su fácil obtención y cultivo. Respecto a los métodos de reprogramación, estos varían desde el uso de proteínas recombinantes, pasando por retrovirus, hasta métodos de transducción vírica no integrativos (como el uso de virus Sendai), tendiendo cada uno diferentes dificultades metodológicas y eficiencias (Figura 5). Durante esta década de investigación, los métodos de cultivo también han sido mejorados, lográndose condiciones de cultivo libres de células alimentadoras (o *feeder cells*) y el uso de medios de cultivo definidos sin suero, los cuales pueden ser adquiridos comercialmente⁵²⁻⁵⁴.

Dada la característica pluripotente de las hiPSC, éstas pueden ser diferenciadas a diversos tipos celulares, conservando la información genética de la célula donante. Esto último ha permitido el estudio de diferentes enfermedades, dado que es posible obtener

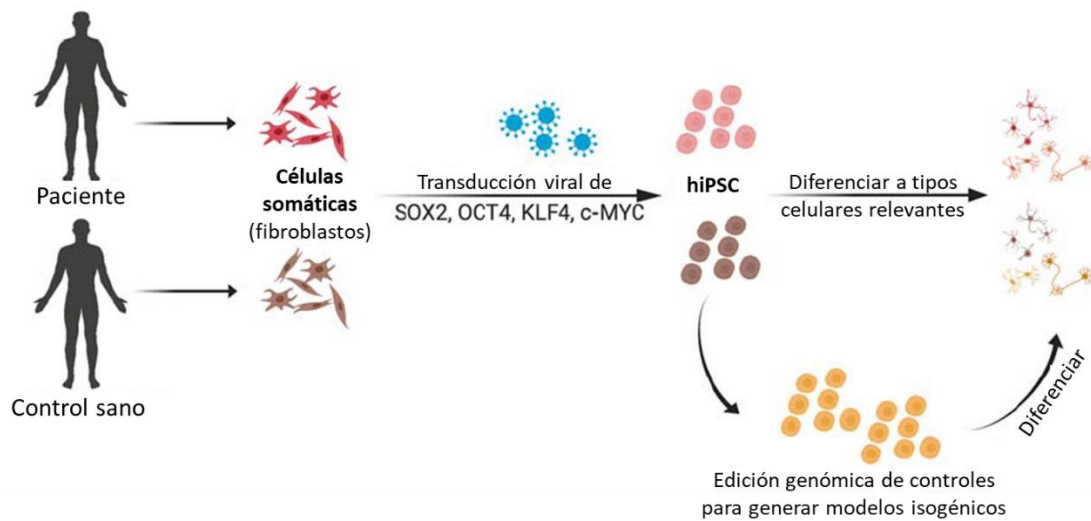


Figura 5. Modelamiento de enfermedades neuropsiquiátricas mediante el uso de hiPSC. Células somáticas, como los fibroblastos cutáneos o células de la orina, se obtienen de pacientes y donantes sanos. Los factores de transcripción OSKM de Yamanaka (OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) se introducen en las células mediante distintas aproximaciones como la transducción viral, reprogramándolas a un estado pluripotente. Estas hiPSC pueden ser diferenciadas a diferentes tipos celulares para realizar análisis *in vitro*, comparando células derivadas de pacientes y donantes sanos. Las hiPSC de controles sanos pueden ser manipuladas genéticamente utilizando herramientas de edición del genoma como CRISPR/Cas9, ZNF o TALENS para generar variantes isogénicas específicas asociadas a enfermedades; posteriormente pueden ser diferenciadas a los tipos celulares deseados. Modificado de ⁵⁵.

distintos tipos de células que de otra manera sería imposible conseguir, como aquellas presentes durante el desarrollo embrionario. Incluso, el día de hoy, es posible mediante ingeniería genética el obtener células isogénicas, es decir, que comparten el mismo genoma, pero a las cuales se les ha modificado uno o varios genes de manera de estudiar el impacto de una modificación sobre el *background* genético real de un paciente (Figura 5)^{53,56}.

Sumado a lo anterior, en el contexto específico del cerebro, se han podido diferenciar hiPSC a una diversa gama de células presentes durante el desarrollo y la adultez cerebral, junto con establecer distintos tipos de modelamiento en dos (2D) y tres dimensiones (3D) que permiten estudiar las interacciones celulares y estructuras más complejas como la BHE y los organoides cerebrales⁵⁷⁻⁵⁹.

En los últimos 10 años se han publicado más de 30 trabajos en los cuales se incluye el uso de hiPSC provenientes de pacientes con esquizofrenia las cuales han sido diferenciadas a NSC, células precursoras neuronales (NPC), neuronas, astrocitos y organoides cerebrales. En comparación con células derivadas de sujetos controles, las células derivadas de hiPSC obtenidas de pacientes esquizofrénicos conservan características fenotípicas de la enfermedad, tales como anormalidades sinápticas, deficiencias en la migración, aumento del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial^{55,60-62}. La generación de organoides cerebrales usando hiPSC de esquizofrénicos ha mostrado deficiencias en la correcta estratificación, migración y conectividad de las neuronas en un contexto más complejo y asimilable a las etapas tempranas del desarrollo^{57,63}.

Sin embargo, a la fecha, todos los trabajos realizados en células derivadas de hiPSC incluyen sólo el estudio de células derivadas del linaje neural y analizadas, principalmente, en el contexto de su función sináptica. Dentro de las observaciones se destacan niveles reducidos de múltiples moléculas sinápticas en neuronas (tales como CYFIP1 y PSD-95) alteraciones en la vía de Wnt, aumento del estrés oxidativo y de proteínas de remodelamiento del citoesqueleto^{62,64,65}. Estas últimas observaciones podrían ser relevantes en el contexto de la angiogénesis.

Por lo anteriormente expuesto, en esta tesis se pretende abordar, mediante el uso de hiPSC, la caracterización de los componentes celulares principales del nicho neurovascular y recrear y estudiar la formación temprana de la vasculatura cerebral en esquizofrenia en modelos 2D y 3D.

II. HIPÓTESIS

Al recapitular el neurodesarrollo de la esquizofrenia mediante hiPSC, los componentes del nicho neurovascular generan una angiogénesis deficiente.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Evaluar las diferencias en la inducción de la angiogénesis por parte de células del linaje neural, así como en el fenotipo y función de células endoteliales derivados de hiPSC provenientes de sujetos esquizofrénicos (hiPSC SZP) y controles (hiPSC Ctrl).

2. Objetivos Específicos

- i. Analizar la diferencia en la expresión de moléculas angiogénicas de NSC y células del linaje neural, derivadas de hiPSC SZP e hiPSC Ctrl.
- ii. Evaluar las diferencias en la formación de vasos inducida por parte de NSC y células del linaje neural derivadas de hiPSC SZP e hiPSC Ctrl.
- iii. Analizar las diferencias fenotípicas y funcionales entre células endoteliales derivadas de hiPSC SZP e hiPSC Ctrl.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo Celular

Todas las células utilizadas fueron crecidas en condiciones estériles en un incubador a 37°C, con 5% CO₂ y humedad relativa cercana al 90%. Las hiPSC y células derivadas de ellas fueron cultivadas en ausencia de antibióticos y su manipulación se realizó en un gabinete de seguridad con flujo laminar para asegurar la esterilidad de los procesos, en una sala de cultivo especialmente diseñada y certificada con normativa GMP. Las células fueron visualizadas de manera diaria bajo un microscopio invertido y, en caso de que fuera requerido, se realizaron los pasajes cuando las placas llegaban al 80% de confluencia.

Para el congelamiento de las células, estas fueron guardadas en crioviales con DMSO 10% en medio de cultivo y se almacenaron en nitrógeno líquido, siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio de Células Troncales y Biología del Desarrollo (CTYBD) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. En breve, para descongelar las células, los viales fueron calentados en un baño termorregulado a 37°C, traspasados al medio de cultivo, centrifugados para retirar el exceso de DMSO y luego cultivados acorde a las necesidades de cada célula. Para evitar la muerte producto del descongelamiento se utilizó un inhibidor de Rho quinasa 5 μ M (ROCK inhibitor Y-27632, Merck Millipore) el primer día de cultivo.

1.1. Generación de hiPSC

Las hiPSC SZP y Ctrl fueron cordialmente donadas por el Dr. Stevens Rehen del Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (Rio de Janeiro, Brasil) en el marco de una colaboración con el laboratorio CTYBD.

Las líneas celulares SZP utilizadas en este estudio se obtuvieron de seis pacientes diagnosticados con esquizofrenia acorde al DMS-5 (ANEXO1, Tabla S1). Considerando las recomendaciones descritas en la literatura, se seleccionaron pacientes con parentesco y con historia familiar de esquizofrenia. Además, se privilegió el uso de un clon por donante para poder incluir un mayor número de donantes ⁶¹. Tres de las líneas hiPSC SZP (#2,#3 y #4) fueron adquiridas comercialmente (Coriell Institute, EE.UU., ⁶⁵); mientras que las otras tres líneas celulares hiPSC SZP (#1,#5 y #6) fueron reprogramadas en el Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino ⁶⁶. Respecto a las células hiPSC Ctrl, éstas se obtuvieron de cuatro donantes sin antecedentes de enfermedades mentales, incluyendo hombres y mujeres de un rango etario similar a los donantes esquizofrénicos. La línea de hiPSC Ctrl #3 fue adquirida comercialmente (GM23279A, Coriell Insitute); mientras que las otras tres (hiPSC Ctrl #1, #2 y #4) fueron reprogramadas en el Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino ⁶⁶. Las edades, sexo, diagnóstico y método de reprogramación se encuentran resumidos en el ANEXO1 Tabla S1.

Las hiPSC fueron cultivadas en placas recubiertas con Matrigel ES-qualified (Corning Inc., NY, EE.UU.) usando el medio de cultivo mTeSR (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). El medio de cultivo fue cambiado diariamente y las células fueron observadas bajo

microscopio EVOS FL (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, EE. UU) para eliminar diferenciaciones. De manera rutinaria, una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células fueron pasadas usando EDTA 0.5 mM para despegar las células y expandidas en una proporción entre 1:2 y 1:6, siendo lo más común 1:4.

1.2. Generación de NSC

Las NSC SZP y Ctrl fueron cordialmente donadas por el Dr. Stevens Rehen del Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (Rio de Janeiro, Brasil).

Las líneas de hiPSC fueron diferenciadas a NSC utilizando el medio Pluripotent Stem Cells Neural Induction Medium (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA, EE.UU.), acorde a las indicaciones del proveedor ⁶⁷.

Una vez diferenciadas las NSC fueron cultivadas en placas cubiertas con geltrex (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU) en medio de expansión neural (NEM, del inglés Neural Expansion Medium) consistente en Neural Induction Medium y DMEM/F-12 en una proporción 1:1. Cuando el cultivo alcanza el 80% de confluencia las células fueron despegadas utilizando Accutase (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU). 1 millón de NSC fue sembrado en una placa de 60mm para su expansión.

El detalle de las líneas hiPSC usadas para su diferenciación a NSC se encuentra en la Tabla S1 del ANEXO1.

1.3. Generación de Neuroesferas

Para la generación de neuroesferas 3 millones de NSC fueron cultivadas en un pocillo de placa de 6 pocillos en rotación a 90rpm. Para la generación de neuroesferas mixtas (utilizadas en el objetivo 1 y 2) se cultivaron las células en medio de diferenciación mixta (NEM suplementado con N2 y B27), mientras que para las neuroesferas de NSC (utilizadas en el objetivo 2) se cultivaron en medio NEM. El medio fue cambiado a los dos días y luego cada 4 días hasta llegar al día 10.

El detalle de las líneas usadas para su diferenciación a neuroesfera se encuentra en la Tabla S1 del ANEXO1.

1.4. Generación de NPC

Para la generación de NPC, se sembraron 3 millones de NSC en placas de 60mm cubiertas con poli-L-ornitina/laminina en medio de diferenciación mixta consistente en medio NEM suplementado con B27 y N2 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU). Para el recubrimiento se incubaron las placas con una solución de 10 µg/ml de Poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich) en agua a temperatura ambiente durante toda la noche, al día siguiente se lavaron dos veces con agua y se incubaron con una solución de 2.5 µg/ml de laminina (Gibco, Carlsbad, CA, EE.UU.) en PBS durante 3 h a 37°C; las placas fueron guardadas a -20°C para su uso posterior o lavadas con PBS dos veces para su uso inmediato. Luego de sembradas las células, el medio fue cambiado cada 2 días hasta que se observaron procesos neuronales, luego fue cambiado cada 7 días.

El detalle de las líneas usadas para su diferenciación a NPC se encuentra en la Tabla S1 del ANEXO1.

1.5. Generación de Astrocitos

Los Astrocitos SZP y Ctrl fueron cordialmente donados por el Dr. Stevens Rehen del Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (Rio de Janeiro, Brasil).

De manera complementaria, NSC fueron diferenciadas a astrocitos siguiendo el protocolo descrito por Yan y cols. en el 2013 ⁶⁸. Una vez diferenciadas fueron cultivadas en DMEM/F-12 con 10% de Suero Fetal Bovino (PAN BIOTECH, Aidenbach, Bavaria, Alemania). El medio fue cambiado cada 2 días y se subcultivaron cada 2 semanas cuando tenían una confluencia de entre un 80 a 90%, usando Tryple (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) para despegar las células. Los experimentos fueron realizados luego de 5 semanas de cultivo celular.

El detalle de las líneas usadas para su diferenciación a astrocito se encuentra en la Tabla S1 del ANEXO1.

1.6. Generación de BEC

Las hiPSC fueron diferenciadas a BEC acorde al protocolo publicado por Qian y cols. en el 2017 ⁶⁹. Antes de la diferenciación las hiPSC fueron singularizadas con Accutase y entre $25-50 \times 10^3$ células/cm² fueron sembradas en placas recubiertas con Matrigel y cultivadas en mTeSR1 suplementado con 10 mM de ROCKi Y-27632 (Merck Millipore); se cultivaron cambiando el medio a mTeSR1 de manera diaria por 3 días. Para iniciar la

diferenciación en el día 0, las células se trataron con 6 mM de CHIR99021, un agonista de la vía Wnt, en medio DeSR1: DMEM /F12, 1% MEM-NEAA (Thermo Fisher Scientific), 0.5 % GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific), y 0.1 mM β -mercaptoetanol (Sigma). Después de 24 h, el medio se cambió a DeSR2: DeSR1 suplementado con B27 (ThermoFisher Scientific); todos los días durante otros 5 días. El día 6, el medio se cambió a hECSR1: hESFM (Thermo Fisher Scientific) suplementado con bFGF (20 ng/ml), 10 mM de Ácido retinoico y B27. Después de 2 días de cultivo en medio hECSR1 (al día 8), las células se disociaron con Accutase y se sembraron a 1 millón de células/cm² en placas cubiertas con Matrigel, en medio hECSR1. El día 9, el medio se cambió a hECSR2 o medio de cultivo basal (hECSR1 sin ácido retinoico ni bFGF). Las células fueron usadas para los análisis en el día 10.

El detalle de las líneas hiPSC usadas para su diferenciación a BEC se encuentra en la Tabla S1 del ANEXO1.

2. Colección de medio condicionado (MC)

Las NSC fueron cultivadas en placas de 60 mm hasta una confluencia del 80% y se cambió el medio a NEM fresco. Las neuroesferas se cultivaron con agitación durante 8 días como se describió anteriormente y el medio se cambió a NEM fresco. Las NPC fueron cultivadas durante 14 días como se describió anteriormente y el medio se cambió por NEM fresco. Los Astrocitos fueron cultivados por 5-6 semanas como se describió anteriormente y una vez alcanzado el 80% de confluencia el medio se cambió a DMEM-F12 fresco. Las BEC fueron diferenciadas por 9 días y el medio se cambió a hECSR2 (medio

de cultivo basal) fresco. El medio condicionado se recogió 48 h después de la sustitución del medio de los cultivos respectivo, y luego se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso posterior.

3. Proteoma angiogénico

La presencia de factores angiogénicos se evaluó en los distintos MC con el kit Proteome Profiler Human Angiogenesis Array (ARY007, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.) acorde con las instrucciones del fabricante. Se analizó 1 ml de MC de cada línea celular evaluada. La señal fue detectada mediante quimioluminiscencia con un fotodocumentador Uvitec 4.7 (Cambridge, Reino Unido) y la intensidad se cuantificó mediante densitometría utilizando el software ImageJ (NIH, EE. UU.). La intensidad de píxeles de cada factor (por duplicado) se normalizó a la de tres controles internos proporcionados por el ensayo.

4. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

El RNA total de las diferentes líneas celulares fue extraído con fenol-cloroformo utilizando RNA-Solv (Omega Bio-Tek Norcross, GA, EE.UU.) Para la síntesis de cDNA 1 ug de RNA se trató con DNasa I (DNasa I, Buffer DNasa 10x, Agua DEPC; Invitrogen, procesados según las instrucciones del fabricante) para eliminar contaminaciones con DNA. Luego de esto se sintetizó cDNA utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, EE.UU.), acorde a las instrucciones del fabricante incubando la reacción (Random primers, tampón de reacción, RNAsin, dNTPs, DTT, Transcriptasa

Reversa, Agua DEPC) durante 60 minutos a 37°C y 10 minutos a 70°C. El cDNA se conservó a -20 para su uso posterior.

5. PCR cuantitativo (qPCR)

Para cuantificar los cambios en los mRNA producidos en las distintas condiciones, las muestras fueron analizadas por la técnica de qPCR.

Se diseñaron partidores específicos para la detección de cada uno de los transcritos y se estandarizó la concentración óptima de estos de modo que la eficiencia de amplificación en todos los casos fuera del 100% \pm 10% (ANEXO1 Tabla S2). Se incubó la concentración requerida de partidores, 10 μ l de Mix SyberGreen II (Agilent Technologies) en un total de 20 μ l de reacción en un termociclador (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante.

Los datos se analizaron calculando el cambio de expresión relativa usando la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Se evaluaron tres genes de referencia o *housekeeping* (*GAPDH*, *B2M* y *18S*) para normalizar la expresión relativa.

La expresión de ciertos genes fue analizada de manera cualitativa separando productos de reacción de qPCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% en solución de tapón Tris Acetato EDTA (TAE). Los productos fueron incubados con GelRed previo a ser cargados en el gel y fueron visualizados utilizando un transiluminador una vez terminada la electroforesis.

6. Western Blot

Se obtuvieron extractos de proteínas de MC de NSC CM mediante extracción con metanol-cloroformo. Brevemente, se añadieron 500 μ l de metanol frío y 125 μ l de cloroformo frío a 1 ml de MC, se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 1400 \times g durante cinco minutos a 4°C. La interfase blanca se resuspendió en 25 μ l de tampón de extracción compuesto de SDS al 2%, glicerol al 10%, Tris-HCl 50 mM pH 6,8 e inhibidor de proteasa (cat. nº 88265; Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los extractos de proteínas se almacenaron a -20 ° C.

Se pipetearon 60 μ g de proteína en cada carril del gel de poliacrilamida del 8%, se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se bloqueó la unión de proteínas inespecíficas a las membranas incubándolas en TBS-tween 0.1% con 1% de leche de vaca por 1 h. Luego se incubaron durante toda noche a 4°C con el anticuerpo primario para SEMA3 (A-12, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, EE.UU.) en una dilución e 1:100 en TBS-tween 1% leche. Las membranas se lavaron con TBS-tween y se incubaron 2 h a temperatura ambiente en TBS-tween 5% leche que contenía anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de *horseradish* en una dilución 1:1000. Las bandas de proteína se visualizaron usando quimioluminiscencia (ECL; Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido), se detectaron utilizando un fotodocumentador Uvitec 4.7 Cambridge y se cuantificaron por densitometría usando Imagen J (NIH, EE. UU.).

7. Inmunofluorescencia

Para analizar la expresión y distribución de distintas proteínas en las líneas celulares, estas fueron sembradas en portaobjetos multipocillo Lab-tek (Nunc Lab-Tek, Thermo Scientific) y fijadas con para formaldehído al 4% en PBS. Se lavó con PBS y se permeabilizó incubando por 15 min en tritón al 0.1% en PBS (PBS-t 0.1%). Luego se bloqueó la unión a proteínas inespecíficas incubando con una solución de PBS-t 0.1% con un 2% de albumina de suero bovina durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó en el primer anticuerpo primario (PAX6, NESTIN, GFAP, TUJ1, GLUT-1, CD31, OCLN, ZO-1) diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C (Las diluciones usadas para cada anticuerpo se encuentran detalladas en la Tabla S3 del ANEXO1). Se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario secundario unido a un fluoróforo a elección (Alexa488 o Alexa594) durante 2 h. En caso de requerirlo el citoesqueleto de actina fue identificado con una solución de faloidina incubada junto con el anticuerpo secundario; los núcleos fueron identificados por tinción con Dapi durante 5 min. Posterior a esto los cortes fueron lavados y montados en medio de montaje Dako (Agilent Technologies).

Las inmunofluorescencias fueron adquiridas en un microscopio confocal (Carl Zeiss 710) y fotografiadas utilizando el programa de adquisición de imágenes Zen (Carl Zeiss). Dichas imágenes fueron procesadas utilizando el programa ImageJ (NIH).

8. Modelo tridimensional de reclutamiento de células endoteliales

Para modelar el reclutamiento de células endoteliales en las etapas tempranas de la vascularización se realizó un ensayo utilizando un co-cultivo de neuroesferas y células

endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC, del inglés Human Umbilical cord Endothelial Cells) siguiendo el protocolo publicado por Milner en el 2007 ⁷⁰ con modificaciones.

Para la obtención de HUVEC las venas del cordón umbilical se lavaron con PBS tibio. Las células endoteliales se aislaron mediante digestión con colagenasa a una concentración de 0.2 mg/ml y se recuperaron con medio 199 (M199). Las células se sembraron en placas recubiertas de gelatina al 1% y se cultivaron en medio de cultivos primarios (PCM, M199 con NBCS al 10%, FBS al 10%, L-glutamina 3.2 mM y penicilina-estreptomicina 100 U/mL). El medio se cambió cada dos días hasta alcanzar un 80% de confluencia. Todos los cultivos primarios de HUVEC se utilizaron entre los pases dos a cinco.

Para el co-cultivo las HUVEC fueron marcadas con el trazador fluorescente Vybrant Dil (Invitrogen) acorde a las instrucciones del fabricante. Entre 80-100 neuroesferas (generadas acorde a lo indicado en el punto 1.3) contenidas en 100 µl de medio NEM, fueron depositadas en un pocillo de placa de 6 pocillos no adherente, al centro de un anillo de plástico esterilizado. Después de dejar 15 min las células para que se asentaran en el plástico se agregaron 40 µl de suspensión celular que contenían 80.000 HUVEC marcadas con Dil. Después de 2 h de incubación se agregaron 2 ml de medio NEM y se dejaron en el incubador. 18 h después los cultivos fueron visualizados y fotografiados bajo un microscopio de fluorescencia EVOS FL (Thermo Fischer Scientific) para evidenciar la presencia de células marcadas en su superficie. El número de células endoteliales no

adheridas fue calculado al contar las células presentes en el sobrenadante con un hemocitómetro. Las neuroesferas fueron disgregadas con tripsina-EDTA 0.05% (Sigma) por 5 min a 37°C y contadas con un hemocitómetro; el porcentaje de células marcadas fluorescentemente fue analizado mediante citometría de flujo a través de una colaboración con la Dra. Daniela Sauma del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

9. Ensayo de formación de túbulos y ramificaciones

Para evaluar la angiogénesis *in vitro*, se realizó un ensayo de formación de túbulos y ramificaciones utilizando HUVEC o BEC según lo descrito en ⁶⁷.

Las células se sembraron en Matrigel reducido en factores de crecimiento (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) en placas de 96 pocillos.

Las HUVEC (55.000 células/pocillo) se sembraron con los siguientes estímulos: MC, NEM, medio de crecimiento endotelial (EGM-2; Lonza, Verviers, Bélgica; usado como control positivo), o medio basal endotelial (EBM, Clonetics, Walkersville, MD, EUA; control negativo). Para evaluar la contribución de VEGFA a la angiogénesis inducida por los MC de NSC y Nsp Ctrl se usó un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a VEGFA (100 µg / ml de Bevacizumab, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se usaron 50 ng/ml de VEGFA recombinante como control. Cada estímulo se evaluó por triplicado. Después de cuatro h de incubación, se tomaron imágenes de cinco campos diferentes por pocillo.

Las diferentes líneas de BEC (50.000 células / pocillo) se sembraron con los siguientes estímulos: medio hESFM (como control negativo), medio de cultivo basal (hECSR2: hESFM suplementado con B27) o medio de cultivo + 50 ng/ml de VEGFA recombinante. Cada estímulo se evaluó por triplicado. Para los primeros análisis se tomaron fotografías a las 3, 4, 5 y 24 h de incubación (ANEXO 1 Figura S1). Seleccionándose las 4 h para el resto de los experimentos; se tomaron imágenes de cinco campos diferentes por pocillo.

El número de túbulos fue cuantificado contando el número de polígonos cerrados (*meshes*) presente en las fotografías y las ramificaciones contando el número de elongaciones y segmentos (*pieces*) presentes en las fotografías utilizando la herramienta Angiogenesis Analyzer en ImageJ (NIH, EE. UU.).

10. Ensayo de angiogénesis en membrana corioalantoidea (CAM) de embrión de pollo

Para una evaluación *in vivo* del potencial angiogénico de los MC se realizó un ensayo CAM como ha sido descrito anteriormente⁶⁷. Brevemente, se incubaron huevos de gallina fertilizados (Avícola Chorombo, Chile) a 38,5 ° C con una humedad constante del 75%. En el día embrionario 1 (E1), se extrajeron 2 ml de albúmina de cada huevo. En E4 se creó una ventana redonda de 2 cm². Para entregar los diferentes estímulos se utilizó una matriz de biocelulosa de origen bacteriano (6 mm de diámetro, donación Dr. Nelson Navarrete, Facultad de Medicina, U. Chile), la cual fue cargado con 100 µl de medio. Los estímulos utilizados fueron: MC, NEM, 100 µg de VEGFA (como control positivo) y PBS (como control negativo). Se usó un anticuerpo bloqueante de VEGFA (100 µg /ml de Bevacizumab, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) para evaluar la contribución de

VEGFA a la angiogénesis inducida por los MC Ctrl. En E8, se fotografió la vasculatura de la CAM y posteriormente, cada matriz, llenada con las condiciones experimentales respectivas, se colocó encima del CAM. Para cada condición se utilizaron 10 huevos. Se dejó un grupo de huevos control (Sham), el cual no tenían membrana para evaluar el efecto de la matriz de biocelulosa sobre la angiogénesis. El día E12, se inyectó crema blanca debajo del CAM antes de fotografiar cada huevo, con el fin de mejorar la visualización de los vasos. Se tomaron fotografías con una cámara digital HD IC80 (Leica, Heidelberg, Alemania) y se contó el número de vasos dentro de un radio de 6 mm desde la membrana de biocelulosa utilizando el software ImageJ (NIH, EE. UU.). En las mismas fotografías se midió el diámetro de 200 vasos por condición usando el software ImageJ.

11. Análisis estadístico

Se utilizó el programa Prism v8.0 (GraphPad Software Inc) para realizar el análisis estadístico descriptivo de los datos. Se evaluó normalidad mediante el test de D'Agostino-Pearson. Para analizar significancia entre grupos muestrales se utilizó el test Mann-Whitney, Kruskal-Wallis con post test de Dunn o el test de t par datos anidados, como se indica en cada figura. Para evaluar las diferencias entre distribuciones de datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó la corrección de Bonferroni al comparar más de dos grupos. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

Se utilizó el programa Past v4.02 (Ø, Hammer and D.A.T. Harper) para realizar el Análisis de Componentes Principales.

V. RESULTADOS

1. Analizar la diferencia en la expresión de moléculas angiogénicas de células troncales neurales y células del linaje neural, derivadas de hiPSC SZP e hiPSC Ctrl.

En etapas tempranas del desarrollo, las NSC participan en el reclutamiento de células endoteliales hacia el tubo neural y posteriormente, junto con otras células del linaje neural, en la maduración de los vasos sanguíneos del cerebro ⁶. La formación de nuevos vasos es un proceso complejo que se desarrolla en un balance entre señales pro y anti-angiogénicas²⁰. Dadas las alteraciones funcionales y de expresión de factores reportadas en la esquizofrenia^{62,71}, se pretendió evaluar si existía un desbalance en la secreción de factores angiogénicos en etapas tempranas del desarrollo de parte del sistema nervioso, recapituladas mediante el cultivo de NSC y otras células del linaje neural, para posteriormente explorar su potencial impacto sobre la angiogénesis.

A partir de hiPSC se obtuvieron cultivos de NSC (Figura 6A), las cuales se renuevan de forma clonal y son multipotentes, pudiendo diferenciarse a los principales fenotipos del sistema nervioso. Las NSC pueden ser cultivadas en suspensión formando agregados tridimensionales o neuroesferas (Figura 6B), las que se componen tanto de NSC, como de células progenitoras neurales, gliales y de células en proceso de diferenciación. Las NSC pueden ser diferenciadas de manera específica a neuronas (Figura 6C) y astrocitos (Figura 6D). Para el desarrollo de esta tesis se usaron líneas de NSC derivadas de hiPSC Ctrl (NSC Ctrl) y NSC derivadas de hiPSC SZP (NSC SZP). Importantemente, éstas no presentan diferencias entre sí en términos de expresión de marcadores clásicos, tamaño,

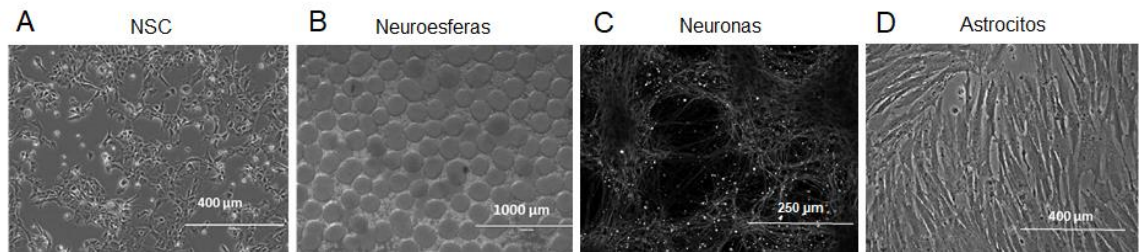


Figura 6. NSC y linajes derivados. (A) Fotografía representativa de un cultivo de NSC, barra= 400μm. (B) Fotografía representativa de neuroesferas cultivadas por 2 días, barra= 1000μm. (C) Fotografía representativa de tinción anti-TUB3 en NSC diferenciadas a neuronas por 14 días, barra = 250μm. (D) Fotografía representativa de astrocitos diferenciados por 5 semanas a partir de NSC, barra= 400 μm.

forma y tasa de replicación ⁶⁷ (Anexo 2, Figura S2). Sin embargo, en un ensayo de crecimiento axonal a partir de neuroesferas, aquellas generadas a partir de NSC SZP presentaban un menor radio de crecimiento axonal que aquellas provenientes de sujetos controles, tal como ha sido descrito en otras publicaciones ^{65,67}.

1.1. Las NSC secretan una gran variedad de moléculas angiogénicas

A la fecha, la principal señal descrita derivada del tubo neural es VEGFA, por lo que en esta tesis se quiso estudiar la expresión de otras moléculas angiogénicas canónicas expresadas por las NSC.

Tres líneas de NSC Ctrl fueron cultivadas en medio de cultivo libre de suero (NEM) por 48 h. El MC fue recolectado y analizado mediante un array proteómico comercial capaz de detectar moléculas angiogénicas (Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit, R&D Systems). De los 55 factores ensayados, se detectaron 20 en el secretoma de las NSC. De éstos, 14 son moléculas pro-angiogénicas y seis son anti-angiogénicas.

La Tabla 1 describe los principales roles de cada uno de los factores y revela que las proteínas encontradas en el MC de las NSC participan en diversos procesos angiogénicos. Dentro de estos, identificamos proteínas relacionadas con las etapas tempranas de la vasculogénesis (VEGFA), la estabilización de los vasos sanguíneos (Ang-1, Tsp-1, MCP1), desestabilización de los vasos y ramificación (Ang-2, uPA, PAI-1), así como también diversas proteínas que participan comúnmente en la migración y proliferación de las células endoteliales. Debido a que todos estos factores son secretados en el nicho neuro-angiogénico durante la morfogénesis del cerebro, también se investigó si dichas

Molécula	Sistema Vasculat	Sistema Nervioso
Angiogenin	Cicatrización; migración, invasión, proliferación y formación de estructuras tubulares de EC ⁷²	Neuroprotección a través de la astroglia ⁷³
Ang-1	Estabilización de vasos; diferenciación de EC; neovascularización ^{74,75}	Neuroprotección; neurogénesis ⁷⁶
Ang-2	Desestabilización de vasos; angiogénesis ⁷⁴	Neurogénesis cortical; migración de la glia radial ⁷⁷
DPP IV	Remodelación vascular; angiogénesis mediada por Y2 / Y5 ⁷⁸	Reparación post-infarto ⁷⁹
Endothelin-1	Proliferación de EC y VSM ⁸⁰	Comunicación neuronal ⁸¹
IGFBP-2	Producción y secreción de VEGFA por las EC ⁸²	Neurogénesis ⁸³
IGFBP-3	Sobrevida de EC ⁸⁴	Inhibición de la proliferación de NPC ⁸⁵
IL-8	Sobrevida de EC; diferenciación ⁸⁶	Sobrevida de NSC; quimiotaxia ⁸⁷
MCP-1	Quimiotaxis; reclutamiento de VSM ⁸⁸	Migración de NSC ⁸⁹
PDGF-AA	Promoción de la expresión de VEGFA ⁹⁰	Diferenciación de NPC en linaje oligodendrocítico ⁹¹
PIGF	Regulación de la angiogénesis patológica ⁹²	Neuroprotección; proliferación de la V-SVZ ^{93,94}
Prolactin	Actividad pro o anti angiogénica según isoformas ⁹⁵	Neurogenesis; neuroprotección ⁹⁶
uPA	Promoción de la permeabilidad vascular; proliferación y migración de las EC ⁹⁷	Migración neuronal; neuritogénesis; neuroprotección después del daño ⁹⁸
VEGFA	Sobrevida, proliferación y migración de la EC; inducción de crecimiento de vasos sanguíneos ⁹⁹	Neurogénesis; reclutamiento de NSC ^{100,101}
Endostatin	Inhibición de la proliferación de la EC ¹⁰²	Inhibición del crecimiento de neuritas y la migración neuronal ¹⁰³
PTX3	Antagonismo de la señalización de FGF2 ¹⁰⁴	Neurogénesis después de la isquemia cerebral ¹⁰⁵
PAI-1	Inhibición de uPA; Inhibición de la migración de la EC ¹⁰⁶	Supervivencia neuronal ¹⁰⁷
PEDF	Inhibición de la angiogénesis fisiológica y patológica ¹⁰⁸	Renovación de NSC ¹⁰⁹
TIMP-1	Inhibición de la migración de la CE ¹¹⁰	Neurogénesis después de la isquemia ¹¹¹
TSP-1	Inhibición de la migración, proliferación y sobrevida de las EC ¹¹²	Mantenimiento del <i>pool</i> de NPC adulto; diferenciación neuronal ¹¹³

Tabla 1. Rol dual de las moléculas angiogénicas secretadas por las NSC derivadas de hiPSC. La tabla describe las principales funciones de las moléculas encontradas en el secretoma de NSC, en el sistema vascular (izquierda) y nervioso (derecha). Las moléculas fueron separadas por sus características pro-angiogénicas (arriba) o anti-angiogénicas (abajo).

proteínas tenían roles dentro del contexto de la neurogénesis (Tabla 1). Interesantemente, se ha descrito que la mayoría de las moléculas detectadas tiene un impacto directo en la neurogénesis, proliferación y/o migración de NSC. También se ha descrito que algunas de ellas, tales como DPP IV, Prolactin, PTX3 y TIMP1, están involucradas en procesos de neuroprotección y neurogénesis post daño; sin embargo, a la fecha, se desconoce su efecto específico durante el desarrollo.

1.2. Las NSC SZP presentan perfil angiogénico desbalanceado.

Con el objetivo de evaluar si la secreción de moléculas angiogénicas estaba desbalanceada en NSC SZP, comparamos los niveles de dichas moléculas en tres medios condicionados de NSC SZP (MC NSC SZP) con los de tres MC de NSC Ctrl. La Figura 7A muestra membranas representativas del array proteómico, en las cuales se puede observar en cada punto las diferencias en abundancia de cada proteína del array. Al cuantificar los niveles proteicos de los MC de NSC Ctrl y de NSC SZP, se distinguen diferencias significativas en la expresión de varias proteínas angiogénicas (Figura 7B). Comparados con MC de NSC Ctrl, los MC de NSC SZP poseen concentraciones menores de proteínas pro-angiogénicas tales como Angiogenina, Ang-1, IGFBP-3, PDGF-AA, uPA, y VEGFA, así como de proteínas anti-angiogénicas como Endostatina y PEDF. Contrariamente, la proteína pro-angiogénica IGFBP-2 y la anti-angiogénica PTX3, se encontraron aumentadas.

Dentro de los factores disminuidos están VEGFA y Ang-1, los cuales participan en las etapas iniciales de la vascularización²⁰. Respecto a VEGFA, otros trabajos han mostrado

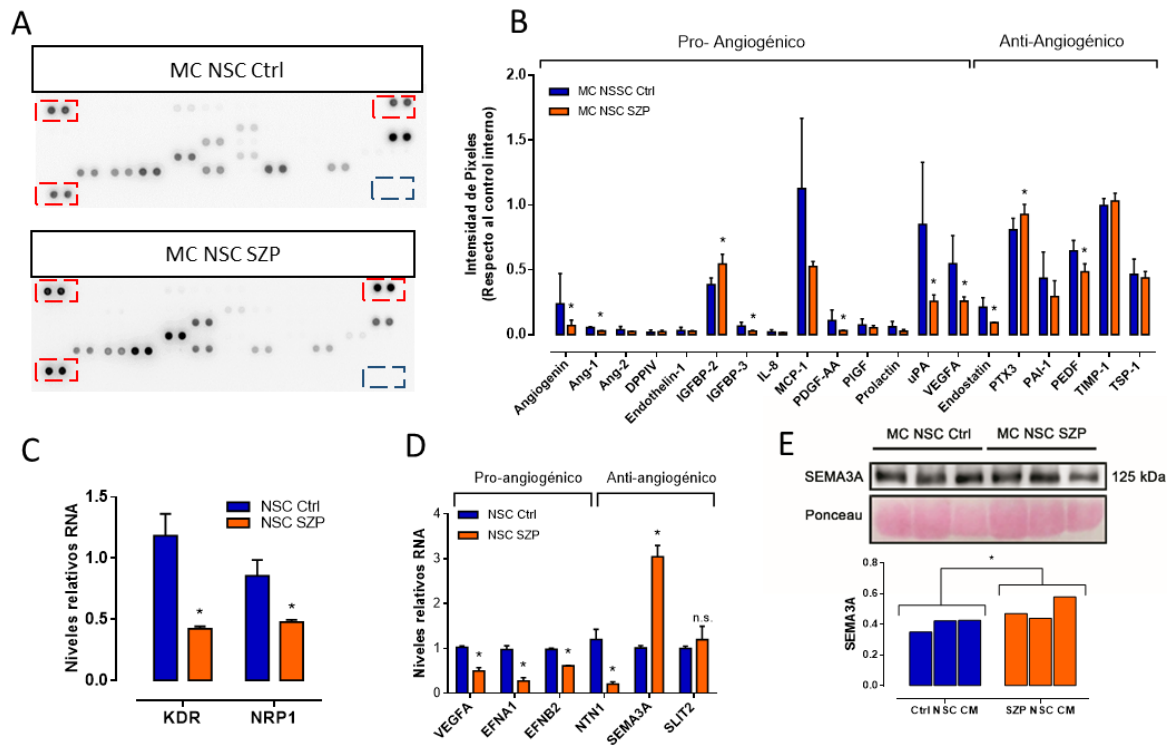


Figura 7. Las NSC SZP presentan un desbalance en la secreción de moléculas angiogénicas. (A) Fotos representativas a membranas del arreglo proteómico realizado a MC de NSC Ctrl y NSC SZP; los puntos corresponden a los factores detectados (en duplicado). Se indica en cajas rojas a los controles positivos y en cajas azules a los controles negativos. (B) Cuantificación de los niveles proteicos de 3 MC de NSC Ctrl comparado con 3 MC de NSC SZP. La expresión corresponde a la intensidad de píxeles de cada molécula normalizada respecto a los controles internos y es graficada como el promedio \pm SD; * $p < 0.05$ según el test de Mann-Withney. (C y D) Análisis de la expresión de los receptores de VEGFA, *KDR* y *NRP1* (C), de factores neuroangiogénicos no canónicos (D) de 3 NSC Ctrl y 3 NSC SZP por qPCR. Los niveles se expresan como la cantidad de RNA relativos a los niveles de B2M (gen *housekeeping*) y son graficados como el promedio \pm SD; * $p < 0.05$ según el test de Mann-Withney. (E) La expresión de SEMA3A fue evaluada en 3 MC de NSC Ctrl y 3 MC de NSC SZP mediante Western Blotting (arriba). Los resultados para cada línea celular (Ctrl #1,#2 #3 and SZP #1,#2,#3) se muestran en orden correlativo. Los niveles se muestran como la intensidad de píxeles del blot de SEMA3A respecto a la banda control del Ponceau (abajo). * $p < 0.05$ según el test de Mann-Withney

una disminución de este factor en el plasma de sujetos esquizofrénicos adultos y en cerebros post-mortem^{44,45}, por lo cual este resultado indicaría que los niveles de VEGFA podrían estar disminuidos incluso desde el periodo de desarrollo embrionario. En línea con una posible existencia de un *loop* autocrino en la señalización de VEGFA, encontramos que la expresión de dos receptores de VEGFA, *KDR* y *NRP1* está disminuida en NSC SZP comparada con NSC Ctrl (Figura 7C).

El desarrollo de la vasculatura neural también depende de vías de señalización no-canónica¹², por lo que evaluamos la expresión de factores secretables de dichas vías a través de qPCR en NSC Ctrl y SZP. *EFNA1* que posee características pro-angiogénicas, se encontró significativamente disminuida en NSC SZP comparado con Ctrl (Figura 7D) mientras que la expresión del factor anti-angiogénico *SEMA3A* estaba aumentado (Figura 7D). *EFNB2*, *NTN1* y *SLIT2* tienen roles duales actuando como factores pro o anti-angiogénicos, dependiendo de la presencia de sus receptores específicos²². Interesantemente, encontramos que los niveles de expresión de estos tres factores estaban disminuidos en NSC SZP respecto a NSC Ctrl (Figura 7D). Se ha reportado que los niveles de *SEMA3A* son mayores en cerebros esquizofrénicos adultos⁴⁹; nosotros corroboramos este aumento en el secretoma de NSC SZP mediante Western Blot (Figura 7E).

1.3. Células del linaje neural derivados de NSC SZP presentan un perfil angiogénico desbalanceado.

La formación de vasos sanguíneos en el cerebro ocurre de manera paralela a la neurogénesis, por lo que nos preguntamos si las diferencias observadas en los secretomas de NSC SZP y Ctrl se mantenían cuando éstas eran expuestas a un estímulo de diferenciación. Para ello cultivamos las NSC como neuroesferas, las cuales se crecen de manera tridimensional y corresponden a una combinación de NSC y neuroprogenitores ya comprometidos tanto a neuronas como a glía. Además, realizamos un protocolo de diferenciación a NPC y a astrocitos.

1.3.1. Neuroesferas

Para realizar el cultivo de neuroesferas cultivamos tres NSC Ctrl y tres NSC SZP en suspensión, en medio de cultivo NEM suplementado con B-27 y N2 para inducir una diferenciación mixta¹¹⁴. Después de 8 días de cultivo, se colectó el MC de 48 h (MC de Nsp) y se cuantificó la presencia de proteínas angiogénicas utilizando un array comercial. A diferencia de los MC de NSC, los MC de Nsp presentan las 55 proteínas evaluadas, aunque aquellas que no se encontraban en NSC se expresan en baja cantidad (Figura 8A). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de la mayoría de las proteínas encontradas en MC de Nsp SZP comparado con MC de Nsp Ctrl, a pesar de que se encontraban en niveles similares o incluso mayores a las analizadas en los MC de NSC, como por ejemplo IGFBP2 (Figura 8B). Sin embargo, en esta condición todavía se observa una reducción de los niveles de VEGFA en MC de Nsp SZP comparado con MC de Nsp SZP

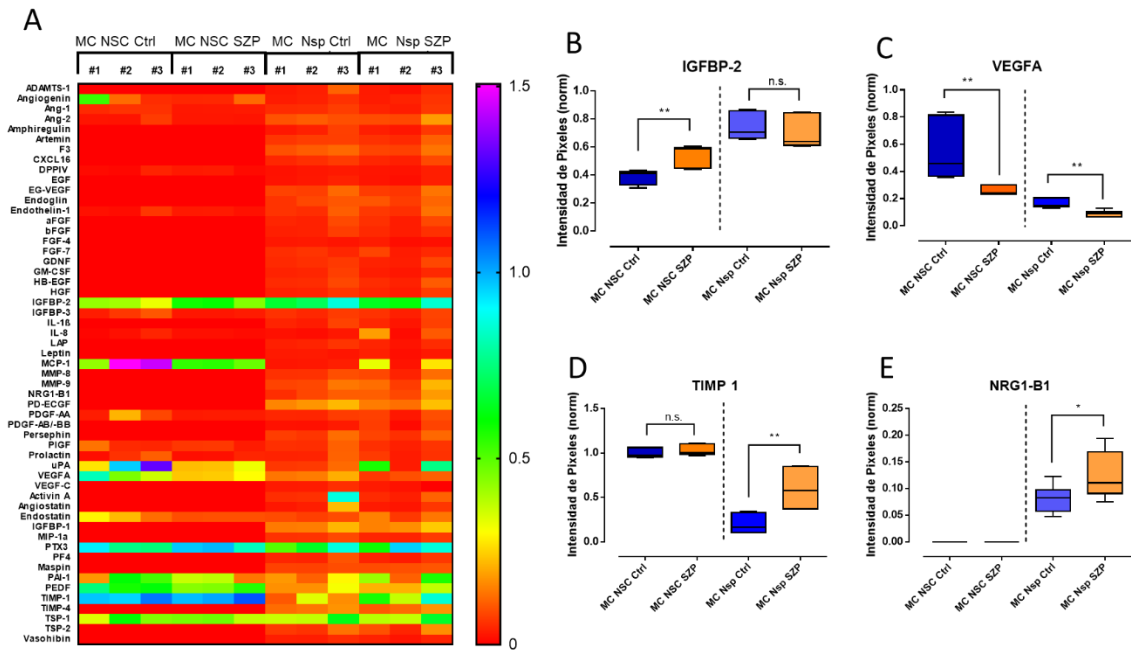


Figura 8. Neuroesferas SZP presentan un desbalance en la secreción de factores angiogénicos.

(A) Mapa de color ilustra los niveles de las proteínas angiogénicas detectadas en 3 MC de NSC Ctrl (#1,#2 y #3), 3 MC de NSC SZP (#1,#2 y #3), 3 MC de Nsp Ctrl (#1,#2 y #3) y 3 MC de Nsp SZP (#1,#2 y #3), mediante un array proteómico angiogénico. Los datos se muestran como el promedio de la intensidad de pixel respecto a los controles internos. La clave de color se ubica a la derecha. (B-E) Cuantificación de los niveles de IGBP-2 (B), VEGFA (C), TIMP-1 (D) y NRG1-B1 (E), en cada uno de los MC. Los valores corresponden al promedio de la intensidad de pixel respecto al control interno \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$ según el test de Mann-Whitney.

Ctrl; las Nsp SZP secretan un 45% menos de VEGFA que las Nsp Ctrl (Figura 8C).

Sumado a esto, los niveles de la proteína anti-angiogénica TIMP-1 fueron 2 veces mayores en el MC de Nsp SZP comparado con el MC de Nsp Ctrl (Figura 8D). Cabe notar que los niveles de NRG1-B1, una proteína de la familia de los receptores de EGF con una función fundamental en el desarrollo del sistema nervioso, resultaron un 53% mayores en el MC de Nsp SZP que en el MC de Nsp Ctrl (Figure 8E). Se han reportado anomalías en la expresión del mRNA de diversas isoformas de *NRG1* y un aumento en su expresión proteica en la corteza prefrontal dorsolateral de cerebros *post-mortem* de sujetos esquizofrénicos^{115,116}.

1.3.2. NPC

Para la generación de NPC dos NSC Ctrl y dos NSC SZP fueron sembradas sobre un recubrimiento de poli-ornitina/laminina y crecidas en medio NEM suplementado con B-27 y N2 durante dos semanas. En estas condiciones, las células generan procesos de tipo neuronal y son positivas para marcadores neuronales estructurales comunes, sin embargo, pese a la adquisición de estas características morfológicas, no generan potenciales de acción hasta los 20 días de cultivo¹¹⁷ por lo que se denominaron en este estudio como progenitores neuronales. Luego de 14 días de cultivo se obtuvo el MC y se analizó la presencia de proteínas angiogénicas mediante un array comercial. El perfil de expresión de las moléculas angiogénicas detectadas en MC de NPC resultó ser diferente al de los MC de NSC y de Nsp, sin embargo, se observan niveles similares de las

principales moléculas detectadas en el MC de NSC (Figura 9A). A diferencia de lo evidenciado en los MC de NSC, los MC de NPC muestran bajos niveles de VEGFA y no existe una disminución significativa en dichos niveles en los MC de NPC SZP respecto al MC de NPC Ctrl (Figura 9B). No obstante, se observa una disminución de un 56% en los niveles de uPA en los MC de NPC SZP en comparación con los MC de NPC Ctrl; los MC de NSC SZP presentan un 70% menos de uPA que los MC de NSC Ctrl (Figura 9C). Como se mencionó anteriormente la neuro-angiogénesis depende también, de las vías de señalización no-canónica, las cuales han sido descritas por poseer roles tanto en angiogénesis como en guía axonal¹³, por lo que evaluamos la expresión de factores secretables de dichas vías a través de qPCR en NPC Ctrl y SZP. Los niveles de mRNA de *SLIT2*, que actúa como molécula de guía repulsiva, se encontraron significativamente aumentados (5.8 veces) en las NPC SZP en comparación con las NPC Ctrl; por el contrario, los niveles de *EFNA1* en NPC SZP son casi indetectables (Figura 9D). Tal como se observó en los niveles secretados de VEGFA, no existen diferencias significativas en los niveles de su transcrito entre NPC Ctrl y SZP (Figura 9D).

1.1.1. Astrocitos

Para la generación de astrocitos, 2 NSC Ctrl y 3 NSC SZP fueron cultivadas en medio de diferenciación de astrocitos (DMEM/F-12, N2 y Suero Fetal Bovino) por 21 días y luego mantenidas en medio de astrocitos (DMEM/F-12 con 10%FBS) durante 4 semanas. En estas condiciones, las células adquieren una morfología clásica de astrocitos y son positivas para marcadores astrocíticos comunes (ANEXO 2 Figura S3). Luego de 5

semanas en cultivo se obtuvo el MC de 48 h y se analizó la presencia de proteínas angiogénicas mediante un array comercial. El perfil de expresión de las moléculas angiogénicas detectadas en MC de Astrocitos resultó ser diferente al de los MC de NSC, neuroesferas y de NPC, encontrándose una mayor expresión de moléculas anti-angiogénicas, lo cual es concordante con su rol en la mantención de la BHE. A pesar de esto se conserva la alta expresión de algunas moléculas pro-angiogénicas tales como IGFBP-2 y uPA (Figura 9A). Al comparar los niveles de las distintas moléculas detectadas en el MC de Astrocitos Ctrl y MC de Astrocitos SZP, no se observan diferencias significativas entre ellos, contrario a lo detectado en los otros tipos celulares.

2. Evaluar las diferencias en la formación de vasos inducido por parte de NSC y células del linaje neural derivadas de hiPSC SZP e hiPSC Ctrl.

La vascularización del cerebro es un fenómeno dinámico y complejo ^{1,2}. El correcto establecimiento del nicho neuro-angiogénico durante el desarrollo permite la adecuada estructuración de la NVU⁴.

Con el objetivo de investigar si existen diferencias en la formación de vasos inducida por derivados celulares de NSC SZP, analizamos su eficacia en ensayos funcionales de vascularización temprana, formación de estructuras capilares y angiogénesis.

2.1. Estudios de la vascularización temprana en modelos mixtos tridimensionales revelan una deficiencia en el reclutamiento de EC por parte de NSC SZP.

De manera de estudiar las dinámicas tempranas de este proceso de vascularización, implementamos un modelo 3D de reclutamiento de células endoteliales (modificado de Milner et al.⁷⁰), basado en la generación de neuroesferas de NSC derivadas de hiPSC y su posterior co-cultivo con cultivos primarios de células endoteliales. A diferencia de otras células endoteliales, las HUVEC comparten algunas características con las BEC, como lo son la expresión de proteínas de uniones estrecha, transportadores de eflujo, transportadores de glucosa GLUT-1 y una TEER elevada (ANEXO 3 Figura S4), ^{118,119}.

Las HUVEC fueron marcadas fluorescentemente utilizando Vybrant Dil (Invitrogen) y sembradas sobre neuroesferas. Los eventos de reclutamiento y adhesión temprana

fueron evaluados mediante la determinación del porcentaje de células adheridas a las neuroesferas luego de 18 h, utilizando citometría de flujo (Figura 10A, B, C).

Dado que los procesos iniciales de reclutamiento ocurren cuando el tubo neural está principalmente compuesto de NSC, las que luego sufren procesos de neuro/glio-génesis, evaluamos dicho proceso en dos tipos de neuroesferas diferentes: NSC crecidas en suspensión en medio NEM, las cuales están compuestas en su totalidad por NSC (Nsp); y NSC crecidas en suspensión en medio de diferenciación mixta, las cuales a los 10 días de cultivo presentan NSC, progenitores neuronales y gliales y células en proceso de diferenciación (Nsp mixta). Al comparar la adhesión de HUVEC a estos dos tipos de condición, observamos que, en promedio, un 45% de las HUVEC sembradas se adhiere a las Nsp, mientras que, de manera significativamente menor, sólo un 7% se adhiere a las Nsp mixtas (Figura 10D), corroborando que este proceso es principalmente llevado a cabo por NSC y, en menor medida, por células diferenciadas o en proceso de diferenciación.

Para evaluar si existen diferencias en la vascularización temprana en esquizofrenia, realizamos un ensayo de reclutamiento y adhesión de células endoteliales a las Nsp SZP. Para ello realizamos el ensayo utilizando Nsp generadas a partir de cuatro NSC Ctrl y cuatro NSC SZP, sembradas en medio NEM. Al comparar el porcentaje de células adheridas, observamos que las distintas líneas de Nsp SZP reclutan una menor

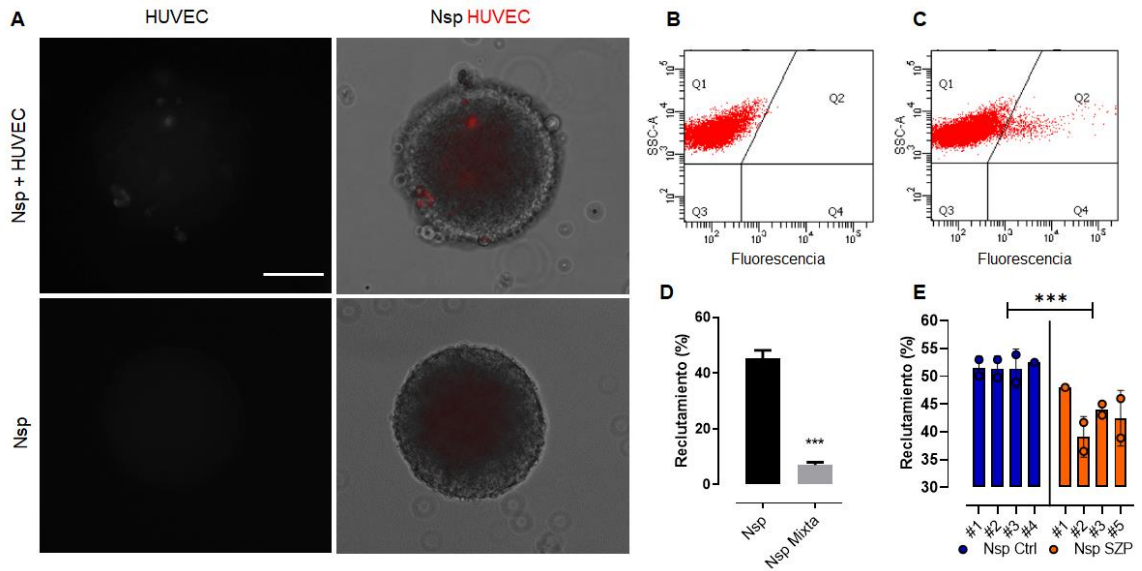


Figura 10. Estudio de vascularización temprana en Nsp. HUVEC marcadas fluorescentemente con Dil fueron sembradas sobre Nsp por 18 h, el número de células HUVEC adheridas fue cuantificado por citometría de flujo. (A) Imágenes representativas de HUVEC (rojo) adheridas a Nsp luego de 18 h de co-cultivo. Se muestra como control negativo de fluorescencia, Nsp sin HUVEC. Barra= 100µm. (B-C) Diagramas de punto muestran la ausencia de células fluorescentes en Nsp solas (B) y la presencia de células fluorescentes en el co-cultivo (C); la detección de células fluorescentes se observa en el sector Q2, respecto a las células en el sector Q1. (D) El porcentaje de HUVEC adheridas, respecto al total sembrado, fue cuantificado para 4 Nsp y 4 Nsp mixtas. *** $p \leq 0.001$ según el test de t para datos pareados. (E) El reclutamiento de células endoteliales fue calculado como el porcentaje de HUVEC adheridas, respecto al total sembrado, en 4 Nsp Ctrl y 4 Nsp SZP; *** $p < 0.001$ según test de t para datos anidados.

proporción de HUVEC comparadas con las Nsp Ctrl, adhiriendo, en promedio, un 17% menos de células (Figura 10E).

2.2. Las NSC SZP inducen una menor angiogénesis *in vitro*

Debido a que las NSC secretan diversas proteínas angiogénicas y que hay una diferencia significativa en la expresión y secreción de varios de estos factores en NSC SZP comparado con NSC Ctrl (Figura 7), evaluamos a continuación los MC de NSC Ctrl y SZP en un ensayo funcional.

Las células endoteliales pueden ser mezcladas con los MC y sembradas sobre una matriz extracelular. En estas condiciones, frente a los estímulos angiogénicos presentes en los MC, éstas migran y desarrollan estructuras similares a los capilares, formando ramificaciones y estructuras tubulares ¹²⁰. Por lo tanto, cultivamos HUVEC en presencia del MC de NSC por cuatro h y evaluamos el número de túbulos y ramificaciones formadas. El control positivo EGM, un medio de cultivo rico en factores angiogénicos, genera un mayor número de túbulos y ramificaciones que el medio basal EBM (Figura 11A), lo mismo ocurre con el medio NEM que pese a no contener suero posee numerosos factores de crecimiento. Comparado con el medio de cultivo NEM, los MC de NSC Ctrl generan más túbulos, por el contrario, el MC de NSC SZP es menos efectivo, produciendo menos estructuras y no siendo significativamente diferente al NEM (Figura 11A).

Demostramos que los MC de NSC Ctrl son pro-angiogénicos dado que inducen la formación de un mayor número de ramificaciones (Figura 11B) y de túbulos (Figura 11C)

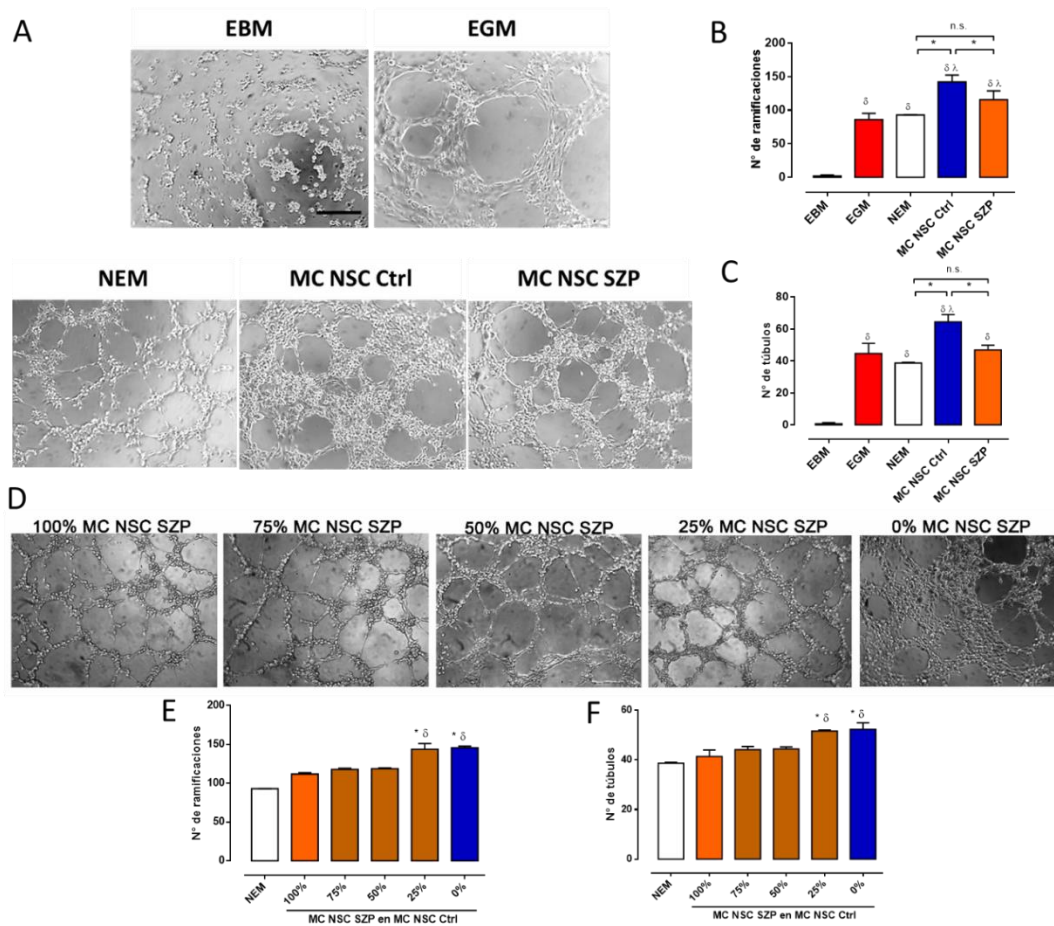


Figura 11. El MC de NSC SZP es menos angiogénico *in vitro*. (A) Para el ensayo de formación de túbulos, cultivos primarios de HUVEC fueron sembrados en medio endotelial basal (EBM) y medio endotelial de crecimiento (EGM) para verificar que poseían una formación de túbulos y ramificaciones normal. Se observan fotos representativas de los túbulos y ramificaciones formadas por EGM, EBM, NEM, MC de NSC Ctrl y MC de NSC SZP. Barra = 30 μ m. (B-C) Cuantificación de los túbulos y ramificaciones generadas por las condiciones en (A). Los datos son representados como el promedio por campo \pm S.D. *, δ (respecto a EBM) and λ (respecto a EGM) = $p < 0.05$ según el test de Kruskal-Wallis. (D-F) Ensayo de dilución. El MC de NSC SZP fue diluido en MC de NSC Ctrl; 100% corresponde sólo a MC de NSC SZP y 0% sólo MC de NSC Ctrl. (D) Imágenes representativas del ensayo al incubar las HUVEC con las distintas diluciones. (E-F) Cuantificación de los túbulos y ramificaciones generadas por las condiciones en (D). Los datos son representados como el promedio por campo \pm S.D. * (respecto a NEM) y δ (respecto a 100%) = $p < 0.05$ según el test de Kruskal-Wallis

que el medio de cultivo NEM. Los MC de NSC SZP no indujeron mayor angiogénesis que la inducida por el medio de cultivo NEM y presentan una disminución en un 23% y 37% del número de ramificaciones y tubos formados, respectivamente, al compararlos con los formados por el MC de NSC Ctrl (Figura 11B-C). De hecho, al realizar un ensayo de dosis-respuesta diluyendo MC de NSC SZP con MC de NSC Ctrl a distintas proporciones, corroboramos que se recupera la capacidad pro-angiogénica a una dilución de 1:3 (Figura 11D-F).

Como se indicó previamente, se ha reportado una disminución de VEGFA en sujetos esquizofrénicos^{44,45}. En concordancia con esto, encontramos que las NSC SZP expresan un 51% menos y secretan un 54% menos de VEGFA que las NSC Ctrl (Figura 7). Por lo tanto, investigamos la contribución de la señalización de VEGFA en la angiogénesis inducida por los MC de NSC Ctrl. Para ello, inhibimos la actividad de VEGFA al incubar los MC de NSC Ctrl con bevacizumab (Bvz), un anticuerpo que se une específicamente a VEGFA, bloqueando su actividad. La suplementación del medio de cultivo NEM con VEGFA aumenta de manera significativa la formación de ramificaciones y túbulos, efecto que se inhibe al agregar 100 µg/ml de Bvz (Figura 12A). Como era esperado, el tratamiento de los MC de NSC Ctrl con Bvz disminuye la formación de ramificaciones y túbulos en un 10% y 17% respectivamente, resultando a niveles similares a los inducidos por los MC de NSC SZP (Figura 12B-C). De la misma manera, el tratamiento del MC de NSC SZP con VEGFA recombinante aumenta la formación de túbulos y ramificaciones en un 20% y 10% respectivamente al tratar con 50 ng/ml de VEGFA, y en un 60% y 52%

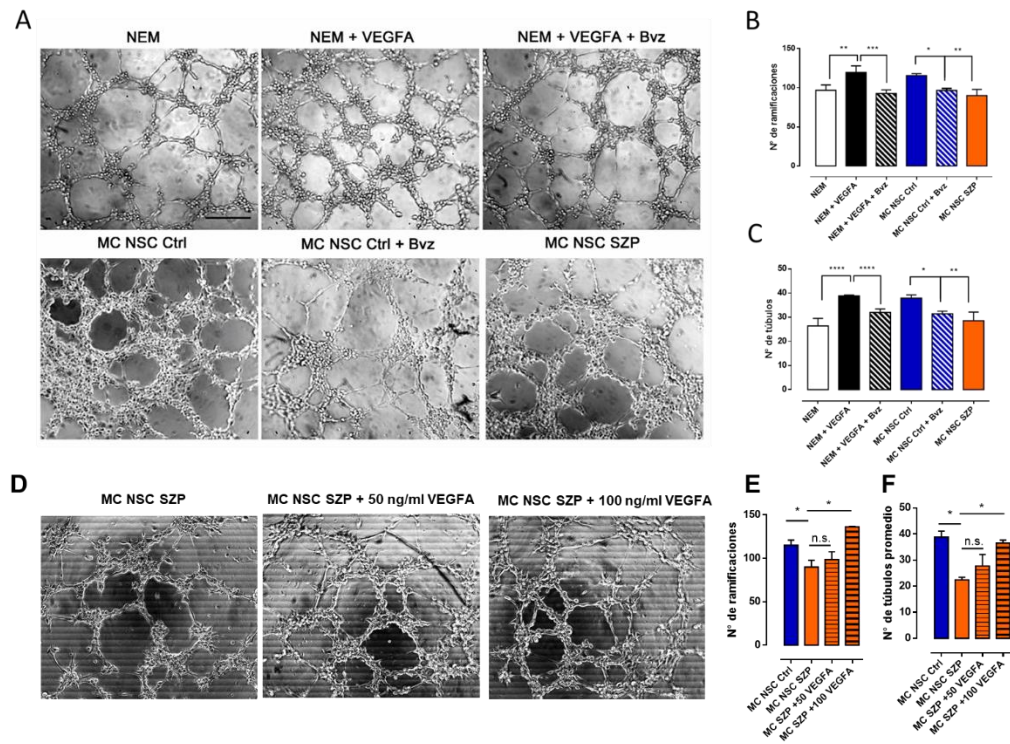


Figura 12. VEGFA es relevante para la angiogénesis *in vitro* inducida por NSC. (A) Imágenes representativas del ensayo de formación de túbulos, cuando se incuban HUVEC con NEM, NEM más 50 ng/ml de VEGFA, NEM más 50 ng/ml de VEGFA y 100 µg/ml del inhibidor bevacizumab (Bvz), MC de NSC Ctrl, MC de NSC Ctrl más 100 µg/ml Bvz o MC de NSC SZP. (B-C) Cuantificación de las ramificaciones (B) y túbulos (C) generados por las condiciones en (A). (D) Imágenes representativas del ensayo de formación de túbulos, cuando las células se incuban con MC NSC SZP, MC NSC SZP + 50 ng/ml de VEGFA y MC NSC SZP + 100 ng/ml de VEGFA. (E-F) Cuantificación de las ramificaciones (E) y túbulos (F) generados por las condiciones en (D). Los datos son representados como el promedio por campo ± S.D. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ según el test de Kruskal-Wallis.

respectivamente al tratar con 100 ng/ml de VEGFA, alcanzando niveles similares a los inducidos por el MC de NSC Ctrl (Figura 12D-F).

2.3. Las NSC SZP inducen una menor angiogénesis *in vivo*

Debido a la complejidad del proceso angiogénico, quisimos evaluar si las deficiencias de los MC de NSC SZP observadas *in vitro* también podían ser observadas *in vivo*. Para realizar este análisis se utilizó la CAM del embrión de pollo. Durante el desarrollo embrionario del pollo, los vasos sanguíneos de la CAM están en constante angiogénesis, por lo que durante los días embrionarios 8 (E8) y 12 (E12) pueden observarse alteraciones en este proceso las que resultan en un cambio en el número de vasos en la CAM. Esto nos permite evaluar el efecto de componentes pro-angiogénicos, anti-angiogénicos y neutros respecto a la angiogénesis. Usamos un biopolímero (biocelulosa) como matriz para la carga del estímulo, el que, a diferencia de otros métodos de entrega, nos permite cargar un mayor volumen; la matriz se posicionó sobre la CAM en E8. Cuatro días después se contó el número de vasos que cruzaban un perímetro fijo alrededor de ella (Figura 13A). Al incubar la CAM con el medio de cultivo NEM se observó un aumento en la vasculatura, la formación de vasos fue mayor al incubar con MC de NSC Ctrl. La incubación con MC de NSC SZP resultó en una vasculatura menos densa y más delgada al compararla con la estimulada con MC de NSC Ctrl (Figura 13A, C). La cuantificación de los vasos formados revela que el MC de NSC Ctrl genera un 25.8% más de vasos que el medio del cultivo NEM y un 29.6% más que el MC de NSC SZP; los MC de NSC SZP no aumentan la formación de vasos al compararlo con el medio de cultivo NEM (Figura 13B).

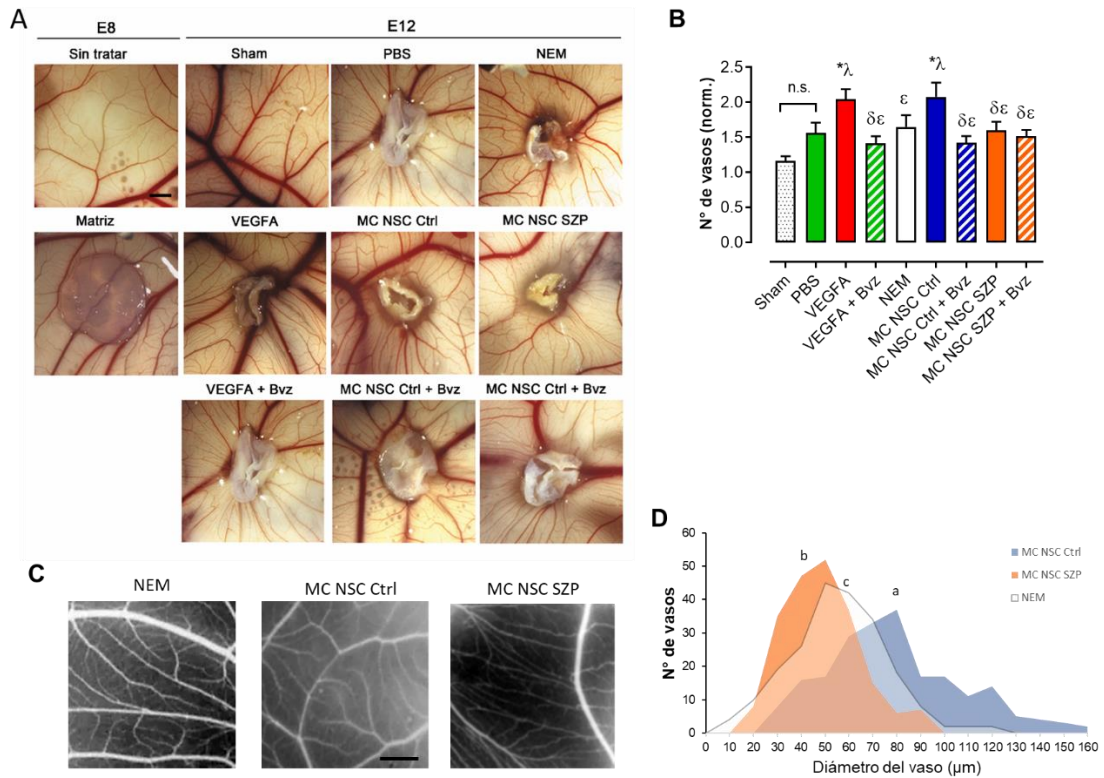


Figura 13. MC de NSC SZP induce menos angiogénesis *in vivo* que el MC de NSC Ctrl. (A) Para el ensayo de CAM los MC fueron incubados sobre una matriz de biocelulosa en E8. Luego de 4 días, se cuantificaron los vasos en el perímetro de la matriz. Imágenes representativas de los vasos en la CAM en los días y condiciones indicadas. Sham (sin estímulo), PBS, NEM, 100 ng VEGFA, MC de NSC Ctrl, MC de NSC SZP, 100 ng VEGFA más 100 $\mu\text{g/ml}$ Bvz, MC de NSC Ctrl más 100 $\mu\text{g/ml}$ Bvz o MC de NSC SZP más 100 $\mu\text{g/ml}$ Bvz. Barra = 2 mm. (B) Cuantificación del número de vasos en E12 normalizado con respecto a los vasos cuantificados en E8. Los datos son representados como el promedio por condición \pm S.D. * (respecto a Sham), λ (respecto a PBS), ϵ (respecto a VEGF) and δ (respecto a Ctrl NSC CM) = $p < 0.05$ según el test de Kruskal-Wallis. (C) Magnificación de las imágenes en (A) permite observar las diferencias en el diámetro de los vasos. Barra= 1mm. (D) Cuantificación del diámetro de los vasos en E12. El gráfico muestra la distribución de frecuencia del diámetro de los vasos cuando la CAM es estimulada con NEM, MC de NSC Ctrl o MC de NSC SZP. Para cada condición se evaluaron 200 vasos. Las tres distribuciones son diferentes entre sí con un $p \leq 0.0001$ según el test de Kolmogorov-Smirnov.

Al cuantificar el diámetro de los vasos formados frente a los distintos estímulos, se observa que el MC de NSC Ctrl y el MC de NSC SZP induce la formación de vasos de mayor y menor calibre, respectivamente, que el medio de cultivo NEM (Figura 13C-D, Anexo 3 Figura S5). Asimismo, el MC de NSC SZP induce la formación de vasos de menor calibre que el MC de NSC Ctrl (Figura 13C-D, Anexo 3 Figura S5).

Debido a que la señalización de VEGFA es crucial para la inducción de angiogénesis *in vitro* mediada por el MC de NSC Ctrl, inhibimos la actividad de VEGFA en el ensayo de CAM al incubar los MC de NSC Ctrl con Bvz (Figura 13). El efecto pro-angiogénico del MC de NSC Ctrl disminuye de manera significativa con el tratamiento de 100 µg/ml de Bvz, alcanzando niveles similares a los de la incubación con MC de NSC SZP y NEM (Figura 13B). Interesantemente, la inhibición de VEGFA en los MC de NSC SZP no tiene un efecto significativo, sugiriendo que ya hay una reducción considerable de VEGFA *per se* en estos MC (Figura 13B).

2.4. Células del linaje neural derivadas de NSC SZP presentan deficiencias en la inducción de la angiogénesis *in vivo* e *in vitro*.

Debido a las diferencias encontradas en la secreción de moléculas angiogénicas canónicas y no canónicas por parte de células derivadas de NSC SZP, tales como Neuroesferas, NPC y astrocitos (Figuras 8 y 9), quisimos evaluar el impacto funcional de estos MC en la inducción de la angiogénesis.

Al evaluar la eficiencia de la angiogénesis *in vitro* inducida por los MC de Nsp observamos que no generaban más ramificaciones que el medio de cultivo NEM (recordar que este medio esta suplementado con factores tróficos) (Figura 14A-B). A pesar de eso, los MC de Nsp Ctrl generaban un aumento en el número de túbulos respecto al medio de cultivo NEM (Figura 14C). A pesar de que el número promedio de ramificaciones y túbulos formados por los MC de Nsp, es menor que el generado por los MC de NSC, confirmamos que los MC de Nsp SZP inducen una menor angiogénesis *in vitro* que los MC de Nsp Ctrl, formando en promedio un 12% menos de ramificaciones y un 38% menos de túbulos (Figura 14C-D). Sumado a esto, la inhibición de VEGFA en los MC de Nsp Ctrl utilizando bvz, produjo una disminución del número de túbulos, pero no de la formación de ramificaciones (Figura 14C-D).

Respecto a los MC de NPC, observamos que los MC de NPC Ctrl generan un mayor número de ramificaciones y túbulos que el medio de cultivo NEM (suplementado), a pesar de que el número promedio de túbulos generados es menor a aquel obtenido cuando se incubaba con MC de NSC Ctrl (Figura 15). Al igual que con los MC de NSC y Nsp, confirmamos que el número de ramificaciones formadas con los MC de NPC SZP es significativamente menor que el de los MC de NPC Ctrl, formando un 26% menos de ramificaciones (Figura 15B). No se observan diferencias significativas en la formación de túbulos entre ambos MC (Figura 15C).

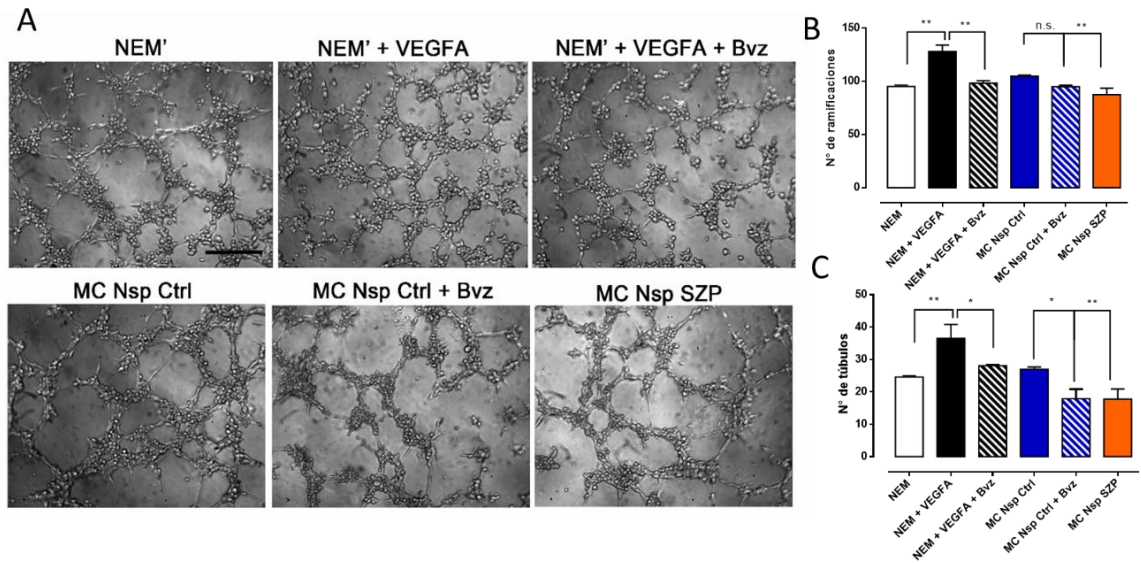


Figura 14. MC de Nsp SZP induce una menor angiogénesis *in vitro* que el MC de Nsp Ctrl. (A) Imágenes representativas del ensayo de túbulos al incubar HUVEC con NEM' (NEM con suplementos de diferenciación, NEM' más 50 ng/ml de VEGFA, NEM' más 50 ng/ml de VEGFA con 100 µg/ml de Bvz, MC de Nsp Ctrl, MC de Nsp Ctrl más 100 µg/ml Bvz o MC de Nsp SZP. Barra= 30 µm. (B-C) Cuantificación del número promedio de ramificaciones (B) y túbulos (C) generados en cada condición de (A). Los valores corresponden al promedio por campo para cada condición ± SD con * p < 0.05 según el test de Kruskal-Wallis.

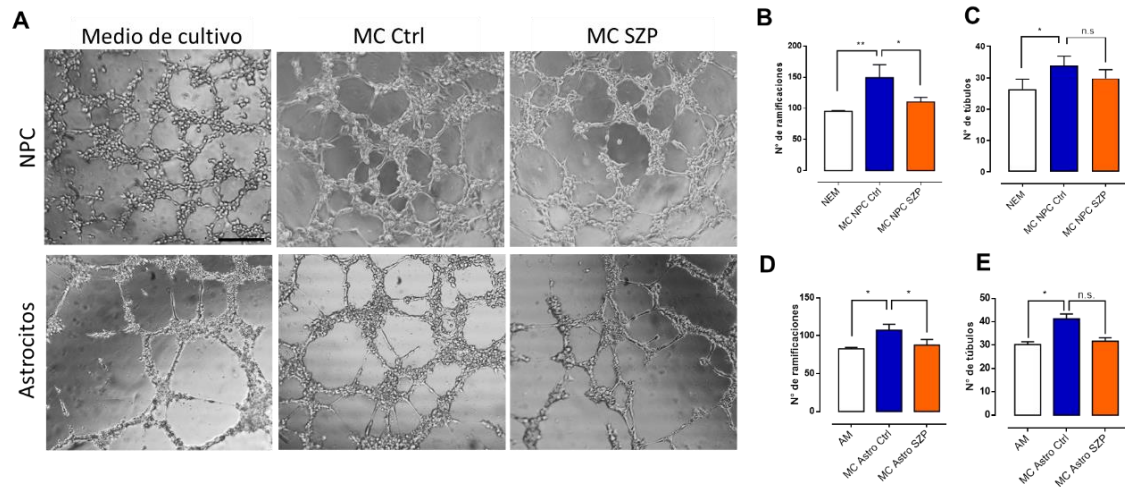


Figura 15. MC de NPC SZP induce una menor angiogénesis *in vitro* que el MC de NPC Ctrl. (A) Imágenes representativas del ensayo de túbulos al incubar HUVEC con Medio de cultivo (NEM o AM), MC Ctrl o MC SZP, de NPC y Astrocytes. Barra= 30 µm. (B-E) Cuantificación del número promedio de ramificaciones (B y D) y túbulos (C y E) generados en cada condición de (A). Los valores corresponden al promedio por campo para cada condición ± SD con * = p < 0.05 y ** = p < 0.01 según el test de Kruskal-Wallis.

Al evaluar los MC de astrocitos, observamos que los MC de Astrocitos Ctrl generan un mayor número de ramificaciones y túbulos que su medio de cultivo AM (DMEM/F-12 con 10% FBS), a pesar de que el número promedio de túbulos generados es menor a aquel obtenido cuando se incubaba con MC de NSC Ctrl (Figura 15). Al igual que con los MC de NPC, confirmamos que el número de ramificaciones formadas con los MC de Astrocitos SZP es significativamente menor que el de los MC de Astrocitos Ctrl, formando un 18% menos de ramificaciones (Figura 15D). Similar a lo observado con los MC de NPC no se observan diferencias significativas en la formación de túbulos entre ambos MC (Figura 15E).

Debido a la participación de los Astrocitos en la mantención de la estabilidad de los vasos sanguíneos del cerebro, se evaluó la modulación de la angiogénesis *in vivo*. Los resultados muestran que tanto los MC de Astrocitos Ctrl como los de SZP inducen una mayor formación de vasos que el medio control AM, formando un 20% y un 25% más de vasos, respectivamente (Figura 16B). A pesar de no observarse diferencias significativas en el número de vasos formados al comparar el MC de Astrocitos Ctrl con el SZP (Figura 16A-B), se comprueba que la estimulación con el MC de Astrocitos SZP genera una mayor cantidad de vasos de menor calibre (Figura 16A, C), de manera similar a lo observado con el MC de NSC SZP.

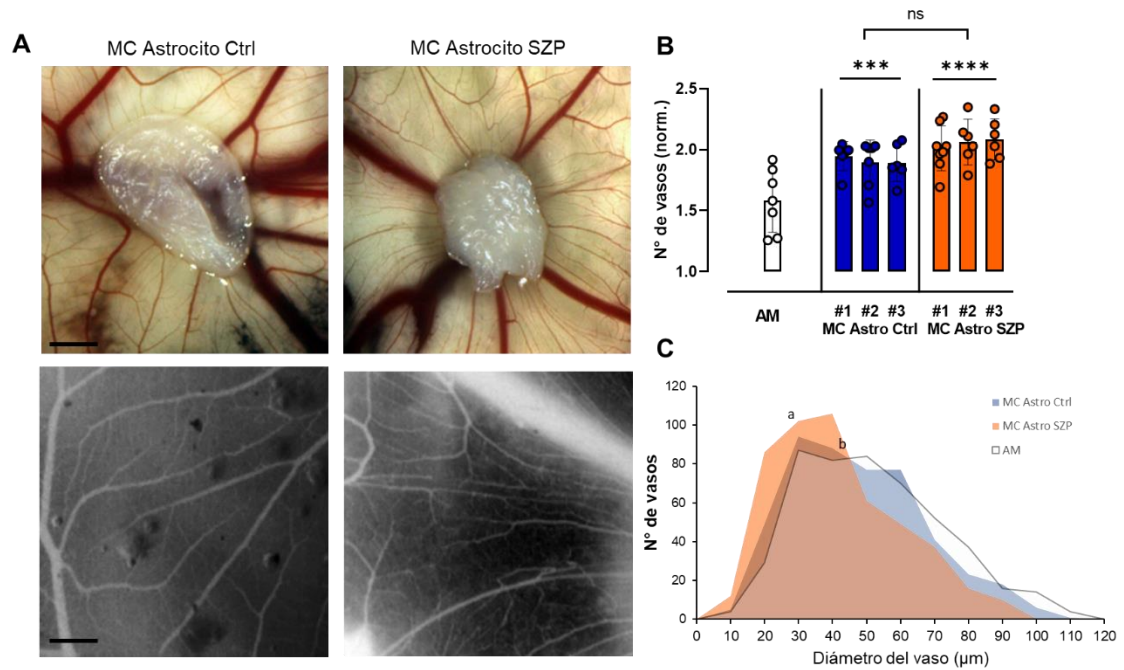


Figura 16. MC de Astrocitos SZP induce la formación de una mayor cantidad de vasos de menor calibre que el MC de Astrocitos Ctrl. (A) Imágenes representativas de los vasos en la CAM en el día E12 al ser incubadas con MC de Astrocitos Ctrl y SZP. Barra = 2 mm (arriba), barra = 70 µm (abajo). (B) Cuantificación del número de vasos en E12 normalizado con respecto a los vasos cuantificados en E8. Los datos son representados como el promedio por condición ± S.D. *** = $p < 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$ respecto a AM, según el test de Kruskal-Wallis. Se indica para cada caso el número identificador del donante (Ctrl #1, #2, #3; SZP #1, #2 y #3) (C) Cuantificación del diámetro de los vasos en E12. El gráfico muestra la distribución de frecuencia del diámetro de los vasos cuando la CAM es estimulada con AM, MC de Astro Ctrl o MC de Astro SZP. Para cada condición se evaluaron 200 vasos. Las distribuciones de al estimular con AM o MC de Astro Ctrl no son diferentes entre sí (b); la distribución al estimular con MC de Astro SZP es significativamente diferente tanto a la de AM como de MC Astro Ctrl (a) con un $p \leq 0.001$ según el test de Kolmogorov-Smirnov.

3. Analizar las diferencias funcionales entre células endoteliales derivadas de hiPSC SZP e hiPSC Ctrl.

Para que la vascularización del cerebro se lleve a cabo, células endoteliales migran hacia el tubo neural para formar el PNVP y posteriormente forman nuevos vasos mediante angiogénesis. Durante este proceso dichos vasos interactúan con los componentes neurales, lo que finalmente llevará a la organización de la NVU y al establecimiento de la BHE ^{2,4,121}. En base a una gran recopilación de evidencia clínica, se ha propuesto recientemente una posible disfunción de la NVU y una hiperpermeabilidad de la BHE en la esquizofrenia ⁴³.

Dado que la correcta angiogénesis y formación de estructuras neurovasculares depende no sólo de la secreción de factores tróficos por parte del tejido nervioso, sino también de la capacidad responsiva inherente de las células endoteliales que llegan al cerebro, realizamos un protocolo de diferenciación de hiPSC SZP y Ctrl a BEC, con el objetivo de evaluar diferencias en la expresión de moléculas clásicas y en su respuesta funcional a estímulos angiogénicos.

3.1. hiPSC pueden ser diferenciadas en células endoteliales con características de microvasculatura cerebral

Las BEC, en especial las de la microvasculatura, poseen características distintivas respecto a otras células endoteliales, tales como una mayor expresión de proteínas relacionadas a uniones estrechas, menor permeabilidad, mayor TEER y expresión de transportadores de eflujo. Dichas características son inducidas en etapas muy tempranas

por el microambiente del sistema nervioso central y les otorgan propiedades de barrera⁹. Por lo cual, se realizó un protocolo de diferenciación de hiPSC a BEC que poseyeran estas características distintivas de microvasculatura cerebral.

Diferenciamos de manera exitosa diversas líneas de hiPSC basándonos en el protocolo publicado por Qian y cols.⁶⁹. Dicho protocolo incluye una activación secuencial de las vías de Wnt y de ácido retinoico, primero con un tratamiento de las hiPSC con CHIR99021, un inhibidor de GS3K y agonista de la vía Wnt canónica que dirige a las hiPSC a progenitores endoteliales derivados de mesodermo, y posteriormente se induce la diferenciación específica a BEC mediante el tratamiento con ácido retinoico (Figura 17A). La Figura 17B muestra imágenes representativas del protocolo. En el día -3 (D-3) se representa una colonia característica de hiPSC y al día 10 (D10) la adquisición de una morfología característica de BEC formando una monocapa con apariencia de empedrado (Figura 17B, C). Se comprobó mediante PCR, que las BEC obtenidas expresan marcadores clásicos de células endoteliales como *factor de Von Willebrand (VWF)*, *cadherina vascular endotelial (VECad o CDH5)* y *receptores de VEGFA (KDR)* (Figura 17C); también se comprobó mediante inmunofluorescencia la presencia del marcador endotelial CD31 (PCAM, Figura 17F). Estas células, al ser diferenciadas de manera específica a BEC, también expresan marcadores característicos de barrera, como proteínas de uniones estrechas (Ocludina y Claudina) y la presencia del transportador de glucosa GLUT-1, corroborada por inmunofluorescencia (Figura 17D, G).

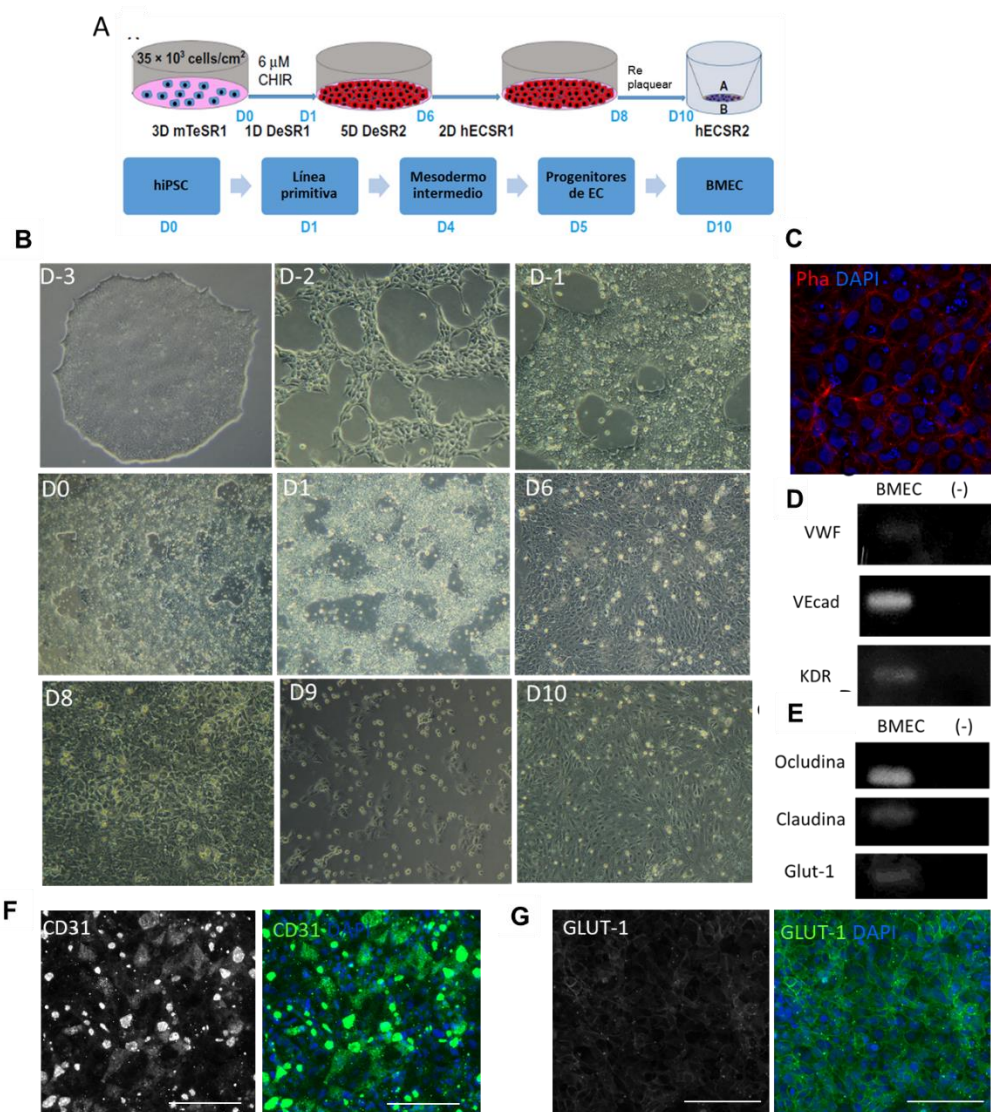


Figura 17. hiPSC pueden ser diferenciadas a BEC. (A) Diagrama del protocolo de diferenciación generado por Qian et al. 2017. Se indican los procesos celulares y el uso de distintos medios de diferenciación, así como los fenotipos resultantes en los distintos días. (B) Imágenes representativas de los cultivos en distintos días del protocolo según se indica en la esquina superior izquierda. Las fotos fueron tomadas con un aumento de 200x a excepción de D-3 que corresponde a un aumento de 100x. (C) Imagen de BEC con tinción de faloidina (Pha) para actina y DAPI para núcleo. (D) Evaluación de marcadores clásicos de endotelio por PCR en BEC. (E) Evaluación de marcadores característicos de barrera por PCR en BEC. (F-G) La presencia y distribución de CD31 (F) y GLUT-1 (G) fue evaluada mediante inmunofluorescencia en BEC. Se usó tinción DAPI para núcleo. Barra= 100 μm.

3.2. BEC SZP presentan un desbalance en la expresión de moléculas asociadas a su función angiogénica y de barrera

Con el objetivo de evaluar si en la esquizofrenia existe un desbalance en la expresión de moléculas relacionadas con la función de las BEC en los contextos de angiogénesis y barrera, dos hiPSC Ctrl y cuatro hiPSC SZP fueron diferenciadas a BEC.

La mayor parte de los genes analizados presenta una alta variabilidad en los niveles de transcrito, siendo dichas variaciones bajas para el caso de las BEC Ctrl y altas para las BEC SZP (Figura 18 A-J), a excepción del transcrito de la proteína de unión estrecha, *Occludina* (OCLN), el que presenta una gran variación tanto dentro del grupo de BEC Ctrl como dentro del de BEC SZP (Figura 18J). A pesar de esto último, a nivel proteico, no se observan mayores diferencias en su distribución celular entre BEC Ctrl y SZP (Figura 18L).

Al analizar los niveles de los receptores clásicos de VEGFA, *Flt1* (Figura 18A) y *KDR* (Figura 18B), así como los correceptores *Neuropilina-1* (NRP1, Figura 18C) y *Neuropilina-2* (NRP2, Figura 18D), observamos variaciones en la expresión de cada línea SZP respecto a las líneas Ctrl. Sin embargo, al comparar entre grupos de BEC Ctrl y SZP no observamos diferencias significativas.

Dada la importancia de HIF1A para la inducción de la angiogénesis y los reportes que ligan alteraciones en los blancos de esta vía en sujetos esquizofrénicos determinamos los niveles de este transcrito en las BEC¹²². Al analizar las diferencias entre los grupos Ctrl y SZP pudimos observar un aumento significativo en los niveles de *HIF1A* por parte de las

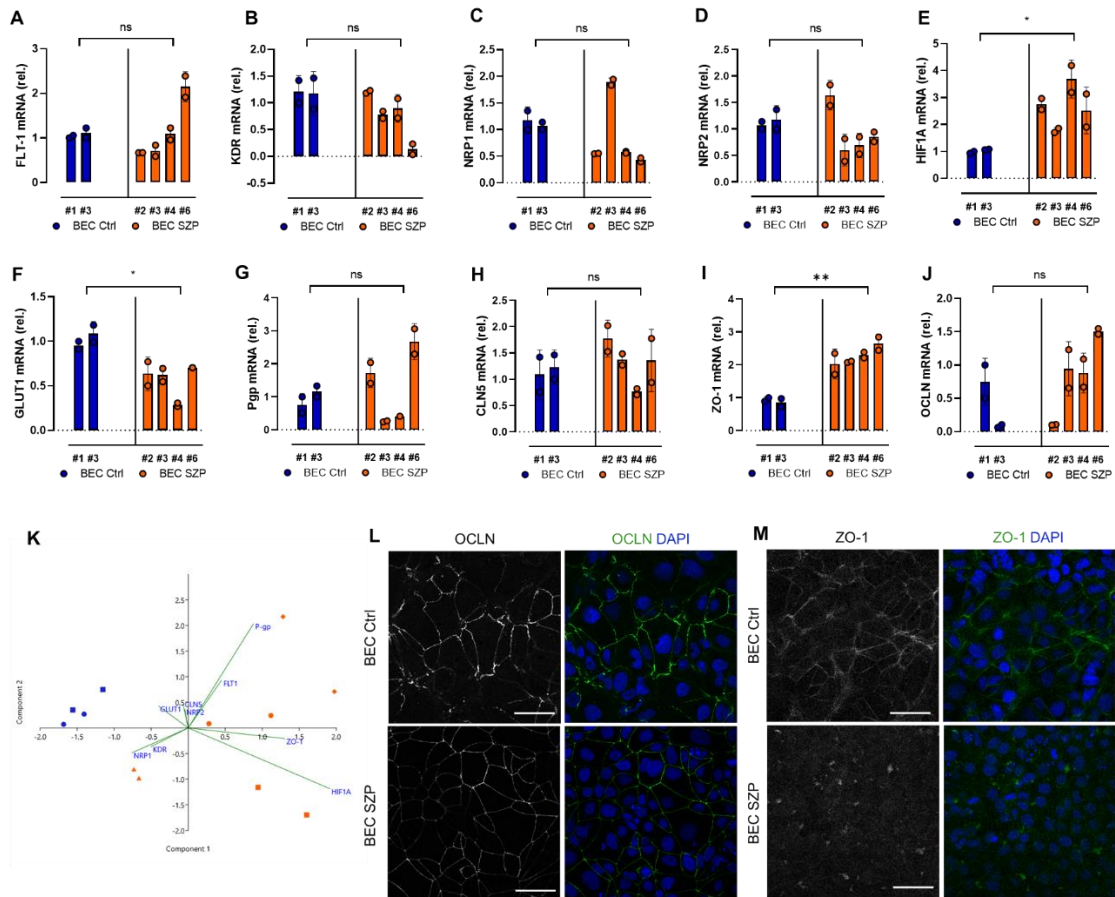


Figura 18. Las BEC SZP presentan alteraciones en la expresión de moléculas asociadas a su función angiogénica y de barrera. Seis hiPSC, dos Ctrl y cuatro SZP, fueron diferenciadas a BEC dos veces cada una de manera independiente. (A-J) Cuantificación mediante qPCR de los niveles de mRNA de *FLT-1* (A), *KDR* (B), *NRP-1* (C), *NRP2* (D), *HIF1A* (E), *GLUT-1* (F), *P-gp* (G), *CLN5* (H), *ZO-1*(I), *OCLN* (J), en BEC Ctrl y BEC SZP. Los niveles se expresan como la cantidad de mRNA relativos a los niveles de B2M (gen *housekeeping*) y son graficados como el promedio \pm SD; * $p < 0.05$ según el test de t para datos anidados. Se indica para cada caso el número identificador del donante (Ctrl #1 y #2; SZP #2, #3, #4 y #6). (K) Gráfico de las componentes 2 en relación con la componente 1 del análisis de componentes principales realizado a los datos obtenidos en (A-J). Se indican los pesos relativos de cada variable con líneas verdes. Se identifica cada línea celular como: BEC Ctrl #1● y #2■; BEC SZP #2●#3▲#4■y #6◆. (L-M) La expresión y distribución de OCLN (H) y ZO-1 (I) fue evaluada mediante inmunofluorescencia en BEC Ctrl y SZP. Se muestran fotos representativas de cada condición, barra= 50 μ m.

BEC SZP, las que, en promedio, expresan un 2.6 veces más *HIF1A* que las BEC Ctrl (Figura 18E).

Respecto a la expresión de moléculas relacionadas con la función de barrera hematoencefálica, corroboramos la expresión tanto de *GLUT-1*, *P-gp*, *Claudina-5 (CLN5)*, *ZO-1* y *Occludina (OCLN)* (Figura 18 F-J). Al analizar los niveles de transcrito de dichas moléculas, se observan variaciones en todos los niveles de estos transcritos entre las BEC SZP. Comparando los niveles entre los grupos de BEC Ctrl y BEC SZP, corroboramos que las BEC SZP expresan, en promedio, un 45% menos de *GLUT-1* que las BEC Ctrl (Figura 18F). Por el contrario, determinamos que BEC SZP expresan, en promedio, 2.5 veces más *ZO-1* que las BEC Ctrl (Figura 18I). A pesar de esto último, cuando analizamos la distribución celular de la proteína *ZO-1*, la cual corresponde a una proteína de anclaje asociada a moléculas de unión estrecha, detectamos que en BEC SZP, ésta se distribuye principalmente en el citoplasma, con concentración solo en ciertos puntos de la membrana, a diferencia de BEC Ctrl en la cual la distribución de *ZO-1* es cercana a la membrana celular. Por tanto, hay una distribución celular anómala de *ZO-1* en las BEC SZP (Figura 18M).

La esquizofrenia es una enfermedad de etiología múltiple, en la cual diferentes variaciones genéticas pueden afectar vías o procesos similares ⁶¹. Dada la gran variabilidad en la expresión de los transcritos analizados entre las diferentes BEC, quisimos evaluar si existían variables, y cuáles, que pudiesen explicar en mayor medida las diferencias entre BEC Ctrl y SZP. Para ello realizamos un Análisis de Componentes

Principales de estos datos y observamos que las dos primeras componentes explican cerca del 80% de la variación, siendo HIF1A, ZO-1 y PGP las variables que más peso aportan a estas componentes (Figura 18 K, ANEXO 3 Figura S7). Las diferencias en los valores de estas componentes permiten discriminar entre las BEC Ctrl y las BEC SZP, agrupándose las BEC Ctrl en un mismo cuadrante de valores. Las BEC SZP se excluyen de los parámetros de BEC Ctrl, sin embargo, presentan gran variabilidad (Figura 18K).

Sumado a la expresión de transcritos, realizamos un análisis de las proteínas secretadas mediante la cuantificación de 55 moléculas angiogénicas clásicas en los MC de una BEC Ctrl y tres BEC SZP, mediante un arreglo proteómico comercial (Figura 19A). Al analizar los niveles de las diferentes moléculas en el MC observamos que las BEC secretan diversas proteínas angiogénicas y existe variación en los niveles de secreción para las diferentes líneas (Figura 19B). Al comparar los niveles del MC de BEC Ctrl con el de BEC SZP encontramos tres moléculas pro-angiogénicas que presentaban niveles diferenciales entre estos dos grupos. En promedio, los MC de BEC SZP presentan un 45% menos de IGFBP-2 (Figura 19C) y un 68% menos de uPA (Figura 19D) que los MC de BEC Ctrl; por otro lado, el MC de BEC SZP presenta 2.2 veces más MMP-9 que el MC de BEC Ctrl (Figura 19E). Los niveles de VEGFA no presentaron diferencias significativas entre los MC de BEC Ctrl y los de BEC SZP (Figura 19F). Cabe notar que, en promedio, las BEC presentan un 95% menos de VEGFA que lo detectado en NSC Ctrl.

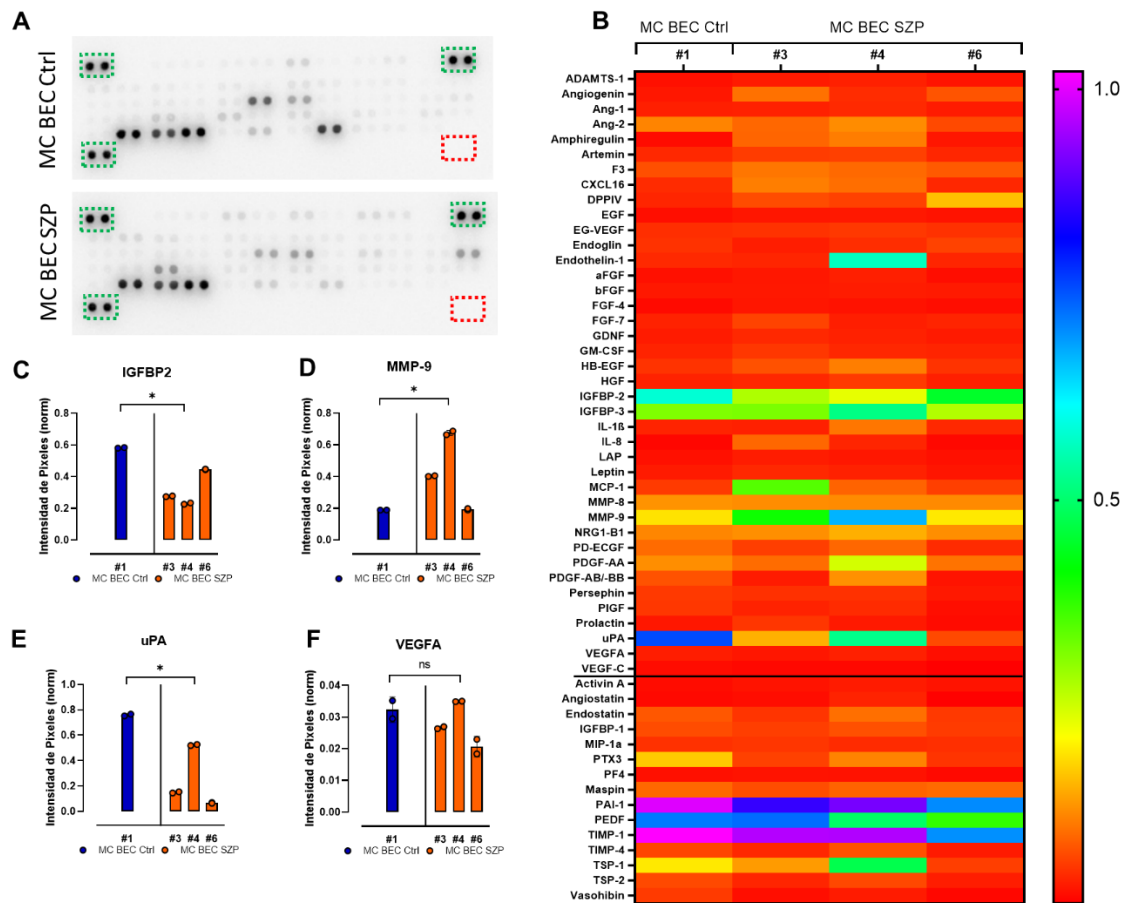


Figura 19. Las BEC SZP presentan un desbalance en la secreción de moléculas angiogénicas. (A) Fotos representativas a membranas del arreglo proteómico realizado a un MC de BEC Ctrl y tres MC de BEC SZP; los puntos corresponden a los factores detectados (en duplicado). Se indica en cajas verdes a los controles positivos y en cajas rojas a los controles negativos. (B) Mapa de color ilustra los niveles de las proteínas angiogénicas detectadas en el MC de BEC Ctrl #1 y en tres MC de BEC SZP (#3,#4 y #6), mediante un array proteómico angiogénico (A). Los datos se muestran como el promedio de la intensidad de pixel respecto a los controles internos. La clave de color se ubica a la derecha. (C-F) Cuantificación de los niveles de IGBP-2 (C), MMP-9 (D), uPA (E) y VEGFA (F), en cada uno de los MC. Los valores corresponden al promedio de la intensidad de pixel respecto al control interno \pm SD; * $p < 0.05$ según el test de t para datos anidados.

1.1. BEC SZP generan menor angiogénesis en respuesta a VEGFA

Con el objetivo de evaluar la capacidad angiogénica intrínseca de las BEC derivadas de hiPSC, se realizó un ensayo de formación de túbulos y ramificaciones *in vitro*.

Diferentes cultivos de BEC, tanto Ctrl como SZP, fueron sembrados en matrigel por 4 h, en medio de cultivo basal (hESFM suplementado con B27). Tanto BEC Ctrl como SZP son capaces de generar estructuras tipo capilar y no se evidencian diferencias significativas entre ellas en la formación de ramificaciones (Figura 20A-B) ni de túbulos (Figura 20 A y C), a excepción de BEC SZP #2 que pareciese tener una mayor angiogénesis basal que el resto de las líneas ensayadas.

Dado que se ha observado una deficiencia en la secreción y expresión de VEGFA en NSC SZP y a que se observa una reducción en la expresión de los receptores y co-receptores de VEGFA en BEC SZP, evaluamos la respuesta angiogénica de dos BEC Ctrl y cuatro BEC SZP al ser estimuladas con VEGFA (Figura 20 A, D-E). Al comparar las veces de cambio en el número de ramificaciones y túbulos entre los cultivos estimulados con VEGFA con respecto a una condición basal sin estimulación, observamos que las BEC Ctrl aumentan el número de ramificaciones y túbulos en una mayor proporción que las BEC SZP (Figura 20 D-E). En promedio, las BEC Ctrl aumentan el número de ramificaciones 1.7 veces al ser estimuladas con VEGFA, en cambio, para las BEC SZP la estimulación no provoca un cambio en el número de ramificaciones (Figura 20D). Respecto al número de túbulos, en promedio, las BEC Ctrl aumentan el número de túbulos generados 6 veces al ser estimuladas con VEGFA, en cambio las BEC SZP sólo lo aumentan 2.4 veces (Figura

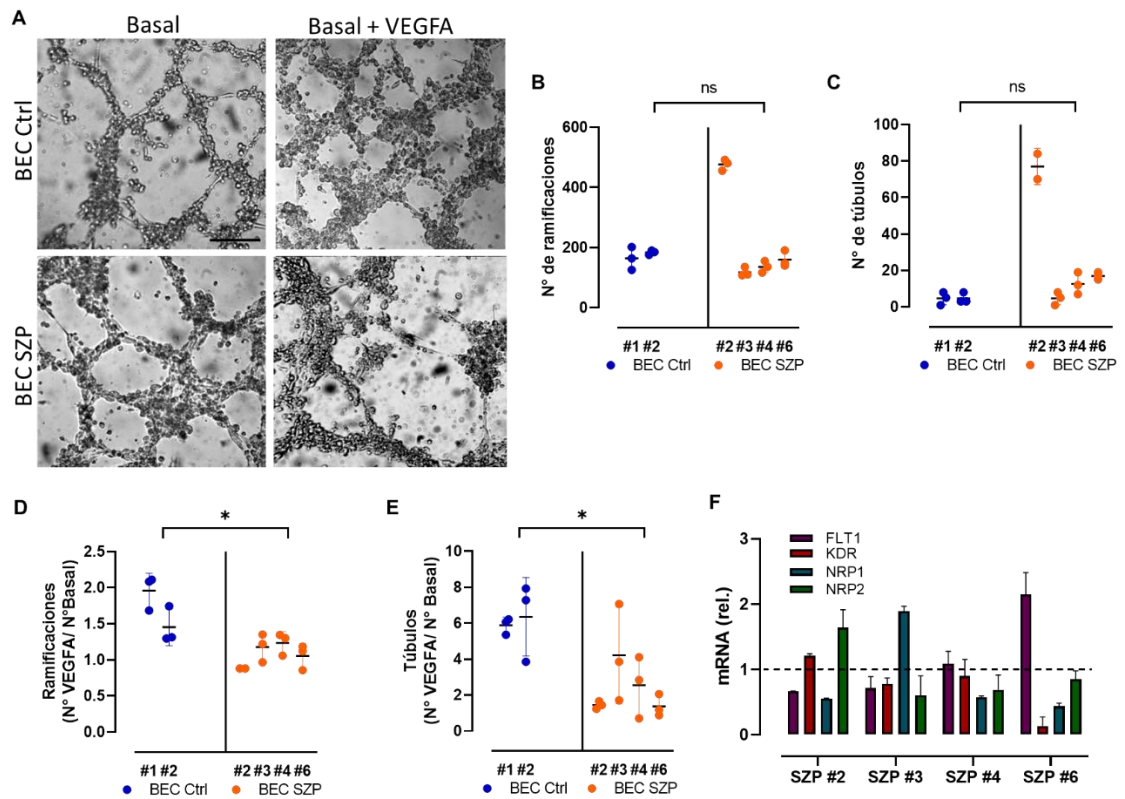


Figura 20. Las BEC SZP generan menos angiogénesis en respuesta a VEGFA. (A) Imágenes representativas del ensayo de túbulos al incubar BEC Ctrl y SZP con medio basal (hESFM + B27) o medio basal suplementado con 50ng/ml de VEGFA, barra= 30 μ m. (B-C) Cuantificación del número promedio de ramifications (B) y túbulos (C) generados al incubar con medio basal (A). Los valores corresponden al promedio por campo para cada condición \pm SD, n=6. Se indica para cada caso el número identificador del donante (Ctrl #1 y #2; SZP #2, #3, #4 y #6). (D-E) Los gráficos muestran la razón entre el número promedio de ramifications (D) y túbulos (E) generados al estimular con VEGFA respecto al medio basal, para dos BEC Ctrl y cuatro BEC SZP. * $p < 0.05$, según test de t para datos anidados. (F) Cuantificación mediante qPCR de los niveles de mRNA de *FLT-1*, *KDR*, *NRP-1* y *NRP2*, correspondientes a las muestras de BEC SZP ensayadas en (A). Los niveles se expresan como la cantidad de mRNA relativos a los niveles de B2M (gen *housekeeping*) y son graficados como el promedio \pm SD; los datos se encuentran normalizados con respecto a los niveles de las muestras BEC Ctrl, por lo que se presenta una línea segmentada en el valor 1.

20E). Al analizar la expresión de receptores de VEGFA (FLT-1 y KDR) y de co-receptores (NRP1 y NRP2) en las BEC SZP, notamos que, si bien, no existe un único receptor que esté significativamente alterado en todas las muestras, cada una presenta desbalances en la expresión de uno o más de estos receptores (Figura 20F). Además, se comprueba que aquellas líneas que poseen una expresión de receptores de VEGFA, que en su conjunto es similar a la de BEC Ctrl (cerca de 1), poseen mayor formación de ramificaciones y túbulos en respuesta a VEGFA (Figura 20F).

La diferencia observada en la capacidad responsiva de BEC SZP frente a VEGFA, podría tener un efecto sinérgico con lo observado en las NSC.

VI. DISCUSIÓN

Con el objetivo de satisfacer sus necesidades energéticas, el cerebro requiere una gran y eficiente vascularización. La vasculatura cerebral es altamente especializada y se constituye en la BHE, la cual involucra no solo la participación de BEC sino de pericitos, lámina basal, astrocitos, microglía y neuronas ^{9,121}. Esta estructura es organizada y formada durante el desarrollo del cerebro por una combinación de señales del tubo neural y las BEC, reclutadas en el nicho neurovascular^{1,121}.

1. Las NSC son reguladoras claves de la angiogénesis

En etapas tempranas del desarrollo, el epitelio neural está compuesto de NSC, a partir de las cuales derivan las NPC y todas las células del linaje neural. Por lo tanto, en un comienzo, el nicho neurovascular depende exclusivamente de una comunicación entre NSC y BEC. La vasculogénesis del cerebro en desarrollo comienza cuando las NSC reclutan angioblastos y BEC para formar el PNVP (o PCAP), donde VEGFA es la principal señal involucrada en este proceso^{3,123}. En esta tesis, se muestra que las NSC derivadas de hiPSC no sólo producen VEGFA, sino que secretan un amplio espectro de otros factores angiogénicos clásicos, los cuales participan en diferentes aspectos de la angiogénesis (Tabla1). Esto sugiere que las NSC no sólo pueden regular el reclutamiento de las BEC para promover la vasculogénesis y la angiogénesis, sino que son participantes activos en la remodelación de los vasos y su mantención. Sumado a lo anterior, otras células del linaje neural como NPC y astrocitos también secretan un variado perfil de moléculas angiogénicas (Figuras 8 y 9). Los perfiles de secreción de estos últimos tipos

celulares varían respecto a las NSC y dan cuenta de su función especializada dentro del nicho neurovascular. Por ejemplo, el secretoma de los astrocitos tiende a tener una mayor presencia de moléculas anti-angiogénicas, lo que se relaciona con la mantención de la BHE. Debido a que la angiogénesis es un proceso plástico, las NSC pueden estar modulando la formación de vasos en congruencia espaciotemporal con la neurogénesis y desarrollo cerebral.

La mayoría de las proteínas angiogénicas secretadas por las NSC tienen impacto sobre variadas funciones dentro del sistema nervioso, tales como, la neurogénesis, la proliferación y migración de NSC, la neuroprotección y la sobrevivencia (Tabla 1). Debido a esto, y al hecho de que forman parte del mismo nicho neurovascular, es posible considerar que todas estas proteínas angiogénicas clásicas tienen una doble función durante el desarrollo del cerebro y que deben considerarse factores neuroangiogénicos. Estos resultados permiten reforzar que no sólo existe una relación intrincada e indispensable entre NSC y la vasculatura en desarrollo, sino también la presencia de mecanismos moleculares comunes que regulan el cableado tanto de los vasos sanguíneos y como de los nervios.

2. La vía de señalización de VEGFA está desregulada en SZP

Existe una creciente evidencia tanto clínica como científica que describe que, en al menos en un subconjunto de individuos con esquizofrenia, ocurre una disfunción vascular-endotelial. Sin embargo, hasta la fecha, esta hipótesis no se ha validado experimentalmente en el contexto de la embriogénesis ni se ha relacionado con un

establecimiento deficiente del nicho neurovascular durante el desarrollo temprano del cerebro en estos pacientes.

Al evaluar las diferencias entre las secreciones de proteínas angiogénicas de NSC SZP y Ctrl, se encontró una disminución en la presencia de factores tanto pro como anti-angiogénicos (Figura 7). Dentro de estos factores, se encuentra VEGFA, el cual es un regulador maestro de la angiogénesis y es la primera molécula descrita como una señal pro-angiogénica derivada del tubo neural, y muchas otras moléculas relacionadas con esta vía. Actualmente, VEGFA sigue siendo el factor más influyente en la vascularización embrionaria y en los procesos angiogénicos en general ^{3,20,123,124}. Se ha reportado anteriormente que los niveles plasmáticos de VEGFA en esquizofrénicos adultos y el mRNA de VEGFA en cerebros post mortem de esquizofrénicos, se encuentran reducidos con respecto a individuos sanos ⁴⁴⁻⁴⁶. De manera concordante con lo descrito en la literatura, en esta tesis, se encontró que tanto la expresión como secreción de VEGFA estaba reducida en NSC SZP con respecto a las NSC Ctrl (Figura 7B). Más allá de las diferencias en expresión entre sujetos esquizofrénicos y controles, se ha reportado en la literatura que la aplicación de algún tratamiento para la enfermedad (farmacológico o terapia electroconvulsiva) aumenta los niveles de plasmáticos de VEGFA ^{44,125,126}. Más aún, un trabajo que incluye 118 pacientes encontró diferencias significativas en los niveles plasmáticos basales de VEGFA entre pacientes que respondían o no al tratamiento antipsicótico, sugiriendo que los niveles serológicos altos de VEGFA podrían ser predictivos para la respuesta a tratamiento⁴⁶. En concordancia con lo anterior,

pareciese haber una correlación entre los niveles de VEGFA y la severidad de los síntomas negativos ¹²⁶, y existir una “gradiente” de expresión, siendo más baja para aquellos pacientes resistentes al tratamiento (con remisión de síntomas), mayor en los tratados que no remiten y normal/alta en los sujetos sanos ¹²⁷. Inclusive, se han encontrado loci, correspondientes a SNPs, asociados a esquizofrenia en el gen de VEGFA, aunque sin significancia a escala genómica¹²⁸. Pese a lo anterior, al analizar la presencia de dichos SNPs en distintos sujetos esquizofrénicos se encuentra que la presencia de uno de ellos es “protectora” para el desarrollo de síntomas positivos como alucinaciones¹²⁸. Respecto a los donantes de las células usadas en esta tesis, desconocemos la presencia de SNPs en el gen de VEGFA. Sin embargo, dada la sintomatología reportada y la historia clínica, que indica alta presencia de síntomas positivos con recurrencia, es plausible que dichos pacientes no posean este SNP protector y que la disminución en los niveles de VEGFA vaya en concordancia con lo descrito en la literatura, ubicándose en el grupo de pacientes con bajos niveles basales de VEGFA y que muestran resistencia al tratamiento. Interesantemente, se ha sugerido una asociación entre la disminución de VEGFA y la aparición de sintomatología psicótica, a raíz de la observación de efectos adversos a la medicación, la cual tendría efectos bloqueantes sobre la vía de señalización de VEGFA ^{129,130}. Desde una perspectiva terapéutica, se ha reportado un rol de VEGFA como tratamiento antidepresivo ^{131,132}. En este contexto, el uso de NSC derivado de hiPSC para el estudio de SZP, puede servir como modelo para el estudio de variantes de VEGFA, su

efecto predictor ante el tratamiento y respuesta frente a una medicación que aborde esta desregulación.

Sumado a la disminución en los niveles de VEGFA, se encontró en este trabajo una reducción en la expresión de receptores de VEGFA, *KDR* y *NRP1*, en NSC SZP (Figura 7C), concordante a la disminución de *KDR* encontrada en cortezas prefrontales post mortem de esquizofrénicos ⁴⁷. Esta alteración en los niveles de receptores de VEGFA no sólo se observó en NSC sino también en BEC, las que si bien, no expresan de manera significativamente alterada un solo receptor, presentan variaciones en los niveles de todos ellos, observándose una disminución en los niveles de *KDR* en 3 de las 4 líneas evaluadas (Figura 20F). Pese a esto, al ensayar la respuesta funcional de estas líneas frente a la estimulación con VEGFA, las BEC SZP responden con una menor formación de túbulos y ramificaciones, lo que podría tener una causa en la desregulación de no sólo un receptor, sino que en la sumatoria de todos los receptores y últimamente, el *output* funcional disminuido (Figura 20 D-F). Estos resultados nos sugieren la posibilidad de un efecto sinérgico entre la escasa producción de VEGFA de las NSC y la baja respuesta de BEC frente a ella, ergo, una señalización VEGFA disminuida en el nicho neuroangiogénico, que podría tener profundas consecuencias en el establecimiento de la NVU. Dicho efecto podría ser abordado utilizando las células derivadas de hiPSC en el modelamiento *in vitro* de la NVU, utilizando co-cultivos que nos permitan recrear el ambiente molecular del nicho y evaluar sus efectos en procesos como la angiogénesis, BHE, neurogénesis, entre otros.

Otras proteínas relacionadas con la vía de señalización de VEGFA también se encontraron desreguladas. Entre ellas se encuentra la angiogenina, la cual está disminuida en los MC de NSC SZP. Angiogenina participa en varios aspectos de la angiogénesis como por ejemplo en el cierre de heridas al aumentar la transcripción de rRNA ⁷², pero también se ha informado que es secretada por las neuronas y media la protección de las neuronas motoras a través de los astrocitos ⁷³. Más específicamente, la angiogenina parece estar involucrada en el desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Parkinson^{133,134}. La transcripción de rRNA dependiente de angiogenina es fundamental para la señalización de VEGFA, por lo tanto, su disminución puede actuar de forma sinérgica y, además, podría explicar la disminución de otros factores angiogénicos ¹³⁵. Del mismo modo, PDGF-AA, que promueve la expresión de VEGFA ⁹⁰, y uPA, una molécula río abajo de VEGFA que inicia la angiogénesis al aumentar la permeabilidad vascular¹³⁶, también están disminuidas en el MC de NSC SZP. No obstante, encontramos que los niveles de IGFBP-2, que promueve la producción y secreción de VEGFA ⁸², estaba aumentado en SZP NSC CM. Si bien proponemos que IGFBP-2 actúa como un mecanismo compensatorio tanto para la angiogénesis como para la neurogénesis, esta aparente disparidad debe aclararse mediante estudios adicionales. De forma contraria a lo observado en NSC, IGFBP-2 se encuentra disminuido en el secretoma de BEC SZP.

De todas las moléculas evaluadas, pareciese ser que uPA es la única disminuida de manera consistente en el nicho neurovascular esquizofrénico, puesto que se

encuentra significativamente reducida en los MC de NSC, NPC y BEC SZP. uPA, primeramente descrito en esta tesis como un nuevo e interesante candidato diferencialmente expresado en SZP, participa de la angiogénesis inducida por VEGFA, permitiendo la acción de metaloproteinasas de matriz extracelular, aumentando la degradación de VE-Cadh y asociándose con integrinas, de esta manera favorece la migración y proliferación de las células endoteliales¹³⁶. Se ha descrito que VEGFA tiene un sitio de corte para uPA, y que el procesamiento de VEGFA₁₈₆ por uPA es necesario para su difusión al medio extracelular y la proliferación mediada por KDR ^{137,138}. Junto con lo anterior, uPA promueve la expresión de los recetores de VEGFA ¹³⁹. Además de su rol en angiogénesis, se ha descrito que uPA y su receptor uPAR son indispensables durante el desarrollo del SNC, promoviendo la migración neuronal y la neuritogénesis, a través del desencadenamiento de cambios proteolíticos y no proteolíticos ⁹⁸. uPA induce la reparación neuronal luego del daño cerebral tal como evento isquémico o estatus epiléptico, actuando como neuroprotector ^{140,141}. Más aún, en un modelo murino de epilepsia, la deficiencia de uPA disminuye el número de nuevas neuronas luego del daño, no afectando el largo ni la densidad de los vasos, sugiriendo que su incremento posee un rol neuroprotector ¹⁴². Estos antecedentes indican que la disminución de uPA en el nicho neurovascular puede tener impactos durante el desarrollo embrionario como en la respuesta al daño durante periodos postnatales.

SEMA3A es una de las moléculas de la familia de las semaforinas con importantes funciones en guía axonal y formación de la vasculatura periférica. Dentro de sus

receptores se encuentran las neuropilinas (Nrp1 y Nrp2) que pueden también actuar como co-receptores de VEGFA ¹⁴³. Se ha reportado que SEMA3A se sobreexpresa en cerebelos de esquizofrénicos y cortezas prefrontales post mortem ^{49,144}. Estas observaciones están relacionadas con deficiencias en la neuroplasticidad y la migración de neuronas en sujetos esquizofrénicos. Encontramos que la expresión y secreción de SEMA3A está aumentada en NSC SZP, de manera concordante a lo descrito en adultos esquizofrénicos.

Otras moléculas que a la fecha no tienen una vinculación directa con la vía de señalización de VEGFA también se encontraron alteradas. Dentro de estas están IGBP3 y Endostatin, para las que se ha descrito una relación con la supervivencia y/o proliferación de las células endoteliales y que tienen funciones dentro del sistema nervioso como proliferación de NPC, crecimiento de neuritas y migración neuronal^{84,85,102,103}, por lo que su desregulación en SZP NSC probablemente contribuya al deterioro del nicho neurovascular. Sin duda, investigar el papel que pueden cumplir estas proteínas, y su señalización río abajo, se vuelve un objetivo atractivo a explorar en el futuro.

3. Inducción disfuncional de la angiogénesis en SZP

La vascularización del cerebro es un fenómeno dinámico, el cual comienza cuando, alrededor de la semana 6-7 de gestación, células endoteliales y precursores endoteliales son reclutados hacia el neuroepitelio, adhiriéndose a este para formar el PNVP (o PCAP) ^{1,2}. Una vez que el PNVP esté formado, a partir de la semana 8 de gestación, los procesos de angiogénesis y ramificación de vasos van a permitir la formación e invasión de vasos

al cerebro embrionario, permitiendo el desarrollo de la microvasculatura cerebral y la BHE¹⁴⁵. De manera paralela a estos procesos, las NSC del tubo neural sufrirán neurogenesis y gliogénesis ^{1,2}. Los componentes celulares, moleculares y estructurales que acompañan estos procesos, se conocen como nicho neurovascular y su establecimiento durante el desarrollo permite la adecuada estructuración de la NVU ⁴.

Debido a la desregulación de las señales angiogénicas producidas por el secretoma de NSC y otras células del linaje neural provenientes de SZP, se examinó su efecto en la formación de vasos. Dada la complejidad y el dinamismo del proceso de formación de vasos, para su análisis, se determinó dividirlo en tres partes: la vascularización temprana (reclutamiento de células endoteliales al tubo neural), la formación de estructuras capilares y la angiogénesis propiamente tal (ensayo CAM).

En esta tesis se utilizó un modelo tridimensional, cultivando las NSC como Nsp en suspensión y luego agregando células endoteliales (HUVEC), para evaluar la efectividad de las NSC SZP y Ctrl en el reclutamiento de células endoteliales y su adhesión a la periferia de Nsp. Este tipo de aproximación permite emular esta etapa temprana de la formación de PNVP en la cual las células endoteliales se adhieren desde “afuera” y luego migran “hacia adentro” del tubo neural ⁷⁰. De manera similar a lo reportado en modelos similares con tejido murino, las células endoteliales se adhieren en un gran porcentaje a las Nsp formadas por NSC. Al comparar este ensayo cuando se utilizan Nsp SZP respecto a Nsp Ctrl, los resultados indican que un menor porcentaje de células endoteliales se adhiere a las Nsp SZP (un 17% menos que a las Nsp Ctrl, Figura 10E).

Estudios han mostrado que las BEC expresan un repertorio limitado de integrinas, las que incluyen las integrinas $\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$ y la integrina $\alpha V\beta 3$ las que le permiten adherirse y migrar por la MEC secretada por las NSC^{146,147}. Modelos tridimensionales de vascularización *in vitro* han demostrado que la presencia de integrina $\alpha 5\beta 1$ es importante para el proceso de adhesión de células endoteliales a las Nsp, por lo que se presupone que la matriz de fibronectina jugaría un rol fundamental en este proceso⁷⁰. Desconocemos la expresión de fibronectina por parte de las NSC SZP, lo cual sería relevante para explicar el resultado de este experimento. Sin embargo, la evaluación del secretoma de las NSC revela que dentro de las moléculas angiogénicas con mayor representación se encuentran moléculas relacionadas con la MEC, tales como TIMP-1, uPA y PAI1, de las cuales sólo uPA se encuentra disminuida en NSC SZP. Junto con lo anterior, se ha descrito que NTN1, una proteína quimiotáctica de la superfamilia de las lamininas, aumenta la adhesión a fibronectina mediante su interacción con integrina $\alpha V\beta 3$ ¹⁴⁸, por lo que su disminución en NSC SZP podría afectar este proceso.

La vascularización temprana, que comienza con el reclutamiento de células endoteliales y angioblastos a la vecindad del tubo neural y termina con la formación del PVPN, depende de la señalización de VEGFA⁶. VEGFA es la principal señal migratoria proveniente del tubo neural y su deficiencia no permite la formación de plexos vasculares⁶. VEGFA media diversos procesos angiogénicos, incluyendo la adhesión, mediante su interacción directa (o mediante su receptor) con integrinas y otras moléculas de adhesión focal^{137,149}. Más aún, se ha descrito que la estimulación con

VEGFA aumenta rápidamente la expresión y activación de integrina $\alpha 6\beta 1$ en células endoteliales cerebrales (HMBEC), favoreciendo su adhesión a laminina¹⁵⁰. Si bien esta última participaría más bien en fenotipos de estabilización de los vasos y no en adhesión temprana, no es posible descartar que los resultados observados se deban, total o parcialmente, a la deficiencia en la secreción de VEGFA de las Nsp SZP. Por tanto, se requeriría analizar los efectos de VEGFA en el proceso de adhesión ya sea por la suplementación de este factor a las Nsp SZP o por el uso de anticuerpos bloqueantes y/o siRNA en Nsp Ctrl.

Para el experimento realizado en esta tesis se utilizaron HUVEC con el objetivo de uniformar el componente endotelial y evaluar sólo la diferencia a nivel del linaje neural, por lo que las diferencias observadas se deben únicamente a deficiencias en las Nsp SZP o diferencias en las HUVEC debido a una diferente inducción de receptores de adhesión por parte de las Nsp SZP. De manera independiente a este ensayo, se midieron los niveles de mRNA de integrina $\alpha 5$ en BEC derivadas de hiPSC (ANEXO4, Figura S6), la cual se expresa en niveles variables en las distintas líneas, sin evidenciarse una desregulación clara entre las líneas de BEC Ctrl y BEC SZP. Por tanto, sería interesante evaluar el efecto intrínseco de las BEC SZP en este proceso y la evaluación de otras moléculas relacionadas con adhesión.

Seguido del ensayo de adhesión a Nsp se evaluó la inducción de estructuras “tipo capilar” por parte de los secretomas de células de linaje neural en un ensayo de angiogénesis *in vitro*. El MC de NSC SZP indujo en menor medida la migración y formación

de estructuras tubulares (Figura 11). Se encontró que varios factores angiogénicos relacionados con la migración de las células endoteliales, junto con moléculas neuroangiogénicas no canónicas, estaban desregulados en NSC SZP. La disminución en Angiogenina, uPA y VEGFA, por ejemplo, afecta la migración endotelial (Tabla 1). Los factores angiogénicos no canónicos actúan predominantemente como agentes quimioatrayentes o repelentes, promoviendo (o inhibiendo) la migración de EC y, por lo tanto, la angiogénesis ¹. La proteína EFNA1, que actúa como pro-angiogénica, se encontró disminuido en NSC SZP, mientras que SEMA-3A, que es anti-angiogénica, estaba aumentada en NSC SZP, por lo que, en conjunto, reducirían la migración y la formación de tubos de las HUVEC (Figura 7 y 10). Trabajos anteriores han demostrado que NTN1 actúa como una molécula pro o anti-angiogénica dependiendo de su nivel de expresión y su unión a receptores de la familia DCC/NEO1 o UNC5 ¹⁵¹. Por lo tanto, la disminución de NTN1 podría tener un impacto positivo o negativo en la angiogénesis, dependiendo de la concentración y la presencia de receptores, un asunto que requiere más investigación.

Se ha descrito que las NSC promueven la formación de túbulos en BEC mediante un mecanismo que involucra óxido nítrico (NO) y ha sido ampliamente observado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) promueven la angiogénesis ^{14,152}. Curiosamente, en esquizofrenia se ha descrito un aumento de NO y ROS, asociado a daño neuronal por estrés oxidativo ^{153,154}. Esta aparente contradicción podría deberse en parte a que la activación de angiogénesis por parte de ROS por lo general depende de VEGFA, el que se

encuentra alterado en esquizofrenia, o bien a la dualidad de la señalización de ROS, los cuales pueden promover la angiogénesis cuando se presentan en niveles balanceados o disminuirla cuando existe estrés oxidativo ¹⁵⁵.

A modo de emular el desarrollo embrionario, en el cual los procesos angiogénicos se producen a la par de la neurogénesis, se evaluó también la formación de túbulos y ramificaciones al incubar con MC proveniente de neuroesferas (las cuales contienen, NSC y precursores neuronales y gliales), NPC y astrocitos. En el caso de los MC de Nsp se observaron resultados similares a las NSC solo que con un menor poder angiogénico. En cambio, al incubar con MC de NPC SZP y Astrocitos SZP se observó una disminución en el número de ramificaciones, mas no de túbulos (Figura 14 y 15). Nuestros resultados indican que el perfil de moléculas angiogénicas cambia cuando las NSC se someten a estímulos de diferenciación, y esta diferencia en la generación de túbulos y ramificaciones puede ser indicativo de que estos secretomas presentan mayores alteraciones en moléculas quimiotácticas, las que participan en la migración, que en moléculas que permiten la formación de estructuras tubulares, como lo es VEGFA. De hecho, los niveles de VEGFA en el MC de NPC y Astrocitos son relativamente bajos y no presentan diferencias entre Ctrl y SZP; en tanto que moléculas neuro-angogénicas como SLIT2, EFNA1 y SEMA3A se encuentran desreguladas en NPC SZP (Figura 9). Por el contrario, los MC de Nsp SZP presentan menores niveles de VEGFA y al utilizar un inhibidor (bevacizumab) disminuye el número de túbulos más no de ramificaciones. Estos resultados indican que existe una diferencia en la formación de estructuras

capilares, la cual se afecta en distintos niveles por los componentes celulares que participan y su perfil angiogénico específico.

Para evaluar la complejidad de la angiogénesis y la remodelación de los vasos más allá de la migración de las células endoteliales y la formación de estructuras tubulares *in vitro*, investigamos la inducción de la angiogénesis *in vivo* utilizando un ensayo CAM (Figura 13). A diferencia del MC de NSC Ctrl, el MC de NSC SZP no aumentó de forma significativa la formación de nuevos vasos. Concordantemente, moléculas importantes para la remodelación de los vasos y la angiogénesis, como Ang-1, IGBP-3, uPA, VEGFA, Endostatina y PEDF estaban disminuidas en el MC de NSC SZP (Figura 7 y 13). Como se discutió anteriormente, la señalización de VEGFA se ve afectada de manera importante en SZP, para lo cual evaluamos la contribución de VEGFA en la inducción de angiogénesis de NSC Ctrl usando el inhibidor específico bevacizumab, tanto *in vitro* como *in vivo*. A pesar del desequilibrio evidente de otros factores angiogénicos, los resultados indican que VEGFA es un contribuyente importante en la angiogénesis inducida por NSC y su disminución en SZP NSC resulta en una importante disminución de la angiogénesis en general.

De manera adicional a las diferencias en el número de vasos, se observó que el MC de NSC SZP y el MC de Astrocitos SZP induce la formación de un mayor número de vasos de menor diámetro. Es más, el MC de NSC Ctrl genera más vasos de mayor diámetro que el medio de cultivo. Los mecanismos asociados al calibre de los vasos no se encuentran del todo estudiados, sin embargo, es sabido que el calibre de los vasos

tiene un impacto directo en el flujo sanguíneo. Pese a eso, el impacto del calibre de la microvasculatura sobre el flujo general del cerebro todavía permanece en discusión⁴. Si bien a la fecha no existe evidencia de vasos de menor calibre en los cerebros esquizofrénicos adultos, está ampliamente reportada la existencia de anomalías en la microvasculatura y la hipoperfusión en ciertas zonas del cerebro, la cual podría, a su vez, estar relacionada con la severidad de los síntomas ⁴¹. Nuestros datos permiten sugerir que estas últimas podrían, al menos en parte, deberse a una menor maduración y estabilización de los vasos sanguíneos durante el desarrollo.

Se ha descrito que las distintas isoformas de VEGFA se asocian a distintos fenotipos vasculares: isoformas de VEGFA de menor tamaño, como VEGFA₁₂₀, se asocian a la formación de vasos de mayor calibre, mientras que isoformas de mayor tamaño, como VEGFA₁₈₈, forman vasos de menor calibre y favorecen la ramificación ¹²⁴. El MC de NSC Ctrl forma vasos de mayor calibre que el uso de un recombinante de VEGFA de alto peso (VEGFA₁₆₅), el cual forma vasos de calibre similar al medio de cultivo y al MC de NSC SZP (ANEXO 3 Figura S5). Esto nos permite suponer que los MC de NSC Ctrl son ricos en isoformas de VEGFA₁₂₀, mientras que el MC de NSC SZP además de tener menores niveles de VEGFA podría estar enriquecido en isoformas más pesadas. La disminución en los niveles de uPA, el cual participa en el procesamiento proteolítico de VEGFA, en el MC de NSC SZP podría en parte explicar este fenómeno. Sin embargo, es necesario un estudio más exhaustivo de las isoformas de VEGFA presentes en estos MC para evaluar su contribución en este proceso.

La diferenciación y migración de las células neurales durante la neurogénesis, depende de la regulación provista por los vasos que se forman tempranamente y otorgan factores tróficos, como parte del nicho neurovascular. Una inducción deficiente de la angiogénesis altera estos procesos durante el desarrollo embrionario, lo que podría contribuir al desencadenamiento de la esquizofrenia.

4. Alteración endotelial y BHE

Tal como ya ha sido discutido, el ingreso de vasos al cerebro depende en un comienzo de señales derivadas del tubo neural, en particular de las NSC que residen allí. Posteriormente, la angiogénesis va a depender de señales derivadas no sólo de las NSC sino de NPC, precursores gliales, neuronas y glías, junto con señales autocrinas y elementos de matriz presentes en el nicho neurovascular. Por otro lado, los vasos en formación y las células endoteliales que los componen, proveerán al tejido neural en desarrollo de factores tróficos necesarios para la neurogénesis, gliogénesis y mantención de nichos troncales^{1,9}. Es por esto, que debe considerarse que el desarrollo del cerebro, que normalmente se describe como procesos de neurogénesis, sinaptogénesis y conectividad, viene acompañado, e incluso precedido, de una remodelación vascular importante⁴¹.

Diversa evidencia clínica y metagenómica ha indicado que existen desregulaciones en la esquizofrenia asociadas a la microvasculatura y la BHE ^{41,43}. Es por ello, que en esta tesis se pretendió evaluar si es que BEC derivadas de SZP poseían

diferencias transcriptómicas y funcionales asociadas a los procesos angiogénicos y de BHE.

Desde el punto de vista angiogénico, se evaluó la expresión de receptores y coreceptores de VEGFA (FLT1, KDR, NRP1 y NRP2) los cuales se expresaban con variabilidad en las distintas líneas de BEC SZP, mas, ninguno de ellos en particular se encontró significativamente alterado en todas las BEC SZP respecto a las BEC Ctrl (Figura 18). A pesar de lo anterior, al evaluar la respuesta angiogénica de las BEC frente a la estimulación con VEGFA, en un ensayo de formación de túbulos y ramificaciones, se observó que las BEC SZP generan una menor respuesta (Figura 20). Al observar las expresiones de los receptores por línea, es decir, por donante, se comprobó que existían deficiencias en la expresión de uno o más receptores y coreceptores de VEGFA en cada una de las líneas. En el análisis de componentes principales de las variaciones de expresión de estos y otros genes, se observó que las BEC Ctrl se excluyen de las BEC SZP, indicando que existen perfiles de expresión distintivos para estos dos grupos. Pese a ello, sigue existiendo una gran dispersión en las BEC SZP respecto a los niveles de expresión de distintos genes (Figura 18K, ANEXO 4 Figura S7). Dadas estas diferencias de expresión podemos presuponer que los distintos donantes poseen alteraciones genéticas distintas que, sin embargo, confluyen en una misma deficiencia funcional, que es la señalización angiogénica mediada por VEGFA.

El desarrollo embrionario ocurre como un escenario dinámico en el cual el crecimiento de los tejidos, a medida que se alcanza el límite de difusión de O₂, debe ir

acompañado del desarrollo de vasos sanguíneos, lo cual ocurre, como ya ha sido discutido, mediante la señalización de VEGFA. La hipoxia es, por tanto, uno de los principales reguladores transcripcionales de VEGFA. La vía de HIF, la más relevante mediadora de las respuestas de hipoxia, que promueve adaptaciones tanto a corto como a largo plazo, regula la expresión y funcionamiento de diversas moléculas angiogénicas y metabólicas, tales como NO, GLUT1, VEGF, ANG1, ANG2, Tie2, PDGF, bFGF y MCP-1, los cuales son solo unos de los cientos de genes regulables por HIF¹⁵⁶.

La suficiencia o falta de O₂ resulta en la proteólisis o acumulación de HIF α , respectivamente. La acumulación de HIF α permite su dimerización con ARNT (HIF β), su traslocación al núcleo y la transcripción de sus genes blanco¹⁵⁷. Se ha descrito en análisis metagenómicos que en la esquizofrenia existe una sobreexpresión de muchos blancos de la vía HIF y otros genes ligados a hipoxia^{158,159}. Es más, un análisis de metilación MWAS arrojó que varios componentes de la vía HIF se encuentran hipermetilados en esquizofrenia¹⁶⁰. En esta tesis, se observó que los niveles de mRNA de *HIF1A* se encuentran significativamente elevados en las BEC SZP respecto a las BEC Ctrl (Figura 18). La transcripción de HIF1A depende directamente del factor NF- κ B, el que se ha encontrado, junto con otras citoquinas reguladas por el mismo, aumentado en esquizofrenia^{161–163}. Además, se ha reportado que el promotor de HIF1A tiene un elemento de respuesta a hipoxia (HRE), el que normalmente se encuentra metilado, sin embargo, en cáncer de colon está aberrantemente desmetilado, lo que permite una autorregulación positiva¹⁶⁴. Se hace necesario conocer, por tanto, los niveles de NF- κ B y

estado de metilación del promotor, que podrían estar afectando los niveles del transcrito en estas líneas, además de los niveles proteicos de HIF1A y ARNT para establecer la funcionalidad de este aumento en el transcrito. Cabe destacar que se genera una paradoja entre los niveles elevados del transcrito de HIF1A (y de NF- κ B, según lo descrito en la literatura) con una disminución en genes blanco de esta vía asociados a angiogénesis como VEGFA y GLUT-1. Las células fueron cultivadas bajo las mismas concentraciones de oxígeno, por tanto, el aumento de HIF1A pareciese ser una condición intrínseca de la esquizofrenia y no radicar en factores ambientales del proceso de cultivo. Lo anterior, también se sustenta en lo encontrado en pacientes (aumento en la expresión de genes ligados a hipoxia con bajos niveles de VEGFA). Pareciese entonces, que existe un desacoplamiento entre estas dos vías, lo cual podría tener una explicación en la regulación traduccional de HIF1A, en modificaciones genéticas o epigenéticas de los promotores de dichos genes o en la alteración de otras vías que confluyen con esta.

Existe una creciente evidencia clínica y experimental que propone que en sujetos con esquizofrenia podría existir una hiperpermeabilidad en la BHE, la cual se encuentra principalmente fundamentada en una neuroinflamación y aumento del estrés oxidativo presente en la enfermedad ¹⁶⁵. Por esto, se evaluó en BEC SZP la expresión de genes clásicos que participan en la funcionalidad de la BHE, tales como son las proteínas de unión estrecha (CLN5, OCLN, ZO-1), transportadores de eflujo (Pgp) y transportadores metabólicos (GLUT1).

Las alteraciones en los niveles de CLN5 han sido reportadas en la corteza prefrontal de cerebros *post-mortem* en pacientes esquizofrénicos, estando aumentada su expresión a nivel de mRNA y disminuida a nivel de proteína, comparada con sujetos controles ¹⁶⁶. Más aún, ciertos casos de esquizofrenia se han asociado a deleciones en el cromosoma 22, en la región 22q11, zona en la que se ubica el gen de CLN5. Un estudio ha identificado que las anormalidades genéticas encontradas en el gen de CLN5 en sujetos con deleciones en 22q11, se asocian a una disminución en la expresión de la molécula, a nivel de proteína, mas no de transcrito ¹⁶⁷. A diferencia de los sujetos de este último trabajo, los donantes de las células utilizadas en este trabajo no poseen la deleción 22q11 y los niveles de mRNA de CLN5 en las BEC SZP derivadas de dichas células presentan una gran variación, siendo en algunos casos mayores al control y en algunos casos similares, no encontrándose diferencias significativas entre el grupo BEC Ctrl y BEC SZP (Figura 18). Este resultado no descarta que puedan existir diferencias tanto en los niveles proteicos como en la distribución celular de CLN5 en estas líneas.

Respecto a OCLN, no existe evidencia que ligue su desregulación a la esquizofrenia. En esta tesis no se observaron diferencias significativas ni en los niveles de mRNA ni en su distribución celular entre BEC Ctrl y BEC SZP (Figura 18).

Por otro lado, se observó un aumento significativo en los niveles de mRNA de ZO-1 en BEC SZP, la cual, aparentemente, presenta una localización celular defectuosa (Figura 18). Al igual que con OCLN, no existen otros reportes que hayan observado desregulaciones a nivel de mRNA en ZO-1. Sin embargo, se ha descrito que para otras

dos proteínas que poseen dominios PDZ, al igual que ZO-1, la presencia de SNPs en dichos dominios se asocia a la esquizofrenia. Es más, el mRNA de dichas proteínas se encontró elevado en esquizofrenia y la presencia de SNPs en el dominio PDZ se asoció a defectos en su funcionalidad ^{168,169}. Cabría preguntarse si a pesar de estar aumentado el mRNA de ZO-1, podrían existir SNPs en su dominio PDZ que alteren su correcta localización en la membrana plasmática.

Cabe notar que en un subtipo particular de esquizofrenia llamada esquizofrenia de deficiencia (*Deficit schizophrenia*) existen procesos autoinmunes que se dirigen a las moléculas de uniones estrecha afectando la permeabilidad frente a bacterias en el tracto gastrointestinal y la permeabilidad de la BHE ¹⁷⁰. Se precisa más investigación para esclarecer si este corresponde a un subtipo definido o si bien es un extremo en un espectro de alteraciones inmunitarias e inflamatorias que confluyen, en mayor o menor grado, en la alteración de la BHE a través de defectos en las uniones estrechas.

Respecto a P-gp, se ha reportado a nivel funcional un aumento en su actividad en el cerebro de pacientes esquizofrénicos, lo que se ha relacionado, en esta y otras enfermedades del CNS, con un mecanismo de resistencia a drogas terapéuticas ^{171,172}. Los resultados de esta tesis no nos permiten sacar mayores conclusiones respecto a este transportador, dado que se encontró que en dos líneas de BEC SZP los niveles de mRNA eran considerablemente menores a las BEC Ctrl y en dos mayores (Figura 18). Conocer los niveles proteicos y su localización celular se hace necesario para ver la implicancia de P-gp en estas líneas.

Las BEC, a diferencia de células endoteliales periféricas y otro tipo de células, expresan un tipo particular de transportador de glucosa llamado GLUT-1, el cual no está regulado por insulina y permite el transporte continuo de glucosa al cerebro. Dos investigadores han propuesto, que algunos de los hallazgos clínicos de la esquizofrenia, incluyendo la pérdida de materia gris, baja actividad neuronal e hipoperfusión prefrontal, podrían ser explicados por una disminución de la expresión y/o actividad de GLUT-1, la cual podría explicar también la hiperglicemia observada en algunos pacientes ¹⁷³. En línea con esto, un estudio mostró una disminución en el transcrito de GLUT-1 en neuronas piramidales de pacientes con esquizofrenia¹⁷⁴. En esta tesis se identificó una disminución significativa en los niveles de GLUT-1 en BEC SZP (Figura 18), lo que implicaría una menor disponibilidad de glucosa hacia los derivados neurales. Cabe destacar que mutaciones en el gen de GLUT-1 (SCL2A1) pueden desencadenar la aparición de otra enfermedad del neurodesarrollo, la epilepsia ¹⁷⁵.

MMP9 es una metaloproteinasa de matriz que degrada material de matriz extracelular, factores de crecimiento y dominios extracelulares de proteínas transmembrana, tales como proteínas de adhesión celular y receptores de membrana. MMP9 está involucrada tanto en procesos de angiogénesis como, recientemente reportado, en plasticidad sináptica¹⁷⁶. El gen de MMP9 se encuentra codificado en la región 22q.11, cuya delección es el factor de riesgo más común en la esquizofrenia, además de interactuar directamente con otras proteínas ligadas a la esquizofrenia como BDNF o el receptor de NMDA ^{62,177}. Se ha ligado un polimorfismo presente en la región

regulatoria del gen MMP9, el cual altera su tasa de transcripción, con la esquizofrenia. En dos tipos de poblaciones diferentes (polaca y asiática) se han observado preponderancias de las formas menos y más activas respectivamente, tanto que en modelos animales se ha observado que ya sea el aumento o la disminución del transcrito generan deficiencias en la sinapsis neuronal¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Se ha observado en ratones mutantes, que frente al estrés oxidativo, se produce un aumento de MMP9 el cual pareciera ser clave para el aumento de NF-κB y la neuroinflamación¹⁸¹. A nivel proteico, se ha reportado que pacientes esquizofrénicos poseen mayores niveles plasmáticos de MMP9¹⁸²⁻¹⁸⁴. En línea con estas observaciones se encontró en esta tesis que los niveles de MMP9 en el secretoma de BEC SZP estaban significativamente elevados (Figura 19). Interesantemente, el MMP9 secretado por las células endoteliales en el cerebro, juega un rol importante no sólo en la promoción de la angiogénesis mediante el remodelamiento de la ME, sino que recluta NPC a sitios de inflamación y participa en el procesamiento proteolítico de VEGFA; su expresión reduce el reclutamiento de pericitos a las células endoteliales y lleva a la disrupción de la BHE^{124,145,185}. Por lo que su aumento en el nicho neurovascular podría tener efectos tanto para la integridad de la BHE como para la plasticidad sináptica.

Además de los defectos observados en BEC SZP, la desregulación del nicho neurovascular por parte de células del linaje neural también puede tener efectos sobre la formación y mantención de la BHE. En este sentido, se ha reportado ampliamente que las NSC y NPC derivados de hiPSC SZP expresan menores niveles de ligandos Wnt^{41,43,65},

los que participan en la especificación de características de barrera en las BEC⁹. También se ha demostrado que SEMA3A, la que se encontró aumentada en el MC de NSC y en NPC, aumenta la permeabilidad vascular en el cerebro, lo que sugiere que podría disminuir la función de la BHE¹⁸⁶.

Todos estos resultados indicarían que, tal como se ha reportado a nivel clínico en esquizofrenia, las líneas de BEC SZP utilizadas, poseen alteraciones a nivel vascular que se ven reflejadas tanto en su capacidad angiogénica como en el perfil de moléculas expresadas asociadas a inflamación, estrés oxidativo y disrupción de barrera.

5. Significancia biomédica

En general, los hallazgos de esta tesis favorecen la hipótesis prevalente de neurodesarrollo, que estipula que la presencia de defectos que contribuyen y/o desencadenan la enfermedad se encuentran presentes durante el desarrollo embrionario, mucho antes del inicio de los síntomas clínicos. Dada su interdependencia, se hace necesario estudiar no sólo los mecanismos que regulan la actividad neuronal, sino que el nicho neurovascular en su conjunto, para el desarrollo de herramientas terapéuticas para esta enfermedad. Aquí se han identificado diversas proteínas alteradas en los diferentes componentes del nicho neurovascular con efectos perjudiciales tanto para el correcto funcionamiento de la BHE como de la neurogénesis y actividad neuronal. Muchos de ellos también se han visto implicados en la respuesta al estrés oxidativo, daño e isquemia.

Los diferentes componentes celulares del nicho neurovascular analizados presentan desregulaciones en un sinnúmero de factores, algunos de estos factores se encuentran desregulados de forma significativa en todos los pacientes y otros no. Sin embargo, se observa en este estudio que todas esas desregulaciones en su conjunto confluyen en un impacto en la angiogénesis. La esquizofrenia es una enfermedad en la que muchos loci poco comunes contribuyen en gran manera al riesgo y muchos muy comunes en poco porcentaje³⁴. Dado el alto número de mutaciones y variantes presentes en estos pacientes, desconocemos el impacto que ellos tienen a nivel funcional, sobre todo en procesos no abordados tradicionalmente, como el angiogénico.

6. Células derivadas de hiPSC como modelo de desarrollo cerebral temprano en esquizofrenia

La obtención de muestras de células vivas del cerebro humano, especialmente durante el desarrollo, es limitada. No obstante, el uso de hiPSC en estudios de enfermedades complejas como la esquizofrenia, ha facilitado el camino para una mejor comprensión de los mecanismos celulares y moleculares implicados, principalmente, con la diferenciación y maduración neuronal^{61,62}. Aunque el potencial de hiPSC para generar modelos de enfermedades, es una tecnología poderosa, los procesos de diferenciación y la generación de co-cultivos tridimensionales que reflejen de mejor manera las dinámicas presentes en el desarrollo, son todavía elementos que están en continua generación y constante revisión⁵⁶.

La esquizofrenia es una enfermedad genéticamente compleja, que reúne a la fecha 108 loci asociados a esta, con menor o mayor penetrancia ^{30,34}. Pese a existir diversidad en las alteraciones genéticas en los distintos pacientes, muchas de ellas confluyen a un fenotipo común, el cual puede ser modelado mediante hiPSC. Las líneas derivadas de hiPSC usadas en esta tesis recapitulan, con sus respectivas limitaciones, hallazgos encontrados a nivel clínico en grandes cohortes de pacientes, tales como: disminución en VEGFA, disminución en KDR, aumento de SEMA3A, aumento en NRG1, disminución en GLUT1, aumento en MMP9. Sumado a observación en la alteración de otros factores relacionados con procesos alterados en esquizofrenia como: migración neuronal, maduración vascular, inflamación y alteración en la BHE. Esto revela la utilidad de usar un enfoque de células pluripotentes para modelar la esquizofrenia, pudiendo utilizarse para evaluar la desregulación en esta y otras vías en la búsqueda de una posible estrategia terapéutica. En este contexto, proponemos que las hiPSC podrían ser utilizadas para reconstruir la NVU de manera isogénica, permitiendo evaluar los defectos del nicho en la funcionalidad de la BHE *in vitro*⁵⁹.

Los resultados de esta tesis muestran una base celular para las alteraciones reportadas en la esquizofrenia a nivel de la microvasculatura, la NVU y la BHE ^{41,43}, poniendo un énfasis en la importancia del nicho neurovascular desde etapas tempranas del desarrollo, como sustento de la anatomía y funcionalidad adulta (Figura 21).

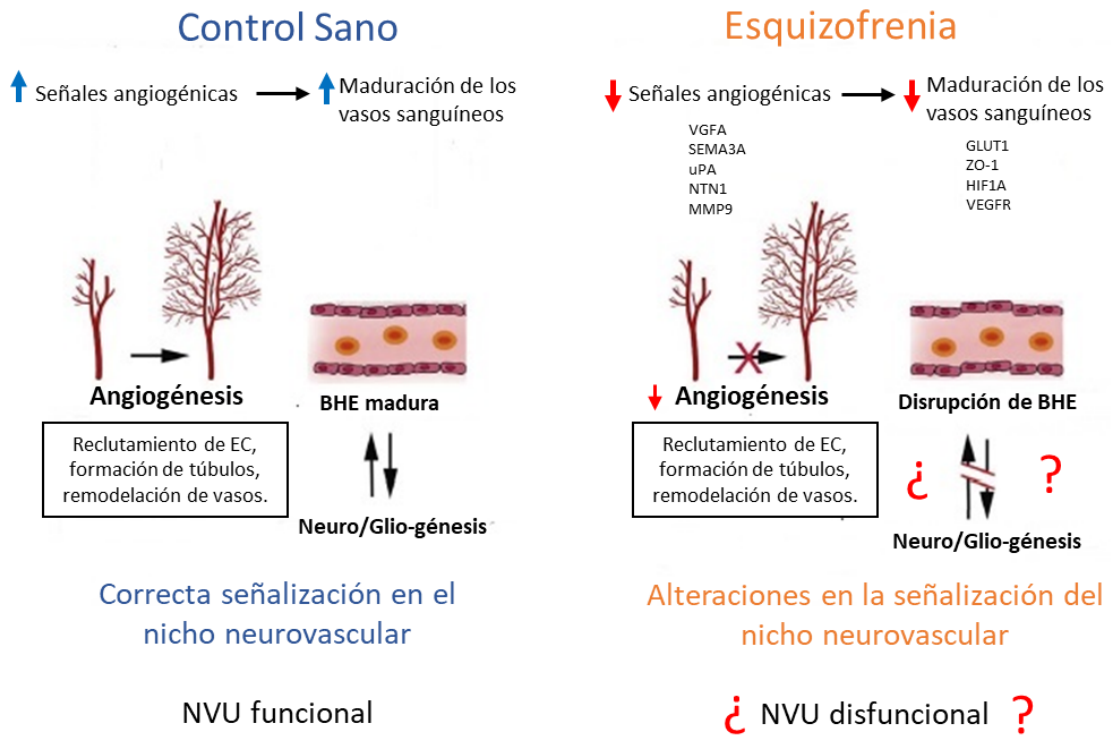


Figura 21. Posible desregulación en el nicho neurovascular en SZP durante el desarrollo cerebral. En condiciones normales (Control Sano) las señales angiogénicas derivadas de los tejidos neurales promueven la maduración de los vasos sanguíneos, a través de una correcta señalización en el nicho neurovascular que permite la estructuración de la NVU. Esto se refleja en un correcto reclutamiento de células endoteliales (EC) a la vecindad del tubo neural, una formación de estructuras tipo capilar o túbulos y la remodelación de los vasos. Además, dichas señales permiten la maduración de la BHE y la entrega de factores que promueven los procesos de neuro y glio-génesis. Los resultados de esta tesis indican que, en la esquizofrenia, los derivados neurales presentan una disminución en la señalización angiogénica (menor secreción de VEGFA, uPA, NTN1, aumento de SEMA3A), esto resulta en una menor inducción de la angiogénesis. Además, se observa una alteración en la expresión de proteínas esenciales para la funcionalidad de las BEC y la BHE (GLUT1, ZO-1, HIF1A y receptores de VEGFA). Por lo que se propone una posible disrupción de la BHE lo que podría afectar la neuro y/o glio-génesis y por consiguiente en la funcionalidad de la NVU. Modificado de ⁴¹.

VII. CONCLUSIONES

Como resultado de este trabajo se puede concluir, en primer lugar, que es posible observar diferencias entre células del linaje neural y endotelial, derivadas de hiPSC de donantes esquizofrénicos y controles, tanto a nivel molecular como funcional.

Las NSC SZP presentan deficiencias en la inducción de la angiogénesis tanto en el perfil de moléculas secretadas como a nivel funcional, mostrando un menor reclutamiento de células endoteliales a neuroesferas, una menor formación de estructuras capilares, una menor inducción de la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* y la formación de vasos de menor calibre. Se obtienen resultados similares con otras células diferenciadas a partir de NSC como Nsp, NPC y astrocitos.

Las BEC SZP poseen diferencias en la expresión y secreción de moléculas asociadas a su función angiogénica y de barrera.

La vía de señalización de VEGFA pareciese estar alterada en SZP, lo cual puede ser observado en una menor expresión de VEGFA y sus receptores en NSC; una menor respuesta angiogénica de las BEC SZP al ser estimuladas con VEGFA; y posiblemente en la formación de vasos de menor calibre en respuesta al MC de NSC y Astrocitos SZP.

El estudio de células derivadas de hiPSC SZP muestra hallazgos similares a lo encontrado en pacientes y alteraciones en vías que podrían estar actuando de forma sinérgica en el nicho neurovascular.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. James, J. M. & Mukoyama, Y. Neuronal action on the developing blood vessel pattern. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 1019–1027 (2011).
2. Marín-Padilla, M. The human brain intracerebral microvascular system: development and structure . *Frontiers in Neuroanatomy* vol. 6 38 (2012).
3. Risau, W. Developing brain produces an angiogenesis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 3855–3859 (1986).
4. Iadecola, C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* **96**, 17–42 (2017).
5. STRONG, L. H. THE EARLY EMBRYONIC PATTERN OF INTERNAL VASCULARIZATION OF THE MAMMALIAN CEREBRAL CORTEX. *J. Comp. Neurol.* **123**, 121–138 (1964).
6. Hogan, K. A., Ambler, C. A., Chapman, D. L. & Bautch, V. L. The neural tube patterns vessels developmentally using the VEGF signaling pathway. *Development* **131**, 1503 LP – 1513 (2004).
7. Paredes, I., Himmels, P. & Ruiz de Almodóvar, C. Neurovascular Communication during CNS Development. *Dev. Cell* **45**, 10–32 (2018).
8. Banerjee, S. & Bhat, M. A. Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**, 235–258 (2007).
9. Daneman, R. & Prat, A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a020412 (2015).
10. Blanchette, M. & Daneman, R. Formation and maintenance of the BBB. *Mech. Dev.* **138**, 8–16 (2015).
11. Grammas, P., Martinez, J. & Miller, B. Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert Rev. Mol. Med.* **13**, e19 (2011).
12. Tam, S. J. & Watts, R. J. Connecting Vascular and Nervous System Development: Angiogenesis and the Blood-Brain Barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* **33**, 379–408 (2010).
13. Serini, G. & Bussolino, F. Common Cues in Vascular and Axon Guidance.

Physiology **19**, 348–354 (2004).

14. Li, Q., Ford, M. C., Lavik, E. B. & Madri, J. A. Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: an in vitro study. *J. Neurosci. Res.* **84**, 1656–1668 (2006).
15. Patan, S. Vasculogenesis and Angiogenesis as Mechanisms of Vascular Network Formation, Growth and Remodeling. *J. Neurooncol.* **50**, 1–15 (2000).
16. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671–674 (1997).
17. Hanahan, D. Signaling Vascular Morphogenesis and Maintenance. *Science* (80-). **277**, 48 LP – 50 (1997).
18. Kolte, D., McClung, J. A. & Aronow, W. S. Chapter 6 - Vasculogenesis and Angiogenesis. in (eds. Aronow, W. S. & McClung, J. A. B. T.-T. R. in C. A. D.) 49–65 (Academic Press, 2016). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802385-3.00006-1>.
19. Gilbert, S. F. *Developmental Biology*. (Sinauer Associates, Inc., 2013).
20. Conway, E. M., Collen, D. & Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res.* **49**, 507–521 (2001).
21. Ramasamy, S. K., Kusumbe, A. P. & Adams, R. H. Regulation of tissue morphogenesis by endothelial cell-derived signals. *Trends Cell Biol.* **25**, 148–157 (2015).
22. Carmeliet, P. & Tessier-Lavigne, M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* **436**, 193–200 (2005).
23. Schizophrenia Spectrum and Other Psychotic Disorders. in *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (American Psychiatric Association, 2013). doi:[doi:10.1176/appi.books.9780890425596.dsm02](https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.dsm02).
24. Moskowitz, A. & Heim, G. Eugen Bleuler’s Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias (1911): A centenary appreciation and reconsideration. *Schizophr. Bull.* **37**, 471–479 (2011).
25. DSM-5 Diagnostic Classification. in *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (American Psychiatric Association, 2013). doi:[doi:10.1176/appi.books.9780890425596.x00DiagnosticClassification](https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.x00DiagnosticClassification).
26. Insel, T. R. Rethinking schizophrenia. *Nature* **468**, 187–193 (2010).

27. Selemon, L. D. & Zecevic, N. Schizophrenia: a tale of two critical periods for prefrontal cortical development. *Transl. Psychiatry* **5**, e623–e623 (2015).
28. Hilker, R. *et al.* Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register. *Biol. Psychiatry* **83**, 492–498 (2018).
29. Birnbaum, R. & Weinberger, D. R. Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 727–740 (2017).
30. Ripke, S. *et al.* Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**, 421–427 (2014).
31. Stilo, S., Forti, M. & Murray, R. Environmental risk factors for schizophrenia: Implications for prevention. *Neuropsychiatry (London)*. **1**, 457–466 (2011).
32. Brown, A. S. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog. Neurobiol.* **93**, 23–58 (2011).
33. Weinberger, D. R. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* **44**, 660–669 (1987).
34. Avramopoulos, D. Recent Advances in the Genetics of Schizophrenia. *Mol. Neuropsychiatry* **4**, 35–51 (2018).
35. Costain, G. & Bassett, A. S. Clinical applications of schizophrenia genetics: genetic diagnosis, risk, and counseling in the molecular era. *Appl. Clin. Genet.* **5**, 1–18 (2012).
36. Patel, K. R., Cherian, J., Gohil, K. & Atkinson, D. Schizophrenia: overview and treatment options. *P T* **39**, 638–645 (2014).
37. Yang, A. C. & Tsai, S.-J. New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
38. Kirkpatrick, B., Miller, B., García-Rizo, C. & Fernandez-Egea, E. Schizophrenia: a systemic disorder. *Clin. Schizophr. Relat. Psychoses* **8**, 73–79 (2014).
39. Bleuler, E. *Dementia praecox or the group of schizophrenias. Dementia praecox or the group of schizophrenias.* (International Universities Press, 1950).
40. Hanson, D. R. & Gottesman, I. I. Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. *BMC Med. Genet.* **6**, 7 (2005).
41. Katsel, P., Roussos, P., Pletnikov, M. & Haroutunian, V. Microvascular anomaly

- conditions in psychiatric disease. Schizophrenia – angiogenesis connection. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **77**, 327–339 (2017).
42. Lopes, R., Soares, R., Coelho, R. & Figueiredo-Braga, M. Angiogenesis in the pathophysiology of schizophrenia — A comprehensive review and a conceptual hypothesis. *Life Sci.* **128**, 79–93 (2015).
 43. Najjar, S. *et al.* Neurovascular Unit Dysfunction and Blood–Brain Barrier Hyperpermeability Contribute to Schizophrenia Neurobiology: A Theoretical Integration of Clinical and Experimental Evidence . *Frontiers in Psychiatry* vol. 8 83 (2017).
 44. Lee, B.-H. *et al.* Alterations in plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with schizophrenia before and after treatment. *Psychiatry Res.* **228**, 95–99 (2015).
 45. Fulzele, S. & Pillai, A. Decreased VEGF mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia subjects. *Schizophr. Res.* **115**, 372–373 (2009).
 46. Xiao, W. *et al.* Baseline serum vascular endothelial growth factor levels predict treatment response to antipsychotic medication in patients with schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **28**, 603–609 (2018).
 47. Hino, M. *et al.* Decreased VEGFR2 expression and increased phosphorylated Akt1 in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* **82**, 100–108 (2016).
 48. Hashimoto, K. *et al.* Increased levels of serum basic fibroblast growth factor in schizophrenia. *Psychiatry Res.* **120**, 211–218 (2003).
 49. Eastwood, S. L., Law, A. J., Everall, I. P. & Harrison, P. J. The axonal chemorepellant semaphorin 3A is increased in the cerebellum in schizophrenia and may contribute to its synaptic pathology. *Mol. Psychiatry* **8**, 148–155 (2003).
 50. Jongbloets, B. C. & Pasterkamp, R. J. Semaphorin signalling during development. *Development* **141**, 3292 LP – 3297 (2014).
 51. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
 52. Takahashi, K. & Yamanaka, S. A developmental framework for induced pluripotency. *Development* **142**, 3274 LP – 3285 (2015).

53. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 115–130 (2017).
54. Yu, J. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science (80-.)*. **318**, 1917 LP – 1920 (2007).
55. Das, D., Feuer, K., Wahbeh, M. & Avramopoulos, D. Modeling Psychiatric Disorder Biology with Stem Cells. *Curr. Psychiatry Rep.* **22**, 24 (2020).
56. Karagiannis, P. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol. Rev.* **99**, 79–114 (2019).
57. Nascimento, J. M. *et al.* Human Cerebral Organoids and Fetal Brain Tissue Share Proteomic Similarities . *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 7 303 (2019).
58. Luo, C. *et al.* Cerebral Organoids Recapitulate Epigenomic Signatures of the Human Fetal Brain. *Cell Rep.* **17**, 3369–3384 (2016).
59. Logan, S. *et al.* Studying Human Neurological Disorders Using Induced Pluripotent Stem Cells: From 2D Monolayer to 3D Organoid and Blood Brain Barrier Models. *Compr. Physiol.* **9**, 565–611 (2019).
60. Hoffmann, A., Ziller, M. & Spengler, D. Progress in iPSC-Based Modeling of Psychiatric Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4896 (2019).
61. Hoffman, G. E., Schrode, N., Flaherty, E. & Brennand, K. J. New considerations for hiPSC-based models of neuropsychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* **24**, 49–66 (2019).
62. Moslem, M., Olive, J. & Falk, A. Stem cell models of schizophrenia, what have we learned and what is the potential? *Schizophr. Res.* **210**, 3–12 (2019).
63. Stachowiak, E. K. *et al.* Cerebral organoids reveal early cortical maldevelopment in schizophrenia—computational anatomy and genomics, role of FGFR1. *Transl. Psychiatry* **7**, 6 (2017).
64. Brennand, K. *et al.* Phenotypic differences in hiPSC NPCs derived from patients with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **20**, 361–368 (2015).
65. Brennand, K. J. *et al.* Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* **473**, 221–225 (2011).
66. Sochacki, J. *et al.* Generation of iPSC cell lines from schizophrenia patients using a

- non-integrative method. *Stem Cell Res.* **17**, 97–101 (2016).
67. Casas, B. S. *et al.* hiPSC-derived neural stem cells from patients with schizophrenia induce an impaired angiogenesis. *Transl. Psychiatry* **8**, 48 (2018).
 68. Yan, Y. *et al.* Efficient and Rapid Derivation of Primitive Neural Stem Cells and Generation of Brain Subtype Neurons From Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 862–870 (2013).
 69. Qian, T. *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells to blood-brain barrier endothelial cells. *Sci. Adv.* **3**, e1701679 (2017).
 70. Milner, R. A novel three-dimensional system to study interactions between endothelial cells and neural cells of the developing central nervous system. *BMC Neurosci.* **8**, 3 (2007).
 71. Noh, H., Shao, Z., Coyle, J. T. & Chung, S. Modeling schizophrenia pathogenesis using patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1863**, 2382–2387 (2017).
 72. Sheng, J. & Xu, Z. Three decades of research on angiogenin: A review and perspective. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **48**, 399–410 (2016).
 73. Skorupa, A. *et al.* Motoneurons Secrete Angiogenin to Induce RNA Cleavage in Astroglia. *J. Neurosci.* **32**, 5024–5038 (2012).
 74. Thomas, M. & Augustin, H. G. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* **12**, 125–137 (2009).
 75. Babaei, S. *et al.* Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *Am. J. Pathol.* **162**, 1927–1936 (2003).
 76. Meng, Z. *et al.* Ectopic expression of human angiopoietin-1 promotes functional recovery and neurogenesis after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* **267**, 135–146 (2014).
 77. Marteau, L. *et al.* Angiopoietin-2 regulates cortical neurogenesis in the developing telencephalon. *Cereb. Cortex* **21**, 1695–1702 (2011).
 78. Kitlinska, J. *et al.* Dual Role of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV) in Angiogenesis and Vascular Remodeling. in *Dipeptidyl Aminopeptidases in Health and Disease* (eds. Back, N., Cohen, I. R., Kritchevsky, D., Lajtha, A. & Paoletti, R.) 215–222 (Springer US, 2003). doi:10.1007/0-306-47920-6_26.

79. Wesley, U. V, Hatcher, J. F., Ayvaci, E. R., Klemp, A. & Dempsey, R. J. Regulation of Dipeptidyl Peptidase IV in the Post-stroke Rat Brain and In Vitro Ischemia : Implications for Chemokine-Mediated Neural Progenitor Cell Migration and Angiogenesis. *Mol. Neurobiol.* **54**, 4973–4985 (2017).
80. Salani, D. *et al.* Endothelin-1 Induces an Angiogenic Phenotype in Cultured Endothelial Cells and Stimulates Neovascularization In Vivo. *Am. J. Pathol.* **157**, 1703–1711 (2000).
81. Dashwood, M. R. & Loesch, A. Endothelin-1 as a neuropeptide : neurotransmitter or neurovascular effects ? *J. Cell Commun. Signal.* **4**, 51–62 (2010).
82. Das, S. K. *et al.* MDA-9/Syntenin and IGFBP-2 Promote Angiogenesis in Human Melanoma. *Cancer Res.* **73**, 844–854 (2014).
83. Brooker, G. J. F. *et al.* Endogenous IGF-1 Regulates the Neuronal Differentiation of Adult Stem Cells. *J. Neurosci. Res.* **59**, 332–341 (2000).
84. Granata, R. *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-3 induces angiogenesis through IGF-I- and SphK1-dependent mechanisms. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 835–845 (2007).
85. Kalluri, H. S. G. & Dempsey, R. J. IGFBP-3 Inhibits the Proliferation of Neural Progenitor Cells. *Neurochem. Res.* **36**, 406–411 (2011).
86. Brat, D. J., Bellail, A. C. & Van Meir, E. G. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro. Oncol.* **7**, 122–133 (2005).
87. Kelland, E. E., Gilmore, W., Weiner, L. P. & Lund, B. T. The dual role of CXCL8 in human CNS stem cell function: Multipotent neural stem cell death and oligodendrocyte progenitor cell chemotaxis. *Glia* **59**, 1864–1878 (2011).
88. Ma, J., Wang, Q., Fei, T., Han, J.-D. J. & Chen, Y.-G. MCP-1 mediates TGF- β -induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* **109**, 987 LP – 994 (2007).
89. Widera, D. *et al.* MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 381–387 (2004).
90. Shikada, Y. *et al.* Platelet-Derived Growth Factor-AA Is an Essential and Autocrine Regulator of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Non-Small Cell Lung Carcinomas. *Cancer Res.* **65**, 7241 LP – 7248 (2005).

91. Soltys, J., Perrone, C., Knight, J. & Mao-draayer, Y. PDGF-AA and BDNF Promote Neural Stem Cell Differentiation. *J Neurol Neurophysiol* **54**, (2011).
92. Tjwa, M., Luttun, A., Autiero, M. & Carmeliet, P. VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. *Cell Tissue Res.* **314**, 5–14 (2003).
93. Liu, H. *et al.* Neuroprotection by PlGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia. *Brain* **129**, 2734–2745 (2006).
94. Crouch, E. E., Liu, C., Silva-Vargas, V. & Doetsch, F. Regional and Stage-Specific Effects of Prospectively Purified Vascular Cells on the Adult V-SVZ Neural Stem Cell Lineage. *J. Neurosci.* **35**, 4528 LP – 4539 (2015).
95. Faupel-Badger, J. M. *et al.* 16-kDa Prolactin Reduces Angiogenesis, but Not Growth of Human Breast Cancer Tumors In Vivo. *Horm. Cancer* **1**, 71–79 (2010).
96. Torner, L. Actions of Prolactin in the Brain: From Physiological Adaptations to Stress and Neurogenesis to Psychopathology. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7**, 25 (2016).
97. Breuss, J. M. & Uhrin, P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA / uPAR system. *Cell Adh. Migr.* **6**, 535–540 (2012).
98. Lino, N. *et al.* uPA-uPAR molecular complex is involved in cell signaling during neuronal migration and neuriteogenesis. *Dev. Dyn.* **243**, 676–689 (2014).
99. Hoeben, A. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* **56**, 549–580 (2004).
100. Schmidt, N. O. *et al.* Vascular endothelial growth factor-stimulated cerebral microvascular endothelial cells mediate the recruitment of neural stem cells to the neurovascular niche. *Brain Res.* **1268**, 24–37 (2009).
101. Jin, K. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *PNAS* **99**, 11946–11950 (2002).
102. O'Reilly, M. S. *et al.* Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* **88**, 277–285 (1997).
103. Ahmad, A. Al *et al.* Endostatin binds nerve growth factor and thereby inhibits neurite outgrowth and neuronal migration in-vitro. *Brain Res.* **1360**, 28–39 (2010).

104. Inforzato, A. *et al.* The Angiogenic Inhibitor Long Pentraxin PTX3 Forms an Asymmetric Octamer with Two Binding Sites. *J. Biol. Chem.* **285**, 17681–17692 (2010).
105. Rodriguez-Grande, B. *et al.* Pentraxin 3 mediates neurogenesis and angiogenesis after cerebral ischaemia. *J. Neuroinflammation* **12**, 15 (2015).
106. McMahon, G. A. *et al.* Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates Tumor Growth and Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 33964–33968 (2001).
107. Soeda, S. *et al.* Anti-apoptotic roles of plasminogen activator inhibitor-1 as a neurotrophic factor in the central nervous system. *Thromb. Haemost.* **100**, 1014–1020 (2008).
108. Filleur, S., Nelius, T., de Riese, W. & Kennedy, R. C. Characterization of PEDF: A multi-functional serpin family protein. *J. Cell. Biochem.* **106**, 769–775 (2009).
109. Sa, F. *et al.* Pigment epithelium – derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat. Neurosci.* **9**, 331–339 (2006).
110. Chirco, R., Liu, X.-W., Jung, K.-K. & Kim, H.-R. C. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 99–113 (2006).
111. Wójcik-Stanaszek, L. *et al.* The Potential Role of Metalloproteinases in Neurogenesis in the Gerbil Hippocampus Following Global Forebrain Ischemia. *PLoS One* **6**, 1–15 (2011).
112. Lawler, P. R. & Lawler, J. Molecular Basis for the Regulation of Angiogenesis by Thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2**, a006627 (2012).
113. Lu, Z. & Kipnis, J. Thrombospondin 1 — a key astrocyte-derived neurogenic factor. *FASEB J.* **24**, 1925–1934 (2010).
114. Garcez, P. P. *et al.* Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science (80-)*. **352**, 816 LP – 818 (2016).
115. Hashimoto, R. *et al.* Expression analysis of neuregulin-1 in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **9**, 299–307 (2004).
116. Chong, V. Z. *et al.* Elevated neuregulin-1 and ErbB4 protein in the prefrontal cortex of schizophrenic patients. *Schizophr. Res.* **100**, 270–280 (2008).
117. Da Silveira Paulsen, B. *et al.* Altered Oxygen Metabolism Associated to Neurogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from a Schizophrenic

- Patient. *Cell Transplant.* **21**, 1547–1559 (2012).
118. Cucullo, L. *et al.* Immortalized Human Brain Endothelial Cells and Flow-Based Vascular Modeling: A Marriage of Convenience for Rational Neurovascular Studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28**, 312–328 (2007).
 119. Yeon, J. H. *et al.* Reliable permeability assay system in a microfluidic device mimicking cerebral vasculatures. *Biomed. Microdevices* **14**, 1141–1148 (2012).
 120. DeCicco-Skinner, K. L. *et al.* Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis. *JoVE* e51312 (2014) doi:doi:10.3791/51312.
 121. Tata, M., Ruhrberg, C. & Fantin, A. Vascularisation of the central nervous system. *Mech. Dev.* **138**, 26–36 (2015).
 122. Schmidt-Kastner, R., van Os, J., W.M. Steinbusch, H. & Schmitz, C. Gene regulation by hypoxia and the neurodevelopmental origin of schizophrenia. *Schizophr. Res.* **84**, 253–271 (2006).
 123. James, J. M., Gewolb, C. & Bautch, V. L. Neurovascular development uses VEGF-A signaling to regulate blood vessel ingression into the neural tube. *Development* **136**, 833 LP – 841 (2009).
 124. Vempati, P., Popel, A. S. & Mac Gabhann, F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 1–19 (2014).
 125. Xiao, W. *et al.* Elevated serum vascular endothelial growth factor in treatment-resistant schizophrenia treated with electroconvulsive therapy: Positive association with therapeutic effects. *World J. Biol. Psychiatry* **20**, 150–158 (2019).
 126. Ye, F. *et al.* Altered serum levels of vascular endothelial growth factor in first-episode drug-naïve and chronic medicated schizophrenia. *Psychiatry Res.* **264**, 361–365 (2018).
 127. Zhao, Y. *et al.* Neurocognition and social cognition in remitted first-episode schizophrenia: correlation with VEGF serum levels. *BMC Psychiatry* **19**, 403 (2019).
 128. Lizano, P. *et al.* VEGFA GENE variation influences hallucinations and frontotemporal morphology in psychotic disorders: a B-SNIP study. *Transl. Psychiatry* **8**, (2018).

129. Kuo, Y. L., Yang, Y. K., Cheng, H.-C., Yen, C. J. & Chen, P. S. Psychotic disorder induced by a combination of sorafenib and BAY86-9766. *Gen. Hosp. Psychiatry* **36**, 450.e5-450.e7 (2014).
130. Kunene, V. & Porfiri, E. Sunitinib-induced Acute Psychosis: Case Report. *Clin. Genitourin. Cancer* **9**, 70–72 (2011).
131. Deyama, S. *et al.* Role of Neuronal VEGF Signaling in the Prefrontal Cortex in the Rapid Antidepressant Effects of Ketamine. *Am. J. Psychiatry* **176**, 388–400 (2019).
132. Udo, H., Hamasu, K., Furuse, M. & Sugiyama, H. VEGF-induced antidepressant effects involve modulation of norepinephrine and serotonin systems. *Behav. Brain Res.* **275**, 107–113 (2014).
133. Li, S. & Hu, G. Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration. *Int J Biochem M* **1**, 26–35 (2010).
134. Kieran, D. *et al.* Control of Motoneuron Survival by Angiogenin. *J. Neurosci.* **28**, 14056–14061 (2008).
135. Kishimoto, K., Liu, S., Tsuji, T., Olson, K. A. & Hu, G. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* **24**, 445–456 (2005).
136. Breuss, J. M. & Uhrin, P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adh. Migr.* **6**, 535–615 (2012).
137. Hoeben, A. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* **56**, 549 LP – 580 (2004).
138. Plouët, J. *et al.* Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J. Biol. Chem.* **272**, 13390–13396 (1997).
139. Stepanova, V. *et al.* Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Promotes Angiogenesis by Attenuating Proline-rich Homeodomain Protein (PRH) Transcription Factor Activity and De-repressing Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor Expression. *J. Biol. Chem.* **291**, 15029–15045 (2016).
140. Cho, E. *et al.* Neuroprotection by urokinase plasminogen activator in the hippocampus. *Neurobiol. Dis.* **46**, 215–224 (2012).
141. Merino, P. & Yepes, M. Urokinase-type Plasminogen Activator Induces

- Neurorepair in the Ischemic Brain. *J. Neurol. Exp. Neurosci.* **4**, 24–29 (2018).
142. Lahtinen, L. *et al.* Urokinase-type plasminogen activator regulates neurodegeneration and neurogenesis but not vascular changes in the mouse hippocampus after status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* **37**, 692–703 (2010).
 143. Alto, L. T. & Terman, J. R. Semaphorins and their Signaling Mechanisms. *Methods Mol. Biol.* **1493**, 1–25 (2017).
 144. Gilabert-Juan, J. *et al.* Semaphorin and plexin gene expression is altered in the prefrontal cortex of schizophrenia patients with and without auditory hallucinations. *Psychiatry Res.* **229**, 850–857 (2015).
 145. Saili, K. S. *et al.* Blood-brain barrier development: Systems modeling and predictive toxicology. *Birth Defects Res.* **109**, 1680–1710 (2017).
 146. Wang, J. & Milner, R. Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins via MAP kinase signalling. *J. Neurochem.* **96**, 148–159 (2006).
 147. Milner, R. & Campbell, I. L. Developmental regulation of beta1 integrins during angiogenesis in the central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* **20**, 616–626 (2002).
 148. Lee, H. K. *et al.* Netrin-1 specifically enhances cell spreading on fibronectin in human glioblastoma cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **12**, 225–230 (2008).
 149. Oommen, S., Gupta, S. K. & Vlahakis, N. E. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) induces endothelial and cancer cell migration through direct binding to integrin $\alpha 9\beta 1$: identification of a specific $\alpha 9\beta 1$ binding site. *J. Biol. Chem.* **286**, 1083–1092 (2011).
 150. Lee, T.-H. *et al.* Integrin regulation by vascular endothelial growth factor in human brain microvascular endothelial cells: role of $\alpha 6\beta 1$ integrin in angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 40450–40460 (2006).
 151. Prieto, C. P. *et al.* Netrin-1 acts as a non-canonical angiogenic factor produced by human Wharton ' s jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSC). *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 1–15 (2017).
 152. Kim, Y.-W. & Byzova, T. V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* **123**, 625–631 (2014).
 153. Pitsikas, N. The Role of Nitric Oxide Synthase Inhibitors in Schizophrenia. *Curr.*

- Med. Chem.* **23**, 2692–2705 (2016).
154. Paulsen, B. da S. *et al.* Altered oxygen metabolism associated to neurogenesis of induced pluripotent stem cells derived from a schizophrenic patient. *Cell Transplant.* **21**, 1547–1559 (2012).
 155. Wong, W. New connections: The duality of ROS in angiogenesis. *Sci. Signal.* **10**, eaan6438 (2017).
 156. Krock, B. L., Skuli, N. & Simon, M. C. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer* **2**, 1117–1133 (2011).
 157. Choudhry, H. & Harris, A. L. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metab.* **27**, 281–298 (2018).
 158. Schmidt-kastner, R., Os, J. Van & Steinbusch, H. W. M. Gene regulation by hypoxia and the neurodevelopmental origin of schizophrenia. *Schizophr. Res.* **84**, 253–271 (2006).
 159. Schmidt-Kastner, R., van Os, J., Esquivel, G., Steinbusch, H. W. M. & Rutten, B. P. F. An environmental analysis of genes associated with schizophrenia: hypoxia and vascular factors as interacting elements in the neurodevelopmental model. *Mol. Psychiatry* **17**, 1194–1205 (2012).
 160. Aberg, K. A. *et al.* Methylome-wide association study of schizophrenia: identifying blood biomarker signatures of environmental insults. *JAMA psychiatry* **71**, 255–264 (2014).
 161. Volk, D. W., Moroco, A. E., Roman, K. M., Edelson, J. R. & Lewis, D. A. The Role of the Nuclear Factor- κ B Transcriptional Complex in Cortical Immune Activation in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **85**, 25–34 (2019).
 162. Altinoz, M. A., Ince, B., Tek, C., Srihari, V. H. & Guloksuz, S. The NF- κ B signaling pathway: an important therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* **23**, 490–491 (2018).
 163. Song, X.-Q., Lv, L.-X., Li, W.-Q., Hao, Y.-H. & Zhao, J.-P. The Interaction of Nuclear Factor-Kappa B and Cytokines Is Associated with Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **65**, 481–488 (2009).
 164. Koslowski, M., Luxemburger, U., Türeci, Ö. & Sahin, U. Tumor-associated CpG demethylation augments hypoxia-induced effects by positive autoregulation of HIF-1 α . *Oncogene* **30**, 876–882 (2011).

165. Najjar, S. Neurovascular Unit Dysfunction and Blood – Brain Barrier Hyperpermeability Contribute to Schizophrenia Neurobiology : A Theoretical integration of Clinical and experimental evidence. **8**, (2017).
166. Nishiura, K. *et al.* PKA activation and endothelial claudin-5 breakdown in the schizophrenic prefrontal cortex. *Oncotarget* **8**, 93382–93391 (2017).
167. Greene, C. *et al.* Dose-dependent expression of claudin-5 is a modifying factor in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **23**, 2156–2166 (2018).
168. Dev, K. K. & Henley, J. M. The schizophrenic faces of PICK1. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 574–579 (2006).
169. Li, C. *et al.* Positive association between PDLIM5 and schizophrenia in the Chinese Han population. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **11**, 27–34 (2008).
170. Maes, M., Sirivichayakul, S., Kanchanatawan, B. & Vodjani, A. Breakdown of the Paracellular Tight and Adherens Junctions in the Gut and Blood Brain Barrier and Damage to the Vascular Barrier in Patients with Deficit Schizophrenia. *Neurotox. Res.* **36**, 306–322 (2019).
171. de Klerk, O. L. *et al.* Regional increase in P-glycoprotein function in the blood-brain barrier of patients with chronic schizophrenia:: A PET study with [11C]verapamil as a probe for P-glycoprotein function. *Psychiatry Res. Neuroimaging* **183**, 151–156 (2010).
172. F.G., H. *et al.* Bypassing P-Glycoprotein Drug Efflux Mechanisms: Possible Applications in Pharmacoresistant Schizophrenia Therapy. *Biomed Res. Int.* **2015**, 484963 (2015).
173. McDermott, E. & De Silva, P. Impaired neuronal glucose uptake in pathogenesis of schizophrenia - Can GLUT 1 and GLUT 3 deficits explain imaging, post-mortem and pharmacological findings? *Med. Hypotheses* **65**, 1076–1081 (2005).
174. Sullivan, C. R. *et al.* Neuron-specific deficits of bioenergetic processes in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* **24**, 1319–1328 (2019).
175. Koch, H. & Weber, Y. G. The glucose transporter type 1 (Glut1) syndromes. *Epilepsy Behav.* **91**, 90–93 (2019).
176. Vafadari, B., Salamian, A. & Kaczmarek, L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J. Neurochem.* **139**, 91–114 (2016).

177. Lepeta, K. & Kaczmarek, L. Matrix Metalloproteinase-9 as a Novel Player in Synaptic Plasticity and Schizophrenia. *Schizophr. Bull.* **41**, 1003–1009 (2015).
178. Han, H. *et al.* The C(-1562)T polymorphism of matrix metalloproteinase-9 gene is associated with schizophrenia in China. *Psychiatry research* vol. 190 163–164 (2011).
179. Rybakowski, J. K., Skibinska, M., Kapelski, P., Kaczmarek, L. & Hauser, J. Functional polymorphism of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **109**, 90–93 (2009).
180. Wiera, G., Wozniak, G., Bajor, M., Kaczmarek, L. & Mozrzymas, J. W. Maintenance of long-term potentiation in hippocampal mossy fiber-CA3 pathway requires fine-tuned MMP-9 proteolytic activity. *Hippocampus* **23**, 529–543 (2013).
181. Dwir, D. *et al.* MMP9/RAGE pathway overactivation mediates redox dysregulation and neuroinflammation, leading to inhibitory/excitatory imbalance: a reverse translation study in schizophrenia patients. *Mol. Psychiatry* (2019) doi:10.1038/s41380-019-0393-5.
182. Domenici, E. *et al.* Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS One* **5**, e9166 (2010).
183. Yamamori, H. *et al.* Plasma levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in treatment-resistant schizophrenia treated with clozapine. *Neurosci. Lett.* **556**, 37–41 (2013).
184. Chang, S.-H. *et al.* Expression of anti-cardiolipin antibodies and inflammatory associated factors in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* **187**, 341–346 (2011).
185. Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C. & Zlokovic, B. V. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* **163**, 1064–1078 (2015).
186. Hou, S. T. *et al.* Semaphorin3A elevates vascular permeability and contributes to cerebral ischemia-induced brain damage. *Sci. Rep.* **5**, 7890 (2015).

IX. ANEXOS

ANEXO 1: Materiales y Métodos

Línea celular	Identificación	Diagnóstico	Síntomas	Sexo	Edad	Fuente celular	Técnica de Reprogramación	Líneas celulares generadas				
Ctrl #1	CF1	Sano	Sin síntomas	M	37	Fibroblasto	Cytotune 1.0 kit (ThermoFisher)	NSC	Nsp	NPC	Astro	BEC
Ctrl #2	CF2	Sano	Sin síntomas	M	31	Fibroblasto	Cytotune 1.0 kit (ThermoFisher)	NSC	Nsp	NPC	Astro	
Ctrl #3	GM23279A	Sano	Sin síntomas	F	36	Fibroblasto	Retrovirus (OCT4, SOX2, KLF4, MYC)	NSC	Nsp	NPC	Astro	BEC
Ctrl #4	ADHD2	Sano	Sin síntomas	M	31	Endotelio urinario	Cytotune 2.0 kit (ThermoFisher)		Nsp			
SZP #1	EZQ4	Esquizofrenia	Delirio de persecución	M	42	Fibroblasto	Cytotune 2.0 kit (ThermoFisher)	NSC	Nsp	NPC	Astro	
SZP #2	GM23760B	Esquizofrenia	Hermano de GM23761B. Episodios de agitación, delirios de persecución y miedo de ser asesinado.	M	26	Fibroblasto	Lentivirus (OCT4, SOX2, KLF4, MYC, LIN28)	NSC	Nsp	NPC	Astro	BEC
SZP #3	GM23761B	Esquizofrenia	Hermana de GM23760B. Hospitalizada, abuso de drogas, padre afectado, depresión.	F	27	Fibroblasto	Lentivirus (OCT4, SOX2, KLF4, MYC, LIN28)	NSC	Nsp	NPC	Astro	BEC
SZP #4	GM23762B	Esquizofrenia	Pensamiento desorganizado, aislamiento afectivo, disociación afectiva del contenido, suspicacia. Desencadenamiento a los 15 años. Hospitalizado, historia familiar.	M	23	Fibroblasto	Retrovirus (OCT4, SOX2, KLF4, MYC, LIN28)					BEC
SZP #5	EZQ3	Esquizofrenia	Padre diagnosticado con esquizofrenia	M	45	Fibroblasto	Cytotune 2.0 kit (ThermoFisher)		Nsp			
SZP#6	EZQ9	Esquizofrenia	Abuso de sustancias. Alcoholismo en tíos paternos, padre y abuelo paterno	M	44	Fibroblasto	Cytotune 2.0 kit (ThermoFisher)					BEC

Tabla S1. Líneas celulares derivadas de hiPSC. Se indica el nombre de cada línea, el código de identificación, diagnóstico, síntomas, sexo (M=masculino; F= femenino), edad en años, célula somática reprogramada, técnica de reprogramación y líneas celulares derivadas usadas en esta tesis.

Gen	Secuencia Fw	Secuencia Rv	T° de annealing	Concentración de partidores [nM]	Eficiencia	R
18S	GGGCCCCAAGCGTTACTTT	TTGCGCCGGTCCAAGAATTT	60	750	90,9	0,997
B2M	GCTATCCAGCGTACTCCAAA	GAAAGACCAGTCTTGTGTA	60	800	94,4	0,995
CDH5 (VE-Cad)	AGAATGACAATGCCCCGGAGTT	GATGTTGGCCGTGTATCGTGA	60	250	98,1	0,997
CLDN5	GCGGGTGTGCACTGAGGATT	GCCCTGCCGATGGAGTAAAGA	60	250	106,9	0,997
EFNA1	AGCCTCAAAACGGGTCAGTA	CATGCCTGCACAGCTTGT	60	250	106	0,999
EFNB2	AGGTGCCCTTAGCCAGAT	ACCAAAGTGTGTGCTACCT	60	250	106,1	0,998
FLT1 (VEGFR1)	ATCACTCAGCGCATGGCAAT	TCTCCTCCGTCGGCATT	60	500	91	0,999
GADPH	CAAGAAGTGGTGAAGCAGGC	CCACCACCCTGTTGCTGTAG	60	500	90,4	0,997
GLUT-1	TGCCTGAAGTCGCACAGTGAA	AGGGCAGCTTGACAGCTCATT	60	250	110	0,995
ITGA5	AATGGACCAAGGCAGAAGGCA	TGGAGGCTTGAGCTGAGCTTT	60	250	99,3	0,998
KDR (VEGFR2)	TCATGCACGGCATCTGGGAAT	GCACAGCCAAGAACAACACTGCAT	60	250	99,7	0,996
NEO1	GCTTCATCAAATTGACGTGGCGGA	AGATGTACACGGTCGCTGGCATT	60	500	91,7	0,998
NRP1	AGCCTGCAACTGGGAAACT	TGGTTACCAGGCGGATGTT	60	250	106,1	0,998
NRP2	TCTGGCCGATTGCTAATGA	TGGCCGTGAGCATGGTTAAA	60	250	106,8	0,999
NTN1	TGCAAGAAGGACTATGCCGTC	GCTCGTGCCTGCTTATACAC	60	1000	93,9	0,998
OCLN			60	500		
P-gp (MDR-1)	AACAGTCCAGCTGATGCAGA	TTCACGGCCATAGCGAATGT	60	250	109,5	0,991
SEMA3A	TGGCCAACAGTCCAGTTAT	TTCCAGCCCACTTGCAATCA	60	250	107,7	0,999
SLIT2	TGTGAGCCATGCCACAAGAA	AACGCATTGATGGGCAAGCA	60	250	102,2	0,999
UNC5b (mh)	GGGCTGGAGGATTACTGGTG	TGCAGGAGAACCTCATGGTC	60	500	92,7	0,994
VEGF A	CTCTACCTCCACCATGCCAAG	AGACATCCATGAACCTCACCACTTC	60	800	108	0,999
vWF	TGCCAGAGCCTGCACATCAAT	CCACTGGCTGTTTCGGCAAAT	60	250	99,6	0,998
Zo-1	TCACGCAGTTACGAGCAAGT	GAGGCAGTGGTTGGTGTTT	60	250	99,9	0,991

Tabla S2. Partidores usados para qPCR. Se indican los nombres de los genes cuyo mRNA fue evaluado, la secuencia nucleotídica del partidor *forward* (Secuencia Fw) y el partidor *reverse* (Secuencia Rv), la temperatura de alineamiento (T° annealing) utilizada, la concentración de partidores a la cual la eficiencia de amplificación es óptima, la eficiencia de amplificación lograda en una curva de estandarización y el coeficiente de regresión lineal de la curva de estandarización.

Anticuerpo	Dilución utilizada	N° de catálogo, proveedor
SEMA3A	1 : 100	sc-74554, Santa Cruz Biotechnology
Nestin	1 : 200	RA22125, Neuromics
Pax6	1 : 200	sc-81649, Santa Cruz Biotechnology
Zo-1	1 : 200	sc- 33725, Santa Cruz Biotechnology
GLUT-1	1 : 100	MA5-11315, Invitrogen
OCLN	1 : 200	sc- 133256, Santa Cruz Biotechnology
CD31	1 : 50	P8590, Sigma
Alexa Fluor 546	1 : 250	A-11003, Invitrogen
Alexa Fluor 488	1 : 250	A-11008, Invitrogen

Tabla S3. Anticuerpos utilizados en Western Blot e inmunofluorescencia. Se indican los nombres de los anticuerpos, la dilución utilizada en la incubación, el número de catálogo y proveedor.

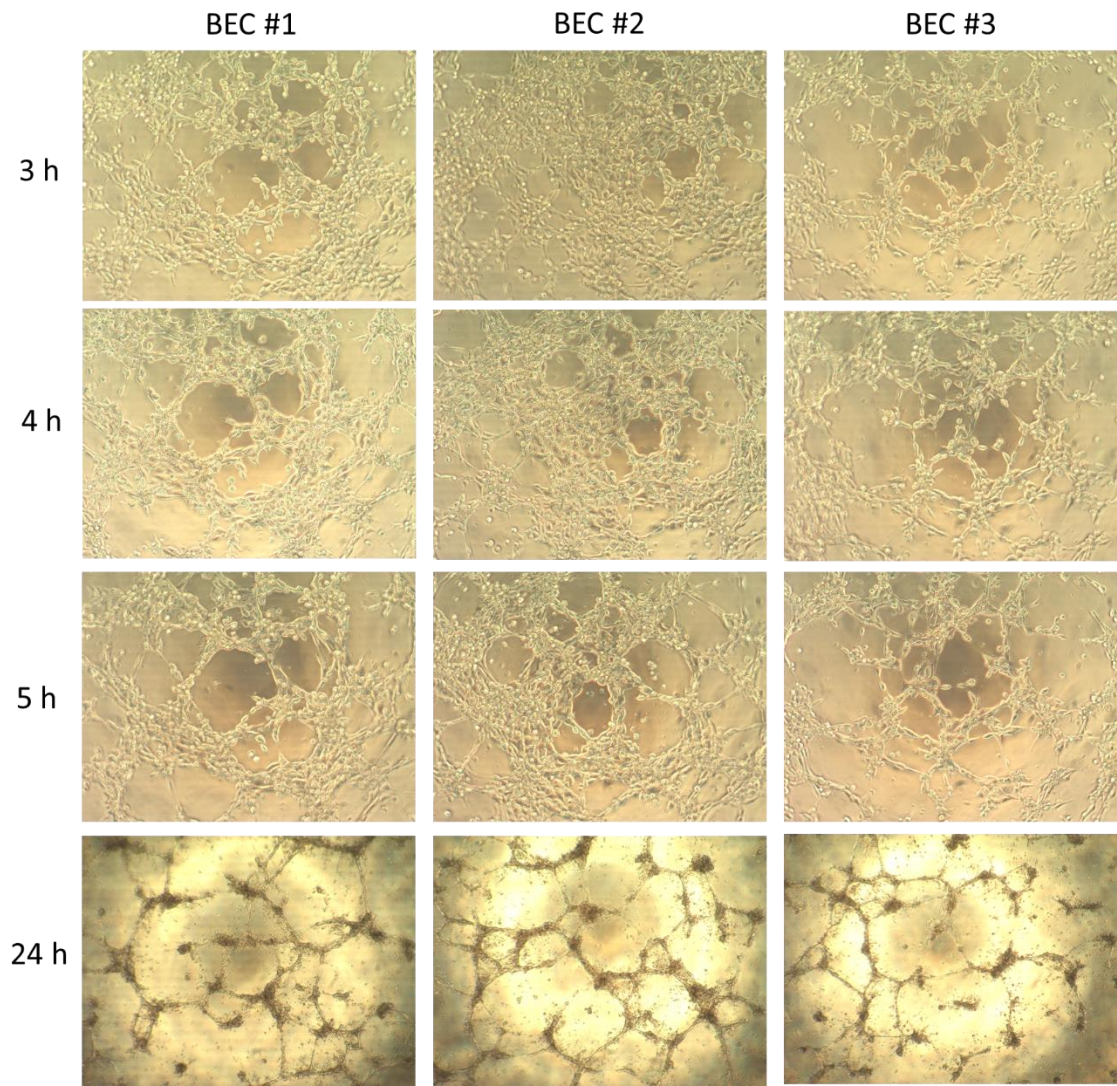


Figura S1. Optimización de los tiempos de incubación en el ensayo de formación de túbulos y ramificaciones usando BEC. Imágenes representativas de tres ensayos de formación de túbulos de BEC en medio de cultivo basal (hESFM + B27). Se tomaron fotografías luego de 3, 4, 5 y 24 h. Se observa que los túbulos se comienzan a formar a las 3 h y se estabilizan a las 4 h de incubación. Después de las 5 h se ve que algunos polígonos se desestabilizan. La foto de las 24 h tiene la mitad de la magnificación y se observa que gran parte de los polígonos se ha desestabilizado.

ANEXO 2: Resultados Objetivo 1

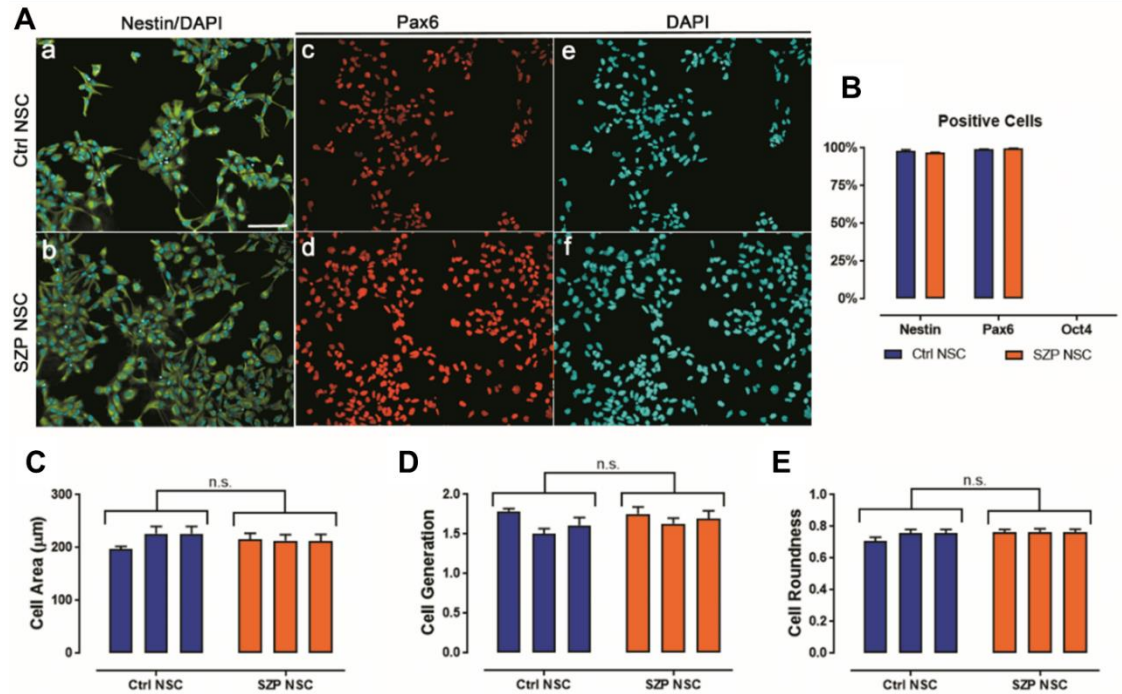


Figura S2. Caracterización de NSC Ctrl y NSC SZP. (A) Inmunofluorescencias efectuadas a NSC Ctrl (a, c, e) y NSC SZP (b, d, f) para la detección de marcadores específicos de NSC: (a y b) Nestin (verde) y marcador nuclear DAPI (azul); (c y d) Pax6 (rojo) y el correspondiente marcador nuclear DAPI (e y f); barra = 100 µm. Imágenes representativas de N= 3 (3 NSC Ctrl y 3 NSC SZP). (B) Porcentajes de células positivas. Los cultivos de NSC Ctrl y NSC SZP tienen un 98% (± 0.003) y 97% (± 0.01) de células positivas para Nestina, y un 99% (± 0.002) y 99.7% (± 0.002) de células positivas para Pax6, respectivamente. No se detectaron células positivas para Oct4 ni en los cultivos de NSC Ctrl ni de NSC SZP. Los datos se muestran como el promedio \pm SD de N= 3. (C) La medición del área celular no mostró diferencias significativas entre los grupos de NSC Ctrl y NSC SZP (D) La división celular fue monitoreada por 12 h y no se observaron diferencias significativas entre NSC Ctrl y NSC SZP. (E) La redondez celular no mostró diferencias significativas entre los grupos de NSC Ctrl y NSC SZP. (C-E) Los gráficos muestran el promedio \pm SD, de los datos obtenidos de cada línea celular (NSC Ctrl #1, #2, #3 y NSC SZP #1, #2, #3).

La figura fue adaptada de Casas y col., 2018.⁶⁷ y corresponde a los resultados de una colaboración con el laboratorio del co-tutor de tesis Dr. Stevens Rehen.

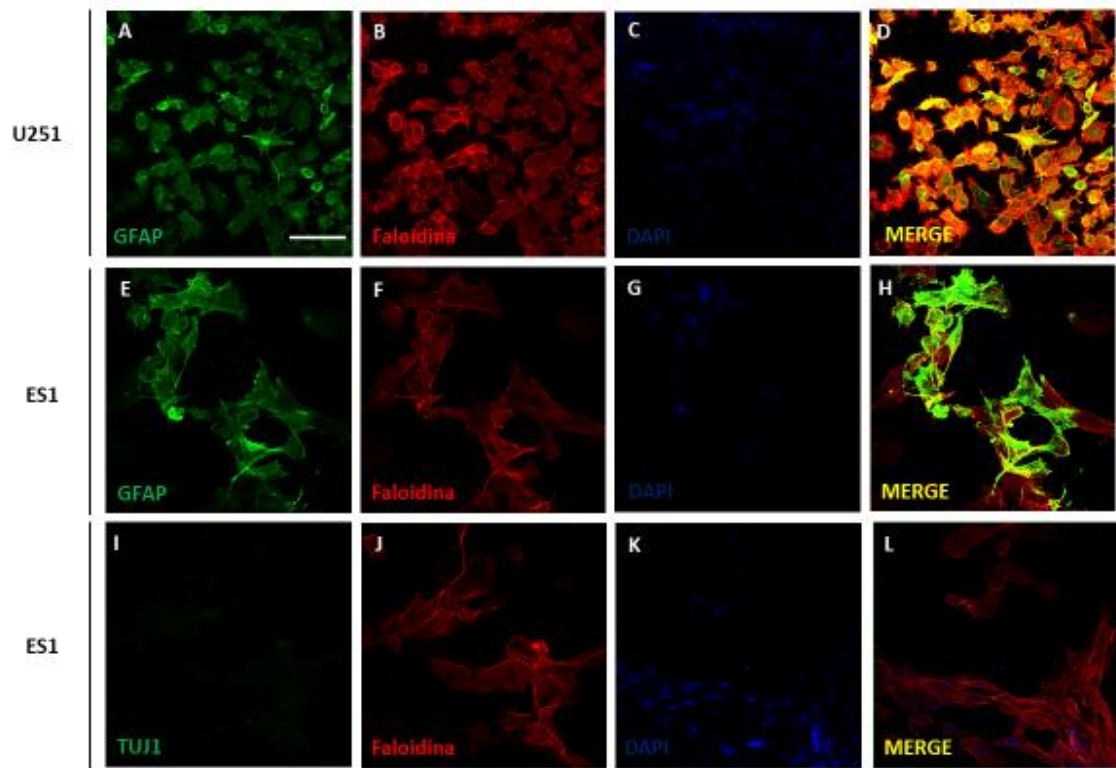


Figura S3. Caracterización de Astrocitos SZP. Imágenes representativas de inmunofluorescencia realizadas en la línea de astrocitoma U251 (A-D) y astrocitos derivados de hiPSC en pasaje 5 (E-L) para marcador de astrocitos GFAP (verde, A y E), marcador neuronal TUJ1 (verde, I), filamentos de actina Faloidina (rojo B, F y J) y marca nuclear DAPI (azul C, G y K). (D, H y L) La superposición de los diferentes canales (MERGE; amarillo). (N=2, 2 PE). Barra de escala 50 μ m. Las imágenes muestran que los astrocitos derivados de hiPSC (ES1) son positivos para GFAP y negativos para TUJ1.

Figura adaptada del seminario de título “Contribución de los astrocitos al establecimiento de la esquizofrenia, mediante la secreción de factores neuroangiogénicos” realizada por Tomás Monteverde Faúndez (2019) bajo la tutoría de la Dra. Verónica Palma. Las muestras utilizadas para esta caracterización son las mismas que fueron ensayadas en la presente tesis de doctorado.

ANEXO 3: Resultados Objetivo 2

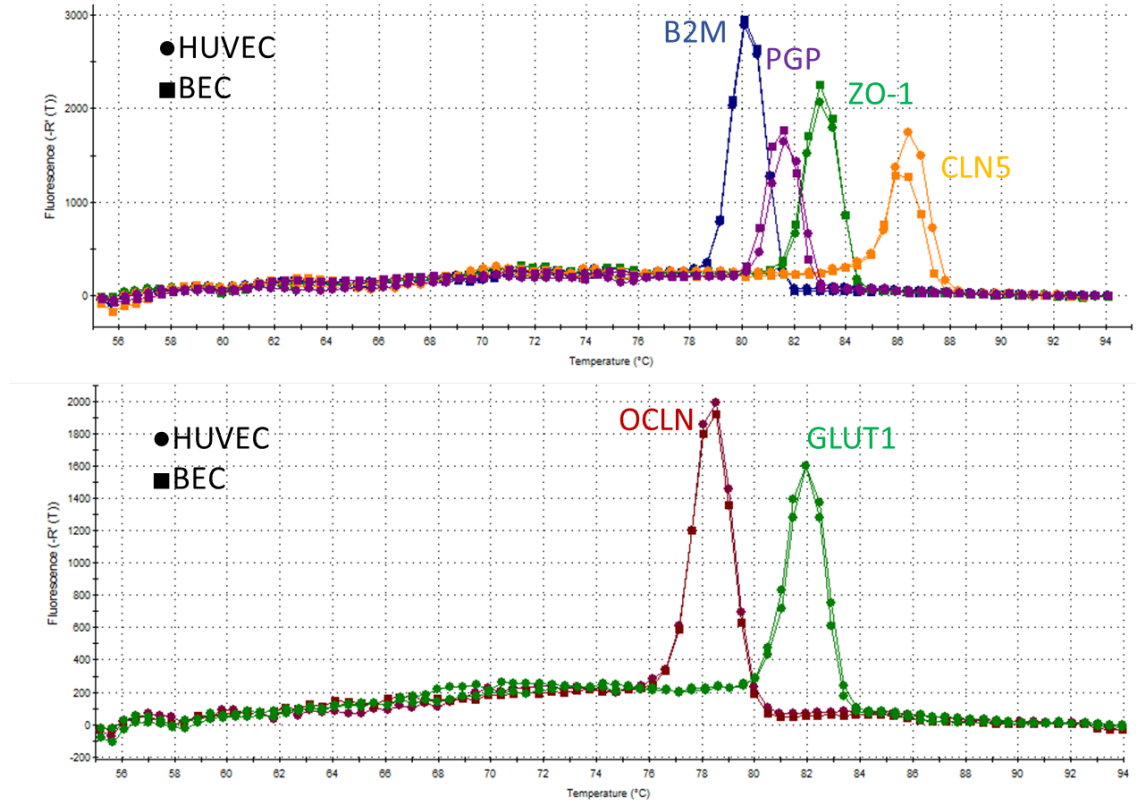


Figura S4. Las HUVEC expresan marcadores clásicos de BEC. Los gráficos corresponden a curvas de disociación de amplicones producidos por la amplificar los transcritos del transportador de glucosa *GLUT1*, el transportador de eflujo *PGP*, la proteína de anclaje *ZO-1* y las proteínas de unión estrecha *OCLN* y *CLN5*, mediante qPCR. Los datos mostrados se obtuvieron de muestras representativas de HUVEC (●) y BEC (■). Se muestra la curva del gen housekeeping *B2M* como referencia control. Se observa que HUVEC, así como BEC expresan los genes mencionados.

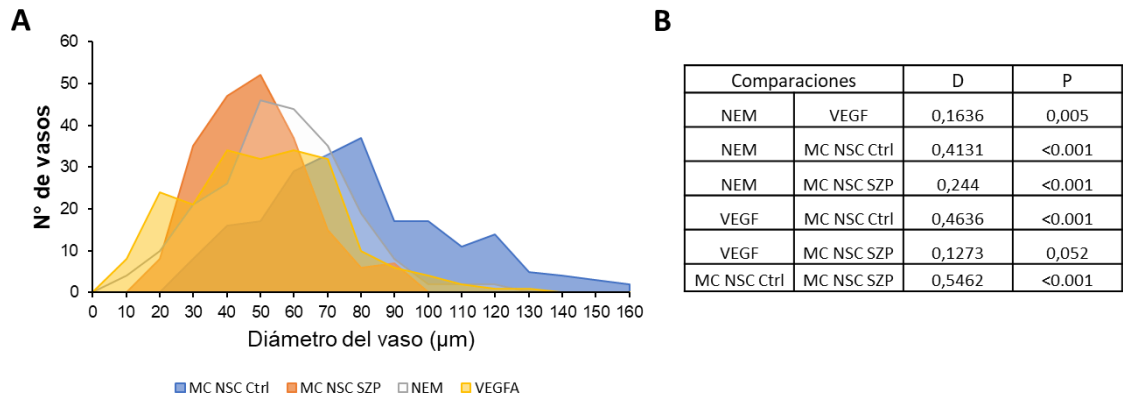


Figura S5. Efecto de VEGFA sobre el diámetro de los vasos en el ensayo CAM. Para el ensayo de CAM los estímulos fueron incubados sobre una matriz de biocelulosa en E8. Luego de 4 días, se cuantificó el diámetro los vasos en el perímetro de la matriz. (A) El gráfico muestra la distribución de frecuencia del diámetro de los vasos cuando la CAM es estimulada con NEM, MC de NSC Ctrl o MC de NSC SZP. Se utilizaron tres MC de donantes diferentes para cada grupo y se evaluaron 220 vasos en cada condición. (B) La tabla indica la diferencia máxima entre las distribuciones acumulativas (*D*) de cada tratamiento y el *P* valor de la comparación entre las distintas condiciones según el test de Kolmogorov-Smirnov.

ANEXO 4: Resultados Objetivo 3

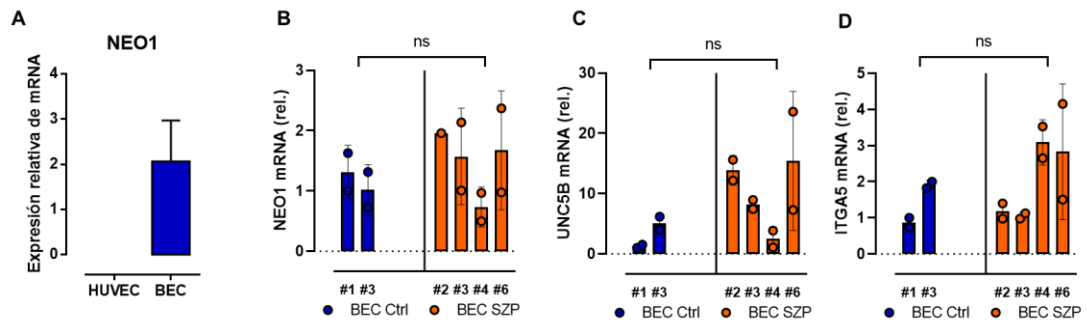


Figura S6. Las BEC SZP presentan variaciones en la expresión de receptores neuroangiogénicos. (A) La cuantificación mediante qPCR de los niveles de mRNA de *NEO1* en HUVEC y BEC muestra que este último se expresa sólo en BEC y no en HUVEC, tal como se ha indicado anteriormente. **(B-D)** Seis hiPSC, dos Ctrl y cuatro SZP, fueron diferenciadas a BEC dos veces cada una de manera independiente. Cuantificación mediante qPCR de los niveles de mRNA de *NEO1* (B), *UNC5B* (C) e *ITGA5* (D) en BEC Ctrl y BEC SZP. Los niveles se expresan como la cantidad de mRNA relativos a los niveles de B2M (gen *housekeeping*) y son graficados como el promedio \pm SD. Se indica para cada caso el número identificador del donante (Ctrl #1 y #2; SZP #2, #3, #4 y #6). Se observa que para todos los transcritos cuantificados existe una gran variación entre los diferentes donantes y en algunos casos inclusive entre las réplicas celulares del mismo donante.

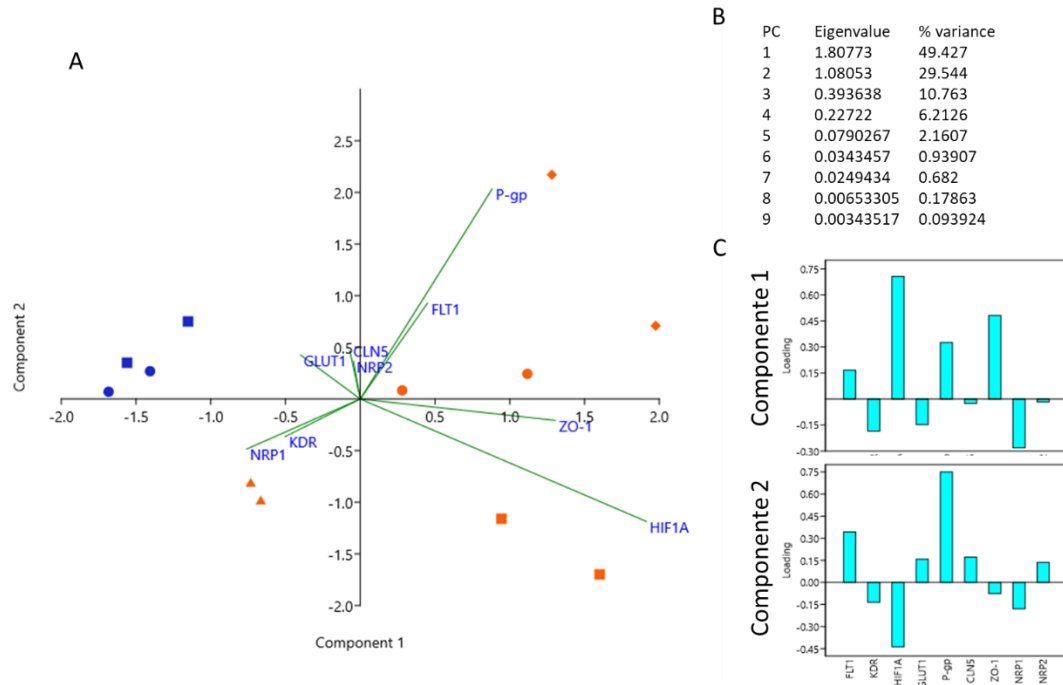


Figura S7. Los niveles de mRNA de moléculas angiogénicas y de barrera varían entre BEC Ctrl y BEC SZP.

Análisis de Componentes Principales realizado a los niveles de transcrito obtenidos en las BEC Ctrl y BEC SZP. (A) Gráfica del componente 2 en relación al componente 1, muestra la distribución de las diferentes líneas celulares: BEC Ctrl #1 ● y #2 ■; BEC SZP #2 ● #3 ▲ #4 ■ y #6 ◆. Los pesos de cada variable se indican con líneas verdes. (B) Tabla muestra el porcentaje de varianza explicado por cada una de las componentes, donde se comprueba que las componentes 1 y 2 explican cerca del 80% de la varianza. (C) Las gráficas muestra el peso de cada una de las variables en las dos primeras componentes.

PUBLICACIONES

hiPSC-derived neural stem cells from patients with schizophrenia induce an impaired angiogenesis.

Bárbara S. Casas, Gabriela Vitória, Marcelo N. do Costa, Rodrigo Madeiro da Costa, Pablo Trindade, Renata Maciel, Nelson Navarrete, Stevens K. Rehen y Verónica Palma

Translational psychiatry, 2018; 8(1), 48. doi:10.1038/s41398-018-0095-9

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Development meeting 2020: From Stem Cells to Human Development (Online, 2020)

“Impaired neuro-angiogenic crosstalk involved in Schizophrenia etiopathogenesis: an hiPSC-derived neurodevelopmental study” **Bárbara Casas**, Sofía Puvogel, Gabriela Vitória, Marcelo Costa, Stevens Rehen y Verónica Palma

Reunión Club Cajal 2019 (Puerto Varas) “Impaired neuro-angiogenic crosstalk in

Schizophrenia: an hiPSC-derived neurodevelopmental study” **Bárbara Casas**, Tomás Monteverde, Sofía Puvogel, Joaquín Cerda, Gabriela Vitória, Marcelo Costa, Stevens Rehen y Verónica Palma.

XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile (Puerto Varas, 2018)

“Characterization of the neurovascular unit by means of a multicellular isogenic schizophrenia-derived hiPSC model” **Bárbara Casas**, Tomás Valdeverde, Gabriela Vitória, Marcelo Costa, Markus Uhrig, Fernando Ezquer, Stevens Rehen y Veronica Palma,

IX Latin American Society for Developmental Biology Meeting 2017 (Medellín,

Colombia). Schizophrenia-derived Neural Stem Cells induce an impaired angiogenesis **Casas B.**, Vitoria G., Costa M., Díaz. V., Rehen S. and Palma V.

FINANCIAMIENTO

Beca CONICYT para estudios de Doctorado en Chile N° 21150781 otorgada por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), República de Chile, 2015-2019.

Premio L'Oréal -UNESCO For Women in Science 2019

Beca CONICYT para Asistencia a Eventos para Estudiantes de Doctorado, convocatoria 2019.

IBRO-LARC Short Stay Grants award otorgada por la International Brain Research Organization para financiar la asistencia a una pasantía en Brasil Rio de Janeiro, 2019

LASDB award 2017 Beca de asistencia al XI Latin American Society for Developmental Biology meeting.

Beca CONICYT para Asistencia a Eventos para Estudiantes de Doctorado, convocatoria 2017.

IBRO-LARC Travel Grants award otorgada por la International Brain Research Organization para financiar la asistencia a un curso internacional en Brasil, 2016.