

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO



“Contribución de los astrocitos al establecimiento de la esquizofrenia, mediante la secreción de factores neuroangiogénicos”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Tomás Monteverde Faúndez

Director del Seminario de Título:

Dra. Verónica Palma

12/10/19, Septiembre 2019

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Tomás Monteverde Faúndez**

“Contribución de los astrocitos a la patogénesis de la esquizofrenia”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título: Verónica Palma

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____

Santiago de Chile, 12/09/2019

Biografía

Nací el 14 de enero de 1995 en la ciudad de Santiago, Chile. Toda mi vida he vivido en esta ciudad, que me ha visto crecer con el paso de los años. A los 6 años entre al pre-escolar del Colegio William Kilpatrick, en donde estudiaría hasta los 13 años. Posteriormente finalice mis estudios de enseñanza media en el colegio Compañía de María Apoquindo. En donde generé gran parte de mis amistades que me acompañan hasta el día de hoy.

Es en este mismo contexto de la enseñanza media, en donde me doy dando cuenta de mis intereses hacia las ciencias en general, tanto Física, Química y Biología fueron asignaturas de mi pleno agrado durante estos años. En segundo medio durante la unidad de genética, recuerdo que algo hizo clic en mí, llevándome a investigar cómo podría dedicar mi vida alrededor de esta área. Es así como descubrí la existencia de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, la cual creía era la mejor de las formas para desarrollarme en mi área de interés de ese entonces.

Una vez admitido en la carrera en la Universidad de Chile, comenzó este camino de lleno de nuevas experiencias, amistades y aprendizajes. En donde fui adentrándome cada vez más en este nuevo mundo de la ciencia. Una vez llegada mi entrada al laboratorio de la Dra. Verónica Palma en el año 2017, no pare de enamorarme de aquello que había decidido estudiar y supe que era el lugar correcto en el que estar. Aprendí de muchas personas distintas durante este tiempo, y no puedo estar más agradecido, debido a que fueron sin duda una parte fundamental de mi formación.

Hoy me encuentro en la fase final de este proceso de formación, con ganas de seguir aprendiendo intensamente como lo he hecho estos últimos años. Aun me encuentro con incertidumbre acerca de qué camino seguir una vez concluido este ciclo, pero sin duda alguna de que tome la decisión correcta al estudiar esta carrera.

Agradecimientos

Hay tantos a quienes quiero agradecer que parece difícil saber por donde comenzar. Primero quiero agradecer a mi familia, a mi madre Mónica y a mi padre Franco, ustedes que me formaron desde el primer día, tal vez no lo digo con suficiente frecuencia, pero a ustedes les debo todo. Han sido un apoyo constante durante mi vida y a pesar de tener momentos altos y bajos, sé que siempre he podido contar con ustedes cuando más lo necesito. A mis hermanas Elisa y Sofía, son la alegría de mi vida y no me podría imaginar la vida sin ustedes.

A la Dra. Verónica que desde el primer día me hizo sentir como un integrante más de este hermoso grupo de trabajo. Su compromiso con mi formación, junto con sus críticas y guías han sido pilar estructural dentro de mi formación crítica hacia la ciencia. Gracias también a Andrea y Bárbara, mis guías del día a día, sé que pusieron mucho tiempo y esfuerzo formarme lo mejor posible dentro del laboratorio, y no saben lo inmensamente feliz que me hace haber tenido la oportunidad de aprender de ustedes.

Al resto de la gente que trabajó conmigo en el laboratorio, en especial a Nacho, Dani, Sofi, David e Issac que fueron con quienes más compartí, agradezco su paciencia, comprensión y ganas de ayudar cuando los necesite. Tanto en ámbitos científicos como fuera de ellos, gracias por el tiempo compartido.

Gracias a mis amigos del colegio, ellos que siempre fueron el escape que necesite cuando las cosas no iban bien, ya que de tanto ensayo y fallo la mente necesita descansar. Gracias Coni, Feña, Guille, Cami, Maida, Alvaro, Zoran y Vicho, por ser

esa ancla emocional que uno muchas veces necesita. Al resto de mis amigos y amigas, saben que los adoro, pero no caben todos aquí, lo que no significa que no fueran y sigan siendo muy importantes para mí.

Finalmente, a mi compañera de vida, quien me acompañó y soportó por estos últimos 4 años. Sofía no hay palabras para lo que has sido durante este tiempo para mí, es difícil plasmar en palabras lo que han sido 4 años de alegrías, rabias, penas, encantos y desencantos. De ti aprendí tanto que es imposible agradecerte lo suficiente por dejarme ser parte de tu vida, y pasar a formar una juntos. Gracias por formar conmigo el núcleo de mis relaciones que me llevan a estar donde estoy hoy.

Financiamiento

Para la realización de este Seminario de Título se contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT # 1190083 titulado “IPS DERIVED CELL MODELS REVEAL NEUROVASCULAR ALTERATIONS ASSOCIATED WITH THE ONSET OF SCHIZOPHRENIA”, cuyo Investigador Responsable es la Dra. Verónica Palma.

Índices

Abstract	3
1. Introducción	5
1.2 Unión neurovascular	7
1.3 Afecciones a la Barrera Hematoencefálica en desórdenes mentales	8
1.4 Rol de los astrocitos en la mantención de la Barrera Hematoencefálica	9
1.5 Planteamiento del problema	12
1.6 Hipótesis	12
1.7 Objetivo general	12
1.8 Objetivos específicos	12
2. Materiales y Métodos	13
2.1 Cultivo de astrocitos	13
2.2 Caracterización mediante marcadores de astrocitos por PCR	14
2.3 Inmunofluorescencia de cultivos de astrocitos	15
2.4 Extracción de Medio Condicionado de cultivos de astrocitos	16
2.5 Arreglo del perfil angiogénico proteómico	17
2.6 Ensayo de formación túbulos	17
2.7 Ensayo de la membrana corio-alantoidea del embrión de pollo (CAM)	18
2.8 Análisis estadístico	21
3. Resultados	21
3.1 Establecimiento de las condiciones de cultivo de astrocitos derivados de hiPSC	21
3.2 Caracterización de astrocitos mediante PCR	22
3.3 Caracterización de astrocitos mediante Inmunofluorescencia	23
3.4 Ensayo de crecimiento	25
3.5 Arreglo Proteómico	26
3.6 Evaluación del potencial angiogénico de los CMs	30
3.6.1 Ensayo de Túbulos (<i>In vitro</i>)	30

3.6.2	Ensayo CAM (<i>In vivo</i>) combinado con el uso de andamiajes tridimensionales tipo esponjas basados en biocelulosa	32
4.	Discusión y Proyecciones	36
4.1	Cultivo y caracterización.....	38
4.2	Expresión de moléculas angiogénicas.....	44
4.3	Ensayos funcionales	48
4.3.1	Ensayo angiogénico (<i>in vitro</i>)	48
4.3.2	Ensayo angiogénico (<i>in vivo</i>)	50
4.4	Proyecciones	54
	Conclusiones.....	56
	Referencias	58
	Anexos.....	73

Índice Figuras

Figura 1.	8
Figura 2.	20
Figura 3.	22
Figura 4.	23
Figura 5.	24
Figura 6.	25
Figura 7.	30
Figura 8.	32
Figura 9.	34
Figura 10	36

Índice de Tablas

Tabla 1	26
Tabla 2	28
Anexo 1	73
Anexo 2	73

Lista de abreviaturas

BBB	Barrera Hematoencefálica, por sus siglas en inglés <i>Brain Blood Barrier</i>
BECs	Células Endoteliales Cerebrales, por sus siglas en inglés <i>Brain Endothelial Cells</i>
CAM	Membrana corioalantoidea, por sus siglas en inglés <i>Corioalantoide membrane.</i>
CM	Medio condicionado o secretoma, por sus siglas en inglés <i>Conditioned media</i>
IF	Inmunofluorescencia
hiPSC	Células pluripotentes inducidas humanas, por sus siglas en inglés <i>human induced pluripotent stem cells</i>
HUVEC	Células de la vena del cordón umbilical humano, por sus siglas en inglés <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
NTN-1	Netrina-1
NVU	Unión Neurovascular, por sus siglas en inglés <i>neurovascular unit.</i>
PC	Paciente control
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena, por sus siglas en inglés <i>polimerase chain reaction.</i>
PE	Paciente esquizofrénico
ROS	Especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés <i>reactive oxygen species</i>
RTQ	Receptor tirosina quinasa
SNC	Sistema Nervioso Central.
TJ	Uniones Estrechas, por sus siglas en inglés <i>tight junctions</i>

VEGF Factor de crecimiento de endotelio vascular, por sus siglas en inglés
Vascular endothelial grown factor

VEGFR Receptor del factor de crecimiento de endotelio vascular, por sus siglas en
inglés *Vascular endothelial grown factor receptor*

Resumen

La esquizofrenia es un desorden mental que afecta a cerca del 1% de la población mundial. Su origen no tiene una causa única, se reconoce que existen factores tanto genéticos como ambientales involucrados en gatillar el desarrollo de la enfermedad. Datos recientes indican que esta patología se generaría durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso. Correlaciones clínicas sugieren una relación entre el padecimiento de la enfermedad con una disrupción de la barrera hematoencefálica (BBB), lo que sumado a la neuroinflamación observada en estos pacientes, guiaría a deficiencias en la conectividad neuronal, pérdidas de materia gris y distribución anormal de neuronas. La principal función de la BBB es la mantención de la homeostasis del sistema nervioso central (SNC), siendo crítica su establecimiento durante el desarrollo para lo que requiere de la interacción de diferentes estímulos y tipos celulares: a esta unidad funcional se le conoce como unión neurovascular (NVU). Dentro de los componentes de la NVU encontramos a los astrocitos, los cuales poseen principalmente un rol en la mantención del fenotipo de las células endoteliales cerebrales (BECs). Por lo que un desbalance en la secreción de moléculas neuroangiogénicas por parte de los astrocitos potencialmente contribuiría en la alteración de la formación de la NVU, favoreciendo así la disrupción de la BBB.

En el siguiente seminario se buscó evaluar si existen diferencias en el perfil y función de moléculas angiogénicas secretadas por astrocitos derivados desde células troncales humana inducidas (hiPSC) de pacientes esquizofrénicos (PE) versus control (PC). A

partir de medio condicionado (CM) provenientes de astrocitos, mediante un arreglo proteómico se comparó la secreción de moléculas relacionadas con diferentes vías pro y antiangiogénicas. Adicionalmente los CM fueron ensayados *in vitro* mediante ensayo de túbulos con células endoteliales de la vena cordón umbilical (HUVEC) e *in vivo* en un ensayo sobre la membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo. No se detectaron diferencias significativas en el perfil de secreción entre CMs de PC y PE, pero si se observaron diferencias en los ensayos funcionales. Los resultados nos permiten sugerir que los efectos observados en los ensayos funcionales se deberían probablemente a la acción de vías angiogénicas no canónicas. Estas alteraciones podrían derivar en un menor aporte de factores tróficos a la NVU, impactando a su vez en el correcto desarrollo y mantención de la BBB y, ergo, en el funcionamiento del cerebro de PE.

Abstract

Schizophrenia is a mental disorder that affects around 1% of the world population. Its origin doesn't have a single cause, both genetic and environmental factors are involved in the development of the disease. Recent data indicate that this pathology is generated during embryonic development of the central neural system (SNC). Clinical correlations suggest a relationship between the disease and a disruption of the brain blood barrier (BBB), which added to the neuroinflammation observed in patients would lead to cerebral connectivity impairment, loss of gray matter and abnormal distribution of neurons. The main function of the BBB is the homeostasis maintenance of the SNC, for which it requires the interaction of different stimulus and cell types conforming a functional unit known as neurovascular unit (NVU). Within the components of the NVU we find astrocytes, which main role consists in the maintenance of the brain endothelial cells (BECs) phenotype. Hence, an imbalance in the secretion of angiogenic molecules by the astrocytes potentially could contribute to alterations in the establishment of the NVU, leading to the disruption of the BBB.

In this seminary we evaluated potential differences in profile and function of the angiogenic molecules secreted by human induced pluripotent stem cells (hiPSC)-derived astrocytes from schizophrenic patients (PE) versus control patients (PC). Through astrocytes conditioned medium (CM) analysis via proteomic assay we compared the secretion of molecules related with both pro and antiangiogenic pathways. Additionally, CM were tested *in vitro* through a human umbilical vein

endothelial cells (HUVEC) tube formation assay and *in vivo* in a corioallantoide membrane assay (CAM) on chicken embryos. Although no significant differences in the secretion profile between CMs of PC and PE could be found, we do observe disparities in the functional assays. These results allow us to suggest that the effects non-canonical pathways most likely are participating and account for the difference in the angiogenic potential among CMs from PC and PE. Those alterations in angiogenic potential could derive in a lower contribution of trophic factors to the NVU, impacting on its proper development and consequently on the BBB and thus, on brain function of PE.

1. Introducción

La esquizofrenia se considera un trastorno mental que afecta alrededor del 1% de la población mundial (Häfner y an der Heiden, 1997). Este trastorno se caracteriza fisiológicamente por una pérdida de materia gris en áreas como la corteza frontal (Turetsky y col., 1995, Fornito y col., 2009) y el hipocampo (Heckers y Konradi, 2010, Velakoulis y col., 1999), así como por alteraciones en marcadores astrogliales (Bloomfield y col., 2015). Actualmente, no existe cura para la esquizofrenia y los tratamientos farmacológicos son incapaces de suprimir por completo los cuadros psicóticos, trayendo además consigo una serie de efectos secundarios indeseados que conducen a interrupción del tratamiento por parte de los pacientes (Lieberman y col., 2005). La falla en las aproximaciones para generar tratamientos se debe en parte a que la etiología de la esquizofrenia no está resuelta, se postula que incluye tanto factores ambientales como genéticos (recapitulado en Insel, 2010 y Huckins y col., 2019). Múltiples estudios la han postulado como una enfermedad del neurodesarrollo (recapitulado en Lewis y Levitt, 2002, Walsh y col., 2008), esto ya que se ha asociado tanto a una deficiencia en el proceso de maduración del cerebro durante la adolescencia (Feinberg, 1982), el sometimiento a estrés en el proceso de maduración del sistema nervioso en pacientes con un consecuente daño en su desarrollo temprano (Weinberger, 1987), o el hecho que incluso entre gemelos idénticos con factores de riesgo de esquizofrenia puede que alguno de ellos no la padezca (Murray y Lewis, 1987), indicando así que la genética no es del todo determinante para gatillar el desarrollo de la enfermedad.

1.1 Trabajo con células troncales pluripotentes humanas inducidas

Las células troncales pluripotentes humanas inducidas (hiPSC) son células con la capacidad de generar todos los linajes celulares embrionarios. Estas son generadas a partir de células somáticas, modificadas mediante la introducción de factores de transcripción maestros, borrando así las marcas epigenéticas y permitiendo su reprogramación (Takahashi y Yamanaka, 2006, Takahashi y col., 2007). Como células troncales, son capaces de dar origen a diferentes linajes de las capas germinales (Bock y col., 2011), dependiendo del método de diferenciación que se utilice. El poder generar este tipo de células ha generado una revolución en el área de la biomedicina; múltiples estudios las han utilizado como modelos para estudiar enfermedades de toda índole (Yagi y col., 2011, Jung y Bernstein, 2014) y otros las han planteado como una alternativa de terapia celular (Kanemura y col., 2014, Sundberg y col., 2013). Esto se debe a que el trabajo con estas células posee una serie de ventajas, como mantener las características genéticas del individuo del que provienen, o la posibilidad de generar cultivos primarios de linajes que de otra manera solo se podían obtener de tejido post-mortem.

Durante el último tiempo, se han usado las hiPSC para estudiar el linaje neuronal y glial, en el contexto de la enfermedad de la esquizofrenia (Brennand y col., 2011, Tran, Ladrán y Brennand, 2012). En estos trabajos se han podido encontrar diferencias funcionales que presentan las células provenientes de pacientes esquizofrénicos (PE)

respecto a pacientes control (CP), tanto a nivel de progenitores neurales (Brennan y col., 2015) como de neuronas (Hook y col., 2014). El hecho de encontrar estas diferencias ha permitido dilucidar la existencia de vías de señalización específicas afectadas, que den cuenta de la aparición y/o desarrollo de la enfermedad.

1.2 Unión neurovascular

El desarrollo del sistema nervioso se da en conjunto con el sistema vascular. En esta interfaz hay una serie de células y moléculas que estarán interactuando íntimamente, formando una unidad funcional conocida como la unión neurovascular (NVU). Esta está conformada por células endoteliales, pericitos, lamina basal, prolongaciones de los astrocitos, microglías, junto con otros componentes secretados por las células que permiten mantener las propiedades e interactúan modulando esta interfaz (Fig. 1). La función de la NVU es conferir propiedades de barrera a las células endoteliales del ce-

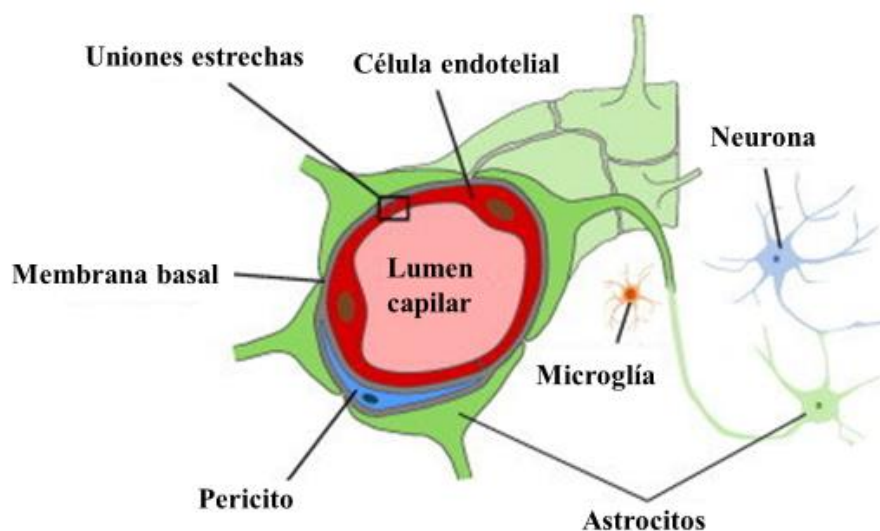


Figura 1. Esquema de la unión neurovascular y sus principales componentes celulares. (Modificado a partir de Heye y col., 2014).

rebrote (BEC). Dentro de las propiedades que poseen estas células se encuentra la presencia de uniones estrechas (TJ) (Brightman y Reese, 1969), la ausencia de fenestraciones, una baja tasa de transcitosis, la presencia de transportadores de eflujo como Pgp y BCRP, y de nutrientes como Glut-1 y Lat-1 (Abbott y col., 2010), también presentan una disminución en la expresión de moléculas de adhesión a leucocitos (Blanchette y Daneman, 2015). Todas estas propiedades permiten que las BECs actúen como una barrera altamente selectiva entre la vasculatura y el SNC contribuyendo a la homeostasis del sistema.

1.3 Afecciones a la Barrera Hematoencefálica en desórdenes mentales

El fenotipo característico de las BECs se establece a lo largo de la conexión entre la vasculatura y el SNC generando la BBB. Gracias a las particulares propiedades

mencionadas anteriormente, las BECS son capaces de regular el paso de sustancias desde el sistema sanguíneo al SNC, sacar del sistema sustancias capaces de permear la barrera a través de los transportadores de eflujo, y mantener la quiescencia del sistema inmune dentro del SNC. La BBB es fundamental en la mantención de la homeostasis en un sistema delicado como lo es el SNC, por lo que la disrupción o el aumento en la permeabilidad de la BBB se ha asociado con múltiples enfermedades del neurodesarrollo o neurodegenerativas (recapitulado en Stolp y Dziegielewska, 2009). Diversos estudios, utilizando datos clínicos, han correlacionado la disrupción de la BBB en pacientes con enfermedades como el Alzheimer o Esclerosis múltiple (Bowman y col., 2007, Patel y Frey, 2015), sin esclarecer si esta es una causa o consecuencia de la enfermedad. Particularmente en esquizofrenia, se planteado que el aumento en la permeabilidad o disrupción de la BBB sería un factor contribuyente en la neuroinflamación que se observa en PE. El determinar cómo se produce este aumento en la permeabilidad, y si es que éste es parte del establecimiento de esta patología, ayudaría tanto al diagnóstico de la enfermedad, así como al desarrollo de tratamientos con el fin de reestablecer el balance del SNC, alterado por la invasión del sistema inmune (Busse y col., 2012, Bechter y col., 2010).

1.4 Rol de los astrocitos en la mantención de la Barrera Hematoencefálica

Los astrocitos, como parte de la NVU, cumplen un rol en de la mantención del fenotipo de barrera, más que en la inducción de la misma. En mamíferos, la formación de la BBB comienza con el reclutamiento de progenitores endoteliales alrededor de plexo

perivascular, proceso mediado por moléculas secretadas por progenitores neurales (Hellstrom, Abramsson y Betsholtz, 1999). Este proceso ocurre previo a la gliogénesis; se ha visto en ratones que este proceso sucede alrededor del día embrionario 11 (E11), en tanto la generación de los astrocitos resulta ser un proceso que se desarrolla desde un prenatal tardío (E17) hasta al menos del día postnatal 3 (Sauvageot y Stiles, 2002, Daneman y col., 2010a, Yang, Higashimori y Morel, 2013). Previo a la aparición de astrocitos, las células endoteliales del SNC restringen el paso de sustancias (Daneman y col., 2010a), probablemente por el aumento en la expresión de TJ observado a la par con el proceso angiogénico (Daneman y col., 2009, 2010b). Sin embargo, se ha reportado que la resistencia transepitelial generada por las BECs, sigue aumentando en periodos postnatales (Butt, Jones y Abbott, 1990), sugiriendo fuertemente la existencia de un proceso de maduración de la BBB, en el cual parecen estar involucrados los astrocitos.

A pesar de que múltiples trabajos han planteado la capacidad inductora del fenotipo de BECs por parte de los astrocitos (Rubin y col., 1991, Alvarez y col., 2011) hay estudios que muestran la aparición de propiedades de barrera incluso previo a la aparición de los astrocitos dentro del desarrollo del SNC (Ben-Zvi y col., 2014, Sohet y col., 2015). Hoy en día existen diferentes hipótesis que explicarían esta discrepancia. Una de ellas plantea que los astrocitos no serían requeridos para la inducción del fenotipo de las BECs, pero sí para su mantención. Esto debido por ejemplo a la expresión y secreción del ligando de la vía Wnt/ β -catenina, el cual se sabe es necesario tanto para la inducción como mantención de la BBB (Blanchette y Daneman, 2015). Además, se tiene

conocimiento de otras moléculas moduladoras de la BBB presentes en el CM de astrocitos (Blanchette y Daneman, 2015), como son Sonic Hedgehog (SHH), agiopoetinas, angiotensinogen y ApoE. Por otro lado, los astrocitos también tienen la capacidad de expresar moléculas capaces de disrumpir la BBB, entre las que encontramos moléculas con propiedades migratorias y/o angiogénicas como son Netrina 1 (NTN1), Factor de Crecimiento Vascular (VEGF), Factor de crecimiento Fibroblástico básico (FGFb) o MMPs, entre otras. Estas últimas, se ha visto también, tienen una importante función en el desarrollo neural. A este microambiente en donde se encuentran e interactúan estas moléculas con propiedades moduladoras tanto para la vasculatura como el SNC lo denominaremos nicho neuroangiogénico.

Existe una íntima relación entre el sistema vascular y el sistema neural, esto debido a su similar distribución a lo largo del cuerpo y la codependencia existente para su correcto desarrollo (recapitulado en Park, Choi y Kim, 2003). Se ha descrito la presencia de factores secretados por el nicho neuroangiogénico, siendo estas moléculas capaces de modular procesos de neurogénesis y guía axonal, así como de angio y vasculogénesis. Por tanto, un desbalance en la secreción de parte de los astrocitos de algunas de las moléculas anteriormente mencionadas podría afectar fuertemente el nicho neuroangiogénico, la BBB y ergo, el desarrollo normal del SNC. En línea con este planteamiento, recientemente se han sido descrito diferencias en la secreción y función de moléculas neuroangiogénicas entre PE y PC por parte de células troncales neurales y neuroesferas derivadas a partir de hiPSC (Casas y col. 2018). Sin embargo, a la fecha esto no se ha estudiado la contribución de los astrocitos.

1.5 Planteamiento del problema

En vista de la evidencia mostrada que denota un rol modulador de los astrocitos sobre la BBB, y adscribiendo a la hipótesis que plantea a la esquizofrenia como una enfermedad del neurodesarrollo en este trabajo se buscó evaluar la contribución causal de lo astrocitos a un posible desbalance del nicho neuroangiogénico. Para ello específicamente se planteó la comparación de los CMs de astrocitos derivados de hiPSC de PC y de PE, midiendo tanto sus diferencias a nivel de expresión de moléculas angiogénicas como su potencial angiogénico sobre células endoteliales.

1.6 Hipótesis

Existen diferencias en la expresión de moléculas angiogénicas entre los CMs de astrocitos provenientes de hiPSCs de PC y de PE, las cuales contribuyen al establecimiento de la esquizofrenia, mediante la modulación de la maduración de las células endoteliales.

1.7 Objetivo general

Comparar los perfiles angiogénicos de astrocitos derivados de hiPSC de PC y de PE, y evaluar su potencial función sobre las propiedades de células endoteliales.

1.8 Objetivos específicos

1. Evaluar la presencia de moléculas pro y anti-angiogénicas presentes en el CM de los astrocitos PC versus PE mediante ensayo proteómico.

2. Evaluar a través de ensayos funcionales, tanto *in vitro* como *in vivo*, el potencial angiogénico que tienen los CMs de PC y PE sobre células endoteliales.

2. Materiales y Métodos

2.1 Cultivo de astrocitos

Los astrocitos para este estudio fueron derivados a partir de hiPSC en el laboratorio del colega y colaborador Dr. Stevens Rehen (Instituto D'Or, Rio de Janeiro, Brasil), a partir de muestras obtenidas de PC y PE. Para este trabajo, se utilizaron 2 líneas control y 3 esquizofrénicas, las características de cada una se especifican en el Anexo 1. Las células fueron cultivadas de modo adherente en botellas, y como medio de cultivo éstas usaron DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) con 10% de Suero Fetal Bovino (PAN BIOTECH, Aidenbach, Bavaria, Alemania). Para la mantención de los cultivos de astrocitos se les cambia el medio día por medio o cada 2 días, y se subcultivan 1 vez cada 2 semanas cuando llegan a tener una confluencia de entre un 80 a 90%. Este tiempo puede variar dependiendo de la línea particular y de la cantidad de células cultivadas inicialmente. Para el subcultivo de los astrocitos se les retiró el medio. Seguidamente se lavó con PBS por 3-5 min, se retiró el PBS y se agregó Tryple (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) para soltar las células. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se lavó con PBS y se centrifugó a 300g por 4 minutos. El pellet celular fue resuspendido y homogenizado en el volumen de medio correspondiente para su uso.

2.2 Caracterización mediante marcadores de astrocitos por PCR

Se buscó comprobar la expresión de moléculas descritas en la literatura como marcadores clásicos de astrocitos mediante la técnica reacción de polimerasa en cadena (PCR, por sus siglas en inglés.)

El RNA fue obtenido de astrocitos cultivados en botella mediante extracción fenol-cloroformo usando Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) o RNA-solv (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA), según las instrucciones del fabricante. El pellet obtenido fue resuspendido en agua libre de nucleasas (DEPC Treated water, Invitrogen). Se cuantificó el RNA extraído mediante su absorbancia a 260nm en un lector de placas InfiniteM200 PRO.

El cDNA fue sintetizado a partir de 1µg de RNA con el kit M-MLV de transcriptasa reversa (Promega, Madison, WI, USA), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

La expresión génica relativa fue medida por PCR convencional con el kit go taq (Promega, Madison, WI, USA) usando partidores diseñados para los genes especificados en el Anexo 2 Suplementarios. Los partidores de los genes utilizados como marcadores de astrocitos, *GFAP* y *S100B*, fueron diseñados a partir del programa AmplifX (Marsella, Francia) con las siguientes restricciones: tamaño de x-20 pares de bases (pb), una temperatura de melting 60 ± 1 °C, y un tamaño de amplificado de entre 150 y 400 pb. Se probó la especificidad de los partidores a través de la herramienta PrimerBlast (MD, USA). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones:

- Denaturación inicial: 95°C por 2 min.
- Repetición por 40 ciclos de:
 - Denaturación: 95°C por 30 s
 - Hibridación: 60°C por 30s
 - Elongación: 72°C por 30s
- Elongación final: 72 por 5min

Se analizaron los amplicones usando un gel 2% agarosa en solución buffer TMED con Gelred 1X (1/10000), separándolos a través de una electroforesis a 90V por 1 hr. Las imágenes fueron obtenidas a través de una cámara X utilizando un transiluminador-UV.

2.3 Inmunofluorescencia de cultivos de astrocitos

La inmunofluorescencia se realizó para caracterizar fenotípicamente los astrocitos utilizados durante el estudio. Las células fueron lavadas con PBS, y fijadas con paraformaldehído 4% en PBS a temperatura ambiente por 10 min. La permeabilización se realizó con solución salina PBS 0,2% Tritón 100x (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 5 min a temperatura ambiente. La solución de bloqueo constó de PBS 3% albumina de suero bovino, con el que se incubó las muestras en una cámara oscura y húmeda por 30 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron incubados, en solución de bloqueo, durante la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron *GFAP* (marcador de astrocitos, conejo, Sigma, 1:400), TUJ1 (marcador neuronal, pollo, Aves

labs, 1:1000). Los anticuerpos secundarios, junto con el de faloidina, fueron incubados por 1 hr 30 min en una cámara oscura y húmeda a temperatura ambiente. Estos fueron anti-conejo (Alexa fluor 488, cabra, Thermo Fisher, 1:250), anti-pollo (Alexa fluor 488, cabra, Invitrogen, 1:500) y faloidina-rhodamina (marcador de filamentos de actina, Life tec, 1:250). Posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, se incubó con 4' -6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (marca nuclear, 1:10000) por 5 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes fueron tomadas en la unidad de microscopia avanzada de la Pontificia Universidad Católica de Chile en un microscopio Zeiss 810. Cada fotografía fue tomada con una magnificación de 20X.

2.4 Extracción de Medio Condicionado de cultivos de astrocitos

Los astrocitos fueron crecidos en botellas T-75 hasta un 80% de confluencia. Se lavaron y se recambió el medio a 10 ml de DMEM/F-12 sin suero (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), el cual fue colectado a las 48 hrs y congelado inmediatamente a -80°C. El día de la colección de medio había 400 mil células por mL de CM, esta información se obtuvo al contarlas en una cámara de Neubauer. A estas muestras preparadas en el laboratorio de la Dra. Verónica Palma se les llamará CMs vp. Por otra parte, se contó con 2 batchs de CM congelados, preparadas por nuestros colaboradores en Brasil. La primera, corresponde a muestras de 2 PC (C1, C2) y 3 PE (ES1, ES2, ES3), éstos se denominarán CMs, y de éstos se desconoce la cantidad de células de las que provienen los secretomas. El segundo batch, corresponde a muestras de 3 PC (C1,

C2, C3) y 3 PE (ES1, ES2, ES3), se referirán a estos como CMs*, de los cuales se conoce el número exacto de células del que provienen (1.5×10^6 células/mL).

2.5 Arreglo del perfil angiogénico proteómico

La presencia de moléculas secretadas, moduladoras del proceso angiogénico, fue evaluada mediante el kit del arreglo proteómico de perfil angiogénico humano (Catálogo # ARY007, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las marcas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia potenciada y la intensidad de cada una cuantificada mediante ImageJ (NIH, USA). La intensidad de cada molécula fue obtenida en duplicado y normalizada por los 3 controles internos que posee este arreglo.

2.6 Ensayo de formación túbulos

Para evaluar el potencial angiogénico de los CM de astrocitos, se realizó un ensayo de formación de túbulos utilizando un cultivo primario de células endoteliales del cordón umbilical (HUVEC) según lo previamente descrito (Prieto y col., 2017) y establecido en el laboratorio de la Dra Palma. Se sembraron 55.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos junto con el estímulo a probar, la cual se incubó previamente con Matrigel por 1 hr. Los estímulos probados fueron CM de astrocitos control (C1, C2) y de paciente esquizofrénico (ES1, ES2 y ES3), DMEM/F-12, medio de crecimiento endotelial (EGM, Lonza, Verviers, Belgium, usado como control positivo), medio basal endotelial (EBM, Clonetics, Walkersville, MD, USA, usado como control negativo). Cada condición se realizó por duplicado. Después de 4 hrs de haber sido

sembradas las células, se tomaron las fotografías de cada pocillo. La cuantificación de las ramificaciones y estructuras tubulares formadas se realizó contando a través del programa ImageJ (NIH, USA).

2.7 Ensayo de la membrana corio-alantoidea del embrión de pollo (CAM)

La evaluación del potencial angiogénico de los CM *in vivo* se realizó a través de un ensayo CAM, según se lo descrito anteriormente (Casas y col., 2018). Los embriones de pollo (*Gallus gallus* Hyline Brown) se obtuvieron de la Avícola Chorombo (Don Pollo, Pirque, Santiago) en el mismo día de la postura del huevo. Una vez en el laboratorio, los huevos se almacenaron a 5°C hasta su uso, lo que permitió mantener detenido el desarrollo hasta su uso. Antes de comenzar un ensayo, los huevos se extrajeron desde su lugar de mantención a 5°C y se limpiaron con etanol 70%, quitando cualquier remanente de alcohol ya que puede resultar nocivo para la viabilidad del embrión. Luego se les permitió aclimatarse a T° ambiente por 1 hora. Los embriones se ingresaron a un incubador a 38°C, 75% humedad y con agitación periódica cada 30 minutos (GQF Manufacturing Co. Modelo 1502), esto equivale al día 0 de experimentación (E0). El primer día después del comienzo de la incubación (E1), se removió 3 ml de albumina de cada huevo, al día 4 (E4) se abrió una ventada de aproximadamente 2 cm². Se utilizó una matriz de biocelulosa de origen bacteriano (sham) de origen casero, como dispositivo para entregar el estímulo, para lo cual fue incubada con 100 µL del estímulo a ser probado. Se probó: CM de C1, C2, SZ1, SZ2, SZ3, DMEM/F-12, VEGF-A (como control positivo) y PBS (como control negativo).

En E8 se retiró un grupo de huevos para ser fotografiados las CAM, considerando estas imágenes como representativas de la vascularización al tiempo inicial ($t= 0$) para evaluar el cambio transcurrido luego del tratamiento; estas imágenes se usaron para normalizar respecto al resto de las condiciones. En E8 también se colocó la biocelulosa con el estímulo sobre la CAM usando entre 8 a 10 huevos por condición. En E12, 4 días después de haber sido colocado el estímulo, se procedió a tomar las fotografías de cada huevo, para lo cual se inyectó en el huevo crema de leche en PBS (1:1) como medio de contraste para mejorar la captura de los vasos. Las fotografías se tomaron con una cámara digital HD IC80 (Leica, Heidelberg, Germany). El número de vasos se contó a un radio de 6mm alrededor del estímulo colocado, usando el programa ImageJ (NIH, USA). Para el cálculo del diámetro de vasos, se midieron el largo en pixeles de 50 vasos por huevo y ajustando el tamaño según la amplificación de la imagen usando el programa ImageJ (NIH, USA).

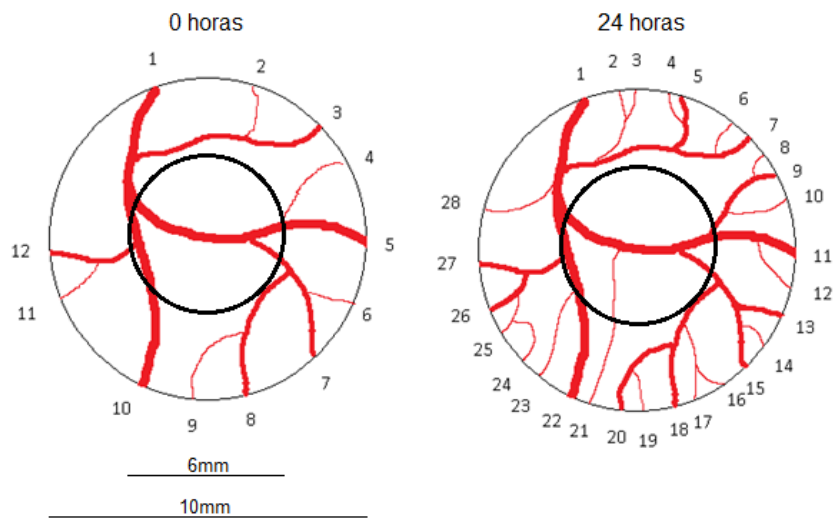


Figura 2. Ejemplo de cuantificación de una imagen obtenida de un CAM. Esquema ilustrativo de conteo de vasos; se muestra una circunferencia con perímetro a 10mm cuyo centro es el estímulo colocado. Independiente de cual sea el estímulo, se señala como un anillo de 6mm que representa el tamaño promedio de una matriz de biocelulosa a modo de ejemplo.

En cumplimiento con los protocolos de bioética, posterior al tiempo de duración establecido del experimento, los embriones fueron sacrificados por decapitación utilizando una tijera de disección. Los restos del embrión y el contenido del huevo fueron traspasados a una botella que es congelada a -20° C. Las cáscaras son depositadas en una bolsa plástica que es congelada a -20° C. Tanto las botellas como las cascaras son retiradas posteriormente por una empresa especializada en el tratamiento de desechos animales (Prosesam). Los resultados fueron contados independientemente por 3 personas, con el fin de generar una cuantificación más robusta.

2.8 Análisis estadístico

Los gráficos mostrados y análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 8, donde los resultados son mostrados como promedio \pm error estándar. Para estudiar diferencias entre los grupos experimentales, se aplicaron los análisis estadísticos Kruskal-Wallis, Kolmogorov-Smirnov y Mann Whitney para datos no paramétrico para comparar 2 grupos y los test Dunn y Turkey de comparación múltiple para la comparación de más de 2 grupos. En todos los casos, se consideró p valor $<$ 0.01 o inferior como diferencia estadísticamente significativa.

3. Resultados

3.1 Establecimiento de las condiciones de cultivo de astrocitos derivados de hiPSC

El trabajo con líneas celulares primarias, como es el caso de los astrocitos derivados desde iPSC, conlleva consigo una serie de complicaciones. Entre ellas, encontramos que poseen un número finito de pasajes o semanas de cultivo en las cuales las características fenotípicas, como son la morfología y la expresión de marcadores propios de su linaje celular, se logran mantener. Junto con ello, todos los cultivos son realizados sin adicionar antibióticos a los medios, por lo que es vital establecer todas las medidas de trabajo necesarias para mantener la asepsia de los cultivos para evitar cualquier tipo de contaminación. El trabajo con líneas primarias de iPSC ya había sido realizado en el laboratorio previamente (en una sala de cultivo que mantiene las condiciones GMP, del inglés por *Good Manufacture Practices*), mas no se había cultivado líneas de astrocitos, por lo que establecer los protocolos tanto de mantención

como de subcultivo de estas células fueron los primeros objetivos de este seminario de título. El cambio de medio se estableció día por medio o cada dos días, dependiendo de la confluencia presentada por el cultivo. Por otro lado, el subcultivo se realizó al estar la placa entre un 80-90% de confluencia (Fig. 3B), lo que se alcanza aproximada-

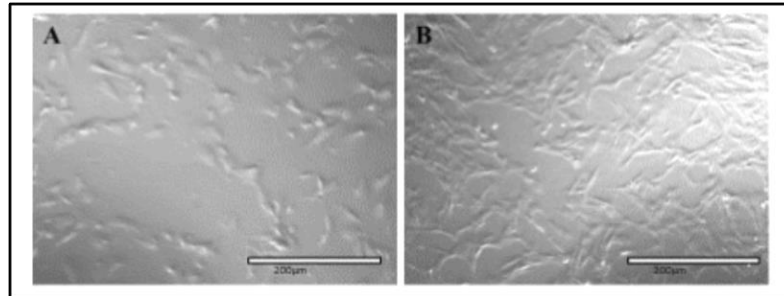


Figura 3. Fotografía representativa de cultivo de astrocitos derivados de iPSCs, observada en campo claro, 10X. (A) Astrocitos 1 día después de haber sido subcultivados. (B) Astrocitos al 80% de confluencia.

mente a las 2 semanas de haber sido sembradas, lo cual podía variar dependiendo de la línea particular con la que se estuviera trabajando. El cultivo es capaz de mantenerse en confluencia mientras se le cambie el medio día por medio, por un periodo cercano a 5 a 7 días.

3.2 Caracterización de astrocitos mediante PCR

Con el fin de corroborar la presencia de los marcadores clásicos de astrocitos como son *GFAP* y *S100B*, se realizó un PCR convencional contra estos genes y como genes de referencia se utilizó *GAPDH* y *B2M*. De las 4 líneas analizadas (2 PC y 2 PE) no se logró amplificación de ninguno de los marcadores de astrocitos (Fig. 4) pese a que si

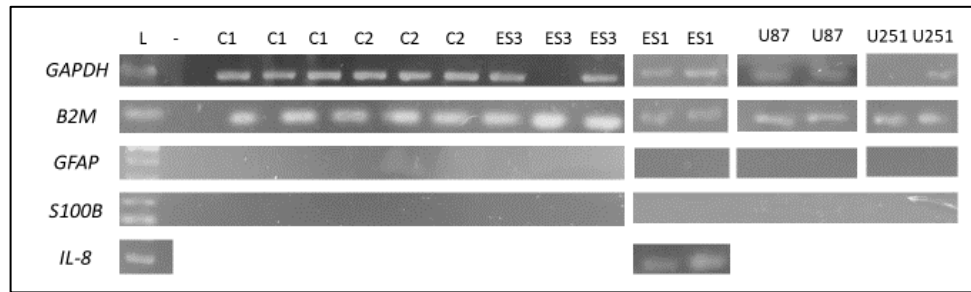


Figura 4. Caracterización de cultivos de astrocitos derivados de iPSC PC y PE mediante PCR convencional. Bandas de la amplificación por PCR para los genes *GAPDH*, *B2M*, *GFAP*, *S100B* e *IL-8* en gel de agarosa al 2%, sobre las líneas de astrocitos PC (C1 y C2), PE (ES1, ES3) y de astrocitoma humano U87 y U251 (controles positivos).

hubo amplificación de los genes de referencia por parte de estas, ilustrado por duplicado en cada caso. Estos genes de referencia también amplificaron para los controles positivos, las líneas humanas de glioma U87 y U251 (Fig 4). Se realizó un PCR de *IL-8*, la cual se sabe es una citoquina secretada por los astrocitos. En la muestra analizada (ES1) si hubo reacción positiva para esta citoquina, sugiriendo que el no observar la amplificación para los genes *GFAP* y *S100B*, además de deberse a la integridad y calidad del cDNA sintetizado podría atribuirse a un problema en el diseño y/o uso de los partidores específicos de astrocitos.

3.3 Caracterización de astrocitos mediante Inmunofluorescencia

Cultivos de astrocitos de paciente esquizofrénico PE, de pasaje 5 (ES1) y 10 (ES3) fueron caracterizados mediante una inmunofluorescencia (IF) anti GFAP. Como se ilustra en las imágenes representativas correspondientes a ES1, los astrocitos analizados (ES1, ES3) muestran una clara marca de GFAP (Fig. 5 E), molécula amplia-

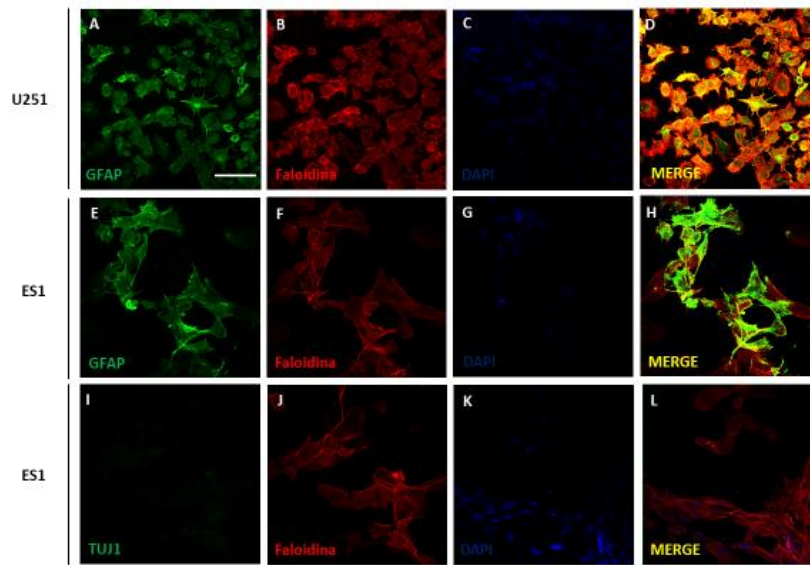


Figura 5. Caracterización de cultivos a través de marcadores de astrocitos y neurona. Inmunofluorescencia de línea de astrocitoma U251 (A-D) y astrocitos en pasaje 5 (E-L) para marcador de astrocitos (A y E) GFAP (verde), marcador neuronal (I) TUJ1 (verde), marca de filamentos de actina (B, F y J) Faloidina (rojo) y marca nuclear (C, G y K) DAPI (azul). (D, H y L) La superposición de los diferentes canales (MERGE; amarillo). Imágenes representativas (N=2, 2 PE). Barra de escala 50µm.

mente descrita y validada como marcador de astrocitos. La marca de GFAP también se observa en la IF realizada sobre la línea U251 (Fig. 5 I), que fue usada como control positivo para el marcador. Todas las líneas también presentan tanto marca de faloidina (Fig. 5 B, F y J) en rojo, como de núcleo DAPI, en azul (Fig.5 C, G y K). Se observa una superposición entre las marcas de GFAP y faloidina para las muestras GFAP positivas (Fig 5 D y H). Esto es esperado ya que GFAP es una proteína asociada al citoesqueleto, y la marca de faloidina indica la ubicación de los filamentos de actina. En términos morfológicos, no se observan diferencias entre las diferentes líneas de

astrocitos analizadas. La línea ES1 también probó ser negativa para el marcador TUJ1 (Fig. 5 I), un marcador neuronal.

3.4 Ensayo de crecimiento

Teniendo en cuenta lo observado durante el cultivo de las distintas líneas, que indicaba que las líneas crecen a velocidades diferentes, se decide ensayar empíricamente si bajo las condiciones de cultivo establecidas, las líneas poseen una tasa de crecimiento disimil. Para ello, 2 cultivos controles y dos cultivos esquizofrénicos se crecieron midiendo por triplicado, con excepción de la línea CF2 la cual se contó por duplicado (Fig. 6). A partir de estos datos, se calculó una tasa de crecimiento mediante un ajuste

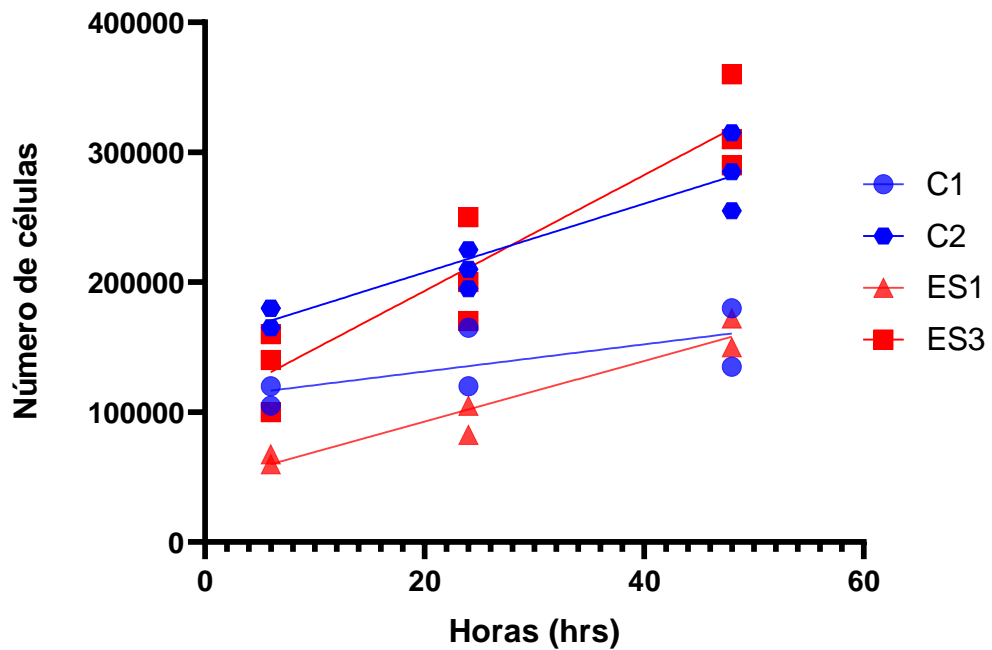


Figura 6. Grafica del Ensayo de crecimiento de cultivos de astrocitos. Se indica a 3 tiempo 6, 24 y 48 hrs, las cuantificaciones de la cantidad de células de cada réplica, por cultivo individualizado.

lineal tomando cada punto como independiente para calcular la pendiente. Las tasas de crecimiento se calculan como la pendiente de la recta generada a partir de los puntos (Tabla 1), mostrando así una diferencia de hasta un 76,5% en las tasas de crecimiento entre

Tabla 1. Datos de regresión lineal del ensayo de crecimiento de cultivos de astrocitos.

	C1	C2	ES1	ES3
Pendiente	1047	2646	2338	4459
R ²	0,4597	0,8739	0,9419	0,8714

Regresión lineal realizado a través del programa Graf Pad considerando cada replica como un punto individual, con una certeza del 95%.

la línea con mayor y menor tasa crecimiento, ES3 y C1 respectivamente. La línea ES3 resultó ser la con mayor tasa de crecimiento, seguida por la C2, mostrando así que, al menos en las líneas ensayadas en este seminario, la tasa de crecimiento no es dependiente de la condición control versus condición esquizofrénica *per se*, sino es más bien dependiente de cada línea celular. Los valores R² de la Tabla 1, sugieren en una primera instancia que los datos no se ajustan a un modelo lineal.

3.5 Arreglo Proteómico

Utilizando un kit para evaluar el perfil proteómico humano, el cual mediante un coctel de anticuerpos es capaz de detectar la presencia de 55 moléculas secretadas con propiedades moduladoras sobre el proceso angiogénico se procedió a ensayar la presencia de las mismas en los diferentes CM de 48 hrs de colección. Estas cuantificaciones se evaluaron tanto para CMs generados por nuestros colaboradores en

el laboratorio del Dr. Stevens Rehen, Instituto D'Or, Rio de Janeiro, Brasil (2 PC, 3 PE), los cuales pasaremos a llamar CMs, como para CMs generados a partir del cultivo de astrocitos en Chile (2 PE), que mencionaremos como CMs vp. El promedio de los datos generados se muestra a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Cuantificación de niveles relativos de moléculas pro y anti-angiogénicas en los CM de astrocitos.

		CMs PC		CMs PE			CMs vp PE	
		C1	C2	ES1	ES2	ES3	ES1	ES3
Angiogénicos	ADAMTS-1	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,08
	Angiogenin	0,06	0,07	0,08	0,07	0,05	0,12	0,35
	Ang-1	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,02	0,1
	Ang-2	0,07	0,08	0,09	0,08	0,07	0,04	0,21
	Amphiregulin	0,02	0,03	0,04	0,04	0,03	0,01	0,07
	Artemin	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,02	0,13
	Coagulation Factor III	0,08	0,08	0,06	0,06	0,06	0,04	0,34
	CXCL16	0,05	0,06	0,09	0,07	0,05	0,04	0,12
	DPPIV (CD26)	0,03	0,03	0,06	0,06	0,06	0,03	0,12
	EGF	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,03
	EG-VEGF	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02	0,1
	Endoglin (CD105)	0,05	0,07	0,07	0,06	0,06	0,02	0,08
	Endothelin-1 (ET-1)	0,32	0,24	0,29	0,27	0,25	0,29	0,26
	aFGF	0,03	0,03	0,05	0,04	0,03	0,02	0,09
	bFGF	0,02	0,03	0,04	0,03	0,03	0,02	0,15
	FGF-4	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,01	0,05
	FGF-7	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,01	0,05
	GDNF	0,04	0,04	0,05	0,04	0,03	0,02	0,06
	GM-CSF	0,03	0,04	0,05	0,04	0,03	0,03	0,08
	HB-EGF	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02	0,08
	HGF (IL-6)	0,03	0,04	0,03	0,03	0,04	0,01	0,06
	IGFBP-2	0,44	0,47	0,52	0,45	0,38	0,46	0,27
	IGFBP-3	0,53	0,51	0,71	0,56	0,36	0,55	0,8
	IL-1 β (IL-1F2)	0,05	0,06	0,05	0,06	0,07	0,02	0,08
	IL-8 (CXCL8)	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,25
	LAP (TGF-B1)	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01	0,1
	Leptin	0,02	0,02	0,04	0,04	0,04	0,01	0,06
	MCP-1 (CCL2)	0,03	0,08	0,45	0,36	0,28	0,27	0,21
	MMP-8	0,07	0,09	0,08	0,07	0,07	0,03	0,1
	MMP-9	0,11	0,15	0,13	0,12	0,12	0,05	0,23
	NRG1-B1	0,07	0,09	0,07	0,08	0,08	0,02	0,08
	PD-ECGF	0,1	0,12	0,1	0,1	0,12	0,03	0,1
	PDGF-AA	0,15	0,15	0,14	0,14	0,15	0,08	0,28
PDGF-AB/PDGF-BB	0,05	0,08	0,05	0,09	0,11	0,02	0,06	
Persephin	0,05	0,06	0,07	0,07	0,07	0,03	0,13	
PIGF	0,03	0,05	0,07	0,06	0,05	0,03	0,21	
Prolactin	0,02	0,03	0,06	0,06	0,05	0,01	0,08	
uPA	0,65	0,83	1,3	1,19	1,07	0,99	0,86	
VEGF	0,22	0,2	0,27	0,2	0,12	0,13	0,26	
VEGF-C	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,08	
Antiangiogénicos	Activin A	0,1	0,1	0,09	0,07	0,05	0,07	0,09
	Angiostatin/Plasminogen	0,02	0,03	0,04	0,04	0,03	0,02	0,06
	Endostatin/Collagen XVIII	0,12	0,11	0,07	0,08	0,09	0,03	0,39
	IGFBP-1	0,09	0,1	0,17	0,13	0,09	0,1	0,18
	MIP-1 α (CCL3)	0,04	0,05	0,05	0,04	0,03	0,02	0,11
	Pentraxin-3 (PTX3 o TSG-14)	0,35	0,47	0,87	0,59	0,32	0,62	0,55
	Platelet factor 4 (PF4 o CXCL4)	0,03	0,04	0,04	0,04	0,03	0,01	0,07
	Serpin B5 (Maspin)	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,02	0,1
	Serpin E1 (PAI-1)	0,83	0,98	0,89	0,79	0,76	0,68	0,74
	Serpin F1 (PEDF)	0,11	0,12	0,09	0,12	0,14	0,05	0,55
	TIMP-1	0,99	1,13	1,13	1,03	0,98	0,59	0,61
	TIMP-4	0,09	0,11	0,12	0,11	0,09	0,03	0,1
	Thrombospondin-1 (TSP-1)	0,85	0,92	0,93	0,91	0,84	0,7	0,51
Thrombospondin-2 (TSP-2)	0,08	0,1	0,11	0,11	0,13	0,05	0,24	
Vasohibin	0,03	0,05	0,06	0,06	0,05	0,02	0,08	

Los datos ilustran el promedio de la cuantificación de la intensidad de pixeles para cada molécula, redondeado a 2 decimales.

Las comparaciones generadas se obtuvieron a través de test t para datos no paramétricos con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados provenientes de los CMs arrojaron que no había diferencias significativas para ninguna las 55 diferentes moléculas que el kit es capaz de detectar, entre PE y PC.

Dado a que no se poseía la información respecto a la cantidad de células de las que fueron obtenidos estos CM, se decidió repetir el análisis, generando los CMs PE en Chile, de los cuales si se conoce el número de células de que proviene cada uno. Los resultados obtenidos, fueron analizados de varias formas. En primera instancia, con los datos brutos de la medición, encontramos que si existen diferencias significativas para todas las moléculas, con excepción de EGF, Endotelina-1, Actina A y Timp-1. Esto a través de un test de Sidak de comparación múltiple con una significancia del 95%, el p valor vario entre 0,01 y 0,0001. Al analizar la cuantificación arrojada por el kit pero esta vez normalizada por el número de células, se obtiene igualmente la presencia de diferencias significativas para todas las moléculas con excepción de EGF y MCP-1. Esto se probó mediante la misma prueba estadística realizada sobre los datos brutos. Por otra parte, al comparar el patrón de expresión, es decir, considerar las moléculas más representadas entre los CMs y los CMs vp para las muestras ES1 y ES3, se observa que el patrón no cambia mas si su nivel de expresión (Fig. 7) relativa al nivel de expresión arrojado por el kit.

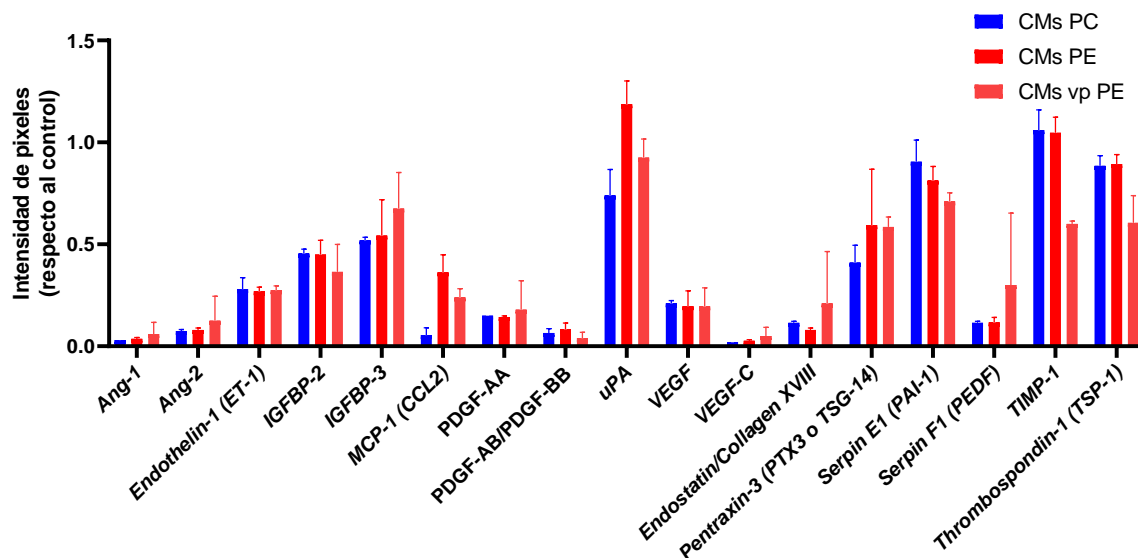


Figura 7. Intensidad de pixeles relativa de moléculas secretadas. Intensidad de los picos en pixeles, normalizadas con respecto a los controles internos del arreglo proteómico. En este se muestran las proteínas con mayor expresión (Endothelin-1, IGFBP-2, IGFBP-3, uPA, Pentraxina-3, Serpina E1, TIMP-1, Trombospondina-1), junto con aquellas que participan en vías antigénicas de interés para la discusión de los datos. (Ang-1, Ang-2, MCP-1, VEGF, VEGF-C, PDGF-AA, PDGF-AB/PDGF-BB, Serpina-F1) para los CM indicados.

Esto último indica que, al menos para las líneas probadas, la secreción de moléculas en CM por parte de estas líneas no es lineal, lo que se visualiza con variabilidad en los niveles de expresión de moléculas como Endotensina colágeno XVIII o Serpina F-1, en los CMs vp.

3.6 Evaluación del potencial angiogénico de los CMs

3.6.1 Ensayo de Túbulos (*In vitro*)

Ya que el arreglo proteómico utilizado solo detecta moléculas canónicas, no encontrar diferencias significativas en el potencial angiogénico de los CM de astrocitos podría

indicar que una vía no canónica podría estar involucrada en modular el nicho neuroangiogénico. Por tanto, se decidió probar el efecto angiogénico que tiene el secretoma de los astrocitos sobre las células endoteliales HUVEC, las cuales se sabe poseen una rápida capacidad de migrar y formar estructuras tubulares en presencia de un estímulo angiogénico. A células HUVEC se le colocó el CM extraído desde las diferentes líneas de astrocitos (Fig. 7A). Posteriormente, a las 4 horas, se contó la cantidad de ramificaciones y estructuras tubulares que estas formaron en este período de tiempo. Por estructuras tubulares nos referimos a cualquier estructura poligonal cerrada que se forma a partir de la unión las células endoteliales que se encuentran en un proceso de migración (Fig. 8A). Los resultados arrojaron que no se observan diferencias significativas en el número de ramificaciones entre los CM de astrocitos provenientes de PC y de PE, ni respecto al control con medio DMEM/F-12 (Fig. 8B). Por otro lado, los ensayos con CM de astrocitos de PC generaron un mayor número de estructuras tubulares respecto a los provenientes de PE y el control con DMEM/F-12 (Fig. 8C).

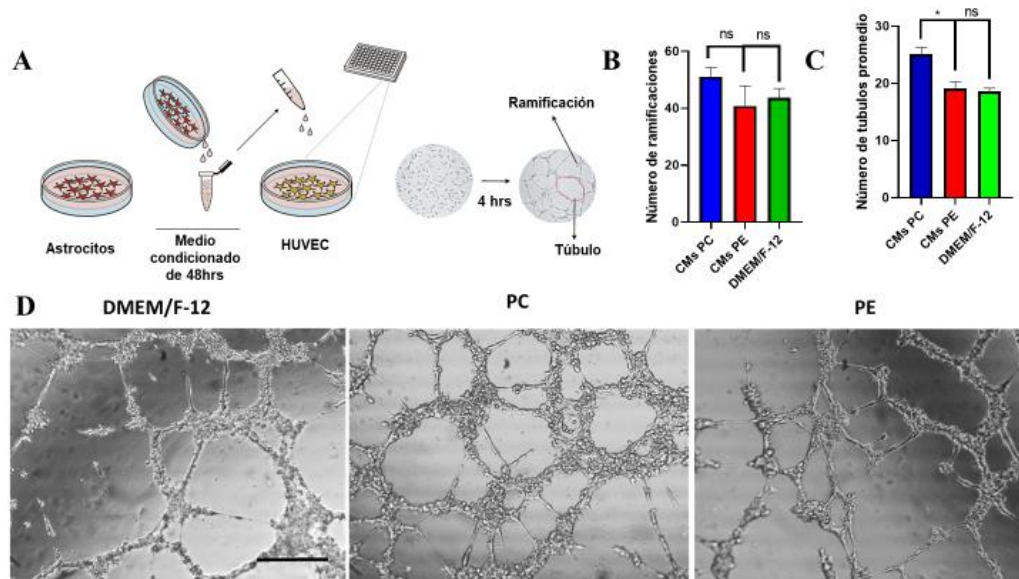


Figura 8. Ensayo de Túbulo. (A) Esquema representativo del ensayo de túbulo. (B) Cuantificación del número de ramificaciones. Test Kruskal-Wallis intervalo de confianza del 95% n = 4 (C) Cuantificación de la cantidad de estructuras poligonales. Test de comparación múltiple de Dunn, n = 4, *p valor ≤ 0,05. (D) Imagen representativa para medio de cultivo de astrocitos o DMEM/F-12, medio condicionado de astrocitos de PC y de PE. Escala de la barra: 30µm.

3.6.2 Ensayo CAM (*In vivo*) combinado con el uso de andamiajes tridimensionales tipo esponjas basados en biocelulosa

Para corroborar el efecto angiogénico obtenido en un ensayo *in vitro*, se evaluó el efecto que tienen los tratamientos en la CAM de embriones de pollo al ser aplicados en día de desarrollo 8 (E8) y ensayar la capacidad de esta membrana para responder a estos estímulos en E12. En este ensayo se busca evaluar el potencial, pro o anti-angiogénico que posee un estímulo al colocarlo sobre esta membrana extraembrionaria,

en este periodo del desarrollo embrionario del embrión de pollo, en el cual los vasos de esta membrana se encuentran en un periodo activo de angiogénesis.

Una cantidad de 100µL de cada estímulo fue suministrada a través de una matriz biológica de biocelulosa, que actúa como un dispositivo de liberación lenta, para lo cual esta fue pre-incubada previamente por 1hr con los controles o CM respectivos, para luego ser aplicado en día E8 del desarrollo del embrión de pollo. En este momento, se retiró para fotografiar una cohorte de huevos, set de imágenes que se utilizó posteriormente para normalizar los datos. Ya en E12, 4 días después de haber colocado el estímulo, se contaron todos los vasos que cruzaran un área determinada alrededor de la estructura colocada (Fig. 9A). Los resultados fueron obtenidos a través del conteo de 3 personas diferentes, con el fin de hacerlo más robusto. Estos fueron normalizados respecto a su estado en E8, arrojando como resultado que existe una diferencia significativa en el efecto angiogénico generado por los CM de PC y de PE, respecto al control con medio DMEM/F-12 (Fig. 9B). Esto analizado mediante un test de Kruskal-Wallis de comparación múltiple con un intervalo de confianza del 95%. Los CMs de PC y PE mostraron ser más angiogénicos respecto a DMEM/F-12 en un 48,8 y 37.7%

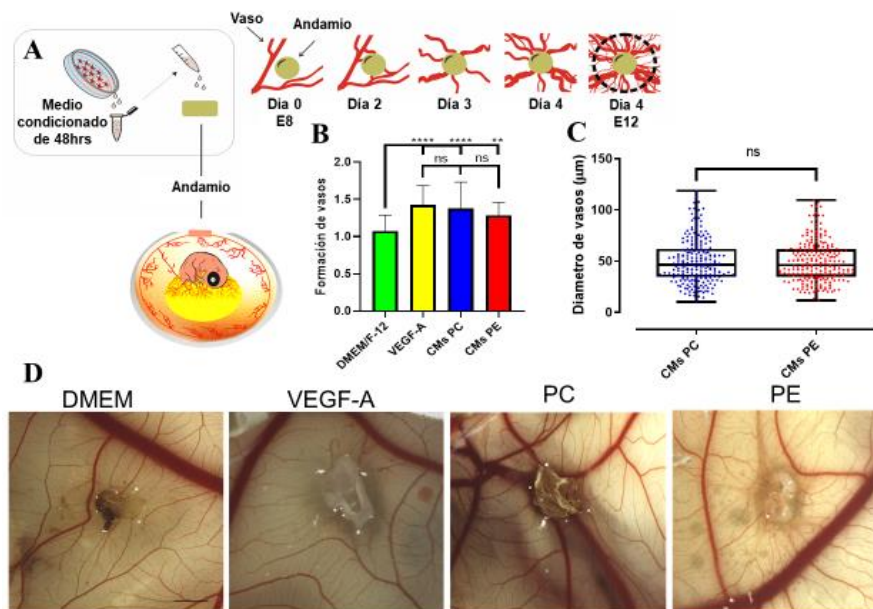


Figura 9. Angiogénesis promovida por matrices de biocelulosa enriquecidas en CMs e implantadas en la CAM. (A) Esquema representativo del ensayo CAM. (B) Cuantificación de formación de vasos entre DMEM/F-12 (control negativo), VEGF (control positivo), PC y PE. Test de Turkey con un intervalo de confianza del 95%, **p valor $\leq 0,01$ ****p valor $\leq 0,0001$, N = 23. (C) Cuantificación del grosor de los vasos para condiciones de CM generados en ausencia de suero de PC y PE. Test Mann Whitney con un intervalo de confianza del 95%. N= 219. (D) Imágenes representativas para las condiciones con DMEM/F-12, VEGF, CMs de astrocitos de PC y PE. Barra de tamaño: 2mm.

respectivamente. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre las condiciones CM PC y PE en cuanto al número de vasos generados. La modificación de las redes vasculares de la CAM fue evaluada también considerando el efecto sobre el grosor de los vasos a las 48 horas desde la implantación del estímulo, como se muestra en la Figura 8 C. Este análisis arrojó que no existen diferencias significativas entre el grosor de los vasos generados en las CAM estimuladas con CM de PC y PE (Fig. 9C).

Se realizó un segundo ensayo CAM. Esta vez los CMs utilizados provenían del mismo número de células de siembra original ($1,5 \cdot 10^6$ cel/mL). Al igual que en el ensayo CAM anterior se evaluó tanto el potencial angiogénico mediante la formación de vasos (Fig. 10A), y la medición del grosor de su diámetro (Fig. 10B). Los resultados muestran que

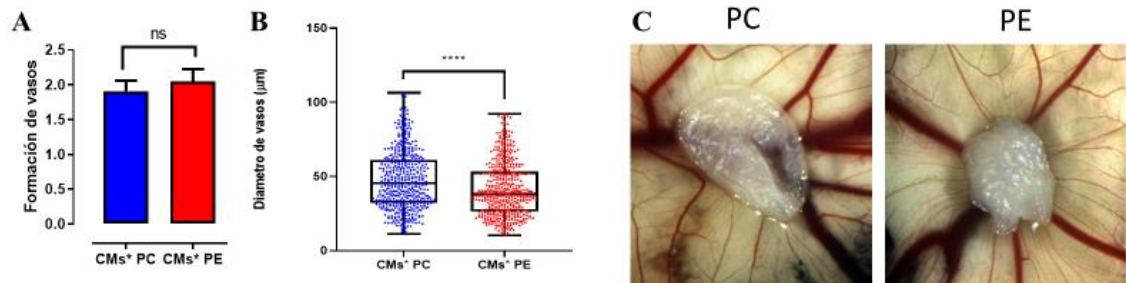


Figura 10. Ensayo CAM CMs*, obtenido a partir de cultivos sembrados con el mismo número celular. (A) Cuantificación de formación de vasos entre PC y PE Test Kolmogorov-Smirnov con un intervalo de confianza del 95%. N=19. (B) Cuantificación del grosor de los vasos para condiciones PC y PE. (C) Imágenes representativas para las condiciones CMs de astrocitos de PC y PE. Test Kolmogorov-Smirnov con un intervalo de confianza del 95%. N=19. ****p valor $\leq 0,0001$.

no existe diferencia significativa entre el conteo de formación de vasos entre los CMs* de astrocitos provenientes de PC respecto a los de PE (Fig. 10A). Pero si se encontró diferencias significativas en el grosor de los vasos entre PC y PE (Fig. 10B), siendo en el promedio del diámetro de los vasos un 16% menor en los PE, respecto a los generados por PC.

Las diferencias encontradas a través de este ensayo nos muestran que existen diferencias en las propiedades moduladoras de los CMs ensayados sobre células endoteliales. Las diferencias encontradas, sugieren que más que un efecto directo sobre

la angiogénesis (nº de vasos), sino que sobre la maduración y/o estabilización de los vasos. Lo que no quiere decir que los CMs probados no posean un efecto proangiogénico, todo por el contrario ya que el número de vasos se encuentra al nivel de VEGF-A (Control positivo). Al comparar los resultados de ambos ensayos CAM vemos que ambos no arrojan diferencias en términos de la generación de nuevos vasos entre CMs de PC y PE. Esto nos indica que las moléculas capaces de modelar en su conjunto no son capaces de superar el efecto generado por VEGF-A por sí solo. Por otro lado, se encuentran diferencias es en el grosor de los vasos generados, al comparar los ensayos de CMs y CMs*. Esto sugiere que los PC genera vasos más gruesos que los PE, propiedad posiblemente atribuible a moléculas capaces de modular la maduración y estabilización de los vasos. Debido a que esta diferencia solo se observa en el ensayo con CMs*, se sugiere que el efecto se ve ocultado en el ensayo de CMs debido a que estos provienen de una diferente cantidad de células, cambiando así la concentración relativa de los posibles componentes moduladores.

4. Discusión y Proyecciones

Los astrocitos forman parte de la NVU y cumplen un papel clave ya que se desenvuelven en la interfaz que contacta el SNC con el sistema vascular. En ella los astrocitos junto con BECs, pericitos, y otros componentes celulares y estructurales, regulan el paso de sustancias como nutrientes, desechos, y drogas, así como la quiescencia del sistema inmune en el SNC, con el fin mantener la homeostasis del sistema, que permite tanto su correcto desarrollo como su mantención. Se ha planteado

que los astrocitos podrían ser necesarios para la inducción del fenotipo de la BBB (Janzer y Raff, 1987), pero no existen pruebas concluyentes respecto a esto. Lo que sí parece claro es que los astrocitos son necesarios para la mantención del fenotipo de la BBB (Gaillard y col., 2000, Alvarez y col., 2011, Nishitsuji y col., 2011). Cambios en el microambiente, provocados por los astrocitos pueden generar la disrupción de la BBB (Wang y col., 2014, Argaw y col., 2012), conduciendo así a ciertos problemas en el funcionamiento del SNC.

Se ha visto que existen una serie de procesos que se encuentran desregulados, tanto en el desarrollo como el funcionamiento del SNC, en pacientes que padecen de esquizofrenia. Entre algunos de estos encontramos alteraciones en las vías glutamatérgicas y serotoninérgicas, procesos sinaptogénicos y de mielinización postnatales, y la acción del sistema inmune. Todos estos procesos se encuentran en parte regulados por las células gliales, y en particular por los astrocitos. Múltiples estudios han planteado que los astrocitos estarían contribuyendo tanto al desarrollo como la mantención del fenotipo esquizofrénico (recapitulado en Muller y Schwarz, 2010, Koyama, 2015, Molofsky y col., 2015). A pesar, de que la contribución de los astrocitos a la patogénesis de la esquizofrenia ya haya sido estudiada, los estudios realizados, tanto en arreglos de ADN (Sugai y col., 2004), qPCR (Catts y col., 2014) o detección de moléculas en el suero de pacientes (Schroeter y col., 2002), han sido incapaces de determinar un mecanismo de acción que dé cuenta de la contribución de los astrocitos a estos mecanismos alterados, concluyendo principalmente que se requiere de mayores estudios para generar cualquier afirmación. Interesantemente, un

estudio más reciente realizado en ratón ha planteado la importancia de las células gliales dentro de la patogénesis de la esquizofrenia (Windrem y col., 2017), y en particular de los astrocitos, especulando acerca de su relevancia en los procesos de sinaptogénesis y mielinización. Estos datos ponen en evidencia que aún queda mucho que dilucidar acerca de la regulación que ejercen los astrocitos en el SNC y su posible influencia sobre el desarrollo de la esquizofrenia.

4.1 Cultivo y caracterización

El trabajar con hiPSC presenta una importante serie de ventajas en modelamiento de enfermedades con un amplio espectro de mutaciones que aumentan el riesgo de desarrollarlas, como es el caso de la esquizofrenia. Esto se ha probado antes, encontrándose cambios fenotípicos en astrocitos derivados desde hiPSC debido a alteraciones genéticas o ambientales de ciertas patologías (recapitulado en Gonzalez, Gregoty y Brennand, 2017). Al mismo tiempo, también permite evaluar las perturbaciones individuales de cada paciente, siendo una herramienta para el desarrollo de terapias personalizadas. Sin embargo, se presentan una serie de desventajas a la hora de intentar generalizar esta herramienta como un modelo para una enfermedad como la esquizofrenia, la cual se sabe no tiene un componente únicamente genético, sino también ambiental. Debido a que las marcas epigenéticas son eliminadas en el proceso de dediferenciación se es incapaz de evaluar estas perturbaciones. Por otro lado, existe una gran heterogeneidad en el perfil genético de los pacientes que limita las conclusiones que se puede sacar de estos estudios; esta heterogeneidad también se

puede generar dependiendo del método de reprogramación, así como de protocolos de diferenciación usados (recapitulado en Hoffman y col., 2019).

Las condiciones de cultivo establecidas nos permitieron crecer todas las líneas de astrocitos, tanto de PC como de PE, para los diferentes experimentos. A pesar de ser sembradas y cultivadas bajo las mismas condiciones, no fue posible mantener la misma confluencia para todos los cultivos, posiblemente por la heterogeneidad propia de los pacientes, problema que no es nuevo dentro del trabajo con hiPSC. Múltiples trabajos han evaluado la contribución del perfil genético de los donantes, afirmando que es principal responsable en las diferencias encontradas a nivel transcripcional (Rouhani y col., 2014, Burrows y col., 2016, Hoffman y col., 2017), por lo que no resulta extraño que difieran en sus algunas características fenotípicas como puede la tasa de crecimiento.

Tal como se expuso anteriormente parte de los desafíos del trabajo con estas células corresponde a disminuir la heterogeneidad de las mutaciones genéticas presentes en los pacientes, agrupando y generando así cohortes más homogéneas en enfermedades con una variabilidad tan alta en su perfil genético. Esto en una primera instancia se resume en aumentar la cantidad de donantes tanto de PE como PC, una vez hecho esto, agruparlos para los estudios en grupos en donde idealmente las mutaciones que presenten sean similares. También se ha propuesto trabajar con líneas modificadas a través de la técnica CRISPR con el fin de emular mutaciones puntuales que se han correlacionado con esquizofrenia, con el fin de generar líneas con un perfil genético

más similar (Hoffman y col., 2019). Esta heterogeneidad en las tasas de replicación ya había sido observada en el laboratorio del Dr. Stevens Rehen, donde denominaron las líneas C2 y ES3 como de alto crecimiento, C1 y ES1 de buen crecimiento, y finalmente las líneas C3 y ES2 como de pobre crecimiento. Lo último está en línea con lo reportado en este trabajo en la sección 3.4. Al comparar las líneas con tasas de crecimiento más similares, como resultaron ser C2 y ES3 las que se catalogaron como de alto crecimiento, vemos que provienen de pacientes de género distinto y de tratamientos de reprogramación diferentes, lo que sugiere que las diferencias observadas se deben principalmente a diferencias en los perfiles genéticos de cada paciente.

Esto presentó una serie de inconvenientes a la hora de coordinar experimentos que se requerían realizar con más de una línea en simultáneo. Otra limitación que se presentó es que el tiempo de crecimiento para subcultivo en promedio para las células en cuestión era de 2 semanas. Por lo que descongelar un nuevo batch de células con el fin de realizar o repetir algún experimento requería de 2 semanas como mínimo para generar 1 pasaje, y luego otras 2 semanas para que estas llegasen nuevamente a confluencia y se pudiera trabajar con ellas. Esto, debido a que no es recomendable someter a las células a un segundo proceso de subcultivo en tiempos muy cercanos, ya que las células resienten este proceso pudiendo afectar sus propiedades de proliferación y adhesión.

Como se ha mencionado, la tasa de crecimiento que poseen las células es un factor a considerar tanto a la hora de planificar experimentos, como a la hora de realizarlos. Es en vista de esto que se decidió realizar un ensayo de crecimiento con el fin de determinar las tasas de crecimiento de cada línea de astrocitos, y se calcularon las tasas a partir de un ajuste lineal de los datos obtenidos. El ajuste realizado tomo en cuenta cada punto para la construcción del ajuste, no solo el promedio de los datos por punto, debido a la dispersión de los datos el ajuste arrojó un valor R^2 entre 0,45 y 0,87 para 3 de las 4 líneas de astrocitos analizadas (C1, C2, ES3). Esto induciría a pensar que el ajuste lineal no sería la mejor aproximación para determinar las tasas. Pero, al trabajar con el promedio de los datos, el R^2 de 3 líneas (C2, ES1, ES3) pasa a estar entre 0,98 y 0,99. Esto indica que a pesar de que cuando se trabaja con el promedio de los datos, éstos muestran un comportamiento lineal. Para corroborar si esta tendencia que se ve al trabajar con los promedios, se mantiene al trabajar con los datos individuales, se requiere generar un mayor número de datos por condición. Teniendo como mínimo un número tal que nos permita evaluar la distribución de los datos, y de ser normales, generar mayores análisis que prueben de manera más robusta el comportamiento lineal observado bajo las condiciones establecidas.

La caracterización de los astrocitos se realizó a través de PCRs sobre los genes *GFAP* y *S100B*, teniendo como genes de referencia *GAPDH* y *B2M*. Como se mostró, no hubo amplificación de los marcadores de astrocitos, *GFAP* y *S100B*, pero sí de los genes de referencia para las 4 líneas evaluadas en ese momento (C1, C2, ES1, ES33), al igual que para las dos líneas control U87 y U251. Con el fin de evaluar si la falla provenía

de los partidores utilizados, o si realmente había una ausencia en la expresión de los marcadores de astrocitos, se utilizaron las líneas U87 y U251, como controles positivos de *GFAP*. Estos controles corresponden a líneas inmortalizadas de astrocitoma, se ha descrito que la línea U87 expresa *GFAP* (Herpers, 1986), y proteínas de la familia S100 (Strojnik, 2010). La amplificación de los marcadores de astrocitos para estas líneas también resulto negativa, y positiva para los genes de referencia (Fig. 4). Finalmente, se realizó un último PCR con partidores para *IL-8*, previamente probados en el laboratorio, con el fin de corroborar la integridad del cDNA sintetizado, y así corroborar que los partidores sintetizados son el problema que impide la amplificación de los marcadores deseados. Esto se realizó solamente para 1 línea (ES1), la cual amplificó según lo esperado (Fig 4).

Se realizó una IF buscando la expresión de GFAP, y resultó en que de las dos líneas sobre las que se realizó la IF (ES1, ES3), ambas mostraron poseer marca de GFAP. Para corroborar que la marca que se observa en la IF corresponde a GFAP, se marcó también con faloidina las muestras. Esto ya que la faloidina marca los filamentos de actina de la célula, y siendo GFAP la principal proteína que constituye los filamentos intermedios en astrocitos maduros (Eng, 1985), la marca de ambas debe colocalizar en las células. Eso es lo que se observa en gran medida en la Fig. 5 D y H. Por otro lado, debido a que estas células fueron derivadas desde células troncales neurales para corroborar que ninguna de estas células corresponda a células de un linaje neuronal, se realizó una IF marcando TUJ1, marcador de neuronas. La IF realizada no mostró marca para la línea ES1 (Fig. 5B). Para corroborar que la marca observada corresponde a

GFAP se utilizó como control positivo la línea U251, la cual es una línea celular inmortalizada de astrocitoma, la cual se ha descrito previamente expresa dicho marcador (Kang, 2006). La IF mostró que esta muestra si posee marca de GFAP, y que al igual que en las muestras de astrocitos, colocaliza con la marca de faloidina en gran parte de la célula. Con esto se corrobora que las líneas con las que se trabajó expresan al menos el marcador clásico de astrocito GFAP, por lo que se puede decir corresponden a astrocitos. La falla en la amplificación de los genes mediante PCR probablemente se deba a un problema en el diseño y/o trabajo con los partidores. Los cuales al ser diseñados para este trabajo no fueron probados previamente y a pesar de haberse usado herramientas bioinformáticas para testarlos en teoría, estos no lograron amplificar los genes tanto para las muestras como los controles positivos.

El uso de astrocitos derivados de hiPSC probó ser útil para probar la existencia de propiedades diferentes que pudiesen existir debido a diferencias genéticas que tuviesen los PE, respecto a los PC. Mostrando así cual podría ser la contribución de los astrocitos, en particular de su secretoma, en la modulación de las BECs en este nicho en particular. El no encontrar diferencias morfológicas entre los diferentes cultivos de astrocitos o que, a pesar de encontrar serias diferencias en las tasas de crecimiento éstas no se le pudieran atribuir a la condición esquizofrénica, sino más bien al perfil genético que cada sujeto, indicaría que la contribución a la enfermedad vendría dada por una diferencia en las moléculas secretadas hacia el nicho en cuestión. Al mismo tiempo, el trabajar con este tipo de células para una enfermedad que también tiene un componente ambiental presenta limitaciones a la hora de intentar determinar un efecto detonante

para los cambios observados, pudiendo ser que los cambios en el secretoma u otros aspectos se vean activados o exacerbados frente algún insulto que se puede haber generado durante el desarrollo de SNC. Como también que la influencia que ejercen los astrocitos en la modulación de las células endoteliales se de una u otra forma mediada por otro tipo celular que este participando en el nicho como pueden ser los pericitos o microglías. Los pericitos se han visto que secretan factores capaces de regular la estrechez de la BBB, siendo en parte responsables del tráfico celular al regular a las BECs a través de TGF- β secretado al medio (recapitulado en Blanchette y Daneman 2015). Por su parte las microglías están más relacionadas con la regulación del sistema inmune, que como se mencionó anteriormente, podría dar cuenta en parte del desarrollo de la esquizofrenia. Las microglías frente a una injuria o infección se activan, generando neuroinflamación, esto posiblemente a través de mecanismos que involucran un aumento en especies reactivas de oxígeno (ROS) generado por microglías activadas (recapitulado en da Fonseca, 2014).

4.2 Expresión de moléculas angiogénicas

El arreglo realizado arrojó que no había diferencias significativas, entre PC (C1, C2) y PE (ES1, ES2, ES3), para ninguna de las 55 moléculas secretadas que el kit permite medir. Sin embargo, el resultado no permite esclarecer fehacientemente si hay diferencias en términos de expresión de moléculas angiogénicas entre los dos grupos evaluados. Debido a que no se conoció la cantidad de células de las que provienen cada CM. Las diferencias encontradas en los ensayos funcionales no permiten, por ahora,

ser vinculadas a una proteína en particular y determinar su mecanismo de acción. Las diferencias pueden deberse tanto a diferencias en el perfil de expresión de moléculas angiogénicas de los astrocitos como un todo, es decir que el delicado balance del conjunto de moléculas presentes se interpreta diferencialmente de parte de las células endoteliales. Alternativamente, la diferencia funcional podría deberse también a la acción de moléculas angiogénicas no canónicas, tales como netrinas, semaforinas y efrinas (Longman, Viola y Dharmarajan, 2012, Prieto y col., 2017, Bai, Zhao y Zhao 2014, Wang y col., 2010).

El factor maestro de la angiogénesis VEGF, el cual posee varias isoformas (VEGF-A/B/C), posee varias vías de acción dependiendo del receptor (VEGFR) que une. La primera en ser descrita, y la más conocida, corresponde a la interacción de un dímero de VEGF-A que interactúa con su receptor (VEGFR2) que también resulta ser un homodímero de VEGFR2. Este receptor tirosina quinasa (RTK) se encuentra en la superficie de las células endoteliales y es responsable de la cascada de señalización que lleva a un aumento en la migración, proliferación y angiogénesis (Domigan, Ziyad y & Iruela-Arispe 2015). Esta vía es la que se denomina canónica. Múltiples estudios han probado que esta no es la única vía de señalización por la que puede actuar VEGF, ya que se ha descrito la interacción con heterodímeros de VEGFR como son VEGFR1-VEGFR2 y VEGFR2-VEGFR3. Las cascadas de señalización que generan estos dímeros de receptores al interactuar con su ligando difieren respecto a las generadas por la vía canónica (Autiero y col., 2010, Nilsson y col., 2010, Cudmore y col., 2013). Por ejemplo, la interacción con el heterodímero VEGFR1-VEGFR2 lleva

exclusivamente a la migración y formación de túbulos. Existen otras vías en donde el VEGF no interactúa a través del receptor VEGFR2, a estas las llamaremos vías no-canónicas. En estas la interacción es llevada a cabo con moléculas llamadas galectinas u otras como las gramilinas; de estas vías aún no se entiende completamente su efecto *in vivo*. Dentro de lo que se sabe, es que las galectinas principalmente modulan glicosilaciones en receptores RTQ, siendo capaces de inducir migración celular y modular las interacciones célula-célula de las células endoteliales. También se ha visto que una galectina (Gal3) es capaz de interactuar con VEGFR2 generando multidímeros, lo que amplificará el efecto angiogénico a la hora de que VEGFR2 interactúe con su ligando. Por otro lado, existen otras vías en donde se es capaz de suprimir la acción de VEGFR2 sin la presencia de su ligando, al disminuir su concentración en la superficie celular debido a una fosforilación aberrante provocada por una quinasa de la familia Src, esto ocurre en ambientes donde han aumentado las ROS (Warren y col.,2014). Esta última vía resulta muy interesante en vista de que ROS es capaz de activar HIF-1 α vía NF κ B (Bonello y col., 2007). HIF-1 α es un factor de transcripción activado durante en condiciones de hipoxia, y se ha visto se encuentra mutado en la esquizofrenia (Huckins y col., 2019), siendo además la hipoxia durante el neurodesarrollo uno de los factores ambientales relacionados con el riesgo de padecer esquizofrenia (recapitulado en Schmidt-Kastner y col., 2012). HIF-1 α promueve la transcripción de genes relacionados con la angiogénesis, glicogénesis y respuestas protectoras, podría estar involucrado en la modulación de la vascularización del SNC que se está íntimamente relacionado al desarrollo del sistema neural (Maltepe y col.,

1998, Raab y Plate, 2007), siendo esta otra posible vía que dé cuenta de las alteraciones observadas y afirme la hipótesis de la esquizofrenia como una enfermedad del neuro desarrollo.

Claramente, el no poseer más información acerca de los CMs de astrocitos fue la principal limitante para poder extraer mayores conclusiones de los ensayos realizados con estos. Otro factor limitante, es que las condiciones de cultivo no son iguales a las fisiológicas por lo podría ser que la expresión de ciertas moléculas simplemente no ocurre bajo estas condiciones. Dentro del patrón de moléculas expresado, encontramos que las moléculas más representadas se encuentran altamente expresadas en todas las líneas, lo cual es de esperarse debido a que todas son astrocitos y tratados bajo las mismas condiciones. En las condiciones de cultivo los astrocitos están completamente fuera de su contexto fisiológico. Se ha descrito que tal como ellos ejercen un rol regulador sobre otros tipos celulares en contexto de la NVU, ellos también son regulados tanto por factores del entorno como señales de células como las BECs (Estrada y col., 1990, Wagner y Gardner, 2000). Por lo que es posible, que existan diferencias de expresión entre los astrocitos de PC y PE, pero que estas solo se presenten cuando están en el nicho correcto o frente a un insulto. Queda para futuras investigaciones realizar ensayos de transwell combinando múltiples tipos celulares, para reconstruir la NVU *in vitro*.

Se planteó generar CM de astrocitos a partir de un número conocido de células. Es decir, una vez extraído el CM, las células fueron despegadas y contadas, con el fin de

saber cuántas células produjeron ese CM. Al comparar los resultados obtenidos con los medios condicionados de estas líneas, respecto a los generados en Brasil, se observa que el patrón de expresión se mantiene. En otras palabras, las moléculas más representadas son las mismas al analizar los CMs de las mismas líneas. Lo que indicaría que la cantidad de células de la que provenga un CM no afecta el patrón de expresión de las moléculas *per se* que estamos detectando. Por otro lado, al analizar los niveles individuales de expresión de las moléculas en los CMs vp, vemos que la diferencia de expresión es mucho mayor que la encontrada previamente. Teniendo en cuenta que los CMs generados provienen de un diferente número celular, se decide normalizar los datos por el número de células del que proviene cada CM. Aun así, los niveles de expresión de ciertas moléculas siguen más altas, al punto de que podemos encontrar diferencias significativas en casi todas las moléculas, cosa que previamente no se habían encontrado. Indicando así que la expresión y secreción de moléculas en cultivos de astrocitos no es lineal, y que por ende hay que tenerlo como un factor a considerar a la hora de desarrollar un modelo de estudio o un posible tratamiento a partir de estas células.

4.3 Ensayos funcionales

4.3.1 Ensayo angiogénico (*in vitro*)

A pesar de no haber encontrado diferencias significativas en el arreglo proteómico de moléculas angiogénicas, si se encontraron diferencias en el ensayo al comparar el efecto de los CMs provenientes PC de los de PE. No se encontraron diferencias

significativas en la generación de ramificaciones, pero si se encontraron diferencias en la formación de estructuras tubulares. Esto implica que hay diferencias en el potencial angiogénico y/o migratorio que poseen los CMs. Los resultados indican que debido a que el CM proveniente de PC generan un mayor número de ramificaciones, es decir, que poseen un mayor potencial angiogénico o que el CM proveniente de PE posee un mayor potencial antiangiogénico. En vista de que no se observan diferencias significativas entre las ramificaciones formadas por los CMs de y las de DMEM/F-12 (control negativo), se induce a pensar que más que un efecto antiangiogénico por parte de los CMs de PE, lo que se observa es un efecto proangiogénico por parte de los CMs de PC. El efecto a observado es atribuible a vías proangiogénicas más que a vías antiangiogénicas, debido a los resultados presentados en el ensayo CAM generados muestran que los CMs ensayados poseen un potencial angiogénico similar al de VEGF. Las vías implicadas pueden ser tanto canónicas, como no canónicas, siendo más tentativo proponer vías que aumente la ramificación de las células endoteliales y no la formación de túbulos. Por lo que la vía clásica VEGF-A/VEGFR2 no sería la mejor de las propuestas, ya que esta aumenta tanto la proliferación, migración y angiogénesis de las células endoteliales, y el no observar cambios en la formación de estructuras tubulares no sería consistente con esta afirmación. Por otro lado, tenemos la vía VEGF-A/VEGFR2/3, en donde se ha descrito que al interactuar el dímero de VEGF-A con el receptor heterodimérico es capaz de inducir ramificación de vasos y ramificación de las células endoteliales (Nilsson y col., 2010). También, se debe considerar que los niveles de VEGF-A detectados para las muestras fueron relativamente homogéneos

para los diferentes medios condicionados testados, el otro factor a considerar son los receptores presentes en las células HUVEC, los cuales por venir del mismo cultivo debiesen presentarse en iguales cantidades entre sí. Pero, estos dos no son los únicos factores involucrados en vía, existen factores secretados por los astrocitos capaces de modular la acción del receptor VEGFR-3 (Gore y col., 2011, Tammela y col., 2011). En particular el mecanismo que involucra la regulación a través de la vía Wnt no logra dilucidar si la regulación proviene de una vía autocrina o paracrina (Gore y col., 2011), dejando la posibilidad a que esta esté regulada por el ligando secretado y, por ende, presente en el CM de astrocitos.

4.3.2 Ensayo angiogénico (*in vivo*)

Los datos utilizados para el análisis son el resultado del conteo de 3 personas, esto se realizó así con el fin de generar un análisis más robusto. El problema con estos es que si uno analiza de forma independiente el conteo por persona los resultados obtenidos por cada uno difieren de los del resto, el conteo en este tipo de ensayos puede diferir mucho de persona en persona ya que requiere haberse entrenado para generar un criterio para reconocer todos los vasos. Esto plantea que parte de la variabilidad encontrada en los datos es atribuible a las personas que contaron.

Los resultados muestran que existe una diferencia entre el control DMEM/F-12 y los CMs tanto de PC como PE, mostrando que estos últimos generan una mayor cantidad de vasos por lo que tendrían un mayor potencial angiogénico. Nuevamente, esto refuerza la idea de que a pensar que hay una vía proangiogénica no canónica

involucrada, ya como se mencionó anteriormente no hay diferencias significativas a nivel del arreglo proteómico, aunque por las condiciones en que se dio el arreglo proteómico se necesitaría una nueva cuantificación, con CM del mismo número de células, tanto de PC como PE. Otro factor evaluado dentro del ensayo fue el grosor de los nuevos vasos formados, no se encontraron diferencias en este parámetro entre los vasos generados por los CMs de PC y PE. Resaltando así la idea de que no existen diferencias significativas en el potencial angiogénico entre los CMs de PC y PE.

Con estos datos en cuenta, nuevamente resulta difícil extraer conclusiones más allá de no observarse diferencias en el potencial angiogénico, ya que al no poseer información acerca de la cantidad de células de las que proviene cada CM, es posible que el efecto de ciertas moléculas que podrían estar modulando favorablemente el proceso no se logren observar o se encuentren aumentados en el caso de mecanismos antiangiogénicos, cuando no debiese ser así, por lo que debe ser un factor a tener en cuenta antes de emitir cualquier juicio.

Dentro del marco de una colaboración con el laboratorio de Dr. Stevens Rehen (Instituto D'Or, Rio de Janeiro, Brasil), se nos pidió elaborar un ensayo CAM a partir de CMs* de astrocitos de 3 PC (C, C2, C3) y 3 PE (ES1, ES2, ES3) los cuales si provenían un mismo número de células. Los resultados de este ensayo arrojaron que no hay diferencias significativas en la formación de vasos entre las condiciones de PC y PE al igual que en el ensayo anterior. Pero, si se encontraron diferencias en el grosor de los vasos generados, siendo los PC significativamente más gruesos que los PE. Debido a

que los CMs* probados provienen del mismo número de células, es más seguro decir que existe una diferencia entre los CMs* de PC y de PE. Los resultados presentados, sugieren que más que una diferencia en el potencial angiogénico, esto podría dar cuenta de vías relacionadas con la maduración y estabilización de los vasos generados durante el proceso de estimulación de la CAM entre E8 y E12.

Se puede especular respecto al origen de estas diferencias observadas, dentro de las posibilidades encontramos pueden estar involucradas tanto vías canónicas como no canónicas, al igual que vías pro y antiangiogénicas. Según los resultados obtenidos, es más seguro afirmar que por los resultados obtenidos en el proteoma, hayan vías no canónicas involucradas en la diferencia de potencial angiogénico. Por otro lado, al encontrarse diferencias entre CM de PE y el control negativo de DMEM/F-12 (Fig. 6A), siendo este último significativamente menor, sugiere que no hay vías antiangiogénicas sobre- reguladas en los astrocitos de PE. Por lo que las diferencias serían atribuibles a una mayor cantidad de moléculas proangiogénicas en los CMs de PC, o a vías involucradas con la maduración y estabilización de los vasos, las cuales no fueron evaluadas directamente en este trabajo. Dentro de las vías se especula podrían estar involucradas en la modulación de este proceso VEGF, Sonic Hedgehog (SHH), Wnt7a/b, Wntb/ β -catenina y Notch, entre otras posibles. Estas están implicadas tanto en el establecimiento inicial de los vasos (recapitulado en Paredes, Himmels y Almodovar 2018), su formación o neovascularización, estabilización y especialización (recapitulado en Jain, 2003). Estas vías de señalización son clasificadas como vías canónicas de angiogénesis, pero algunas también no canónicas cuando los ligandos de

estas vías interactúan con otros receptores como se mencionó anteriormente. Se ha descrito que los astrocitos expresan moléculas que forman partes de estas vías de señalización como SHH (Alvarez y col., 2011), angiotensinogeno (Wosik y col., 2007), JAG1 (Xing y col., 2013) y Wnt (recapitulado en Jha y col., 2018) por mencionar algunas. Gran parte de las moléculas secretadas que interactúan con estas vías se evaluaron mediante el arreglo proteómico, como VEGF-A, Ang-2, PDGF, TGF- β 1, sin mostrar diferencias significativas. Pero existen otras moléculas capaces de modelar estas vías que no fueron evaluadas, y que podrían dar cuenta de la vía o vías que estarían actuando y permitirían dar cuenta de las diferencias observadas. Por ejemplo, la vía Hedgehog, particularmente a través de SHH, que sabemos es secretado por astrocitos (Wang y col., 2014). SHH es capaz de inducir la expresión de NTN-1 en BECs, probándose al administrarse SHH o CM de astrocitos a un cultivo de BECs. NTN-1 probó ser necesaria para el correcto funcionamiento de la BBB, ya que en su ausencia aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias que guían hacia una disrupción de la BBB. Al mismo tiempo se vio que ésta también regula la integridad de las TJ, lo cual favorece el correcto funcionamiento de la BBB (Podjaski y col., 2015). Esta regulación que ejerce SHH sobre las BECs, no es la única relevante en la mantención del correcto funcionamiento de la BBB, también se ha visto que es capaz de regular la quiescencia del sistema inmune a través de la disminución de la expresión de LAMs en las BECs (Alvarez y col., 2011). Otra que podría dar cuenta de los efectos observados en los ensayos funcionales es PDGF-C. Esta isoforma de la proteína no fue evaluada en el arreglo proteómico, pero si sus isoformas A y B. Se ha visto que PDGF-

C es capaz de regular la maduración y estabilidad de los vasos en glioblastoma, es decir, cáncer de astrocitos. Siendo además estos vasos formados más delgados y menos permeables que los generados por tumores que no sobre expresan PDGF-C (di Tomaso y col., 2009).

4.4 Proyecciones

En vista de que no se pudo dilucidar el mecanismo de acción por el cual se generan las diferencias observadas en los ensayos funcionales, se plantea una serie de moléculas que no fueron evaluadas, pero se sabe que participan en vías que podrían estar modulando el proceso angiogénico. Además, se ha visto que las moléculas de estas vías están descritas como moléculas que participan en la formación y estabilidad de los vasos formados, que son secretadas por los astrocitos.

Dentro de las moléculas secretadas por los astrocitos que cumplen con esto tenemos a SHH, que como ya vimos cumple una doble función. En primer lugar, regula la quiescencia del sistema inmune disminuyendo los niveles de moléculas LAMs como Icam1 (Alvarez y col., 2011) y induciendo la expresión de NTN-1 en BECs, la cual regula la acción de citoquinas proinflamatorias (Podjaski y col., 2015). Por otro lado, en el trabajo de Alvarez y col. 2011, también encontraron que la presencia de SHH disminuye la difusión paracelular en las BECs, al aumentar la expresión de claudina-5, este aumento en la expresión de claudina-5, se obtiene de igual manera al suministrar CM de astrocitos a las BECs. Las angiopoetinas son agonistas del receptor TIE2, la activación de este receptor disminuye la permeabilidad vascular (Pizurki y col. 2003).

El angiotensinogeno, molécula secretada por los astrocitos, es precursor de las Angiotensinas I-IV, para esto debe ser clivada por Agt y así unirse como angiotensina II al receptor AT₁ expresados por BECs (Wosik y col., 2007). Se ha visto que el *knock out* de Agt resulta en una BBB más permeable. En cuanto a ApoE, se ha visto que el *knock out* de esta proteína aumenta la permeabilidad de la BBB, al igual que su resistencia transepitelial (Nishitsuji y col. 2011). Otra molécula fundamental en la regulación de las propiedades de la BBB es VEGF-A, ya que se ha descrito que posee un efecto negativo sobre las TJ actuando sobre claudina-5 y ocludina (Argaw y col., 2009), llevado a la disrupción de la BBB y con ello a un aumento en la infiltración del sistema inmune al SNC. PDGF-C es la única candidata por ahora para poder explicar por sí sola el efecto sobre la maduración y estabilización de los vasos, observada en los ensayos funcionales. Finalmente se propone medir HIF-1 α , la cual se sabe encuentra mutada en múltiples PE (Huckins y col., 2019), y la cual podría dar cuenta de la desregulación de procesos angiogénicos a lo largo del neurodesarrollo, pudiendo estar favorecida su acción por la alta presencia de ROS debido a procesos neuroinflamatorios. Es así como este conjunto de moléculas serían las primeras candidatas para determinar mediante que vía de señalización se están llevando a cabo los efectos observados, pudiendo ser incluso todas las mencionadas.

Otra de las posibles proyecciones del trabajo que se dejaron de lado, es que los astrocitos son tanto moduladores como modulados por los diferentes tipos celulares presentes en la NVU, por lo que se propone que el desarrollo de co-cultivos es necesario

para un mejor entendimiento de la interacción de estos componentes dentro de una misma matriz.

Conclusiones

El trabajo con líneas primarias derivadas desde hiPSC proporciona la posibilidad de experimentar con linajes celulares humanos, como son los astrocitos, debido a la imposibilidad de extraer de este tejido de un organismo humano vivo. Al mismo tiempo, plantea desafíos y limitantes, como la capacidad limitada de replicación que poseen y sus características propias por su perfil genético, como su velocidad de crecimiento. Este seminario de título logró implementar el cultivo de astrocitos, combinado con la programación de experimentos y la primera caracterización de las líneas. La caracterización de las líneas es fundamental, debido a que uno está diferenciando desde un estadio más temprano del desarrollo (células troncales neurales) para poder trabajar con el linaje deseado. A pesar de que esto no constituyó un objetivo particular del seminario, se menciona ya que fue parte esencial establecer estas condiciones de cultivo para el correcto desarrollo de los objetivos.

Utilizando primeramente los CMs, de los cuales se desconoce el número de células del que provienen, se logró determinar un perfil de expresión para moléculas angiogénicas canónicas. En vista de que no se encontraron diferencias significativas entre los CMs de PC y de PE, tanto para los secretomas CMs como CMs vp, deja abierta la duda a si, de existir un desbalance en nicho angiogénico, este se encuentre desregulado por acción de los astrocitos. Por lo que solo se cumple parcialmente el objetivo 1, sin poder

descartar si las moléculas angiogénicas no canónicas se encuentran expresadas diferentemente entre los CMs de PC y PE.

De los ensayos funcionales se desprende que existen diferencias del potencial angiogénico de los CMs entre PC y PE. Debido a que no se puede afirmar con certeza que existan diferencias en el perfil de secreción de moléculas angiogénicas de los astrocitos provenientes de PC, respecto a los PE, no se puede afirmar que las diferencias observadas se deban a vías directamente relacionadas con a la angiogénesis. Señalando nuevamente, que es necesario indagar más a profundidad en que moléculas presentes en el CM de los astrocitos podría dar cuenta de los fenómenos observados en los ensayos funcionales.

Finalmente, con la información recabada se afirma que existe un potencial angiogénico diferencial entre los CMs de PC y PE, y que de existir un desbalance en el nicho neuroangiogénico este tipo celular estaría contribuyendo, pero sin poder dilucidarse cual sería a vía de señalización o si este es suficiente para contribuir la disrupción de la BBB.

Referencias

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. 2010. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of disease*, **37.1**: 13-25.
- Alvarez, J. I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P. J., Terouz, S., ... & Van Horssen, J. 2011. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*, **334.6063**: 1727-1731.
- Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zhang, Y., Zameer, A., & John, G. R. 2009. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106.6**: 1977-1982.
- Argaw, A. T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J. N., ... & Ferrara, N. 2012. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation*, **122.7**: 2454-2468.
- Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., ... & Kliche, S. (2003). Role of PlGF in the intra-and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature medicine*, **9.7**: 936.
- Bai, Y., Liang, S., Yu, W., Zhao, M., Huang, L., Zhao, M., & Li, X. 2014. Semaphorin 3A blocks the formation of pathologic choroidal neovascularization induced by transforming growth factor beta. *Molecular vision*, **20**: 1258.

Bechter, K., Reiber, H., Herzog, S., Fuchs, D., Tumani, H., & Maxeiner, H. G. 2010. Cerebrospinal fluid analysis in affective and schizophrenic spectrum disorders: identification of subgroups with immune responses and blood–CSF barrier dysfunction. *Journal of psychiatric research*, **44.5**: 321-330.

Blanchette, M., & Daneman, R. 2015. Formation and maintenance of the BBB. *Mechanisms of development*, **138**: 8-16.

Bloomfield, P. S., Selvaraj, S., Veronese, M., Rizzo, G., Bertoldo, A., Owen, D. R., ... & McGuire, P. 2015. Microglial activity in people at ultra high risk of psychosis and in schizophrenia: an [11C] PBR28 PET brain imaging study. *American Journal of Psychiatry*, **173.1**: 44-52.

Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z. D., ... & Gnirke, A. 2011. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*, 144.3: 439-452.

Bonello, S., Zähringer, C., BelAiba, R. S., Djordjevic, T., Hess, J., Michiels, C., ... & Görlach, A. 2007. Reactive oxygen species activate the HIF-1 α promoter via a functional NF κ B site. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **27.4**: 755-761.

Bowman, G. L., Kaye, J. A., Moore, M., Waichunas, D., Carlson, N. E., & Quinn, J. F. 2007. Blood–brain barrier impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance. *Neurology*, **68.21**: 1809-1814.

Brennand, K. J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., ... & McCarthy, S. 2011. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, **473.7346**: 221.

Brennand, K., Savas, J. N., Kim, Y., Tran, N., Simone, A., Hashimoto-Torii, K., ... & Abdelrahim, M. 2015. Phenotypic differences in hiPSC NPCs derived from patients with schizophrenia. *Molecular psychiatry*, **20.3**: 361.

Brightman, M. W., & Reese, T. S. 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *The Journal of cell biology*, **40.3**: 648-677.

Burrows, C. K., Banovich, N. E., Pavlovic, B. J., Patterson, K., Romero, I. G., Pritchard, J. K., & Gilad, Y. 2016. Genetic variation, not cell type of origin, underlies the majority of identifiable regulatory differences in iPSCs. *PLoS genetics*, **12.1**. e1005793.

Busse, S., Busse, M., Schiltz, K., Bielau, H., Gos, T., Brisch, R., ... & Bernstein, H. G. 2012. Different distribution patterns of lymphocytes and microglia in the hippocampus of patients with residual versus paranoid schizophrenia: further evidence for disease course-related immune alterations?. *Brain, behavior, and immunity*, **26.8**: 1273-1279.

Butt, A. M., Jones, H. C., & Abbott, N. J. 1990. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of physiology*, **429.1**: 47-62.

Casas, B. S., Vitória, G., do Costa, M. N., da Costa, R. M., Trindade, P., Maciel, R., ... & Palma, V. 2018. hiPSC-derived neural stem cells from patients with schizophrenia induce an impaired angiogenesis. *Translational psychiatry*, **8.1**: 48.

Catts, V. S., Wong, J., Fillman, S. G., Fung, S. J., & Shannon Weickert, C. 2014. Increased expression of astrocyte markers in schizophrenia: association with neuroinflammation. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*, **48.8**: 722-734.

Chinchilla, P., Xiao, L., Kazanietz, M. G., & Riobo, N. A. 2010. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell cycle*, **9.3**: 570-579.

Cudmore, M. J., Hewett, P. W., Ahmad, S., Wang, K. Q., Cai, M., Al-Ani, B., ... & Miller, M. R. 2012. The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nature communications*, **3**: **972**

da Fonseca, A. C. C., Matias, D., Garcia, C., Amaral, R., Geraldo, L. H., Freitas, C., & Lima, F. R. S. 2014. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, **8**: 362.

Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C. J., & Barres, B. A. 2009. Wnt/ β -catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106.2**: 641-646.

Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. 2010b. Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, **468.7323**: 562.

Daneman, R., Zhou, L., Agalliu, D., Cahoy, J. D., Kaushal, A., & Barres, B. A. 2010b. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PloS one*, **5.10**: e13741.

di Tomaso, E., London, N., Fuja, D., Logie, J., Tyrrell, J. A., Kamoun, W., ... & Jain, R. K. 2009. PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment. *PloS one*, **4.4**: e5123.

Domigan, C. K., Ziyad, S., & Iruela-Arispe, M. L. 2015. Canonical and noncanonical vascular endothelial growth factor pathways: new developments in biology and signal transduction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **35.1**: 30-39.

Eng, L. F. 1985. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, **8**: 203-214.

Estrada, C., Bready, J. V., Berliner, J. A., Pardridge, W. M., & Cancilla, P. A. 1990. Astrocyte growth stimulation by a soluble factor produced by cerebral endothelial cells in vitro. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **49.6**: 539-549.

Feinberg, I. 1982. Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence?. *Journal of psychiatric research*, **17.4**: 319-334.

Fornito, A., Yücel, M., Patti, J., Wood, S. J., & Pantelis, C. 2009. Mapping grey matter reductions in schizophrenia: an anatomical likelihood estimation analysis of voxel-based morphometry studies. *Schizophrenia research*, **108.1-3**: 104-113.

Gaillard, P. J., van der Sandt, I. C. J., Voorwinden, L. H., Vu, D., Nielsen, J. L., de Boer, A. G., & Breimer, D. D. 2000. Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharmaceutical research*, **17.10**: 1198-1205.

Gonzalez, D. M., Gregory, J., & Brennand, K. J. (2017). The importance of non-neuronal cell types in hiPSC-based disease modeling and drug screening. *Frontiers in cell and developmental biology*, **5**: 117.

Gore, A. V., Swift, M. R., Cha, Y. R., Lo, B., McKinney, M. C., Li, W., ... & Weinstein, B. M. (2011). Rspo1/Wnt signaling promotes angiogenesis via Vegfc/Vegfr3. *Development*, **138.22**: 4875-4886.

Häfner, H., & an der Heiden, W. 1997. Epidemiology of schizophrenia. *The Canadian Journal of Psychiatry*, Vol: 42.2: 139-151.

Heckers, S., & Konradi, C. 2010. Hippocampal pathology in schizophrenia. In *Behavioral neurobiology of schizophrenia and its treatment*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp: 529-553.

Herpers, M. J. H. M., Ramaekers, F. C. S., Aldeweireldt, J., Moesker, O., & Slooff, J. 1986. Co-expression of glial fibrillary acidic protein-and vimentin-type intermediate filaments in human astrocytomas. *Acta neuropathologica*, **70.3-4**: 333-339.

Heye, A. K., Culling, R. D., Hernández, M. D. C. V., Thrippleton, M. J., & Wardlaw, J. M. 2014. Assessment of blood–brain barrier disruption using dynamic contrast-enhanced MRI. A systematic review. *NeuroImage: Clinical*, **6**: 262-274.

Hellstrom, M., Lindahl, P., Abramsson, A., & Betsholtz, C. 1999. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, **126.14**: 3047-3055.

Hoffman, G. E., Hartley, B. J., Flaherty, E., Ladrán, I., Gochman, P., Ruderfer, D. M., ... & Brennand, K. J. 2017. Transcriptional signatures of schizophrenia in hiPSC-derived NPCs and neurons are concordant with post-mortem adult brains. *Nature communications*, **8.1**: 2225.

Hoffman, G. E., Schrode, N., Flaherty, E., & Brennand, K. J. 2019. New considerations for hiPSC-based models of neuropsychiatric disorders. *Molecular psychiatry*, **24.1**: 49.

Hook, V., Brennand, K. J., Kim, Y., Toneff, T., Funkelstein, L., Lee, K. C., ... & Gage, F. H. 2014. Human iPSC neurons display activity-dependent neurotransmitter secretion: aberrant catecholamine levels in schizophrenia neurons. *Stem cell reports*, **3.4**: 531-538.

Huckins, L. M., Dobbyn, A., Ruderfer, D. M., Hoffman, G., Wang, W., Pardiñas, A. F., ... & Boocock, J. 2019. Gene expression imputation across multiple brain regions provides insights into schizophrenia risk. *Nature genetics*, **51.4**: 659.

Insel, T. R. 2010. Rethinking schizophrenia. *Nature*, **468.7321**: 187.

- Jain, R. K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine*, **9.6**: 685.
- Janzer, R. C., & Raff, M. C. 1987. Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, **325.6101**: 253.
- Jha, M. K., Kim, J. H., Song, G. J., Lee, W. H., Lee, I. K., Lee, H. W., ... & Suk, K. 2018. Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: implications in brain health and diseases. *Progress in neurobiology*, **162**: 37-69.
- Jung, G., & Bernstein, D. 2014. hiPSC modeling of inherited cardiomyopathies. *Current treatment options in cardiovascular medicine*, **16.7**: 320.
- Kanemura, H., Go, M. J., Shikamura, M., Nishishita, N., Sakai, N., Kamao, H., ... & Kawamata, S. 2014. Tumorigenicity studies of induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration. *PloS one*, **9.1**: e85336.
- Kang, C. S., Zhang, Z. Y., Jia, Z. F., Wang, G. X., Qiu, M. Z., Zhou, H. X., ... & Pu, P. Y. 2006. Suppression of EGFR expression by antisense or small interference RNA inhibits U251 glioma cell growth in vitro and in vivo. *Cancer gene therapy*, **13.5**: 530.
- Koyama, Y. 2015. Functional alterations of astrocytes in mental disorders: pharmacological significance as a drug target. *Frontiers in cellular neuroscience*, **9**: 261.
- Lewis, D. A., & Levitt, P. 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annual review of neuroscience*, **25.1**: 409-432.

Lieberman, J. A., et al. 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *New England Journal of Medicine*, **353.12**: 1209-1223.

Longman, D., Arfuso, F., Viola, H. M., Hool, L. C., & Dharmarajan, A. M. 2012. The role of the cysteine-rich domain and netrin-like domain of secreted frizzled-related protein 4 in angiogenesis inhibition in vitro. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, **20.1**: 1-6.

Maltepe, E., & Simon, M. C. 1998. Oxygen, genes, and development: an analysis of the role of hypoxic gene regulation during murine vascular development. *Journal of molecular medicine*, **76.6**: 391-401.

Molofsky, A. V., Krennick, R., Ullian, E., Tsai, H. H., Deneen, B., Richardson, W. D., ... & Rowitch, D. H. 2012. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & development*, **26.9**: 891-907.

Muller, N., & J Schwarz, M. 2010. The role of immune system in schizophrenia. *Current immunology reviews*, **6.3**: 213-220.

Murray, R. M., & Lewis, S. W. 1987. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder?. *British medical journal (Clinical research ed.)*, **295.6600**: 681.

Nilsson, I., Bahram, F., Li, X., Gualandi, L., Koch, S., Jarvius, M., ... & Baldwin, M. 2010. VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *The EMBO journal*, **29.8**: 1377-1388.

Nishitsuji, K., Hosono, T., Nakamura, T., Bu, G., & Michikawa, M. 2011. Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain barrier model. *Journal of Biological Chemistry*, **286.20**: 17536-17542.

Park, J. A., Choi, K. S., Kim, S. Y., & Kim, K. W. 2003. Coordinated interaction of the vascular and nervous systems: from molecule-to cell-based approaches. *Biochemical and biophysical research communications*, **311.2**: 247-253.

Paredes, I., Himmels, P., & de Almodovar, C. R. (2018). Neurovascular communication during CNS development. *Developmental cell*, **45.1**: 10-32.

Patel, J. P., & Frey, B. N. 2015. Disruption in the blood-brain barrier: the missing link between brain and body inflammation in bipolar disorder?. *Neural plasticity*, 2015.

Pizurki, L., Zhou, Z., Glynos, K., Roussos, C., & Papapetropoulos, A. 2003. Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *British journal of pharmacology*, **139.2**: 329-336.

Podjaski, C., Alvarez, J. I., Bourbonniere, L., Larouche, S., Terouz, S., Bin, J. M., ... & Arbour, N. 2015. Netrin 1 regulates blood-brain barrier function and neuroinflammation. *Brain*, **138.6**: 1598-1612.

Prieto, C. P., Ortiz, M. C., Villanueva, A., Villarroel, C., Edwards, S. S., Elliott, M., ... & Palma, V. 2017. Netrin-1 acts as a non-canonical angiogenic factor produced by

human Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSC). *Stem cell research & therapy*, **8.1**: 43.

Raab, S., & Plate, K. H. 2007. Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and the nervous system. *Acta neuropathologica*, **113.6**: 607-626.

Rouhani, F., Kumasaka, N., de Brito, M. C., Bradley, A., Vallier, L., & Gaffney, D. 2014. Genetic background drives transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells. *PLoS genetics*, **10.6**: e1004432.

Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., ... & Morales, J. 1991. A cell culture model of the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology*, **115.6**: 1725-1735.

Schmidt-Kastner, R., Van Os, J., Esquivel, G., Steinbusch, H. W. M., & Rutten, B. P. F. 2012. An environmental analysis of genes associated with schizophrenia: hypoxia and vascular factors as interacting elements in the neurodevelopmental model. *Molecular psychiatry*, **17.12**: 1194.

Schroeter, M. L., Abdul-Khaliq, H., Frühauf, S., Höhne, R., Schick, G., Diefenbacher, A., & Blasig, I. E. 2003. Serum S100B is increased during early treatment with antipsychotics and in deficit schizophrenia. *Schizophrenia Research*, **62.3**: 231-236.

Stolp, H. B., & Dziegielewska, K. M. 2009. Role of developmental inflammation and blood–brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathology and applied neurobiology*, **35.2**: 132-146.

Strojnik, T., Kavalar, R., Barone, T. A., & Plunkett, R. J. 2010. Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains. *Anticancer research*, 30.12: 4851-4860.

SUGAI, T., KAWAMURA, M., IRITANI, S., ARAKI, K., MAKIFUCHI, T., IMAI, C., ... & NAWA, H. 2004. Prefrontal abnormality of schizophrenia revealed by DNA microarray: impact on glial and neurotrophic gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1025.1**: 84-91.

Sundberg, M., Bogetofte, H., Lawson, T., Jansson, J., Smith, G., Astradsson, A., ... & Hallett, P. 2013. Improved cell therapy protocols for Parkinson's disease based on differentiation efficiency and safety of hESC-, hiPSC-, and non-human primate iPSC-derived dopaminergic neurons. *Stem cells*, **31.8**: 1548-1562.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, **126.4**: 663-676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, **131.5**: 861-872.

Tammela, T., Zarkada, G., Nurmi, H., Jakobsson, L., Heinolainen, K., Tvorogov, D., ... & Miura, N. 2011. VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. *Nature cell biology*, **13.10**: 1202.

Tran, N. N., Ladrán, I. G., & Brennand, K. J. 2012. Modeling Schizophrenia Using induced pluripotent Stem cell-Derived and Fibroblast-induced neurons. *Schizophrenia bulletin*, **39.1**: 4-10.

Turetsky, B., Cowell, P. E., Gur, R. C., Grossman, R. I., Shtasel, D. L., & Gur, R. E. 1995. Frontal and temporal lobe brain volumes in schizophrenia: relationship to symptoms and clinical subtype. *Archives of general psychiatry*, **52.12**: 1061-1070.

Velakoulis, D., Pantelis, C., McGorry, P. D., Dudgeon, P., Brewer, W., Cook, M., ... & Singh, B. 1999. Hippocampal volume in first-episode psychoses and chronic schizophrenia: a high-resolution magnetic resonance imaging study. *Archives of general psychiatry*, **56.2**: 133-141.

Wagner, S., & Gardner, H. 2000. Modes of regulation of laminin-5 production by rat astrocytes. *Neuroscience letters*, **284.1-2**: 105-108.

Walsh, T., McClellan, J. M., McCarthy, S. E., Addington, A. M., Pierce, S. B., Cooper, G. M., ... & Stray, S. M. 2008. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *science*, **320.5875**: 539-543.

Wang, Y., Nakayama, M., Pitulescu, M. E., Schmidt, T. S., Bochenek, M. L., Sakakibara, A., ... & Barberis, A. 2010. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*, **465.7297**: 483.

Wang, Y., Jin, S., Sonobe, Y., Cheng, Y., Horiuchi, H., Parajuli, B., ... & Suzumura, A. 2014. Interleukin-1 β induces blood–brain barrier disruption by downregulating sonic hedgehog in astrocytes. *PloS one*, **9.10**: e110024.

Warren, C. M., Ziyad, S., Briot, A., Der, A., & Iruela-Arispe, M. L. 2014. A ligand-independent VEGFR2 signaling pathway limits angiogenic responses in diabetes. *Sci. Signal.*, **7.307**: ra1-ra1.

Weinberger, D. R. 1987. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Archives of general psychiatry*, **44.7**: 660-669.

Wosik, K., Cayrol, R., Dodelet-Devillers, A., Berthelet, F., Bernard, M., Moundjian, R., ... & Prat, A. 2007. Angiotensin II controls occludin function and is required for blood–brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience*, **27.34**: 9032-9042.

Xing, F., Kobayashi, A., Okuda, H., Watabe, M., Pai, S. K., Pandey, P. R., ... & Liu, W. 2013. Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO molecular medicine*, **5.3**: 384-396.

Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., ... & Suzuki, N. 2011. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Human molecular genetics*, **20.23**: 4530-4539.

Yang, Y., Higashimori, H., & Morel, L. 2013. Developmental maturation of astrocytes and pathogenesis of neurodevelopmental disorders. *Journal of neurodevelopmental disorders*, **5.1**: 22.

Anexos

Anexo 1. Líneas de hiPSC utilizadas para el estudio.

Célula	Grupo	Género	Fuente celular	Técnica de reprogramación	Diagnostico	Cariotipo
C1	control	M	Fibroblasto	Kit cytotune 1.0 (ThermoFisher)	Sano	46, XY
C2	control	M	Fibroblasto	Kit cytotune 1.0 (ThermoFisher)	Sano	46, XY
C3	control	F	Fibroblasto	(OCT4, SOX2, KLF4, MYC, LIN28)	Sano	46, XX
ES1	esquizofrénico	M	Fibroblasto	Kit cytotune 1.0 (ThermoFisher)	Esquizofrenia paranoica	46, XY
ES2	esquizofrénico	M	Fibroblasto	(OCT4, SOX2, KLF4, MYC, LIN28)	Esquizofrenia paranoica	46, XY
ES3	esquizofrénico	F	Fibroblasto	(OCT4, SOX2, KLF4, MYC, LIN28)	Desorden esquizoafectivo	46, XX

Datos clínicos de los pacientes sobre los cuales se extrajeron células para su reprogramación a hiPSC, entregados por el laboratorio del Dr. Steven Rehen.

Anexo 2. Partidores utilizados en el estudio.

Gen	Anterógrado 5'-3'	Retrógrado 5'-3'
<i>GAPDH</i>	CAAGAAGGTGGTGAAGCAGGC	CCACCACCCTGTTGCTGTAG
<i>B2M</i>	GCTATCCAGCGTACTCCAAA	GAAAGACCAGTCCTTGCTGA
<i>GFAP</i>	AAGCACGAAGCCAACGACTA	TTCCCCGTCTTTGGTGCTTT
<i>S100B</i>	AGACGGTCATGCAAGAAAGC	ATGCAGGCCGTTAAACAGC
<i>IL-8</i>	GAGGGTTGTGGAGAAGTTTTT	CTGGCATCTTCACTGATTCTT

Partidores de *GFAP* y de *S100B* fueron generados a partir del programa AmplifX bajo las condiciones indicadas en la sección 2.X. Se probó teóricamente su función a través de la herramienta PrimerBlast.