



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Anomalías neuronales en la esquizofrenia: Ampliando la mirada desde la perspectiva de nicho”

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

DELIA CATALINA GARRIDO JARA

Directora del Seminario de Título:

Dra. Verónica Palma Alvarado

Codirectora del Seminario de Título:

Dra. Bárbara Casas Atala

Noviembre 2022

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 la **Sra. Delia Catalina Garrido Jara**,

“Anomalías neuronales en la esquizofrenia: Ampliando la mirada desde la perspectiva de nicho”

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

Dra. Verónica Palma Alvarado
Directora Seminario de Título: _____

Dra. Bárbara Casas Atala
Directora Seminario de Título: _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

Evaluador:

Santiago de Chile, noviembre de 2022

BIOGRAFÍA

Nací el 17 de julio de 1997, en Santiago, Chile. Desde mi infancia, hasta ahora he vivido en una linda casita en Peñalolén, rodeada de naturaleza y a los pies de la cordillera. Fui a un colegio cerca de mi casa, el mismo desde *pre-kinder*, hasta cuarto medio. Creciendo fui una niña inquieta, manifesté varios intereses en distintos deportes, la literatura y la pintura. Me gustaba cómo permiten percibir, con una conciencia plena, el mundo que nos rodea desde distintas perspectivas. Y siento que eso me llevó a enamorarme de la ciencia, un campo diverso que permite entender, un poco mejor, el mundo que nos rodea. Que nos hace plantear problemas, preguntas y metodologías para resolver estas interrogantes, de manera creativa. Participé en ferias científicas, conversatorios, talleres electivos, escuelas de verano buscando qué me gustaba, y qué camino podría seguir luego del colegio. Así fue como me topé con esta carrera que hoy, va llegando a su fin. Por mi paso en la universidad valoro cómo aprendí a pensar y razonar con rigurosidad científica, hecho que ha cambiado la perspectiva de lo que me rodea de manera muy interesante y las increíbles oportunidades que he tenido. Pude ir a colegios a hacer clases de biología y transmitir mi amor por la ciencia, conversando con estudiantes. Participamos en un mundial de Biología Sintética en Estados Unidos, junto a un tremendo equipo con los que conservo amistades hasta hoy. Tuve la tremenda oportunidad de ir de intercambio a España becada por un semestre. Descubrí mi amor por la bicicleta, y mi interés por la meditación. Hice buenas amistades, aprendí mucho y por eso estoy agradecida. No tengo muy claro que sigue para mí, pero sé que mientras siga mi curiosidad innata, cultive la constancia y duerma 8 horas diarias, podré lograr lo que me proponga.

DEDICATORIA

*A la mini Delia que quería estudiar una carrera en ciencia,
pero no sabía si sería capaz ...
Sí se pudo.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi mamá Iris por sus palabras de aliento, sus abrazos y disposición a ayudarme en todo; A mi papá Mauricio muchas gracias por escucharme, llevarme tecitos cuando ya era tarde y yo sentía que no podía más, por siempre decirme que puedo hacer todo lo que me proponga. A mi hermano Mauro gracias por hacerme reír y siempre tener arengas para mí. Muchas gracias a mi abuelita que siempre tuvo un abrazo para mí y me ofreció un espacio para despejarme y descansar. Quisiera también agradecer a la Dra. Verónica Palma por acogerme en su laboratorio hace ya casi tres años, por todas las oportunidades que me ha dado y su guía en mi formación como científica. A mi tutora Bárbara Casas, muchísimas gracias por estos años de formación, por estar dispuesta siempre a enseñarme y ayudarme tanto en mi formación científica como personal, siempre con una paciencia y tranquilidad que valoro mucho. A mis compañeros de Laboratorio, especialmente a Nati, Fabi, Edel, Jeshu, Seba, David y Dan muchas gracias por la gran disposición a ayudar, a resolver preguntas, por su colaboración en estos años de formación. Muchas gracias también por generar un ambiente grato, en donde las risas no faltaron y el cariño se siente siempre. Agradecer a los compañeros de laboratorios AG y MA por la disposición a prestar equipos y a compartir conocimientos. Realmente, estoy muy agradecida del ambiente enriquecedor, cariñoso, colaborativo y diverso en el que me formé estos años. Quisiera agradecer, de todo corazón, a mis amigas Florentina y Consuelo por todas las sesiones de trabajo, por su paciencia cuando llegaba tarde, por siempre escucharme, darme consejos que sólo me han nutrido y por siempre ser mis fans número uno, su apoyo y amistad ha sido fundamental en este proceso, y por eso estoy muy agradecida.

FINANCIAMIENTO

Para la realización de este Seminario de Título se contó con el financiamiento de los proyectos FONDECYT #1190083 y #1221522, cuya Investigadora Responsable es la Dra. Verónica Palma.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 Un cambio de paradigma para abordar el estudio de la esquizofrenia: una enfermedad neurovascular y del neurodesarrollo	17
1.2 La vascularización del cerebro en el desarrollo embrionario: el establecimiento de la unidad neurovascular.	20
1.3 Los principales componentes de la Unidad Neurovascular: Células Endoteliales de Cerebro, Células Troncal Neurales, astrocitos y neuronas.	25
1.4 Las células troncales pluripotentes inducidas humanas como modelo para recapitular la unidad neurovascular SZ en el neurodesarrollo.....	28
1.5 Preguntas de investigación.....	33
1.6 Objetivo General	33
1.7 Objetivos Específicos	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.1 Cultivos Celulares y Muestras de Medio Condicionado.	34
2.2 Colección de Medio condicionado.	35
2.3 Extracción RNA y Síntesis cDNA.	36
2.4 Diseño Partidores.	36

2.5 Estandarización Partidores.	38
2.6 PCR Cuantitativo (qPCR).	40
2.7 Análisis Proteómico.....	40
2.8 Interpretación Resultados Proteoma.	41
2.9 Análisis Estadístico.	41
3. RESULTADOS.....	43
3.1 La caracterización molecular sugiere un desbalance sináptico en neuronas SZ.....	43
3.2. El perfil de moléculas neuro-angiogénicas secretadas por componentes de la unidad neurovascular es diferente en SZ versus HC.	53
DISCUSIÓN.....	63
4.1 Alteraciones en la expresión de genes sinápticos durante la diferenciación neuronal en cultivos derivados de hPSC de pacientes con SZ sugieren un desbalance entre la sinapsis excitatoria/inhibitoria.	63
4.2 Los secretomas de los principales componentes de la unidad neurovascular en SZ son menos neurotróficos y podrían contribuir a la migración y sinapsis defectuosa en neuronas.	67
CONCLUSIONES.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74
ANEXO.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo Neurovascular embrionario.....	22
Figura 2. Los componentes celulares de la unidad neurovascular están estrechamente relacionados.	25
Figura 3. hiPSC como modelo para estudiar los componentes celulares de la unidad neurovascular en SZ.....	29
Figura 4. SYP aumenta su expresión a lo largo de la diferenciación de neuronas SZ.	46
Figura 5. Los genes sinápticos inhibitorios disminuyen su expresión durante el transcurso de diferenciación de neuronas en HC y SZ.	48
Figura 6. Los genes sinápticos excitatorios aumentan su expresión durante el transcurso de diferenciación de neuronas SZ.....	49
Figura 7. Los genes del neurodesarrollo presentan diferencias en sus patrones de expresión durante el transcurso de diferenciación de neuronas SZ.....	50
Figura 8. SEMA3A aumenta su expresión a lo largo de la diferenciación de neuronas HC y SZ.....	51
Figura 9. Los genes metabólicos presentan diferencias en sus patrones de expresión durante el transcurso de diferenciación de neuronas SZ.	52
Figura 10. Los componentes celulares de la unidad neurovascular secretan perfiles de moléculas angiogénicas característicos.	55
Figura 11. El secretoma de moléculas neuro-angiogénicas de SZ es menos neurotrófico.	56
Figura 12. Los niveles de uPA son menores en el secretoma de diversos componentes de la unidad neurovascular en SZ respecto a HC.....	62

ANEXO

Figura 13. No hay diferencias en la expresión génica de transcritos claves en el proceso de maduración neuronal a los 30 días de cultivo para neuronas SZ y HC.	90
Figura 14. No hay diferencias en la expresión génica para los transcritos seleccionados a los 90 días de cultivo para neuronas SZ y HC.	91
Figura 15. El secretoma de cultivos neuronales SZ de 70 días presenta bajos niveles de MCP-1....	92
Figura 16. Las membranas, representativas de los proteomas angiogénicos para secretomas individuales, de los diferentes cultivos neuronales de 70 días presentan patrones de expresión similares.	93
Figura 17. Las membranas de proteoma neurogénico para cada uno de los secretomas de los cultivos neuronales de 70 días ensayados presentan patrones de expresión similares.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de los cultivos primarios hiPSC utilizados en el trabajo.	35
Tabla 2. Partidores utilizados en el trabajo.	38
Tabla 3. Valores de E y R para las condiciones de amplificación.	40
Tabla 4. Panel de genes de maduración neuronal seleccionados para este estudio.....	45
Tabla 5. Resumen que destaca las proteínas alteradas en el secretoma de los diferentes componentes celulares de la unidad neurovascular en SZ.	58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATP: Adenosín Trifosfato

BBB: Barrera Hematoencefálica (del inglés, Blood Brain Barrier)

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

CBF: Flujo Cerebral Sanguíneo (del inglés, Cerebral Blood Flow)

cDNA: DNA complementario (del inglés, complementary DNA)

CF: Conectividad Funcional

CNS: Sistema Nervioso Central (del inglés, Central Nervous System)

Ct: umbral de ciclo (Ct, del inglés, Cycle threshold)

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (del inglés, Deoxyribonucleic Acid)

ECM: Matriz Extracelular (del inglés, ExtraCellular Matrix)

fMRI: Imágenes de Resonancia Magnética Funcional (del inglés, functional Magnetic Resonance Imaging)

HC: Sujeto sano (del inglés, Healthy Control)

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

IGFBP2: Proteína de Unión a Factor de Crecimiento similar a Insulina 2 (del inglés, Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2)

IL-8: Interleucina 8

MCP-1: Proteína Quimioattractante de Monocitos-1 (del inglés Monocyte Chemoattractant Protein-1)

MMP-9: Metaloproteinasa de Matriz 9

NGF: Factor de crecimiento de Nervio (del inglés, Nerve Growth Factor)

NO: Óxido Nítrico (del inglés, Nitrogen Oxide)

NPC: Célula progenitora Neural (del inglés, Neural progenitor Cell)

NSC: Célula Troncal Neural (del inglés, Neural Stem Cell)

NVU: Unidad Neurovascular (del inglés, NeuroVascular Unit)

PAI-1: Inhibidor del Activador de Plasminógeno 1 (del inglés, Plasminogen Activator Inhibitor 1)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction)

PDGF: Factor de crecimiento Derivado de Plaquetas, (del inglés Platelet Derived Growth Factor)

PEDF: Factor Derivado de Pigmento del Epitelio (del inglés, Pigment epithelium-derived factor)

PPC: Plexo Pial Capilar

qPCR: PCR cuantitativo (del inglés, quantitative PCR)

SZ: Esquizofrenia

uPA: Activador de Plasminógeno tipo uroquinasa (del inglés, urokinase type Plasminogen Activator)

VEGFA: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A (del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor A)

Palabras claves: Esquizofrenia, sinapsis, conectividad funcional, hPSC, unidad neurovascular, células endoteliales de cerebro, célula troncal neural, neuronas, astrocitos, secretoma, uPA.

RESUMEN

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico cuyo origen, la evidencia apunta, se remonta al neurodesarrollo. Durante el proceso embrionario el sistema vascular y nervioso se desarrollan de manera concomitante e interactúan en un nicho definido como unidad neurovascular. Alteraciones en el establecimiento de esta comunicación neurovascular podrían generar una posible predisposición hacia la esquizofrenia. Al modelar este trastorno mediante el uso de células pluripotentes inducidas diferenciadas a cultivos neuronales, se ha reportado una conectividad funcional alterada en las redes neuronales. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen este fenómeno y, en particular, la contribución del nicho neurovascular, no han sido estudiados. En este seminario de título se buscó contribuir a estas interrogantes mediante la evaluación comparativa de la expresión de genes asociados a sinapsis y conectividad funcional durante el transcurso de la maduración neuronal de neuronas, diferenciadas a partir de células pluripotentes inducidas, y posterior análisis de la composición proteica del secretoma de los principales componentes celulares de la unidad neurovascular: células troncal neurales, neuronas, astrocitos y células endoteliales de cerebro. Se observaron diferencias al evaluar el curso temporal de la expresión génica entre muestras provenientes de pacientes con esquizofrenia y sujetos sanos, tanto para genes metabólicos tales como *ATP5F1D*, como genes asociados al desarrollo neuronal como *CDK5R1* y genes asociados a sinapsis (*SYP*, *HOMER1* y *GRIN1*). Estos resultados sugieren una maduración de las redes neuronales con una expresión génica alterada en la esquizofrenia, que promueve anomalías en la conectividad sináptica y en el balance excitatorio/inhibitorio. En todos los componentes celulares de la unidad neurovascular evaluados se encontró una secreción de moléculas neuro-angiogénicas que promueven el desarrollo concomitante de los sistemas vascular y nervioso. Sin embargo, en la condición de esquizofrenia se reporta un secretoma menos neurotrófico, un ligero aumento de factores mitogénicos y una disminución transversal de uPA, una molécula clave en la formación de conexiones sinápticas. Estos resultados sugieren un ambiente perjudicial para el establecimiento y maduración de redes neuronales en esquizofrenia. Los resultados de este trabajo contribuyen a la caracterización de las anomalías sinápticas previamente observadas en cultivos neuronales provenientes de pacientes con esquizofrenia, incluyendo el análisis de la expresión génica durante su maduración, y refuerzan la importancia del nicho neurovascular.

ABSTRACT

Schizophrenia is a neurodevelopmental psychiatric disorder, an embryonic process in which the vascular and nervous systems develop concomitantly, interacting in a specific niche defined as the neurovascular unit. Alterations in this interaction could lead to a proneness towards schizophrenia. The study of this disorder using human induced pluripotent stem cells differentiated into neuronal cultures describes less dynamic functional connectivity in neuronal networks. But neither the molecular basis underlying this phenomenon nor the contribution of the neurovascular niche secretome has been explored so far. This thesis aimed to increase our current understanding of these issues through the comparative analysis of gene expression related to functional activity during the neuronal culture maturation, followed by the analysis of the protein composition of the neurovascular unit secretome; in particular, its main cellular components: neural stem cells, neurons, astrocytes, and brain endothelial cells. Over the temporal course of neuronal differentiation, we observed an altered gene expression in schizophrenia for metabolic genes such as *ATP5F1D*, neurodevelopmental genes like *CDK5R1*, and synapsis-associated genes (*SYP*, *HOMER 1*, and *GRIN1*). These results suggest that the maturation process of the neuronal networks in schizophrenia possesses a unique gene expression pattern, which could promote anomalies in the synaptic connectivity and the balance between excitatory/inhibitory synapses throughout its differentiation. Regarding the secretome analyses, we observed the presence of neuro-angiogenic molecules in all its cellular components. Nevertheless, the schizophrenia neurovascular unit secretome was less neurotrophic, with a slight increase in mitogenic factors and a transversal decrease in the uPA levels, a key molecule in synaptic connections. These results suggest a detrimental environment for the establishment and maturation of the neuronal networks in schizophrenia. The present work contributes to the depiction of the underlying synaptic anomalies previously described in schizophrenia-derived neuronal cultures, integrating gene expression through neuronal maturation, and considering the neurovascular niche perspective.

INTRODUCCIÓN

1.1 Un cambio de paradigma para abordar el estudio de la esquizofrenia: una enfermedad neurovascular y del neurodesarrollo.

La esquizofrenia (SZ) es un trastorno psiquiátrico complejo, de carácter crónico, que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial (Harvey y col., 2019). La SZ se comenzó a considerar como un trastorno mental -a comienzos de 1900 (Jablensky, 2010). En este contexto es interesante revisar el trabajo del psiquiatra suizo Eugene Bleuler quien acuñó el término *esquizofrenia*, el cual viene de la conjugación de dos palabras griegas y se traduce como “mente dividida”. Si bien este término puede causar confusión con el trastorno de personalidad múltiple, Bleuler utilizó este término para enfatizar el quiebre de diversas funciones psíquicas como una de las características más prevalentes en la enfermedad. Bleuler, indicaba que *“en cada caso, hay una evidencia del quiebre de funciones psicológicas: a medida que avanza la enfermedad, la personalidad e identidad de la persona pierde su cohesión”* (Tillman, 1951).

La SZ se caracteriza por la percepción alterada de la realidad por parte del paciente, que a su vez repercute en sus relaciones sociales, laborales y familiares (Harvey y col., 2019). Los síntomas se comienzan a manifestar en la adolescencia tardía o adultez temprana y se presentan en un amplio espectro que varía según el paciente y, dentro de un mismo paciente, según el transcurso de su vida (Harvey y col., 2019). Estos síntomas se clasifican en tres categorías: los síntomas positivos como las alucinaciones, delirios, discurso desorganizado y conductas motoras desorganizadas; los síntomas negativos como anhedonia, discurso reducido y catatonia; y los síntomas cognitivos con un detrimento en las capacidades cognitivas como son mantener la atención, la memoria de corto plazo y la capacidad de realizar funciones ejecutivas básicas (Patel y col., 2014).

A nivel fisiológico, se ha reportado la pérdida progresiva de materia gris y una cantidad sustancial de trabajos ha reportado deficiencias en la conectividad neuronal entre distintas regiones del cerebro, con disfunciones a nivel sináptico y anormalidades en el balance sináptico excitatorio/inhibitorio (Kantrowitz & Javitt, 2010; Inan y col., 2013; Di Lorenzo y col., 2015; Zhuo y col., 2014; Ribolsi y col., 2014). Estos estudios han sido realizados mediante técnicas no invasivas, que estudian la dinámica de flujos hemodinámicos y la asocian a actividad cerebral, comparando entre pacientes con SZ y sujetos sanos (HC, del inglés Healthy Control), complementado con análisis en tejidos *postmortem* (Erdeniz y col., 2017; Spencer y col., 2009). Por otro lado, se ha descrito una neuroinflamación crónica en los pacientes, específicamente en la corteza prefrontal dorsolateral (López-González y col., 2019).

Hoy en día, no existe cura para la SZ. Los tratamientos disponibles están enfocados en tratar los síntomas positivos y poseen un efecto reducido sobre los síntomas negativos y cognitivos (Patel y col., 2014). Además, se ha estimado que sólo son eficientes en el tratamiento de la mitad de los pacientes y usualmente conllevan efectos secundarios de carácter metabólico y neurológico (Stępnicki y col., 2018).

La manifestación tardía de síntomas en los pacientes y la pérdida progresiva de materia gris a lo largo del curso de su vida llevaron a plantear, en un comienzo, que el origen de esta enfermedad era de carácter neurodegenerativo (Kochunov & Hong, 2014). Sin embargo, hallazgos sobre el proceso del neurodesarrollo en humanos y la identificación de marcas genéticas características de pacientes SZ ha contribuido a una hipótesis que define a la SZ como una enfermedad del neurodesarrollo. Dentro de las evidencias que sustentan esta hipótesis se encuentra que los genes relacionados con la enfermedad son, en su mayoría, genes que normalmente se expresan en etapas

fetales del desarrollo, más que en etapas postnatales (Harrison, 2014; Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014; Trubetskoy y col., 2022).

La etiología de SZ es altamente compleja y se considera que posee un origen multifactorial. El componente genético es importante y muy heterogéneo, contando con la descripción de al menos 287 locis relacionados con la SZ (Trubetskoy y col., 2022). Sin embargo, la predisposición genética no es suficiente para el desencadenamiento de la enfermedad. Factores ambientales, en periodos pre y postnatales son claves para su manifestación en la vida del paciente. La hipoxia prenatal, la restricción calórica materna, la exposición a traumas, la depresión y el consumo de drogas psicotrópicas, pueden gatillar esta enfermedad (Susser & St Clair, 2013; Harvey y col., 2019).

Una de las primeras observaciones del Dr. Bleuler sobre tejidos *postmortem* de pacientes incluyen una interesante observación: *“La fragilidad de los vasos sanguíneos que aparece en varios esquizofrénicos, tanto agudos como crónicos, pareciese indicar una patología vascular”* (Tillman, 1951). A pesar de esto, los estudios por gran parte del siglo se enfocaron en el estudio del componente nervioso de esta enfermedad. Sin embargo, en las últimas décadas las observaciones de Bleuler han vuelto a resonar, permitiendo una perspectiva más integradora, que contempla el componente vascular además del neural (Jablensky, 2010).

Respecto al componente vascular en SZ, se ha reportado un reducido número de vasos sanguíneos en la corteza frontal de pacientes con SZ, con una microvasculatura anómala, de carácter delgado y tortuoso (Andreasen y col., 1997). Se ha reportado que, en ciertas zonas del cerebro, los pacientes tienen un flujo sanguíneo cerebral reducido respecto a HC (Lopes y col., 2015; Katsel y col., 2017). Además, de forma consistente, se ha observado una barrera hematoencefálica hiperpermeable, lo que permite el paso de agentes del sistema inmune o de citoquinas proinflamatorias al cerebro, contribuyendo a la neuroinflamación ya mencionada (Baruah & Vasudevan, 2019).

Considerando entonces que tanto el componente vascular como neural se describen de manera anormal en SZ, es importante estudiar en el contexto del desarrollo embrionario del sistema nervioso central (CNS, del inglés Central Nervous System) la constitución de ambos componentes.

1.2 La vascularización del cerebro en el desarrollo embrionario: el establecimiento de la unidad neurovascular.

La íntima relación entre la actividad neuronal y el flujo sanguíneo es clave para el funcionamiento del CNS, por lo que una falla en esta interacción podría generar fisiopatologías que causan enfermedades tales como la SZ (Katsel y col., 2017).

El cerebro es un órgano que necesita una constante fuente de oxígeno y nutrientes para su correcto desarrollo y funcionamiento; la falta de reservas energéticas en éste demanda un flujo rápido y constante que se entrega a través de una intrincada red de vasos sanguíneos (Watts y col., 2018). Las redes de microvasculatura cerebral se distribuyen espacialmente de manera casi idéntica a las redes neuronales (Di Giovanna y col., 2018). Además, existe una importante comunicación entre ambos sistemas; estudios muestran que la actividad de una neurona es suficiente para dilatar o contraer los vasos vecinos (Cauli, 2004).

Esta intrincada red es el resultado del desarrollo concomitante de ambos sistemas a nivel espaciotemporal durante el desarrollo embrionario temprano (James & Mukoyama, 2011). Desde el interior del tubo neural, las células progenitoras neurales, mediante la secreción del factor pro-angiogénico VEGFA, reclutan angioblastos y células endoteliales hacia a la superficie del tubo neural, los que se diferenciarán y formarán la microvasculatura del cerebro (James & Mukoyama, 2011) (véase figura 1-A). Las células endoteliales cerebrales (BEC, del inglés Brain Endothelial Cells) forman un rudimentario sistema de vascularización conocido como el *plexo pial capilar*. A medida que

avanza el desarrollo embrionario y comienza la diferenciación de las células progenitoras neurales a neuronas, las células endoteliales de cerebro que conforman el plexo pial capilar invadirán el tubo neural, guiadas por factores solubles secretados por las células progenitoras neurales desde el interior del tubo, para generar nuevos vasos sanguíneos y así iniciar la vascularización del cerebro (Engelhardt & Liebner, 2014) (véase figura 1-B). El proceso de generar vasos sanguíneos a partir de vasos ya existentes se conoce como el proceso de *angiogénesis*, que no debe confundirse con la *vasculogénesis*, la cual corresponde a la formación *de novo* de vasos sanguíneos.

En la superficie del tubo neural, los puntos en que los vasos sanguíneos penetran para luego vascularizar -mediante angiogénesis- el interior del tubo, son resultado de procesos finamente regulados mediante la presencia de factores solubles, con sus concentraciones definidas por los componentes de la matriz extracelular (ECM, el inglés Extra Cellular Matrix) (Ben-Zvi & Liebner, 2021). La composición de la ECM es dinámica y clave en el neurodesarrollo, propiciando gradientes de moléculas con diversas funciones. Por ejemplo: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular A, VEGFA (del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor A), Factor de crecimiento Derivado de Plaquetas, PDGF (del inglés Platelet Derived Growth Factor) y factores de la familia Wnt son secretadas por las células progenitoras neurales y propiciarán la migración de las células endoteliales de cerebro al tubo neural; moléculas como la Proteína de Unión a Factor de Crecimiento similar a Insulina 2, IGFBP2 (del inglés Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2) o el Factor Derivado de Pigmento del Epitelio, PEDF (del inglés Pigment epithelium-derived factor) promueven la auto-renovación de las células troncales neurales, manteniendo un *pool* de estas a través del neurodesarrollo; el Activador de Plasminógeno tipo uroquinasa, uPA (del inglés, urokinase type Plasminogen Activator), Reelina y la Metaloproteínasa de Matriz 9 (MMP-9) son ejemplos de proteínas remodeladoras de ECM que permiten la proyección axonal y establecer conexiones

sinápticas, procesos claves en la maduración de cultivos neuronales (Lino y col., 2014; Merino y col., 2018; Reinhard y col., 2015; Shen y col., 2019). Dichos factores son ejemplos de la variada gama secretada por los componentes celulares de la unidad neurovascular y que permiten una vascularización que se desarrolla en conjunto con las primeras estructuras anatómicas del cerebro. (Ruhrberg y col., 2002).

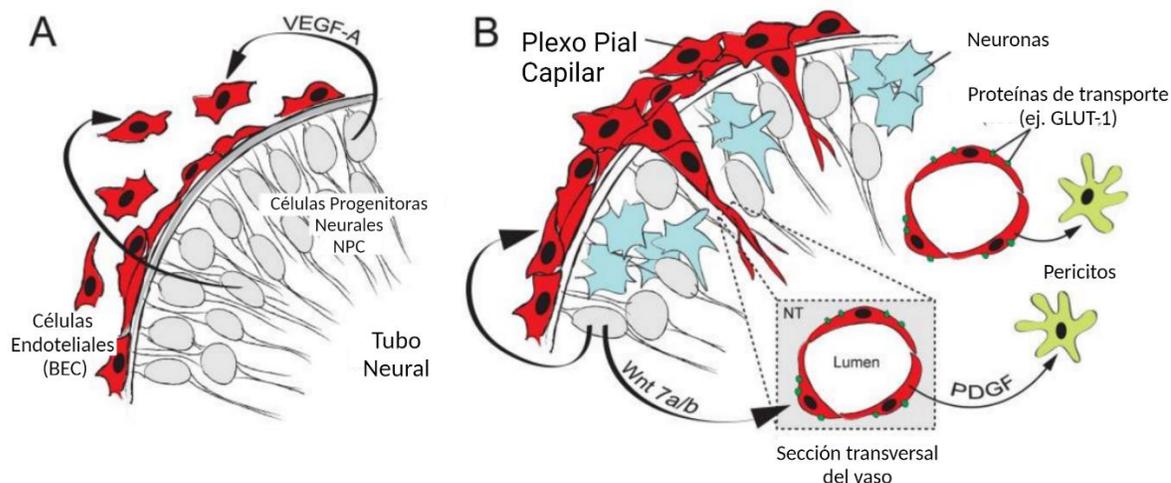


Figura 1. Desarrollo Neurovascular embrionario. El esquema representa los primeros procesos de interacción entre los sistemas nervioso y vascular durante el desarrollo embrionario. En (A), el reclutamiento de angioblastos y Células Endoteliales de Cerebro a la superficie del tubo neural por parte de las células progenitoras neurales, y en (B) la posterior invasión del tubo neural por parte de las Células Endoteliales de Cerebro (Modificado de James & Mukoyama, 2011).

Las células endoteliales de cerebro en este contexto interactúan con otros componentes celulares del CNS, lo que permite mantener la integridad de los vasos sanguíneos y las propiedades particulares de la interfaz altamente selectiva entre el sistema circulatorio y el CNS, la Barrera Hematoencefálica (BBB, del inglés Blood Brain Barrier) (James & Mukoyama, 2011). La unidad funcional de esta estructura se define como la unidad neurovascular (NVU, del inglés Neurovascular Unit) y corresponde al nicho en el que interactúan los componentes celulares neurales con los vasculares, es decir el ambiente discreto en el que coinciden componentes celulares, la totalidad de

factores secretados al medio y los componentes estructurales de matriz extracelular generada por las células que componen el nicho (Iadecola, 2017). La unidad neurovascular es dinámica y evoluciona tanto en sus componentes celulares como moleculares a través del desarrollo (Iadecola, 2017).

Se ha reportado que diversos factores que participan en el reclutamiento de vasos y en el proceso de angiogénesis también tienen efectos en el sistema nervioso. Por ejemplo, el principal factor secretado por las células progenitoras neurales corresponde a VEGFA, un factor clave en la angiogénesis, el cual se ha relacionado con la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, clave en procesos de desarrollo neural, transmisión y plasticidad sináptica (Casas y col., 2022 ii; Stenman y col., 2008). VEGFA no solo afecta la angiogénesis; en su ausencia se ha reportado un desarrollo alterado del tubo neural, lo que da evidencia de las propiedades neurogénicas de esta molécula (Ruhrberg y col., 2002; Gerhardt y col., 2003). Además, se ha evidenciado que las células endoteliales inducen la neurogénesis (la diferenciación de neuronas) en el CNS en desarrollo y la auto-renovación de las células troncales neurales, progenitoras de las células progenitoras neurales en el linaje neural (Karakatsani y col., 2019; Shen y col., 2004). Es a partir de la premisa de que ambos sistemas son co-dependientes que surge el término de la neuro-angiogénesis, el cual hace referencia al desarrollo coordinado de neuronas y vasos sanguíneos (Casas y col., 2018).

Como se mencionó anteriormente, en cuanto se genera la invasión de las células endoteliales de cerebro al tubo neural, estas reclutan pericitos y establecen una red de vasos con permeabilidad altamente selectiva, la BBB (Abbott y col., 2010). Esta interfaz entre la sangre y el parénquima del cerebro permite el paso de nutrientes y el desecho de toxinas, siendo clave para mantener la homeostasis del cerebro. La reducida permeabilidad de esta estructura se debe de manera directa a la presencia de características particulares de las células endoteliales de cerebro, inducidas por su

contacto con células del linaje neural (Keaney & Campbell, 2015). Las células endoteliales de cerebro generan un endotelio continuo, es decir, con ausencia de fenestraciones; presentan proteínas de unión estrecha específicas, que cierran el espacio entre células adyacentes; presentan una transcitosis reducida y poseen transportadores de eflujo e influjo altamente específicos (Keaney & Campbell, 2015; Langen y col., 2019). Los pericitos contribuyen indirectamente tanto a la mantención de la estabilidad del vaso sanguíneo como a la angiogénesis (Armulik y col., 2011). Gracias a sus características contráctiles, los pericitos aportan a la contracción de la microvasculatura y, por ende, al flujo sanguíneo cerebral (CBF, del inglés Cerebral Blood Flow) (Hall y col., 2014). Los astrocitos también favorecen la disminución de la permeabilidad de la BBB de manera indirecta: alrededor de la semana 15 post-concepción se generan las primeras poblaciones de astrocitos, que se establecen en los capilares endoteliales y recubren con su pie astrocítico aproximadamente el 99% de la superficie luminal de los vasos sanguíneos, aportando a mantener la integridad de la BBB y controlando el flujo cerebral sanguíneo (Daneman y col., 2010; Abbott y col., 2010). En este microambiente, en donde los componentes celulares están muy cercanos unos a otros, el secretoma de estas células, es decir la totalidad de factores liberados al medio (moléculas, vesículas y microvesículas) tendrá una repercusión sobre todos los componentes de la unidad neurovascular para su correcto desarrollo y funcionalidad. En ese sentido, un desbalance en los factores solubles secretados en este nicho repercutirá en el desarrollo del CNS y, por consiguiente, podría contribuir al desarrollo de enfermedades tales como la SZ.

1.3 Los principales componentes de la Unidad Neurovascular: Células Endoteliales de Cerebro, Células Troncal Neurales, astrocitos y neuronas.

La unidad neurovascular está compuesta de células endoteliales de cerebro, célula troncal neural, astrocitos, neuronas, pericitos y microglías. Estos componentes celulares se ilustran a continuación, en la figura 2.

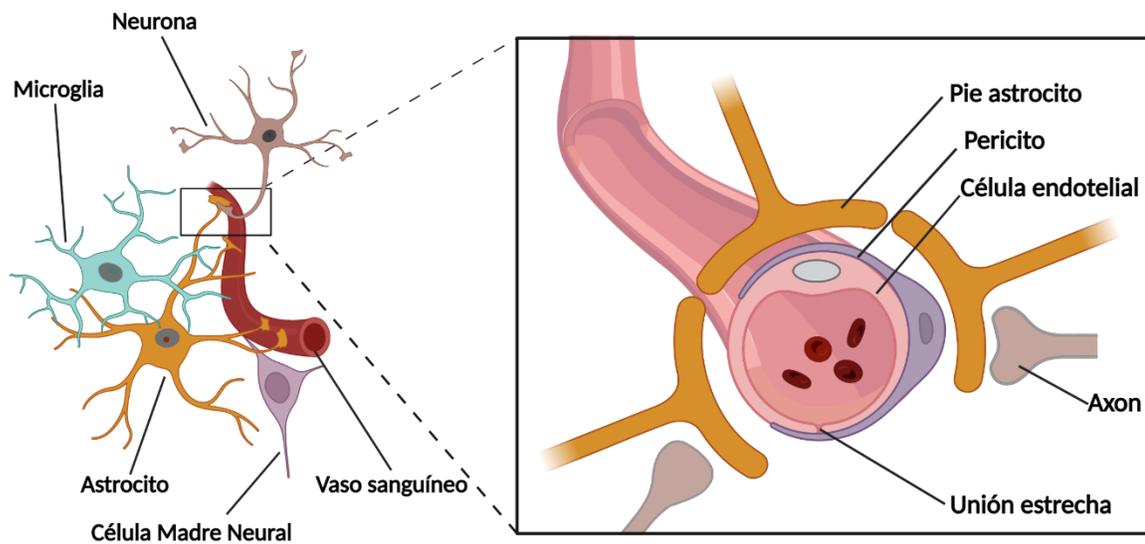


Figura 2. Los componentes celulares de la unidad neurovascular están estrechamente relacionados. El esquema presenta los principales tipos celulares de la unidad neurovascular. A la izquierda el esquema general, en donde se destaca que las células del CNS se encuentran íntimamente relacionadas con los vasos sanguíneos, que a su vez están compuestos por células del sistema vascular (destacado a la derecha) (Modificado de Casas y col. 2022 i).

Tal como se ha explicitado, las células endoteliales de cerebro poseen un fenotipo diferente al resto de células endoteliales del cuerpo. Su morfología es alargada y aplanada, se encuentran unidas por proteínas de unión estrecha, se induce la ausencia de fenestraciones gracias a la proximidad e influencia de células de linaje neural y se ha reportado que poseen un mayor número de mitocondrias (Abbott y col., 2010; Abbott, 2004). Se ha descrito que, mediante factores solubles, las células endoteliales inducen la auto-renovación de las células troncales neurales y luego promueven

la diferenciación hacia una población neuronal (Shen y col., 2004). En la adultez, el *pool* de células troncales neurales se mantiene en la proximidad de los vasos sanguíneos, proyectando un pie para entrar en contacto directo con las células endoteliales de cerebro y mediante este contacto célula-célula, se mantiene su quiescencia e identidad de célula multipotente (Ottone y col., 2014).

Las células troncales neurales son las células precursoras del linaje neural, que mediante división asimétrica generan diversos tipos de neuronas y células gliales como los astrocitos, además de dividirse de manera simétrica manteniendo la auto-renovación, es decir, dos tipos celulares con el mismo potencial de diferenciación multipotente (Gage, 2000; Yao y col., 2012). La diferenciación, migración y mantención de un equilibrio entre células troncales neurales que se auto-renuevan y se diferencian a lo largo del tiempo del desarrollo embrionario, es clave para generar la correcta migración neuronal que dará origen a las capas corticales (Pollen y col., 2014; Zhao & Moore, 2017). Mediante factores difusibles secretados por las células endoteliales de cerebro se mantiene el *pool* de células troncales neurales y se favorece su diferenciación a poblaciones neuronales (Shen y col., 2004). A su vez, se ha demostrado que a medida que las células troncales neurales se diferencian, inducen las propiedades de permeabilidad en la BBB, induciendo expresión de proteínas de unión estrecha e inhibiendo la formación de fenestraciones en el epitelio (Weidenfeller y col., 2007).

Los astrocitos son las células más abundantes en el CNS y sus funciones principales implican: i) compartimentalizar el parénquima neural mediante el amplio contacto de su pie astrocítico con la superficie del vaso sanguíneo; ii) mantener la homeostasis iónica del espacio extracelular; y iii) proveer sustratos energéticos a neuronas para la síntesis y liberación de neurotransmisores, siendo claves en el establecer y modular la sinapsis (Volterra & Meldolesi, 2005; Sofroniew y col., 2009; Kadry y col., 2020; Haydon, 2001). De hecho, se ha descrito que el pie astrocítico es un punto de control esencial en el metabolismo del cerebro (Wolburg y col., 2009). Los astrocitos también han

demostrado ser clave en el establecimiento de la BBB, mediante el contacto directo con las células endoteliales de cerebro y la liberación de factores solubles al medio. Al cultivar monocapas de células endoteliales de cerebro bovinas en medio condicionado de astrocitos de rata, aumenta significativamente la resistencia transendotelial de los cultivos, un indicativo de la permeabilidad reducida (Rubin y col., 1991; Nehaus y col., 1991).

Otro importante componente de la unidad neurovascular son las neuronas. La función principal de estas es transmitir e integrar la información proveniente de otras neuronas en un circuito neural. Sus propiedades electrofisiológicas generan diferencias de potencial de acción, que permite propagar impulsos eléctricos a través de proyecciones especiales llamadas axones, hacia terminales en los que se liberan vesículas con neurotransmisores, hacia una neurona diana, específicamente proyecciones ramificadas desde el cuerpo neuronal, denominadas dendritas. Este proceso eléctrico y químico por el que se transmite información entre neuronas, se denomina sinapsis (Südhof & Malenka, 2008). Este proceso se repite a lo largo de conexiones neuronales, generando circuitos coordinados de neuronas o redes neuronales, que a su vez formarán las vías activas de procesamiento de información y actividad cerebral, que permitirá percibir y responder frente a estímulos del medio (Südhof & Malenka, 2008). Los circuitos neuronales se establecen dinámicamente durante el desarrollo y son determinados por factores genéticos, morfogenéticos y por dinámicas de actividad espontánea y sensorial. Por otro lado, en estos circuitos neuronales el balance excitatorio/inhibitorio es dinámico durante el desarrollo y puede alterar las propiedades y topología de las redes (Sadeh & Clopath, 2021). Este balance se puede ver alterado en patologías como la SZ (Inan y col., 2013). En neuronas maduras del CNS, en general, el neurotransmisor GABA genera una respuesta inhibitoria y el Glutamato genera una respuesta excitatoria (Südhof & Malenka, 2008). Las neuronas conforman la unidad neurovascular mediante su unión directa a los

astrocitos. A pesar de esto, la actividad neuronal regula directamente el CBF mediante la vía del óxido nítrico (NO) y de manera indirecta, mediante la comunicación con los astrocitos (Zonta y col., 2002). Más allá de su función clásica de transducción de señales y sinapsis, las neuronas se han visto también implicadas en el desarrollo vascular y de la BBB mediante la acción de gradientes de neurotransmisores, tanto en etapas pre como postnatales (Lacoste y col., 2014; Whiteus y col., 2013).

1.4 Las células troncales pluripotentes inducidas humanas como modelo para recapitular la unidad neurovascular SZ en el neurodesarrollo.

Se ha establecido que la SZ es un trastorno del neurodesarrollo, que implica un fallido desarrollo y funcionamiento de los principales componentes celulares de la unidad neurovascular, conllevando una BBB defectuosa (Baruah & Vasudevan, 2019). Los modelos de estudio clásicos, mencionados a continuación, no logran recapitular de una manera integrativa la fisiopatología multisistémica de la enfermedad en etapas embrionarias tempranas (Brennand & Gage, 2011). Tejidos *postmortem* o técnicas no invasivas como la imagen de resonancia magnética funcional (fMRI) nos dan una noción de las alteraciones que presenta el CNS del paciente en esa etapa específica de la vida, más no nos entregan mucha información sobre su posible origen (Brennand & Gage, 2011).

Por otro lado, los modelos animales actuales no se diseñan con el objetivo de recrear el equivalente humano de la enfermedad, sino más bien con el objetivo modelar síntomas específicos, hipótesis mecanísticas o causales, así como también la prueba inicial de fármacos (Jones, y col., 2011), por lo que no son un modelo efectivo para estudiar el desarrollo embrionario en SZ.

En la última veintena ha surgido un modelo atractivo para el estudio de etapas tempranas del desarrollo: Las células troncales pluripotentes inducidas humanas (hiPSC, del inglés human induced

Pluripotent Stem Cells). El modelo propuesto el 2006 por los Dres. Shinya Yamanaka y Kazutoshi Takahashi consiste, a grandes rasgos, en obtener una muestra de células somáticas del paciente y reprogramarlas a través de la incorporación de factores de transcripción expresados en etapas tempranas del desarrollo, como Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4, para así lograr un estado pluripotente en estas, análogo al de las células troncales embrionarias (Takahashi & Yamanaka, 2006). Luego de la reprogramación se puede inducir la diferenciación y obtener distintos linajes celulares, tales como los que componen el nicho neuro-angiogénico, manteniendo la identidad genética del donante (Brennand & Gage, 2011). Por otro lado, este modelo permite una aproximación modular, en la que se puede complejizar cada vez más el sistema, por ejemplo, co-cultivando distintos tipos celulares para simular interacciones de la unidad neurovascular o generando incluso órganos rudimentarios, denominados organoides (Brennand & Gage, 2011). En la figura 3 se ilustran los pasos principales para trabajar con el modelo de las hiPSC descrito.

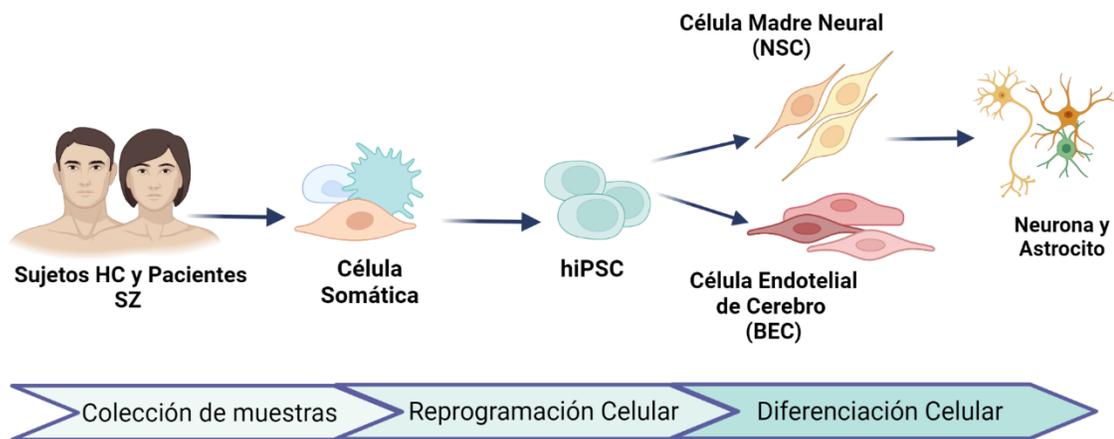


Figura 3. hiPSC como modelo para estudiar los componentes celulares de la unidad neurovascular en SZ. La figura resume los pasos principales para generar los diferentes tipos celulares de la unidad neurovascular, diferenciados a partir de muestras somáticas de pacientes y sujetos control.

Diversos grupos de trabajo han caracterizado morfológica y funcionalmente cultivos celulares derivados de hiPSC de pacientes con SZ en etapas tempranas del desarrollo, así como también

mediante el establecimiento de estructuras más complejas como organoides (Stachowiak y col., 2017; Notaras y col., 2021; Sawada y col., 2020; Srikanth y col., 2018). Dentro de las líneas celulares analizadas, se encuentran los tipos celulares que conforman la unidad neurovascular.

Se ha reportado una resistencia transendotelial disminuida y una distribución disminuida y anormal de las proteínas de unión estrecha en cultivos de células endoteliales de cerebro SZ (Pong y col., 2020). Estudios de nuestro laboratorio, dirigidos por la Dra. Casas, recientemente revelaron que la distribución de proteínas de unión estrecha específicas en células endoteliales de cerebro SZ se encontraba alterada, estando distribuidas en el citosol, respecto al grupo HC en donde la distribución de estas proteínas se observaba en la membrana plasmática de las células (Casas y col., 2022). Además, a nivel funcional se reportó una respuesta disminuida de las células endoteliales de cerebro SZ frente a estímulos angiogénicos y su secretoma aumentó la permeabilidad vascular (Casas y col., 2022). Estos hallazgos apuntan a una BBB intrínsecamente más permeable, debido a deficiencias en las células endoteliales de cerebro SZ.

Dichos resultados se suman a trabajos previos del nuestro laboratorio, dirigidos por la Dra. Casas, realizados en células troncales neurales derivadas de pacientes con SZ. En ellos se informó que, si bien su proliferación y morfología no difiere de sujetos control, sí se presenta una migración y desarrollo de neuritas deficiente (Casas y col., 2018). Es más, se ha demostrado que el secretoma de las células troncales neurales SZ induce en menor nivel migración y angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* respecto a HC (Casas y col., 2018).

Estudios realizados con células progenitoras neurales presentan una migración neuronal disminuida (Brennand y col., 2014) así como una señalización vía Wnt alterada (Topol y col., 2015a). Las células progenitoras neurales presentan además una tendencia a una temprana diferenciación, asociada a anomalías en la generación de capas corticales además de un aumento de la maquinaria

translacional, relacionada a su vez con un aumento de síntesis de proteína global a nivel celular en cultivos derivados de pacientes, respecto a HC (Stachowiak y col., 2017; Topol y col., 2015b).

Por otro lado, trabajos con astrocitos derivados de pacientes con SZ presentan un fenotipo reactivo y un perfil de expresión proteico proinflamatorio de forma basal (Trindade y col., 2022). Éste se ve reflejado en niveles alterados de proteínas en vías de señalización involucradas en la respuesta inflamatoria del sistema inmune y niveles elevados de citoquinas *proinflamatorias*. Además, los perfiles transcripcionales de astrocitos derivados de pacientes presentan patrones transcripcionales divergentes relacionados con la señalización con calcio, secreción de metaloproteinasas y absorción desde el medio de glutamato, además de anomalías transcripcionales respecto a la composición de miRNAs relacionados con inflamación y una respuesta disminuida frente a un estímulo proinflamatorio, la citoquina IL- β , lo que a su vez podría relacionarse con la neuroinflamación que presentan los pacientes (Szabo y col., 2021; Akkouh y col., 2020; Akkouh y col., 2021).

Uno de los tipos celulares más estudiados en SZ utilizando hiPSC han sido las neuronas. En general, los cultivos neuronales a partir de hiPSC se cultivan durante un rango de 3 meses. A estos cultivos se les denominan cultivos de largo plazo. Durante de este periodo las neuronas se diferencian y establecen circuitos en el cultivo, comenzando a presentar actividad eléctrica espontánea alrededor del segundo mes (Yu y col., 2014). Los primeros estudios reportaron un número reducido de neuritas en conjunto con una conectividad neuronal disminuida en los cultivos neuronales de SZ, además de un nivel alterado de proteínas sinápticas respecto a HC (Brennand y col., 2011). Sin embargo, la actividad sináptica en cultivos de neuronas SZ no ha sido consistente en estudios, encontrándose a veces que no existe diferencia con HC o bien existe una hipoactividad sináptica en cultivos SZ respecto a HC (Brennand y col., 2011; Puvogel, Blanchard y col., 2022; Yu y col., 2014; Naujock y col., 2020). Al analizar los circuitos y las dinámicas entre estos cultivos neuronales derivados de hiPSC SZ

se han reportado tendencias a hipoexcitabilidad, anomalía que se ha relacionado con un desbalance en la relación entre sinapsis excitatoria/inhibitoria en estos circuitos (Naujock y col., 2020).

Recientemente en nuestro laboratorio, parte del trabajo de la tesis doctoral de la Dra. Puvogel, consistió en analizar la dinámica de estas redes neuronales, a nivel de su coordinación y generación de patrones de conectividad en cultivos neuronales de SZ de largo plazo. Al estudiar en redes neuronales SZ su conectividad funcional (CF), es decir la correlación temporal entre eventos neurofisiológicos remotos (Friston, 2011), se reportó que estas redes cambian de configuración con menor frecuencia, y poseen un menor repertorio de configuraciones de redes neuronales (Puvogel, Blanchard y col., 2022). Estos resultados coinciden con anormalidades previamente descritas en la CF de pacientes con SZ, en donde se ve comprometida la capacidad de cambiar de manera rápida y eficiente las configuraciones de red para responder a diversos patrones de actividad (Ribolsi y col., 2014). Sin embargo, los mecanismos moleculares detrás de estas anormalidades sinápticas no se han explorado.

Tomando en consideración que los componentes celulares de la unidad neurovascular secretan diversos factores solubles liberados al medio que repercuten directamente en la neurogénesis y actividad neuronal; y que el desarrollo y desempeño sináptico de las redes neuronales en SZ se ve alterado, pero no se ha explorado los lineamientos moleculares; y que los otros componentes celulares de la unidad neurovascular se han visto alterados en SZ, pero la repercusión de estos componentes alterados sobre el establecimiento de la actividad neuronal no ha sido explorada, es que se identifican interesantes y novedosas interrogantes a explorar. Este seminario de título las buscó abordar mediante una exhaustiva búsqueda bibliográfica combinada con aproximaciones de biología molecular y celular.

1.5 Preguntas de investigación

Considerando los antecedentes presentados, surge el interés de estudiar el origen de las anomalías de redes neuronales SZ con un enfoque a nivel molecular, y también indagar en la posible influencia del nicho neurovascular sobre este fenotipo neuronal.

Se pretenden abordar las siguientes preguntas:

- ¿Existen alteraciones en los perfiles de expresión génica-sináptica en los cultivos neuronales de largo plazo en SZ, detectables a lo largo de su diferenciación y relacionadas con las anomalías sinápticas observadas en redes neuronales SZ descritas en los pacientes?
- ¿Hay diferencias en la composición de los secretomas de los principales componentes de la unidad neurovascular en SZ respecto a HC que se relacionen con las anomalías sinápticas observadas en las redes neuronales SZ?

1.6 Objetivo General

Estudiar la expresión de genes clave en cultivos neuronales derivados de hiPSC a lo largo de su diferenciación y evaluar posibles anomalías en el secretoma de los principales componentes de la unidad neurovascular que pudiesen repercutir en la alteración sináptica observada en SZ.

1.7 Objetivos Específicos

1. Estudiar los niveles de transcrito de genes relacionados con la sinapsis en cultivos neuronales de largo plazo derivados de hiPSC provenientes de pacientes con SZ y HC.
2. Analizar comparativamente el secretoma de los principales componentes celulares de la unidad neurovascular en líneas derivadas de hiPSC provenientes de pacientes con SZ y HC.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cultivos Celulares y Muestras de Medio Condicionado.

En colaboración con el Laboratorio del Dr. Stevens Rehen, en el Instituto D'or de Pesquisa e Ensino (Río de Janeiro, Brasil), se establecieron los protocolos para la colección de muestras de células somáticas de pacientes, el procesamiento de estas y su posterior reprogramación para inducir un estado de pluripotencia. A partir de estos cultivos, se generaron cultivos primarios de: células troncales neurales (Casas y col., 2018), astrocitos (Trindade y col., 2022), neuronas (Puvogel, Blanchard y col., 2022) y células endoteliales de cerebro (Casas y col., 2022). En los trabajos mencionados se realiza la descripción detallada de los pacientes SZ y controles sanos, y la caracterización del cariotipo, estabilidad de las líneas y evaluación morfológica y funcional para cada línea, además de una minuciosa descripción de los protocolos de diferenciación.

Para la cuantificación de los niveles de transcrito se trabajó con muestras de neuronas de distintos rangos temporales de diferenciación. En particular para esta tesis se consideraron muestras de 30 días y 90 días, gentileza de la candidata a Dra. Sofía Puvogel, en el contexto de su proyecto de tesis doctoral. Se trabajó con tres líneas obtenidas de tres donantes HC y cinco líneas de diagnosticados con SZ. Luego de su diferenciación, las células fueron homogeneizadas en TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) y guardadas a -80°C para su posterior análisis.

Para los análisis del secretoma se trabajó con muestras almacenadas a -80°C de medio condicionado de neuronas de 70 días de diferenciación, y muestras de secretoma de células endoteliales de cerebro diferenciadas durante 14 días, ambas cultivadas en el laboratorio por la Dra. Bárbara Casas. Los resultados del análisis proteómico de células troncal neurales y astrocitos son gentileza de la Dra. Casas y del Dr. Pablo Trindade, respectivamente. Se trabajó con líneas derivadas de 3 sujetos

control y 5 pacientes con esquizofrenia. Para más información sobre los donantes, muestras y protocolo de reprogramación, referirse a la tabla 1.

Abreviación	Línea Celular	Grupo	Sexo	Edad	Muestra célula somática inicial	Técnica de Reprogramación
HC #1	GM23279 A	Control	M	36	Fibroblasto	Cytotune 1.0 kit (ThermoFisher)
HC #2	CF2	Control	H	31	Fibroblasto	Cytotune 1.0 kit (ThermoFisher)
HC #3	ADHD2	Control	H	31	Orina Endotelial	(OCT4, SOX2, KLF4, MYC)
SZ #1	GM23760 B	Esquizofrenia	H	26	Fibroblasto	Cytotune 2.0 kit (ThermoFisher)
SZ #2	EZQ 3	Esquizofrenia	H	45	Fibroblasto	Cytotune 2.0 kit (ThermoFisher)
SZ #3	EZQ4	Esquizofrenia	H	42	Fibroblasto	(OCT4, SOX2, KLF4, MYC, LIN28)
SZ #4	GM23761 B	Esquizofrenia	M	27	Fibroblasto	(OCT4, SOX2, KLF4, MYC, LIN28)
SZ #5	EZQ9	Esquizofrenia	M	44	Fibroblasto	Cytotune 2.0 kit (ThermoFisher)

Tabla 1. Información de los cultivos primarios hiPSC utilizados en el trabajo. El listado incluye la información sobre donantes y su técnica de reprogramación celular. M: Mujer; H: hombre.

2.2 Colección de Medio condicionado.

Cuando los cultivos alcanzaron el 90% de confluencia se cambió el medio de cultivo por medio sin suero y se mantuvo incubando por 48 horas. Luego de 48 horas se colectó el medio sobrenadante, se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos. Se hicieron alícuotas, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.3 Extracción RNA y Síntesis cDNA.

Con el fin de evaluar el nivel de transcrito en neuronas se descongelaron en hielo muestras de neuronas homogeneizadas en TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Una vez descongeladas se trabajó con alícuotas de 1 mL. Se les agregó cloroformo frío y se incubó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó por 15 minutos a 1200xg, a 4°C, para luego extraer la fase superior, que se pasa a un tubo, con isopropanol frío. Se incubó por 30 minutos a -20°C y luego centrifugó por 10 minutos con parámetros anteriormente mencionados. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* resultante se lavó con etanol 75% frío y se centrifugó a 1500xg por 10 minutos a 4°C. Se repitió el lavado, para un total de dos lavados. Luego se secó el *pellet* permitiendo evaporar el etanol evitando dejar resecar totalmente el *pellet*. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en agua libre de nucleasas y se cuantificó la concentración y pureza de RNA mediante espectrofotometría utilizando el lector de placas Infinite M200 Pro (NanoQuant Tecan, Männedorf, Suiza). Se evaluó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de Agarosa 1% en solución tampón Tris-acetato-EDTA 1X.

Para la síntesis de cDNA, se descongelaron muestras en hielo y con el fin de eliminar posibles contaminaciones con DNA, se utilizó RQ1 DNase I (Promega, Madison, WI, USA) según las instrucciones del fabricante. La síntesis de cDNA se realizó usando la enzima transcriptasa inversa M-MLV (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), según protocolo de fabricante. El cDNA resultante fue diluido en agua libre de nucleasas en proporción 1:4 y almacenado a -20°C.

2.4 Diseño Partidores.

Con el fin de evaluar genes clave en la maduración y sinapsis neuronal, que hayan previamente sido reportados en SZ, se realizó un análisis bibliográfico y se seleccionaron 10 genes para evaluar su nivel de transcrito durante la diferenciación neuronal. Para analizar esto, en las muestras de cDNA sintetizadas mediante PCR, se diseñaron partidores específicos para cada gen seleccionado.

Los templados de los genes para el diseño de partidores se obtuvieron de la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI), en donde se seleccionó el transcrito de mRNA más corto para así amplificar un mayor rango de variantes del transcrito del gen, a excepción de el gen *HOMER*, para el cual sólo se incluyó la isoforma 1 y *GAD1*, en el cual se incluyó la isoforma 67.

Una vez seleccionado el templado se utilizó el software AmplifX 2.0.7 (Inst Neurophysiopathol, Marseille, France) para diseñar los partidores, acorde a los siguientes parámetros: rango de longitud partidior: 19-21 nucleótidos; diferencia máxima de Tm entre primers 2°C; fragmento a amplificar entre 150 y 200 bp; temperatura de annealing 60-65°C; porcentaje GC: 50-60%. En base a estos parámetros el programa AmplifX genera 100 parejas de partidores posibles, que hibridan en distintas partes del gen.

El programa AmplifX arroja las mejores 100 parejas de partidores que cumplen los requisitos mencionados y se seleccionan aquellas que se encuentren en exones diferentes, con el objetivo de que reconozcan mRNA maduro, utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST Primer Design), de NCBI. Esto aplica para la mayoría de los genes a evaluar, a excepción de dos casos: Para *GAD1* interesa sólo la isoforma 67 y evitar la amplificación de la isoforma 25, por lo que se procura que uno de los partidores se encuentre en un exón exclusivo del transcrito para la isoforma 67. En la tabla 2 se presentan los partidores diseñados.

Gen	Partidor Forward 5'-3'	Partidor Reverse 3'-5'
SYP	TGGACGTGGTGAATCAGCT	GGTCTTGTTGGCACAATCCA
SEMA3A	TGGCCAACAGCTCCAGTTAT	TTCCAGCCCACTTGCATTCA
RELN	CGAGGTGCTCATTTCCTG	CCAAATCCGAAAGCACTGGAA
GRIN	AGTCCCACGAGAATGGCTTCA	TTGTGCCGCTTGTAGGCAAT
GAD67	ACTCCAAGGATGCAACCAGA	ACTGTGCCCTTTGCTTTCCA
CDK5	AGGCCACGCTGTTTGAGGATG	TGTTGGGCTGCACCTTCTTGG
GPHN	CGGAGTCCTTACAGTGAGT	TCACACCAATCTATCAGGGTT
HOMER1	AGCCAAGGGCTGAACCAACT	TGTGCAGACGTTCTGCTTCT
ATP5F1D	TGTGAGCAGCGTTCCATCG	TCGTTGGCCTCGATTCCGATC
SLC2A1	TGCCTGAAGTCGCACAGTGAA	AGGGCAGCTTGACAGCTCATT

Tabla 2. Partidores utilizados en el trabajo. Se presentan los partidores diseñados para el panel de genes seleccionados.

2.5 Estandarización Partidores.

Se estandarizaron partidores diseñados mediante una curva estándar de diluciones seriadas (1:10) con un total de 6 puntos por curva, utilizando como templado cDNA de neuronas HC. Se utilizó termociclador Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) y se analizan resultados en software MxPro. La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos: 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos y 72°C por 15 segundos.

A partir del Ct (*Cycle threshold*, el ciclo en que la señal fluorescente del cDNA amplificado supera el umbral de detección, determinada por el ruido) entregado para cada gen y el LOG de la concentración de cDNA por punto, se graficó una recta y mediante regresión lineal se obtiene el R y la eficiencia (E) mediante la ecuación:

$$E (\%) = \left(10^{\frac{-1}{m}} - 1\right) \times 100$$

donde *m* corresponde a la pendiente de la recta. Los parámetros deben ser 90-110% de eficiencia y el R de la recta no menor a 0.985. A continuación, en la tabla 3 se presenta el detalle de E y R para cada partidor.

Gen	E (%)	R
ATP5F1D	103.6	0.999
SYP	106.4	0.997
CDK5R1	103.2	0.997
RELN	105.8	0.999
GRIN1	103	1
GPHN	91.7	0.990
GAD1	100	0.999
HOMER1	104.3	0.993
SLC2A1	110	0.995
SEMA3A	107.7	0.999

Tabla 3. Valores de E y R para las condiciones de amplificación. Parámetros obtenidos a partir de la estandarización de cada partidor, para los diez genes a analizar en este estudio. Se comprueba que los partidores funcionan de manera óptima amplificando con la misma eficiencia transcritos en un rango de 6 órdenes de magnitud de diferencia.

2.6 PCR Cuantitativo (qPCR).

Para medir la cantidad relativa de transcrito para cada gen, en condiciones SZ y HC, se utilizaron los mismos ciclos descritos para la estandarización. Se trabajó en duplicado para cada punto, y el cambio en los niveles de mRNA se calculó utilizando de referencia los genes *housekeeping 18S*, *GAPDH* y *B2M* mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que consiste, brevemente en promediar valores Ct de duplicados. Luego:

$$\Delta Ct = Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{gen\ housekeeping}$$

Se utilizó como línea de referencia HC1 y a partir de sus valores de ΔCt se calcularon los valores $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra\ de\ interés} - \Delta Ct_{muestra\ de\ referencia}$$

Finalmente, se calcula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.7 Análisis Proteómico.

Con el fin de obtener los niveles de moléculas angiogénicas en los secretomas se trabajó con un arreglo proteómico Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit (R&D Systems, Minneapolis, Min, USA), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Brevemente, se bloqueó la membrana mientras se incubaron muestras con un cocktail de detección de anticuerpos, incluido en kit. Luego de esto, se agregó a la membrana bloqueada la muestra y se incubó durante la noche, a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las membranas 3 veces, para luego incubar con el anticuerpo secundario, *HRP-Streptavidin* por 30 minutos a temperatura ambiente (RT, del inglés Room Temperature). Luego se repitieron lavados y finalmente se revelaron en fotodocumentador y registraron resultados.

Adicional a este kit proteómico, se trabajó con un arreglo que permite la detección de moléculas asociadas a neurogénesis, Human Neuro Antibody Array II (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente: Se bloqueó la membrana y luego se procedió a incubar con muestra durante la noche, a 4°C. Al día siguiente se lavaron las membranas para luego incubar con el anticuerpo primario, durante la noche, a 4°C. El tercer día, se repitió el proceso de lavado de membranas para luego agregar el anticuerpo secundario, HRP-*Streptavidin* por 2 horas a RT. Luego se repitieron lavados, se revelaron en fotodocumentador y registraron resultados.

2.8 Interpretación Resultados Proteoma.

Para cuantificar la intensidad de fluorescencia por punto, la cual es proporcional a la cantidad de proteína en el secretoma, se utilizó el programa *ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, USA) en el que se especifica la intensidad de píxeles integrada en cada región. Se normalizaron los valores respecto a puntos de control positivo y negativo incluidos en cada membrana. Se analizó una membrana por cada uno de los cultivos derivados de donante para ambos grupos experimentales analizados; las membranas utilizadas contienen cada analito por duplicado. El programa *ImageJ* entrega un valor por cada punto en la membrana, es decir, dos valores por cada analito. Estos valores se utilizaron como duplicado para los análisis estadísticos. Los resultados del análisis proteómico de células troncal neurales y astrocitos son gentileza de la Dra. Bárbara Casas y del Dr. Pablo Trindade, respectivamente.

2.9 Análisis Estadístico.

Todos los gráficos y análisis estadísticos en el presente trabajo se realizaron con el programa *GraphPad Prism 8.0.1*. (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*). Los resultados corresponden al

promedio de los duplicados experimentales \pm desviación estándar (SD). En el caso de la cuantificación de transcrito, se utilizó la prueba t-test anidada para la evaluación de diferencias entre condiciones HC y SZ.

Con el fin de comparar los niveles secretados al medio detectados por los análisis proteómicos de secretomas, de cada proteína analizada entre los dos grupos experimentales, se aplicó al promedio de los donantes por grupo, prueba ANOVA de dos vías seguido de prueba de comparaciones múltiples de Sidak's. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa un valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 La caracterización molecular sugiere un desbalance sináptico en neuronas SZ.

En trabajos previos realizados en el laboratorio y recientemente publicados, se ha descrito una alteración en la actividad neuronal en cultivos de largo plazo obtenidos a partir de hiPSC de SZ mediante la técnica de *calcium imaging* (Puvogel, Blanchard y col., 2022). Para estos trabajos, el protocolo de diferenciación a neuronas utilizado genera específicamente neuronas de la corteza cerebral, específicamente del CNS dorsal anterior (en inglés, dorsal forebrain-cortex) (Shi y col., 2012). Esto es importante de considerar a la hora de seleccionar los genes a analizar, pues se buscó que estuviesen específicamente alterados en pacientes SZ en neuronas corticales. Se reportó que los circuitos neuronales SZ se mantenían más estáticos entre configuraciones de conexión, en otras palabras, eran menos dinámicos. Con el fin de evaluar a nivel molecular esta alteración funcional, se analizó el nivel de expresión génica dichos cultivos, enfocándose particularmente en transcritos relevantes para la sinapsis neuronal. Para ello, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva y una posterior selección de genes a evaluar considerando el cumplimiento de dos criterios: que se hayan reportado como alterados en neuronas corticales de pacientes con SZ, y que su producto génico se asocie a una función relevante en el establecimiento de sinapsis en el neurodesarrollo. En base a esto, se generó una lista de 10 genes candidatos a evaluar. En la tabla 4 se presentan los genes candidatos, con sus funciones asociadas y sus alteraciones descritas en SZ. A grandes rasgos, los genes evaluados pueden ser categorizados según las funciones de su producto génico: marcadores sinápticos (*SYP; GRIN1, HOMER1; GPHN, GAD67*), genes del neurodesarrollo canónicos y no-canónicos (*CDK5R1, RELN, SEMA3A*) y finalmente, genes metabólicos (*SLC2A1, ATP5F1D*).

A partir de los genes seleccionados, se diseñaron y sintetizaron los partidores respectivos (referirse a tabla 2). Posterior a su estandarización, se procedió a cuantificar los niveles de transcrito de dichos genes en cultivos de neuronas HC y SZ, mediante qPCR.

Los cultivos primarios de neuronas presentan actividad eléctrica espontánea generalmente al día 70 de diferenciación, hito que generalmente se utiliza para discernir entre cultivos neuronales inmaduros y maduros (Räsänen y col., 2022). Para evaluar el cambio en la expresión de los genes seleccionados durante el transcurso de la diferenciación neuronal, se evalúan los cultivos en dos tiempos distintos: a los 30 días y 90 días. Es decir, en etapas tempranas y tardías de maduración.

Gen	Proteína	Función	Asociación con SZ
<i>SYP</i>	Sinaptofisina	Glicoproteína integral de membrana en vesículas pre-sinápticas	Expresión disminuida en diversas regiones del cerebro <i>postmortem</i> ¹
<i>GAD 1</i>	GAD 67	Síntesis de GABA basal en citosol. Regula inervación de sinapsis inhibitorias en el cerebro	Consistentemente disminuido en corteza prefrontal en cerebro <i>postmortem</i> ²
<i>GPHN</i>	Gefirina	Ensamblaje de proteínas postsinápticas, receptores de glicina y GABA en sinapsis inhibitorias	Niveles de transcrito y de proteína disminuidos en cerebro <i>postmortem</i> ³
<i>GRIN 1</i>	Receptor NMDA Subunidad 1	Subunidad crítica del receptor de NMDA	Hipofunción de receptores NMDA en SZ. Expresión disminuida en corteza frontal <i>postmortem</i> ⁴
<i>HOMER 1</i>	HOMER isoforma 1	Ensamblaje de proteínas postsinápticas y receptores metabotrópicos en sinapsis glutamatérgica	Expresión disminuida en hipocampo <i>postmortem</i> ⁵
<i>CDK5R1</i>	P35 Activador dependiente de Ciclina 5	Activador Cdk5, favorece migración neuronal, neuritogénesis y sinaptogénesis	Proteína disminuida en regiones de cerebro <i>postmortem</i> ⁶
<i>RELN</i>	Reelina	Glicoproteína extracelular que favorece migración neuronal	Expresión génica disminuida en el cerebro <i>postmortem</i> ⁷
<i>SEMA3A</i>	Semaforina 3A	Proteína quimio-repelente para guía axonal, clave en patrón de desarrollo neuronal	Proteína aumentada en cerebelo <i>postmortem</i> ⁸
<i>SLC2A1</i>	Transportador de Glucosa 1	Transportador de glucosa a través de la BBB en mamíferos	Proteína disminuida en cerebro <i>postmortem</i> ⁹
<i>ATP5F1D</i>	ATP Sintasa F1 subunidad Delta	Subunidad clave en ATPasa para catalizar la síntesis de ATP en mitocondria	Expresión disminuida en el hipocampo <i>postmortem</i> ¹⁰

Tabla 4. Panel de genes de maduración neuronal seleccionados para este estudio. Genes sinápticos en azul; genes del neurodesarrollo canónicos y no-canónicos en rojo y genes metabólicos en morado.

Al comparar en el mismo tiempo de diferenciación los cultivos neuronales SZ y HC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión para ninguno de los 10 genes evaluados (véase anexo, figura 1 y 2). Sin embargo, al comparar los niveles de expresión a lo largo del transcurso de diferenciación, se encontraron diferencias importantes. Se muestran los resultados de los niveles de transcrito como la razón de cambio de la expresión de mRNA en los periodos de 30 a 90 días. Se presenta el log2 de la razón 90/30 días, con cada periodo de tiempo asociado a su $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Por lo tanto, los números positivos implican un aumento en su expresión en el transcurso de diferenciación, y números negativos indican una disminución en la expresión a lo largo de la diferenciación y los números cercanos a cero, o en cero, implican que la expresión entre ambos periodos de tiempo se mantiene constante.

Se analizó la expresión génica del gen *SYP*, que codifica para la proteína presináptica sinaptofisina. Los niveles de transcrito se mantuvieron constantes en neuronas HC durante los tiempos evaluados, mientras que en SZ los niveles aumentaron a lo largo de la diferenciación (figura 4).

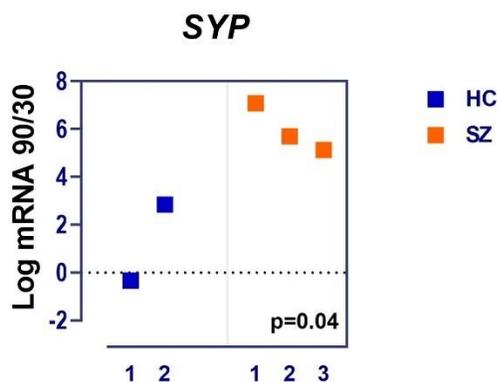


Figura 4. SYP aumenta su expresión a lo largo de la diferenciación de neuronas SZ. Se presenta la variación de niveles de transcrito durante el transcurso de la diferenciación de los cultivos neuronales, para el gen presináptico SYP. Cada punto del gráfico corresponde al promedio de determinaciones de cada donante (\pm D.E.), indicados en números correlativos en el eje x. Las identificaciones numéricas de cada donante se encuentran en la tabla 1. Evaluación estadística con t test anidado, $p < 0.05$.

Se evaluaron a continuación genes relacionados con sinapsis excitatorias e inhibitorias. Se ha reportado que un balance entre sinapsis excitatorias e inhibitorias es clave para una comunicación eficiente entre las redes neuronales. Un ejemplo de este desbalance se da en el fenotipo neurofisiológico de hiperexcitabilidad, que implica una elevada actividad de redes neuronales; es seguido generalmente por eventos compensatorios de hipoexcitabilidad y este desbalance genera a largo plazo un detrimento en la integridad de las conexiones entre neuronas y las neuronas en sí. Este fenotipo se observa en trastornos del neurodesarrollo como el Síndrome X frágil, Epilepsia, Trastorno del Espectro Autista y se ha reportado entre áreas específicas del cerebro de pacientes con SZ (Bülow y col., 2022; Schindewolf y col., 2016; Inan y col., 2013). Los genes sinápticos-inhibitorios evaluados fueron proteínas asociadas a la sinapsis GABAérgica, *GPHN* y *GAD1*. Interesantemente, los niveles de *GPHN* a lo largo del periodo de diferenciación se encontraron disminuidos para ambas condiciones, y los niveles de *GAD1* se mantuvieron constante en el periodo de tiempo evaluado para ambas condiciones. Esto sugiere una tendencia a la disminución en la sinapsis GABAérgica para las redes neuronales durante el transcurso de su diferenciación, la cual no se encontraría significativamente alterada en SZ (figura 5).

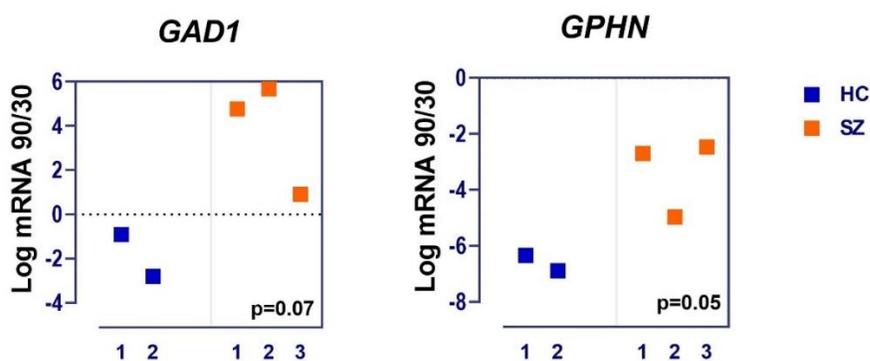


Figura 5. Los genes sinápticos inhibitorios disminuyen su expresión durante el transcurso de diferenciación de neuronas en HC y SZ. Se presenta la variación de niveles de transcrito durante el transcurso de la diferenciación de los cultivos neuronales, para el par de genes sinápticos inhibitorios analizados. Cada punto del gráfico corresponde al promedio de determinaciones de cada donante (\pm D.E.), indicados en números correlativos en el eje x. Las identificaciones numéricas de cada donante se encuentran en la tabla 1. Evaluación estadística con t test anidado, $p < 0.05$.

Por otro lado, los niveles de transcrito para los genes sinápticos excitatorios, *HOMER1* y *GRIN1* sí presentaron diferencias entre ambas condiciones (figura 6). En el caso de *HOMER1*, mientras que su expresión disminuyó en el transcurso del tiempo en condición HC, durante el curso de su diferenciación aumentó en SZ. Por otro lado, mientras que *GRIN1* disminuyó significativamente en HC a lo largo del tiempo, se mantuvo constante en SZ. Esto sugiere que la evolución del número de las sinapsis excitatorias en redes neuronales es distinta en SZ respecto a HC.

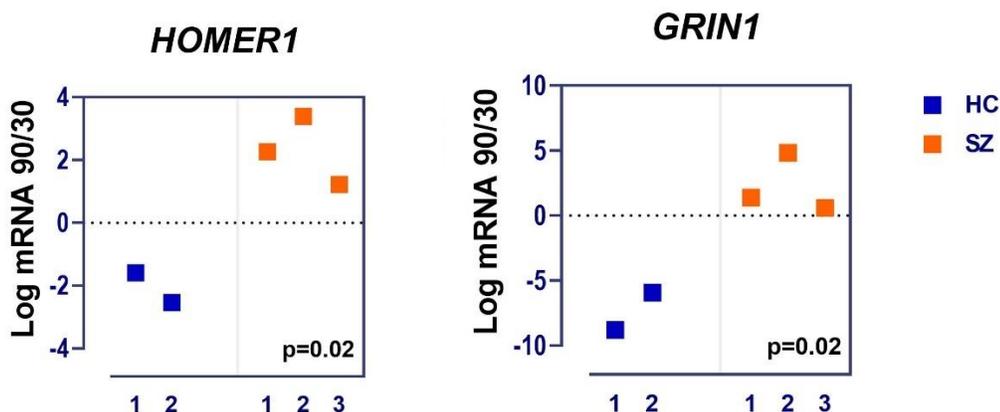


Figura 6. Los genes sinápticos excitatorios aumentan su expresión durante el transcurso de diferenciación de neuronas SZ. Se presenta la variación de niveles de transcrito durante el transcurso de la diferenciación de los cultivos neuronales, para el par de genes sinápticos excitatorios analizados. Cada punto del gráfico corresponde al promedio de determinaciones de cada donante (\pm D.E.), indicados en números correlativos en el eje x. Las identificaciones numéricas de cada donante se encuentran en la tabla 1. Evaluación estadística con t test anidado, $p < 0.05$.

En conjunto con el análisis de genes sinápticos, la expresión de genes implicados en el neurodesarrollo también fue evaluada. El gen *CDK5R1* codifica para p35, el activador de la subunidad 1 reguladora de la quinasa dependiente de ciclina, CDK5, específico de neuronas (Ko y col., 2001). CDK5 se encuentra implicada en la remodelación del citoesqueleto en neuronas con el fin de orientar las redes neuronales durante el neurodesarrollo (Nguyen y col., 2002). Se ha reportado que la expresión de p35 varía de manera cíclica a lo largo del desarrollo cerebral, por ende, varía también la actividad de CDK5 (Wu y col., 2000). A lo largo del transcurso de la diferenciación se encontró una disminución de la expresión del gen en HC, y en SZ se mantuvo constante su expresión (figura 7).

Por otro lado, se evaluó el gen *RELN* que codifica para una glicoproteína de la ECM (Wasser & Herz, 2017). Esta tiene funciones clave en la migración neuronal en el desarrollo temprano, contribuyendo a la formación de capas corticales de neuronas y también al crecimiento de neuritas mediante la modulación del citoesqueleto (Wasser & Herz, 2017). En los cultivos evaluados no hubo un cambio

en la variación de la expresión de este gen, en los periodos de tiempo evaluados, para las condiciones estudiadas (figura 7).

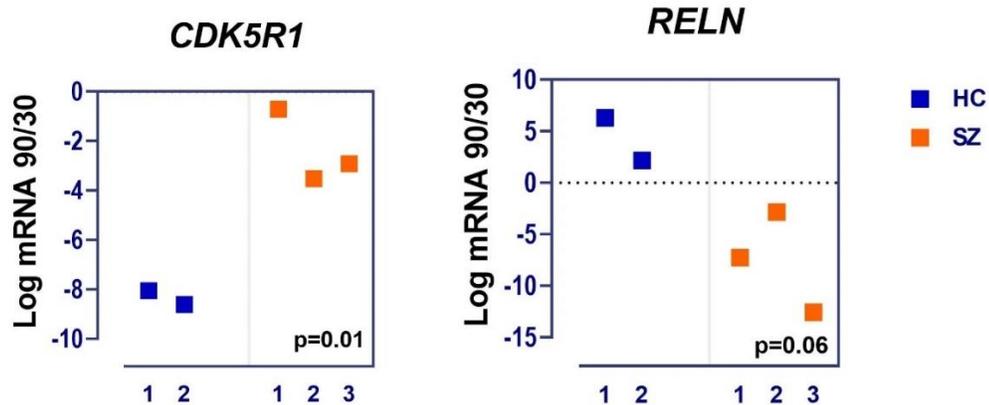


Figura 7. Los genes del neurodesarrollo presentan diferencias en sus patrones de expresión durante el transcurso de diferenciación de neuronas SZ. Se presenta la variación de niveles de transcrito durante el transcurso de la diferenciación de los cultivos neuronales, para genes involucrados en el neurodesarrollo. Cada punto del gráfico corresponde al promedio de determinaciones de cada donante (\pm D.E.), indicados en números correlativos en el eje x. Las identificaciones numéricas de cada donante se encuentran en la tabla 1. Evaluación estadística con t test anidado, $p < 0.05$.

Las vías de señalización relacionadas con el neurodesarrollo clásico se definen como vías canónicas.

Existen factores neuro-angiogénicos menos estudiados y más recientemente descubiertos, que se clasifican dentro de los *no canónicos*. Dentro de estos se encuentra la molécula SEMA3A, que cumple un rol quimio repulsivo, inhibiendo el crecimiento axonal, como también quimioattractante, estimulando el crecimiento de dendritas apicales (Schwamborn y col., 2004).

Este gen no ha sólo sido implicado en su función neurogénica, sino que también cumple un rol anti-angiogénico en el desarrollo de las células endoteliales del cerebro, inhibiendo su proliferación y migración (Maione y col., 2009). Esta molécula es un ejemplo de factores que tienen roles tanto en el componente vascular como neural y del desarrollo de la BBB y niveles alterados de esta podrían repercutir en ambos componentes, por lo tanto, en el establecimiento de la unidad neurovascular. Los niveles de transcrito del gen que codifica para esta proteína, *SEMA3A*, no presentaron cambios

en las condiciones SZ y HC, en ambas condiciones aumentó la expresión durante el transcurso de su diferenciación (figura 8).

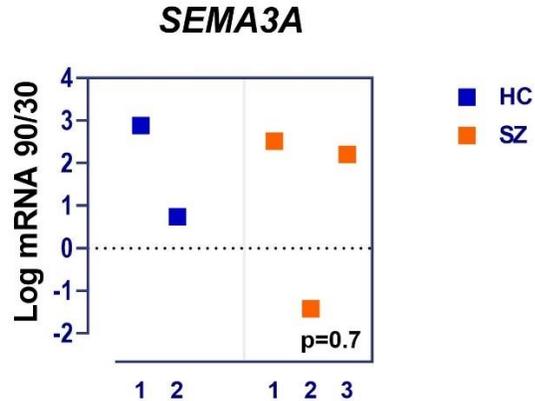


Figura 8. SEMA3A aumenta su expresión a lo largo de la diferenciación de neuronas HC y SZ. Se presenta la variación de niveles de transcrito durante el transcurso de la diferenciación de los cultivos neuronales, para el gen de la familia de semaforinas. Cada punto del gráfico corresponde al promedio de determinaciones de cada donante (\pm D.E.), indicados en números correlativos en el eje x. Las identificaciones numéricas de cada donante se encuentran en la tabla 1. Evaluación estadística con t test anidado, $p < 0.05$.

En SZ se han reportado anomalías metabólicas, relacionadas con la actividad mitocondrial. Por eso, se evaluó el gen *ATP5F1D*, que codifica para la ATP sintasa en la membrana mitocondrial. Mientras los niveles de expresión disminuyeron en el transcurso de diferenciación de HC, los niveles se mantuvieron constantes en SZ (figura 9).

Al evaluar la expresión del transportador de glucosa (SLC2A1) no se reportaron cambios significativos entre neuronas SZ y HC durante el transcurso de su diferenciación (figura 9).

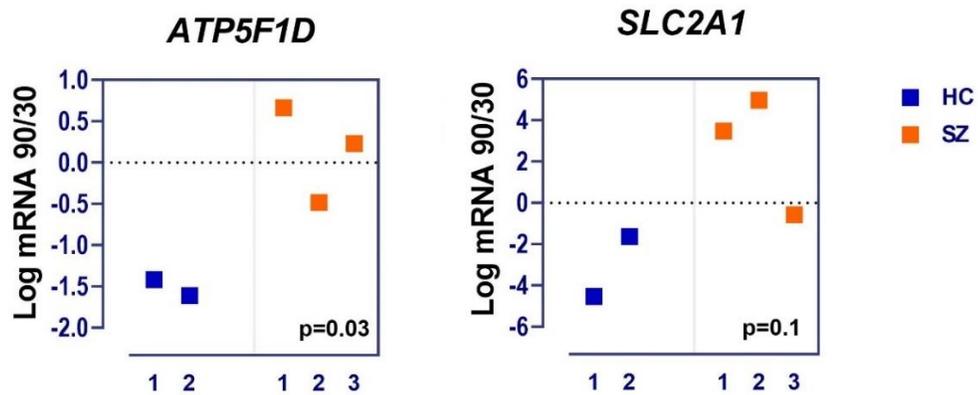


Figura 9. Los genes metabólicos presentan diferencias en sus patrones de expresión durante el transcurso de diferenciación de neuronas SZ. Se presenta la variación de niveles de transcrito durante el transcurso de la diferenciación de los cultivos neuronales, para los genes metabólicos analizados. Cada punto del gráfico corresponde al promedio de determinaciones de cada donante (\pm D.E.), indicados en números correlativos en el eje x. Las identificaciones numéricas de cada donante se encuentran en la tabla 1. Evaluación estadística con t test anidado, $p < 0.05$.

3.2. El perfil de moléculas neuro-angiogénicas secretadas por componentes de la unidad neurovascular es diferente en SZ versus HC.

La comunicación paracrina mediante factores solubles liberados al medio es uno de los mecanismos de comunicación celular que permite el desarrollo concomitante y coordinado de los sistemas vascular y nervioso. La alteración de los niveles de secreción de algún componente celular del nicho podría repercutir en el desarrollo de las neuronas y en la formación de redes neuronales, generando conexiones sinápticas defectuosas, como las observadas en los cultivos primarios de SZ. Con el fin de caracterizar los secretomas en ambas condiciones, y dilucidar si existen alteraciones en proteínas en SZ respecto a HC que pudiesen afectar al desarrollo de las neuronas, se analizó la composición de los secretomas de células troncales neurales, neuronas, astrocitos y células endoteliales de cerebro mediante dos análisis proteómicos comerciales: un proteoma neurogénico, que contempla 30 moléculas neurogénicas y un proteoma angiogénico que contempla 55 moléculas angiogénicas, que a su vez se clasifica en pro y anti-angiogénicas. Es importante destacar que el análisis por proteoma engloba el conjunto de proteínas seleccionadas, en forma dinámica, es decir, representa una temporalidad específica. Se probaron ambos kits de proteomas en los cultivos neuronales de 70 días, tiempo en que ya existe una tendencia hacia la madurez de las redes neuronales (véase anexo, figura 3-5). Para los otros componentes celulares, sólo se utilizó el proteoma angiogénico. Los secretomas de células troncales neurales fueron colectados una vez el cultivo se estabiliza luego de su descongelamiento y alcanza una confluencia de 80% (14 días de cultivo); los secretomas de astrocitos se colectaron en cultivos de 50 días; finalmente, los secretomas de células endoteliales de cerebro correspondían a células diferenciadas por 10 días, habiendo en todos los casos validado el fenotipo funcionalmente (trabajo de tesis de PhD de Dra Bárbara Casas, cPhD Sofía Puvogel).

Los resultados del proteoma angiogénico revelan más información respecto al ensayo neurogénico que solamente mostró cambios en la expresión de una proteína, MCP 1 (véase anexo figura 3-5).

Los resultados de esta tesis se concentran por tanto en los resultados observados en el proteoma angiogénico. Dentro de la amplia variedad de moléculas angiogénicas que contempla este proteoma, varias proteínas poseen funciones tanto angiogénicas como neurogénicas, es decir, pueden ser consideradas moléculas neuro-angiogénicas (Casas y col., 2018).

A continuación, en la figura 10 se representan los niveles de las 55 moléculas analizadas en el secretoma de cada cultivo celular y en cada condición (sujetos sanos versus SZ) en una representación del tipo mapa de calor.

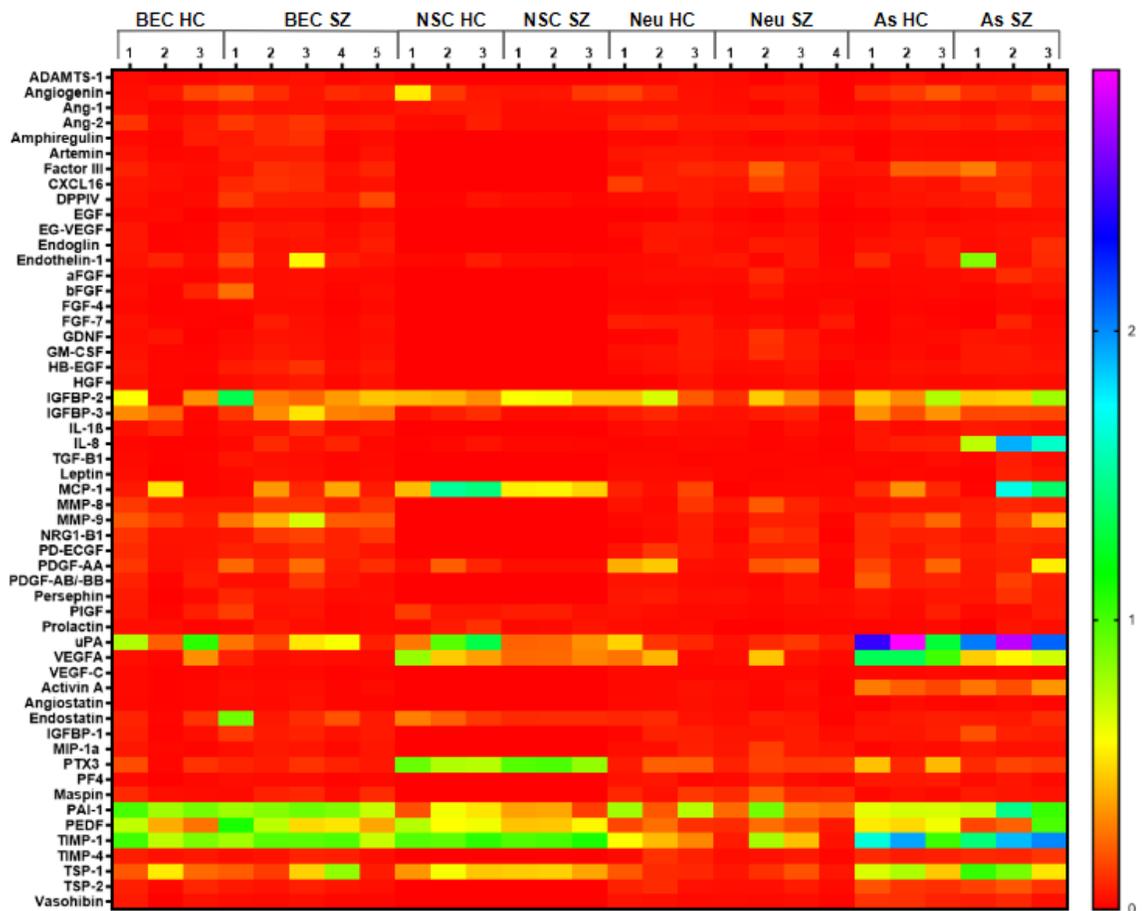


Figura 10. Los componentes celulares de la unidad neurovascular secretan perfiles de moléculas angiogénicas característicos. En el mapa de calor el eje vertical corresponde al conjunto de las proteínas analizadas, y el eje horizontal muestra el detalle de cada cultivo primario utilizado, en que se indica el tipo celular y luego la condición evaluada. Cada número (1-3) que está incluido dentro de cada abreviación, corresponde a un donante específico (tabla 1). Cada recuadro que compone el mapa corresponde al promedio (\pm D.E.) del nivel de expresión de la proteína específica en el secretoma del cultivo primario indicado, de acuerdo con la barra con código de color ubicada a la derecha.

El mapa de calor representa por color, los niveles encontrados de moléculas, donde el rojo es cero y los colores más fríos, representan un mayor nivel de la proteína. Como se puede observar, no todas las moléculas fueron encontradas en los secretomas de los cultivos. De hecho, una gran parte de éstas no presentó niveles relevantes para ninguna de las condiciones (véase sector superior de mapa). Como se puede apreciar en la parte inferior del mapa, si hubo una diversidad de moléculas expresadas transversalmente en los cultivos analizados e, importantemente, también moléculas

particulares a un solo tipo celular. En la figura 11 se observa un mapa de calor reducido, que sintetiza las 14 moléculas secretadas en los tipos celulares analizados, revelando patrones de expresión distintivos: las células troncales neurales secretan una acotada variedad de estas proteínas, pero en mayores niveles que los cultivos de neuronas maduras, lo que coincide con literatura (Dause y col., 2022). Por otro lado, los astrocitos secretan los mayores niveles de proteínas al medio, en su mayoría pro-inflamatorias, tal y cómo se ha descrito en literatura sobre el fenotipo de astrocitos en SZ (Trindade y col., 2022).

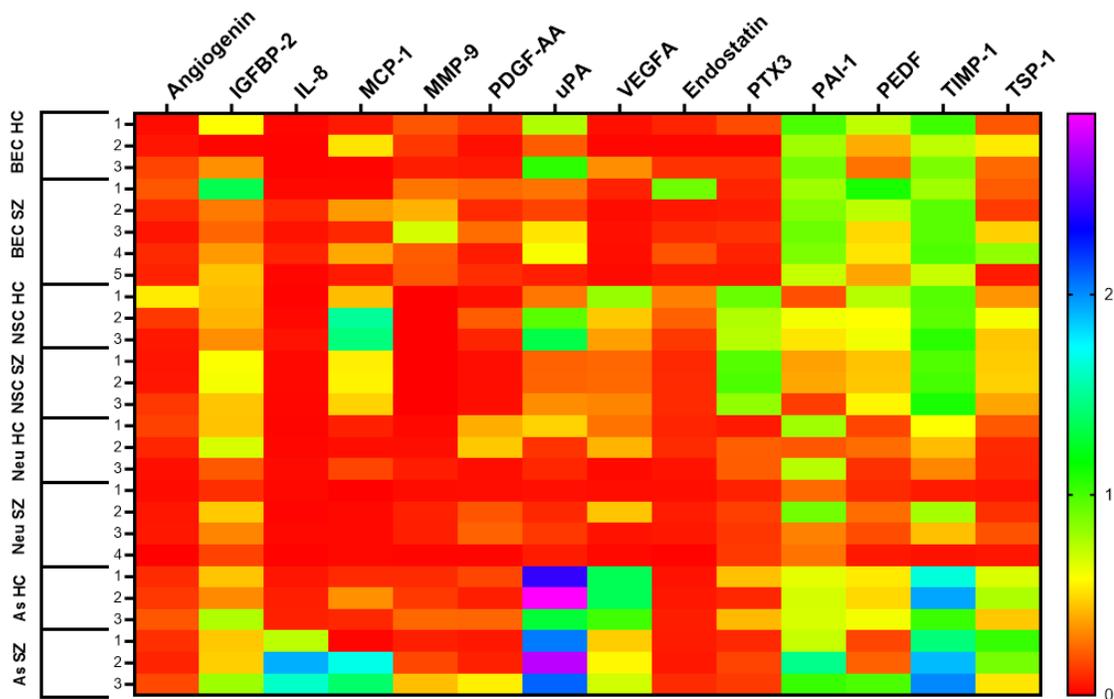


Figura 11. El secretoma de moléculas neuro-angiogénicas de SZ es menos neurotrófico. Mapa de calor resumen en que se encuentran listados los cultivos primarios individuales en el eje vertical, en tanto el nombre de las proteínas analizadas en eje horizontal.

Al analizar el conjunto de 14 proteínas transversalmente secretadas por los componentes de la unidad neurovascular analizados, se observa que no solo poseen funciones que impactan (de manera positiva o negativa) sobre la migración y proliferación de las células endoteliales de cerebro, sino también impactan a las células troncales neurales: promoviendo la mantención de un *pool* de

estas, con factores que contribuyen a su auto-renovación, y también factores que promueven su proliferación asimétrica propiciando diferenciación hacia linajes neuronales y gliales.

Por otro lado, dentro del grupo de las moléculas identificadas hay algunas que favorecen y otras que inhiben o repelen la proyección de neuritas, así como la migración y adhesión a la matriz extracelular. En otras palabras, se encuentran en este nicho de la unidad neurovascular moléculas que contribuyen al desarrollo del componente neural del cerebro, como también al componente vascular. Esto último es relevante porque refuerza la idea que los diferentes tipos celulares secretan moléculas que repercutirán en el desarrollo de otros tipos celulares del nicho. En la tabla 5 se presentan las principales funciones neurogénicas de las moléculas expresadas de manera diferencial entre la condición SZ respecto a HC. También se ilustra la diferencia entre los niveles en SZ respecto a HC para cada tipo celular en que existe una diferencia significativa, representada como la razón entre los niveles HC y SZ.

Al analizar el secretoma de los cultivos de células endoteliales de cerebro, se encontró un aumento en los niveles de MMP-9 en SZ respecto a HC. Esta metaloproteasa está implicada en la degradación de componentes de la matriz extracelular, entre ellos Colágeno IV y V (Van den Steen y col., 2002). Posee también, roles clave en etapas tempranas del neurodesarrollo (Reinhard y col., 2015).

Otra molécula cuyos niveles se encontraron aumentados en células endoteliales de cerebro SZ respecto a HC, fue Endostatina. Esta molécula anti-angiogénica se ha reportado implicada en la inhibición del crecimiento de neuritas y la migración neuronal, mediante su unión a NGF (Al Ahmad y col., 2010).

Factor	BEC	NSC	Neurona	Astrocito	Función Neurogénica
MMP-9	↑ 2.9				Promueve migración neuronal, proyección de neuritas y establecimiento de conexiones sinápticas ¹¹ .
Endostatina	↑ 9.1				Inhibe la proyección de neuritas y migración neuronal ¹² .
Angiogenina		↓ 0.4			Extensión de neuritas, guía axonal y supervivencia de neuronas motoras frente a hipoxia ¹³ .
PDGF-AA			↓ 0.4		Promueve la neurogénesis ¹⁴ y contribuye a la mielinización de axones ¹⁵ .
IL-8				↑ 28.1	Induce muerte celular de NSC ¹⁶ y neuronas ¹⁷ .
IGFBP2	↑ 1.7		↓ 0.6		Induce la auto-renovación de NSC ¹⁸ e inhibe apoptosis neuronal ¹⁹ .
MCP-1/CCL2		↓ 0.5		↑ 6.1	Migración a zona de daño y extravasación de NSC luego de accidente cerebrovascular isquémico ²⁰ .
PAI-1			↓ 0.7	↑ 1.6	Primueve la migración neuronal ²¹ . Factor neurotrófico que promueve mantención de neuritas ²² y conexiones entre neuronas ²³ .
PEDF	↑ 1.4	↓ 0.8			Favorece auto-renovación de NSC o neurogénesis según contexto ²⁴ . Factor neuritogénico ²⁵ .
VEGFA		↓ 0.4		↓ 0.5	Promueve neurigenesis, migración neuronal ²⁶ y posee rol neuroprotector ²⁷ .
uPA	↓ 0.3	↓ 0.3	↓ 0.3		Establece, mediante remodelación de ECM ²⁸ y citoesqueleto ²⁹ conectividad sináptica y modulación de redes neuronales ³⁰ .

Tabla 5. Resumen que destaca las proteínas alteradas en el secretoma de los diferentes componentes celulares de la unidad neurovascular en SZ. Se presentan las proteínas cuyos niveles fueron significativamente distintos, comparando entre el promedio de los donantes por grupo. Se presenta como la tasa de cambio en el grupo SZ respecto a HC, indicando un aumento (flecha verde, hacia arriba) o disminución (flecha roja, hacia abajo). Se detalla la función neurogénica de cada molécula.

El secretoma de las células troncales neurales, para ambas condiciones, fue el que contenía una menor cantidad de las moléculas analizadas respecto a los otros tipos celulares, presentando solo 20 de las 55 moléculas analizadas. Los niveles de la molécula pro-angiogénica Angiogenina eran menores en la condición SZ respecto a control. Angiogenina o ribonucleasa 5 se une e hidroliza mRNA, regulando la síntesis de proteínas (Gao & Xu, 2008). Interactúa con el DNA y activa la producción de rRNA, además de inducir expresión de genes supresores de apoptosis. Posee, además, un rol neuroprotector, al ser asimilada desde el medio por neuronas en condiciones de estrés, como hipoxia (Subramanian & Feng, 2007). Se ha descrito su participación en procesos como

la proyección de neuritas y guía axonal de neuronas motoras (Steidinger y col., 2011). Se encontraron niveles disminuidos de la proteína PDGF-AA en el secretoma de las neuronas SZ respecto a control. PDGF es una familia de glicoproteínas diméricas, que puede componerse de variaciones entre cuatro subunidades: A, B, C y D, y la isoforma PDGF-AA se ha visto implicada tanto en neurogenesis como en proliferación de precursores de oligodendrocitos, y cumpliendo un rol clave en la mielinización de axones (Fruttiger y col., 1999; Sil y col., 2018).

El secretoma proveniente de los cultivos de astrocitos contenía los mayores niveles de moléculas secretadas respecto a todos los cultivos analizados. En el secretoma de astrocitos SZ el nivel de la citoquina Interleucina-8 (IL-8) se encontró aumentado 28 veces más que en el secretoma HC.

Como se mencionó anteriormente, hubo moléculas cuyos niveles en SZ se encontraron alterados en más de un tipo celular estudiado. Dentro de estas hubo cuatro proteínas que presentaban niveles alterados en dos tipos celulares, aumentados en un tipo y disminuidos en el otro.

Por ejemplo, los niveles de IGFBP2, se encontraron aumentados en SZ al ser comparados con HC para el secretoma de células endoteliales de cerebro, pero disminuido en el secretoma de neuronas. Esta molécula está implicada en mantener el *pool* de células troncales neurales en el desarrollo, pues contribuye directamente a la auto-renovación de estas células (Shen y col., 2019).

La molécula Proteína Quimioattractante de Monocitos 1, MCP-1 (del inglés Monocyte Chemoattractant Protein 1) se encontró aumentada en astrocitos, pero disminuida en células troncales neurales. MCP-1 o CCL2, llamada así por su motivo característico de 4 cisteínas conservadas en su estructura y por su receptor CCR2, tiene la función clásica pro-inflamatoria de reclutar mediante quimiotaxis agentes del sistema inmune como monocitos y neutrófilos, favoreciendo su migración e infiltración al CNS (Deshmane y col., 2009).

Las moléculas anti-angiogénicas también presentaron este caso de niveles alterados en más de un tipo celular SZ.

El Inhibidor del Activador de Plasminógeno 1, PAI-1 (del inglés, Plasminogen Activator Inhibitor 1) inhibidor directo de uPA y tPA, se encontró disminuido en neuronas, pero aumentada en astrocitos al comparar los niveles en los secretomas de SZ respecto a HC. Además de su rol como inhibidor de la fibrinólisis, lo que permite una degradación controlada de coágulos sanguíneos, PAI-1 está involucrado en variados eventos de remodelación de ECM, como migración celular mediante su interacción con el eje uPA/uPAR, pero independiente de la activación o no del plasminógeno (Czekay y col., 2011). Se ha reportado que inhibe la apoptosis neuronal, evitando la desintegración de las redes neuronales mediante la mantención de neuritas, a través de vías de señalización independientes de su actividad como proteasa (Soeda y col., 2004; Koyanagi y col., 2008) y adicional a esto, se ha reportado que niveles deficientes de PAI-1 en el secretoma de astrocitos genera muerte neuronal in vitro (Soeda y col., 2001).

PEDF, es una molécula anti-angiogénica que inhibe la actividad de VEGFA tanto a nivel transcripcional como al interferir con la unión a su receptor VEGFR2 (Zhang y col., 2006). Esta molécula se encontró aumentada en células endoteliales de cerebro SZ respecto a HC, pero disminuida en células troncales neurales SZ. Interesantemente, para esta molécula se han reportado dos principales funciones diametralmente opuestas: la auto-renovación de células troncales neurales, y la diferenciación a neuronas de manera contexto-dependiente (Sagheer y col., 2015). PEDF promueve la neurogénesis y proyección de neuritas, media efectores neurotróficos y confiere neuroprotección frente a agentes neurotóxicos (Houenou y col., 1999; Stevens y col., 2019; Bilak y col., 2002). Pero también se ha reportado que PEDF promueve la auto-renovación de células troncales neurales mediante la regulación de principales efectores de vía Notch. De hecho, se ha

descrito que para la auto-renovación de estas células es clave la secreción al nicho neurovascular por parte de las células endoteliales de cerebro del factor PEDF (Ramírez-Castillejo y col., 2006; Shin y col., 2014).

Dentro de los resultados destacan también moléculas que no sólo presentaron niveles alterados en más de un tipo de cultivo celular, sino que también sus niveles en los secretomas de SZ, respecto a HC, siguen una misma tendencia: ser secretadas en menor nivel.

VEGFA se encontró consistentemente disminuido en células troncales neurales y astrocitos. Esta proteína es conocida por su rol esencial en generar migración y proliferación de células endoteliales para generar nuevos vasos sanguíneos, durante el desarrollo y la adultez (Ruhrberg y col., 2002; Risau, 1997). Adicional a este rol, desde comienzos de este siglo se comenzó a describir un rol neurogénico de VEGF, producidas injurias contra el CNS, y durante el desarrollo (Rosenstein, 2004; Meirer y col., 2001).

VEGFA promueve la neurogénesis *in vitro* e *in vivo* en la formación del CNS, la migración neuronal durante el desarrollo y posee un rol neuroprotector, promoviendo la sobrevivencia de neuronas y crecimiento de neuritas (Jin y col., 2000; Jin y col., 2002). Además, es un factor mitogénico para astroglias (Mani y col., 2005).

Otra proteína cuyos niveles estuvieron disminuidos en SZ fue uPA. En la figura 12 se observan los niveles de uPA, presentados en los mapas de calor de una manera desglosada. Se aprecia una disminución de los niveles secretados de este factor, en SZ respecto a HC, para componentes celulares del linaje neural (células troncales neurales y neuronas), así como para el componente vascular (células endoteliales de cerebro).

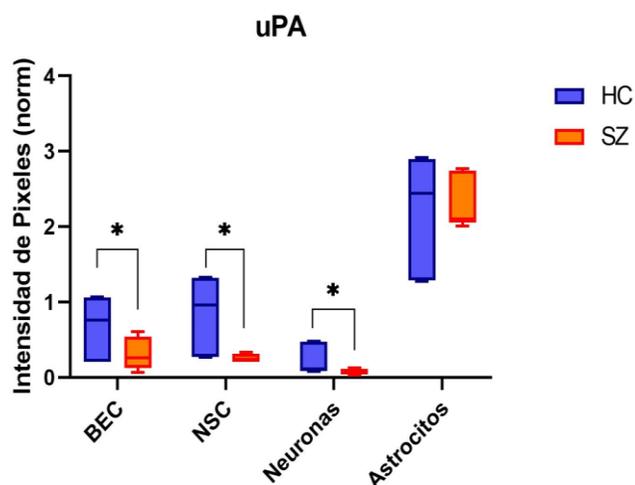


Figura 12. Los niveles de uPA son menores en el secretoma de diversos componentes de la unidad neurovascular en SZ respecto a HC. El gráfico presenta niveles de uPA en secretomas de cada tipo celular analizado, en condiciones HC (azul) y SZ (naranja). Significancia estadística calculada por Anova de dos vías seguido por prueba de comparaciones múltiples Holm Sidak's, $p < 0.05$.

uPA presenta un rol clásico en el sistema fibrinolítico, al unirse a su receptor uPAR cataliza la conversión de plasminógeno a plasmina, para degradar fibrina (Summaria y col., 1967). Este rol es esencial en la degradación de trombos en los vasos sanguíneos (Yepes y col., 2003). Por otra parte, la unión de uPA a su receptor de membrana, uPAR, posee funciones no proteolíticas claves en el desarrollo del CNS: el eje uPA/uPAR es esencial para la migración neuronal, el crecimiento axonal, y la dendritogenesis en neuronas (Semina y col., 2016). A su vez, estos procesos son importantes para establecer redes neuronales funcionales y el desarrollo espaciotemporal del CNS. Así el eje uPA/uPAR, tanto mediante funciones proteolíticas como no proteolíticas, impacta en el desarrollo y establecimiento de redes neuronales en CNS, participando del remodelamiento del citoesqueleto y de la ECM (Lino y col., 2014). En la adultez, uPA cumple funciones de factor neurotrófico, y promueve la regeneración axonal en enfermedades neurodegenerativas de la materia blanca y, luego de ataques isquémicos, promueve la activación astrocítica y la recuperación de actividad sináptica mediante la remodelación del citoesqueleto (Diaz y col., 2017; Merino y col., 2017; Merino y col., 2018).

DISCUSIÓN

4.1 Alteraciones en la expresión de genes sinápticos durante la diferenciación neuronal en cultivos derivados de hiPSC de pacientes con SZ sugieren un desbalance entre la sinapsis excitatoria/inhibitoria.

En el presente trabajo se estudiaron los niveles de transcrito de genes relacionados con la sinapsis en cultivos neuronales de largo plazo derivados de hiPSC provenientes de pacientes con SZ y HC considerando la temporalidad, es decir, monitoreando a lo largo de su diferenciación. En particular, se definió cuantificar los cambios de expresión entre dos ventanas temporales que representan distintos estados de madurez en los cultivos: a los 30 (inmaduro) y 90 días (maduro).

En los cultivos neuronales HC el gen *ATP5* disminuyó su expresión a lo largo del transcurso de su diferenciación, mientras que en SZ su expresión se mantuvo constante. Este nivel de transcrito, elevado a lo largo del transcurso de su diferenciación en SZ, de concordar con un correspondiente incremento a nivel proteico, podría sugerir alteraciones metabólicas en las neuronas SZ. El metabolismo ha sido descrito como un factor importante en la actividad sináptica de neuronas y su posterior tiempo de recuperación (Shetty y col., 2012). Específicamente, se ha destacado la síntesis de ATP como clave para la actividad sináptica, recalando la importancia de las subunidades de la ATPasa, entre ellas la codificada por el gen *ATP5* (Rangaraju y col., 2014). Los genes relacionados con síntesis de ATP no sólo han sido relacionados con la actividad a nivel sináptico, sino también a nivel de CF. Es más, genes relacionados con la CF cerebral entre áreas distintas, específicamente con conexiones de larga distancia se relacionan con la co-expresión entre genes de estrés oxidativo y de función mitocondrial (Vértés y col., 2016). Esto sugiere que la expresión constante de *ATP5* a lo largo del transcurso de diferenciación de neuronas SZ podría implicar alteraciones metabólicas, que a su vez podrían contribuir a la dinámica alterada en la CF de cultivos neuronales SZ.

Para explorar estas alteraciones metabólicas, sería interesante generar cultivos neuronales HC que produzcan mayores niveles de transcritos de *ATP5F1D* (por ejemplo, agregando números de copia de dicho gen por sobreexpresión) durante su diferenciación, y comparar cómo afecta la CF, respecto a un cultivo neuronal HC control.

SYP codifica para la proteína Sinaptofisina, una de las proteínas de membrana más abundantes en vesículas sinápticas. Se ha demostrado que Sinaptofisina no es esencial para la liberación de neurotransmisores, pero que regula la formación de sinapsis dependiente de actividad en el hipocampo (McMahon y col., 1996; Tarsa & Goda, 2002). La formación de conexiones sinápticas implica la proyección y guía -mediada por quimiotaxis- axonal hacia su objetivo, en donde se realizará la sinaptogénesis, estableciendo la identidad pre y post sináptica correspondiente, por procesos independientes de actividad neuronal (Goodman & Shatz, 1993). Luego estas conexiones son refinadas y mantenidas mediante procesos dependientes de actividad neuronal, en donde se estabilizan y definen los circuitos sinápticos óptimos, proceso en donde *SYP* está implicada (Südhof, 2018). En el trabajo presente, se encontró que mientras los niveles de transcrito de *SYP* se mantuvieron constantes para cultivos neuronales HC durante el transcurso de su diferenciación, en SZ aumentaron sus niveles de transcrito a lo largo de su diferenciación. Esto coincide con trabajos recientes que han encontrado niveles aumentados de *SYP* en el citosol de cultivos de neuronas SZ (Yamamoto y col., 2021). Un desbalance en los niveles de esta proteína ha sido relacionado con alteraciones conductuales y cognitivas en ratones, síntomas prevalentes en SZ (Schmitt y col., 2009). Además, niveles alterados de *SYP* han sido relacionados funcionalmente con SZ (Shen y col., 2012). La evidencia sugiere que este gen se relaciona con la fisiopatología de SZ, pero no hay trabajos que relacionen específicamente la CF con los niveles de *SYP*. La *SYP* está directamente relacionada con la cinética de la endocitosis de vesículas sinápticas en neuronas centrales (Kwon & Chapman, 2011).

Por otro lado, se ha asociado el uso de glucosa a nivel regional en el cerebro en estado de reposo con los niveles de *SYP* en primates (Rocher y col., 2003). La tendencia a aumentar la expresión de este gen durante el transcurso de diferenciación de los cultivos neuronales SZ, contrario a lo que se observa en HC, podría implicar un aumento de los niveles de esta proteína. Esto a su vez podría impactar en la frecuencia de liberación de vesículas presinápticas, generando una depleción de estas y por consiguiente una posterior hipoactividad en SZ. O bien, podría conllevar a mecanismos regulatorios que disminuyen la cantidad de proteína funcional, lo que a su vez podría impactar también en la actividad presináptica en neuronas SZ. Para definir entre ambas opciones a futuro podría evaluarse la presencia de proteínas implicadas en la inhibición postranscripcional de la sinaptofisina.

CDK5R1 codifica para el cofactor p35, activador específico en neuronas de la CDK5, que varía cíclicamente su expresión desde el desarrollo hasta la vida adulta (Wu y col., 2000). Los resultados obtenidos en el trabajo presente indican que, mientras la expresión disminuyó en los cultivos HC durante el transcurso de su diferenciación, se mantuvo constante en los cultivos SZ. Este resultado no implica un aumento significativo de su expresión en la condición SZ, la cual se ha encontrado disminuida en tejidos *postmortem* de pacientes SZ respecto a HC (Ramos-Miguel y col., 2013). Si bien no son resultados diametralmente opuestos, esta divergencia observada en los niveles de expresión de *CDK5R1* en SZ en distintas etapas del desarrollo, al ser comparado con HC, podría relacionarse con las vías río arriba que regulan la expresión del gen, que podrían estar generando una expresión desfasada, respecto a los ciclos de expresión en condiciones HC. La actividad de CDK5 en neuronas depende del coactivador p35 (Ko y col., 2001) y es clave en la proyección de neuritas y migración axonal, como ha sido demostrado en experimentos con ratones mutantes para *CDK5R1*

(Kwon y col., 1999) y *CDK5* (Ohshima y col., 1996) en donde en ambos casos se ha encontrado una corticogénesis defectuosa, con una migración limitada en neuronas.

Los genes sinápticos excitatorios *HOMER1* y *GRIN1* presentan un curso temporal diferente en cultivos SZ respecto a HC. En HC la expresión de ambos genes disminuye durante el transcurso de la diferenciación, mientras que en SZ *GRIN1* se mantuvo constante y *HOMER1* aumentó su expresión. Para el caso de los genes *GPHN* y *GAD1*, el comportamiento de expresión a lo largo de su diferenciación es similar en HC y SZ, disminuyendo su expresión. Estos resultados sugieren que en los cultivos neuronales en SZ a lo largo de la maduración de las redes se pudiese presentar un desbalance en el equilibrio entre la sinapsis. En trabajos a nivel de pacientes con SZ, existe evidencia de tanto una tendencia hacia la hiperexcitabilidad en circuitos, como hacia la hipoexcitabilidad de estos, según la zona del cerebro estudiada o el tratamiento del paciente (Whitfield-Gabrieli y col., 2009; McHugo y col., 2019; Allen y col., 2019). Como se ha reiterado a lo largo de este trabajo, el balance entre sinapsis excitatoria/inhibitoria es clave en la formación y dinámica entre redes neuronales para un funcionamiento correcto del cerebro. Esta posible tendencia a la hiperexcitabilidad podría estar saturando la señal en las redes, dificultando el cambio de CF entre las redes neuronales SZ, lo que contribuiría a su vez con la dinámica reducida observada en redes. Al analizar en la literatura la correlación entre expresión génica y la CF de redes neuronales, se ha reportado que los principales genes implicados cumplen funciones en el neurodesarrollo y la formación de sinapsis (Richiardi y col., 2015). No existen a la fecha trabajos que relacionen directamente los genes estudiados en este trabajo con CF, pero si a la fecha hay una cantidad sustancial de trabajos que relacionan genes con CF e indican que, en su mayoría, estos genes poseen funciones asociadas a sinapsis, como recepción o síntesis de neurotransmisores, genes de guía axonal y de remodelación de la ECM (Glahn y col., 2010; Zhang y col., 2021; Anderson y col., 2018;

Zhang y col., 2021; Zhu y col., 2021). Incluso, un trabajo asoció la expresión de genes implicados en la CF con genes en los que se han caracterizado mutaciones asociadas a enfermedades que afectan al CNS, siendo la SZ una de las enfermedades que más genes asociados presenta (Zhu y col., 2021).

4.2 Los secretomas de los principales componentes de la unidad neurovascular en SZ son menos neurotróficos y podrían contribuir a la migración y sinapsis defectuosa en neuronas.

El secretoma de los componentes unidad neurovascular en ambas condiciones contiene moléculas implicadas en el desarrollo de los sistemas vascular y neural. Los niveles de secreción de algunas de estas moléculas fueron diferentes en SZ respecto a HC, en algunos casos inclusive para más de un tipo celular analizado. Los aumentos en los niveles de MMP-9 en células endoteliales de cerebro SZ respecto a HC, se vuelven interesantes al considerar los roles de esta molécula remodeladora de ECM sobre etapas tempranas del neurodesarrollo actuando en procesos como migración neuronal, proyección de neuritas y establecimiento de conexiones sinápticas; y que en la vida adulta contribuye a reestructurar estas redes sinápticas (Reinhard y col., 2015). Niveles alterados de esta proteína en la ECM del nicho neurovascular SZ podrían estar relacionadas con fallas en la conectividad sináptica. En su rol de molécula angiogénica, se ha reportado que niveles elevados de esta molécula se asocian a un fenotipo permeable de BBB, lo que podría contribuir a la permeabilidad de BBB observada en SZ (Shigemori y col., 2006; Turner & Sharp, 2016).

Los niveles aumentados de Endostatina, molécula anti-angiogénica implicada en la inhibición del crecimiento de neuritas y la migración neuronal (Al Ahmad y col., 2010) en células endoteliales de cerebro SZ, de replicarse en el nicho de la unidad neurovascular, sugeriría su implicancia no sólo en la funcionalidad defectuosa de las células endoteliales de cerebro SZ, sino también en la migración defectuosa de célula troncal neural y neuronas SZ.

El secretoma de los astrocitos en SZ, particularmente los elevados niveles de IL-8 respecto a la condición HC encontrados, resulta muy interesante pues altos niveles de esta citoquina pro-inflamatoria han demostrado tener un rol pro-angiogénico, asociado a patofisiologías como diversos cánceres además de inducir la muerte celular de NCS (Li y col., 2003; Breton & Mao-Draayer, 2011). Por tanto, el fenotipo pro-inflamatorio de los astrocitos SZ, que ha sido recientemente reportado podría repercutir sobre otros componentes de la unidad neurovascular en SZ. (Trindade y col., 2022)

Los niveles alterados de la proteína MCP-1, que fue la única proteína que se reportó alterada en el secretoma de neuronas SZ en el proteoma neurogénico (véase anexo fig 3-5), posee un importante rol neuroprotector. Se ha reportado que luego de derrames cerebrovasculares isquémicos, genera la migración y reclutamiento de células troncales neurales a zona de daño, además de su extravasación transendotelial (Andres y col., 2011). Sumado estas funciones en el CNS adulto, se ha reportado que es secretada y posee su receptor de superficie CCR2 en células troncales neurales, neuronas y principalmente astrocitos perivasculares durante el desarrollo del CNS (Andres y col., 2011; Conductier y col., 2010). Se podría conjeturar que MCP-1 posee una función en migración mediante señalización autocrina durante eventos del neurodesarrollo. Se han descrito sus niveles de secreción como heterogéneos en astrocitos durante el desarrollo (Andjelkovic y col., 2002) y niveles elevados de secreción están asociados a eventos inflamatorios que contribuyen a un detrimento en el desarrollo del CNS (Croitoru-Lamoury y col., 2003) lo que al ser relacionado con los resultados obtenidos, en donde se encuentra aumentada la secreción de esta molécula 6 veces más en astrocitos SZ que en HC, indicaría un posible ambiente proinflamatorio en el nicho SZ con una importante contribución de los astrocitos, lo que a su vez se reafirma por los elevados niveles de IL-8 ya discutidos.

Al analizar importantes proteínas del neurodesarrollo y del establecimiento de conexiones sinápticas, en conjunto con sus inhibidores, como es el caso de PEDF/ VEGFA y uPA/PAI-1, se encontraron niveles alterados en más de un tipo celular, lo que permite especular y plantear interesantes reflexiones, discutidas a continuación.

Para la proteína PEDF, cuya función varía de manera contexto-dependiente, el hecho de encontrar aumentada la secreción de esta proteína por parte de las células endoteliales de cerebro podría tener repercusiones importantes en el balance entre el *pool* de células troncales neurales y la neurogénesis en el nicho de la unidad neurovascular. Los niveles consistentemente disminuidos en componentes neurales de su blanco, VEGFA, en el contexto biológico del nicho neurovascular en el CNS en desarrollo en SZ podrían implicar anomalías en la neurogénesis. Por ejemplo, generando un desfase en esta y así afectar el delicado balance entre el *pool* de Célula Troncal Neural/neuronas para generar correctamente las capas corticales del cerebro (Wu y col., 2017). Además, se ve afectado el proceso de formación y proyección de neuritas, entre ellos la guía axonal, lo que se relaciona con el establecimiento de conexiones sinápticas entre neuronas (Wu y col., 2019), afectando así la modulación de conexiones sinápticas entre redes neuronales, y, por consiguiente, la CF en el sistema nervioso (Guérit y col., 2014). Tomando en consideración que VEGFA es clave para establecer el acoplamiento neurovascular, los niveles disminuidos en el nicho neurovascular en SZ, podrían implicar efectos adversos en el desarrollo concomitante de ambos sistemas. Por otro lado, se han encontrado los niveles de VEGFA alterados en pacientes con SZ (Misiak y col., 2018; Pillai y col., 2015). Variaciones de polimorfismo de *VEGF*, que a su vez implican variaciones en los niveles de la proteína disponible, se han relacionado con alucinaciones en enfermedades como la SZ (Maffioletti y col., 2020; Lizano y col., 2018). Por lo tanto, niveles disminuidos de este factor, no

solo repercuten en el desarrollo del CNS sino también en el funcionamiento de este en la vida adulta y en la respuesta frente a injurias contra este sistema.

uPA, como se mencionó anteriormente es un factor remodelador de la ECM clave en establecer conexiones entre redes neuronales. La inhibición *in vitro* de uPA en cultivos neuronales corticales de rata altera severamente la conectividad funcional entre redes neuronales y la sincronía entre las conexiones sinápticas, más no las propiedades eléctricas a nivel de célula única, todo esto mediante la modulación de la ECM (Van De Vijver y col., 2019). Por otro lado, se ha reportado que uPA regula la expresión y funcionalidad de proteínas claves en la sinaptogénesis, tales como GAP-43 (Merino y col., 2017)

Además, el Inhibidor directo de uPA, PAI-1, se encontró desregulado también en los resultados presentados en este trabajo. Cabe notar que, los niveles de PAI-1 se encontraron disminuidos en neuronas y aumentados en astrocitos. Se esperaría que, frente a estos resultados, hubiese mayores niveles de uPA secretado por neuronas y un menor nivel en astrocitos. Sin embargo, en neuronas tanto uPA como PAI-1, se encuentran disminuidos. Además, se genera un efecto sinérgico, entre uPA y VEGFA mediante mecanismos independientes; uPA favorece la producción de VEGFA y viceversa (Breuss & Uhrin, 2012). Sin embargo, los niveles de ambas proteínas en los secretomas analizados para la condición SZ, son bajos. Es interesante considerar estas observaciones recién expuestas, ya que las proteínas analizadas se relacionan y regulan entre sí, y el hecho de que se haya encontrado que los niveles secretados de dichas proteínas no son consistentes con sus reguladores directos, indicaría potenciales alteraciones en las vías de señalización moleculares, que a su vez podrían impactar en el fenotipo de estas células y, por consiguiente, podrían implicarse en la fisiopatología de SZ.

Tomando en consideración las funciones de las proteínas alteradas en SZ, que se muestran en la tabla 5, y los niveles en los que cada proteína se encuentra alterada en la condición SZ, para los principales componentes de la unidad neurovascular, se puede concluir que en la condición SZ habría un ambiente menos neurotrófico, con una menor cantidad de factores tróficos que impulsarán la proyección de neuritas y migración neuronal, como uPA y VEGFA, sumado a los elevados niveles de IL-8, que disminuye la viabilidad Célula Troncal Neural y neuronas al promover un ambiente proinflamatorio. Por otro lado, la alteración en niveles de factores que mantienen la auto-renovación, como PEDF o IGFBP2, tienden a estar aumentados en SZ respecto a HC. Amplia evidencia indica que en ambientes con altas concentraciones de factores que promueven la división simétrica en células troncales, se tiende a diferenciar estas poblaciones, más que a mantener la troncalidad (Pastrana y col., 2011; Gritli-Linde y col., 2001; Palma y col., 2001; Zandstra y col., 2000). Esto podría implicar que en SZ las células troncales neurales en el nicho se diferenciarán en un tiempo y espacio inadecuado para el correcto neurodesarrollo. Esto, sumado a que el ambiente formado no sería el propicio para incitar la migración neuronal o la proyección de neuritas, podría implicar un proceso de migración cortical defectuoso. Esta hipótesis coincide con la literatura reciente, sobre trabajos en organoides derivados de pacientes con SZ, en donde en zonas subcorticales se encontraban poblaciones de neuronas maduras, pero en las capas corticales estaba depleto de estas acompañado por alteraciones en la ECM de la corteza, con bajos niveles de la proteína reelina, además de presentar un reducido número de conexiones entre ambas regiones (Stachowiak y col., 2017). La posible depleción de células troncales neurales debida a la neurogénesis temprana en SZ impactaría en el *pool* de células troncales neurales en el adulto, residente en zonas como el giro dentado del hipocampo o la zona subventricular, así limitando la neurogénesis frente a injurias al CNS: dejándolo más vulnerable y susceptible a daños. Esto

coincidiría con evidencia en la que se ha observado, en tejidos *postmortem* de pacientes, una proliferación disminuida de células troncales neurales (Reif y col., 2006). Esta proliferación se ve también comprometida frente a la supresión del gen Disrupted-in-Schizophrenia 1 (*DISC1*), que se encuentra clásicamente mutado en SZ (Mao y col., 2009). Además, este gen tiene un rol clave en regular la integración y maduración de nuevas neuronas en el cerebro adulto (Duan y col., 2007). De hecho, se han reportado células progenitoras neurales inmaduras y muerte de neuronas maduras en tejidos *postmortem* de pacientes (Walton y col., 2012).

La hipótesis de un nicho neurovascular deficiente de factores neurogénicos en SZ, podría afectar también la capacidad de estas neuronas para establecer conexiones sinápticas, lo que a su vez impactaría en la conectividad a nivel de red. Esto, sumado al desbalance en sinapsis excitatoria/inhibitoria propuesto anteriormente, podría ser una causa de la CF alterada que se observa en los cultivos neuronales de pacientes con SZ (Puvogel, Blanchard y col, 2022).

Se hace deseable incursionar en el futuro en el estudio del efecto directo que pudiesen tener los diferentes secretomas, o un conjunto de ellos, sobre los procesos de diferenciación de cultivos de largo plazo de neuronas SZ y su influencia sobre las dinámicas neuronales.

Para ello, se plantea la reconstrucción *in vitro* de la NVU, generando un co-cultivo de los componentes celulares presentados en este seminario de título para la posterior recolección y análisis de su secretoma en conjunto. Se podría ser luego utilizado en cultivos neuronales HC para evaluar el rescate del fenotipo en SZ, evaluando posibles cambios en la CF de estos cultivos, resultado de la exposición a estos secretomas.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se planteó responder dos preguntas, tendiente a contribuir a la comprensión de las causas que subyacen a las alteraciones sinápticas, descritas en las redes neuronales en SZ.

Pese a que no se encontraron diferencias en los niveles de transcrito de genes asociados a la función sináptica en neuronas SZ de 30 o 90 días, respecto al control, el análisis del curso temporal de la expresión génica permitió revelar diferencias en los patrones de expresión entre HC y SZ, tanto para genes asociados al metabolismo (*ATP5F1D*), al desarrollo neuronal (*CDK5R1*) y la sinapsis pre (*SYP*) y post (*HOMER1*; *GRIN1*). Estos resultados sugieren que durante el curso de la maduración de las redes neuronales en SZ se generan alteraciones en el establecimiento de conexiones sinápticas y en el balance excitatorio/inhibitorio que define las configuraciones de circuitos neuronales.

De las 55 moléculas neuro-angiogénicas analizadas, se detectaron 14 en los secretomas de células endoteliales de cerebro, célula troncal neural, neuronas y astrocitos, en ambos grupos analizados. Se encontró un desbalance en los secretomas derivados de SZ que sugiere un ambiente menos neurotrófico. Se observan niveles alterados de factores que promueven migración como CCL2, factores neurotóxicos como IL-8 y factores mitogénicos de células troncales como IGFBP2.

En SZ existió una tendencia transversal, tanto de los componentes neurales como vasculares, a presentar niveles disminuidos de uPA.

Nuestros resultados sugieren que la presencia alterada de estos factores identificados en el nicho neurovascular podría influir el establecimiento de las redes neuronales, generando circuitos neuronales con comportamientos aberrantes, que impactarían en un futuro en la funcionalidad del cerebro en pacientes con SZ.

BIBLIOGRAFÍA

Nota: La bibliografía de las tablas 4 y 5 se encuentra al final de esta sección.

- Abbott, N. (2004). Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochemistry International*, 45(4), 545-552. doi: 10.1016/j.neuint.2003.11.006
- Abbott, N., Patabendige, A., Dolman, D., Yusof, S., & Begley, D. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology Of Disease*, 37(1), 13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Akkouh, I., Hughes, T., Steen, V., Glover, J., Andreassen, O., Djurovic, S., & Szabo, A. (2021). Transcriptome analysis reveals disparate expression of inflammation-related miRNAs and their gene targets in iPSC-astrocytes from people with schizophrenia. *Brain, Behavior, And Immunity*, 94, 235-244. doi: 10.1016/j.bbi.2021.01.037
- Akkouh, I., Ueland, T., Hansson, L., Inderhaug, E., Hughes, T., & Steen, N. et al. (2020). Decreased IL-1 β -induced CCL20 response in human iPSC-astrocytes in schizophrenia: Potential attenuating effects on recruitment of regulatory T cells. *Brain, Behavior, And Immunity*, 87, 634-644. doi: 10.1016/j.bbi.2020.02.008
- Al Ahmad, A., Lee, B., Stack, J., Parham, C., Campbell, J., & Clarke, D. et al. (2010). Endostatin binds nerve growth factor and thereby inhibits neurite outgrowth and neuronal migration in-vitro. *Brain Research*, 1360, 28-39. doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.023
- Allen, P., Sommer, I., Jardri, R., Eysenck, M., & Hugdahl, K. (2019). Extrinsic and default mode networks in psychiatric conditions: Relationship to excitatory-inhibitory transmitter balance and early trauma. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 99, 90-100. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.02.004
- Anderson, K., Krienen, F., Choi, E., Reinen, J., Yeo, B., & Holmes, A. (2018). Gene expression links functional networks across cortex and striatum. *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-03811-x
- Andjelkovic, A., Song, L., Dzenko, K., Cong, H., & Pachter, J. (2002). Functional expression of CCR2 by human fetal astrocytes. *Journal Of Neuroscience Research*, 70(2), 219-231. doi: 10.1002/jnr.10372
- Andreasen, N., O'Leary, D., Flaum, M., Nopoulos, P., Watkins, G., Ponto, L., & Hichwa, R. (1997). Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naïve patients. *The Lancet*, 349(9067), 1730-1734. doi: 10.1016/s0140-6736(96)08258-x
- Andres, R., Choi, R., Pendharkar, A., Gaeta, X., Wang, N., & Nathan, J. et al. (2011). The CCR2/CCL2 Interaction Mediates the Transendothelial Recruitment of Intravascularly Delivered Neural Stem Cells to the Ischemic Brain. *Stroke*, 42(10), 2923-2931. doi: 10.1161/strokeaha.110.606368
- Armulik, A., Genové, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell*, 21(2), 193-215. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.001
- Baker, N., Carlo Russo, V., Bernard, O., D'Ercole, A., & Werther, G. (1999). Interactions between Bcl-2 and the IGF system control apoptosis in the developing mouse brain. *Developmental Brain Research*, 118(1-2), 109-118. doi: 10.1016/s0165-3806(99)00136-4

- Baruah, J., & Vasudevan, A. (2019). The Vessels Shaping Mental Health or Illness. *The Open Neurology Journal*, 13(1), 1-9. doi: 10.2174/1874205x01913010001
- Ben-Zvi, A., & Liebner, S. (2021). Developmental regulation of barrier- and non-barrier blood vessels in the CNS. *Journal Of Internal Medicine*, 292(1), 31-46. doi: 10.1111/joim.13263
- Bilak, M., Becerra, S., Vincent, A., Moss, B., Aymerich, M., & Kuncl, R. (2002). Identification of the Neuroprotective Molecular Region of Pigment Epithelium-Derived Factor and Its Binding Sites on Motor Neurons. *The Journal Of Neuroscience*, 22(21), 9378-9386. doi: 10.1523/jneurosci.22-21-09378.2002
- Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. (2014). *Nature*, 511(7510), 421-427. doi: 10.1038/nature13595
- Brennand, K., & Gage, F. (2011). Concise Review: The Promise of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Based Studies of Schizophrenia. *Stem Cells*, 29(12), 1915-1922. doi: 10.1002/stem.762
- Brennand, K., Savas, J., Kim, Y., Tran, N., Simone, A., & Hashimoto-Torii, K. et al. (2014). Phenotypic differences in hiPSC NPCs derived from patients with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 20(3), 361-368. doi: 10.1038/mp.2014.22
- Brennand, K., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., & Sangar, S. et al. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 473(7346), 221-225. doi: 10.1038/nature09915
- Brennand, K., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., & Sangar, S. et al. (2022). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. Retrieved 22 August 2022, from
- Breton, J., & Mao-Draayer, Y. (2011). Impact of Cytokines on Neural Stem/Progenitor Cell Fate. *Journal Of Neurology & Neurophysiology*, s4. doi: 10.4172/2155-9562.s4-001
- Breuss, J. and Uhrin, P., 2012. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adhesion & Migration*, 6(6), pp.535-540.
- Buckley, P., Harvey, P., Bowie, C., & Loebel, A. (2007). The relationship between symptomatic remission and neuropsychological improvement in schizophrenia patients switched to treatment with ziprasidone. *Schizophrenia Research*, 94(1-3), 99-106. doi: 10.1016/j.schres.2006.12.032
- Bülow, P., Segal, M., & Bassell, G. J. (2022). Mechanisms driving the emergence of neuronal hyperexcitability in Fragile X syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6315. doi:10.3390/ijms23116315
- Casas, B., Vitória, G., do Costa, M., Madeiro da Costa, R., Trindade, P., & Maciel, R. et al. (2018). hiPSC-derived neural stem cells from patients with schizophrenia induce an impaired angiogenesis. *Translational Psychiatry*, 8(1). doi: 10.1038/s41398-018-0095-9
- Cauli, B. (2004). Cortical GABA Interneurons in Neurovascular Coupling: Relays for Subcortical Vasoactive Pathways. *Journal Of Neuroscience*, 24(41), 8940-8949. doi: 10.1523/jneurosci.3065-04.2004
- Conductier, G., Blondeau, N., Guyon, A., Nahon, J., & Rovère, C. (2010). The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *Journal Of Neuroimmunology*, 224(1-2), 93-100. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.010

- Croituru-Lamoury, J., Guillemin, G., Boussin, F., Mognetti, B., Gigout, L., & Chéret, A. et al. (2003). Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: Evidence for a central role of TNF α and IFN γ in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia*, 41(4), 354-370. doi: 10.1002/glia.10181
- Czekay, R., Wilkins-Port, C., Higgins, S., Freytag, J., Overstreet, J., & Klein, R. et al. (2011). PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *International Journal Of Cell Biology*, 2011, 1-9. doi: 10.1155/2011/562481
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A., & Barres, B. (2010). Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562-566. doi: 10.1038/nature09513
- Dause, T. J., Denninger, J. K., Smith, B. M., & Kirby, E. D. (2022). The neural stem cell secretome across neurodevelopment. *Experimental Neurology*, 355, 114142. doi:10.1016/j.expneurol.2022.114142
- de Jonge, J., Vinkers, C., Hulshoff Pol, H., & Marsman, A. (2017). GABAergic Mechanisms in Schizophrenia: Linking Postmortem and In Vivo Studies. *Frontiers In Psychiatry*, 8. doi: 10.3389/fpsyt.2017.00118
- Deshmane, S., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal Of Interferon & Cytokine Research*, 29(6), 313-326. doi: 10.1089/jir.2008.0027
- Di Giovanna, A., Tibo, A., Silvestri, L., Müllenbroich, M., Costantini, I., & Allegra Mascaro, A. et al. (2018). Whole-Brain Vasculature Reconstruction at the Single Capillary Level. *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-30533-3
- Di Lorenzo, G., Daverio, A., Ferrentino, F., Santarnecchi, E., Ciabattini, F., & Monaco, L. et al. (2015). Altered resting-state EEG source functional connectivity in schizophrenia: the effect of illness duration. *Frontiers In Human Neuroscience*, 9. doi: 10.3389/fnhum.2015.00234
- Diaz, A., Merino, P., Manrique, L., Ospina, J., Cheng, L., Wu, F., Jeanneret, V. and Yepes, M., 2017. A Cross Talk between Neuronal Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Astrocytic uPA Receptor (uPAR) Promotes Astrocytic Activation and Synaptic Recovery in the Ischemic Brain. *The Journal of Neuroscience*, 37(43), pp.10310-10322.
- Duan, X., Chang, J., Ge, S., Faulkner, R., Kim, J., & Kitabatake, Y. et al. (2007). Disrupted-In-Schizophrenia 1 Regulates Integration of Newly Generated Neurons in the Adult Brain. *Cell*, 130(6), 1146-1158. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.010
- Eastwood, S., Law, A., Everall, I., & Harrison, P. (2003). The axonal chemorepellant semaphorin 3A is increased in the cerebellum in schizophrenia and may contribute to its synaptic pathology. *Molecular Psychiatry*, 8(2), 148-155. doi: 10.1038/sj.mp.4001233
- Egbujo, C., Sinclair, D., & Hahn, C. (2016). Dysregulations of Synaptic Vesicle Trafficking in Schizophrenia. *Current Psychiatry Reports*, 18(8). doi: 10.1007/s11920-016-0710-5
- Engelhardt, B., & Liebner, S. (2014). Novel insights into the development and maintenance of the blood–brain barrier. *Cell And Tissue Research*, 355(3), 687-699. doi: 10.1007/s00441-014-1811-2
- Erdeniz, B., Serin, E., İbadi, Y., & Taş, C. (2017). Decreased functional connectivity in schizophrenia: The relationship between social functioning, social cognition and graph theoretical network measures. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 270, 22-31. doi: 10.1016/j.pychresns.2017.09.011

- Friston, K. J. (2011). Functional and effective connectivity: A Review. *Brain Connectivity*, 1(1), 13-36. doi:10.1089/brain.2011.0008
- Fruttiger, M., Karlsson, L., Hall, A., Abramsson, A., Calver, A., & Bostrom, H. et al. (1999). Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development*, 126(3), 457-467. doi: 10.1242/dev.126.3.457
- Gage, F. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438. doi: 10.1126/science.287.5457.1433
- Gao, X., & Xu, Z. (2008). Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 40(7), 619-624. doi: 10.1111/j.1745-7270.2008.00442.x
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., & Abramsson, A. et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal Of Cell Biology*, 161(6), 1163-1177. doi: 10.1083/jcb.200302047
- Glahn, D., Winkler, A., Kochunov, P., Almas, L., Duggirala, R., & Carless, M. et al. (2010). Genetic control over the resting brain. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 107(3), 1223-1228. doi: 10.1073/pnas.0909969107
- Goodman, C., & Shatz, C. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell*, 72, 77-98. doi: 10.1016/s0092-8674(05)80030-3
- Gritli-Linde, A., Lewis, P., McMahon, A., & Linde, A. (2001). The Whereabouts of a Morphogen: Direct Evidence for Short- and Graded Long-Range Activity of Hedgehog Signaling Peptides. *Developmental Biology*, 236(2), 364-386. doi: 10.1006/dbio.2001.0336
- Guérit, S., Allain, A., Léon, C., Cazenave, W., Ferrara, N., Branchereau, P., & Bikfalvi, A. (2014). VEGF modulates synaptic activity in the developing spinal cord. *Developmental Neurobiology*, 74(11), 1110-1122. doi: 10.1002/dneu.22187
- Hall, C., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N., Mishra, A., & Sutherland, B. et al. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature*, 508(7494), 55-60. doi: 10.1038/nature13165
- Harrison, P. (2014). Recent genetic findings in schizophrenia and their therapeutic relevance. *Journal Of Psychopharmacology*, 29(2), 85-96. doi: 10.1177/0269881114553647
- Harvey, P., Strassnig, M., & Silberman, J. (2019). Prediction of disability in schizophrenia: Symptoms, cognition, and self-assessment. *Journal Of Experimental Psychopathology*, 10(3), 204380871986569. doi: 10.1177/2043808719865693
- Haydon, P. (2001). Glia: listening and talking to the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(3), 185-193. doi: 10.1038/35058528
- Houenou, L., D'Costa, A., Li, L., Turgeon, V., Enyadike, C., Alberdi, E., & Bécerra, S. (1999). Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *The Journal Of Comparative Neurology*, 412(3), 506-514. doi: PMID: 10441236
- i. Casas, B. S., Arancibia-Altamirano, D., Acevedo-La Rosa, F., Garrido-Jara, D., Makshev, V., Pérez-Monje, D., & Palma, V. (2022). It takes two to tango: Widening our understanding of the onset of schizophrenia from a neuro-angiogenic perspective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. doi:10.3389/fcell.2022.946706

- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96(1), 17-42. doi: 10.1016/j.neuron.2017.07.030
- ii. Casas, B., Vitória, G., Prieto, C., Casas, M., Chacón, C., & Uhrig, M. et al. (2022). Schizophrenia-derived hiPSC brain microvascular endothelial-like cells show impairments in angiogenesis and blood–brain barrier function. *Molecular Psychiatry*. doi: 10.1038/s41380-022-01653-0
- Inan, M., Petros, T., & Anderson, S. (2013). Losing your inhibition: Linking cortical GABAergic interneurons to schizophrenia. *Neurobiology Of Disease*, 53, 36-48. doi: 10.1016/j.nbd.2012.11.013
- Ishii, K., Kubo, K., & Nakajima, K. (2016). Reelin and Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 10. doi: 10.3389/fncel.2016.00229
- Jablensky, A. (2010). The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and future prospects. *Dialogues In Clinical Neuroscience*, 12(3), 271-287. doi: 10.31887/dcns.2010.12.3/ajablensky
- James, J., & Mukoyama, Y. (2011). Neuronal action on the developing blood vessel pattern. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 22(9), 1019-1027. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.09.010
- Jin, K., Mao, X., & Greenberg, D. (2000). Vascular endothelial growth factor: Direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 97(18), 10242-10247. doi: 10.1073/pnas.97.18.10242
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X., Xie, L., & Greenberg, D. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99(18), 11946-11950. doi: 10.1073/pnas.182296499
- Jones, C., Watson, D., & Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. *British Journal Of Pharmacology*, 164(4), 1162-1194. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x
- Kadry, H., Noorani, B., & Cucullo, L. (2020). A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids And Barriers Of The CNS*, 17(1). doi: 10.1186/s12987-020-00230-3
- Kantrowitz, J., & Javitt, D. (2010). N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: The final common pathway on the road to schizophrenia?. *Brain Research Bulletin*, 83(3-4), 108-121. doi: 10.1016/j.brainresbull.2010.04.006
- Karakatsani, A., Shah, B., & Ruiz de Almodovar, C. (2019). Blood Vessels as Regulators of Neural Stem Cell Properties. *Frontiers In Molecular Neuroscience*, 12. doi: 10.3389/fnmol.2019.00085
- Katsel, P., Roussos, P., Pletnikov, M., & Haroutunian, V. (2017). Microvascular anomaly conditions in psychiatric disease. Schizophrenia – angiogenesis connection. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 77, 327-339. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.04.003
- Keaney, J., & Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS Journal*, 282(21), 4067-4079. doi: 10.1111/febs.13412
- Kelland, E., Gilmore, W., Weiner, L., & Lund, B. (2011). The dual role of CXCL8 in human CNS stem cell function: Multipotent neural stem cell death and oligodendrocyte progenitor cell chemotaxis. *Glia*, 59(12), 1864-1878. doi: 10.1002/glia.21230

- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R., Takahashi, S., Kulkarni, A., Li, E. and Tsai, L., 2001. p35 and p39 Are Essential for Cyclin-Dependent Kinase 5 Function during Neurodevelopment. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), pp.6758-6771.
- Kochunov, P., & Hong, L. (2014). Neurodevelopmental and Neurodegenerative Models of Schizophrenia: White Matter at the Center Stage. *Schizophrenia Bulletin*, 40(4), 721-728. doi: 10.1093/schbul/sbu070
- Koyanagi, S., Kuramoto, Y., Kimura, M., Oda, M., Kozako, T., & Hayashida, S. et al. (2008). Anti-apoptotic roles of plasminogen activator inhibitor-1 as a neurotrophic factor in the central nervous system. *Thrombosis And Haemostasis*, 100(12), 1014-1020. doi: 10.1160/th08-04-0259
- Kumar, A., Pareek, V., Singh, H., Faiq, M., Narayan, R., Raza, K., & Kumar, P. (2019). Altered Expression of a Unique Set of Genes Reveals Complex Etiology of Schizophrenia. *Frontiers In Psychiatry*, 10. doi: 10.3389/fpsyt.2019.00906
- Kwon, S., & Chapman, E. (2011). Synaptophysin Regulates the Kinetics of Synaptic Vesicle Endocytosis in Central Neurons. *Neuron*, 70(5), 847-854. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.001
- Kwon, Y., Tsai, L., & Crandall, J. (1999). Callosal axon guidance defects in p35^{0/0} mice. *The Journal Of Comparative Neurology*, 415(2), 218-229. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19991213)415:2<218::aid-cne6>3.0.co;2-f
- Kyziridis, T. C. (2005). Notes on the History of Schizophrenia. *German Journal of Psychiatry*, 8(3), 42–48.
- Lacoste, B., Comin, C., Ben-Zvi, A., Kaeser, P., Xu, X., Costa, L., & Gu, C. (2014). Sensory-Related Neural Activity Regulates the Structure of Vascular Networks in the Cerebral Cortex. *Neuron*, 83(5), 1117-1130. doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.034
- Langen, U., Ayloo, S., & Gu, C. (2019). Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, 35(1), 591-613. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062608
- Leber, S., Llenos, I., Miller, C., Dulay, J., Haybaeck, J., & Weis, S. (2017). Homer1a protein expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *Journal Of Neural Transmission*, 124(10), 1261-1273. doi: 10.1007/s00702-017-1776-x
- Li, A., Dubey, S., Varney, M., Dave, B., & Singh, R. (2003). IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. *The Journal Of Immunology*, 170(6), 3369-3376. doi: 10.4049/jimmunol.170.6.3369
- Lino, N., Fiore, L., Rapacioli, M., Teruel, L., Flores, V., Scicolone, G. and Sánchez, V., 2014. uPA-uPAR molecular complex is involved in cell signaling during neuronal migration and neuritogenesis. *Developmental Dynamics*, 243(5), pp.676-689.
- Lionel, A., Vaags, A., Sato, D., Gazzellone, M., Mitchell, E., & Chen, H. et al. (2013). Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Human Molecular Genetics*, 22(10), 2055-2066. doi: 10.1093/hmg/ddt056
- Lizano, P., Lutz, O., Ling, G., Padmanabhan, J., Tandon, N., & Sweeney, J. et al. (2018). VEGFA GENE variation influences hallucinations and frontotemporal morphology in psychotic disorders: a B-SNIP study. *Translational Psychiatry*, 8(1). doi: 10.1038/s41398-018-0271-y

- Lopes, R., Soares, R., Coelho, R., & Figueiredo-Braga, M. (2015). Angiogenesis in the pathophysiology of schizophrenia — A comprehensive review and a conceptual hypothesis. *Life Sciences*, 128, 79-93. doi: 10.1016/j.lfs.2015.02.010
- López-González, I., Pinacho, R., Vila, È., Escanilla, A., Ferrer, I., & Ramos, B. (2019). Neuroinflammation in the dorsolateral prefrontal cortex in elderly chronic schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*, 29(3), 384-396. doi: 10.1016/j.euroneuro.2018.12.011
- Maffioletti, E., Gennarelli, M., Magri, C., Bocchio-Chiavetto, L., Bortolomasi, M., & Bonvicini, C. et al. (2020). Genetic determinants of circulating VEGF levels in major depressive disorder and electroconvulsive therapy response. *Drug Development Research*, 81(5), 593-599. doi: 10.1002/ddr.21658
- Mani, N., Khaibullina, A., Krum, J., & Rosenstein, J. (2005). Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways. *Experimental Neurology*, 192(2), 394-406. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.12.022
- Mao, Y., Ge, X., Frank, C., Madison, J., Koehler, A., & Doud, M. et al. (2009). Disrupted in Schizophrenia 1 Regulates Neuronal Progenitor Proliferation via Modulation of GSK3 β / β -Catenin Signaling. *Cell*, 136(6), 1017-1031. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.044
- McDermott, E., & de Silva, P. (2005). Impaired neuronal glucose uptake in pathogenesis of schizophrenia – Can GLUT 1 and GLUT 3 deficits explain imaging, post-mortem and pharmacological findings?. *Medical Hypotheses*, 65(6), 1076-1081. doi: 10.1016/j.mehy.2005.06.022
- McHugo, M., Talati, P., Armstrong, K., Vandekar, S., Blackford, J., Woodward, N., & Heckers, S. (2019). Hyperactivity and Reduced Activation of Anterior Hippocampus in Early Psychosis. *American Journal Of Psychiatry*, 176(12), 1030-1038. doi: 10.1176/appi.ajp.2019.19020151
- McMahon, H., Bolshakov, V., Janz, R., Hammer, R., Siegelbaum, S., & Südhof, T. (1996). Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 93(10), 4760-4764. doi: 10.1073/pnas.93.10.4760
- Meador-Woodruff, J. (2000). Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Research Reviews*, 31(2-3), 288-294. doi: 10.1016/s0165-0173(99)00044-2
- Meirer, R., Gurunluoglu, R., & Siemionow, M. (2001). Neurogenic Perspective on Vascular Endothelial Growth Factor: Review of the Literature. *Journal Of Reconstructive Microsurgery*, 17(08), 625-630. doi: 10.1055/s-2001-18818
- Merino, P., Diaz, A., Jeanneret, V., Wu, F., Torre, E., Cheng, L. and Yepes, M., 2017. Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Binding to the uPA Receptor (uPAR) Promotes Axonal Regeneration in the Central Nervous System. *Journal of Biological Chemistry*, 292(7), pp.2741-2753.
- Merino, P., Diaz, A., Manrique, L., Cheng, L. and Yepes, M., 2018. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) promotes ezrin-mediated reorganization of the synaptic cytoskeleton in the ischemic brain. *Journal of Biological Chemistry*, 293(24), pp.9234-9247.
- Merino, P., Diaz, A., Torre, E. and Yepes, M., 2020. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) regulates the expression and function of growth-associated protein 43 (GAP-43) in the synapse. *Journal of Biological Chemistry*, 295(2), pp.619-630.

- Misiak, B., Stramecki, F., Stańczykiewicz, B., Frydecka, D., & Lubeiro, A. (2018). Vascular endothelial growth factor in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry*, 86, 24-29. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.05.005
- Naujock, M., Speidel, A., Fischer, S., Kizner, V., Dorner-Ciossek, C., & Gillardon, F. (2020). Neuronal Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells from Schizophrenia Patients in Two-Dimensional and in Three-Dimensional Cultures Reveals Increased Expression of the Kv4.2 Subunit DPP6 That Contributes to Decreased Neuronal Activity. *Stem Cells And Development*, 29(24), 1577-1587. doi: 10.1089/scd.2020.0082
- NEUHAUS, J., RISAU, W., & WOLBURG, H. (1991). Induction of Blood-Brain Barrier Characteristics in Bovine Brain Endothelial Cells by Rat Astroglial Cells in Transfilter Coculture. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 633(1 Glial-Neurona), 578-580. doi: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb15667.x
- Nguyen, M., Mushynski, W. and Julien, J., 2002. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Death & Differentiation*, 9(12), pp.1294-1306.
- Notaras, M., Lodhi, A., Dündar, F., Collier, P., Sayles, N., & Tilgner, H. et al. (2021). Schizophrenia is defined by cell-specific neuropathology and multiple neurodevelopmental mechanisms in patient-derived cerebral organoids. *Molecular Psychiatry*, 27(3), 1416-1434. doi: 10.1038/s41380-021-01316-6
- Ohshima, T., Ward, J., Huh, C., Longenecker, G., Veeranna, & Pant, H. et al. (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 93(20), 11173-11178. doi: 10.1073/pnas.93.20.11173
- Ottone, C., Krusche, B., Whitby, A., Clements, M., Quadrato, G., & Pitulescu, M. et al. (2014). Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nature Cell Biology*, 16(11), 1045-1056. doi: 10.1038/ncb3045
- Palma, V., Lim, D., Dahmane, N., Sánchez, P., Brionne, T., & Herzberg, C. et al. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*, 132(2), 335-344. doi: 10.1242/dev.01567
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., & Doetsch, F. (2011). Eyes Wide Open: A Critical Review of Sphere-Formation as an Assay for Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 8(5), 486-498. doi: 10.1016/j.stem.2011.04.007
- Patel, K. R., Cherian, J., Gohil, K., & Atkinson, D. (2014). Schizophrenia: overview and treatment options. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 39(9), 638-645.
- Pillai, A., Howell, K., Ahmed, A., Weinberg, D., Allen, K., & Bruggemann, J. et al. (2015). Association of serum VEGF levels with prefrontal cortex volume in schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 21(5), 686-692. doi: 10.1038/mp.2015.96
- Pollen, A., Nowakowski, T., Shuga, J., Wang, X., Leyrat, A., & Lui, J. et al. (2014). Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nature Biotechnology*, 32(10), 1053-1058. doi: 10.1038/nbt.2967

- Pong, S., Lizano, P., & Karmacharya, R. (2020). Investigating Blood-Brain Barrier Dysfunction in Schizophrenia Using Brain Microvascular Endothelial Cells Derived From Patient-Specific Stem Cells. *Biological Psychiatry*, 87(9), S189-S190. doi: 10.1016/j.biopsych.2020.02.495
- Puvogel, S., Blanchard, K., Casas, B., Miller, R., Garrido-Jara, D., & Arizabalos, S. et al. (2022). Altered resting-state functional connectivity in hiPSCs-derived neuronal networks from schizophrenia patients. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, 10. doi: 10.3389/fcell.2022.935360
- Rafii, S., Butler, J., & Ding, B. (2016). Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature*, 529(7586), 316-325. doi: 10.1038/nature17040
- Ramírez-Castillejo, C., Sánchez-Sánchez, F., Andreu-Agulló, C., Ferrón, S., Aroca-Aguilar, J., & Sánchez, P. et al. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nature Neuroscience*, 9(3), 331-339. doi: 10.1038/nn1657
- Ramos-Miguel, A., Meana, J., & García-Sevilla, J. (2013). Cyclin-dependent kinase-5 and p35/p25 activators in schizophrenia and major depression prefrontal cortex: basal contents and effects of psychotropic medications. *International Journal Of Neuropsychopharmacology*, 16(3), 683-689. doi: 10.1017/s1461145712000879
- Rangaraju, V., Calloway, N., & Ryan, T. (2014). Activity-Driven Local ATP Synthesis Is Required for Synaptic Function. *Cell*, 156(4), 825-835. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.042
- Räsänen, N., Tiihonen, J., Koskivi, M., Lehtonen, Š, & Koistinaho, J. (2022). The iPSC perspective on schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, 45(1), 8-26. doi:10.1016/j.tins.2021.11.002
- Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Strobel, A., Lauer, M., Schmitt, A., & Lesch, K. (2006). Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Molecular Psychiatry*, 11(5), 514-522. doi: 10.1038/sj.mp.4001791
- Reinhard, S., Razak, K., & Ethell, I. (2015). A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 9. doi: 10.3389/fncel.2015.00280
- Ribolsi, M., Daskalakis, Z., Siracusano, A., & Koch, G. (2014). Abnormal Asymmetry of Brain Connectivity in Schizophrenia. *Frontiers In Human Neuroscience*, 8. doi: 10.3389/fnhum.2014.01010
- Richiardi, J., Altmann, A., Milazzo, A., Chang, C., Chakravarty, M., & Banaschewski, T. et al. (2015). Correlated gene expression supports synchronous activity in brain networks. *Science*, 348(6240), 1241-1244. doi: 10.1126/science.1255905
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671-674. doi: 10.1038/386671a0
- Rocher, A., Chapon, F., Blaizot, X., Baron, J., & Chavoix, C. (2003). Resting-state brain glucose utilization as measured by PET is directly related to regional synaptophysin levels: a study in baboons. *Neuroimage*, 20(3), 1894-1898. doi: 10.1016/j.neuroimage.2003.07.002
- ROSENSTEIN, J. (2004). New roles for VEGF in nervous tissue?beyond blood vessels. *Experimental Neurology*, 187(2), 246-253. doi: 10.1016/j.expneurol.2004.01.022
- RUBIN, L., BARBU, K., BARD, F., CANNON, C., HALL, D., & HORNER, H. et al. (1991). Differentiation of Brain Endothelial Cells in Cell Culture. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 633(1 Glial-Neurona), 420-425. doi: 10.1111/j.1749-6632.1991.tb15631.x

- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., & Fujisawa, H. et al. (2002). Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes & Development*, 16(20), 2684-2698. doi: 10.1101/gad.242002
- Sadeh, S., & Clopath, C. (2021). Excitatory-inhibitory balance modulates the formation and dynamics of neuronal assemblies in cortical networks. *Science Advances*, 7(45). doi: 10.1126/sciadv.abg8411
- Sagheer, U., Gong, J., & Chung, C. (2015). Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) is a Determinant of Stem Cell Fate: Lessons from an Ultra-Rare Disease. *Journal Of Developmental Biology*, 3(4), 112-128. doi: 10.3390/jdb3040112
- Sawada, T., Chater, T., Sasagawa, Y., Yoshimura, M., Fujimori-Tonou, N., & Tanaka, K. et al. (2020). Developmental excitation-inhibition imbalance underlying psychoses revealed by single-cell analyses of discordant twins-derived cerebral organoids. *Molecular Psychiatry*, 25(11), 2695-2711. doi: 10.1038/s41380-020-0844-z
- Schindewolf, C., Kim, D., Bel, A., & Rotstein, H. G. (2016). Complex patterns in networks of hyperexcitable neurons. *Theoretical Computer Science*, 633, 71-82. doi:10.1016/j.tcs.2015.05.051
- Schmitt, U., Tanimoto, N., Seeliger, M., Schaeffel, F., & Leube, R. (2009). Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience*, 162(2), 234-243. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.04.046
- Semina, E., Rubina, K., Sysoeva, V., Rysenkova, K., Klimovich, P., Plekhanova, O. and Tkachuk, V., 2016. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching. *European Journal of Cell Biology*, 95(9), pp.295-310.
- Shen, F., Song, C., Liu, Y., Zhang, J., & Wei Song, S. (2019). IGFBP2 promotes neural stem cell maintenance and proliferation differentially associated with glioblastoma subtypes. *Brain Research*, 1704, 174-186. doi: 10.1016/j.brainres.2018.10.018
- Shen, Q., Goderie, S., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., & Abramova, N. et al. (2004). Endothelial Cells Stimulate Self-Renewal and Expand Neurogenesis of Neural Stem Cells. *Science*, 304(5675), 1338-1340. doi: 10.1126/science.1095505
- Shen, Y., Tsai, H., Ruan, J., Liao, Y., Chen, S., & Chen, C. (2012). Genetic and functional analyses of the gene encoding synaptophysin in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 137(1-3), 14-19. doi: 10.1016/j.schres.2012.01.028
- Shetty, P., Galeffi, F., & Turner, D. (2012). Cellular Links between Neuronal Activity and Energy Homeostasis. *Frontiers In Pharmacology*, 3. doi: 10.3389/fphar.2012.00043
- Shi, Y., Kirwan, P., & Livesey, F. J. (2012). Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nature Protocols*, 7(10), 1836-1846. doi:10.1038/nprot.2012.116
- Shigemori, Y., Katayama, Y., Mori, T., Maeda, T., & Kawamata, T. Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Brain Edema XIII*, 130-133. doi: 10.1007/3-211-30714-1_29
- Shin, Y., Yang, K., Han, S., Park, H., Seok Heo, Y., Cho, S., & Chung, S. (2014). Reconstituting Vascular Microenvironment of Neural Stem Cell Niche in Three-Dimensional Extracellular Matrix. *Advanced Healthcare Materials*, 3(9), 1457-1464. doi: 10.1002/adhm.201300569

- Sil, S., Periyasamy, P., Thangaraj, A., Chivero, E., & Buch, S. (2018). PDGF/PDGFR axis in the neural systems. *Molecular Aspects Of Medicine*, 62, 63-74. doi: 10.1016/j.mam.2018.01.006
- Soeda, S., Imatoh, T., Ochiai, T., Koyanagi, S., & Shimeno, H. (2004). Plasminogen activator inhibitor-1 aids survival of neurites on neurons derived from pheochromocytoma (PC-12) cells. *Neuroreport*, 15(5), 855-858. doi: 10.1097/00001756-200404090-00024
- Soeda, S., Oda, M., Ochiai, T., & Shimeno, H. (2001). Deficient release of plasminogen activator inhibitor-1 from astrocytes triggers apoptosis in neuronal cells. *Molecular Brain Research*, 91(1-2), 96-103. doi: 10.1016/s0169-328x(01)00133-4
- Sofroniew, M., & Vinters, H. (2009). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8
- Spencer, K. (2009). The functional consequences of cortical circuit abnormalities on gamma oscillations in schizophrenia: insights from computational modeling. *Frontiers In Human Neuroscience*, 3. doi: 10.3389/neuro.09.033.2009
- Srikanth, P., Lagomarsino, V., Muratore, C., Ryu, S., He, A., & Taylor, W. et al. (2018). Shared effects of DISC1 disruption and elevated WNT signaling in human cerebral organoids. *Translational Psychiatry*, 8(1). doi: 10.1038/s41398-018-0122-x
- Stachowiak, E., Benson, C., Narla, S., Dimitri, A., Chuye, L., & Dhiman, S. et al. (2017). Cerebral organoids reveal early cortical maldevelopment in schizophrenia—computational anatomy and genomics, role of FGFR1. *Translational Psychiatry*, 7(11). doi: 10.1038/s41398-017-0054-x
- Steidinger, T., Standaert, D., & Yacoubian, T. (2010). A neuroprotective role for angiogenin in models of Parkinson's disease. *Journal Of Neurochemistry*, 116(3), 334-341. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07112.x
- Stenman, J., Rajagopal, J., Carroll, T., Ishibashi, M., McMahon, J., & McMahon, A. (2008). Canonical Wnt Signaling Regulates Organ-Specific Assembly and Differentiation of CNS Vasculature. *Science*, 322(5905), 1247-1250. doi: 10.1126/science.1164594
- Stępnicki, P., Kondej, M., & Kaczor, A. (2018). Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. *Molecules*, 23(8), 2087. doi: 10.3390/molecules23082087
- Stevens, A., Ahmed, U., Vigneswara, V., & Ahmed, Z. (2019). Pigment Epithelium-Derived Factor Promotes Axon Regeneration and Functional Recovery After Spinal Cord Injury. *Molecular Neurobiology*, 56(11), 7490-7507. doi: 10.1007/s12035-019-1614-2
- Subramanian, V., & Feng, Y. (2007). A new role for angiogenin in neurite growth and pathfinding: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 16(12), 1445-1453. doi: 10.1093/hmg/ddm095
- Südhof, T. (2018). Towards an Understanding of Synapse Formation. *Neuron*, 100(2), 276-293. doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.040
- Südhof, T., & Malenka, R. (2008). Understanding Synapses: Past, Present, and Future. *Neuron*, 60(3), 469-476. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.011
- Summaria, L., Hsieh, B. and Robbins, K., 1967. The Specific Mechanism of Activation of Human Plasminogen to Plasmin. *Journal of Biological Chemistry*, 242(19), pp.4279-4283.

- Susser, E., & St Clair, D. (2013). Prenatal famine and adult mental illness: Interpreting concordant and discordant results from the Dutch and Chinese Famines. *Social Science & Medicine*, 97, 325-330. doi: 10.1016/j.socscimed.2013.02.049
- Szabo, A., Akkouh, I., Vandenberghe, M., Osete, J., Hughes, T., & Heine, V. et al. (2021). A human iPSC-astroglia neurodevelopmental model reveals divergent transcriptomic patterns in schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 11(1). doi: 10.1038/s41398-021-01681-4
- 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. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tarsa, L., & Goda, Y. (2002). Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99(2), 1012-1016. doi: 10.1073/pnas.022575999
- Thirumangalakudi, L., Yin, L., Rao, H., & Grammas, P. (2007). IL-8 Induces Expression of Matrix Metalloproteinases, Cell Cycle and Pro-Apoptotic Proteins, and Cell Death in Cultured Neurons. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 11(3), 305-311. doi: 10.3233/jad-2007-11307
- Topol, A., English, J., Flaherty, E., Rajarajan, P., Hartley, B., & Gupta, S. et al. (2015). Increased abundance of translation machinery in stem cell-derived neural progenitor cells from four schizophrenia patients. *Translational Psychiatry*, 5(10), e662-e662. doi: 10.1038/tp.2015.118
- Topol, A., Zhu, S., Tran, N., Simone, A., Fang, G., & Brennand, K. (2015). Altered WNT Signaling in Human Induced Pluripotent Stem Cell Neural Progenitor Cells Derived from Four Schizophrenia Patients. *Biological Psychiatry*, 78(6), e29-e34. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.12.028
- Trindade, P., Casas, B., Monteverde Faundez, T., Gasparotto, J., Tiefensee Ribeiro, C., & DeValle, S. et al. (2022). Induced pluripotent stem cell-derived astrocytes from patients with schizophrenia exhibit an inflammatory phenotype that affects vascularization. *Biorxiv*. doi: doi: <https://doi.org/10.1101/2022.03.07.483024>
- Trubetskoy, V., Pardiñas, A., Qi, T., Panagiotaropoulou, G., Awasthi, S., & Bigdeli, T. et al. (2022). Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature*, 604(7906), 502-508. doi: 10.1038/s41586-022-04434-5
- Turner, R., & Sharp, F. (2016). Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 10. doi: 10.3389/fncel.2016.00056
- Van De Vijver, S., Missault, S., Van Soom, J., Van Der Veken, P., Augustyns, K., Joossens, J., Dedeurwaerdere, S. and Giugliano, M., 2019. The effect of pharmacological inhibition of Serine Proteases on neuronal networks in vitro. *PeerJ*, 7, p.e6796.
- Vértes, P., Rittman, T., Whitaker, K., Romero-Garcia, R., Váša, F., & Kitzbichler, M. et al. (2016). Gene transcription profiles associated with inter-modular hubs and connection distance in human functional magnetic resonance imaging networks. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1705), 20150362. doi: 10.1098/rstb.2015.0362
- Vicente P, B., Rioseco S, P., Saldivia B, S., Kohn, R., & Torres P, S. (2002). Estudio chileno de prevalencia de patología psiquiátrica (DSM-III-R/CIDI) (ECP). *Revista Médica De Chile*, 130(5). doi: 10.4067/s0034-98872002000500007

- Volterra, A., & Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(8), 626-640. doi: 10.1038/nrn1722
- Walton, N., Zhou, Y., Kogan, J., Shin, R., Webster, M., & Gross, A. et al. (2012). Detection of an immature dentate gyrus feature in human schizophrenia/bipolar patients. *Translational Psychiatry*, 2(7), e135-e135. doi: 10.1038/tp.2012.56
- Wasser, C. and Herz, J., 2017. Reelin: Neurodevelopmental Architect and Homeostatic Regulator of Excitatory Synapses. *Journal of Biological Chemistry*, 292(4), pp.1330-1338.
- Watts, M., Pocock, R., & Claudianos, C. (2018). Brain Energy and Oxygen Metabolism: Emerging Role in Normal Function and Disease. *Frontiers In Molecular Neuroscience*, 11. doi: 10.3389/fnmol.2018.00216
- Weidenfeller, C., Svendsen, C., & Shusta, E. (2007). Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood?brain barrier properties. *Journal Of Neurochemistry*, 101(2), 555-565. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04394.x
- Whiteus, C., Freitas, C., & Grutzendler, J. (2013). Perturbed neural activity disrupts cerebral angiogenesis during a postnatal critical period. *Nature*, 505(7483), 407-411. doi: 10.1038/nature12821
- Whitfield-Gabrieli, S., Thermenos, H., Milanovic, S., Tsuang, M., Faraone, S., & McCarley, R. et al. (2009). Hyperactivity and hyperconnectivity of the default network in schizophrenia and in first-degree relatives of persons with schizophrenia. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 106(4), 1279-1284. doi: 10.1073/pnas.0809141106
- Wolburg, H., Noell, S., Wolburg-Buchholz, K., Mack, A., & Fallier-Becker, P. (2009). Agrin, Aquaporin-4, and Astrocyte Polarity as an Important Feature of the Blood-Brain Barrier. *The Neuroscientist*, 15(2), 180-193. doi: 10.1177/1073858408329509
- Wu, D. C., Yu, Y. P., Lee, N. T., Yu, A. C., Wang, J. H., & Han, Y. F. (2000). The expression of Cdk5, p35, p39, and Cdk5 kinase activity in developing, adult, and aged rat brains. *Neurochemical research*, 25(7), 923-929. <https://doi.org/10.1023/a:1007544106645>
- Wu, K., Lv, L., Lei, Y., Qian, C., & Sun, F. (2019). Endothelial cells promote excitatory synaptogenesis and improve ischemia-induced motor deficits in neonatal mice. *Neurobiology Of Disease*, 121, 230-239. doi: 10.1016/j.nbd.2018.10.006
- Wu, K., Mo, J., Kou, Z., Liu, Q., Lv, L., Lei, Y., & Sun, F. (2017). Neurovascular Interaction Promotes the Morphological and Functional Maturation of Cortical Neurons. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 11. doi: 10.3389/fncel.2017.00290
- Yamamoto, K., Kuriu, T., Matsumura, K., Nagayasu, K., Tsurusaki, Y., & Miyake, N. et al. (2021). Multiple alterations in glutamatergic transmission and dopamine D2 receptor splicing in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with familial schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 11(1). doi: 10.1038/s41398-021-01676-1
- Yao, J., Mu, Y., & Gage, F. (2012). Neural stem cells: mechanisms and modeling. *Protein & Cell*, 3(4), 251-261. doi: 10.1007/s13238-012-2033-6
- Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E., Bugge, T., Strickland, D. and Lawrence, D., 2003. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *Journal of Clinical Investigation*, 112(10), pp.1533-1540.

- Yu, D., Di Giorgio, F., Yao, J., Marchetto, M., Brennand, K., & Wright, R. et al. (2014). Modeling Hippocampal Neurogenesis Using Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 3(1), 217. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.06.015
- Zandstra, P., Le, H., Daley, G., Griffith, L., & Lauffenburger, D. (2000). Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation. *Biotechnology And Bioengineering*, 69(6), 607-617. doi: 10.1002/1097-0290(20000920)69:6<607::aid-bit4>3.0.co;2-f
- Zhang, C., Cai, H., Xu, X., Li, Q., Li, X., & Zhao, W. et al. (2021). Genetic Architecture Underlying Differential Resting-state Functional Connectivity of Subregions Within the Human Visual Cortex. *Cerebral Cortex*, 32(10), 2063-2078. doi: 10.1093/cercor/bhab335
- Zhang, S., Wang, J., Gao, G., Parke, K., & Ma, J. (2006). Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *Journal Of Molecular Endocrinology*, 37(1), 1-12. doi: 10.1677/jme.1.02008
- Zhang, X., Xie, Y., Tang, J., Qin, W., Liu, F., & Ding, H. et al. (2021). Dissect Relationships Between Gene Co-expression and Functional Connectivity in Human Brain. *Frontiers In Neuroscience*, 15. doi: 10.3389/fnins.2021.797849
- Zhao, X., & Moore, D. (2017). Neural stem cells: developmental mechanisms and disease modeling. *Cell And Tissue Research*, 371(1), 1-6. doi: 10.1007/s00441-017-2738-1
- Zhu, D., Yuan, T., Gao, J., Xu, Q., Xue, K., & Zhu, W. et al. (2021). Correlation between cortical gene expression and resting-state functional network centrality in healthy young adults. *Human Brain Mapping*, 42(7), 2236-2249. doi: 10.1002/hbm.25362
- Zhuo, C., Zhu, J., Qin, W., Qu, H., Ma, X., & Tian, H. et al. (2014). Functional connectivity density alterations in schizophrenia. *Frontiers In Behavioral Neuroscience*, 8. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00404
- Zonta, M., Angulo, M., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2002). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience*, 6(1), 43-50. doi: 10.1038/n

BIBLIOGRAFÍA TABLAS

1. Egbujo, C., Sinclair, D., & Hahn, C. (2016). Dysregulations of Synaptic Vesicle Trafficking in Schizophrenia. *Current Psychiatry Reports*, 18(8). doi: 10.1007/s11920-016-0710-5
2. de Jonge, J., Vinkers, C., Hulshoff Pol, H., & Marsman, A. (2017). GABAergic Mechanisms in Schizophrenia: Linking Postmortem and In Vivo Studies. *Frontiers In Psychiatry*, 8. doi: 10.3389/fpsy.2017.00118
3. Leber, S., Llenos, I., Miller, C., Dulay, J., Haybaeck, J., & Weis, S. (2017). Homer1a protein expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *Journal Of Neural Transmission*, 124(10), 1261-1273. doi: 10.1007/s00702-017-1776-x
4. Meador-Woodruff, J. (2000). Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Research Reviews*, 31(2-3), 288-294. doi: 10.1016/s0165-0173(99)00044-2
5. Lionel, A., Vaags, A., Sato, D., Gazzellone, M., Mitchell, E., & Chen, H. et al. (2013). Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Human Molecular Genetics*, 22(10), 2055-2066. doi: 10.1093/hmg/ddt056
6. Ramos-Miguel, A., Meana, J., & García-Sevilla, J. (2013). Cyclin-dependent kinase-5 and p35/p25 activators in schizophrenia and major depression prefrontal cortex: basal contents and effects of psychotropic medications. *International Journal Of Neuropsychopharmacology*, 16(3), 683-689. doi: 10.1017/s1461145712000879
7. Ishii, K., Kubo, K., & Nakajima, K. (2016). Reelin and Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 10. doi: 10.3389/fncel.2016.00229
8. Eastwood, S., Law, A., Everall, I., & Harrison, P. (2003). The axonal chemorepellant semaphorin 3A is increased in the cerebellum in schizophrenia and may contribute to its synaptic pathology. *Molecular Psychiatry*, 8(2), 148-155. doi: 10.1038/sj.mp.4001233
9. McDermott, E., & de Silva, P. (2005). Impaired neuronal glucose uptake in pathogenesis of schizophrenia – Can GLUT 1 and GLUT 3 deficits explain imaging, post-mortem and pharmacological findings?. *Medical Hypotheses*, 65(6), 1076-1081. doi: 10.1016/j.mehy.2005.06.022
10. Kumar, A., Pareek, V., Singh, H., Faiq, M., Narayan, R., Raza, K., & Kumar, P. (2019). Altered Expression of a Unique Set of Genes Reveals Complex Etiology of Schizophrenia. *Frontiers In Psychiatry*, 10. doi: 10.3389/fpsy.2019.00906
11. Reinhard, S., Razak, K., & Ethell, I. (2015). A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers In Cellular Neuroscience*, 9. doi: 10.3389/fncel.2015.00280
12. Al Ahmad, A., Lee, B., Stack, J., Parham, C., Campbell, J., & Clarke, D. et al. (2010). Endostatin binds nerve growth factor and thereby inhibits neurite outgrowth and neuronal migration in-vitro. *Brain Research*, 1360, 28-39. doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.023
13. Subramanian, V., & Feng, Y. (2007). A new role for angiogenin in neurite growth and pathfinding: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 16(12), 1445-1453. doi: 10.1093/hmg/ddm095
14. Sil, S., Periyasamy, P., Thangaraj, A., Chivero, E., & Buch, S. (2018). PDGF/PDGFR axis in the neural systems. *Molecular Aspects Of Medicine*, 62, 63-74. doi: 10.1016/j.mam.2018.01.006
15. Fruttiger, M., Karlsson, L., Hall, A., Abramsson, A., Calver, A., & Bostrom, H. et al. (1999). Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development*, 126(3), 457-467. doi: 10.1242/dev.126.3.457
16. Kelland, E., Gilmore, W., Weiner, L., & Lund, B. (2011). The dual role of CXCL8 in human CNS stem cell function: Multipotent neural stem cell death and oligodendrocyte progenitor cell chemotaxis. *Glia*, 59(12), 1864-1878. doi: 10.1002/glia.21230

17. Thirumangalakudi, L., Yin, L., Rao, H., & Grammas, P. (2007). IL-8 Induces Expression of Matrix Metalloproteinases, Cell Cycle and Pro-Apoptotic Proteins, and Cell Death in Cultured Neurons. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 11(3), 305-311. doi: 10.3233/jad-2007-11307
18. Shen, F., Song, C., Liu, Y., Zhang, J., & Wei Song, S. (2019). IGFBP2 promotes neural stem cell maintenance and proliferation differentially associated with glioblastoma subtypes. *Brain Research*, 1704, 174-186. doi: 10.1016/j.brainres.2018.10.018
19. Baker, N., Carlo Russo, V., Bernard, O., D'Ercole, A., & Werther, G. (1999). Interactions between Bcl-2 and the IGF system control apoptosis in the developing mouse brain. *Developmental Brain Research*, 118(1-2), 109-118. doi: 10.1016/s0165-3806(99)00136-4
20. Andres, R., Choi, R., Pendharkar, A., Gaeta, X., Wang, N., & Nathan, J. et al. (2011). The CCR2/CCL2 Interaction Mediates the Transendothelial Recruitment of Intravascularly Delivered Neural Stem Cells to the Ischemic Brain. *Stroke*, 42(10), 2923-2931. doi: 10.1161/strokeaha.110.606368
21. Czekay, R., Wilkins-Port, C., Higgins, S., Freytag, J., Overstreet, J., & Klein, R. et al. (2011). PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *International Journal Of Cell Biology*, 2011, 1-9. doi: 10.1155/2011/562481
22. Soeda, S., Imatoh, T., Ochiai, T., Koyanagi, S., & Shimeno, H. (2004). Plasminogen activator inhibitor-1 aids survival of neurites on neurons derived from pheochromocytoma (PC-12) cells. *Neuroreport*, 15(5), 855-858. doi: 10.1097/00001756-200404090-00024
23. Sagheer, U., Gong, J., & Chung, C. (2015). Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) is a Determinant of Stem Cell Fate: Lessons from an Ultra-Rare Disease. *Journal Of Developmental Biology*, 3(4), 112-128. doi: 10.3390/jdb3040112
24. Houenou, L., D'Costa, A., Li, L., Turgeon, V., Enyadike, C., Alberdi, E., & Becerra, S. (1999). Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *The Journal Of Comparative Neurology*, 412(3), 506-514. doi: PMID: 10441236
25. Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X., Xie, L., & Greenberg, D. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 99(18), 11946-11950. doi: 10.1073/pnas.182296499
26. Jin, K., Mao, X., & Greenberg, D. (2000). Vascular endothelial growth factor: Direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 97(18), 10242-10247. doi: 10.1073/pnas.97.18.10242
27. Lino, N., Fiore, L., Rapacioli, M., Teruel, L., Flores, V., Scicolone, G. and Sánchez, V., 2014. uPA-uPAR molecular complex is involved in cell signaling during neuronal migration and neuritogenesis. *Developmental Dynamics*, 243(5), pp.676-689.
28. Merino, P., Diaz, A., Manrique, L., Cheng, L. and Yepes, M., 2018. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) promotes ezrin-mediated reorganization of the synaptic cytoskeleton in the ischemic brain. *Journal of Biological Chemistry*, 293(24), pp.9234-9247.
29. Van De Vijver, S., Missault, S., Van Soom, J., Van Der Veken, P., Augustyns, K., Joossens, J., Dedeurwaerdere, S. and Giugliano, M., 2019. The effect of pharmacological inhibition of Serine Proteases on neuronal networks in vitro. *PeerJ*, 7, p.e6796.
30. Semina, E., Rubina, K., Sysoeva, V., Rysenkova, K., Klimovich, P., Plekhanova, O. and Tkachuk, V., 2016. Urokinase and urokinase receptor participate in regulation of neuronal migration, axon growth and branching. *European Journal of Cell Biology*, 95(9), pp.295-310.

ANEXO

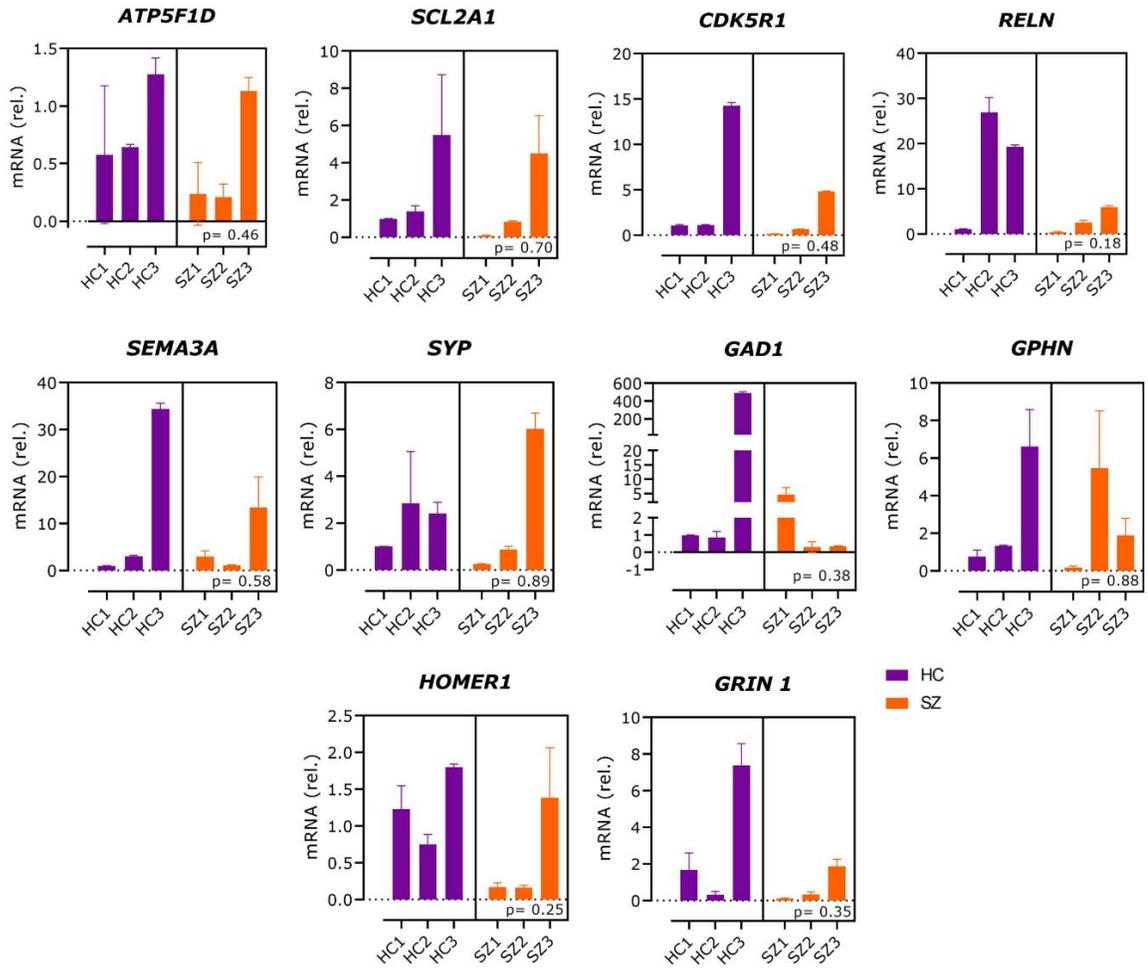


Figura 13. No hay diferencias en la expresión génica de transcritos claves en el proceso de maduración neuronal a los 30 días de cultivo para neuronas SZ y HC. Los gráficos presentan el promedio de los niveles relativos de mRNA (\pm D.E.) para cada cultivo celular derivado de cada donante, por grupo, a los 30 días de cultivo neuronal. HC (morado) y SZ (naranja). Significancia estadística calculada por t test anidado, $p < 0.05$.

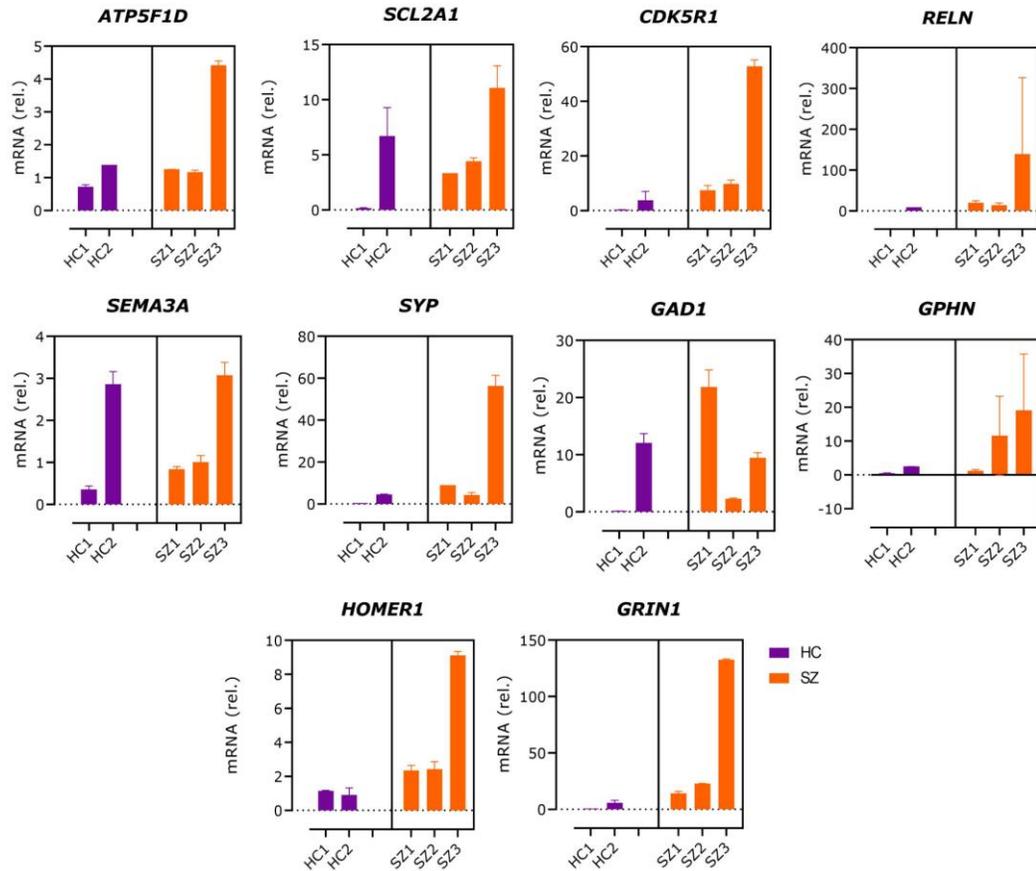


Figura 14. No hay diferencias en la expresión génica para los transcritos seleccionados a los 90 días de cultivo para neuronas SZ y HC. Los gráficos presentan el promedio de los niveles relativos de mRNA (\pm D.E.) para cada cultivo celular derivado de cada donante, por grupo, a los 90 días de cultivo neuronal. HC (morado) y SZ (naranja). Significancia estadística calculada por t test anidado, $p < 0.05$.

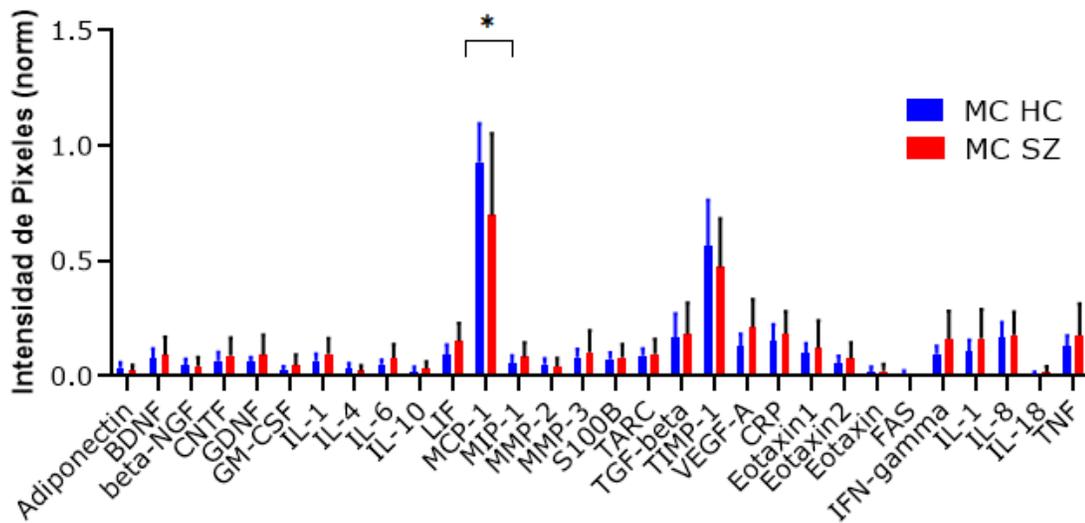


Figura 15. El secretoma de cultivos neuronales SZ de 70 días presenta bajos niveles de MCP-1.

El gráfico muestra los niveles de las 30 proteínas (especificadas en eje X) según la intensidad de píxeles (eje Y). Las barras corresponden al promedio de cada grupo (\pm D.E.). Significancia estadística calculada por Anova de dos vías seguido por prueba de comparaciones múltiples Holm Sidak's, $p < 0.05$.

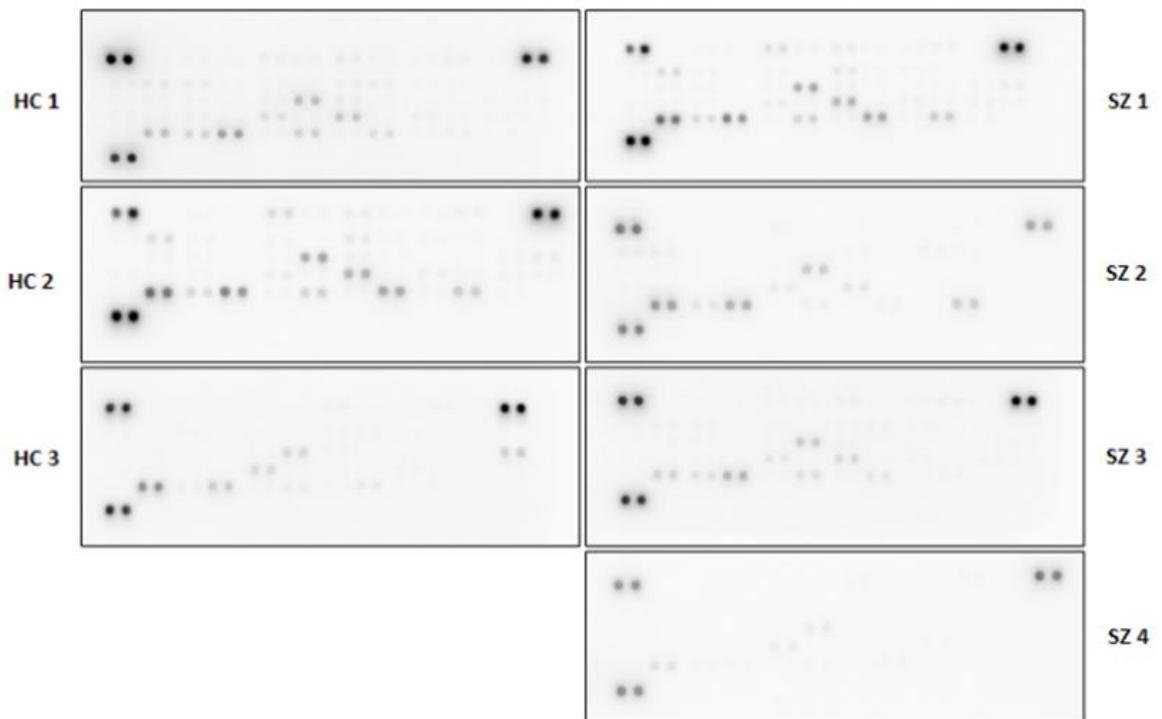


Figura 16. Las membranas, representativas de los proteomas angiogénicos para secretomas individuales, de los diferentes cultivos neuronales de 70 días presentan patrones de expresión similares. Se presentan las fotos utilizadas para definir los niveles de proteína en el secretoma de cultivos neuronales, entre 70-72 días de cultivo. Cada membrana presentada, corresponde a un donante por grupo, identificados en la tabla 1.

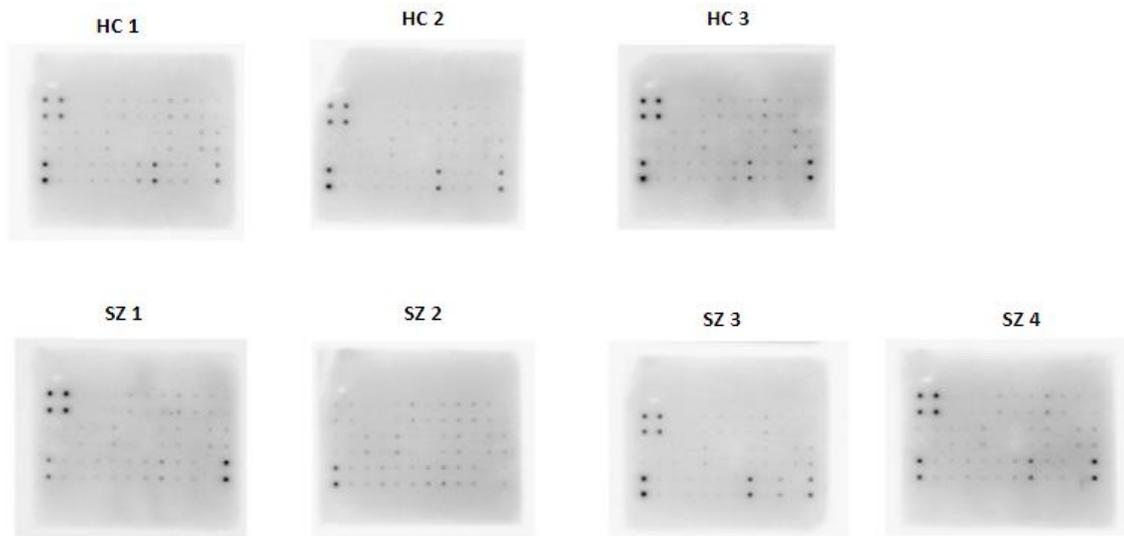


Figura 17. Las membranas de proteoma neurogénico para cada uno de los secretomas de los cultivos neuronales de 70 días ensayados presentan patrones de expresión similares. Se presentan las fotos utilizadas para definir los niveles de proteína en el secretoma de cultivos neuronales entre 70-72 días de cultivo. Cada membrana presentada, corresponde a un donante por grupo, identificados en la tabla 1.