

- Artículo
- [Publicado: 16 diciembre 2020](#)

La proteína S1 del SARS-CoV-2 cruza la barrera hematoencefálica en ratones

- [Elizabeth M. Rhea](#) ,
- [Aric F. Logsdon](#) ,
- [Kim M. Hansen](#) ,
- [lindsey m. williams](#) ,
- [Mayo J. Reed](#) ,
- [Kristen K. Baumann](#) ,
- [Sara J. Holden](#) ,
- [jacob raber](#) ,
- [William A. Bancos](#) y
- [Michelle A. Erickson](#)

[Neurociencia de la naturaleza](#) volumen 24 , paginas368–378 (2021) [Citar este artículo](#)

- 277k Accesos
- 84 citas
- 6578 Altmetric
- [Métricadetalles](#)

Abstracto

No está claro si el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2, que causa la enfermedad por coronavirus 2019, puede ingresar al cerebro. El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo se une a las células a través de la subunidad S1 de su proteína de punta. Mostramos que el S1 radioyodado inyectado por vía intravenosa (I-S1) cruzó fácilmente la barrera hematoencefálica en ratones macho, fue absorbido por regiones del cerebro y entró en el espacio cerebral parenquimatoso. I-S1 también fue absorbido por el pulmón, el bazo, el riñón y el hígado. El I-S1 administrado por vía intranasal también entró en el cerebro, aunque a niveles aproximadamente diez veces más bajos que después de la administración intravenosa. *APOE* el genotipo y el sexo no afectaron la absorción de I-S1 en todo el cerebro, pero tuvieron efectos variables en la absorción por el bulbo olfatorio, el hígado, el bazo y los riñones. La absorción de I-S1 en el hipocampo y el bulbo olfatorio se redujo por la inflamación inducida por lipopolisacáridos. Los estudios mecanísticos indicaron que I-S1 cruza la barrera hematoencefálica por transcitosis adsorptiva y que la enzima convertidora de angiotensina 2 murina está involucrada en la captación del cerebro y los pulmones, pero no en la captación del riñón, el hígado o el bazo.

[Descargar PDF](#)

Principal

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) es responsable de la pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). Además de la neumonía y la dificultad respiratoria aguda, la COVID-19 se asocia con una serie de síntomas relacionados con el SNC, que incluyen pérdida del gusto y el olfato, dolores de cabeza, espasmos, convulsiones, confusión, deterioro de la visión, dolor nervioso, mareos, alteración de la conciencia, náuseas y vómitos, hemiplejía, ataxia, ictus y hemorragia cerebral [1](#)·[2](#). Se ha postulado que algunos de los síntomas de la COVID-19 pueden deberse a acciones directas del virus sobre el SNC; por ejemplo, los síntomas respiratorios podrían deberse en parte a que el SARS-CoV-2 invade los centros respiratorios del cerebro [1](#)·[3](#). También se ha informado encefalitis en COVID-19, y podría ser el resultado de que el virus o las proteínas virales hayan ingresado al cerebro [4](#)·[5](#). El ARNm del SARS-CoV-2 se recuperó del líquido cefalorraquídeo [4](#), lo que sugiere que puede cruzar la barrera hematoencefálica (BBB). Otros coronavirus, incluido el virus SARS estrechamente relacionado que causó el brote de 2003-2004, pueden cruzar la BBB [6](#)·[7](#)·[8](#) y el SARS-CoV-2 puede infectar neuronas en un modelo BrainSphere [9](#). Sin embargo, el SARS-CoV-2 podría inducir cambios en el SNC sin cruzar directamente la BBB, ya que el COVID-19 está asociado con una tormenta de citoquinas y muchas citoquinas cruzan la BBB para afectar la función del SNC [10](#).

Aquí evaluamos si una proteína viral del SARS-CoV-2, la proteína del pico 1 (S1), puede cruzar la BHE. Esta pregunta es importante y clínicamente relevante por dos razones. En primer lugar, se ha demostrado que algunas proteínas que se desprenden de los virus cruzan la BHE, lo que induce neuroinflamación y, de otro modo, afecta las funciones del SNC [11](#)·[12](#)·[13](#)·[14](#)·[15](#)·[16](#)·[17](#). En segundo lugar, la proteína viral que se une a las células se puede usar para modelar la actividad del virus; en otras palabras, si la proteína de unión viral cruza la BBB, es probable que la proteína permita que el virus también cruce la BHE [18](#)·[19](#). S1 es la proteína de unión para SARS-CoV-2 (ref.[20](#)); se une a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) [21](#)·[22](#)·[23](#) y probablemente también a otras proteínas.

En este estudio, mostramos que I-S1 cruzó fácilmente la BBB murina, ingresó al tejido parenquimatoso del cerebro y, en menor grado, fue secuestrado por las células endoteliales del cerebro y asociado con el glucocáliz capilar cerebral. Describimos la tasa de entrada de I-S1 en el cerebro después de la administración intravenosa (iv) e intranasal, determinamos su captación en 11 regiones cerebrales diferentes, examinamos el efecto de la inflamación, el genotipo *APOE* y el sexo en el transporte de I-S1 y comparamos I-S1 captación en el cerebro a la captación en el hígado, riñón, bazo y pulmón. Sobre la base de experimentos con la glicoproteína WGA, encontramos que la entrada al cerebro de I-S1 probablemente implica el mecanismo dependiente de vesículas de transcitosis de adsorción.

Resultados

La proteína I-S1 se transporta a través de la barrera hematoencefálica del ratón

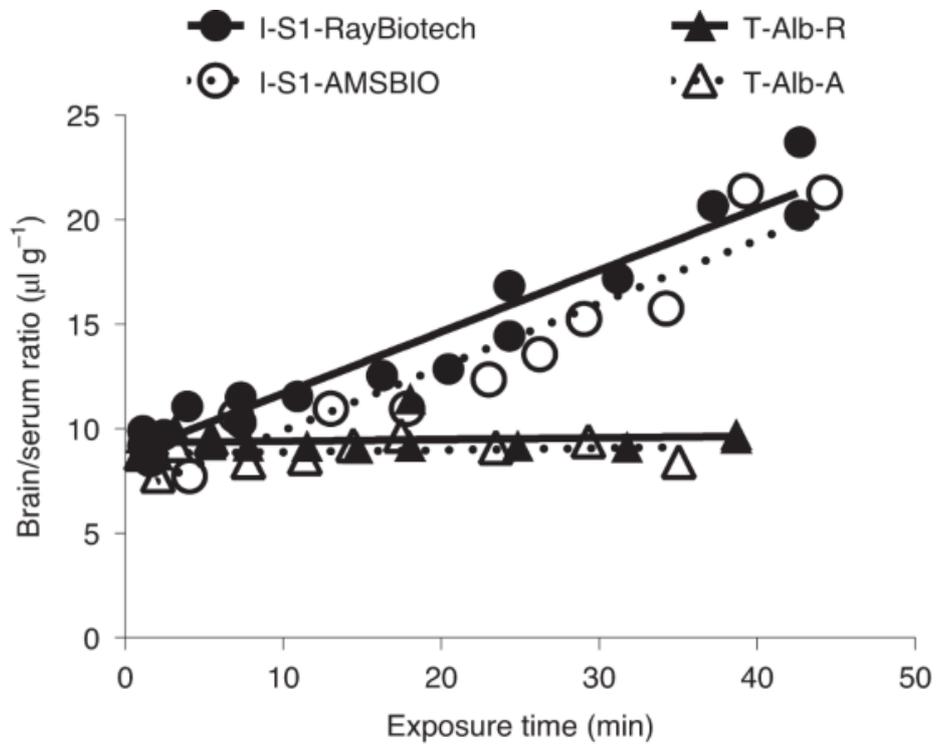
Obtuvimos proteínas S1 de dos fuentes comerciales: RayBiotech y AMSBIO. Las proteínas S1 se radiomarcaron internamente y se verificó que estaban intactas después del marcaje mediante geles de autorradiografía (datos extendidos, figura [1](#) y figura complementaria [1](#)). Determinamos si el I-S1 inyectado por vía intravenosa podría cruzar la BBB en ratones, midiendo su constante de flujo de sangre al cerebro (K_i) usando un

análisis de regresión de tiempo múltiple (MTRA). MTRA traza las proporciones de tejido/suero para I-S1 contra el tiempo de exposición, que es una medida de tiempo que se ha corregido para la eliminación de I-S1 de la sangre. La pendiente de la porción lineal de esta gráfica mide K_i , es decir, la constante de flujo de entrada unidireccional para I-S1.

Co-inyectamos albúmina marcada con ^{99m}Tc (T-Alb) junto con el I-S1. T-Alb cruza mal la BBB intacta y, por lo tanto, puede usarse para medir el espacio vascular del cerebro. Cualquier relación cerebro/suero para I-S1 que supere las relaciones cerebro/suero de T-Alb representa por lo tanto I-S1 extravascular; es decir, material que ha cruzado la BBB. T-Alb también se puede utilizar para medir la fuga de lechos de tejidos periféricos y de una BBB que ha sido interrumpida por una enfermedad o inflamación.

Los valores K_i de las proteínas I-S1 de las dos fuentes diferían en aproximadamente un 3% (Fig. 1). Estos resultados muestran que, a diferencia de T-Alb, I-S1 cruza fácilmente la BBB del ratón.

Fig. 1: Las proteínas S1 de dos fuentes comerciales, RayBiotech y AMSBIO, se transportan a través de la BBB del ratón.



| | K_i ($\mu\text{l g}^{-1} \text{min}^{-1}$) | V_i ($\mu\text{l g}^{-1}$) | r^2 |
|--------------------|--|--------------------------------|--------|
| I-S1 (RayBiotech) | 0.295 ± 0.022 | 8.74 ± 0.50 | 0.935 |
| I-S1 (AMSBIO) | 0.304 ± 0.033 | 6.88 ± 0.84 | 0.905 |
| T-Alb (RayBiotech) | 0.00800 ± 0.0134 | 9.332 ± 0.263 | 0.0266 |
| T-Alb (AMSBIO) | 0.00941 ± 0.0164 | 8.798 ± 0.287 | 0.0355 |

Las proporciones de cerebro/suero de I-S1 de RayBiotech y AMSBIO y T-Alb que se inyectó conjuntamente con I-S1-RayBiotech o I-S1-AMSBIO se representan frente al

tiempo de exposición. Las pendientes de las líneas representan el valor K_i de cada compuesto en $\mu\text{l g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ([Métodos](#)). La intersección del eje y (V_i) de cada compuesto refleja el espacio vascular en $\mu\text{l g}^{-1}$. Los valores de K_i y V_i (media \pm se) se calcularon mediante regresión lineal simple. El K_i para I-S1 (RayBiotech) fue significativamente distinto de cero ($P < 0,0001$), lo que indica que hubo captación cerebral. El K_i para I-S1 (AMSBIO) también fue significativamente distinto de cero ($P < 0,0001$). Las comparaciones estadísticas de las curvas I-S1 de cada proveedor no mostraron diferencias estadísticas entre los valores de K_i ($F(1,22) = 0,05881, p = 0,8106$), pero sí mostraron una diferencia entre los valores de V_i ($F(1,23) = 10,32, P = 0,0039$). El K_i para T-Alb-R no se desvió significativamente de cero ($P = 0,3556$), lo que indica que no hubo captación cerebral. el K_i el valor de T-Alb-A tampoco se desvió significativamente de cero ($P = 0,5792$). La aparente falta de captación cerebral de T-Alb indica que T-Alb permaneció confinado al espacio vascular y no se filtró.

[Datos fuente](#)

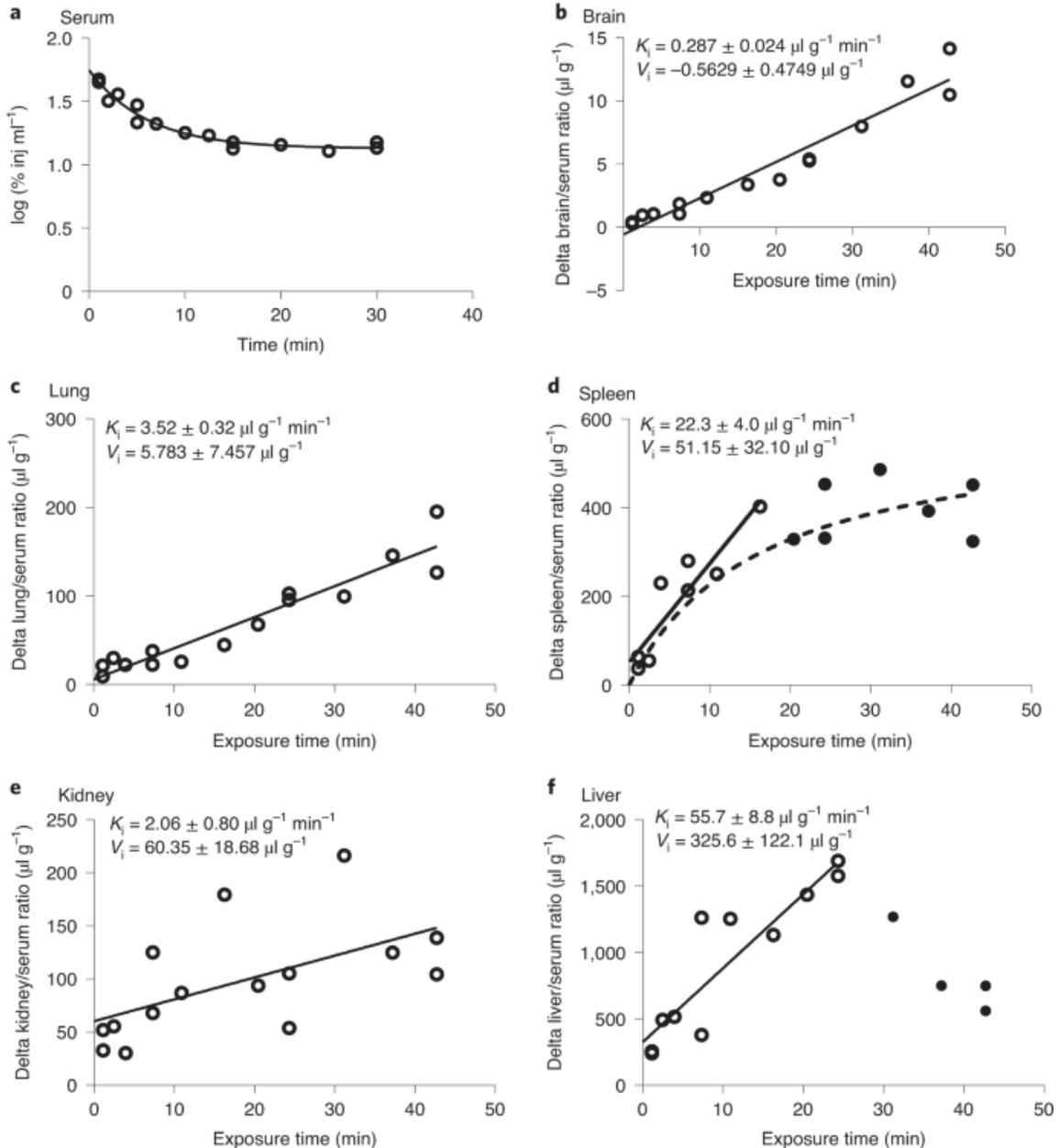
[imagen a tamaño completo](#)

I-S1 se elimina de la sangre y es absorbido por los tejidos periféricos

Determinamos la eliminación de I-S1 inyectado por vía intravenosa de RayBiotech de la sangre y su absorción en el cerebro y otros tejidos, nuevamente usando MTRA (Fig. 2). El aclaramiento de I-S1 de la sangre fue lineal durante los primeros 10 min, con un aclaramiento a la mitad del tiempo de aproximadamente 6,6 min (Fig. 2a), seguido de una meseta. En la Fig. 2 y las figuras posteriores, las proporciones de tejido/suero para T-Alb se restaron de las proporciones de tejido/suero para I-S1. Estas proporciones de tejido/suero 'delta' se corrigieron así para el I-S1 en el espacio vascular y para cualquier I-S1 que hubiera entrado en el tejido debido a un lecho capilar con fugas. Los valores delta resultantes representan así la captación específica de I-S1 por los tejidos.

Fig. 2: I-S1 (RayBiotech) se elimina de la sangre y es absorbido por los tejidos periféricos.

S1 glycoprotein (RayBiotech)



a, Aclaramiento de I-S1 (RayBiotech) de la sangre. Los datos se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial de una fase no lineal: $y = 0,617 (e^{-0,165 t}) + 1,13$ con una vida media de 4,20 min ($n = 15$ ratones; $r^2 = 0,956$). El aclaramiento de la sangre fue lineal durante los primeros 10 min, con un aclaramiento medio tiempo de 6,6 min. **b - f**, Los ejes y muestran las proporciones delta tejido/suero para I-S1, corregidas por el espacio vascular y la fuga no específica ([Métodos](#)). **b**, el valor de K_{i1} -S1 para todo el cerebro fue significativamente distinto de cero ($P < 0,0001$), lo que indica que hubo captación tisular ($n = 15$ ratones). **c - f**, Los valores de K_{i1} -S1 K_i para diferentes tejidos calculados en base a las porciones lineales de sus curvas. **c**, el valor de K_{i1} -S1 K_i para el pulmón fue significativamente distinto de cero ($P < 0,0001$; $n = 15$ ratones). **d**, el valor de K_{i1} -S1 K_i para el bazo fue significativamente distinto de cero ($P = 0,0014$; $n = 8$ ratones; $n = 7$ ratones (círculos rellenos) se excluyeron del análisis de regresión debido a la no linealidad, lo que viola los supuestos de MTRA). **e**, el valor de K_{i1} -S1 K_i para el riñón fue significativamente distinto de cero ($P = 0,024$; $n = 15$ ratones). **f**, el valor de K_{i1} -S1 K_i para

el hígado fue significativamente distinto de cero ($P = 0,0001$; $n = 11$ ratones; $n = 4$ ratones (círculos rellenos) se excluyeron del análisis de regresión debido a la no linealidad). Todos los términos de error son el sem

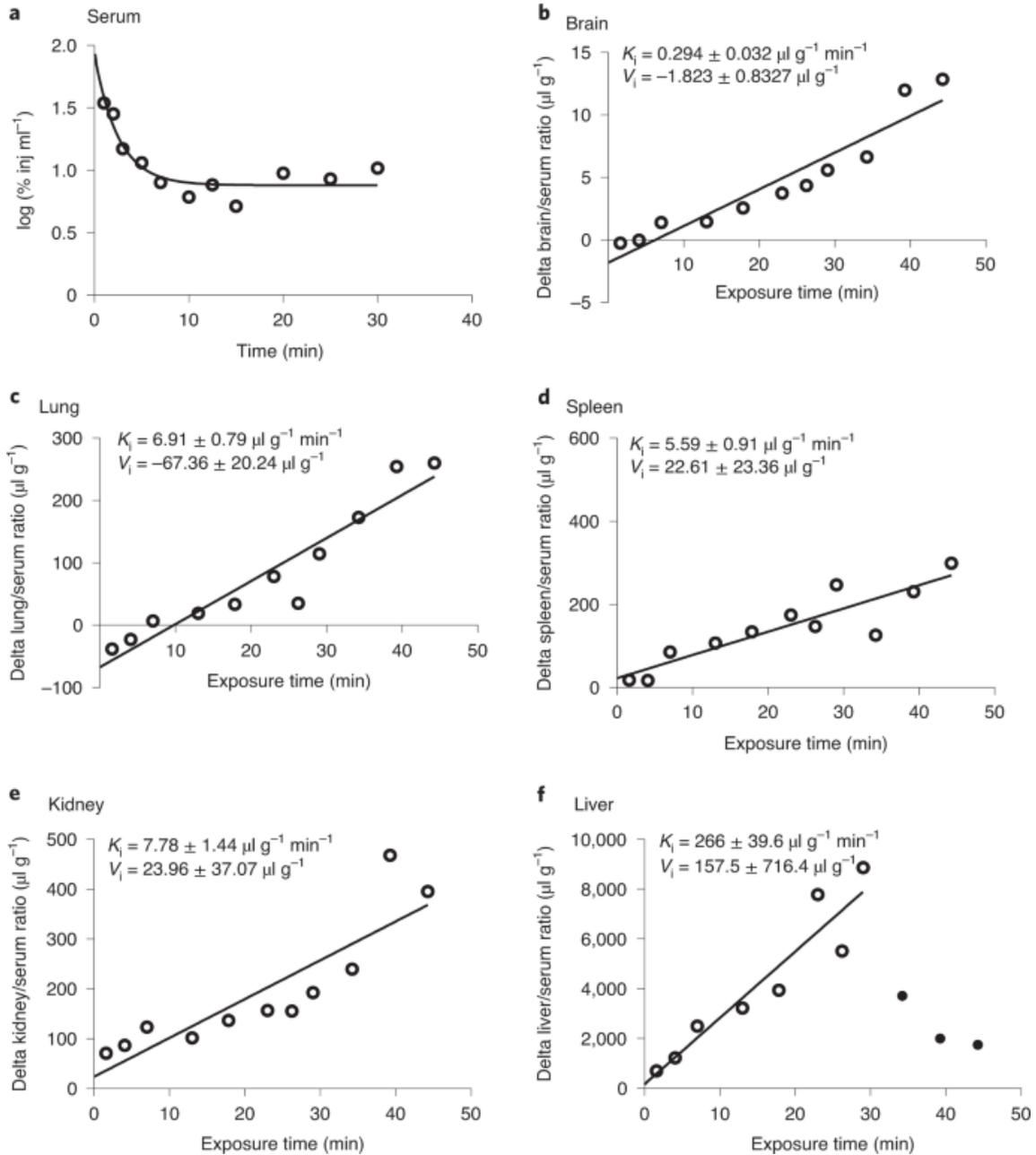
[imagen a tamaño completo](#)

Todos los tejidos mostraron captación de I-S1 (Fig. [2b-f](#)). La captación del bazo y el hígado no fue lineal, lo que sugiere que sus lechos de tejido estaban entrando en equilibrio con la sangre. La mayoría de las sustancias en la sangre son eliminadas por los riñones o el hígado; la captación mucho mayor de I-S1 en el hígado en comparación con el riñón sugiere que el I-S1 se elimina de la sangre predominantemente por el hígado. Para determinar si había diferencias regionales en la captación de I-S1 dentro del cerebro, recolectamos el bulbo olfativo y diseccionamos todo el cerebro en diez regiones (Datos extendidos Fig. [2](#)). Encontramos que I-S1 entró en todas las regiones del cerebro, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

De manera similar, determinamos la eliminación de I-S1 (AMSBIO) de la sangre y su absorción por el cerebro y otros tejidos (Fig. [3](#)). Los resultados fueron similares a los obtenidos con I-S1 derivado de RayBiotech (Fig. [2](#)), pero hubo algunas diferencias. El I-S1 derivado de AMSBIO se eliminó de la sangre más rápido (vida media de 3,6 min), y la tasa de absorción hepática fue casi cinco veces más rápida que la absorción hepática de I-S1 derivado de RayBiotech ($P < 0,0001$). Juntos, estos resultados muestran que I-S1 se elimina de la sangre principalmente por el hígado y que S1 tiene acceso a otros tejidos relevantes para COVID-19, incluidos los riñones, los pulmones y el bazo.

Fig. 3: I-S1 (AMSBIO) se elimina de la sangre y es absorbido por los tejidos periféricos.

S1 glycoprotein (AMSBIO)



a, Eliminación de I-S1 de AMSBIO de la sangre. Los datos se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial de una fase: $y = 1,05 (e^{-0,393 t}) + 0,880$ (vida media de 1,74 min; $n = 11$ ratones; $r^2 = 0,867$). El aclaramiento de la sangre fue lineal durante los primeros 10 min, con un aclaramiento medio tiempo de 3,6 min. En **b - f**, los ejes y muestran las proporciones delta tejido/suero para I-S1, corregido por espacio vascular y fuga inespecífica ([Métodos](#)). **b**, La I-S1 K_i valor para todo el cerebro fue significativamente diferente de cero ($P < 0,0001$), lo que indica la absorción de tejido ($n = 11$ ratones). **c - f**, **Los valores de I-S1 K_i** para diferentes tejidos calculados en base a las porciones lineales de sus curvas. **c**, **el I-S1 K_i** para el pulmón fue significativamente distinto de cero ($P < 0,0001$; $n = 11$ ratones). **d**, **el valor de K_i de I-S1** para el bazo fue significativamente distinto de cero ($P = 0,002$; $n = 11$ ratones). **e**, **el valor de I-S1 K_i** para el riñón fue significativamente distinto de cero ($P = 0,0004$; $n = 11$ ratones). **f**, **el I-S1 K_i** para el hígado fue significativamente distinto de cero ($P = 0,0005$; $n = 8$ ratones; $n =$

3 ratones (círculos rellenos) se excluyeron del análisis de regresión debido a la no linealidad). Todos los términos de error son el sem

[imagen a tamaño completo](#)

I-S1 es estable en el cerebro y la sangre

Medimos la estabilidad de I-S1 inyectado por vía intravenosa de RayBiotech en sangre y cerebro a través de la precipitación ácida (Tabla complementaria [1](#)). I-S1 añadido a los tejidos (controles de procesamiento) ex vivo mostró poca degradación. La radiactividad recuperada del cerebro 10 min después de la inyección iv y el suero 10 y 30 min después de la inyección iv de I-S1 era estable, con la mayor parte de la radiactividad precipitada por el ácido. La radiactividad recuperada del cerebro 30 min después de la inyección iv de I-S1 se degradó en su mayor parte. Esto indica que la I-S1 entra intacta en la BBB pero finalmente se degrada en el cerebro, aunque no está claro si esto implica la escisión del yodo radiactivo de la I-S1 y/o si la propia proteína S1 se degrada.

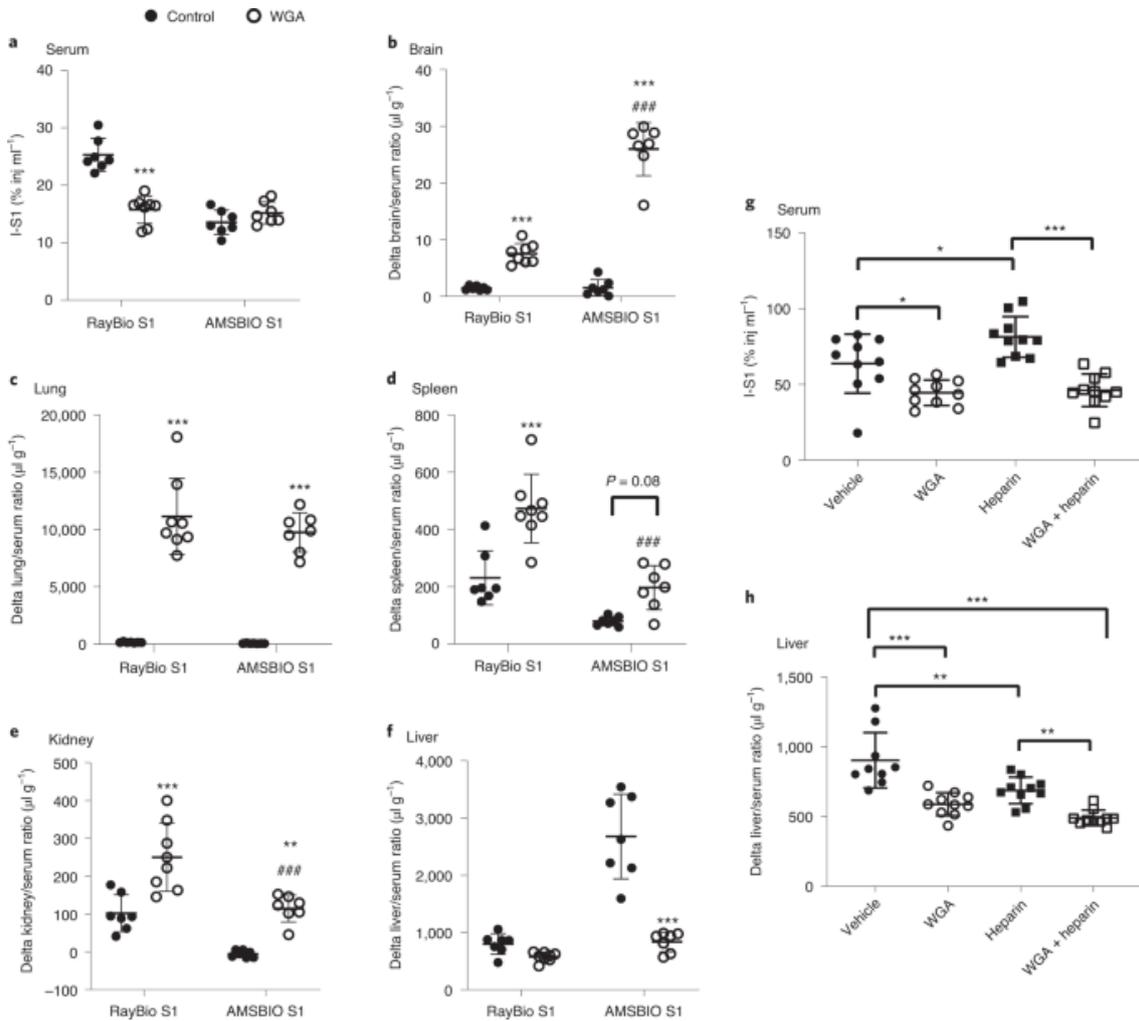
La mayor parte del I-S1 absorbido por el lecho capilar entra en el parénquima cerebral.

En casos raros, las sustancias que parecen cruzar la BBB en realidad son secuestradas por el lecho capilar, lo que les impide ingresar al espacio del fluido intersticial/parenquimatoso cerebral. Por lo tanto, luego evaluamos si el I-S1 inyectado por vía intravenosa cruza completamente la pared capilar para ingresar al parénquima cerebral. Para ello, utilizamos una versión modificada del método de "agotamiento capilar" que también nos permitió medir la cantidad de I-S1 inyectado por vía intravenosa que se adhiere de forma reversible al lado luminal del lecho capilar. Descubrimos que la unión de I-S1 al lado luminal permaneció estática con el tiempo, mientras que hubo un pequeño aumento con el tiempo en la cantidad de I-S1 retenida por los capilares cerebrales (Datos extendidos Fig. [3](#)). El cambio más grande con el tiempo fue en la cantidad de I-S1 que ingresa al parénquima. Estos resultados muestran que a los 30 min, más del 50 % de I-S1 había cruzado completamente la pared capilar para entrar en los espacios del líquido intersticial y del parénquima cerebral.

WGA mejora la captación de I-S1 en el cerebro y algunos tejidos periféricos

La aglutinina de germen de trigo (WGA) es una lectina vegetal que cruza la BHE a través de la transcitosis adsorptiva [24](#), un proceso mediante el cual las proteínas o los péptidos se unen a las glicoproteínas de la superficie luminal de las células endoteliales, se internalizan en vesículas y luego se transportan a través de la membrana. Para WGA, la transcitosis por adsorción ocurre cuando WGA se une a las glicoproteínas de la superficie celular que contienen ácido siálico y *N*-acetilglucosamina. Muchas proteínas virales también se unen a glicoproteínas que contienen ácido siálico y *N*-acetilglucosamina y, por lo tanto, cuando se inyecta WGA junto con dichas proteínas virales, mejora su transporte a través de la BBB y la absorción en los tejidos periféricos [18](#). Aquí, encontramos que la absorción de I-S1 inyectado por vía intravenosa (RayBiotech o AMSBIO) en el cerebro, pulmón, bazo y riñón aumentó cuando se incluyó WGA en la inyección (Fig. [4b-e](#)). La coinyección de WGA también aumentó la eliminación de I-S1 (RayBiotech), pero no de I-S1 (AMSBIO), como se muestra por una disminución de I-S1 en la sangre (Fig. [4a](#)). La coinyección de WGA disminuyó la captación de I-S1 (AMSBIO) pero no de I-S1 (RayBiotech) en el hígado (Fig. [4f](#)), aunque disminuyó la captación de I-S1 (RayBiotech) en el hígado en otro experimento (ver a continuación y Figura [4h](#)).

Fig. 4: WGA mejora la absorción de I-S1 por el cerebro, los pulmones, el bazo y los riñones, mientras que la heparina bloquea la absorción por el hígado.



a – f, Niveles séricos y absorción tisular de I-S1 de RayBiotech o AMSBIO 10 min después de la inyección iv en la que se incluyó WGA, un estimulador de la transcitosis adsorptiva, en las inyecciones a la mitad de los ratones. **a**, Niveles de I-S1 en suero expresados como porcentaje de la dosis inyectada por ml de suero. Hubo un efecto principal de la fuente S1 ($F(1,25) = 49,79, P < 0,0001$) y el tratamiento ($F(1,25) = 20,57, P < 0,0001$), así como un efecto significativo de su interacción ($F(1,25) = 40,93, P < 0,0001$). El tratamiento con WGA disminuyó los niveles de I-S1 (RayBiotech) en suero ($P < 0,0001$), lo que indica un mayor aclaramiento de la sangre. **b**, Niveles de I-S1 en el cerebro expresados como proporciones delta cerebro/suero, que muestran efectos significativos (todos $P < 0,0001$) de la fuente de S1 ($F(1,25) = 92,98$), tratamiento ($F(1,25) = 252,2$) y su interacción ($F(1,25) = 91,41$). Estos resultados muestran que WGA estimuló la captación de I-S1 tanto de RayBiotech como de AMSBIO y que WGA estimuló la captación de I-S1 de AMSBIO más que de RayBiotech. **c**, los niveles de Lung I-S1 muestran un efecto del tratamiento ($F(1,25) = 204,6, P < 0,0001$). **d**, los niveles de Spleen I-S1 muestran efectos de la fuente S1 ($F(1,25) = 43,06, P < 0,0001$) y tratamiento ($F(1,25) = 30,42, P < 0,0001$) y una tendencia de interacción ($F(1,25) = 3,657, P = 0,08$). **e**, los niveles de I-S1 en riñón muestran los efectos de la fuente ($F(1,25) = 33,45, P < 0,0001$) y el tratamiento ($F(1,25) = 40,77, P < 0,0001$). **f**, los niveles de I-S1 en hígado muestran los efectos de la fuente de S1 ($F(1,25) = 55,87$), el tratamiento ($F(1,25) = 52,16$) y su interacción ($F(1,25) =$

32,08), todos en $P < 0,0001$. para **una - f**, los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías con fuente S1 (RayBiotech versus AMSBIO) y tratamiento (con o sin WGA) como factores principales, seguido de las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey; los datos son la media \pm sd * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$, lo que indica comparaciones de tratamientos dentro del grupo I-S1 (RayBiotech o AMSBIO); # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ y ### $P < 0,001$, lo que indica comparaciones de grupos I-S1 dentro de los tratamientos. $n = 7$ por grupo, excepto los ratones RayBiotech S1-WGA ($n = 8$). **g , h**, Niveles séricos y captación hepática de I-S1 de RayBiotech 10 minutos después de la inyección iv con o sin coinyección de WGA, heparina o ambos. **g**, la heparina aumentó los niveles séricos de I-S1 ($P = 0,016$), pero no bloqueó el efecto de la WGA sobre los niveles séricos de I-S1. **h**, En comparación con el vehículo, la captación de I-S1 disminuyó con la heparina ($P = 0,0015$), WGA ($P < 0,0001$) y WGA + heparina ($P < 0,001$). La captación hepática de I-S1 fue menor después de WGA + heparina frente a heparina sola ($p = 0,0034$), pero no frente a WGA sola. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$. para **g y h**, los datos se analizaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba de comparaciones múltiples de Sidak, con $n = 10$ para cada grupo, con la excepción del vehículo hepático en **h**, donde se identificó un valor atípico mediante una prueba de Grubbs ($77,6 \mu\text{l g}^{-1}$) y excluidos, dejando $n = 9$ ratones.

[imagen a tamaño completo](#)

Estos resultados sugieren fuertemente que I-S1 cruza la BHE y los tejidos periféricos a través del mecanismo de transcitosis adsorptiva, uniéndose a las glicoproteínas de la superficie celular que contienen ácido siálico o *N*-acetilglucosamina.

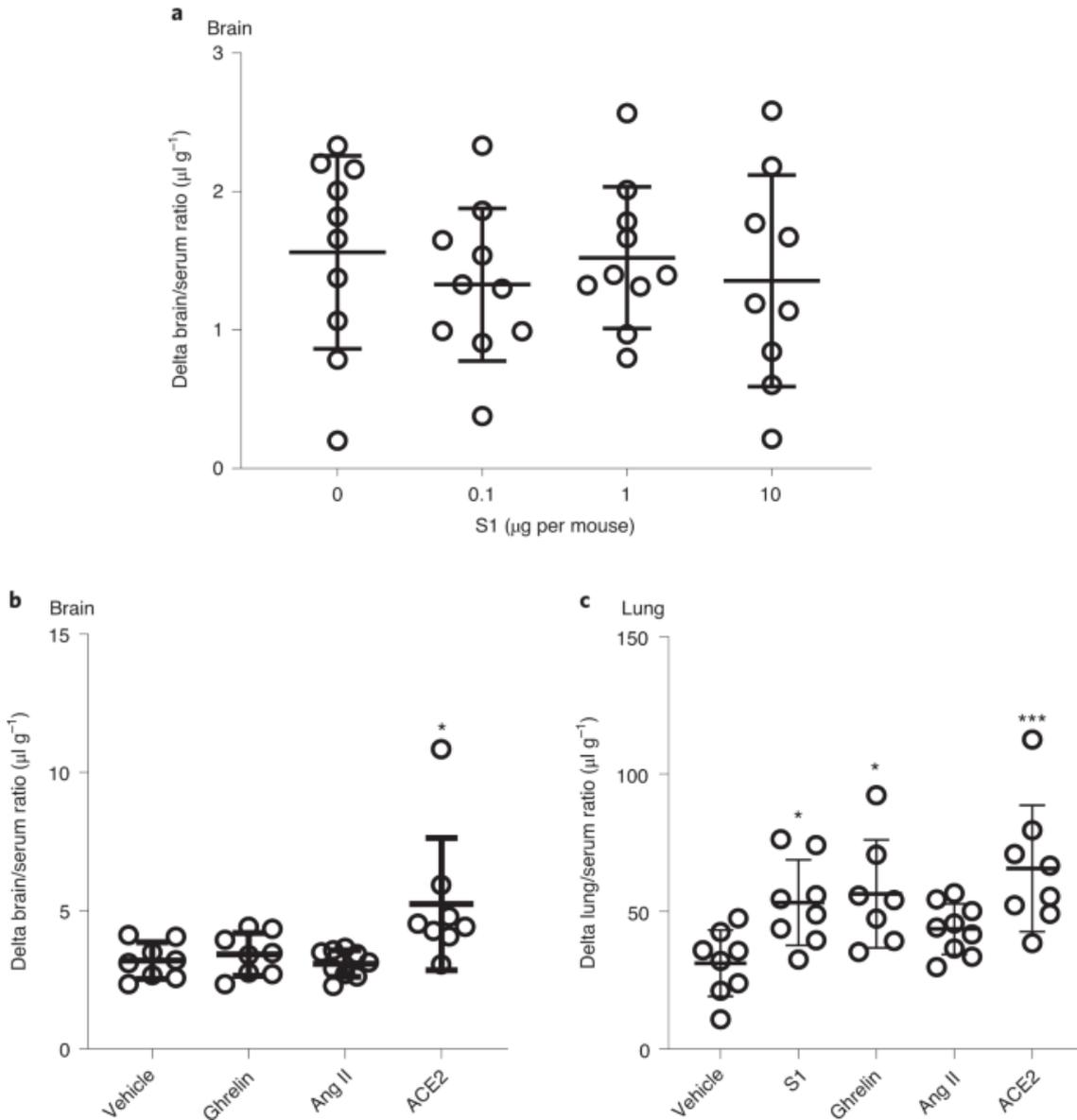
La heparina bloquea la captación de I-S1 en el hígado pero no en el cerebro

Algunos virus utilizan heparán sulfato en la membrana celular como receptor [25](#). La heparina puede bloquear la absorción del virus en los tejidos, presumiblemente uniéndose a las proteínas virales y, por lo tanto, impidiendo que estas proteínas virales se unan al sulfato de heparán en las membranas celulares [19](#):[26](#). Sin embargo, encontramos que la heparina co-inyectada con I-S1 no afectó la captación de I-S1 (RayBiotech) en el cerebro, pulmón, bazo o riñón y no influyó en el efecto de la coinyección de WGA en la captación de I-S1 en estos tejidos (datos no mostrados). La heparina co-inyectada con I-S1 bloqueó la captación de I-S1 en el hígado (Fig. [4h](#)), lo que probablemente explicó la disminución observada en la eliminación de I-S1 de la sangre (como lo demuestra el aumento en los niveles de I-S1 en suero); Figura [4g](#)), pero no bloqueó el efecto de WGA sobre la captación de I-S1 en el hígado. Estos resultados indican que I-S1 usa sitios sensibles a la heparina para unirse al lecho capilar del hígado, pero no para unirse a los lechos capilares del cerebro, bazo, pulmón o riñón.

La captación de I-S1 en el cerebro no fue bloqueada por S1 no marcado

A continuación, determinamos si el transporte de I-S1 inyectado por vía intravenosa (RayBiotech) al cerebro podría bloquearse al incluir en la inyección un exceso de proteína S1 no marcada (AMSBIO). El S1 no marcado no afectó las relaciones cerebro/suero para delta I-S1 en ninguna de las dosis probadas (Fig. [5a](#)), aunque mejoró la captación de I-S1 en el pulmón (Fig. [5c](#)). Esto indica que el sitio de unión para I-S1 en el tejido cerebral no se satura fácilmente, una característica de la transcitosis por adsorción. La S1 sin marcar tampoco afectó las proporciones de cerebro/suero para T-Alb (datos no mostrados), lo que indica que incluso la dosis alta ($10 \mu\text{g}$) de S1 no interrumpió de forma aguda la BHE.

Fig. 5: Efectos de los sustratos S1, ACE2 y ACE2 no marcados sobre la captación de I-S1 en los tejidos.



a - c, captación tisular de I-S1 de RayBiotech 10 minutos después de la inyección iv con o sin S1 no marcado (de AMSBIO), ACE2 o los sustratos de ACE2 grelina o angiotensina II (Ang II). El eje y muestra la relación tejido/suero corregida por albúmina (delta). Los datos son la media \pm sd **a**, S1 sin marcar a una dosis de 0,1 μg ($n = 10$ ratones), 1 μg ($n = 10$) o 10 μg ($n = 9$) no redujo la captación de I-S1 en el cerebro en comparación con los controles del vehículo ($n = 10$; ANOVA de una vía: $F(3,33) = 0,6312$, $P = 0,6$). **segundo** _ La coinyección tuvo un efecto principal significativo en la captación de I-S1 en el cerebro (ANOVA unidireccional: $F(3,29) = 4,7$, $P = 0,0073$), con 1 μg de ACE2 aumentando la captación (ACE2 versus vehículo: $P = 0,0109$; prueba de comparaciones múltiples de Dunnett) pero sin efecto de 1 μg de grelina o 1 μg de Ang II. (* $P < 0,05$; $n = 8, 8, 9$ y 8 para los grupos vehículo, grelina, Ang II y ACE2, respectivamente). **c**, la coinyección tuvo un efecto principal significativo en la captación de I-S1 en los pulmones (ANOVA unidireccional: $F(4,35) = 5,12$, $P = 0,0023$), con efectos significativos de 1 μg de S1 no marcado ($P = 0,0372$), 1 μg de grelina ($P = 0,0188$) y 1 μg de ACE2 ($P = 0,0007$), pero sin efectos de 1 μg de Ang II ($P = 0,3511$; todas las pruebas de Dunnett). * $P < 0,05$,

** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$. $n = 8, 8, 7, 9$ y 8 para vehículo, S1, grelina, Ang II y ACE2, respectivamente. Se detectó un valor atípico ($201 \mu\text{g}^{-1}$) en el grupo de grelina mediante una prueba de Grubbs ($\alpha < 0,05$) y se excluyó del análisis.

[imagen a tamaño completo](#)

ACE2 probablemente media la captación de I-S1 en el cerebro y los pulmones, pero no en otros tejidos

Se cree que la capacidad del SARS-CoV-2 para ingresar a las células depende de la unión de la proteína S a la enzima unida a la membrana (y glicoproteína) ACE2. Para evaluar si ACE2 tiene un papel en la captación de I-S1 en el cerebro y los tejidos periféricos, inyectamos por vía intravenosa ACE2 humano o los sustratos de ACE2 Ang II y grelina con I-S1 (RayBiotech). Esto no afectó los niveles en sangre de I-S1 o T-Alb inyectados por vía intravenosa (datos no mostrados), lo que indica que estas proteínas no afectaron el volumen de distribución o eliminación de S1 o albúmina. La coinyección de ACE2 aumentó los niveles renales de T-Alb inyectada por vía intravenosa: $F(4,36) = 2,63$, $P = 0,0505$; vehículo: $119 \pm 4,4 \mu\text{g}^{-1}$ ($n = 8$ ratones); ACE2: $151 \pm 15,6 \mu\text{g}^{-1}$ ($n = 8$ ratones), $P = 0,02$), indicando posiblemente que ACE2 afecta el aclaramiento renal de albúmina. Solo la coinyección de ACE2 mejoró la captación de I-S1 en el cerebro (Fig. [5b](#)). La captación en pulmón aumentó con la inyección conjunta de S1, grelina o ACE2, pero no con angiotensina II (Fig. [5c](#)), mientras que la captación en hígado, riñón o bazo no se vio alterada por la inyección conjunta de ninguna de estas sustancias (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que ACE2 está involucrado en la captación de S1 en los pulmones y probablemente en el cerebro, pero no en la captación de I-S1 en el bazo, el hígado o el riñón.

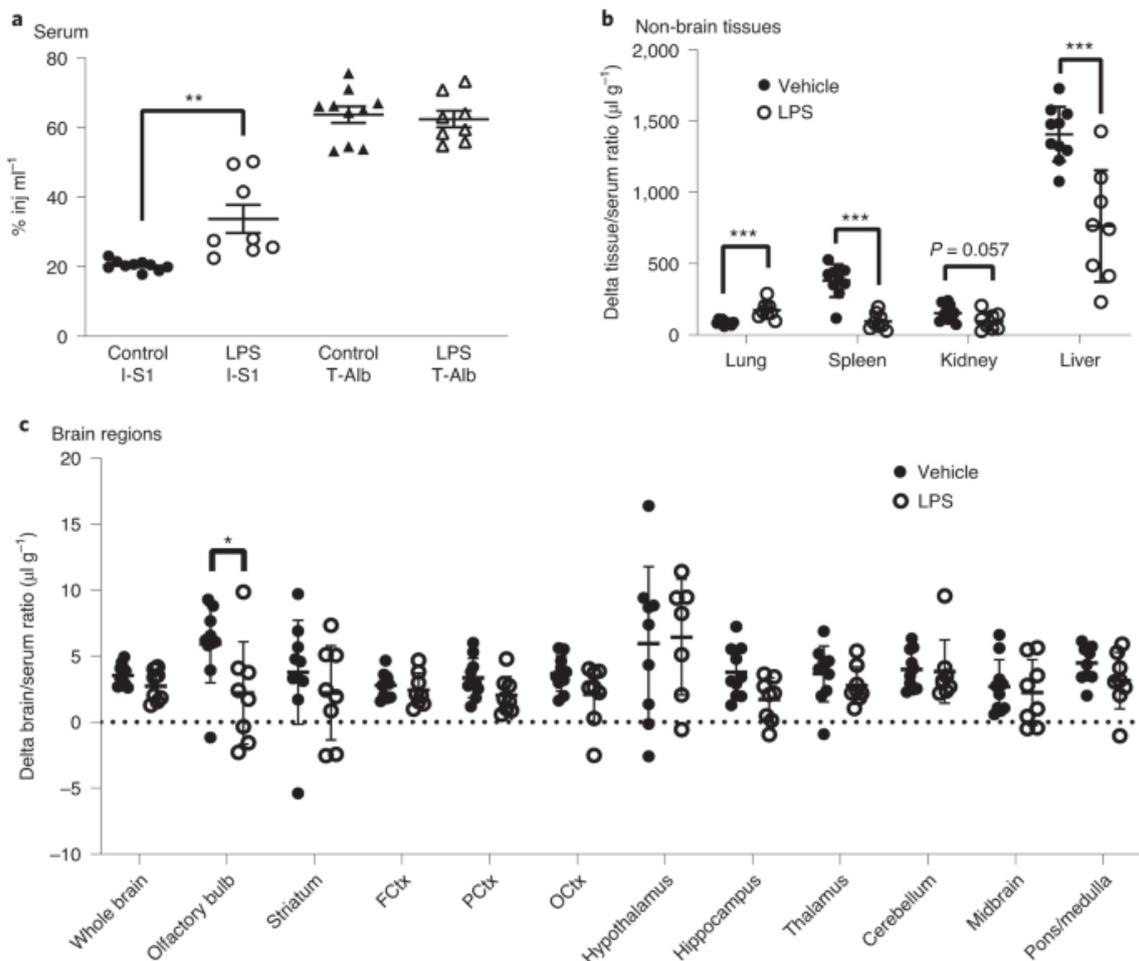
La inflamación aumenta la captación de I-S1 en el cerebro y los pulmones

Dado que la infección por SARS-CoV-2 induce un estado inflamatorio, a continuación determinamos si un estado inflamatorio, en este caso, inducido por una inyección de lipopolisacárido (LPS), afecta la absorción de I-S1 inyectado por vía intravenosa (RayBiotech) en el cerebro y tejidos periféricos. Los ratones recibieron una inyección de 3 mg kg^{-1} de LPS derivado de *Salmonella typhimurium* (Sigma) en $t = 0$ y nuevamente a las 6 y 24 h más tarde, y recibieron una inyección iv de I-S1 más T-Alb 28 h después de la primera inyección de LPS.; este régimen de LPS puede interrumpir la BBB, aumentar su permeabilidad a los virus y las proteínas virales [27](#)·[28](#) y aumentar el nivel en sangre de muchas de las citoquinas que se encuentran elevadas en la tormenta de citoquinas asociada con COVID-19 (refs. [5](#)·[29](#)).

Descubrimos que el LPS no afectó los niveles sanguíneos de T-Alb, lo que indica que la inflamación no indujo la contracción del volumen del espacio vascular ni la fuga de los lechos capilares periféricos en estos ratones. Los ratones que habían recibido LPS tenían niveles séricos de I-S1 más altos (Fig. [6a](#)), lo que indica una disminución en la eliminación de la sangre (probablemente debido a la disminución de la captación de I-S1 en el hígado observada en estos ratones; Fig. [6b](#)), así como proporciones más altas de cerebro/suero de T-Alb, lo que indica una interrupción de la BBB (control: $8,52 \pm 0,19 \mu\text{g}^{-1}$ ($n = 10$); LPS: $12,2 \pm 0,68 \mu\text{g}^{-1}$ ($n = 8$), $t = 5,74$, $P < 0,0001$). Estos ratones también tenían proporciones más altas de I-S1 cerebro/suero (es decir, proporciones no corregidas para I-S1 en el espacio vascular y para cualquier entrada de I-S1 en el cerebro debido a una fuga), lo que indica un mayor paso de I-S1 a través de la BBB (control: $12,06 \pm 0,26 \mu\text{g}^{-1}$ ($n = 10$); LPS: $14,9 \pm 0,64 \mu\text{g}^{-1}$ ($n = 8$), $t = 4,38$, $P = 0,0005$), aunque sus

proporciones delta cerebro/suero para I-S1 (es decir, proporciones corregidas) no fueron diferentes de los controles (excepto en el bulbo olfativo) (Fig. 6c). El único tejido periférico que mostró una mayor captación de I-S1 después de recibir LPS fue el pulmón, donde la captación aumentó en un 101% (Fig. 6b). Estos resultados muestran que la inflamación podría aumentar la toxicidad de S1 para el tejido pulmonar al aumentar su absorción. Los resultados también muestran que, en ratones, la inflamación puede aumentar la entrada de I-S1 inyectado por vía intravenosa en el cerebro, pero esto probablemente se deba a la interrupción de la BBB en lugar de mejorar la transcitosis de absorción.

Fig. 6: LPS tiene efectos mínimos sobre la captación de I-S1 en el cerebro, pero altera la eliminación de I-S1 de la sangre y la captación por los tejidos periféricos.



a – c, Tratamos ratones con LPS intraperitoneal usando un protocolo que previamente demostró alterar la permeabilidad de BBB e inducir inflamación ([Métodos](#)). Cuatro horas después de la última inyección de LPS, les dimos a los ratones una inyección iv que contenía I-S1 (RayBiotech) y T-Alb y recolectamos muestras de tejido y sangre 10 minutos después de la inyección iv. **a**, Los niveles séricos de I-S1 (RayBiotech), expresados como el porcentaje de dosis inyectada por 1 ml (% inj ml⁻¹) de suero, aumentaron 4 h después de la inyección de LPS frente al control ($t = 3,66$, $df = 16$, $P = 0,0021$, t de dos colas-test), lo que indica que LPS disminuyó la eliminación de I-S1 de la sangre. LPS no tuvo un efecto significativo sobre los niveles séricos de T-Alb ($t = 0,3739$, $df = 16$, $P = 0,7134$), lo que indica un efecto selectivo de LPS sobre la eliminación de I-S1. **b**, Niveles tisulares de I-S1, expresados como proporciones tejido/suero corregidas (proporciones cerebro/tejido

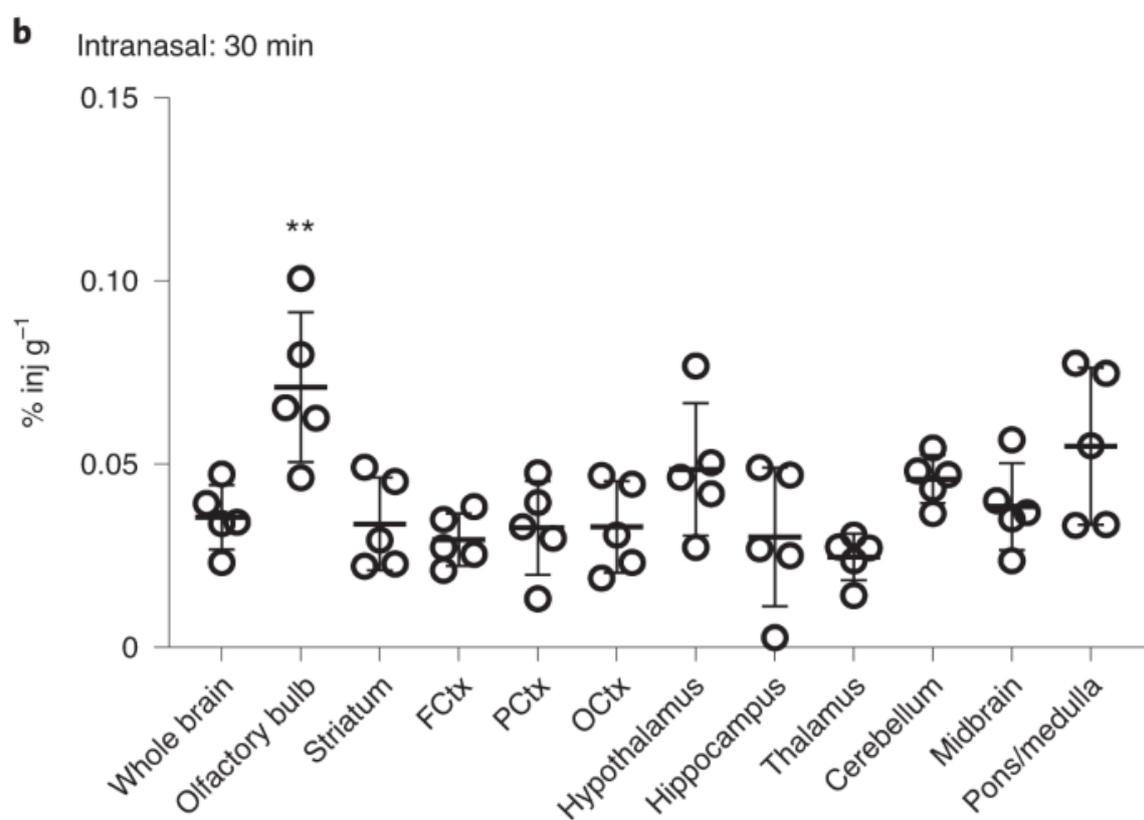
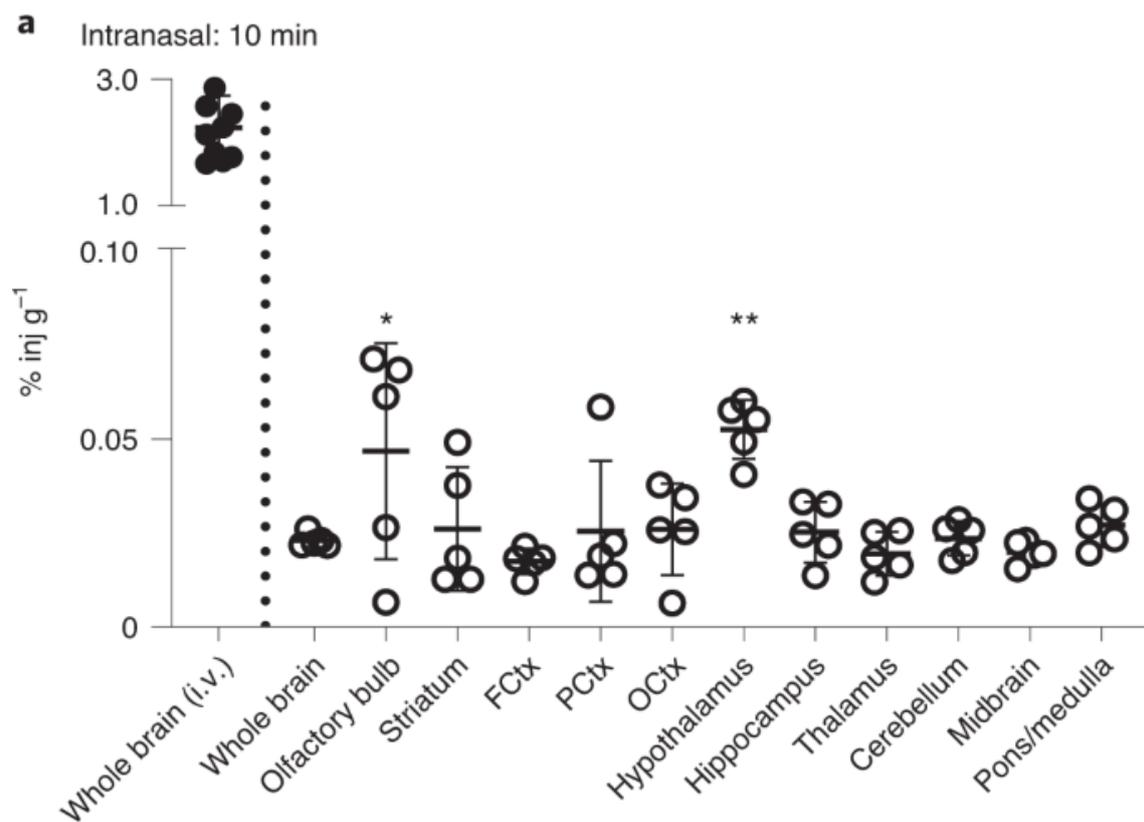
delta) para el espacio vascular y la fuga restando las proporciones tejido/suero para T-Alb. LPS aumentó la captación de I-S1 por el tejido pulmonar ($t = 4,58$, $df = 16$, $P = 0,0003$) y disminuyó la captación de I-S1 por el bazo ($t = 6,39$, $df = 16$, $P < 0,0001$) y el hígado ($t = 4,60$, $gl = 16$, $P = 0,0003$); el efecto de LPS sobre la captación de I-S1 por riñón no fue significativo ($P = 0,057$; todas las pruebas t de dos colas). La disminución de la captación de I-S1 por parte del tejido hepático probablemente contribuya a la disminución de la eliminación de I-S1 de la sangre que se observa en **un . c**, Niveles de I-S1 en áreas del cerebro, expresados como relaciones delta cerebro/suero. ANOVA de dos vías mostró un efecto principal significativo de la región del cerebro ($F(11, 190) = 2,72$, $P = 0,0028$), que representa el 12,5 % de la variabilidad, y un efecto principal del tratamiento con LPS ($F(11, 190) = 10,7$, $P = 0,0012$), explicando el 4,5% de la variabilidad; no hubo un efecto estadísticamente significativo para la interacción. La prueba de comparaciones múltiples de Sidak mostró que el tratamiento con LPS disminuyó la captación de I-S1 en el bulbo olfatorio ($P = 0,026$), pero no en otras regiones del cerebro. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ y $t = 0,1 > P > 0,05$. Fctx, corteza frontal; Pctx, corteza parietal; Octx, corteza occipital. Los datos son la media \pm sd Grupos de control (**a**): $n = 10$ ratones; grupo de vehículo (**byc**): $n = 10$ ratones; Grupo LPS (**a - c**): $n = 10$ ratones.

[imagen a tamaño completo](#)

I-S1 ingresa al cerebro y la sangre del ratón después de la administración nasal

Algunos virus pueden ingresar al cerebro a través del nervio olfativo, un nervio craneal con proyecciones a través de la lámina cribosa [30](#). Otros virus pueden cruzar la BBB después de ingresar al torrente sanguíneo desde el compartimiento nasal. No está claro si el SARS-CoV-2 en la nariz puede ingresar al cerebro por cualquiera de estas rutas. Por lo tanto, evaluamos la capacidad de I-S1 administrado por vía intranasal para ingresar al cerebro. Después de una inyección de una solución de vehículo de 1 μ l que contenía I-S1 en cada naris al nivel de la placa cribosa (donde el nervio olfativo emerge de la bóveda craneal), se detectó I-S1 en todas las regiones del cerebro (Fig. [7a, B](#)). Los niveles de I-S1 en todo el cerebro, la corteza frontal, el cerebelo, el mesencéfalo y la protuberancia medular fueron más altos a los 30 min en comparación con los 10 min después de la administración. La distribución de I-S1 en el cerebro fue mayormente homogénea, aunque los niveles en el bulbo olfatorio y el hipotálamo fueron más altos que en otras regiones del cerebro a los 10 min y también en el bulbo olfatorio a los 30 min después de la administración. Los niveles de I-S1 en todo el cerebro expresados como porcentaje de la dosis administrada fueron aproximadamente diez veces mayores después de la inyección iv que después de la inyección intranasal (Fig. [7a](#)). Apareció radiactividad en la sangre después de la administración intranasal de I-S1, lo que indica que algo de I-S1 había entrado en el torrente sanguíneo (datos no mostrados). El área bajo la curva (AUC) de I-S1 en sangre después de la administración intranasal fue de 9,42 (% inj $ml^{-1} min^{-1}$), mientras que el AUC de I-S1 en sangre después de la inyección iv fue de 1430 (% inj $ml^{-1} min^{-1}$), lo que indica que la biodisponibilidad para la vía nasal fue del 0,66 %. Juntos, estos resultados muestran que I-S1 puede ingresar al cerebro y distribuirse de manera dependiente del tiempo a todas las regiones del cerebro después de la administración intranasal. Sin embargo, la captación de I-S1 en el cerebro a través de esta ruta es mucho menos eficiente que la captación después del transporte a través de la BBB.

Fig. 7: I-S1 ingresa al cerebro después de la administración intranasal.



a, b, captación cerebral de I-S1 (RayBiotech) administrada por vía intranasal (1 μ l por naris), expresada como el porcentaje de dosis administrada absorbida por gramo de cada región cerebral (% inj g⁻¹). **a**, 10 minutos después de la administración intranasal, se

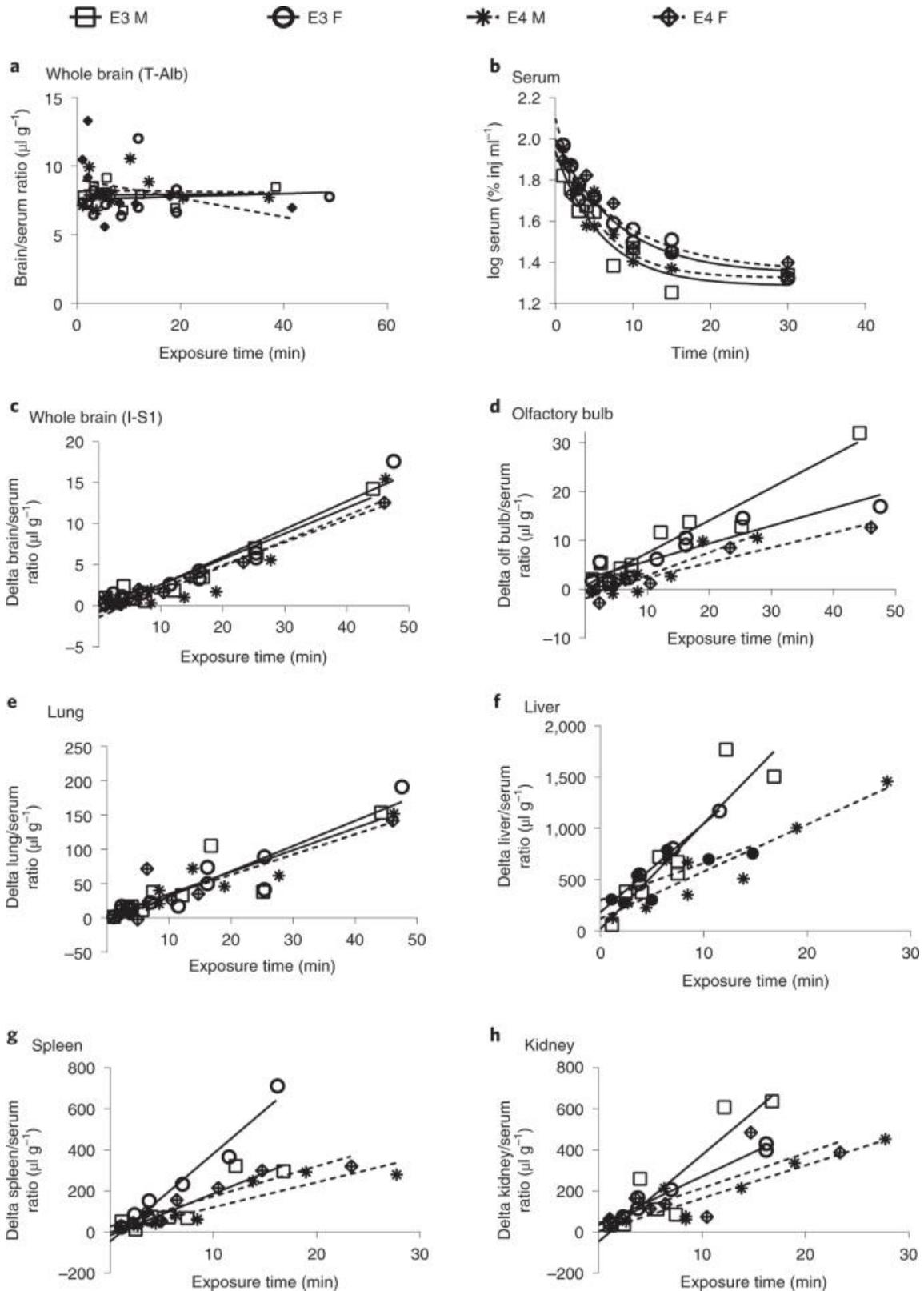
detectó I-S1 en todas las regiones cerebrales diseccionadas. El ANOVA unidireccional mostró un efecto significativo de la región del cerebro ($F(11,48) = 3,77, P = 0,0006$), con una captación significativamente mayor en el bulbo olfatorio ($P = 0,031$) y el hipotálamo ($P = 0,0041$) en comparación con el total. cerebro (prueba de comparaciones múltiples de Dunnett). La captación en todo el cerebro después de la administración intranasal fue de $0,023 \pm 0,0008 \%$ inj g⁻¹; para la comparación visual, también mostramos el porcentaje de dosis en todo el cerebro por gramo 10 min después de la inyección iv calculado a partir de los valores de control para el experimento LPS en la Fig. 6 (círculos rellenos, $0,22 \pm 0,016 \%$ inj g⁻¹); $n = 5$ ratones. **b**, 30 minutos después de la administración intranasal, se detectó I-S1 en todas las regiones cerebrales diseccionadas. ANOVA unidireccional mostró un efecto significativo de la región del cerebro ($F(11,48) = 4,33, P = 0,0002$), con una captación significativamente mayor en el bulbo olfatorio en comparación con todo el cerebro ($P = 0,0023$, prueba de comparaciones múltiples de Dunnett). Una prueba *t* de dos colas mostró aumentos significativos entre 10 y 30 min para todo el cerebro ($P = 0,0143, t = 3,116, df = 8$), corteza frontal ($P = 0,0391, t = 2,464, df = 8$), cerebelo ($P = 0,0003, t = 6,226, df = 8$), mesencéfalo ($P = 0,0098, t = 3.370, df = 8$) y pons ($P = 0,0232, t = 2.801, df = 8$) pero no las demás regiones; $n = 5$ ratones. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$.

[imagen a tamaño completo](#)

Efectos del sexo y el genotipo *APOE* en la captación de I-S1

El sexo masculino y el genotipo *APOE4* en comparación con el genotipo *APOE3* son factores de riesgo tanto para contraer como para tener un mal resultado de COVID-19 (refs. 31, 32, 33). Por lo tanto, determinamos la captación de I-S1 (RayBiotech) o T-Alb inyectados por vía intravenosa en ratones machos y hembras que expresan *APOE3* o *APOE4* humanos bajo la expresión del promotor *ApoE* de ratón. El genotipo *APOE* y el sexo no afectaron a las proporciones cerebro/suero de T-Alb (Fig. 8a). ANOVA de dos vías mostró un efecto del sexo en la captación de I-S1 en el bulbo olfatorio y el bazo y un efecto de *APOE* genotipo en la captación de I-S1 en hígado, bazo y riñón (Fig. 8b-h). Las pruebas de comparaciones múltiples mostraron que, en comparación con los otros tres grupos, los ratones macho que expresaban *APOE3* humano tenían la captación de I-S1 más rápida en el bulbo olfatorio, el hígado y el riñón, mientras que, en comparación con los otros tres grupos, los ratones hembra que expresaban *APOE3* humano tuvo la captación de I-S1 más rápida en el bazo. Estos resultados sugieren que la captación mejorada de I-S1 por parte de algunos tejidos podría contribuir al aumento del riesgo de COVID-19 en hombres frente a mujeres, pero no al riesgo asociado con el genotipo *APOE4*.

Fig. 8: Influencia del sexo y del genotipo *ApoE* en la captación de I-S1.



a - h, Niveles séricos y captación tisular de I-S1 (RayBiotech) y captación cerebral de T-Alb después de la inyección iv en ratones machos y hembras que eran homocigotos para *APOE3* (E3) o *APOE4* (E4) humanos. Para **a**, se realizó MTRA para calcular K_i y v_i para T-Alb. En **c - h**, el eje y muestra las proporciones delta tejido/suero para I-S1, que se corrigieron para el espacio vascular y la fuga no específica (Métodos). Las pendientes de las líneas de regresión que resultan de MTRA miden la tasa de entrada (K_i) en los

tejidos. el *ki* los valores de los cuatro grupos (machos E3, hembras E3, machos E4 y hembras E4) se compararon estadísticamente mediante ANOVA de dos vías con el sexo y el genotipo *APOE* como variables independientes, seguido de las pruebas post hoc de comparación múltiple de Tukey (**a - h**). El sexo o el genotipo *APOE* no influyeron en los cambios en la captación cerebral de T-Alb (**a**), los niveles de I-S1 en suero (**b**) o la captación de I-S1 en el tejido cerebral (**c**) o pulmonar (**e**), lo que indica que estos factores no influyen en la integridad de la BBB ni en el espacio vascular cerebral, el aclaramiento de la sangre o la absorción por el cerebro o el tejido pulmonar. **D.** ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del sexo en la captación de I-S1 en el bulbo olfativo ($F(1,29) = 14,30, P = 0,0007$), lo que representa el 29 % de la variabilidad. La prueba de comparaciones múltiples post hoc de Tukey mostró una *Ki* significativamente mayor para los machos E3 en comparación con las hembras E3 ($p = 0,0056$) y las hembras E4 ($P = 0,0015$). El genotipo *APOE* tuvo un efecto de nivel de tendencia sobre la captación en el bulbo olfativo ($F(1,29) = 3,838, P = 0,06$). **F.** El genotipo *APOE* tuvo un efecto principal significativo en la captación de I-S1 en el hígado ($F(1,24) = 28,44, P < 0,0001$), que representa el 50 % de la variabilidad, con una tasa de captación más baja para las hembras E4 en comparación con las hembras E3 ($P = 0,0057$) y los machos E3 ($P = 0,0001$), y con una tasa de captación más baja para los machos E4 frente a E3 machos ($p = 0,0039$). **g** , Hubo un efecto principal significativo del sexo en la captación de I-S1 en el bazo ($P = 0,0004$), que representa el 20 % de la variabilidad, un efecto principal del genotipo *ApoE* ($P < 0,0001$), que representa el 43 % de la variabilidad , y un efecto significativo de su interacción ($P = 0,0029$), explicando el 13% de la variabilidad. Las comparaciones múltiples mostraron tasas de captación más rápidas para las hembras E3 en comparación con las hembras E4 ($P < 0,0001$) a machos E3 ($P = 0,0003$) y a machos E4 ($P < 0,0001$). **h** , el genotipo *APOE* tuvo un efecto significativo en la captación de I-S1 en el riñón ($P = 0,0046$), lo que explica el 25 % de la variabilidad, con una captación más rápida en los machos E3 en comparación con los machos E4 ($P = 0,0089$) y las hembras E4 ($P = 0,012$). El número de ratones asignados a cada grupo fue de 11 para las hembras E3 y de 10 para los otros tres grupos. Sin embargo, el número de ratones utilizados para calcular las líneas de regresión osciló entre 6 y 11 por grupo, porque se observó una desviación de la linealidad que cumplía con los criterios de exclusión ([Métodos](#)). el nlos valores por grupo (incluidos los valores atípicos excluidos) se muestran en la Tabla complementaria [2](#) .

[imagen a tamaño completo](#)

Transporte I-S1 a través de un modelo in vitro de BBB

Para determinar si el I-S1 cruza células de tipo endotelial en un modelo in vitro de la BBB humana, comparamos el transporte de I-S1 versus T-Alb a través de monocapas de células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSC) derivadas del endotelio cerebral. células (iBEC) sembradas en Transwells. Tres experimentos independientes mostraron que la tasa de paso de I-S1 (RayBiotech) en la dirección luminal a aluminal no fue estadísticamente significativa en comparación con la de T-Alb (datos extendidos, figura [4a](#)). Un experimento indicó que S1 sin marcar no inhibía el paso de I-S1 (RayBiotech) (Datos ampliados, Fig. [4b](#)). WGA tampoco tuvo efecto en el transporte RayBiotech I-S1 (Datos extendidos Fig. [4c](#)). I-S1 (RayBiotech) tenía un coeficiente de permeabilidad significativamente más alto que I-S1 (AMSBIO I-S1) in vitro (Datos extendidos Fig. [4d](#)); sin embargo, esta diferencia no fue significativa después de corregir el transporte de T-Alb. En resumen, estos resultados sugieren que los iBEC pueden ser más

permeables a I-S1 que a T-Alb, pero la diferencia es demasiado pequeña para respaldar los estudios mecanísticos que utilizan este modelo.

Discusión

Los resultados de este estudio muestran que I-S1 de dos fuentes comerciales diferentes cruza fácilmente la BBB del ratón, al menos cuando se inyecta por vía intravenosa. I-S1 fue absorbido por las 11 regiones cerebrales examinadas. Esta entrada generalizada de I-S1 en el cerebro podría explicar los diversos efectos de S1 y/o SARS-CoV-2, como encefalitis, dificultades respiratorias y anosmia [1](#)·[3](#)·[4](#). S1 es la proteína SARS-CoV-2 que inicialmente se une a los receptores de la superficie celular, preparando el escenario para la internalización viral. Para el transporte a través de la BBB, las proteínas de unión viral a menudo se comportan de manera similar al propio virus. Por ejemplo, las interacciones (incluidas la unión y el transporte) entre la glicoproteína gp120 del VIH-1 y la BBB son similares a las del virus completo [18](#)·[28](#). Además, muchas, si no la mayoría, de las proteínas virales pueden ser biológicamente muy activas; por ejemplo, gp120 es altamente tóxico [11](#)·[12](#)·[13](#)·[14](#)·[15](#)·[16](#)·[17](#). Las proteasas de la célula huésped a menudo separan las proteínas de pico de coronavirus del virus. Una vez escindidas, las subunidades S1 y S2 de la punta del coronavirus no se mantienen covalentemente mediante enlaces disulfuro, por lo que S1 podría desprenderse de los viriones [34](#). Es posible que durante la infección por SARS-CoV-2, el S1 desprendido esté disponible para cruzar la BBB, desencadenando respuestas en el cerebro mismo, sin que necesariamente implique el cruce de partículas virales intactas. Por lo tanto, determinar si S1 cruza la BBB es importante para comprender si el SARS-CoV-2 y el propio S1 podrían inducir respuestas en el cerebro.

Nuestro método de estudio de la farmacocinética de S1 tiene muchas ventajas sobre el enfoque más tradicional de determinar la captación y distribución viral que se basa en la recuperación del virus. El marcaje radiactivo permite detectar S1 a niveles muy bajos y cuantificar las tasas de captación para el cerebro y otros tejidos. Los factores que podrían afectar la absorción de proteínas virales pueden manipularse experimentalmente en animales sanos, en lugar de infectados. La recuperación de I-S1 de un tejido refleja solo factores relacionados con la permeabilidad, mientras que la recuperación de ratones infectados también refleja otros factores, como la tasa de replicación del virus en ese tejido.

Una pregunta crucial que respondimos parcialmente aquí fue: ¿qué receptor usa I-S1 para ingresar al cerebro y otros tejidos? Según la experiencia con el SARS, se supone que el SARS-CoV-2 se unirá a la ACE2 humana, pero no a la ACE2 murina. El SARS puede infectar ratones de tipo salvaje (WT), pero no produce síntomas graves ni la muerte, excepto en ratones transgénicos que sobreexpresan ACE2 humano (ref. [35](#)), aunque esto también podría deberse simplemente a que estos ratones transgénicos expresan de 8 a 12 veces más ACE2 que los ratones WT. Los ratones utilizados aquí solo expresaron receptores murinos, por lo que nuestros hallazgos sugieren que la suposición de que ACE2 debe ser la proteína humana es incorrecta y demuestra que los ratones WT pueden usarse en estudios cinéticos de S1 y probablemente SARS-CoV-2.

Encontramos evidencia razonablemente sólida de que la ACE2 murina está involucrada en la captación de I-S1 en el tejido pulmonar, ya que la inyección conjunta de I-S1 con sustratos solubles de ACE2 y ACE2 aumentó la captación de I-S1 (esta observación quizás sorprendente se analiza más adelante). La evidencia de la participación de ACE2 en la captación de I-S1 en el cerebro es más débil que la del pulmón, ya que aquí la captación se vio afectada por la coinyección con ACE2 soluble, pero no por los sustratos de ACE2. El

hallazgo de que la captación de I-S1 en el riñón, el hígado y el bazo no se vio afectada por ACE2 soluble o por sustratos de ACE2 indica que otros receptores además de ACE2 están implicados en la captación de I-S1 en algunos tejidos.

Que S1 e incluso SARS-CoV-2 usen más de un receptor no es sorprendente si se considera que muchos virus usan múltiples receptores. Por ejemplo, el VIH-1 usa los receptores CD4 y manosa-6-fosfato, y el virus de la rabia usa el receptor de acetilcolina, un receptor del factor de crecimiento nervioso y la molécula de adhesión de células neurales para ingresar a las células [25](#)·[36](#). Los receptores (además de ACE2) que pueden unirse o se prevé que se unan al SARS-CoV-2 según el modelo incluyen basigina, ciclofilinas, dipeptidil peptidasa-4 (refs. [37](#)·[38](#)) y GRP78 (ref. [39](#)).

Una de las razones por las que un virus puede usar tal diversidad de receptores es que los virus se unen con menos especificidad que los ligandos de receptores endógenos. Los sitios de unión de las proteínas virales suelen ser regiones altamente cargadas en la glicoproteína de la membrana celular debido a las altas concentraciones de ácido siálico, *N*-acetilglucosamina o sulfato de heparán. Los coronavirus en general se unen a glicoproteínas ricas en ácido siálico [40](#). Un trabajo pionero mostró que la unión de WGA a regiones BBB ricas en ácido siálico o *N*-acetilglucosamina resultó en el transporte de WGA a través de la BBB a través del mecanismo de transcitosis adsorptiva [24](#). La WGA coadministrada con un inductor más débil de la transcitosis por adsorción a menudo aumentará en lugar de bloquear la penetración de la BBB del inductor más débil [41](#). En el estudio actual, la capacidad de WGA para aumentar la captación de I-S1 en el tejido cerebral sugiere que S1 cruza la BHE a través de transcitosis de adsorción.

Debido a que la proteína espiga del SARS-CoV-2 está más cargada que la proteína espiga del SARS, se ha sugerido que puede unirse a una mayor cantidad de receptores [42](#). Algunos virus se unen a receptores ricos en heparán sulfato; la absorción de esos virus es inhibida por la heparina [25](#). Mostramos que la heparina inhibía la captación de I-S1 en el hígado, pero no la captación en el cerebro y otros tejidos periféricos. Estos resultados muestran que S1 usa heparán sulfato para unirse al hígado pero no a otros tejidos. Llegamos a la conclusión de que es probable que varios receptores estén involucrados en la captación de S1; qué receptor es más importante varía de un tejido a otro. Será importante identificar las glicoproteínas unidas a la membrana que sirven como receptores para el SARS-CoV-2.

No está claro por qué, en nuestro estudio, la coinyección con sustratos ACE2 o ACE2 mejoró en lugar de inhibir la absorción de I-S1 inyectado por vía intravenosa, pero existen algunas explicaciones posibles. Dado que S1 no se une al sitio catalítico de ACE2 [42](#)·[43](#), es posible que no se produzca la cinética de inhibición tradicional ligando-receptor dependiente de la dosis. La ACE2 que co-inyectamos con I-S1 puede haberse unido a la Ang II circulante que normalmente habría competido con I-S1 por unirse a la ACE2 unida a la membrana. Además, S1 se une al SARS-CoV-2 como homotrímero [38](#), pero estudiamos S1 monomérico; es posible que la inyección conjunta de ligandos de ACE2 alterara la conformación de ACE2 de tal manera que facilitara la unión del monómero S1.

Los factores de riesgo tanto para contraer COVID-19 como para tener un mal resultado incluyen individuos masculinos que son positivos para el alelo *ApoE4* en comparación con el alelo *ApoE3* [31](#)·[32](#)·[33](#), mientras que la tormenta de citocinas es una característica de la enfermedad grave [44](#). Encontramos que la influencia del sexo, el genotipo *ApoE* y el estado inflamatorio en la captación de I-S1 varió entre los tejidos. *Sexo y ApoE* humana el estado en ratones no afectó la absorción de I-S1 inyectado por vía intravenosa en todo el

cerebro o los pulmones, pero sí afectó su absorción en el bulbo olfatorio, el hígado, el bazo y el riñón, con una mayor absorción en los machos. Esto sugiere que parte del riesgo de malos resultados para los hombres puede estar relacionado con el grado en que sus tejidos tienen una mayor absorción de S1 o SARS-CoV-2. Sin embargo, *ApoE3*, no *ApoE4*, se asoció con mayores tasas de absorción de I-S1 por el bulbo olfatorio, el hígado, el bazo y los riñones, lo que sugiere que es poco probable que el riesgo asociado con el estado de *ApoE* se deba a un aumento de S1 o SARS-CoV-2. captación de tejido.

La inflamación inducida por la inyección de LPS aumentó la cantidad de I-S1 inyectada por vía intravenosa que ingresa al cerebro, pero este aumento probablemente se debió a la interrupción de la BBB y no a la mejora de la transcitosis de adsorción; de hecho, la captación de I-S1 después de la corrección de la interrupción de BBB fue en realidad menor en una región del cerebro, el bulbo olfativo. Los ratones expuestos a LPS tenían una mayor captación de I-S1 en los pulmones pero una menor captación en el bazo y el hígado; esto último probablemente explica por qué estos ratones habían reducido la eliminación de I-S1 de la sangre. En particular, esta disminución en la eliminación de la sangre observada en ratones en un estado inflamatorio sugiere que todos los tejidos estarán expuestos a niveles más altos de S1 que en el estado no inflamatorio.

Una infección letal puede ocurrir después de la administración intranasal de SARS [35](#). Se ha postulado que el virus nasal se propaga al pulmón y de allí a la sangre y el cerebro [35](#), pero otros sugieren que el SARS-CoV-2 en las fosas nasales podría propagarse al cerebro a través del nervio olfativo [45](#), al igual que muchos otros virus [30](#). Aunque nuestros hallazgos muestran que la I-S1 administrada por vía intranasal puede ingresar al tejido cerebral del ratón, destacan la BBB como la ruta principal para la entrada de la I-S1 al cerebro. Además, se encontró una cantidad muy pequeña (0,66 % de biodisponibilidad después de la administración intranasal) de I-S1 en la sangre, lo que sugiere una mala transferencia de la nariz a la sangre. Sin embargo, nuestros estudios fueron diseñados para evaluar la capacidad de I-S1 para ingresar al cerebro a través del nervio olfativo y no para evaluar su capacidad para ingresar a la sangre a través de la vasculatura nasal. Sin embargo, nuestros resultados favorecen algunos sitios distintos de las fosas nasales, como los pulmones, como el punto de entrada de S1 detectado en la sangre.

Es importante tener en cuenta que, aunque el estudio muestra que I-S1 cruza la BBB en ratones, es posible que este no sea el caso en humanos. Por esa razón, utilizamos modelos in vitro de la BBB humana, que pueden ser útiles para estudiar los mecanismos de permeabilidad de la BBB. El modelo utilizado en este estudio se deriva de iPSC humanas y desarrolla un fenotipo similar a una célula endotelial cerebral que incluye transportadores de entrada y salida de BBB funcionales y fuertes propiedades de barrera que permiten el estudio del transporte sin los efectos de confusión de una fuga de referencia alta [46](#) [47](#). En este modelo, no observamos diferencias significativas en la permeabilidad de I-S1 en comparación con T-Alb. La aparente ausencia de transporte de I-S1 a través de la BHE en este modelo in vitro podría deberse a problemas técnicos, como los bloqueadores de la unión de I-S1 en los tampones. También podría significar que los iBEC no expresaron las glicoproteínas de la membrana celular necesarias para el transporte de I-S1, o que I-S1 no puede cruzar la BBB humana. Una nota de precaución con respecto a la validez del uso de S1 monomérico como modelo para el SARS-CoV-2 es que S1 normalmente se adjunta al SARS-CoV-2 como un trímero. Sin embargo, la proteína S1 puede eliminarse del virus in vivo y, por lo tanto, el estudio de los monómeros S1 puede tener validez por sí mismo, aunque actualmente no hay evidencia directa de que las proteínas de pico se eliminen del SARS-CoV-2. En total,

Métodos

Ratones

Todos los estudios con ratones fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Ciencias y Salud de Oregón y el Sistema de Atención de la Salud de Asuntos de Veteranos de Puget Sound (VAPSHCS) y se realizaron en instalaciones aprobadas por la Asociación Estadounidense para la Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). Se compraron ratones CD-1 macho (6 a 10 semanas de edad) de Charles River Laboratories (Hollister). Se utilizó un total de 204 machos CD-1 para todos los estudios. Ratones macho y hembra de reemplazo dirigido (TR) humano E3 y E4, generados como se describió anteriormente [48](#), fueron criados en la Universidad de Ciencias y Salud de Oregón antes de ser transferidos a VAPSHCS para los experimentos. Los ratones E3 y E4 TR tenían aproximadamente 4 meses de edad el día del estudio. Se utilizaron un total de 21 ratones E3 y 20 E4 TR para todos los estudios. Los ratones tenían acceso ad libitum a comida y agua y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. La temperatura se mantuvo entre 18 y 23 °C y la humedad entre 40 y 60 %. Para todos los experimentos, los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de 0,15 a 0,2 ml de uretano al 40 % para minimizar el dolor y la angustia. Los ratones anestesiados se colocaron en una almohadilla térmica hasta el momento de su uso. Al final de cada estudio, los ratones fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia.

Fuentes y marcaje radiactivo de proteínas

Las proteínas S1 fueron proporcionadas por los fabricantes (RayBiotech, 230-30161, Val 16-Gln 690; AMSBIO, AMS.S1N-C52H3, Val 16-Arg 685). Las proteínas se disolvieron en PBS (pH 7,4) a una concentración de 0,45–0,61 mg ml⁻¹. Las proteínas se produjeron en líneas celulares HEK293, tenían etiquetas His C-terminales, se calculó que tenían aproximadamente 76 kDa en proteína, pero migraron en gel a 100–120 kDa debido a la glicosilación. Una vez recibidas, las proteínas S1 se descongelaron y se dividieron en alícuotas en porciones de 5 µg, y se usaron inmediatamente o se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Los 5 µg de proteína S1 descongelada se marcaron radiactivamente con 1 mCi de ¹²⁵I (Perkin Elmer) usando el método de cloramina-T, como se describió anteriormente [49](#). El I-S1 se purificó en una columna de G-10 Sephadex (GE Healthcare) y se eluyó con PBS en tubos de vidrio que contenían BSA al 1 % en solución de Ringer lactato (BSA-LR). Basándonos en la cantidad de proteína yodada, estimamos que la actividad específica de I-S1 era de aproximadamente 11 Ci g⁻¹ o alrededor de 12,5 ng por 300 000 cpm BSA (Sigma) se marcó con ^{99m}Tc (GE Healthcare) utilizando el método de tartrato estannoso [50](#). T-Alb se purificó en una columna de G-10 Sephadex. Tanto los I-S1 como los T-Alb eran más del 90% precipitables con ácido. El peso molecular de las proteínas marcadas se confirmó analizando una actividad de 200 000-600 000 cpm en tampón LDS 1x (Invitrogen) con o sin agente reductor (Invitrogen) en un gel Bis-Tris al 4–12 % (GenScript) en tampón MOPS (Invitrogen). Luego, el gel se fijó durante 30 min en ácido acético al 10 %/metanol al 50 %, se lavó 3 veces con agua y luego se secó usando un sistema de secado DryEase Mini-Gel (Invitrogen). Los geles secos se expusieron en una película de autorradiografía durante 24 horas y luego se revelaron. Las bandas principales de I-S1 de RayBiotech y AMSBIO migraron a sus patrones de peso molecular predichos, según los datos del fabricante (Datos extendidos Fig. [1](#)).

Medición de la tasa de entrada de sangre al cerebro

Se usó MTRA [51](#)·[52](#) para medir la constante de flujo unidireccional de sangre al cerebro (K_i) para I-S1. En ratones anestesiados, la vena yugular izquierda se expuso a una inyección iv de 0,1 ml de BSA-LR que contenía 3×10^5 cpm de I-S1. T-Alb (6×10^5 cpm) también se incluyó en la inyección para medir el espacio vascular del cerebro y el espacio de albúmina para los tejidos periféricos. En puntos de tiempo entre 1 y 30 min, se recogió sangre de la arteria carótida. La sangre se centrifugó a 3200 g durante 10 min y se recogieron 50 μ l de suero. Se extrajo y pesó todo el cerebro, el riñón y el bazo y partes del pulmón y el hígado. Los tejidos y el suero se colocaron en un Wizard² contador gamma (Perkin Elmer), y se midieron los niveles de radiactividad. Los resultados para el cerebro y otros tejidos se expresaron como la relación tejido/suero en unidades de μ l g⁻¹ tanto para I-S1 como para T-Alb. Para cada tejido individual, su relación tejido/suero para T-Alb se sustrajo de su relación tejido/suero para I-S1, dando un valor 'delta'. Estos valores delta se corrigieron por lo tanto para el espacio vascular y cualquier fuga no específica en el tejido y, por lo tanto, representan la captación de proteína I-S1 que no se debió a atrapamiento en el espacio vascular o fuga. Las proporciones delta cerebro/suero se trazaron frente al tiempo de exposición, un cálculo que corrige la eliminación de la sangre:

$$\text{Expt} = \frac{\int_0^t C_p(\tau) d\tau}{C_{pt}} \quad \text{Expt} = \frac{\int_0^t C_p(\tau) d\tau}{C_{pt}}$$

(1)

donde t es el tiempo entre la inyección iv y el muestreo, C_p es el cpm por ml de suero arterial, C_{pt} es el cpm por ml de suero arterial en el tiempo t y τ es la variable ficticia para el tiempo. La pendiente de la porción lineal de la relación de la relación tejido/suero versus el tiempo de exposición mide la tasa de flujo de entrada unidireccional (K_i en μ l g⁻¹ min⁻¹) y la intersección *mide* V_i , el espacio vascular y la unión luminal inicial en $t = 0$ (ref. [51](#)·[52](#)):

$$\text{Tissue/serumratio} = K_i(\text{expt}) + V_i \quad \text{Tissue/serumratio} = K_i(\text{expt}) + V_i$$

(2)

Cálculos de área bajo la curva y porcentaje de dosis inyectadas

El AUC para el nivel de radiactividad en sangre de 0 a 30 min se calculó utilizando el software Prism 8.0 (GraphPad). Los resultados de suero se expresaron como el porcentaje de la dosis inyectada por ml de sangre (% inj ml⁻¹). El porcentaje de la dosis inyectada por gramo de cerebro (% inj g⁻¹) se calculó multiplicando el valor delta cerebro/suero por el porcentaje de dosis inyectada por ml para I-S1.

Estabilidad de I-S1 en cerebro y sangre

Los ratones anestesiados recibieron una inyección en la vena yugular de 0,1 ml de BSA-LR que contenía 6×10^5 cpm de I-S1 y 6×10^5 cpm de T-Alb. Diez minutos después de la inyección, se extrajo sangre arterial de la aorta abdominal, se abrió el tórax y se pinzaron las arterias torácicas descendentes, se cortaron ambas venas yugulares y se perfundieron 20 ml de solución de Ringer lactato a través del ventrículo izquierdo del corazón para lavar el espacio vascular. del cerebro A continuación, se extirpó todo el cerebro. Se centrifugó sangre completa y se añadieron 10 μ l de suero a 500 μ l de BSA-LR y se combinaron con una parte igual de ácido tricloroacético al 30%, se mezcló, se centrifugó y se contó el sobrenadante y el sedimento. Se homogeneizaron cerebros completos en BSA-LR con inhibidor de proteasa mini completo (Roche; una tableta por 10 ml de tampón) con un homogeneizador de vidrio portátil y se centrifugaron. El sobrenadante resultante se combinó con partes iguales de ácido tricloroacético al 30 %, se mezcló, Se centrifugó y se

contó el sobrenadante y el sedimento. Para determinar la cantidad de degradación de I-S1 o T-Alb que se produjo durante el procesamiento, se añadieron I-S1 y T-Alb a cerebros y sangre entera arterial de animales a los que no se les había inyectado radiactividad y se procesaron inmediatamente como se indicó anteriormente. El porcentaje de radiactividad que precipitó el ácido (%P) en todas estas muestras se calculó mediante la ecuación:

$$\%P=100(S)/(S+P)\%P=100(S)/(S+P)$$

(3)

donde S es el cpm en el sobrenadante y P es el cpm en el sedimento.

Agotamiento capilar del cerebro

El método de agotamiento capilar adaptado a ratones se utilizó para separar los capilares cerebrales y los componentes vasculares del [parénquima cerebral 53,54](#). Utilizamos la variante de la técnica que también estima la unión reversible a la luz capilar. Esto último se realiza evaluando dos grupos de ratones: uno con un paso de lavado vascular, que elimina el material unido de forma reversible a la luz capilar (grupo de lavado), y otro sin el paso de lavado (grupo sin lavado). La diferencia entre estos grupos representa el material que se adhirió de manera reversible a la luz capilar (ecuación 4). Los ratones fueron anestesiados y recibieron una inyección iv de 6×10^5 cpm T-Alb con 6×10^5 cpm I-S1 en 0,1 ml BSA-LR. A los 5, 10 y 30 minutos más tarde, se obtuvo sangre de la arteria carótida y se extrajo el cerebro (grupo sin lavado). En un grupo separado de ratones, se extrajo sangre de la aorta abdominal a los 5, 10 y 30 min, se abrió el tórax y se pinzaron las arterias torácicas descendentes, se cortaron ambas yugulares y se infundieron 20 ml de solución de Ringer lactato a través del ventrículo izquierdo de el corazón para lavar el contenido vascular del cerebro y eliminar cualquier material asociado de forma reversible con la luz capilar (grupo de lavado). Cada cerebro completo se homogeneizó en vidrio con tampón fisiológico (10 mM HEPES, 141 mM NaCl, 4 mM KCl, 2,8 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄-H₂O, 10 mM D-glucosa (pH 7,4)) y se mezcló completamente con dextrano al 26%. El homogeneizado se centrifugó a 4255 g durante 15 min a 4 °C. Se separaron cuidadosamente el sedimento, que contenía los capilares, y el sobrenadante, que representaba el espacio del parénquima cerebral. Se determinaron los niveles de radiactividad en el sedimento capilar, el sobrenadante cerebral y el suero arterial tanto para T-Alb como para I-S1 y se expresaron como las relaciones capilar/suero y parénquima cerebral/suero. Las proporciones parenquimatosas I-S1 se corrigieron por contaminación vascular restando las proporciones correspondientes para T-Alb; estos resultados se informan como las proporciones de parénquima cerebral delta/suero. La cantidad de S1 en el espacio del parénquima cerebral se tomó como el espacio delta del parénquima cerebral del grupo de lavado (P_w), la cantidad en el capilar como el capilar del grupo de lavado (C_w), y la cantidad de material que se une débilmente a la superficie luminal (luminal) como:

$$\text{Luminal}=(P+C)-(P_w+C_w)\text{Luminal}=(P+C)-(P_w+C_w)$$

(4)

Donde P es el espacio del parénquima cerebral delta y C es el espacio capilar, ambos de los grupos sin lavado.

Efectos de la aglutinina de germen de trigo y la heparina

Coinyectamos WGA con I-S1 para determinar el papel de las glicoproteínas que contienen ácido siálico y *N*-acetilglucosamina en la absorción de S1 por la BBB y otros tejidos. Se anestesiaron los ratones, después de lo cual se expusieron la vena yugular y la arteria carótida derecha. Luego, los ratones recibieron una inyección en la vena yugular de 0,1 ml de BSA-LR que contenía 3×10^5 cpm de I-S1 y 6×10^5 cpm de T-Alb y, en un subconjunto de ratones, 10 µg de la planta lectina WGA (Sigma). Se recogieron muestras de cerebro, tejidos y suero 5 min más tarde y se calcularon las relaciones tejido/suero como antes en unidades de µl por gramo. El sulfato de heparán es utilizado como receptor por algunos virus [25](#) y la heparina, al unirse a las proteínas virales, puede bloquear la entrada del virus en el cerebro [19:26](#). Por lo tanto, grupos separados de ratones tenían heparina (12 U por ratón) incluida en la inyección.

Saturación de I-S1 y unión a la enzima ACE2

En ratones anestesiados, la vena yugular izquierda se expuso a una inyección iv de 0,1 ml de BSA-LR que contenía 3×10^5 cpm de I-S1 (RayBiotech) y 6×10^5 cpm de T-Alb. Para algunos ratones, la inyección contenía 1 µg por ratón de S1 no marcado (AMSBIO), acil grelina de ratón (CBio), angiotensina II (Tocris) o ACE2 humano (R&D). Diez minutos después de la inyección iv, se obtuvo sangre completa de la arteria carótida y se centrifugó después de la coagulación. Se extirparon todo el cerebro, el bulbo olfatorio, el riñón, el bazo y partes del hígado y del pulmón. Se determinaron los niveles de radiactividad en el suero arterial y los tejidos y los resultados se expresaron como el porcentaje de I-S1 inyectado por ml para el suero y relaciones delta tejido/suero para los tejidos.

Inyecciones de lipopolisacáridos

A ratones macho CD-1 de 6 a 10 semanas de edad se les administró una inyección intraperitoneal de 3 mg kg^{-1} de LPS de *S. typhimurium* (Sigma) disueltos en solución salina normal estéril a las 0, 6 y 24 h. A las 28 h, los ratones se anestesiaron y se expusieron la vena yugular izquierda y la arteria carótida derecha. Los ratones recibieron una inyección iv de 6×10^5 cpm de I-S1 y 6×10^5 cpm de T-Alb en 0,1 ml de BSA-LR en la vena yugular izquierda. Se recolectó sangre arterial de la arteria carótida derecha 10 minutos más tarde, el ratón se decapitó inmediatamente, se extrajo el cerebro, se diseccionó en regiones (bulbo olfatorio, corteza frontal, corteza occipital, corteza parietal, tálamo, hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo, protuberancia medular, cerebelo y mesencéfalo) y se pesaron las regiones. También se extrajeron y pesaron riñones, bazos y porciones de hígado y pulmón. El suero se obtuvo centrifugando la sangre de la arteria carótida durante 10 min a 4255 g . Los niveles de radiactividad en suero, regiones cerebrales y tejidos se midieron en un contador gamma. Los valores de todo el cerebro se calcularon sumando los niveles de radiactividad y el peso de todas las regiones del cerebro excepto el bulbo olfativo. Los datos de las regiones del cerebro de los ratones de control (que no recibieron LPS) se analizaron por separado en busca de diferencias entre las regiones del cerebro y también se usaron en comparaciones con ratones tratados con LPS. Se determinaron los niveles de radiactividad en el suero arterial y las regiones y tejidos del cerebro y los resultados se expresaron como el porcentaje de I-S1 inyectado por ml para el suero y relaciones delta tejido/suero ($\mu\text{l g}^{-1}$) para los tejidos.

Entrega intranasal de I-S1

Los ratones anestesiados se colocaron en posición supina y recibieron una inyección de 1 µl de $2 \times 10^5 - 3 \times 10^5$ cpm I-S1 en BSA-LR administrado en cada naris, entregado al nivel de la placa cribosa (4 mm de profundidad), utilizando una punta MultiFlex de 10 µl

(Thermo Fisher Scientific). Después de la administración, el ratón permaneció en posición supina durante 30 s antes de colocarse sobre el lado izquierdo. Se recolectó sangre arterial de la arteria carótida derecha 10 o 30 minutos más tarde, el ratón se decapitó inmediatamente, se extrajo el cerebro y se diseccionó en regiones (bulbo olfatorio, corteza frontal, corteza occipital, corteza parietal, tálamo, hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo, protuberancia). médula, cerebelo y mesencéfalo) y se pesaron las regiones. El suero se obtuvo centrifugando la sangre de la arteria carótida durante 10 min a 4255 g. Los niveles de radiactividad en el suero y las regiones del cerebro se midieron en un Wizard ²contador gamma. Los valores de todo el cerebro se calcularon sumando los niveles de radiactividad y el peso de todas las regiones del cerebro excepto el bulbo olfativo. Se determinaron los niveles de radiactividad en el suero arterial y los tejidos y se expresaron los resultados como el porcentaje de I-S1 inyectado por ml de suero y se calculó el porcentaje de I-S1 inyectado por gramo de región cerebral.

MTRA en ratones *ApoE*

P. Sullivan proporcionó ratones *APOE* TR humanos que expresan *ApoE3* o *ApoE4* humanos, bajo el control del promotor de *ApoE* de ratón y en el fondo C57BL/6J, para reproducirlos [55-56](#), como se describió anteriormente [57](#). Con TR, el gen resultante contiene el promotor *ApoE* de ratón y la *ApoE* de ratón se reemplaza por la *ApoE* humana, de modo que solo se expresa el gen humano, y no el gen de ratón. La colonia se mantiene mediante reproducción homocigótica. Para prevenir la deriva genética, regularmente, la *ApoE* humana los ratones que expresan diferentes isoformas se cruzan entre sí y, posteriormente, se crían de nuevo en homocigosidad para refrescar la colonia. Ratones machos y hembras que eran homocigóticos para *ApoE3* o *ApoE4* fueron estudiados por MTRA como se describe anteriormente. ANOVA de dos vías utilizó el sexo y el genotipo *APOE* como variables independientes. Como se describió anteriormente, las proporciones de tejido/suero T-Alb se usaron para medir y corregir cualquier alteración de la BBB.

Transporte de I-S1 a través de células similares al endotelio cerebral derivadas de iPSC

Los iBEC se derivaron de la línea GM25256 iPSC (Coriell Institute) utilizando el método de Neal et al. [58](#) con una densidad de siembra de 15.000 células por pocillo para la diferenciación, que resultó ser óptima para esta línea celular. El uso de esta línea de células madre se realizó de acuerdo con un Acuerdo de Transferencia de Material entre VAPSHCS y el Instituto Coriell y fue aprobado por el Comité Institucional de Bioseguridad de VAPSHCS. Brevemente, las iPSC se cultivaron hasta una densidad óptima en placas recubiertas con Matrigel (VWR, 62405-134) en medio E8 Flex (Thermo Fisher Scientific, A2858501), y luego se pasaron con Accutase (Thermo Fisher Scientific, A1110501) a placas recubiertas con Matrigel en Medio E8 Flex más inhibidor de ROCK Y-27632 10 μ M (R&D Systems, 1254). Al día siguiente, el medio se cambió a E6 (Thermo Fisher Scientific, A1516401) y los cambios de E6 continuaron diariamente durante tres días más. A continuación, el medio se cambió a medio libre de suero endotelial humano (HESFM; ⁻¹ de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; Peprotech, 100-18B), ácido retinoico 10 μ M (Sigma, R2625) y suplemento B27 al 1% (Thermo Fisher Scientific, 17504044). 48 h más tarde, los iBEC se subcultivaron en insertos Transwell de 24 pocillos (Corning, 3470) recubiertos con 1 mg ml⁻¹ de colágeno IV (Sigma, C5533) y fibronectina 5 mM (Sigma, F1141) en HESFM + 20 ng ml⁻¹ bFGF, ácido retinoico 10 μ M y B27 al 1%. A las 24 h después del subcultivo, el medio se cambió a HESFM + 1% B27 sin bFGF ni ácido retinoico, y se registró la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) utilizando un voltímetro End EVOM2 (World Precision Instruments) acoplado a una cámara de copa EndOhm. Las

mediciones de TEER se realizaron diariamente y los experimentos de transporte S1 se realizaron cuando TEER se estabilizó, entre 10 y 13 días *in vitro*. Los valores de TEER en estos estudios superaron los $1000 \Omega \text{ cm}^2$, y se confirmó que los valores medios de TEER eran iguales entre los grupos justo antes de comenzar el estudio de transporte.

Antes de los estudios de transporte, se cambió el medio y las células se equilibraron en la incubadora durante 20 min. Luego se agregaron HESFM tibio + B27 al 1%, 1 millón de cpm de T-Alb y 500,000 cpm de I-S1 en un volumen de 100 μl a la cámara luminal. Después de tiempos de incubación de 10, 20, 30 y 45 min a 37 °C, se recogieron volúmenes de 500 μl de medio de la cámara abluminal y se reemplazaron con medio fresco precalentado. A continuación, las muestras se precipitaron con ácido añadiendo una concentración final de BSA al 1 % para visualizar el sedimento y ácido tricloroacético al 15 % para precipitar las proteínas en solución. Las muestras se centrifugaron a 4.255 g durante 15 min a 4 °C. La radiactividad en el sedimento se contó en el contador gamma y los coeficientes de área superficial de permeabilidad para T-Alb e I-S1 se calcularon de acuerdo con el método de Dehouck et al. [59](#). El aclaramiento se expresó como μl de trazador radiactivo que se transportó desde la cámara luminal a la abluminal, calculado a partir del nivel inicial de radiactividad precipitable con ácido agregado a la cámara luminal y el nivel final de radiactividad en la cámara abluminal:

$$\text{Clearance}(\mu\text{l}) = \frac{[C]_c \times V_c}{[C]_L} \text{Clearance}(\mu\text{l}) = \frac{[C]_c \times V_c}{[C]_L}$$

(5)

Donde $[C]_L$ es la concentración inicial de radiactividad en la cámara luminal (en $\text{cpm } \mu\text{l}^{-1}$), $[C]_c$ es la concentración de radiactividad en la cámara abluminal ($\text{cpm } \mu\text{l}^{-1}$) y V_c es el volumen de la cámara abluminal en μl . El volumen despejado se graficó frente al tiempo y la pendiente se estimó mediante regresión lineal. Las pendientes de las curvas de espacio libre para la monocapa iBEC más la membrana Transwell se indicaron mediante PS_{app} , donde PS es el producto de permeabilidad \times área superficial (en $\mu\text{l min}^{-1}$). La pendiente de la curva de aclaramiento para una membrana Transwell sin iBEC se denotó por $PS_{membrana}$. El valor PS para la monocapa iBEC (PS_e) se calculó a partir de $1/PS_{app} = 1/PS_{membrana} + 1/PS_e$. Los valores de PS_e se dividieron por el área superficial de los insertos de Transwell ($0,33 \text{ cm}^2$) para generar el coeficiente de permeabilidad endotelial (P_e ; en $\mu\text{l min}^{-1} \text{ cm}^2$).

Estadísticas y reproducibilidad

Tamaño de la muestra, aleatorización y cegamiento

Los tamaños de muestra se predeterminaron en función de la varianza que se conoce a partir de la realización previa de experimentos similares en el transporte de BBB. Seleccionamos tamaños de muestra para proporcionar una potencia de 0,8 a 0,9 basada en diferencias de 30 a 40 % entre las medias. Los ratones anestesiados se aleatorizaron entre los grupos de prueba alternando sus asignaciones. Los Transwells se evaluaron para TEER antes de los experimentos y se asignaron a grupos de tal manera que los valores de TEER entre grupos tenían medias y varianzas aproximadamente iguales. No se hizo cegamiento para experimentos o análisis porque este conocimiento se requería para llevar a cabo experimentos y análisis.

Exclusión y replicación de datos

Para MTRA, el método exige la exclusión de puntos de datos que contribuyen a la no linealidad de la curva. Los valores atípicos cuya exclusión mejoró el $r^2 \geq 0,2$ se excluyeron

del análisis (los puntos excluidos se indican mediante círculos rellenos en las figuras [2](#) y [3](#)) y más explicado en las leyendas). Para ANOVA y comparaciones de medias, se aplicó una vez la prueba de exclusión de valores atípicos de Grubbs (alfa < 0,05) para detectar valores atípicos únicos, y cualquier valor atípico que se excluyó mediante este método se indicó en las leyendas de las figuras y se proporcionaron sus valores. Cada figura se generó como una única réplica experimental, con la excepción de los estudios de iPSC en los que se compararon el transporte de albúmina y S1 en tres experimentos independientes. Sin embargo, el uso de T-Alb como control interno para todos los experimentos nos permitió realizar un seguimiento de la consistencia entre los experimentos con diferentes diseños en función de sus proporciones predecibles de tejido/suero. Además, las proporciones de tejido/suero I-S1 tomadas en los mismos puntos de tiempo de diferentes experimentos podrían compararse y concordar bien entre sí,

análisis estadístico

Se utilizó Prism 8.0 para todos los cálculos estadísticos (GraphPad). Se utilizó un análisis de regresión lineal simple para calcular las pendientes y las intersecciones, y los términos de error para la pendiente y la intersección y son los errores estándar. Como requiere MTRA, solo se usó la parte lineal de la pendiente para calcular K_i . Se usó ANCOVA para determinar si diferían las pendientes y las intersecciones de dos líneas, y se usó ANOVA de dos vías para determinar los efectos del sexo y el genotipo en las líneas de regresión en los estudios con ratones *APOE*. Se usaron pruebas de dos colas para comparar dos medias, y ANOVA de una o dos vías y pruebas de comparaciones múltiples cuando se compararon más de dos medias. Las pruebas estadísticas utilizadas se especifican en todas las leyendas de las figuras. Se asumió que la distribución de datos era normal, pero esto no se probó formalmente. Sin embargo, todos los puntos de datos se muestran con la media y la desviación estándar.

Resumen de informes

Más información sobre el diseño de la investigación está disponible en el [Resumen de informes de investigación de Nature](#) vinculado a este artículo.

Disponibilidad de datos

Los datos que respaldan los hallazgos de este estudio están disponibles del autor correspondiente a pedido razonable. [Los datos de origen](#) se proporcionan con este documento.

Referencias

1. 1.

Li, YC, Bai, WZ & Hashikawa, T. El potencial neuroinvasivo del SARS-CoV-2 puede desempeñar un papel en la insuficiencia respiratoria de los pacientes con COVID-19. *J. Med. Virol.* **92**, 552–555 (2020).

[CAS PubMed Google Académico](#)

2. 2.

Mao, L. et al. Manifestaciones neurológicas de pacientes hospitalizados con enfermedad por coronavirus 2019 en Wuhan, China. *JAMA Neurol.* **77**, 1–9 (2020).

[Centro de PubMed Google Académico](#)

3. 3.

Saleki, K., Banazadeh, M., Saghadzadeh, A. & Rezaei, N. La participación del sistema nervioso central en pacientes con COVID-19. *Rev. Neurosci.* **31** , 453–456 (2020).

[CAS PubMed Google Académico](#)

4. 4.

Moriguchi, T. et al. Un primer caso de meningitis/encefalitis asociada al SARS-Coronavirus-2. *En t. J. infectar. Dis.* **94** , 55–58 (2020).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

5. 5.

Wang, J., Jiang, M., Chen, X. & Montaner, LJ Tormenta de citoquinas y cambios de leucocitos en infecciones leves versus severas por SARS-CoV-2: revisión de 3939 pacientes con COVID-19 en China y conceptos emergentes de patogénesis y terapia. *J. Leukoc. Biol.* **108** , 17–41 (2020).

[CAS Google Académico](#)

6. 6.

Bleau, C., Filliol, A., Samson, M. y Lamontagne, L. La invasión cerebral por el virus de la hepatitis del ratón depende del deterioro de las uniones estrechas y la producción de interferón beta en las células endoteliales microvasculares del cerebro. *J.Virol.* **89** , 9896–9908 (2015).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

7. 7.

Subbarao, K. et al. La infección previa y la transferencia pasiva de anticuerpos neutralizantes previenen la replicación del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo en el tracto respiratorio de los ratones. *J.Virol.* **78** , 3572–3577 (2004).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

8. 8.

Xu, J. et al. Detección del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo en el cerebro: papel potencial de la quimiocina mig en la patogénesis. *clin. Infectar. Dis.* **41** , 1089–1096 (2005).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

9. 9.

Bullen, CK et al. La infectabilidad de las neuronas BrainSphere humanas sugiere neurotropismo del SARS-CoV-2. *ALTEX* **37** , 665–671 (2020).

[PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

10. 10

Erickson, MA & Banks, WA Ejes neuroinmunes de las barreras hematoencefálicas e interfaces hematoencefálicas: bases para la regulación fisiológica, estados patológicos e intervenciones farmacológicas. *Farmacol. Rev.* **70** , 278–314 (2018).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

11. 11

Oh, SK et al. Identificación de la glicoproteína de la cubierta del VIH-1 en el suero de pacientes con SIDA y ARC. *J. Adquirir. Inmunodeficiencia Sindr.* **5** , 251–256 (1992).

[CAS PubMed Google Académico](#)

12. 12

Westendorp, MO et al. Sensibilización de células T a la apoptosis mediada por CD95 por HIV-1 Tat y gp120. *Naturaleza* **375** , 497–500 (1995).

[CAS PubMed Google Académico](#)

13. 13

Bansal, AK et al. Neurotoxicidad de las proteínas gp120 y Tat del VIH-1 en el estriado de rata. *Res. cerebral.* **879** , 42–49 (2000).

[CAS PubMed Google Académico](#)

14. 14

Rychert, J., Strick, D., Bazner, S., Robinson, J. & Rosenberg, E. La detección de gp120 de VIH en plasma durante la infección temprana por VIH se asocia con un aumento de citocinas proinflamatorias e inmunorreguladoras. *Res. SIDA Tararear. Retrovirus* **26** , 1139–1145 (2010).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

15. 15.

Banks, WA, Kastin, AJ & Akerstrom, V. La proteína gp120 del VIH-1 cruza la barrera hematoencefálica: papel de la endocitosis por adsorción. *Ciencias de la vida* **61** , L119–L125 (1997).

[Google Académico](#)

16. dieciséis.

Banks, WA, Robinson, SM & Nath, A. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica al VIH-1 Tat. *Exp. Neurol.* **193** , 218–227 (2005).

[CAS PubMed Google Académico](#)

17. 17

Raber, J. et al. La expresión del sistema nervioso central de HIV-1 Gp120 activa el eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal: evidencia de la participación de los receptores NMDA y la óxido nítrico sintasa. *Virología* **226** , 362–373 (1996).

[CAS PubMed Google Académico](#)

18. 18

Bancos, WA et al. Transporte de pseudovirus del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 a través de la barrera hematoencefálica: papel de las proteínas de la envoltura y la endocitosis de adsorción. *J.Virol.* **75** , 4681–4691 (2001).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

19. 19

Banks, WA, Robinson, SM, Wolf, KM, Bess, JW Jr. y Arthur, LO La unión, la internalización y la incorporación a la membrana del virus de la inmunodeficiencia humana 1 en la barrera hematoencefálica están reguladas de manera diferencial. *Neurociencia* **128** , 143–153 (2004).

[CAS PubMed Google Académico](#)

20. 20

Weiss, SR & Navas-Martin, S. Patogénesis del coronavirus y el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo patógeno emergente. *Microbiol. mol. Biol. Rev.* **69** , 635–664 (2005).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

21. 21

Yan, R. et al. Base estructural para el reconocimiento de SARS-CoV-2 por ACE2 humano de longitud completa. *Ciencia* **367** , 1444–1448 (2020).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

22. 22

Hoffmann, M. et al. La entrada de células SARS-CoV-2 depende de ACE2 y TMPRSS2 y está bloqueada por un inhibidor de proteasa clínicamente probado. *Celda* **181** , 271–280 (2020).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

23. 23

Shang, J. et al. Base estructural del reconocimiento de receptores por SARS-CoV-2. *Naturaleza* **581** , 221–224 (2020).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

24. 24

Villegas, JC & Broadwell, RD Transcitosis de proteínas a través del epitelio y endotelio cerebral de mamíferos: II. Transcitosis por adsorción de WGA-HRP y las barreras hematoencefálica y hematoencefálica. *J. Neurocitol.* **22** , 67–80 (1993).

[CAS PubMed Google Académico](#)

25. 25

Schweighardt, B. & Atwood, WJ Receptores de virus en el sistema nervioso central humano. *J. Neurovirol.* **7** , 187–195 (2001).

[CAS PubMed Google Académico](#)

26. 26

Ramos-Kuri, M., Barron Romero, BL & Aguilar-Setien, A. Inhibición de tres alfa herpesvirus (herpes simplex 1 y 2 y virus de la pseudorrabia) por heparina, heparán y otros polielectrolitos sulfatados. *Arco. Medicina. Res.* **27** , 43–48 (1996).

[CAS PubMed Google Académico](#)

27. 27

Nottet, HS et al. Mecanismos para la migración transendotelial de monocitos infectados con VIH-1 al cerebro. *J. Immunol.* **156** , 1284–1295 (1996).

[CAS PubMed Google Académico](#)

28. 28

Banks, WA, Kastin, AJ, Brennan, JM y Vallance, KL La endocitosis de adsorción de HIV-1gp120 por la barrera hematoencefálica se ve reforzada por el lipopolisacárido. *Exp. Neurol.* **156** , 165–171 (1999).

[CAS PubMed Google Académico](#)

29. 29

Erickson, MA & Banks, WA Respuestas de citoquinas y quimioquinas en suero y cerebro después de inyecciones únicas y repetidas de lipopolisacárido: cuantificación múltiple con análisis de ruta. *Comportamiento cerebral. inmune* **25** , 1637-1648 (2011).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

30. 30

van Riel, D., Verdijk, R. & Kuiken, T. El nervio olfativo: un atajo para la influenza y otras enfermedades virales en el sistema nervioso central. *J. Pathol.* **235** , 277–287 (2015).

[PubMed Google Académico](#)

31. 31

Kuo, CL, et al. Genotipo *ApoE* e4e4 y mortalidad con COVID-19 en UK Biobank. *J. Gerontol. Un Biol. ciencia Medicina. ciencia* **75** , 1801–1803 (2020).

32. 32.

Gebhard, C., Regitz-Zagrosek, V., Neuhauser, HK, Morgan, R. & Klein, SL Impacto del sexo y el género en los resultados de COVID-19 en Europa. *Biol. Sexo. Diferir de.* **11** , 29 (2020).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

33. 33.

Li, LQ et al. Características clínicas de los pacientes con COVID-19, tasa de alta y tasa de letalidad del metanálisis. *J. Med. Virol.* **92** , 577–583 (2020).

[CAS PubMed Google Académico](#)

34. 34.

Paredes, AC et al. Los cambios conformacionales tectónicos de una glicoproteína de punta de coronavirus promueven la fusión de membranas. *proc. Academia Nacional. ciencia EE . UU.* **114** , 11157–11162 (2017).

[CAS PubMed Google Académico](#)

35. 35.

McCray, PB Jr. et al. Infección letal de ratones K18-hACE2 infectados con coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo. *J.Virol.* **81** , 813–821 (2007).

[CAS PubMed Google Académico](#)

36. 36.

Dohgu, S., Ryerse, JS, Robinson, SM y Banks, WA El virus de inmunodeficiencia humana 1 utiliza el receptor de manosa-6-fosfato para atravesar la barrera hematoencefálica. *PLoS ONE* **7** , e39565 (2012).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

37. 37.

Radzikowska, U. et al. Distribución de ACE2, CD147, CD26 y otras moléculas asociadas al SARS-CoV-2 en tejidos y células inmunitarias en salud y en factores de riesgo de asma, EPOC, obesidad, hipertensión y COVID-19. *Alergia* **75** , 2829–2845 (2020).

[CAS PubMed Google Académico](#)

38. 38.

Vankadari, N. & Wilce, JA Coronavirus emergente de WuHan (COVID-19): escudo de glucano y predicción de la estructura de la glicoproteína espiga y su interacción con el CD26 humano. *emergente Los microbios infectan.* **9** , 601–604 (2020).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

39. 39.

Ibrahim, IM, Abdelmalek, DH, Elshahat, ME y Elfiky, AA Predicción del sitio de unión del receptor GRP78 de la célula huésped de la espiga COVID-19. *J. infectar.* **80** , 554–562 (2020).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

40. 40

Guruprasad, L. Reconocimiento del receptor del huésped de la proteína del pico del coronavirus humano. *prog. Biografía. mol. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.10.006> (2020).

41. 41.

Banks, WA & Kastin, AJ Caracterización de la captación cerebral mediada por lectina de HIV-1 gp120. *J. Neurosci. Res.* **54** , 522–529 (1998).

[CAS PubMed Google Académico](#)

42. 42.

Hassanzadeh, K., et al. Consideraciones en torno a la proteína espiga del SARS-CoV-2 con especial atención a la infección cerebral por COVID-19 y los síntomas neurológicos. *ACS química. Neurociencias* _ <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00373> (2020).

43. 43.

Prabakaran, P., Xiao, X. & Dimitrov, DS Un modelo de la estructura y función de ACE2 como receptor del SARS-CoV. *Bioquímica Biografía. Res. común* **314** , 235–241 (2004).

[CAS PubMed Google Académico](#)

44. 44.

Li, X. et al. Factores de riesgo de gravedad y mortalidad en pacientes hospitalizados adultos con COVID-19 en Wuhan. *J. Allergy Clin. inmunol.* **146** , 110–118 (2020).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

45. 45.

Machado, C., DeFina, PA, Chinchilla, M., Machado, Y. & Machado, Y. La disfunción del tronco cerebral en la infección por SARS-COV-2 puede ser una causa potencial de dificultad respiratoria. *Neurol. India* **68** , 989–993 (2020).

[PubMed Google Académico](#)

46. 46.

Al-Ahmad, AJ Estudio comparativo de la expresión y la actividad de los transportadores de glucosa entre células endoteliales microvasculares cerebrales derivadas de células madre y células hCMEC/D3. *Soy. J. Physiol. Fisiol Celular.* **313** , C421–c429 (2017).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

47. 47.

Lippmann, ES y col. Derivación de células endoteliales de la barrera hematoencefálica a partir de células madre pluripotentes humanas. *Nat. Biotecnología.* **30** , 783–791 (2012).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

48. 48.

Rodriguez, GA, Burns, MP, Weeber, EJ & Rebeck, GW Los ratones jóvenes de reemplazo dirigidos a *APOE4* exhiben un aprendizaje espacial y una memoria deficientes, con una densidad de espinas dendríticas reducida en la corteza entorrinal medial. *Aprender Mem.* **20** , 256–266 (2013).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

49. 49.

Montelaro, RC & Rueckert, RR Sobre el uso de cloramina-T para yodar específicamente las proteínas de superficie de virus con envoltura intacta. *J. Gen. Virol.* **29** , 127–131 (1975).

[CAS PubMed Google Académico](#)

50. 50

Wang, YF, Chuang, MH, Chiu, JS, Cham, TM y Chung, MI Preparación in situ de albúmina sérica humana marcada con tecnecio-99m para aplicación clínica. *Exp. Tohoku J. Medicina.* **211** , 379–385 (2007).

[CAS PubMed Google Académico](#)

51. 51.

Blasberg, RG, Fenstermacher, JD y Patlak, CS Transporte de ácido alfa-aminoisobutírico a través de los capilares cerebrales y las membranas celulares. *J. Cereb. Metab. del flujo sanguíneo.* **3** , 8–32 (1983).

[CAS PubMed Google Académico](#)

52. 52.

Blasberg, RG, Patlak, CS & Fenstermacher, JD Selección de condiciones experimentales para la determinación precisa de las constantes de transferencia sangre-cerebro a partir de experimentos de una sola vez: un análisis teórico. *J. Cereb. Metab. del flujo sanguíneo.* **3** , 215–225 (1983).

[CAS PubMed Google Académico](#)

53. 53.

Triguero, D., Buciak, J. & Pardridge, WM Método de agotamiento capilar para la cuantificación del transporte de péptidos y proteínas plasmáticas circulantes en la barrera hematoencefálica. *J. Neuroquímica.* **54** , 1882–1888 (1990).

[CAS PubMed Google Académico](#)

54. 54.

Gutierrez, EG, Banks, WA & Kastin, AJ El factor alfa de necrosis tumoral murino se transporta de la sangre al cerebro en el ratón. *J. Neuroimmunol.* **47** , 169-176 (1993).

[CAS PubMed Google Académico](#)

55. 55.

Knouff, C. et al. *La estructura de ApoE* determina la eliminación de VLDL y el riesgo de aterosclerosis en ratones. *J. Clin. Invertir.* **103** , 1579–1586 (1999).

[CAS PubMed Centro de PubMed Google Académico](#)

56. 56.

Sullivan, PM y col. El reemplazo dirigido del gen de la apolipoproteína E de ratón con el alelo común humano *APOE3* mejora la hipercolesterolemia y la aterosclerosis inducidas por la dieta. *J. Biol. química* **272** , 17972–17980 (1997).

[CAS PubMed Google Académico](#)

57. 57.

Siegel, JA, Haley, GE & Raber, J. Efectos dependientes de la isoforma de la apolipoproteína E sobre la ansiedad y la cognición en ratones hembra TR. *Neurobiol. Envejecimiento* **33** , 345–358 (2012).

[CAS PubMed Google Académico](#)

58. 58.

Neal, EH et al. Un esquema de diferenciación simplificado y completamente definido para producir células endoteliales de la barrera hematoencefálica a partir de iPSC humanas. *Stem Cell Rep.* **12** , 1380–1388 (2019).

[CAS Google Académico](#)

59. 59.

Dehouck, MP et al. Transferencia de fármacos a través de la barrera hematoencefálica: correlación entre modelos in vitro e in vivo. *J. Neuroquímica.* **58** , 1790–1797 (1992).

[CAS PubMed Google Académico](#)

[Descargar referencias](#)

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por VAPSHCS (WAB y MAE) y becas de investigación de los Institutos Nacionales de Salud (R21 AG065928-01 para MAE y RF-1 AG059088 para WAB y JR). Damos las gracias a R. Weaver, S. Pemberton y D. Quaranta de asistencia técnica.

Información del autor

afiliaciones

- 1. Geriatrics Research Education and Clinical Center, Veterans Affairs Puget Sound Health Care System, Seattle, WA, EE. UU.**

Elizabeth M. Rhea, Aric F. Logsdon, Kim M. Hansen, Lindsey M. Williams, Kristen K. Baumann, William A. Banks y Michelle A. Erickson

- 2. División de Gerontología y Medicina Geriátrica, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina de la Universidad de Washington, Seattle, WA, EE. UU.**

Elizabeth M. Rhea, Aric F. Logsdon, Kim M. Hansen, May J. Reed, William A. Banks y Michelle A. Erickson

- 3. Departamento de Neurociencias del Comportamiento, Universidad de Ciencias y Salud de Oregon, Portland, OR, EE. UU.**

Sarah J. Holden y Jacob Raber

- 4. Departamento de Neurología, Psiquiatría y Medicina Radiológica; División de Neurociencia, Departamentos de Neurología y Medicina de Radiación, ONPRC, Universidad de Ciencias y Salud de Oregon, Portland, OR, EE. UU.**

jacob raber

Contribuciones

EMR: diseño experimental, trabajo experimental y análisis de datos (experimentos con ratones), redacción, edición y gráficos. AFL: redacción, edición, trabajo experimental y análisis de datos (experimentos con ratones). KMH: redacción, edición, trabajo experimental y análisis de datos (marcaje y caracterización de proteínas y experimentos con ratones). LMW: trabajo experimental y análisis de datos (estudios in vitro), redacción

y edición. MJR: trabajo experimental (experimentos con ratones), diseño experimental, redacción y edición. KKB: trabajo experimental (experimentos con ratones), escritura y edición. SJH: trabajo experimental (*APOE*cría de ratones), redacción y edición. JR: redacción, edición y diseño experimental. WAB: diseño experimental, estadística, redacción, edición y gráficos. MAE: redacción, edición, diseño experimental y trabajo experimental (marcaje de proteínas, experimentos con ratones y estudios in vitro).

Autor correspondiente

Correspondencia a [William A. Banks](#) .

Declaraciones de ética

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Información adicional

Revisión por pares *Information Nature Neuroscience* agradece a Jean Millet ya los otros revisores anónimos por su contribución a la revisión por pares de este trabajo.

Nota del editor Springer Nature se mantiene neutral con respecto a los reclamos jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.

Datos extendidos

[Datos extendidos Fig. 1 Autorradiografía en gel de I-S1 de RayBiotech y AMSBIO.](#)

Imágenes recortadas de la fracción 9 de I-S1 de RayBiotech (panel izquierdo, 1 ul de aproximadamente 300 000 CPM ejecutado en condiciones reductoras y no reductoras, expuesto a la película durante 24 horas) y de AMSBIO (panel derecho, 1 ul de aproximadamente 600 000 CPM ejecutado en condiciones reductoras y no reductoras. En cada caso, tanto los geles reducidos como los no reducidos migraron a los pesos moleculares predichos por los fabricantes. Los geles de autorradiografía para validar el tamaño se corrieron una vez. Se confirmó la calidad del marcado I-S1 posterior. por precipitación ácida, descrito en métodos.

[Datos extendidos Fig. 2 I-S1 es absorbido uniformemente por todas las regiones del cerebro.](#)

A los ratones se les administró una inyección de I-S1 (RayBiotech) y se recogieron el bulbo olfatorio, el cerebro completo y la sangre 10 minutos más tarde. Los cerebros se diseccionaron en las 10 regiones mostradas. ANOVA unidireccional con regiones del cerebro como variable independiente mostró una tendencia a las diferencias ($p = 0,09$) y las pruebas de comparaciones múltiples post-hoc no mostraron diferencias entre las regiones del cerebro. $N = 11$ ratones. FCtx = corteza frontal, PCtx = corteza parietal, OCtx = corteza occipital.

[Datos extendidos Fig. 3 Agotamiento capilar para I-S1.](#)

Se realizaron estudios de agotamiento capilar para determinar la partición de I-S1 (RayBiotech) en la luz capilar, en el capilar y en el parénquima cerebral a lo largo del tiempo. El compartimento que contenía radiactividad se representó frente al tiempo del reloj y las pendientes se analizaron mediante regresión lineal. La pendiente de la línea trazada para la fracción parenquimatosa fue $0,187 \pm 0,016 \mu\text{L/g-min}$, $r^2 = 0,952$, $n = 9$

ratones y no fue cero ($p < 0,0001$); la pendiente para la fracción capilar fue de $0,027 \pm 0,006 \mu\text{L/g-min}$, $r^2 = 0,757$, $n = 9$ ratones y no fue cero ($p = 0,0023$). La pendiente para la unión luminal fue de $0,05041 \pm 0,04555 \mu\text{L/g-min}$ y no se desvió significativamente de cero ($p = 0,3050$, $n = 9$, $r^2 = 0,145$). El valor medio de la unión luminal en todos los puntos temporales fue de $1,75 \pm 0,50 \text{ l/g}$.

Datos extendidos Fig. 4 Transporte de proteínas S1 a través de monocapas de células endoteliales similares al cerebro (iBEC) derivadas de iPSC humanas.

un . El paso de RayBiotech I-S1 a través de la monocapa iBEC no fue significativamente más rápido que el de T-Alb ($p = 0,1464$, $t = 1,527$, $df = 16$; prueba t pareada de dos colas). Combinación de 3 diferenciaciones independientes, $n = 17$ transpocillos/grupo, TEER medio ($2578 \pm 897,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$). **segundo** _ Transporte de RayBiotech I-S1 en presencia de $5 \mu\text{g/ml}$ de exceso de S1 sin marcar. El exceso de S1 no tuvo un efecto significativo sobre I-S1 o T-Albumin Pe ($p > 0,5$; ANOVA de dos vías). $N = 5-6$ transwells/grupo de una sola diferenciación **c**. Los Transwells se trataron con WGA ($0,5 \text{ mg/ml}$) o vehículo. Hubo un efecto global significativo del tratamiento ($F(1, 9) = 9,435$, $p = 0,0133$) y el analito ($F(1, 9) = 6,949$, $p = 0,0271$) sobre el transporte RayBiotech I-S1 o T-Alb (dos -way ANOVA), pero no hubo efectos significativos de WGA en I-S1 o T-Alb Pe (prueba de comparaciones múltiples de Sidak). $N = 5-6$ pozos/grupo de una sola diferenciación. **D**. Comparación del transporte RayBiotech I-S1 y AMSBIO I-S1. T-Alb se incluyó con cada I-S1 y también se comparó con el I-S1. El ANOVA de dos vías mostró diferencias entre los I-S1 de las dos fuentes ($F(1,10) = 10,1$, $p = 0,0098$], pero no entre los analitos (T-Alb frente a I-S1). Las comparaciones múltiples con la prueba de Sidak mostraron un transporte más rápido para RayBiotech I-S1 vs AMSBIO I-S1 ($p = 0,0324$) $N = 6$ pozos/grupo de una sola diferenciación * $p < 0,05$.

Información suplementaria

Información suplementaria

Cuadros complementarios 1 y 2.

Resumen de informes

Datos fuente