

# 46077750:TFG\_ÀngelaNatividad .docx

*por* Àngela Natividad I Mateu

---

**Fecha de entrega:** 14-jul-2023 05:00p.m. (UTC+0200)

**Identificador de la entrega:** 2131070742

**Nombre del archivo:** ts\_86f36a10-029d-458b-9557-d1fae1c38259\_TFG\_\_ngelaNatividad.docx (12.12M)

**Total de palabras:** 17058

**Total de caracteres:** 94617



UNIVERSITAT  
POLITÀCNICA  
DE VALÈNCIA

**INCLIVA | VLC**  
Instituto de Investigación Sanitaria



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agrònica  
i del Medi Natural

Universitat Politècnica de València

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrònica i del Medi  
Natural (ETSIAMN)

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

# **El neuroepitelio olfativo como modelo celular para el estudio de la neurobiología de la esquizofrenia**

CURSO ACADÉMICO 2022/2023

Trabajo presentado por Àngela Natividad i Mateu

**Tutor académico:** Prof. Dra. Rosa Porcel

**Tutor experimental:** Dra. Olga Rivero Martín

Valencia, julio de 2023

**Título:** El neuroepitelio olfativo como modelo celular para el estudio de la neurobiología de la esquizofrenia

**Autora:** Àngela Natividad i Mateu

**Localidad y fecha:** Valencia, julio de 2023

**Tutor académico:** Prof. Dra. Rosa Porcel

**Tutor experimental:** Dra. Olga Rivero Martín

**Resumen (Versión español):**

La esquizofrenia es un trastorno mental crónico con una prevalencia mundial de alrededor del 1%. Clínicamente, la esquizofrenia se caracteriza por la presencia de síntomas positivos (alucinaciones, delirios), síntomas negativos (disminución de la expresión emocional) y déficits cognitivos. Pese a que los primeros síntomas del trastorno aparecen durante la adolescencia, no es hasta años más tarde con la aparición de los primeros episodios psicóticos que el diagnóstico se vuelve evidente. Actualmente, estos trastornos se detectan y clasifican solo mediante evaluación clínica (entrevistas semi-estructuradas) basada en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. Por otro lado, un 30% de los pacientes que reciben la medicación no responden al tratamiento. Por tanto, se están haciendo muchos esfuerzos para caracterizar biomarcadores con el fin de permitir pruebas biológicas para el diagnóstico, predicción de respuesta al tratamiento y evolución del trastorno, así como para la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. La dificultad del estudio de biomarcadores en los trastornos mentales recae en razones éticas debido a la dificultad de obtener células neuronales del sistema nervioso central de los propios pacientes. En consecuencia, muchas investigaciones se han realizado en tejidos periféricos que, aunque presentan una mayor accesibilidad, tienen el inconveniente de derivar de líneas no-neuronales. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar modelos neuronales adecuados que permitan el estudio de este trastorno. El neuroepitelio olfativo es un tejido rico en células madre, que se diferencia a neuronas inmaduras. Debido a su localización periférica, es relativamente sencillo de tomar muestras, por lo tanto, adecuado para realizar cultivo y propagación *in vitro*. De hecho, ya se han realizado algunos estudios con precursores neuronales procedentes del neuroepitelio olfativo que muestran alteraciones en pacientes psiquiátricos.

En este proyecto, se propone caracterizar las células del neuroepitelio olfativo para determinar si son adecuadas como modelo de estudio de la esquizofrenia. Los objetivos incluyen verificar el fenotipo neuronal de estas células mediante análisis de expresión génica de marcadores neuronales, estudiar su morfología por inmunofluorescencia usando  $\beta$ -tubulina III (reconoce tubulina específica de neuronas), evaluar la estabilidad de la línea celular, analizar la expresión de genes asociados con el riesgo de esquizofrenia y evaluar el efecto del antipsicótico paliperidona sobre la expresión de genes relacionados con el riesgo a desarrollar esquizofrenia. Este proyecto cumple con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 3, salud y bienestar, pues busca mejorar la calidad de vida de los pacientes con esquizofrenia. Los resultados obtenidos indicaron que las células neuroepiteliales muestran un fenotipo neuronal al expresar marcadores neuronales, ser reconocidas por el anticuerpo anti- $\beta$ III-tubulina y presentar estructuras citoesqueléticas típicas del proceso de neuritogénesis como lamelipodios y neuritas. Además, expresan genes asociados con el riesgo de esquizofrenia, aunque no se observó ningún efecto del antipsicótico paliperidona en la expresión de estos genes. En general, los resultados respaldan que el cultivo *in vitro* de precursores neurales obtenidos de la cavidad nasal constituye un buen modelo experimental para estudiar la fisiopatología de la esquizofrenia.

**Palabras clave:** esquizofrenia; expresión génica; genes de riesgo; neuroepitelio olfativo; células neuroepiteliales; cultivo celular; paliperidona

#### **Resumen (Versión inglés):**

Schizophrenia is a chronic mental disorder with a worldwide prevalence of around 1%. Clinically, schizophrenia is characterized by the presence of positive symptoms (hallucinations, delusions), negative symptoms (decreased emotional expression), and cognitive deficits. Although the first symptoms of the disorder appear during adolescence, it is not until years later with the appearance of the first psychotic episodes that the diagnosis becomes evident. Currently, these disorders are detected and classified only through clinical assessment (semi-structured interviews) based on the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. On the other hand, 30% of patients who receive medication do not respond to treatment. Therefore, many efforts are being made to characterize biomarkers to allow biological tests for diagnosis, prediction of response to treatment and trajectory of the disorder, as well as for the search for new therapeutic targets. The difficulty of studying biomarkers in mental disorders lies in ethical reasons due to the difficulty of obtaining neuronal cells from the central nervous system of the patients themselves. Consequently, many investigations have been carried out in peripheral



tissues. However, although these tissues present greater accessibility, they have the drawback of being derived from non-neuronal lines. Therefore, there is a need to develop adequate neural models that allow the study of this disorder. In this regard, the olfactory neuroepithelium is a tissue rich in stem cells, which differentiates into immature neurons. Due to its peripheral location, it is relatively easy to sample, therefore suitable for *in vitro* culture and propagation. In fact, some studies have already been carried out with neuronal precursors from the olfactory neuroepithelium that show alterations in psychiatric patients.

In this project, it is proposed to characterize the cells of the olfactory neuroepithelium to determine if they are suitable as a model for the study of schizophrenia. The objectives include the verification of their neuronal phenotype by means of gene expression analysis of neuronal biomarkers, morphological analysis by immunofluorescence using  $\beta$ -tubulin III as a neuron-specific tubulin, evaluation of the cell line stability, as well as the evaluation of the effect of the antipsychotic paliperidone on the expression of genes related to the risk of developing schizophrenia. This project meets the Sustainable Development Goal (SDG) 3, health and well-being, as it seeks to improve the quality of life of patients with schizophrenia. The results indicate that neuroepithelial cells show a neuronal phenotype since they express neuronal markers, they are also recognized by antibodies against  $\beta$ -tubulin III and present cytoskeletal structures that present during neuritogenesis, such as lamellipodia and neurites. In addition, they express genes associated with the risk of schizophrenia, although no effects of the antipsychotic paliperidone were observed on the expression of those genes. In general, the results support that the *in vitro* culture of neural precursors obtained from the nasal cavity by the scraping method constitutes a good experimental model to study the pathophysiology of schizophrenia.

**Key words:** schizophrenia; gene expression; risk gene; olfactory neuroepithelium; neuroepithelial cells; cell culture; paliperidone

**Agradecimientos:**

Agradecer en primer lugar a mis dos tutoras, Olga y Rosa, que me han guiado en la realización de este proyecto de principio a fin de la mejor manera posible. También al instituto de investigación sanitaria INCLIVA por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de final de grado con ellos. Por último, agradecer a mi familia por ser siempre el mejor apoyo con el que puedo contar.

## ÍNDICE:

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1-10</b>
1.1. Características clínicas de la esquizofrenia .....	1
1.2. Patología de la esquizofrenia. Factores neuroquímicos .....	1-3
1.2.1. Hipótesis dopaminérgica .....	1-2
1.2.2. Hipótesis glutamatérgica y del ácido gamma-aminobutírico .....	2
1.2.3. Hipótesis serotoninérgica .....	2-3
1.2.4. Otros receptores aminérgicos .....	3
1.2.5. Inflamación y estrés oxidativo .....	3
1.3. Tratamientos actuales. Antipsicóticos .....	4-5
1.4. Etiología de la esquizofrenia. Factores genéticos y ambientales .....	5-6
1.5. Modelos actuales para el estudio de la esquizofrenia .....	6-10
1.5.1. Cerebro <i>post mortem</i> y sangre periférica .....	7-8
1.5.2. Modelos animales .....	8
1.5.3. iPSCs .....	8-9
1.5.4. Neuroepitelio olfativo .....	9-10
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>10-11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>11-18</b>
3.1. Obtención de las células. Método de raspado .....	11-12
3.2. Cultivo celular .....	12
3.3. Ensayo tratamiento con el antipsicótico paliperidona .....	13

3.4. Inmunofluorescencia .....	13-14
3.5. Extracción ARN .....	14
3.6. Síntesis de ADNc .....	14-15
3.7. Selección de genes y diseño de cebadores .....	15-16
3.8. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-PCR) .....	17-18
3.9. Electroforesis .....	18
3.10. Análisis estadístico .....	18
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>19-32</b>
4.1. Análisis morfológico de las células .....	19-21
4.2. Expresión de marcadores neuronales y genes de riesgo de esquizofrenia .....	21-24
4.3. Estabilidad de la línea celular .....	24-30
4.4. Efecto del antipsicótico paliperidona sobre la expresión de genes de riesgo para la esquizofrenia .....	30-32
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>32-33</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>33-38</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>39-55</b>
7.1. Anexo A .....	39-40
7.2. Anexo B .....	41-48
7.3. Anexo C .....	49-50

7.4. Anexo D .....	51-53
7.5. Anexo E .....	54-55

#### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dibujo esquemático de la pared lateral nasal y el procedimiento de exfoliación del tabique .....	12
Figura 2. Fenotipos celulares morfológicos presentes en una muestra de células neuroepiteliales obtenida de un sujeto control sano .....	20
Figura 3. Caracterización de células de pase 5 presentes en cultivo del neuroepitelio nasal de un sujeto control .....	21
Figura 4. Crecimiento de las células del neuroepitelio olfativo de un sujeto control sano a lo largo de diferentes pases .....	27-28
Figura 5. Expresión génica relativa de los marcadores neuronales entre los pases 3, 7 y 8 de células del neuroepitelio olfativo .....	30
Figura 6. Expresión génica relativa de los genes de riesgo de esquizofrenia entre los cuatro grupos de tratamiento del ensayo de paliperidona en células del neuroepitelio olfativo .....	31-32

#### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ensayo paliperidona. Grupos experimentales de células neuroepiteliales .....	13
Tabla 2. Eficiencia de crecimiento obtenida para cada pase empleando la Ecuación 1 .....	25

#### ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Representación gráfica de la eficiencia de crecimiento de las células del neuroepitelio olfativo de un sujeto control sano para cada pase .....	25
--	----

#### ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de la eficiencia de crecimiento .....	25
---	----

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Características clínicas de la esquizofrenia**

La esquizofrenia (SZ) es un trastorno mental crónico con una elevada heredabilidad que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial (Ross *et al.*, 2006). Clínicamente, la SZ se caracteriza por la presencia de síntomas positivos o psicóticos (alucinaciones, delirios, pensamiento desorganizado y comportamiento motor anormal), síntomas negativos (disminución de la expresión emocional, abulia, alogia, anhedonia y falta de interacción social) y déficits cognitivos (dificultades en la atención, memoria de trabajo y función ejecutiva). Se ha observado que los déficits cognitivos surgen antes del diagnóstico clínico y están estrechamente relacionados con los resultados funcionales, como el desempeño académico y laboral, así como la autonomía en la vida diaria (Uno y Coyle, 2019). Además, la SZ se asocia con deterioro neurocognitivo y alteraciones estructurales en el cerebro, como reducción de la materia gris, disminución del volumen en el hipocampo, agrandamiento de las cavidades ventriculares y alteraciones en la conectividad sináptica relacionadas con la psicosis (Benítez-King *et al.*, 2016).

Los primeros signos de SZ ocurren sobre todo en la adolescencia tardía y la edad adulta joven (Jaaro-Peled y Sawa, 2020), con una disminución relativa de la función cognitiva. Sin embargo, no es hasta años más tarde con la aparición de los primeros episodios psicóticos que el diagnóstico se vuelve evidente, por lo que estos primeros episodios psicóticos son un punto importante de estudio en la actualidad para identificar factores de riesgo y entender mejor la etiología de este trastorno (Kahn y Sommer, 2015).

### **1.2. Patología de la esquizofrenia. Factores neuroquímicos**

#### **1.2.1. Hipótesis dopaminérgica**

La hipótesis de la dopamina para explicar la psicopatología de la SZ se propuso por primera vez en la década de 1960, cuando se descubrió que el primer antipsicótico, la clorpromazina, trataba con éxito los síntomas positivos en pacientes con SZ (Yang y Tsai, 2017). La teoría clásica de la psicosis sostiene que la hiperactividad de los receptores de dopamina D2 en la vía mesolímbica es la principal causa de los síntomas positivos de la SZ. La vía mesolímbica se proyecta desde el área tegmental ventral hasta el cuerpo estriado ventral (Stahl, 2018). El receptor de dopamina D2 es un receptor acoplado a proteína G, y es una diana común de los fármacos antipsicóticos. Sin embargo, los antagonistas de los receptores de dopamina no son clínicamente eficaces para tratar los síntomas relacionados con la corteza, como el déficit cognitivo (Yang y Tsai, 2017).

Aunque la hiperactividad en la función dopaminérgica subcortical desempeña un papel relevante en el desarrollo de la sintomatología de la SZ, la hipótesis original de la dopamina debe ampliarse para incluir las contribuciones de otros sistemas de neurotransmisores en la psicopatología de este trastorno (Yang y Tsai, 2017).

### **1.2.2. Hipótesis glutamatérgica y del ácido gamma-aminobutírico**

El glutamato es uno de los neurotransmisores excitadores más abundantes en el cerebro. Las vías glutamatérgicas que conectan con la corteza, el sistema límbico y las regiones del tálamo son importantes en la SZ. Las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica pueden influir en la plasticidad sináptica y en los microcircuitos corticales, especialmente en el funcionamiento del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato). Los receptores NMDA pertenecen a los canales iónicos controlados por ligandos y son importantes para la neurotransmisión excitatoria, la excitotoxicidad y la plasticidad (Stępnicki *et al.*, 2018). La hipótesis glutamatérgica sugiere que la SZ se debe, en parte, a una hipoactividad de los receptores de glutamato NMDA en las interneuronas GABAérgicas de la corteza prefrontal, lo que resulta en una señalización excesiva del glutamato. Las interneuronas GABAérgicas son un tipo específico de neuronas que utilizan el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) como su principal medio de comunicación química. GABA es el neurotransmisor inhibitorio más común en el sistema nervioso central (SNC) y desempeña un papel fundamental en la regulación de la actividad neuronal. Estas interneuronas GABAérgicas desempeñan un papel fundamental en las redes generadoras de ritmo del cerebro, y la sincronización de las oscilaciones neuronales es un mecanismo clave para la memoria, la percepción y la conciencia. Por lo tanto, cualquier alteración en este sistema puede afectar negativamente a cualquiera de estas funciones (Yang y Tsai, 2017). De esta forma, la hipótesis glutamatérgica y la hipótesis del ácido gamma-aminobutírico están estrechamente relacionadas. También se ha planteado que la alteración en la vía del glutamato se relaciona con los síntomas negativos y el deterioro cognitivo en la SZ, además de ser responsable de la sobreestimulación de la vía dopaminérgica mesolímbica (Stahl, 2018).

### **1.2.3. Hipótesis serotoninérgica**

La hipótesis de la serotonina se deriva de los informes sobre el mecanismo de acción de la droga alucinógena dietilamida del ácido lisérgico (LSD) y su vínculo con la serotonina. Los ligandos de LSD son los receptores de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> del cerebro (Yang y Tsai, 2017). Se sugirió que la sobrecarga de serotonina del núcleo del rafe dorsal resultante del estrés puede alterar la

actividad de las neuronas corticales en la SZ. Además, la sobrecarga serotoninérgica prolongada y derivada del estrés en la corteza cerebral en la SZ puede ser una razón clave de este trastorno (Stępnicki *et al.*, 2018). Los antagonistas de la serotonina mejoran los efectos secundarios extrapiramidales de los antipsicóticos. Los receptores de serotonina, en particular el 5-HT<sub>3</sub> y el 5-HT<sub>6</sub>, siguen representando objetivos farmacológicos prometedores para el descubrimiento de nuevos agentes antipsicóticos multirreceptores que pueden aliviar los síntomas cognitivos y negativos del trastorno (Yang y Tsai, 2017).

#### **1.2.4. Otros receptores aminérgicos**

Además de los receptores de dopamina y serotonina, otros receptores aminérgicos también están relacionados con la SZ, por ejemplo, los receptores de histamina, muscarínicos y adrenérgicos. Los antagonistas de los receptores de histamina H<sub>3</sub> pueden ser útiles en el tratamiento de los déficits cognitivos de la SZ (Stępnicki *et al.*, 2018). Los receptores muscarínicos son receptores de acetilcolina y forman parte de la vía colinérgica. La neurotransmisión colinérgica se encuentra alterada en pacientes con SZ y en modelos animales de SZ (Stępnicki *et al.*, 2018). Es importante destacar que los antagonistas de los receptores muscarínicos deterioran los síntomas cognitivos y negativos en los pacientes con SZ. También hay informes de que la actividad de los receptores adrenérgicos puede ser crucial para la regulación aberrante de los sistemas de cognición, excitación y valencia asociados con la SZ (Stępnicki *et al.*, 2018).

#### **1.2.5. Inflamación y estrés oxidativo**

La inflamación y el estrés oxidativo son otras áreas de interés en los estudios sobre la fisiopatología de la SZ. Se han observado alteraciones en el sistema del complemento, una cascada enzimática que media la inmunidad innata y ayuda a defenderse de las infecciones, en relación con la SZ. Estas alteraciones incluyen aumentos en la actividad de las proteínas del complemento C1, C3 y C4. Las proteínas del complemento pueden marcar las sinapsis para su fagocitosis por parte de la microglía activada, lo que conduce a una poda acelerada de las sinapsis (Yang y Tsai, 2017).

En resumen, la fisiopatología central de la SZ podría involucrar principalmente anomalías del sistema dopaminérgico, que a su vez es capaz de interactuar con otras vías de neurotransmisores. Por tanto, es probable que en muchas formas diferentes de psicosis las diferentes hipótesis explicadas anteriormente estén interconectadas, siendo así poco probable



que los tratamientos dirigidos exclusivamente a un solo sistema de neurotransmisores tengan éxito (Yang y Tsai, 2017).

### 1.3. Tratamientos actuales. Antipsicóticos

Los métodos de tratamiento de la SZ se clasifican como antipsicóticos de primera, segunda y tercera generación. Los fármacos antipsicóticos de primera generación actúan principalmente bloqueando los receptores de dopamina D2 en el cerebro. No muestran selectividad por ninguna de las vías de dopamina en el SNC, lo que puede llevar a una variedad de efectos secundarios, en particular síntomas extrapiramidales y aumento de la prolactina (Stępnicki *et al.*, 2018).

Los fármacos antipsicóticos de segunda generación surgen con la aprobación de la clozapina por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*Food and Drug Administration*; FDA). La clozapina actúa como antagonista de los receptores de dopamina y serotonina y fue el primer fármaco con una mayor capacidad para reducir los síntomas negativos. En general, los fármacos de segunda generación, en comparación con los antipsicóticos clásicos, muestran una mayor capacidad para bloquear los receptores de serotonina 5-HT2A en lugar de a los receptores de dopamina D2. Además, el antagonismo de los receptores D2 es más débil en el caso de los antipsicóticos de segunda generación en comparación con los de primera generación, lo que se manifiesta en una menor incidencia de efectos secundarios extrapiramidales. La principal limitación de la clozapina es su tendencia a causar agranulocitosis que puede conducir a la muerte, por lo que se debe controlar el número de glóbulos blancos de los pacientes cada semana durante los primeros seis meses de tratamiento y, posteriormente, cada dos semanas (Stępnicki *et al.*, 2018).

Los antipsicóticos de segunda generación actualmente aprobados para uso clínico incluyen, además de la clozapina, olanzapina, quetiapina, risperidona, paliperidona, ziprasidona y molindona (Stępnicki *et al.*, 2018).

El grupo más nuevo de fármacos antipsicóticos, descrito como de tercera generación, incluye aripiprazol, brexpiprazol y cariprazina. A diferencia de otros neurolepticos, los fármacos de tercera generación no son antagonistas de los receptores de dopamina D2 sino agonistas parciales de D2. La propiedad del aripiprazol como agonista parcial del receptor D2 se relaciona con la inhibición de la acumulación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) a través del receptor de dopamina D2 y, en presencia de altas concentraciones extracelulares de dopamina (por ejemplo, en áreas mesolímbicas), compiten con la dopamina y dan como resultado un antagonismo parcial que conduce a beneficios clínicos. Por el contrario, cuando la concentración

de dopamina extracelular se encuentra en niveles bajos (por ejemplo, en los circuitos de dopamina que están involucrados en la memoria de trabajo), el aripiprazol puede unirse a receptores adicionales y activarlos parcialmente. Por lo tanto, el aripiprazol se conoce como "estabilizador de dopamina" (Stepnicki *et al.*, 2018).

Aunque se han realizado avances significativos en la comprensión de la SZ, su patología completa todavía no se ha elucidado, por lo que los antipsicóticos actuales que se emplean para el tratamiento de este trastorno presentan importantes limitaciones. En primer lugar, no todos los pacientes responden al tratamiento. El 30% de los pacientes que no responden se clasifican como "resistentes al tratamiento". Todavía se desconoce qué es lo que subyace a la diferencia entre los pacientes que responden y los que no responden, aunque existen algunas suposiciones de que pueden estar involucrados polimorfismos dentro de la familia de receptores de dopamina y serotonina. En segundo lugar, los antipsicóticos mejoran principalmente los síntomas positivos, pero los síntomas negativos y cognitivos permanecen sin tratamiento. En tercer lugar, implican efectos secundarios neurológicos y metabólicos graves y pueden provocar disfunción sexual o agranulocitosis (Stepnicki *et al.*, 2018).

#### **1.4. Etiología de la esquizofrenia. Factores genéticos y ambientales**

Los estudios de gemelos han permitido calcular la heredabilidad de la SZ, es decir, el porcentaje de la varianza observada que puede explicarse por factores genéticos. Esta heredabilidad se calcula a partir de las concordancias de gemelos monocigóticos (idénticos) y dicigóticos (mellizos). Esta heredabilidad es elevada, del 80%, por lo que el componente genético es importante en la SZ. Pero los factores ambientales también juegan un papel importante en la etiología del trastorno. Dado que las genealogías familiares muestran que no hay una herencia clara como en las enfermedades monogénicas, se asume que la SZ presenta una herencia poligénica. Por tanto, se ha demostrado que la susceptibilidad a padecer SZ es el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales (Jaaro-Peled y Sawa, 2020).

Entre los factores ambientales que podrían incrementar el riesgo de padecer SZ, estudios epidemiológicos han asociado la SZ con el nacimiento en invierno o principios de primavera. Esta observación ha llevado a la hipótesis de que las infecciones maternas durante el embarazo, especialmente las infecciones virales como la gripe o la infección por el virus del herpes simple, podrían desempeñar un papel en el desarrollo de este trastorno. Se cree que las infecciones maternas podrían afectar al neurodesarrollo del feto. Además, se ha postulado que la respuesta inmune materna desencadenada por dichas infecciones también podría ejercer un efecto

indirecto en el desarrollo cerebral del feto (Jaaro-Peled y Sawa, 2020). Los factores psicosociales también pueden afectar al desencadenamiento y el curso de la SZ. El consumo excesivo de cannabis se asocia con un riesgo elevado de padecer el trastorno (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2022). Otra condición ambiental de gran relevancia es la nutrición. El ácido fólico y la vitamina B12 son necesarios para la síntesis de metionina, y el hierro es fundamental para la mielinización y la neurotransmisión dopaminérgica. La hemoglobina materna baja se asoció con un aumento de 4 veces el riesgo de SZ. Además, las complicaciones durante el embarazo, como la diabetes o la incompatibilidad rhesus, el crecimiento fetal anormal y las complicaciones en el parto, como la cesárea de emergencia o la atonía uterina, aumentan el riesgo de SZ (Jaaro-Peled y Sawa, 2020).

Durante varias décadas se han llevado a cabo estudios para identificar genes que incrementen el riesgo de padecer esquizofrenia, primero a través de estudios de ligamiento y posteriormente mediante estudios de asociación. Estos estudios se han centrado en las hipótesis etiológicas de la SZ. Estudios recientes de asociación de todo el genoma (GWAS) han informado sobre múltiples loci de riesgo para la SZ. La mayoría de estos genes se relacionan con proteínas relevantes para la plasticidad neuronal, la función glutamatérgica o dopaminérgica y la sinaptogénesis (Winship *et al.*, 2019; Trubetskoy *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022). Además, otros estudios genómicos (de exoma completo o de variaciones en el número de copias) han demostrado que los sujetos con SZ tienen una mayor carga de variantes genéticas raras, frecuentemente causadas por anomalías cromosómicas que incluyen variantes del número de copias (Jaaro-Peled y Sawa, 2020). Un gen que clásicamente se ha asociado con la SZ es el gen *DISC1*, implicado en la regulación de la migración radial y tangencial de las neuronas corticales en estadios embrionarios (Morris *et al.*, 2003). Por otro lado, las asociaciones de la subunidad del receptor de glutamato NMDA *GRIN2A* y la subunidad del receptor AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) *GRIA3* con la SZ respaldan la teoría de la disfunción glutamatérgica como una hipótesis implicada en la patología de este trastorno (Singh *et al.*, 2022). Otros genes como el factor de transcripción *SP4* o el gen *TRIO* que codifica para una proteína intercambiadora de GDP por GTP importante en la reorganización del citoesqueleto de actina, también se correlacionan con el riesgo a padecer este trastorno. Mientras que genes como *TRIO* y *SP4* exhibieron una expresión prenatal, otros genes como *GRIN2A* y *GRIA3* mostraron una expresión posnatal (Singh *et al.*, 2022).

### **1.5. Modelos actuales para el estudio de la esquizofrenia**

Actualmente, la mayoría de los trastornos psíquicos se detectan y clasifican solo mediante evaluación clínica (entrevistas semi-estructuradas) basada en el Manual Diagnóstico y

Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM, 5ª edición) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Por tanto, se están haciendo muchos esfuerzos para identificar factores de riesgo o biomarcadores que permitan mejorar el diagnóstico de un paciente que presenta un primer episodio psicótico. Se pretende predecir la trayectoria del paciente, es decir, determinar si los síntomas que manifiesta van a desembocar en una enfermedad crónica y de qué tipo, dado que existen diferentes trastornos psicóticos que comparten entre ellos muchos síntomas y factores de riesgo; o si, por el contrario, el paciente se va a recuperar y los síntomas van a remitir. Por otro lado, dado que existe un 30 % de los pacientes que no responden a la medicación es importante identificar biomarcadores que puedan predecir cuál será la medicación óptima para cada paciente o si los antipsicóticos que existen actualmente serán efectivos o no. Para este último grupo de pacientes que no responden, es relevante identificar nuevas moléculas que actúen como dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos. El problema del estudio de biomarcadores en trastornos mentales recae en la dificultad de obtener células neuronales del SNC. En consecuencia, la mayoría de las investigaciones se realizan sobre tejidos periféricos que, pese a tener mayor accesibilidad, presentan el inconveniente de derivar de líneas no neuronales (Benítez-King *et al.*, 2016). Por tanto, existe la necesidad de desarrollar modelos neuronales adecuados que permitan el estudio de la SZ.

#### **1.5.1. Cerebro *post mortem* y sangre periférica**

Una parte importante de la investigación genómica actual sobre trastornos neuropsiquiátricos como la SZ se basa en el análisis de tejidos cerebrales *post mortem*. Los estudios a partir de tejidos cerebrales humanos obtenidos *post mortem* han mostrado concentraciones altas de dopamina en varias regiones cerebrales subcorticales y densidades de receptores de dopamina superiores a lo normal en los cerebros de pacientes esquizofrénicos (Davis *et al.*, 1991). Sin embargo, el deterioro de la muestra debido al intervalo *post mortem*, y otros factores como la medicación, el abuso de fármacos y el estilo de vida no deben obviarse, pues pueden influir sobre los resultados obtenidos (Benítez-King *et al.*, 2016). Por ello, como fuente alternativa y a menudo complementaria, se ha empleado la sangre periférica que aporta información transcriptómica, proteómica y epigenómica (Crespo-Facorro *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2018; Gilabert-Juan *et al.*, 2019) en la investigación de la SZ. La principal ventaja del uso de biomarcadores en sangre periférica es la facilidad de recolección de la muestra, por lo que se puede mantener un seguimiento del trastorno del paciente. De esta forma, se pueden tomar muestras del paciente al inicio durante los primeros episodios psicóticos y más tarde cuando el paciente ya se encuentra en medicación. Pese a que el perfil de expresión génica de la sangre

periférica dista mucho del de las células neuronales, estudios previos sugieren que algunos genes con expresión alterada en sangre pueden reflejar cambios que ocurren en el SNC y actuar como predictores de progresión de la enfermedad y respuesta a antipsicóticos (Crespo-Facorro *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2018; Gilabert-Juan *et al.*, 2019).

### **1.5.2. Modelos animales**

También se han desarrollado modelos de roedores que reproducen la etiología, patología cerebral y las anomalías conductuales asociadas con la SZ en humanos. Este tipo de modelos se agrupan en 3 categorías: de desarrollo, inducidos por fármacos y genéticos (Winship *et al.*, 2019). Dado que la SZ se relaciona con eventos prenatales, como complicaciones durante el parto o infecciones maternas durante el embarazo, se han desarrollado modelos animales de desarrollo de la SZ que implican manipulaciones ambientales y/o administración de fármacos durante el período perinatal y/o postnatal temprano. Los fármacos que más se emplean para la generación de modelos animales inducidos por fármacos son los potenciadores de la dopamina, como por ejemplo anfetaminas, y los antagonistas no competitivos del receptor NMDA, como la ketamina. Por último, numerosos genes candidatos se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar SZ, motivo por el cual muchos de ellos han sido utilizados para generar modelos animales de SZ, como es el caso de *DISC1* (Winship *et al.*, 2019). Sin embargo, los trastornos neuropsiquiátricos, incluida la SZ, incluyen síntomas como delirios paranoides y alucinaciones auditivas que son exclusivamente humanos y dificultan la interpretación de los resultados obtenidos a partir de modelos animales (Winship *et al.*, 2019).

### **1.5.3. iPSCs**

Los modelos neuronales más recientes incluyen el empleo de células madre pluripotentes inducidas, también conocidas como iPSCs. Las iPSCs son células pluripotentes que se obtienen mediante la reprogramación de células somáticas. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo (Medvedev *et al.*, 2010). Debido a esta capacidad, las iPSCs se han utilizado en la generación de modelos neuronales para el estudio *in vitro* de la SZ (Räsänen *et al.*, 2021). Los estudios que utilizan modelos de SZ basados en iPSC han identificado alteraciones en la proliferación de células progenitoras neurales, diferenciación desequilibrada de neuronas corticales excitatorias e inhibitoras y fallas en el establecimiento de subpoblaciones de neuronas de proyección. Además, se pueden diferenciar a tipos neuronales muy específicos y cada línea celular contiene el fondo genético de cada paciente (Räsänen *et al.*, 2021). Sin

embargo, pese a ser la aproximación más cercana a los modelos neuronales, también presentan una serie de limitaciones. En primer lugar, el proceso de generación de iPSCs es bastante tedioso, y la eficiencia de la reprogramación no siempre es del 100%, lo cual puede dar lugar a una población heterogénea de iPSCs pudiendo afectar a los resultados obtenidos (Doss y Sachinidis, 2019).

Por otro lado, uno de los problemas críticos en el empleo de iPSCs como modelo de estudio de enfermedades es el desarrollo de un control apropiado. Además, las iPSC pueden presentar inestabilidad génica y algunas líneas iPSC exhiben características de programación incompleta y potencial reducido de proliferación y diferenciación junto con transcripción aberrante y metilación del ADN (Doss y Sachinidis, 2019).

#### <sup>2</sup> **1.5.4. Neuroepitelio olfativo**

El neuroepitelio olfativo es un epitelio columnar pseudoestratificado especializado en la percepción del olor. Este tejido se localiza en la cavidad nasal en la placa cribiforme y en la región de los cornetes superior y medio donde se intercalan con parches epiteliales respiratorios. Está constituido por células madre, precursores neuronales, glándulas de Bowman, neuronas sensoriales olfatorias, y células de la glía de soporte: células sustentaculares (Benítez-King *et al.*, 2016).

El lado apical del neuroepitelio olfativo está en estrecho contacto con el medio ambiente y es la capa más externa de la cavidad nasal. Los cilios de las neuronas olfatorias también se localizan en la capa apical del neuroepitelio y se proyectan hacia la cavidad nasal, exponiendo los receptores del olor que se unen a las sustancias odoríferas presentes en el ambiente. La capa media del neuroepitelio olfatorio está constituida por los somas de las neuronas sensoriales olfativas, que transmiten la información del olor al bulbo olfatorio. La tercera capa del tejido neuroepitelial se encuentra en estrecho contacto con la lámina basal y contiene tanto células basales horizontales como células globosas. Ambos tipos de células se han descrito como células madre multipotentes y se consideran altamente neurogénicas porque proliferan activamente y dan lugar a células sustentaculares y neuronas olfativas que reemplazan el neuroepitelio dañado por el medio ambiente (Benítez-King *et al.*, 2016).

En los últimos años, el neuroepitelio olfativo ha sido usado como modelo para investigar el proceso de neurodesarrollo relacionado con la etiología de la SZ. Este tejido está enriquecido en células madre, que se diferencian en neuronas inmaduras que migran hacia el lado apical del neuroepitelio para producir neuronas olfativas maduras. Debido a su localización periférica, su

recolección es relativamente sencilla, por lo que es adecuado el cultivo y la propagación *in vitro* (Benítez-King *et al.*, 2016).

Las neuronas olfativas están más cerca de las neuronas del SNC que cualquier otra célula periférica utilizada para caracterizar biomarcadores. Además, los perfiles de expresión génica de las células olfativas son parecidos a los de las células madre mesenquimales que pueden diferenciarse en neuronas (Benítez-King *et al.*, 2016).

Además, la vía neural olfativa está estrechamente asociada con las regiones cerebrales frontal y temporal, que son estructuras conocidas por desempeñar un papel clave en la etiología de la SZ. En conjunto, la evidencia respalda que el neuroepitelio olfativo comprende un modelo de espejo experimental que refleja los cambios transcripcionales, bioquímicos, estructurales y metabólicos de las neuronas del SNC. Por lo tanto, este tejido puede ser útil para la caracterización de biomarcadores a nivel estructural y celular y para investigar el mecanismo molecular involucrado en la etiología de la SZ (Benítez-King *et al.*, 2016).

Se ha desarrollado un procedimiento de exfoliación mediante una técnica de cepillado para recolectar precursores neuronales y células madre del neuroepitelio. Este procedimiento no es invasivo y se ha aplicado a sujetos sanos y pacientes psiquiátricos para cultivar células de estirpe neuronal *in vitro* (Benítez-King *et al.*, 2011). Ya se han realizado algunos estudios con células neuroepiteliales derivadas de pacientes con SZ. Evidencias obtenidas en precursores neuronales derivados del neuroepitelio olfativo de pacientes con SZ demostraron alteraciones en la organización microtubular y en funciones que dependen de ella, como corrientes de calcio activadas por voltaje tipo L y migración (Benítez-King *et al.*, 2016).

## **2. OBJETIVOS**

En este proyecto se propone la caracterización de células del neuroepitelio olfativo para determinar si son adecuadas como modelo de estudio de la esquizofrenia. Para ello, se pretende cumplir con cinco objetivos:

1. Análisis morfológico por estudio de inmunofluorescencia usando  $\beta$ -tubulina III, que reconoce tubulina específica de neuronas, para analizar la morfología de este tipo celular y comprobar que reúnen características neuronales.
2. Verificar el fenotipo neuronal de las células neuroepiteliales mediante el análisis de la expresión de marcadores neuronales mediante PCR cuantitativa.

3. Estudiar la expresión de genes asociados con el riesgo de padecer esquizofrenia para comprobar que las células del neuroepitelio olfativo sirven como modelo de estudio de este trastorno.
4. Determinar la estabilidad de la línea mediante el análisis de expresión génica de esos mismos marcadores neuronales a lo largo de diferentes pases.
5. Evaluar en las células neuroepiteliales el efecto del antipsicótico paliperidona en la expresión de los genes identificados en el objetivo número 3, comparando cuatro condiciones diferentes (control 1h, paliperidona 1h, control 24h, paliperidona 24h).

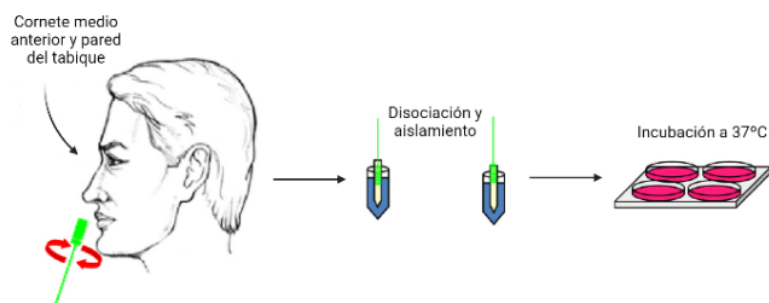
Este proyecto cumple con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 3, salud y bienestar. Se pretende determinar si las células del neuroepitelio olfativo son adecuadas como modelo de estudio de la esquizofrenia para poder investigar sobre nuevos biomarcadores <sup>2</sup> que permitan un diagnóstico temprano de la enfermedad y la búsqueda de dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos más eficientes con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes (para más información consultar Anexo E).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Obtención de las células. Método de raspado

Las muestras de neuroepitelio nasal se obtuvieron de un sujeto sano y sin ningún tipo de medicación. Tal y como describen Galindo *et al.* (2018), se exfoliaron las células del cornete medio con un cepillo interdental estéril mediante movimientos circulares para obtener las células de la pared lateral de la fosa nasal y del tabique (Figura 1). Este procedimiento se realizó por separado para ambas fosas nasales. La extracción de las muestras de exfoliantes y el cultivo primario de las suspensiones celulares fue llevada a cabo por personal del IMIM-Institut Hospital del Mar d'Investigacions Biomèdiques (Barcelona, España). Las células se cultivaron en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C en medio de cultivo completo formado por Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham F-12 1:1 (DMEM/F12) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), Glutamax 4mM y 1 % de estreptomicina-penicilina (Galindo *et al.*, 2018). Las células se expandieron por pase y se congelaron en nitrógeno líquido alícuotas de pase 2 en crioviales a una densidad inicial de 1 millón de células/vial en medio de congelación compuesto por DMEM/F12, Glutamax 4 mM, estreptomicina-penicilina al 1 %, FBS al 20 % y sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 10 %.





**Figura 1. Dibujo esquemático de la pared lateral nasal y el procedimiento de exfoliación del tabique.** Se realizó la exfoliación de las células del epitelio nasal en la pared lateral y en la región anterior del cornete medio lateral y tabique. Después de la disociación mecánica, las células se cultivaron en medio de cultivo completo formado por Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham F-12 1:1 (DMEM/F12) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), Glutamax 4mM y 1 % de estreptomicina-penicilina (*Imagen adaptada de Benítez-King et al., 2011*).

### 3.2. Cultivo celular

Las alícuotas congeladas de pase 2 fueron enviadas a la Sección de Cultivos Celulares (SCSIE-Universitat de València) y se emplearon como cultivo de partida de este proyecto. Para todos los experimentos las células se cultivaron en medio completo sin antibióticos compuesto por DMEM/F12 (Gibco), 10 % de FBS (Gibco), 2X de glutamina (GlutaMAX 100X: Gibco). El criovial se dispuso en un baño a 37 °C hasta que se descongelaron  $\frac{3}{4}$  partes de este y se sembró la suspensión celular en un frasco Falcon de 75 cm<sup>2</sup> (T-75) en medio completo. Las células se cultivaron en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C. El medio de cultivo se cambió al día siguiente y, a continuación, cada 2-3 días hasta que las células alcanzaron una confluencia aproximada del 80 % para realizar el siguiente pase. Los subcultivos siguientes se realizaron siguiendo un método basado en el proceso de tripsinización. Brevemente, se lavaron las células con PBS 1X (Gibco) y se desanclaron de la superficie del frasco incubando con tripsina-EDTA al 0,05 % (Gibco) durante 5 minutos a 37 °C. Se separaron las células de la superficie del frasco con golpes suaves, inactivando la tripsina con medio completo y centrifugando para sedimentar las células. La suspensión celular se sembró de nuevo en un frasco T-75 a una densidad aproximada de  $5 \times 10^5$  células/frasco en medio completo. Este procedimiento se realizó hasta alcanzar el pase 8. Tras cada pase se procesaron cultivos paralelos para llevar a cabo los diferentes ensayos, sembrando las células en placas de 6 pocillos de 9,6 cm<sup>2</sup>/pocillo. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80 % se procedió a la extracción de ARN.

### 3.3. Ensayo tratamiento con el antipsicótico paliperidona

Se sembraron células del neuroepitelio olfativo de pase 4 en cuatro placas de 6 pocillos de 9,6 cm<sup>2</sup>/pocillo a una densidad de  $7,5 \times 10^4$  células/pocillo y se dividieron en dos grupos control y dos de tratamiento según el tiempo de incubación (Tabla 1). Las células se dejaron crecer hasta alcanzar aproximadamente el 80 % de la confluencia antes de iniciar el tratamiento. Para estos experimentos, se disolvió el antipsicótico paliperidona (Sigma-Aldrich) en DMSO hasta obtener una concentración de partida de 2 mM. La concentración final de paliperidona que se dispuso en el medio fue de 10 µM. Las células se incubaron en medio libre de suero formado por DMEM/F12 (Gibco) suplementado con BSA al 0,1% (Thermo Fisher Scientific). Se añadió vehículo o paliperidona al medio libre de suero en función del grupo experimental. Inmediatamente tras el período de incubación correspondiente, se procedió a la extracción de ARN.

**Tabla 1. Ensayo paliperidona.** Grupos experimentales de células neuroepiteliales

Tratamiento	Concentración	Tiempo de incubación	
		1 h	24 h
Vehículo (DMSO)	0.05 %	Control 1 (n = 6)	Control 2 (n = 6)
Paliperidona	10 µM	Tratamiento 1 (n = 6)	Tratamiento 2 (n = 6)

### 3.4. Inmunofluorescencia

Se sembraron células de pase 5 en un portaobjetos de seis canales recubiertos con colágeno IV (IBIDI) específico para microscopía a una densidad de  $4 \times 10^3$  células/canal y se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % antes de la fijación para la inmunofluorescencia. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (PFA: Sigma-Aldrich Chemicals) en PBS 1X durante 30 min y, tras lavar en PBS 1X, se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo formada por suero normal de cabra al 10 % (Gibco) y 0,3% Tritón-X-100 (Thermo Fisher Scientific) en PBS 1X. Luego, las células se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Específicamente, se usó un anticuerpo anti-βIII-tubulina de conejo (dilución 1:100: Sigma-Aldrich Chemicals, T 2200) que reconoce una tubulina específica de neuronas. Tras repetir los lavados con PBS 1X, las células se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente en oscuridad con una solución que contenía el anticuerpo secundario anti-conejo AlexaFluor 488 producido en cabra (dilución 1:400: Thermo Fisher Scientific A-11008) y rodamina faloidina para marcar el citoesqueleto de actina (dilución 1:400: Thermo Fisher Scientific R415), ambos disueltos en solución de bloqueo. Tras lavar en PBS 1X, los canales se llenaron con medio de montaje Ibidi

con diclorhidrato de 4', 6'-diamidino-2 fenilindol (DAPI) (Ibidi GmbH). DAPI permite la tinción de los núcleos celulares. Las imágenes se adquirieron en un microscopio de fluorescencia Leica DMi8 (Leica Microsystems).

### **3.5. Extracción ARN**

Se empleó un tampón de lisis que consta de 5 volúmenes del reactivo RNeasy Protect<sup>®</sup> Cell Reagent (QIAGEN) y 1 volumen de medio DMEM/F12 frío para estabilizar el ARN celular antes de su extracción. Se eliminó el medio de cultivo y, tras una breve incubación de 2 min con el tampón de lisis, las células se rasparon de las placas y se transfirieron a tubos de microcentrífuga que se almacenaron a -20 °C.

El ARN total de los cultivos de las células del neuroepitelio olfativo lisadas se extrajo con el reactivo de lisis RNeasy Lysis Reagent (QIAGEN), los tubos de alta densidad RNeasy High Pure<sup>™</sup> (QIAGEN) y un Mini Kit RNeasy<sup>®</sup> (QIAGEN, Referencia 1038703) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En primer lugar, las células se descongelaron, se centrifugaron para sedimentarlas y se descartó el reactivo RNeasy Protect<sup>®</sup> Cell Reagent. Se añadió una perla metálica al tubo junto con RNeasy Lysis Reagent y se homogeneizó en un RNeasy Lysor LT (QIAGEN) a 40 Hz durante 2 min. Se añadió cloroformo y, después de un período de incubación, las muestras se transfirieron a tubos RNeasy High Pure<sup>™</sup> y se centrifugaron para separar las fases. La fase acuosa superior que contenía el ARN se precipitó con 1,5 volúmenes de etanol de grado molecular en tubos de centrífuga limpios y se transfirió a columnas propias del Mini Kit RNeasy<sup>®</sup>. El ARN quedó atrapado en la membrana de la columna y se lavó de residuos y contaminantes varias veces con diferentes tampones hasta que finalmente se eluyó con agua libre de RNasas.

La concentración final del ARN total aislado se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm con un espectrofotómetro NanoDrop<sup>™</sup> 2000 (Thermo Scientific). Además, la pureza del ARN aislado se midió con los ratios A260/280, que se utiliza para identificar la posible contaminación de proteínas, ya que absorben longitudes de onda alrededor de 280 nm, y A260/230, que se usa para identificar la posible contaminación con componentes orgánicos, ya que absorben longitudes de onda alrededor de 230 nm, siendo los valores óptimos de 1.8-2.0 y 2.0-2.2, respectivamente. El ARN total aislado se almacenó a -80 °C.

### **3.6. Síntesis de ADNc**

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó empleando el Kit QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription (QIAGEN, Referencia 205313) siguiendo las instrucciones del fabricante y

utilizando los reactivos recomendados. La cantidad de ARN de partida se determinó en base a la concentración de ARN obtenida y se estableció en un rango entre 1000 ng y 100 ng. Se añadió tampón de lavado de ADN genómico (ADNg) al ARN de partida y la mezcla se incubó a 42 °C durante 2 min para eliminar cualquier rastro de contaminación de ADNg. Una mezcla preparada a partir de Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer y RT Primer Mix, compuesto por cebadores de hexanucleótidos aleatorios para permitir la síntesis de ADNc de todas las regiones de las transcripciones de ARN, se agregó después de la eliminación de ADNg. Toda la reacción se realizó a 42 °C durante 30 min con un paso final de inactivación a 95 °C. El ADNc recién sintetizado se diluyó en un volumen 1:5 en agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C. Para la síntesis de ADNc se empleó el termobloque Biometra TAdvanced (Analytic Jena). Para cada conjunto de muestras se generaron dos tipos de controles negativos: NTC (*No Template Control*), al cual no se le añadió el molde de ARN; y NRT (*No Reverse Transcriptase*), en el que no se agregó transcriptasa reversa.

### 3.7. Selección de genes y diseño de cebadores

Se seleccionaron dos grupos de genes: un primer grupo formado por 14 genes que se proponen como marcadores neuronales y un segundo grupo constituido por 11 genes que se identifican como factores de riesgo de esquizofrenia. Los genes relacionados con el riesgo a padecer esquizofrenia fueron identificados por investigadores anteriores en este laboratorio en base a investigaciones recientes (Crespo-Facorro *et al.*, 2015; Sainz *et al.*, 2015; Gilabert-Juan *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2022; Trubetsky *et al.*, 2022). Los marcadores neuronales se seleccionaron en base a estudios realizados sobre el neuroepitelio olfativo en trastornos como la esquizofrenia (Benítez-King *et al.*, 2011; Benítez-King *et al.*, 2016; Galindo *et al.*, 2018; Evgrafov *et al.*, 2020).

Los cebadores específicos para cuatro genes de referencia (*GAPDH*, *HPRT1*, *PGK1* y *RS27A*), y para los dos grupos de genes de interés fueron diseñados empleando la herramienta *Primer Blast* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>; consultar las secuencias en el Anexo A, Tablas A1, A2, A3). Los números de acceso NM (transcritos validados) para las transcripciones de los genes de interés se obtuvieron de la base de datos *NCBI Gene* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) y se cotejaron con las transcripciones encontradas en *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) para garantizar la superposición y la identificación de todas las posibles variantes de codificación de ARN.

Se introdujeron el/los código/s NM de cada transcrito en la herramienta *Primer Blast* del NCBI. El diseño de cebadores se realizó siguiendo los siguientes criterios: a) longitud de producto amplificado de 70-150 pb, b) temperatura de *melting* ( $T_m$ ) entre 58-62 °C (óptima de 60 °C) con una diferencia máxima entre ambos cebadores de 3 °C, c) se incluyó al menos un intrón con una longitud de entre 1000-10000 pb para discriminar entre ADN genómico y ADN complementario proveniente del ARN, d) se permitieron variantes de *splicing*, e) no se permitió la posibilidad de que el sitio de unión del cebador contenga un SNP (*single nucleotide polymorfism*) conocido. Este procedimiento generó una lista de diez o menos pares de cebadores directos e inversos potenciales. Se seleccionaron los pares con un porcentaje de GC más similar y menor autocomplementariedad. Los cebadores fueron sintetizados por la empresa Merck bajo la marca Sigma-Aldrich.

Todos los cebadores se testaron utilizando ADNc sintetizado <sup>2</sup> a partir de ARN de células del neuroepitelio olfativo de pase 3. Aquellos genes que mostraron una expresión baja o inespecífica en este tipo celular se testaron de nuevo en muestras de tejido de cerebro *post mortem*, concretamente en las regiones de hipocampo y córtex, para determinar si las inespecificidades observadas eran debidas a que los genes no presentaban expresión en este tipo celular o a que los cebadores diseñados no eran lo suficientemente específicos. Paralelamente, se realizó una electroforesis (Apartado 3.6) con los amplificados de los genes de interés para determinar si el tamaño del amplicón coincidía con el tamaño de producto obtenido en el diseño de cebadores (para el tamaño de producto consultar Anexo A, Tablas A1, A2, A3). Los genes asociados con el riesgo de esquizofrenia que hubiesen mostrado una expresión detectable en las pruebas preliminares se seleccionaron para el ensayo de paliperidona con el objetivo de evaluar el efecto de este antipsicótico sobre la neurobiología de las células neuroepiteliales. Por otra parte, se comparó la expresión de los marcadores neuronales entre los pases 3, 7 y 8 para determinar la estabilidad de la línea celular.

Se empleó la herramienta PANTHER (<http://www.pantherdb.org>) para encontrar anotaciones tanto de los genes clasificados como marcadores neuronales como de los genes de riesgo para esquizofrenia con tal de encontrar información sobre procesos biológicos específicos, funciones moleculares y celulares.

### 3.8. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa (RT-PCR)

El ADNc se amplificó utilizando TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus; Takara) en el termociclador a tiempo real QuantStudio 5 Real-Time PCR System, 384-well (Applied Biosystems). Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 µL que contenía 5 µL de TB Green® Premix Ex Taq™ 5X (Tli RNaseH Plus), 0,2 µL de una mezcla de cebadores directo e inverso a una concentración final de 0,2 µM, 0,2 µL de ROX Reference Dye II (50X), 1 µL de ADNc y 3,6 µL de agua libre de ribonucleasas.

Como control negativo para cada par de cebadores se reemplazó el ADNc por agua libre de ribonucleasas en la reacción de PCR. Para cada conjunto de muestras se incluyeron en la placa los controles negativos NTC y NRT. Los cuatro genes previamente mencionados (*GAPDH*, *HPRT1*, *PGK1* y *RS27A*) se emplearon como genes de referencia internos para la normalización de los resultados obtenidos debido a su expresión estable y constante, por lo que también se emplearon como controles positivos. En una misma placa tanto muestras como controles se dispusieron como triplicados.

El programa del termociclador se ejecutó para una PCR rápida, la temperatura de desnaturalización se fijó en 95 °C y la temperatura combinada de hibridación/extensión se fijó en 60 °C. Con esos parámetros, la máquina calculó la expresión en valores de umbral de ciclo (Ct), que proporciona información sobre la cantidad de ácido nucleico objetivo que contenía el material de partida en función de la cantidad de tiempo necesario para entrar en la fase exponencial de amplificación. Además, se ejecutó una curva de fusión (*melt curve*) al final de los ciclos de PCR para cada ensayo para confirmar la especificidad de los cebadores empleados.

Los resultados de la amplificación se recopilaron y analizaron mediante el software Design & Analysis, Versión 2.6.0 (Thermo Fisher Scientific). La expresión génica para una muestra individual se calculó como el Ct promedio medido a partir de los triplicados técnicos. Para cada triplete se aceptó una diferencia máxima de 0,5 entre los tres valores de Ct o de 0,31 entre los duplicados en caso de que uno de los valores excediese esta diferencia, es decir, si el triplete falló. En caso contrario, el triplete entero es descartado. La eficiencia de la qPCR se calculó empleando la herramienta LinRegPCR localizada en GEAR Genomics (<https://www.gear-genomics.com/rdml-tools/linregpqr.html>), un servidor web para aplicaciones de biología molecular, tal y como describen Untergasser *et al.* (2021).

Los cambios relativos de la expresión génica se calcularon a partir de los valores promedio de Ct utilizando la normalización de genes de referencia múltiple en el software qbase+ 3.2 (Biogazelle). Los cuatro genes candidatos de referencia mencionados anteriormente se analizaron a través de la función GeNorm y los tres más estables, basados en la estabilidad de expresión promedio calculada (valores M), se utilizaron para la normalización.

### **3.9. Electroforesis**

Para la electroforesis, se preparó un gel de agarosa al 3%. Se disolvieron 3 g de agarosa (Agarosa D1 Low EEO: Condalab) en 100 mL de TBE 1X con la ayuda de un microondas. Una vez disuelta la agarosa, se añadieron dos gotas de bromuro de etidio (1 gota/50 mL) (AppliChem) y se homogenizó la mezcla. El fluido del gel se vertió en una cubeta con el peine puesto y se dejó gelificar unos 15 min. Para la preparación de las muestras, en la misma placa de qPCR se dispuso, por cada 10 µL muestra, 2 µL de tampón de carga 6X (Colorante de carga de ADN TriTrack (6X), Thermo Fisher Scientific™). Para la preparación del patrón, se preparó una mezcla compuesta por 1 µL de tampón de carga 6X, 1 µL de marcador de pesos moleculares (GeneRuler 50 pb DNA Ladder: Thermo Fischer Scientific™) y 4 µL de agua. Se retiró el peine del gel una vez gelificado, y se depositó el gel en la cubeta de electroforesis. El gel se cubrió con TBE 1X y se procedió a cargar las muestras: 6 µL de patrón y 12 µL de cada muestra. Una vez cargados los pocillos, dejó correr el gel a 110 V durante 35 min. El resultado de la electroforesis se reveló con el transiluminador ultravioleta Axygen® Gel Documentation Systems (Corning).

### **3.10. Análisis estadístico**

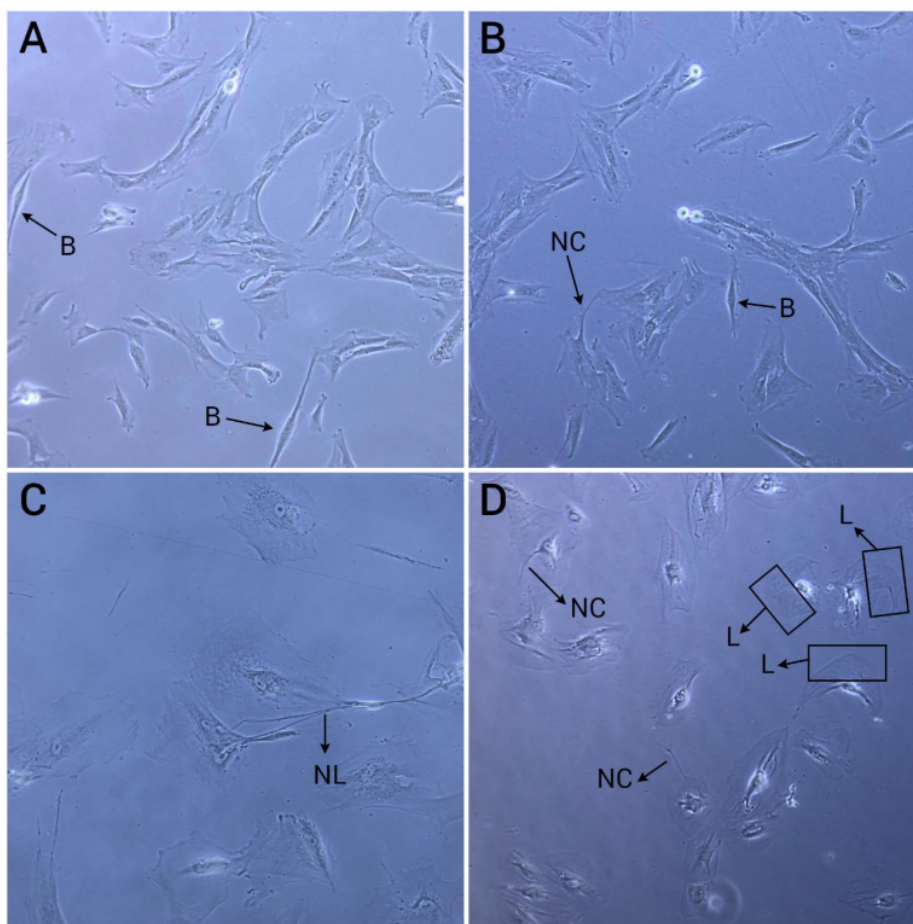
Los cambios en la expresión génica entre los diferentes grupos de tratamiento en el ensayo de paliperidona, y entre los diferentes pases en el ensayo de estabilidad de la línea celular, se compararon realizando una prueba ANOVA unidireccional ordinaria. Se empleó la herramienta Prism versión 9.0 (GraphPad) para el análisis estadístico y la generación de las gráficas, empleando para todas las pruebas un nivel de significación ( $\alpha$ ) de 0,05. El tipo de gráfico empleado fue un diagrama de dispersión con barra en el que para cada grupo se muestra la media con el error estándar de la media (SEM). Todos los gráficos representan cantidades relativas normalizadas calibradas (CNRQ) de expresión génica.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis morfológico de las células

Las muestras de la mucosa nasal presentan fenotipos celulares heterogéneos. Como se muestra en la Figura 2, se observan células con una morfología alargada, así como algunas células bipolares, con un fenotipo morfológico más similar al de las neuronas. Es destacable señalar que a lo largo de los diferentes pases la morfología alargada de estas células va evolucionando hacia un fenotipo más globoso, con la formación de un velo alrededor de la célula, también conocido como lamelipodio. Los lamelipodios son extensiones más o menos aplanadas producidas por la polimerización de filamentos de actina que se organizan en un entramado ramificado, en vez de formar haces. Los lamelipodios, junto con otras estructuras como las micropuntas o las neuritas, son característicos del proceso de neuritogénesis, el paso inicial en la diferenciación neuronal que está influenciado por la organización dinámica del citoesqueleto. Durante este proceso, los microtúbulos y microfilamentos adquieren una organización específica para formar conos de crecimiento, lamelipodios, micropuntas y neuritas, que son los puntos de partida para la formación de dendritas y/o axones (Da Silva y Dotti, 2002). En la Figura 2 se aprecia que las células de neuroepitelio olfativo muestran fenotipos citoesqueléticos característicos de etapas tempranas del proceso de neuritogénesis, como lamelipodios o neuritas largas y cortas, lo que indica que este proceso podría tener lugar *in vitro*.

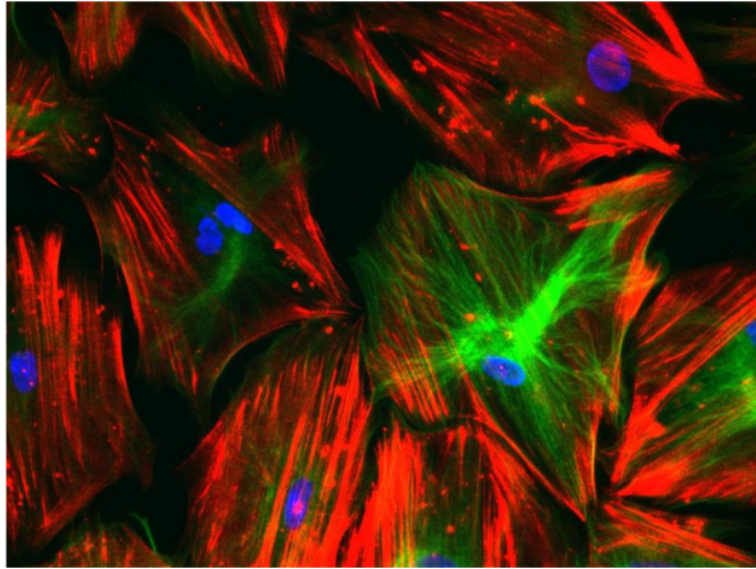




**Figura 2. Fenotipos celulares morfológicos presentes en una muestra de células neuroepiteliales obtenida de un sujeto control sano.** Se observan muestras de pase 2 (A), de pase 3 (B), de pase 5 (C) y de pase 8 (D). Las flechas señalan células con una morfología bipolar (B) y estructuras citoesqueléticas como neuritas largas (NL), neuritas cortas (NC) y lamelipodios (L).

El fenotipo neuronal de las células del neuroepitelio olfativo se verificó con el ensayo de inmunofluorescencia, dado que todas las células fueron reconocidas en mayor o menor medida por el anticuerpo anti- $\beta$ III-tubulina (Figura 3). El marcador neuronal específico  $\beta$ -tubulina III identifica tanto neuronas maduras como inmaduras. Estos resultados son coherentes con estudios previos realizados sobre el mismo tipo celular (Benítez-King *et al.*, 2011; Galindo *et al.*, 2018; Delgado-Sequera *et al.*, 2021). La técnica de exfoliación empleada para obtener las muestras de células neuroepiteliales permite el aislamiento de precursores neuronales y células madre (Benítez-King *et al.*, 2011), por lo que, pese a que el neuroepitelio olfativo está formado

también por otros tipos celulares como células de sostén, únicamente se observan células que presentan un fenotipo neuronal. Estudios anteriores también informan sobre la presencia de células pequeñas y redondeadas, que se corresponderían con células basales, las células madre responsables de la regeneración de las células sensoriales olfativas (Benítez-King *et al.*, 2011).



**Figura 3. Caracterización de células de fase 5 presentes en cultivo del neuroepitelio nasal de un sujeto control.** Las células se fijaron y procesaron por inmunofluorescencia como se describe en la Sección 3.3. Tinción simultánea con anti-βIII-tubulina (verde) para teñir la tubulina específica de neuronas, junto con rodamina faloidina (rojo) para marcar el citoesqueleto de actina. Se usó diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para teñir los núcleos celulares (azul). Las imágenes superpuestas se muestran y se adquirieron con microscopio Leica DMI8.

Para poder obtener células neuroepiteliales con un fenotipo más cercano al de las neuronas del SNC, futuros ensayos que se proponen son la diferenciación de las células neuroepiteliales mediante el empleo de cAMP. El cAMP es un segundo mensajero que actúa como mediador de muchos factores de crecimiento, de forma que la exposición a cAMP disminuye la división celular favoreciendo la diferenciación a la vez que mantiene la viabilidad (Rosen *et al.*, 2001).

#### **4.2. Expresión de marcadores neuronales y genes de riesgo de esquizofrenia**

De los 14 marcadores neuronales que se testaron en las pruebas preliminares realizadas sobre muestras de células neuroepiteliales, 5 de los genes se expresaron de forma consistente (*TUBB3*, *NES*, *VIM*, *MAP1B*, *DISC1*; Ct < 30), 3 mostraron una expresión baja (*OMP*, *TAU*, *GRIK5*; Ct > 30),

2 mostraron una expresión muy baja (*DRD2*, *HTR2C*; Ct > 35), otros 2 genes no mostraron expresión aparente (*PACAP*, *HTR2A*) y en 2 de ellos se observó la presencia de señales inespecíficas (*NEUN*, *HTR2B*). Los genes *OMP*, *HTR2B*, *GRIK5*, *DRD2*, *PACAP*, *NEUN*, *HTR2A*, *HTR2C* se testaron de nuevo en muestras de tejido de cerebro *post mortem*, concretamente en las regiones de hipocampo y córtex, donde se espera una expresión alta de todos estos genes. En los ensayos de expresión sobre muestras de tejido de cerebro *post mortem* en el gen *HTR2B* se volvieron a observar señales inespecíficas, por lo que posiblemente el problema sea que los cebadores muestran una baja eficiencia de amplificación y se deberían diseñar unos nuevos. Por otro lado, los otros 7 genes se expresaron en cerebro *post mortem*, lo que nos permite confirmar que los cebadores diseñados para estos genes funcionan correctamente, por lo que la falta de amplificación de algunos genes es por ausencia de expresión y no por un problema de los cebadores. El rango de valores de Ct para todos los genes y tejidos analizados se enumeran en el Anexo B, (consultar Tabla B1). Paralelamente, se realizó una electroforesis con los amplificados de todos los genes. La electroforesis mostró, para cada gen, una banda cuyo tamaño se correspondía con el tamaño de amplicón obtenido para cada par de cebadores (consultar el tamaño de los amplicones en el Anexo A, Tabla A1; consultar resultados de la electroforesis en el Anexo B, Figura B1). Los genes *PACAP* y *HTR2A* no mostraron banda en la electroforesis. Para el gen *NEUN* se observaron bandas de muy pequeño tamaño (< 50 pb) en la electroforesis que posiblemente se correspondan con dímeros de cebadores o estructuras secundarias de estos. Por consiguiente, todos los genes a excepción de *PACAP*, *HTR2A* y *NEUN*, incluidos los que mostraron un nivel de expresión muy bajo (*DRD2*, *HTR2C*; Ct > 35), se expresan en células neuroepiteliales debido a que podemos confirmar que se produjo amplificación. Los resultados de las pruebas preliminares confirman que <sup>2</sup> las células procedentes del neuroepitelio olfativo mediante el método de raspado exhiben un fenotipo neuronal debido a que expresan marcadores neuronales. Resultados basados en la herramienta PANTHER permiten la clasificación de estos marcadores neuronales en dos categorías: genes implicados en la organización del citoesqueleto (*VIM*, *NES*, *DISC1*, *TUBB3*, *MAP1B*, *MAPT*, *NEUN*, *PACAP* y *OMP*) y receptores de neurotransmisores (*DRD2*, *GRIK5*, *HTR2A*, *HTR2B* y *HTR2C*). Con respecto a estos últimos, podemos diferenciar entre receptores dopaminérgicos (*DRD2*), subunidades de receptores serotoninérgicos (*HTR2A*, *HTR2B* y *HTR2C*) y subunidad de receptor glutamatérgico (*GRIK5*).

Estudios realizados sobre embriones de ratón reportaron la expresión de los genes *VIM* y *MAP1B* en estadios tempranos del desarrollo del epitelio olfativo (Aoki *et al.*, 1995). Tanto *VIM* como *MAP1B* se expresan en altos niveles en los progenitores neurales, mientras que a medida que

las neuronas se diferencian y maduran la expresión de ambos genes disminuye, por lo que se piensa que ambos cumplen un papel importante en el neurodesarrollo (Aoki *et al.*, 1995). La expresión de otros marcadores de progenitores neuronales (*NES*, *TAU*, *TUBB3*), está en concordancia con investigaciones previas realizadas por otros autores en muestras de neuroepitelio olfatorio humano (Benítez-King *et al.*, 2011; Jiménez-Vaca *et al.*, 2017; Brozzetti *et al.*, 2020). No se observó una expresión consistente de los marcadores de neuronas maduras *OMP* y *NEUN*. La proteína marcadora olfativa (*OMP*) únicamente se asocia con neuronas receptoras olfatorias maduras en muchas especies de vertebrados (Hahn *et al.*, 2005). Investigaciones anteriores observaron que la población de células procedentes del neuroepitelio olfativo marcadas positivamente con el anticuerpo anti-OMP o anti-NeuN (marcadores de neuronas maduras) fueron relativamente pocas en comparación con las marcadas para anti-GAP-43 (marcador de neuronas inmaduras) o anti-nestina (marcador de progenitores neuronales) respectivamente (Hahn *et al.*, 2005; Benítez-King *et al.*, 2011). Estos resultados indican que, pese a que predomina una población celular formada por precursores neuronales, algunas células tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas sensoriales olfativas maduras en un medio sin factores tróficos exógenos. Mientras que otros autores han reportado la expresión de genes característicos del SNC como *GRIK5* (subunidad de receptor glutamato) o *PACAP* (péptido neuroregulatorio) en el neuroepitelio olfativo (Thukral, 1997; Hegg *et al.*, 2003), los resultados de las pruebas preliminares no muestran una expresión consistente de estos genes. Por lo que respecta al gen que codifica para el receptor dopaminérgico *DRD2* mostró una expresión muy baja, mientras que de las tres subunidades de los receptores serotoninérgicos en una de ellas se observaron señales inespecíficas (*HTR2B*), y las otras dos mostraron una expresión muy baja (*HTR2C*) o inexistente (*HTR2A*).

Por otro lado, los 11 genes relacionados con el riesgo a padecer esquizofrenia (*SP4*, *AKT1*, *EIF2D*, *NDEL1*, *NISCH*, *RANGAP1*, *TOX*, *GRIA3*, *TENM4*, *TRIO*, *GRIN2A*) mostraron una expresión estable en las pruebas preliminares. La expresión de estos genes es relevante pues permite usar este tipo celular como modelo para el estudio de la función de genes identificados como factores de riesgo de la esquizofrenia, la relación de estos genes con el desarrollo de psicosis o cómo se ven afectados sus niveles de expresión en respuesta a la medicación, entre otros aspectos. Los cebadores de estos genes presentaron gran especificidad, produciendo poco ruido en los controles. El rango de valores de Ct para todos los genes que se clasifican como factores de riesgo de esquizofrenia analizados en células del neuroepitelio olfativo se enumeran en el Anexo B, Tabla B2. Las funciones anotadas de estos genes según los resultados obtenidos mediante la herramienta PANTHER son diversas e incluyen transporte iónico (*GRIN2A* y *GRIA3*), migración y

crecimiento neuronal (*TRIO*), regulación transcripcional (*SP4*), regulación del transporte nuclear (*RANGAP1*), transductor de señal intracelular (*AKT1*), desarrollo neuronal (*TENM4* y *NDEL1*), inicio de la traducción (*EIF2D*), mediador de la translocación de integrinas (*NISCH*) y función inmune (*TOX*). Investigaciones previas identificaron relaciones entre estos genes y la esquizofrenia mediante análisis de GWAS (Chen *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018; Trubetskoy *et al.*, 2022), análisis del exoma (Chow *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2022), análisis de expresión génica (Gilabert-Juan *et al.*, 2019) y secuenciación dirigida (Yi *et al.*, 2021). Entre algunas de las asociaciones más interesantes se destaca la relación entre la subunidad del receptor de glutamato NMDA *GRIN2A* y la subunidad del receptor AMPA *GRIA3* con la esquizofrenia (Singh *et al.*, 2022; Trubetskoy *et al.*, 2022), que respaldan la teoría de la disfunción glutamatérgica como una hipótesis implicada en la patología de este trastorno. Por otro lado, las alteraciones en genes como *TOX*, *SP4* y *EIF2D* en sangre han estado al frente de los estudios en busca de indicadores de psicosis al comparar individuos sanos con pacientes con primeros episodios psicóticos (Crespo-Facorro *et al.*, 2015; Gilabert-Juan *et al.*, 2019). Finalmente, *DISC1* es un gen que clásicamente se ha asociado con el riesgo a padecer esquizofrenia (Morris *et al.*, 2003). Además, también se considera un marcador neuronal por su implicación en el crecimiento de neuritas y el desarrollo cortical a través de su interacción con otras proteínas (Hayashi *et al.*, 2015). Por tanto, la expresión de estos genes en células del neuroepitelio olfativo es interesante pues abre una oportunidad al empleo de estas células como modelo de estudio de la esquizofrenia para la búsqueda de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas.

#### 4.3. Estabilidad de la línea celular

A lo largo de los sucesivos pases se observó que la velocidad de crecimiento de las células se reducía. Se llevó a cabo una evaluación inicial de la velocidad de crecimiento mediante el cálculo del cociente entre la densidad de siembra del cultivo celular (células/frasco) y el producto de la densidad celular en el momento del pase (densidad de *splitting*; células/frasco) y el número de días que se mantuvo en incubación el cultivo (Ecuación 1). Se tomó la libertad de denominar a este factor eficiencia de crecimiento. Para calcular la densidad de *splitting* se multiplicó el volumen de la suspensión celular que se generó durante el proceso de tripsinización por la densidad obtenida en células/mL. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. Para las células de pase 8 no se llevó a cabo un siguiente pase. Los valores de la eficiencia de crecimiento para cada pase se representan en la Gráfica 1.

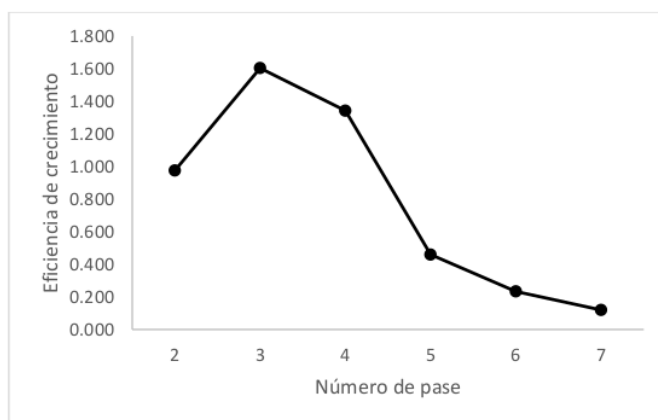
**Ecuación 1.** Cálculo de la eficiencia de crecimiento

$$\text{Eficiencia de crecimiento} = \frac{\text{Densidad de siembra (células/frasco)}}{\text{Densidad splitting (células/frasco)} \times \text{días de incubación}}$$

**Tabla 2.** Eficiencia de crecimiento obtenida para cada pase empleando la Ecuación 1.

Número de pase	Densidad de siembra (células/frasco)	Densidad de splitting (células/frasco)	Días de incubación	Eficiencia de crecimiento
2	1000000	3.90 x10 <sup>6</sup>	4	0.975
3	500000	5.61 x10 <sup>6</sup>	7	1.603
4	300000	4.83 x10 <sup>6</sup>	12	1.342
5	300000	1.65 x10 <sup>6</sup>	12	0.459
6	500000	2.10 x10 <sup>6</sup>	18	0.233
7	500000	1.20 x10 <sup>6</sup>	20	0.120

*Nota:* La densidad de *splitting* (células/frasco) se calculó teniendo en cuenta las células/ml que se contaron en el momento del *splitting*, y sabiendo que la suspensión celular era de 3 mL.



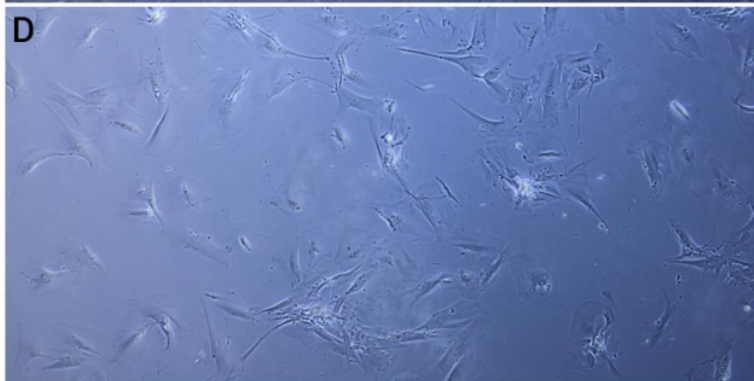
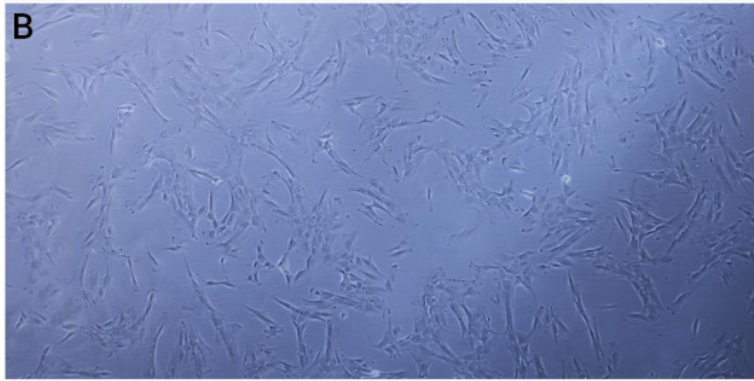
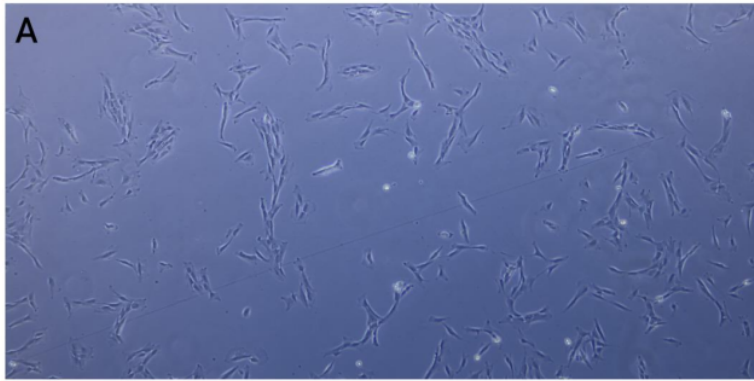
**Gráfica 1.** Representación gráfica de la eficiencia de crecimiento de las células del neuroepitelio olfativo de un sujeto control sano para cada pase.

En la Gráfica 1 se observa una tendencia descendente en la eficiencia de crecimiento a medida que aumenta el número de pase. A partir del pase 5 se identifica un descenso evidente en la velocidad de crecimiento que sigue pronunciándose a lo largo de los pases 6 y 7. Los pases más tempranos (pase 2, 3 y 4) son los que muestran una mejor eficiencia de crecimiento. Además, se observa que a medida que se realizan más pases, las células muestran un crecimiento menos uniforme en comparación con los pases iniciales (Figura 4). En los primeros pases (pase 2, 3, 4; Figura 4, paneles A, B, C), el crecimiento celular es uniforme en todo el cultivo. Sin embargo, en

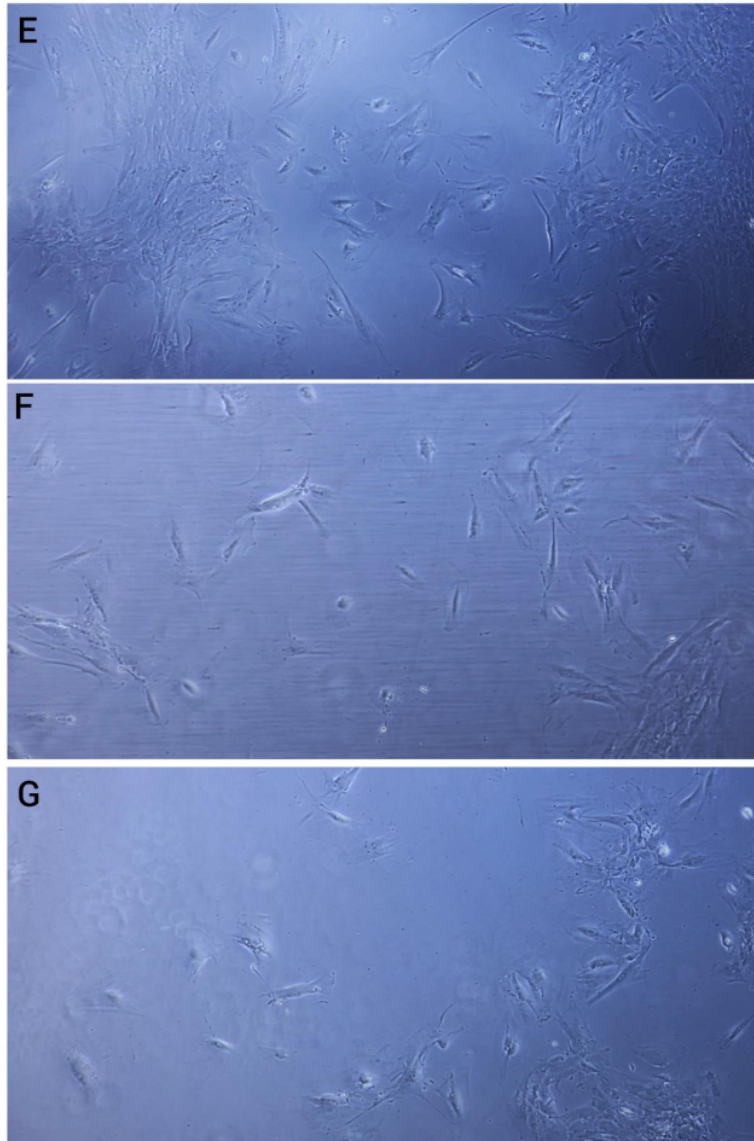
los últimos pases (Figura 4, paneles D, E, F, G), se observa la aparición de áreas más vacías y áreas con mayor densidad celular dentro del mismo cultivo.

Estos resultados indican que el conjunto de procesos que se llevan a cabo para realizar los subcultivos siguientes tienen efectos negativos sobre el crecimiento de las células neuroepiteliales. El proceso de tripsinización y el hecho de que las células pasan a estar más dispersas y deben volver a establecer nuevos contactos entre ellas, sumado a que se está realizando una selección artificial de células neuroepiteliales pues solo una parte de la población se elige para el siguiente pase, provoca que las células estén sometidas a cierto estrés que reduce la velocidad de crecimiento. Esta línea celular, a diferencia de otras líneas celulares como la de neuroblastoma SH-SY5Y con la que se ha trabajado previamente en este laboratorio, se ve mucho más afectada por todo este conjunto de procesos, dado que las células de neuroblastoma se pueden mantener hasta pase 19 con una velocidad de crecimiento rápida. Ahora bien, a diferencia de la línea SH-SY5Y, las células neuroepiteliales no proceden de una línea cancerosa, por lo que su división celular está mucho más limitada. Sin embargo, otros autores han reportado experimentos con células procedentes del neuroepitelio olfativo de pase 11 (Benítez-King *et al.*, 2011) e incluso hasta pase 12 (Idotta *et al.*, 2019), mientras que otros autores solamente las mantienen hasta pase 6 (Delgado-Sequera *et al.*, 2021). Idotta *et al.* (2019) en su estudio realizaron la recolección de muestras en primavera y verano para evitar el empleo de antibióticos en el medio de cultivo, pues estos demostraron ser perjudiciales para el crecimiento y la supervivencia de las células neuroepiteliales en cultivos piloto. En este proyecto, en el cultivo primario se emplearon antibióticos; sin embargo, en los subcultivos siguientes se evitó su empleo precisamente para evitar los efectos deletéreos derivados del uso continuado de antibióticos. Es importante señalar que estos resultados solamente son una aproximación inicial. Para evaluar correctamente la velocidad de división celular se debe recurrir a ensayos de proliferación, que pueden basarse en la medición de la actividad metabólica de las células, tinciones específicas o el empleo de marcadores de proliferación (Miret *et al.*, 2006).





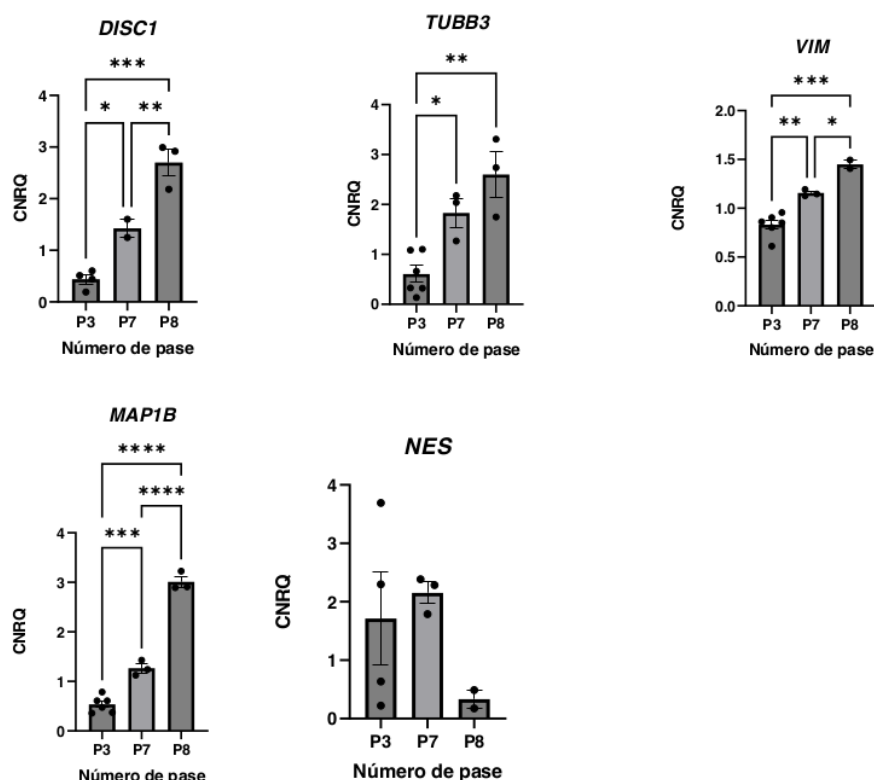




**Figura 4. Crecimiento de las células del neuroepitelio olfativo de un sujeto control sano a lo largo de diferentes pases. Pase 2 (A), pase 3 (B), pase 4 (C), pase 5 (D), pase 6 (E), pase 7 (F), pase 8 (G).**

Por otro lado, también se evaluaron los cambios en la expresión génica de marcadores neuronales sobre la línea de células neuroepiteliales a lo largo de los pases 3, 7 y 8 para comprobar si el fenotipo neuronal se mantenía. Para ello, se seleccionaron los marcadores neuronales que mostraron mejores resultados de expresión durante las pruebas preliminares (*TUBB3*, *NES*, *VIM*, *MAP1B*, *DISC1*) y se testaron en muestras celulares de los diferentes pases.

Los datos de expresión génica relativa obtenidos del análisis mediante qbase+ se normalizaron utilizando los tres genes de referencia más estables después del análisis GeNorm (*HPRT1*, *PGK1* y *RS27A*). Las estadísticas descriptivas de todos los genes analizados se presentan en el Anexo C, Tabla C1. La prueba ANOVA unidireccional ordinaria mostró resultados significativos entre los diferentes pases para los genes *DISC1* ( $p < 0.001$ ), *TUBB3* ( $p < 0.01$ ), *VIM* ( $p < 0.001$ ) y *MAP1B* ( $p < 0.0001$ ; consultar Figura 5 y Anexo C, Tablas C2 y C3). El gen *NES* no presentó resultados significativos; no obstante, la ausencia de significancia estadística parece ser debida a la dispersión de los datos que se da en pase 3 (ver Figura 5; gen *NES*; P3). Al realizar un t-test entre los pases 7 y 8 sí se observó una diferencia significativa de los niveles de expresión del gen *NES* entre ambos pases ( $p < 0.01$ ; consultar Anexo C, Tabla C4). Se observa que a medida que aumenta el número de pase la expresión de los genes *TUBB3*, *VIM*, *MAP1B* y *DISC1* aumenta, mientras que la expresión del gen *NES* disminuye entre los pases 7 y 8 (Figura 5). Los genes *TUBB3*, *VIM*, *MAP1B* y *DISC1* desempeñan funciones importantes en diferentes etapas del desarrollo neuronal, tanto en células progenitoras neuronales, como en neuronas inmaduras y en neuronas post-mitóticas, pues desempeñan funciones críticas en la migración neuronal, la formación de conexiones sinápticas y la organización del citoesqueleto (Aoki *et al.*, 1995; Benítez-King *et al.*, 2011; Jiménez-Vaca *et al.*, 2017; Brozzetti *et al.*, 2020). El gen *NES* por su parte, es un marcador de precursores neuronales. Por tanto, el aumento de expresión de los genes *TUBB3*, *VIM*, *MAP1B* y *DISC1* tomado en cuenta junto a la disminución de la expresión del gen *NES* puede ser indicativo de que las células progenitoras neuronales están abandonando su estado de proliferación y están evolucionando hacia la línea de neuronas post-mitóticas. Las células post-mitóticas son células que han completado su proceso de división celular y, por lo tanto, pierden su capacidad proliferativa. Es importante tener en cuenta que las células post-mitóticas, aunque sean más maduras que las células progenitoras neurales, no necesariamente están completamente diferenciadas. Esta hipótesis viene corroborada por los cálculos de la eficiencia de crecimiento, pues una posible explicación a la reducción de la velocidad de crecimiento de las células sería una disminución de la población de progenitores neuronales que son los que mantienen la mayor capacidad proliferativa (consultar Tabla 2 y Gráfica 1). Es posible que tras cada pase el estrés al que son sometidas las células afecte a los precursores neuronales provocando la pérdida de sus características como células progenitoras. En definitiva, la expresión de los marcadores neuronales no es estable a lo largo de los diferentes pases; sin embargo, el hecho de que las células sigan expresando estos marcadores indica que mantienen su fenotipo neuronal, lo cual es interesante para luego poder aplicar estudios de diferenciación como el que está mediado por cAMP.

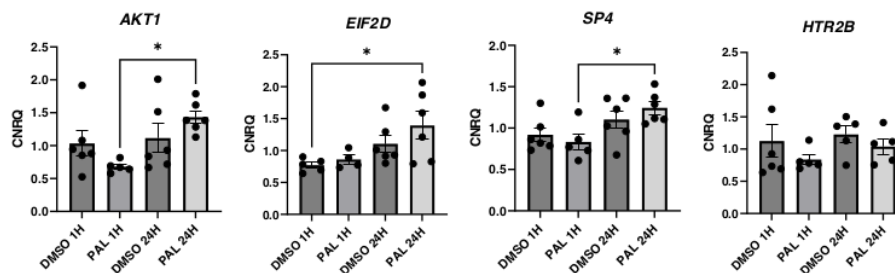


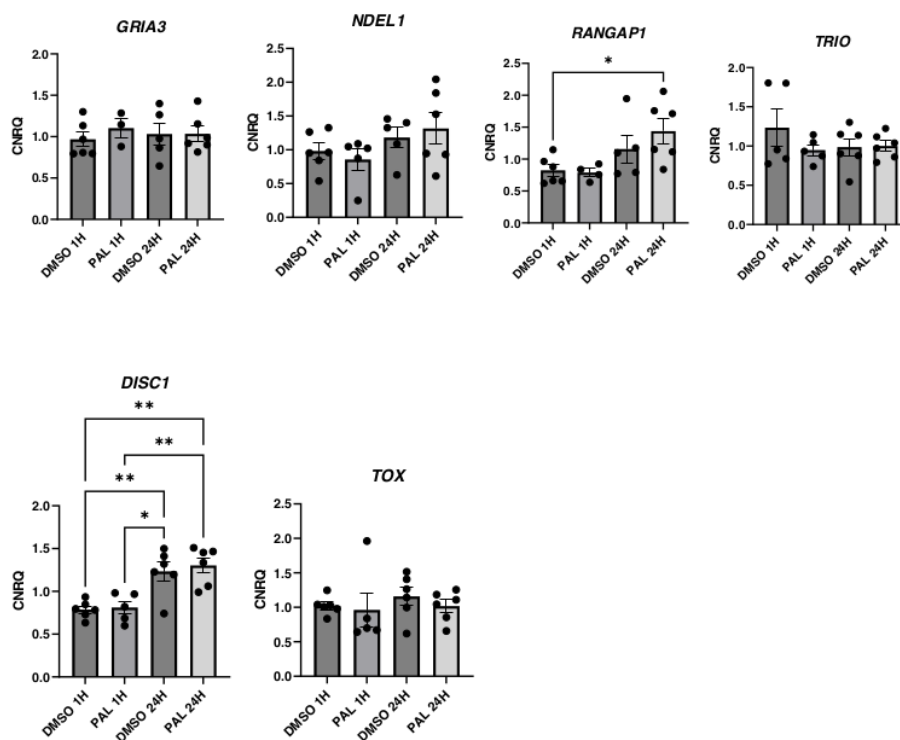
**Figura 5. Expresión génica relativa de los marcadores neuronales entre los pases 3, 7 y 8 de células del neuroepitelio olfativo.** Para cada gen, se representa la media de expresión relativa normalizada (CNRQ) con el error estándar de la media (SEM) de cada grupo de tratamiento. Los puntos individuales representan el CNRQ de cada triplicado. Todos los genes se han testado en células de pase 3, 7 y 8. P3: pase 3; P7: pase 7; P8: pase 8. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$

#### 4.4. Efecto del antipsicótico paliperidona sobre la expresión de genes de riesgo para la esquizofrenia

Para evaluar el efecto del antipsicótico paliperidona sobre las células neuroepiteliales se seleccionaron los genes relacionados con el riesgo a padecer esquizofrenia (*SP4*, *AKT1*, *EIF2D*, *NDEL1*, *RANGAP1*, *TOX*, *GRIA3*, *TRIO*, *DISC1*) y el gen que codifica para la subunidad del receptor serotoninérgico *HTR2B* que actúa como diana de la paliperidona. Para la normalización de los datos se emplearon los genes de referencia *GAPDH*, *HPRT1* y *PGK1*. Las estadísticas descriptivas de todos los genes analizados se presentan en el Anexo D, Tabla D1. La prueba ANOVA unidireccional no mostró diferencias significativas entre los grupos de tratamiento; sin embargo,

*SP4*, *AKT1*, *DISC1*, *EIF2D* y *RANGAP1* tendieron a verse afectados por el tiempo de incubación ( $p < 0,1$ ; consultar Figura 6 y Anexo D, Tablas D2 y D3). Estos resultados apuntan a que los efectos citotóxicos asociados al DMSO que se empleó como vehículo de la paliperidona y se dispuso tanto en los grupos control como en los de tratamiento pudieron haber afectado a la expresión de estos genes, especialmente en el caso de *DISC1*. Por otro lado, la ausencia de alteraciones significativas también puede ser debida al estado indiferenciado de la línea celular. Otra posibilidad es que el antipsicótico no tenga efectos a corto plazo (24 h), y se deban mantener las células en incubación con el antipsicótico durante más tiempo para obtener resultados significativos. Es importante señalar que las células neuroepiteliales obtenidas directamente del método de raspado no expresaron ninguna de las tres subunidades del receptor serotoninérgico de forma consistente, pues una de las subunidades mostraba la presencia de señales inespecíficas (*HTR2B*), mientras que las otras dos subunidades testadas presentaban una expresión nula (*HTR2A*) o muy baja (*HTR2C*), por lo que puede ser que no sea suficiente para ofrecer una respuesta significativa al tratamiento. Otra posibilidad es que simplemente estos genes no se vean afectados por el fármaco. En el futuro se podría probar el tratamiento de las células con antipsicóticos atípicos como la risperidona que, a diferencia de los antipsicóticos típicos como la paliperidona, presentan un mayor número de dianas. Otra opción sería promover la diferenciación de las células con cAMP antes del tratamiento con paliperidona.





**Figura 6. Expresión génica relativa de los genes de riesgo de esquizofrenia entre los cuatro grupos de tratamiento del ensayo de paliperidona en células del neuroepitelio olfativo.** Para cada gen, se representa la media de expresión relativa normalizada (CNRQ) con el error estándar de la media (SEM) de cada grupo de tratamiento. Los puntos individuales representan el CNRQ de cada triplicado. Se empleó DMSO como vehículo de la paliperidona, por sí solo actúa como grupo control. DMSO: sulfóxido de dimetilo; PAL: paliperidona. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01.

## 5. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados al inicio de este trabajo, se han alcanzado las siguientes conclusiones:

1. La población de células del neuroepitelio olfativo fue reconocida por el anticuerpo anti- $\beta$ III-tubulina que detecta tubulina específica de neuronas, lo que demuestra que las células poseen un linaje neuronal. Además, presentan estructuras citoesqueléticas propias del proceso de neuritogénesis, como neuritas y lamelipodios.
2. Las células neuroepiteliales expresan marcadores neuronales, por lo que se verifica su fenotipo neuronal.

3. La expresión de genes asociados con el riesgo a padecer esquizofrenia abre la posibilidad al empleo de esta línea celular como modelo para el estudio de nuevos biomarcadores para el diagnóstico de la esquizofrenia y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos frente a este trastorno.
4. Pese a que las células conservan su fenotipo neuronal a lo largo de los pases, desde el punto de vista morfológico, de velocidad de crecimiento y nivel de expresión génica la línea de células neuroepiteliales no es estable. Con el aumento de número de pase la morfología de las células evoluciona de un fenotipo más alargado a uno más globoso, su velocidad de crecimiento disminuye y la población de progenitores neuronales disminuye debido a un aumento de expresión de genes marcadores de neuronas post-mitóticas.
5. El antipsicótico paliperidona no mostró efectos significativos sobre la expresión de los genes identificados como factores de riesgo para esquizofrenia.

En definitiva, los resultados respaldan que el cultivo *in vitro* de precursores neurales obtenidos de la cavidad nasal por el método de raspado constituye un buen modelo experimental para estudiar la fisiopatología de la SZ, así como el proceso de neurodesarrollo a tiempo real en pacientes sanos y controles. Para obtener fenotipos más similares a las neuronas adultas, se recomienda trabajar con células neuroepiteliales en pases tempranos (pase 2, 3 y 4). Futuros ensayos que se proponen son la diferenciación de las células neuroepiteliales con cAMP, con el objetivo de obtener un fenotipo más cercano al de las neuronas del SNC.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th edition). Ed. American Psychiatric Association. Washington, DC.
- AOKI, K., OSUMI-YAMASHITA, N., NINOMIYA, Y., & ETO, K., 1995. Differential expression of N-CAM, vimentin and MAP1B during initial pathfinding of olfactory receptor neurons in the mouse embryo. *Anatomy and Embryology*, 192(3).
- BENÍTEZ-KING, G., RIQUELME, A., ORTÍZ-LÓPEZ, L., BERLANGA, C., RODRÍGUEZ-VERDUGO, M. S., ROMO, F., CALIXTO, E., SOLÍS-CHAGOYÁN, H., JÍMENEZ, M., MONTAÑO, L. M., RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, G., MORALES-MULIA, S., & DOMÍNGUEZ-ALONSO, A., 2011. A non-invasive method to isolate the neuronal lineage from the nasal epithelium from schizophrenic and bipolar diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, 201(1): 35-45.

- 2 BENÍTEZ-KING, G., VALDÉS-TOVAR, M., TRUETA, C., GALVÁN-ARRIETA, T., ARGUETA, J., ALARCÓN, S., LORA-CASTELLANOS, A., & SOLÍS-CHAGOYÁN, H., 2016. The microtubular cytoskeleton of olfactory neurons derived from patients with schizophrenia or with bipolar disorder: Implications for biomarker characterization, neuronal physiology and pharmacological screening. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 73: 84-95.
- BROZZETTI, L., SACCHETTO, L., CECCHINI, M. P., AVESANI, A., PERRA, D., BONGIANNI, M., PORTIOLI, C., SCUPOLI, M., GHETTI, B., MONACO, S., BUFFELLI, M., & ZANUSSO, G., 2020. Neurodegeneration-Associated Proteins in Human Olfactory Neurons Collected by Nasal Brushing. *Frontiers in Neuroscience*, 14: 145.
- CHEN, J., BACANU, S.-A., YU, H., ZHAO, Z., JIA, P., KENDLER, K. S., KRANZLER, H. R., GELERNTER, J., FARRER, L., MINICA, C., POOL, R., MILANESCHI, Y., BOOMSMA, D. I., PENNINX, B. W. J. H., TYNDALE, R. F., WARE, J. J., VINK, J. M., KAPRIO, J., MUNAFÒ, M., & VANYUKOV, M., 2016. Genetic Relationship between Schizophrenia and Nicotine Dependence. *Scientific Reports*, 6(1): 25671.
- CHOW, T. J., TEE, S. F., LOH, S. Y., YONG, H. S., ABU BAKAR, A. K., & TANG, P. Y., 2020. Analysis of variants of AKT1 in schizophrenia multiplex families. *Asian Journal of Psychiatry*, 49: 101957.
- CRESPO-FACORRO, B., PRIETO, C., & SAINZ, J., 2015. Schizophrenia Gene Expression Profile Reverted to Normal Levels by Antipsychotics. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(4).
- DA SILVA, J. S., & DOTTI, C. G., 2002. Breaking the neuronal sphere: Regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9): 694-704.
- DAVIS K. L., KAHN R. S., KO G., & DAVIDSON M., 1991. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *American Journal of Psychiatry*, 148(11), 1474-1486.
- 2 DELGADO-SEQUERA, A., HIDALGO-FIGUEROA, M., BARRERA-CONDE, M., DURAN-RUIZ, M. C., CASTRO, C., FERNÁNDEZ-AVILÉS, C., DE LA TORRE, R., SÁNCHEZ-GOMAR, I., PÉREZ, V., GERIBALDI-DOLDÁN, N., ROBLEDO, P., & BERROCOSO, E., 2021. Olfactory Neuroepithelium Cells from Cannabis Users Display Alterations to the Cytoskeleton and to Markers of Adhesion, Proliferation and Apoptosis. *Molecular Neurobiology*, 58(4): 1695-1710.

- DOSS, M. X., & SACHINIDIS, A., 2019. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*, 8(5): 403.
- EVGRAFOV, O. V., ARMOSKUS, C., WROBEL, B. B., SPITSYNA, V. N., SOUAIAIA, T., HERSTEIN, J. S., WALKER, C. P., NGUYEN, J. D., CAMARENA, A., WEITZ, J. R., KIM, J. M. "HUGO", LOPEZ DUARTE, E., WANG, K., SIMPSON, G. M., SOBELL, J. L., MEDEIROS, H., PATO, M. T., PATO, C. N., & KNOWLES, J. A., 2020. Gene Expression in Patient-Derived Neural Progenitors Implicates WNT5A Signaling in the Etiology of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 88(3): 236-247.
- GALINDO, L., MORENO, E., LÓPEZ-ARMENTA, F., GUINART, D., CUENCA-ROYO, A., IZQUIERDO-SERRA, M., XICOTA, L., FERNANDEZ, C., MENOYO, E., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J. M., BENÍTEZ-KING, G., CANELA, E. I., CASADÓ, V., PÉREZ, V., DE LA TORRE, R., & ROBLEDÓ, P., 2018. Cannabis Users Show Enhanced Expression of CB1-5HT2A Receptor Heteromers in Olfactory Neuroepithelium Cells. *Molecular Neurobiology*, 55(8): 6347-6361.
- GILABERT-JUAN, J., LÓPEZ-CAMPOS, G., SEBASTIÁ-ORTEGA, N., GUARA-CIURANA, S., RUSO-JULVE, F., PRIETO, C., CRESPO-FACORRO, B., SANJUÁN, J., & MOLTÓ, M. D., 2019. Time dependent expression of the blood biomarkers EIF2D and TOX in patients with schizophrenia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 80: 909-915.
- HAHN, C.-G., HAN, L.-Y., RAWSON, N. E., MIRZA, N., BORGMANN-WINTER, K., LENOX, R. H., & ARNOLD, S. E., 2005. In vivo and in vitro neurogenesis in human olfactory epithelium. *The Journal of Comparative Neurology*, 483(2): 154-163.
- HAYASHI, M. A. F., FELICORI, L. F., FRESQUI, M. A. C., & YONAMINE, C. M., 2015. Protein-Protein and Peptide-Protein Interactions of NudE-Like 1 (Ndel1): A Protein Involved in Schizophrenia. *Current Protein & Peptide Science*, 16(8): 754-767.
- HEGG, C. C., AU, E., ROSKAMS, A. J., & LUCERO, M. T., 2003. PACAP Is Present in the Olfactory System and Evokes Calcium Transients in Olfactory Receptor Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 90(4): 2711-2719.
- IDOTTA, C., TIBALDI, E., BRUNATI, A. M., PAGANO, M. A., CADAMURO, M., MIOLA, A., MARTINI, A., FAVARETTO, N., CAZZADOR, D., FAVARO, A., PAVAN, C., PIGATO, G., TENCONI, E., GENTILI, F., CREMONESE, C., BERTOCCI, I., SOLMI, M., & TOFFANIN, T., 2019. Olfactory



- neuroepithelium alterations and cognitive correlates in schizophrenia. *European Psychiatry*, 61: 23-32.
- JAAIRO-PELED, H., & SAWA, A., 2020. Neurodevelopmental Factors in Schizophrenia. *Psychiatric Clinics of North America*, 43(2): 263-274.
- JIMÉNEZ-VACA, A. L., BENITEZ-KING, G., RUIZ, V., RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, G. B., HERNÁNDEZ-DE LA CRUZ, B., SALAMANCA-GÓMEZ, F. A., GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H., RAMÍREZ-SÁNCHEZ, I., ORTÍZ-LÓPEZ, L., VÉLEZ-DEL VALLE, C., & ORDOÑEZ-RAZO, R. MA., 2018. Exfoliated Human Olfactory Neuroepithelium: A Source of Neural Progenitor Cells. *Molecular Neurobiology*, 55(3): 2516-2523.
- KAHN, R. S., & SOMMER, I. E., 2015. The neurobiology and treatment of first-episode schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 20(1): 84-97.
- MIRET, S., DE GROENE, E. M., & KLAFFKE, W. (2006). Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *SLAS Discovery*, 11(2): 184-193.
- MORRIS, J. K., KANDPAL, G., MA, L., & AUSTIN, C. P., 2003. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: Regulation and loss of interaction with mutation. *Human Molecular Genetics*, 12(13): 1591-1608.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 2022. *Esquizofrenia*, visto el 12 de mayo de 2023 <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>
- RÄSÄNEN, N., TIIHONEN, J., KOSKUVI, M., LEHTONEN, Š., & KOISTINAHO, J., 2022. The iPSC perspective on schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, 45(1): 8-26.
- ROISEN, F. J., KLUEBER, K. M., LU, C. L., HATCHER, L. M., DOZIER, A., SHIELDS, C. B., & MAGUIRE, S., 2001. Adult human olfactory stem cells. *Brain Research*, 890(1): 11-22.
- ROSS, C. A., MARGOLIS, R. L., READING, S. A. J., PLETNIKOV, M., & COYLE, J. T., 2006. Neurobiology of Schizophrenia. *Neuron*, 52(1): 139-153.
- SAINZ, J., PRIETO, C., RUSO-JULVE, F., & CRESPO-FACORRO, B., 2018. Blood Gene Expression Profile Predicts Response to Antipsychotics. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11: 73.

- SINGH, T., POTERBA, T., CURTIS, D., AKIL, H., AL EISSA, M., BARCHAS, J. D., BASS, N., BIGDELI, T. B., BREEN, G., BROMET, E. J., BUCKLEY, P. F., BUNNEY, W. E., BYBJERG-GRAUHOLM, J., BYERLEY, W. F., CHAPMAN, S. B., CHEN, W. J., CHURCHHOUSE, C., CRADDOCK, N., CUSICK, C. M., & DALY, M. J., 2022. Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia. *Nature*, 604(7906): 509-516.
- STAHL, S. M., 2018. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: Dopamine, serotonin, and glutamate. *CNS Spectrums*, 23(3): 187-191.
- STĘPNICKI, P., KONDEJ, M., & KACZOR, A. A., 2018. Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. *Molecules*, 23(8): 2087.
- THUKRAL, V., CHIKARAISHIA, D., HUNTER, D. D., & WANG, J. K. T., 1997. Expression of non-N-methyl-d-aspartate glutamate receptor subunits in the olfactory epithelium. *Neuroscience*, 79(2): 411-424.
- TRUBETSKOY, V., PARDIÑAS, A. F., QI, T., PANAGIOTAROPOULOU, G., AWASTHI, S., BIGDELI, T. B., BRYOIS, J., CHEN, C.-Y., DENNISON, C. A., HALL, L. S., LAM, M., WATANABE, K., FREI, O., GE, T., HARWOOD, J. C., KOOPMANS, F., MAGNUSSON, S., RICHARDS, A. L., SIDORENKO, J., & VAN OS, J., 2022. Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature*, 604(7906): 502-508.
- UNO, Y., & COYLE, J. T., 2019. Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 73(5): 204-215.
- UNTERGASSER, A., RUIJTER, J. M., BENES, V., & VAN DEN HOFF, M. J. B., 2021. Web-based LinRegPCR: Application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data. *BMC Bioinformatics*, 22(1): 398.
- WINSHIP, I. R., DURSUN, S. M., BAKER, G. B., BALISTA, P. A., KANDRATAVICIUS, L., MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P., HALLAK, J., & HOWLAND, J. G., 2019. An Overview of Animal Models Related to Schizophrenia. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 64(1): 5-17.
- YANG, A., & TSAI, S.-J., 2017. New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8): 1689.

YI, X., LI, M., HE, G., DU, H., LI, X., CAO, D., WANG, L., WU, X., YANG, F., CHEN, X., HE, L., PING, Y., & ZHOU, D., 2021. Genetic and functional analysis reveals TENM4 contributes to schizophrenia. *Science*, 24(9): 103063.

ZHAO, Y., LIANG, X., ZHU, F., WEN, Y., XU, J., YANG, J., DING, M., CHENG, B., MA, M., ZHANG, L., CHENG, S., WU, C., WANG, S., WANG, X., NING, Y., GUO, X., & ZHANG, F., 2018. A large-scale integrative analysis of GWAS and common meQTLs across whole life course identifies genes, pathways and tissue/cell types for three major psychiatric disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 95: 347-352.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Anexo A

#### Marcadores neuronales y genes asociados con el riesgo de esquizofrenia. Secuencias de los cebadores obtenidos mediante *Primer Blast*

**Tabla A1.** Información de *Primer Blast* y secuencias para los genes que se clasifican como marcadores neuronales

Gen	Referencia Transcrito	Temp. Hibridación (°C)	Secuencia (5' a 3')	Tamaño de producto (pb)
<i>PACAP</i>	NM_001117.5	60.0	F: TAACGAGGCCTACCGCAAAG R: GTGAAGATCCCGTCCGAGTG	150
<i>TUBB3</i>	NM_001197181.2	60.0	F: TCAGCGTCTACTACAACGAGGC R: GCCTGAAGAGATGTCAAAGGC	120
<i>NES</i>	NM_006617.2	60.0	F: AGCGTTGGAACAGAGGTTGG R: GAGCGATCTGGCTCTGTAGG	119
<i>NEUN</i>	NM_001385818.1	60.0	F: AAGAAGACGGGGAACCCCTA R: GGAACCCCGTCACTGCATAG	94
<i>OMP</i>	NM_006189.1	60.0	F: CTGTGTACCGCCTCAACTTCA R: GAGGTCAGGCGTCCAGTTC	122
<i>VIM</i>	NM_003380.5	60.0	F: GCTTCAGAGAGAGGAAGCCG R: AAGGTCAAGACGTGCCAGAG	82
<i>MAP1B</i>	NM_001324255.2	60.0	F: GGAGACCAAGAATGCTGCCA R: TGGTCGTCTTGGTAGTTCCTG	83
<i>TAU</i>	NM_001203252.2	60.0	F: CCTCGCCTCTGTGCGACTATC R: GTACGTCCCAGCGTGATCTT	93
<i>DISC1</i>	NM_001164544.2	60.0	F: TCCATCACGAGACGAGACTG R: GGCTTCCAGCACAAACATCC	93
<i>GRIK5</i>	NM_001301030.2	60.0	F: CGGTCTCCGAATCCTCAAG R: GCTGTCGTCCAACATCCTCA	146
<i>DRD2 (Torretta)</i>	NM_016574.4	60.0	F: CCCAGCAGAAGGAGAAGAAAG R: CAGGATGTGCGTGATGAAGA	95
<i>DRD2 (V3)</i>	NM_016574.4	60.0	F: GGCGCCCTATGGCTTGA R: CCGTCTGACCCGTTGAAGG	130
<i>HTR2A</i>	NM_001165947.5	60.0	F: TACGTCGCCATCCAGAATCC R: CGTCCTGTAGCCCAAAGACT	133
<i>HTR2B</i>	NM_001320758.2	60.0	F: TCTAATGTCCTGGCGGTGG R: ATAGAACAAGTGGGAGGGGC	107
<i>HTR2C</i>	NM_001256760.3	60.0	F: ATGGTGAACCTGAGGAATGCG R: CTGCTACTGGGCTCACAGAAA	94

**Tabla A2.** Información de *Primer Blast* y secuencias para los genes relacionados con el riesgo de padecer esquizofrenia.

Gen	Referencia Transcrito	Temp. Hibridación (°C)	Secuencia (5' a 3')	Tamaño de producto (pb)
<i>AKT1</i>	NM_001014431.1	60.0	F: CGAGAAGAAGCTCAGCCAC R: CTGTCCACACACTCCATGCT	138
<i>EIF2D</i>	NM_006893	60.0	F: GGGGGAGCAGATTTGATGCT R: CCCACAAAGAAATGGCACAG	95
<i>GRIA3</i>	NM_000828.5	60.0	F: TTTAGTCCTGGGGCTTTGGG R: TTCTCGGTGGTGTCTGGTTG	150
<i>GRIN2A</i>	NM_001134408.2	60.0	F: GCCTTGCTTCAGTTTGTGGG R: TTCTCGTTGTGGCAGATCCC	80
<i>NDEL1</i>	NM_001025579.3	60.0	F: TCCTTACCAGAAAGCTATACCA R: CCCCCACGATGTTTAGTGCT	86
<i>NISCH</i>	NM_007184	60.0	F: AGAGGTCTGTCTGGATGACAC R: TTGGACTIONGACCTCTGGC	96
<i>RANGAP1</i>	NM_002883.4	60.0	F: ACATGGGTCTGCTCAAGAGTG R: GGGCCTTGGGGAAATAGTCC	108
<i>SP4</i>	NM_003112.5	60.0	F: CGAAGAGTTGCTGTTCTGT R: CCAGCGAAGATGTGCTCGTAA	150
<i>TENM4</i>	NM_001098816.3	60.0	F: CCCCTTTGATGACACTCGCT R: TGGTGCCATCCACGAAGTAG	116
<i>TOX</i>	NM_014729	60.0	F: GGAGAAGAGCAAAAACAGGTCT R: AAGGCTGGCTCTGTATGCTG	90
<i>TRIO</i>	NM_007118.4	60.0	F: GTGACGCACATCAAAGCTCC R: ACCACGTACTGCTGACACTG	131

**Tabla A3.** Información de *Primer Blast* y secuencias para los genes de referencia

Gen	Referencia Transcrito	Temp. Hibridación (°C)	Secuencia (5' a 3')	Tamaño de producto (pb)
<i>PGK1</i>	NM_000291.4	60.0	F: AGAAGGCTGGTGGGTTTTGA R: AGCTGGATCTTGTCTGCAACT	121
<i>GAPDH</i>	NM_001357943.2	60.0	F: CTCATGACCACAGTCCATGC R: GCCATCCACAGTCTTCTGGG	51
<i>HPRT1</i>	NM_000194.3	60.0	F: GCTTTCCTTGGTCAGGCAGT R: CAACACTTCGTGGGGTCCTT	80
<i>RS27A</i>	NM_002954.6	60.0	F: CTTTTCGATCCGCCATCTGC R: ACCTCGAGGGTGATGGTCTT	88

*Nota:* Referencia de transcrito (NM): primer código usado en el NCBI para el diseño de los cebadores. Temperatura de hibridación: temperatura usada para el paso de desnaturalización durante la RT-PCR. F: primer directo (*forward*). R: primer reverso (*reverse*). Todos los cebadores fueron sintetizados por la empresa Merck, bajo la marca Sigma-Aldrich.

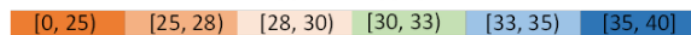
## 7.2. Anexo B

### Resultados del análisis de expresión mediante qPCR de dos categorías de genes: marcadores neuronales y genes asociados con el riesgo de esquizofrenia

**Tabla B1.** Marcadores neuronales testados sobre células neuroepiteliales y muestras de tejido de cerebro *post mortem*. Los genes están clasificados según su nivel de expresión en células neuroepiteliales.

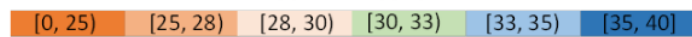
Nivel de expresión alto (Ct < 30)				
Gen	Muestra	C <sub>T</sub>	Gráfico de curva de fusión	Comentarios
<b>VIM</b>	N1	17.6 - 18		
	N2	16.9 -		
		17.2		
		17.5		
	N3	- 17.9		
<b>MAP1B</b>	N1	22.5 -		
	N2	23.2 21.8 - 22		
		23.4		
	N3	- 23.6		
<b>TUBB3</b>	N1	24.2		Los cebadores son inespecíficos. TUBB3 es una potencial diana de unión, con el mismo tamaño de amplicón que TUBB3
	N2	23.5		
	N3	26		
<b>NES</b>	N1	29		
	N2	27.9- 28.5		
	N3	29.8 -		
		30.2		
<b>DISC1</b>	N1	29 29.6		
	N2	28.8 - 29		
	N3	29.8 -		
		30.2		

ESCALA DE COLOR



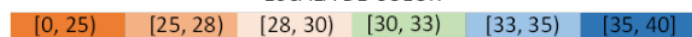
Nivel de expresión bajo (Ct > 30)				
Gen	Muestra	C <sub>T</sub>	Gráfico de curva de fusión	Comentarios
TAU	N1	33.9		
		—		
	N2	34.2		
		32.2		
	N3	- 33		
		33.3		
OMP	N1	32 -		
		33.6		
	N2	32.6		
		—		
	N3	33.6		
		35.7		
GRIK5	HT1	33.7		
		32.8		
	CT2	-		
		35.3		
	CT3	34.0		
		-		
GRIK5	HT1	35.6		
		32.4		
	CT2	-		
		37.3		
	CT3	36.2		
		—		
GRIK5	HT1	39.4		
		32.9		
	CT2	—		
		34.6		
	CT3	34.8		
		25.1-		
GRIK5	HT1	25.4		
		26.8-		
	CT2	26.9		
		27.1-		
	CT3	27.7		
		27.7		

ESCALA DE COLOR

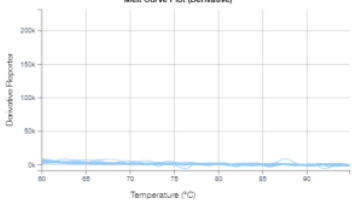
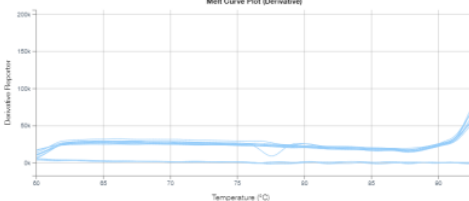
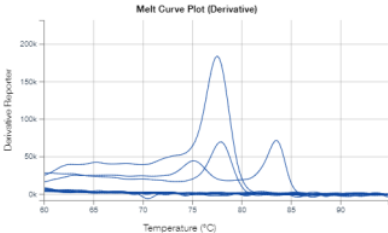
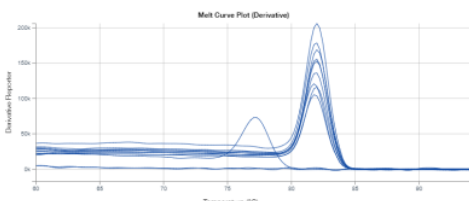


Nivel de expresión muy bajo (Ct > 35)				
Gen	Muestra	C <sub>T</sub>	Gráfico de curva de fusión	Comentarios
DRD2 (Torretta)	N1	35		Mala señal con los dos pares de cebadores. En la electroforesis solo observamos en un caso una banda específica. Los cebadores probablemente funcionan, pero la expresión es baja.
	N2	37.9		
	N3	*		
	HT1	31.2-32.8		
	CT2	33-33.4		
	CT3	31.8-33.8		
DRD2 (V3)	N1	33.2		
	N2	38.2		
	N3	*		
	HT1	31.7-32.3		
	CT2	32.1-33.7		
	CT3	33.2-34.3		
HTR2C	N1	34.6		
	N2	31.6 - 35.6		
	N3	*		
	HT1	29.0-29.7		
	CT2	31.7-32.4		
	CT3	32.9-34.4		

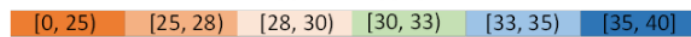
ESCALA DE COLOR





Ausencia de expresión				
Gen	Muestra	C <sub>T</sub>	Gráfico de curva de fusión	Comentarios
PACAP	N1	*		Indeterminado. No hay expresión
	N2	*		
	N3	*		
	HT1	28.0-29.7		
	CT2	30.8-31.5		
	CT3	31.4-31.6		
HTR2A	N1	32.5		No hay expresión
	N2	*		
	N3	*		
	HT1	26.1-26.3		Aunque no observamos expresión en las células neuroepiteliales, en cerebro <i>post mortem</i> parece haber expresión
	CT2	28.8-29.6		
	CT3	29.0-29.3		

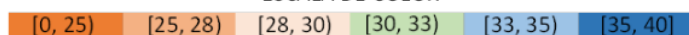
ESCALA DE COLOR



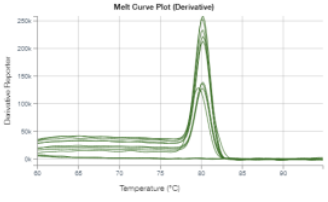
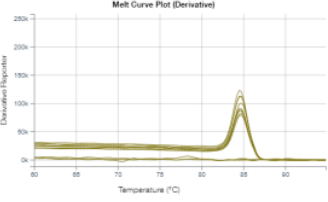
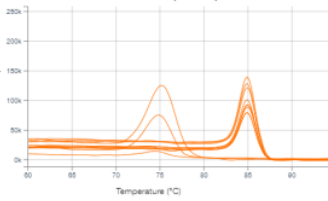
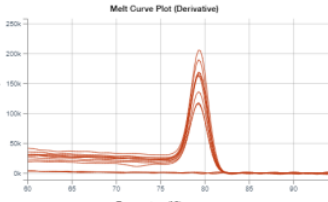
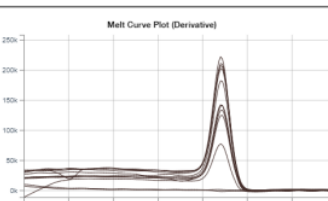
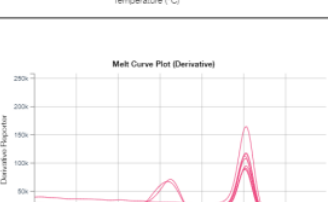
Presencia de señales inespecíficas				
Gen	Muestra	C <sub>T</sub>	Gráfico de curva de fusión	Comentarios
NEUN	N1	28.6 - 31.2		Las muestras de agua ofrecen un patrón similar al de las muestras celulares. Bandas muy pequeñas fueron observadas en la electroforesis, posiblemente se correspondan con dímeros de cebadores o estructuras secundarias de los cebadores
	N2	31.3 - 31.7		
	N3	30.9 - 31.1		
	HT1	27.6 - 27.9		
	CT2	25.3 - 25.4		
	CT3	25.9 - 26.2		
HTR2B	N1	27.1 - 28		En la electroforesis observamos una pequeña banda correspondiente al control negativo, posiblemente estructuras de cebadores secundarios
	N2	26 - 26.9		
	N3	27.6 - 27.9		
	HT1	30.3 - 31.7		
	CT2	31.5 - 33		
	CT3	31.3 - 32.7		Probablemente error de pipeteo

**Nota:** N: células neuroepiteliales de pase 3; N1: primera réplica; N2: segunda réplica; N3: tercera réplica. H: hipocampo de cerebro *post mortem*; C: córtex de cerebro *post mortem*; C1: primera réplica; C2: segunda réplica

ESCALA DE COLOR



**Tabla B2.** Genes asociados con el riesgo a padecer esquizofrenia testados sobre células neuroepiteliales.

Gen	Muestra	C <sub>T</sub>	Gráfico de curva de fusión	Comentarios
<b>SP4</b>	N1	29.2-30.4		
	N2	28.8-29.3		
	N3	31.1-31.9		
<b>AKT1</b>	N1	23.9-24		
	N2	22.5-22.6		
	N3	23.9-24.4		
<b>EIF2D</b>	N1	25.2-25.5		
	N2	24.5-24.7		
	N3	26.1-26.9		
<b>NDEL1</b>	N1	24.6-24.8		
	N2	23.9-24.3		
	N3	25.6-26		
<b>NISCH</b>	N1	26.3-26.7		
	N2	25.8		
	N3	27.5-27.9		
<b>RANGAP1</b>	N1	24.2		
	N2	22.9		
	N3	24.5-24.8		

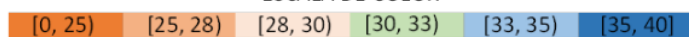
ESCALA DE COLOR

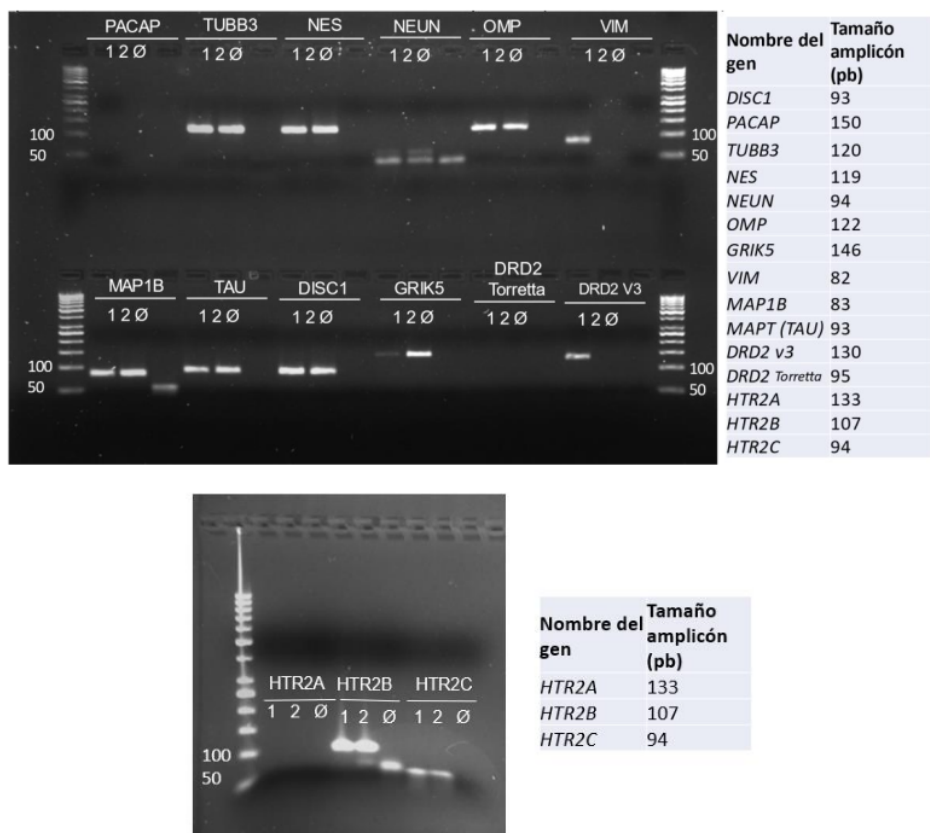


Gen	Muestra	C <sub>T</sub>	Gráfico de curva de fusión	Comentarios
<b>TOX</b>	N1	28.3-29.2		
	N2	28.5		
	N3	29.4-29.8		
<b>GRIA3</b>	N1	27.1-27.3		
	N2	26-26.3		
	N3	27.5-28.2		
<b>TENM4</b>	N1	30.9-31.1		
	N2	30.3-30.9		
	N3	31.4-32		
<b>TRIO</b>	N1	23-23.3		
	N2	22.5-22.8		
	N3	23.9-24.2		
<b>GRIN2A</b>	N1	31.7-32.9		
	N2	30.6-31.8		
	N3	34.7-34.9		

Nota: N: células neuroepiteliales de pase 3; N1: primera réplica; N2: segunda réplica; N3: tercera réplica.

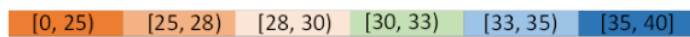
#### ESCALA DE COLOR





**Figura B1. Electroforesis para comprobar los amplificados de la qPCR donde se testaron diferentes primers para marcadores neuronales en muestras de células neuroepiteliales.** Se prepararon dos geles de agarosa al 3% y se empleó un marcador de pesos moleculares de 50 pb (Thermofisher). Para cada gen se testaron dos réplicas (1 y 2). Como control negativo se empleó agua (Ø). Para cada gen se indica su correspondiente tamaño de amplicón (pb).

ESCALA DE COLOR



### 7.3. Anexo C

#### Ensayo estabilidad de la línea de células procedentes del neuroepitelio olfativo.

##### Tablas de resultados de análisis y resumen estadístico

**Tabla C1.** Expresión génica relativa para el ensayo de estabilidad de células del neuroepitelio olfativo.

Gen	n	Pase 3			n	Pase 7			n	Pase 8		
		Media CNRQ con error estándar (SEM)				Media CNRQ con error estándar (SEM)				Media CNRQ con error estándar (SEM)		
DISC1	4	0.437	±	0.088	2	1.425	±	0.178	3	2.697	±	0.260
TUBB3	6	0.605	±	0.169	3	1.828	±	0.283	3	2.598	±	0.456
VIM	6	0.831	±	0.049	3	1.155	±	0.019	2	1.450	±	0.045
NES	4	1.712	±	0.798	3	2.153	±	0.185	2	0.333	±	0.157
MAP1B	6	0.535	±	0.067	3	1.264	±	0.089	3	3.008	±	0.108

**Tabla C2.** Resultados del ANOVA unidireccional ordinario para el ensayo de estabilidad sobre células del neuroepitelio olfativo.

Gen	Predictor	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (DF)	Media cuadrados (MS)	F	Valor p
<i>DISC1</i>	Tratamiento	8.759	2	4.379	47.000	0.0002***
	Residuos	0.559	6	0.093		
<i>TUBB3</i>	Tratamiento	8.642	2	4.321	15.060	0.0013**
	Residuos	2.583	9	0.287		
<i>VIM</i>	Tratamiento	0.637	2	0.319	32.620	0.0001***
	Residuos	0.078	8	0.010		
<i>NES</i>	Tratamiento	4.158	2	2.079	1.580	0.2811
	Residuos	7.898	6	1.316		
<i>MAP1B</i>	Tratamiento	12.250	2	6.126	219.800	< 0.0001****
	Residuos	0.251	9	0.028		

**Tabla C3.** Comparaciones múltiples test ANOVA unidireccional ordinario para el ensayo de estabilidad sobre células del neuroepitelio olfativo.

Gen	Comparaciones entre muestras	Diferencia entre medias	Valor p ajustado
<i>DISC1</i>	P3 vs. P7	-0.9875	0.0226*
	P3 vs. P8	-2.26	0.0002***
	P7 vs. P8	-1.273	0.0091**
<i>TUBB3</i>	P3 vs. P7	-1.222	0.0254*
	P3 vs. P8	-1.993	0.0014**
	P7 vs. P8	-0.7703	0.2364
<i>VIM</i>	P3 vs. P7	-0.3243	0.0042**
	P3 vs. P8	-0.6188	0.0002***
	P7 vs. P8	-0.2945	0.0276*
<i>MAP1B</i>	P3 vs. P7	-0.7295	0.0004***
	P3 vs. P8	-2.473	<0.0001****
	P7 vs. P8	-1.744	<0.0001****

**Tabla C4.** t-test para el ensayo de estabilidad sobre células del neuroepitelio olfativo para el gen *NES* entre los pases 7 y 8.

Gen	Comparaciones entre muestras	Diferencia entre medias	Valor p ajustado
<i>NES</i>	P7 vs. P8	-1.820	0.0064**

Nota: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001

## 7.4. Anexo D

### Ensayo efecto del antipsicótico paliperidona sobre células del neuroepitelio olfativo.

#### Tablas de resultados de análisis y resumen estadístico

**Tabla D1.** Expresión génica relativa para el ensayo del efecto del antipsicótico paliperidona sobre células del neuroepitelio olfativo.

Gen	Tiempo incubación	Control (DMSO)			Paliperidona		
		n	Media CNRQ con error estándar (SEM)		n	Media CNRQ con error estándar (SEM)	
<i>AKT1</i>	1 h	6	1.033	± 0.192	5	0.680	± 0.039
	24 h	6	1.114	± 0.218	6	1.432	± 0.096
<i>DISC1</i>	1 h	6	0.787	± 0.042	5	0.811	± 0.075
	24 h	6	1.232	± 0.108	6	1.303	± 0.091
<i>EIF2</i>	1 h	5	0.771	± 0.047	4	0.860	± 0.070
	24 h	6	1.104	± 0.132	6	1.393	± 0.219
<i>SP4</i>	1 h	6	0.919	± 0.086	5	0.832	± 0.099
	24 h	5	1.102	± 0.109	6	1.244	± 0.076
<i>HTR2B</i>	1 h	6	1.125	± 0.251	5	0.836	± 0.078
	24 h	5	1.225	± 0.134	5	1.039	± 0.117
<i>GRIA3</i>	1 h	6	0.967	± 0.086	3	1.103	± 0.119
	24 h	5	1.030	± 0.136	6	1.034	± 0.092
<i>NDEL1</i>	1 h	6	0.980	± 0.118	5	0.856	± 0.156
	24 h	5	1.180	± 0.152	6	1.316	± 0.233
<i>RANGAP1</i>	1 h	6	0.821	± 0.086	4	0.789	± 0.062
	24 h	5	1.157	± 0.213	6	1.439	± 0.193
<i>TRIO</i>	1 h	5	1.234	± 0.234	5	0.948	± 0.070
	24 h	6	0.985	± 0.110	6	1.001	± 0.066
<i>TOX</i>	1 h	6	1.023	± 0.054	5	0.962	± 0.252
	24 h	6	1.158	± 0.131	6	1.018	± 0.091



**Tabla D2.** Resultados del ANOVA unidireccional ordinario para el ensayo del efecto del antipsicótico paliperidona sobre células del neuroepitelio olfativo.

Gen	Predictor	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (DF)	Media cuadrados (MS)	F	Valor p
<i>AKT1</i>	Tratamiento	1.560	3	0.520	3.480	0.0363*
	Residuos	2.840	19	0.149		
<i>DISC1</i>	Tratamiento	1.282	3	0.427	10.590	0.0003***
	Residuos	0.767	19	0.040		
<i>EIF2</i>	Tratamiento	1.254	3	0.418	3.451	0.0401*
	Residuos	2.060	17	0.121		
<i>SP4</i>	Tratamiento	0.416	3	0.139	0.891	0.4656
	Residuos	2.644	17	0.156		
<i>HTR2B</i>	Tratamiento	0.575	3	0.192	3.853	0.0261*
	Residuos	0.945	19	0.050		
<i>GRIA3</i>	Tratamiento	0.039	3	0.013	0.225	0.8776
	Residuos	0.929	16	0.058		
<i>NDEL1</i>	Tratamiento	0.693	3	0.231	1.389	0.2784
	Residuos	2.992	18	0.166		
<i>RANGAP1</i>	Tratamiento	1.540	3	0.514	3.812	0.0295*
	Residuos	2.290	17	0.135		
<i>TRIO</i>	Tratamiento	0.258	3	0.086	0.919	0.4517
	Residuos	1.684	18	0.094		
<i>TOX</i>	Tratamiento	0.119	3	0.040	0.353	0.788
	Residuos	2.126	19	0.112		

**Tabla D3.** Comparaciones múltiples test ANOVA unidireccional ordinario para el ensayo del efecto del antipsicótico paliperidona sobre células del neuroepitelio olfativo.

Gen	Comparaciones entre muestras	Diferencia entre medias	Valor p ajustado
<i>AKT1</i>	DMSO 1H vs. PAL 1H	0.3531	0.4523
	DMSO 1H vs. DMSO 24H	-0.0804	0.9835
	DMSO 1H vs. PAL 24H	-0.3982	0.311
	PAL 1H vs. DMSO 24H	-0.4335	0.2812
	PAL 1H vs. PAL 24H	-0.7513	0.0219*
	DMSO 24H vs. PAL 24H	-0.3178	0.5005
<i>DISC1</i>	DMSO 1H vs. PAL 1H	-0.02346	0.9974
	DMSO 1H vs. DMSO 24H	-0.4451	0.0056**
	DMSO 1H vs. PAL 24H	-0.5154	0.0015**
	PAL 1H vs. DMSO 24H	-0.4216	0.0127*
	PAL 1H vs. PAL 24H	-0.492	0.0035**
	DMSO 24H vs. PAL 24H	-0.07035	0.9288
<i>EIF2D</i>	DMSO 1H vs. PAL 1H	-0.08941	0.9803
	DMSO 1H vs. DMSO 24H	-0.3331	0.4152
	DMSO 1H vs. PAL 24H	-0.6221	0.0404*
	PAL 1H vs. DMSO 24H	-0.2437	0.7033
	PAL 1H vs. PAL 24H	-0.5327	0.1211
	DMSO 24H vs. PAL 24H	-0.289	0.4941
<i>SP4</i>	DMSO 1H vs. PAL 1H	0.08697	0.9164
	DMSO 1H vs. DMSO 24H	-0.1827	0.5034
	DMSO 1H vs. PAL 24H	-0.3249	0.0882
	PAL 1H vs. DMSO 24H	-0.2697	0.2239
	PAL 1H vs. PAL 24H	-0.4118	0.0307*
	DMSO 24H vs. PAL 24H	-0.1421	0.6917
<i>RANGAP1</i>	DMSO 1H vs. PAL 1H	0.03159	0.9991
	DMSO 1H vs. DMSO 24H	-0.3358	0.453
	DMSO 1H vs. PAL 24H	-0.6178	0.0434*
	PAL 1H vs. DMSO 24H	-0.3674	0.4635
	PAL 1H vs. PAL 24H	-0.6494	0.0609
	DMSO 24H vs. PAL 24H	-0.282	0.5939

Nota: \* $p < 0.1$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$

## 7.5 Anexo E

### Relación del TFG con los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) de la Agenda 2030

Objetivos de desarrollo sostenible	Alto	Medio	Bajo	Ninguno
<b>ODS 1.</b> Fin de la pobreza				X
<b>ODS 2.</b> Hambre cero				X
<b>ODS 3.</b> Salud y bienestar	X			
<b>ODS 4.</b> Educación de calidad				X
<b>ODS 5.</b> Igualdad de género				X
<b>ODS 6.</b> Agua limpia y saneamiento				X
<b>ODS 7.</b> Energía asequible y no contaminante				X
<b>ODS 8.</b> Trabajo decente y crecimiento económico				X
<b>ODS 9.</b> Industria, innovación e infraestructura				X
<b>ODS 10.</b> Reducción de las desigualdades				X
<b>ODS 11.</b> Ciudades y comunidades sostenibles				X
<b>ODS 12.</b> Producción y consumo responsables				X
<b>ODS 13.</b> Acción por el clima				X
<b>ODS 14.</b> Vida submarina				X
<b>ODS 15.</b> Vida de ecosistemas terrestres				X
<b>ODS 16.</b> Paz, justicia e instituciones sólidas				X
<b>ODS 17.</b> Alianzas para lograr los objetivos				X

#### Descripción de la relación del TFG con las ODS con el mayor grado de relación:

El presente proyecto cumple principalmente con dos de las metas del ODS 3, Salud y bienestar:

3.4 Para 2030, reducir en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles mediante la prevención y el tratamiento y promover la salud mental y el bienestar.

3.5 Fortalecer la prevención y el tratamiento del abuso de sustancias adictivas, incluido el uso indebido de estupefacientes y el consumo nocivo de alcohol.

La esquizofrenia es un trastorno mental crónico que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. La susceptibilidad a padecer esquizofrenia es el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales. Actualmente este trastorno solo se diagnostica mediante evaluación clínica (entrevistas semi-estructuradas) basada en el Manual Diagnóstico y Estadístico

de los Trastornos Mentales y solo cuando el paciente empieza a presentar los primeros episodios psicóticos. Por otro lado, de los pacientes que reciben medicación un 30 % presentan resistencia a la misma, lo cual es un porcentaje bastante elevado. Con este proyecto se pretende caracterizar células del neuroepitelio olfativo para determinar si sirven como modelo de estudio de la esquizofrenia y así poder investigar sobre nuevos biomarcadores que permitan un diagnóstico temprano de este trastorno, así como nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos eficaces frente a la esquizofrenia. Con ello, se pretende promover la salud y la calidad de vida de los pacientes. Además, la esquizofrenia es un trastorno que se relaciona con el consumo de sustancias adictivas como la nicotina (muchos pacientes son fumadores) y el consumo de estupefacientes, por lo que la prevención frente este tipo de sustancias es de especial interés para reducir la prevalencia de este trastorno.

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL  
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

neuroid.uprrp.edu

Fuente de Internet

1%

2

rodin.uca.es

Fuente de Internet

1%

Excluir citas

Activo

Excluir bibliografía

Activo

Excluir coincidencias < 70 words