

[Neurobiol Dis.](#) 2020 diciembre; 146: 105131.

Publicado en línea el 11 de octubre de 2020. doi: [10.1016/j.nbd.2020.105131](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105131)

PMCID: PMC7547916

PMID: [33053430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33053430/)

La proteína espiga del SARS-CoV-2 altera la función de barrera en modelos in vitro de microfluidos 2D estáticos y 3D de la barrera hematoencefálica humana

[Tetyana P. Buzhdygan](#) , ^{a, b} [Brandon J. DeOre](#) , ^c [Abigail Baldwin-Leclair](#) , ^c [Trent A. Bullock](#) , ^{a, b} [Hannah M. McGary](#) , ^a [Jana A. Khan](#) , ^a [Roshanak Razmpour](#) , ^a [Jonathan F. Hale](#) , ^a [Peter A. Galie](#) , ^c [Raghava Potula](#) , ^{a, b} [Allison M. Andrews](#) , ^{a, b} y [Servio H. Ramírez](#) ^{a, b, d, *}

[Información del autor](#) [Notas del artículo](#) [Información sobre derechos de autor y licencia](#) [Descargo de responsabilidad](#)

Este artículo se basa en una preimpresión disponible anteriormente: " [La proteína de pico SARS-CoV-2 altera la función de barrera en modelos in vitro microfluídicos 2D estáticos y 3D de la barrera hematoencefálica humana](#) ".

Este artículo ha sido [citado por](#) otros artículos en PMC.

Datos asociados

[Materiales complementarios](#)

[Declaración de disponibilidad de datos](#)

[Ir:](#)

Abstracto

A medida que los investigadores de todo el mundo han centrado su atención en comprender el SARS-CoV-2, la imagen que emerge es la de un virus que tiene efectos graves en la vasculatura en múltiples sistemas de órganos, incluida la vasculatura cerebral. Los efectos observados en el sistema nervioso central incluyen síntomas neurológicos (dolor de cabeza, náuseas, mareos), formación de microcoágulos fatales y, en casos raros, encefalitis. Sin embargo, nuestra comprensión de cómo el virus causa estos síntomas neurológicos leves a graves y cómo se ve afectada la vasculatura cerebral sigue sin estar clara. Por lo tanto, los resultados presentados en este informe exploraron si se podían observar resultados nocivos de la proteína de pico viral SARS-CoV-2 en células endoteliales microvasculares primarias del cerebro humano (hBMVEC). La proteína espiga, que juega un papel clave en el reconocimiento del receptor, está formado por la subunidad S1 que contiene un dominio de unión al receptor (RBD) y la subunidad S2. Primero, utilizando tejido cerebral post mortem, mostramos que la enzima convertidora de angiotensina 2 o ACE2 (un objetivo de unión conocido para la proteína de pico SARS-CoV-2), se expresa de manera ubicua en varios calibres de vasos en la corteza frontal. Además, la expresión de ACE2 aumentó en casos de hipertensión y demencia. ACE2 también fue detectable en hBMVEC primarios mantenidos en condiciones de cultivo celular. El análisis de la viabilidad celular reveló que ni el S1, S2 o una forma truncada del S1 que contenía solo el RBD tenían efectos mínimos sobre la viabilidad de hBMVEC dentro de una ventana de exposición de 48 h. Introducción de proteínas de

espiga a mostramos que la enzima convertidora de angiotensina 2 o ACE2 (un objetivo de unión conocido para la proteína de punta SARS-CoV-2), se expresa de manera ubicua en varios calibres de vasos en la corteza frontal. Además, la expresión de ACE2 aumentó en casos de hipertensión y demencia. ACE2 también fue detectable en hBMVEC primarios mantenidos en condiciones de cultivo celular. El análisis de la viabilidad celular reveló que ni el S1, S2 o una forma truncada del S1 que contenía solo el RBD tenían efectos mínimos sobre la viabilidad de hBMVEC dentro de una ventana de exposición de 48 h. Introducción de proteínas de espiga a mostramos que la enzima convertidora de angiotensina 2 o ACE2 (un objetivo de unión conocido para la proteína de punta SARS-CoV-2), se expresa de manera ubicua en varios calibres de vasos en la corteza frontal. Además, la expresión de ACE2 aumentó en casos de hipertensión y demencia. ACE2 también fue detectable en hBMVEC primarios mantenidos en condiciones de cultivo celular. El análisis de la viabilidad celular reveló que ni el S1, S2 o una forma truncada del S1 que contenía solo el RBD tenían efectos mínimos sobre la viabilidad de hBMVEC dentro de una ventana de exposición de 48 h. Introducción de proteínas de espiga a ACE2 también fue detectable en hBMVEC primarios mantenidos en condiciones de cultivo celular. El análisis de la viabilidad celular reveló que ni el S1, S2 o una forma truncada del S1 que contenía solo el RBD tenían efectos mínimos sobre la viabilidad de hBMVEC dentro de una ventana de exposición de 48 h. Introducción de proteínas de espiga a ACE2 también fue detectable en hBMVEC primarios mantenidos en condiciones de cultivo celular. El análisis de la viabilidad celular reveló que ni el S1, S2 o una forma truncada del S1 que contenía solo el RBD tenían efectos mínimos sobre la viabilidad de hBMVEC dentro de una ventana de exposición de 48 h. Introducción de proteínas de espiga a *Los modelos in vitro* de la barrera hematoencefálica (BBB) mostraron cambios significativos en las propiedades de barrera. La clave de nuestros hallazgos es la demostración de que S1 promueve la pérdida de integridad de la barrera en un modelo microfluídico 3D avanzado de la BBB humana, una plataforma que se asemeja más a las condiciones fisiológicas en esta interfaz del SNC. La evidencia proporcionada sugiere que las proteínas de punta del SARS-CoV-2 desencadenan una respuesta proinflamatoria en las células endoteliales del cerebro que pueden contribuir a un estado alterado de la función BBB. Juntos, estos resultados son los primeros en mostrar el impacto directo que la proteína del pico del SARS-CoV-2 podría tener en las células endoteliales del cerebro; ofreciendo así una explicación plausible de las consecuencias neurológicas observadas en pacientes con COVID-19.

Palabras clave: COVID-19, SARS-CoV-2, Biología vascular cerebral, Barrera hematoencefálica, Neuroinflamación, Chip microfluídico, Ingeniería de tejidos

[Ir:](#)

1. Introducción

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es una crisis de salud pública que emerge rápidamente. Inicialmente reportada como una neumonía de origen desconocido en la provincia china de Hubei, ahora se sabe que esta devastadora enfermedad es causada por el síndrome respiratorio agudo severo corona virus 2 o SARS-CoV-2. El SARS-CoV-2 es un nuevo β -coronavirus humano que comparte una alta homología de secuencia con el SARS-CoV ([Lu et al., 2020](#) ; [Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of V., 2020](#)). La infección se transmite principalmente por gotitas respiratorias y de persona a persona con un período medio de incubación de aproximadamente 5 días ([Lauer et al., 2020](#)).

El espectro clínico de COVID-19 varía de asintomático, leve a moderado, enfermedad autolimitada en la mayoría de los casos ([Huang et al., 2020](#) ; [Hassan et al., 2020](#) ; [Wang et al., 2020](#)). Sin embargo, pueden ocurrir consecuencias graves y fatales en algunos pacientes con comorbilidades como enfermedad cardiovascular/pulmonar y diabetes ([Guzik et al., 2020](#) ; [Yang et al., 2020](#) ; [Moriguchi et al., 2020](#)). La sintomatología más común en los pacientes incluye fiebre, tos seca, fatiga, diarrea, alteración del gusto/olfato, conjuntivitis y neumonía ([Lauer et al., 2020](#) ; [Chan et al., 2020](#)). Los pacientes con infección respiratoria grave pueden progresar al síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y al fallo multiorgánico ([Tay et al., 2020](#)). La gravedad de la enfermedad en los pacientes con COVID-19 se asocia con la desregulación del sistema inmunitario, como la linfopenia y la tormenta inflamatoria de citoquinas. Entre las otras características distintivas de COVID-19 se encuentran el dímero D elevado, la proteína C reactiva, la procalcitonina, la LDH, la ferritina, las LFT y la reducción de las células T CD4+/CD8+, lo que predice la mortalidad ([Liu et al., 2020](#) ; [Chen et al., 2020](#) ; [Guan et al., 2020](#) ; [Zhang et al., 2020](#)).

El sistema pulmonar está principalmente involucrado en los casos fatales de COVID-19. La observación histopatológica de varios estudios de autopsia ha descrito daño alveolar difuso con necrosis de las células de revestimiento alveolar, neumocitos de tipo II reactivos pronunciados, depósito lineal de fibrina intraalveolar y formación de membrana hialina compatible con daño alveolar difuso ([Martines et al., 2020](#) ; [Buja et al., 2020](#)). Además, la evidencia sugiere un amplio tropismo por el SARS-CoV-2 en los riñones, el corazón, el intestino grueso, el bazo y el hígado ([Bradley et al., 2004](#)). Sin embargo, a pesar del interés generalizado en la fisiopatología de la enfermedad, aún se desconoce mucho sobre cómo afecta el SARS-CoV-2 al SNC. Se han informado signos neurológicos, como dolor de cabeza, náuseas, vómitos y alteración de la conciencia ([Carod-Artal, 2020](#) ; [Pranata et al., 2020](#)) con COVID-19, lo que aumenta la plausibilidad de que el SARS-CoV-2 pueda neuroinvasión el sistema nervioso central. (SNC). De hecho, se ha observado encefalitis en especies como el felino ([Rissi, 2018](#)), el porcino ([Mora-Diaz et al., 2019](#)) y el murino ([Roth-Cross et al., 2008](#)) como consecuencia del neurotropismo del coronavirus ([Natoli et al., 2020](#)). Además, se sabe que el SARS-CoV-1, el coronavirus más estrechamente relacionado con el SARS-CoV-2, infecta el tronco encefálico de humanos y animales ([Netland et al., 2008](#)). Recientemente, se informó por primera vez un caso de meningitis/encefalitis en un paciente con COVID-19 ²⁴ que respalda la posibilidad de una neuroinvasión.

Un mecanismo de acción patológico clave para el SARS-CoV-2 parece involucrar la vasculatura. Uno de los principales objetivos celulares para que el virus se una es la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) ([Ou et al., 2020](#)); una carboxipeptidasa de la superficie celular que forma parte del sistema renina-angiotensina (RAS) que es responsable de una miríada de funciones en el sistema cardiovascular. En concreto, ACE2 cataliza la degradación de la angiotensina II a fragmento de angiotensina (1-7) (Ang-(1-7)), lo que se asocia con la vasodilatación y la consiguiente disminución de la hipertensión ([Mali et al., 2020](#) ; [Santos, 2014](#)). . Es de destacar que los estudios en pacientes con COVID-19 indican la presencia de niveles séricos elevados de angiotensina II ²⁸ . ACE2 se expresa en toda la vasculatura ([Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of V., 2020](#)) del cuerpo que permite el acceso del SARS-CoV-2 a múltiples sistemas de órganos, como evidencia de detección de partículas similares a virus en los pulmones ([Ackermann et al., 2020](#)) y el endotelio renal ([Varga et al., 2020](#)) de pacientes con COVID-19. Con respecto al SNC, ACE2 también se expresa en la vasculatura cerebral humana ([Kehoe et al., 2016](#) ; [Bryce et al., 2005](#)), lo cual también confirmamos aquí. Sin

embargo, la forma en que el virus y su participación en ACE2 alteran potencialmente la barrera hematoencefálica (BBB) y contribuyen a la posible aparición de complicaciones neurológicas sigue siendo una pregunta abierta.

El presente estudio tuvo como objetivo identificar si la proteína espiga del virus SARS-CoV-2 afecta negativamente la función de la BBB. Con este fin, examinamos los efectos de las siguientes subunidades de la proteína de punta del SARS-CoV-2 en el estado de la BBB: la subunidad de unión al receptor S1 y la subunidad de fusión S2, así como el dominio de unión al receptor (RBD) de la subunidad S1. Como se informó anteriormente, confirmamos que el principal objetivo de unión celular de la subunidad S1, ACE2, está presente en la vasculatura cerebral humana. Es importante destacar que también mostramos por primera vez que la ACE2 vascular aparece regulada al alza en el tejido cerebral derivado de casos de demencia e hipertensión. Para probar los resultados funcionales, se usaron dos modelos *in vitro* (uno 2D y otro similar a un vaso 3D) de la BHE utilizando células endoteliales cerebrales primarias. En ambos modelos, se determinaron los efectos de las subunidades de pico de SARS-CoV-2 en la integridad de la barrera. Nuestros resultados proporcionan evidencia de la permeabilidad de la barrera endotelial y las respuestas proinflamatorias tras la exposición a estas subunidades. Además, nuestro análisis apunta a una ruptura de barrera que puede ser independiente de ACE2, ya que también ocurrieron efectos nocivos con la subunidad S2. Según el conocimiento de los autores, esta es la primera evaluación de los efectos de la proteína espiga del SARS-CoV-2 en la BBB.

[Ir:](#)

2. Materiales y métodos

2.1. reactivos

Subunidad S1 del SARS-CoV-2 (RayBiotech, n.º de catálogo 230-01101), RBD del SARS-CoV-2 (RayBiotech, n.º de catálogo 230-01102) y subunidad S2 del SARS-CoV-2 (RayBiotech, n.º de catálogo 230-01103) derivado de *E.coli* y SARS-CoV-2 S1 (RayBiotech, Cat No 230-30161-10), SARS-CoV-2 S2 derivado de células HEK293 se utilizó en experimentos donde se indicó. Utilizamos concentraciones de subunidades de proteína de pico de SARS-CoV-2 que oscilan entre 0,1 nM y 50 nM según un estudio anterior que probó los efectos de la proteína SARS-CoV-2 en la estimulación de las células inmunitarias humanas ([Dosch et al., 2009](#)). Otras proteínas recombinantes (es decir, TNF α) se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN, EE. UU.). Tenga en cuenta que las proteínas recombinantes diluidas a las concentraciones utilizadas para estos estudios se analizaron para determinar la presencia de endotoxina de *E.coli* mediante el ensayo de endotoxina LAL cromogénica ToxinSensor (GenScript), que encontró niveles de endotoxina de *E.coli* en cantidades insignificantes.

2.2. Cultivo de células endoteliales

Las células endoteliales microvasculares primarias del cerebro humano (hBMVEC) se aislaron del tejido cerebral fetal como se describe ([Andrews et al., 2018](#)). El tejido sano fue proporcionado (bajo consentimiento informado) por el Laboratorio de Biología del Desarrollo (Universidad de Washington, Seattle, WA) con la aprobación otorgada por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Temple (Filadelfia, PA) y en pleno cumplimiento de los Institutos Nacionales de Salud (NIH).) guías éticas. Las células se cultivaron en matraces recubiertos con colágeno I de cola de rata (BD Biosciences) en medio de crecimiento completo (medio EBM-2 complementado con EGM-2MV SingleQuots

(Lonza, Cat No CC-3156 y CC-4147)) en una incubadora configurada a 37 ° C, 5% CO₂ y 100% humedad. Los experimentos se realizaron en el medio basal (EBM2 suplementado con FBS al 10%).

Para ciertos estudios (como se indica en las figuras), se utilizó la línea celular hCMEC/D3 (un regalo del Dr. Pierre O Couraud, Institut Cochin, université Paris Descartes, París, Francia) que se usa a menudo para modelar la BBB. La línea celular es una línea celular endotelial de cerebro humano inmortalizada con telomerasa para la que se han caracterizado previamente sus propiedades de formación de barrera y las condiciones de cultivo celular ([Weksler et al., 2005](#)).

2.3. BBB modelo 3d

Los modelos tridimensionales de la barrera hematoencefálica (3D BBB) se fabricaron polimerizando hidrogeles compuestos por 5 mg/ml de colágeno tipo I, 1 mg/ml de hialuronano y 1 mg/ml de Matrigel dentro de dispositivos microfabricados. El método completo para este enfoque se describe en un estudio anterior ([Partyka et al., 2017](#)). Brevemente, se inyectaron hidrogeles en el depósito del dispositivo y se insertaron agujas de 180 µm recubiertas con BSA al 0,1 % antes de la polimerización para crear dos huecos cilíndricos y paralelos dentro del gel. Se inyectaron hCMEC/D3 en un canal a una densidad de 10 millones por ml (15 µl por canal). Los canales se incubaron durante 10 minutos para garantizar la unión de las células, luego se inyectaron con células nuevamente y se invirtieron durante 10 minutos para cubrir el lado opuesto y garantizar una cobertura total. Después de la siembra de células, los canales se expusieron a 0,7 dyn/cm² de esfuerzo cortante constante durante cuatro días utilizando una bomba de jeringa lineal (Kent Scientific) para establecer la función de barrera. Después de la perfusión de cuatro días, los vasos se perfundieron durante dos horas con 50 nM de la subunidad S1 del SARS-CoV-2. Después de la exposición a la proteína viral, los vasos se colocaron en fijador o se prepararon para la prueba de permeabilidad. Para cuantificar la localización de ZO-1 en la unión célula-célula en estos vasos, las intensidades de fluorescencia a lo largo de secciones representativas de 100 µm de las condiciones tratadas con proteína de control y de espiga se trazaron como se describe en un estudio anterior ([DeOre et al., 2019](#)). Se calculó la varianza de estos dos gráficos de intensidad y se calculó la diferencia porcentual para cuantificar la reducción en la localización de ZO-1 en las uniones célula-célula.

2.4. Ensayo de detección de impedancia de sustrato de célula eléctrica

Los cambios en tiempo real de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) se midieron utilizando la estación ECIS ZTheta 96 Well Array (biofísica aplicada). ECIS se registró usando la opción de frecuencia/tiempo múltiple (MFT) para monitorear continuamente los cambios en la impedancia sobre el espectro de frecuencias (400 Hz a 48,000 Hz). Las matrices de PET 96W20idf se incubaron con una solución de cisteína 10 mM para estabilizar los electrodos de oro y luego se cubrieron con colágeno tipo 1 de cola de rata. Las células se sembraron en placa a una densidad de 10 000 células por cada pocillo y se dejó un pocillo sin células para fines de modelado. Las células se cultivaron hasta que se formó una monocapa confluyente y una barrera funcional como se indica por una resistencia estable >600 ohmios a 4000 Hz y una capacitancia <20 nF a una frecuencia de 48.000 Hz. Para la fase de crecimiento (5 a 7 días) las células se mantuvieron en medio de crecimiento completo con un cambio del 50% del medio cada dos días. Después de la confluencia, el medio se cambió al medio basal y la subunidad S1 del SARS-CoV-2, la subunidad S2 del SARS-CoV-2 o el RBD del SARS-CoV-2 en concentraciones de 0,1 nM, 1

nM o 10 nM se agregaron a pocillos cuadruplicados y la grabación continuó durante 48 h. El componente de resistencia de barrera intercelular se extrajo utilizando la función de modelado Rb (resistencia de barrera) del software ECIS (biofísica aplicada).

2.5. Ensayos de permeabilidad (2D)

Para evaluar la permeabilidad paracelular en condiciones estáticas, se sembraron células a una densidad de 10.000 células por inserto Transwel recubierto con colágeno I (tamaño de poro 0,4 μm , diámetro 0,33 cm^2 , Corning) en 200 μL de medio de crecimiento completo. Las cámaras basolaterales se llenaron con 500 μL de medio de crecimiento completo. El medio se cambió cada 3 días. Después de que se formó una monocapa confluyente, el medio se cambió al medio basal y las monocapas de hBMVEC se incubaron con 10 ng/mL de TNF- α , o 10 nM de subunidad S1 de SARS-CoV-2, subunidad S2 de SARS-CoV-2 o SARS-CoV-2 RBD por 24 h. Se añadió dextrano conjugado con FITC-DEAE de 3 kDa (Sigma) a la cámara apical hasta la concentración final de 1 mg/mL y 1 h más tarde, se determinó la fluorescencia en las cámaras basolaterales usando un SpectraMax M5e (Molecular Devices). El porcentaje de permeabilidad se calculó como la fluorescencia relativa del medio en las células tratadas con proteína espiga frente a las no tratadas.

2.6. Ensayo de permeabilidad (3D)

Para las mediciones de permeabilidad, los recipientes 3D se transfirieron a la platina de un microscopio de epifluorescencia invertido encerrado en una cámara ambiental ajustada a 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % de CO_2 y 95 % de humedad. Los canales se perfundieron con dextrano-FITC de 4 kDa a un caudal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ utilizando una bomba de jeringa durante 10 min, mientras se sumergían en medio de cultivo para garantizar la viabilidad celular. Esta tasa de flujo fue seleccionada para asegurar un flujo completamente desarrollado en todo el canal y para mantener la coherencia con el trabajo anterior. Se tomaron imágenes a intervalos de 30 s durante 10 min y los coeficientes de difusión se establecieron utilizando la siguiente ecuación de trabajos anteriores ([Adamson et al., 1994](#)).

$PAGS=yodtr2yo0$

donde P es el coeficiente de permeabilidad, dI/dt es la tasa de cambio en la intensidad de fluorescencia fuera del vaso 3D, r es el radio del vaso e I_0 es la intensidad de fluorescencia dentro del vaso 3D.

2.7. Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD (Life Technologies, Cat No L3224) se usó para evaluar la toxicidad de la proteína de punta SARS-CoV-2 para hBMVEC. Brevemente, se sembraron hBMVEC en una placa estéril de 96 pocillos a razón de 1×10^4 células por pocillo y se cultivaron hasta la confluencia. Las células confluentes se trataron con la subunidad S1 del SARS-CoV, la subunidad S2 del SARS-CoV-2 o el RBD del SARS-CoV-2 10 nM durante 48 h. Se agregaron 200 μL de calceína-AM 1 μM y homodímero-1 de etidio 5 μM a cada pocillo y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Los datos se adquirieron a longitudes de onda de excitación y emisión de 495/515 nm para células vivas y 528/617 nm para células muertas y se normalizaron al número total de células.

2.8. Citometría de flujo

Las células sembradas en placas de 12 pocillos se cultivaron hasta la confluencia y se trataron con 10 nM de subunidad S1 del SARS-CoV-2, subunidad S2 del SARS-CoV-2, RBD del SARS-CoV-2 o 100 ng/mL de TNF- α para 4h o 24h. Después del tratamiento, las células

se lavaron con solución salina tamponada con fosfato sin calcio ni magnesio (PBS) y se separaron con accutasa durante 1 a 2 min a 37 °C. A continuación, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 min y se volvieron a suspender en el tampón de fijación (eBioscience/Thermo Fisher) durante 30 min. Después de la fijación, las células se lavaron con tampón de citometría de flujo (FBS al 5 %, azida sódica al 0,1 %) y se sedimentaron de nuevo. Las células se resuspendieron durante 30 min en 100 µL de tampón de citometría de flujo, que contenía 5 µL de anti-ICAM-1 (pe-Cy7-conjugado, BioLegend, Cat No 356116) y 5 µL de anti-VCAM-1 (APC-conjugado, BioLegend, Cat No 305810) anticuerpos. Luego se lavaron las células, precipitados y resuspendidos en tampón de citometría de flujo para análisis FACS. Se adquirieron 10.000 eventos por muestra con un citómetro de flujo FACS BD Canto II (BD Biosciences) y luego se analizaron los datos con el software FlowJo.

2.9. PCR cuantitativa en tiempo real

Las monocapas de células confluentes se trataron con la subunidad S1 del SARS-CoV-2 10 nM, la subunidad S2 del SARS-CoV-2 o el RBD del SARS-CoV-2 durante 24 h y se enjuagaron brevemente con PBS. Para examinar la concentración de ARNm, se extrajo el ARN total utilizando los reactivos de extracción de ARN TRIzol y PureLink (Invitrogen). El cDNA se sintetizó con 400 ng de RNA en 20 µL de mezcla de reacción usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Applied Biosystems). qRT-PCR se realizó con TaqMan Universal 2× Master Mix (Thermo Scientific) y *TIMP-1* humano (Hs01092512), *MMP2* (Hs01548727), *MMP3* (Hs00968305), *MMP9* (Hs00957562), *MMP12* (Hs00159178), *IL1β* (Hs01555410), *IL6* (Hs00174131), *CXCL10* (Hs00171042), *CCL5* (Hs00982282) sondas marcadas con FAM. *ARNr 18S* (Nº de catálogo 4352930). Se utilizó como control interno. Los niveles de expresión génica se analizaron utilizando el algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.10. Electroforesis de proteínas e inmunotransferencia

Las monocapas de células confluentes se trataron con la subunidad S1 del SARS-CoV-2 10 nM, la subunidad S2 del SARS-CoV-2 o el RBD del SARS-CoV-2 durante 24 h y se enjuagaron brevemente con PBS. El lisado de células enteras se preparó con tampón RIPA (EMD Milipore, Cat No 20-188) según el protocolo del fabricante. Las fracciones obtenidas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10 % en tampón MOPS en condiciones desnaturizantes y se transfirieron a una membrana de PVDF de 0,45 µm. Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo Odyssey en solución salina tamponada con fosfato (Li-Cor Biosciences, Cat No 927-40000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las transferencias de proteínas bloqueadas se incubaron con anti-ACE2 de conejo purificado por afinidad (1:1000, Abcam, Cat No 15348) y anti-β-actina de ratón (1:5000, Sigma, Cat No A5441), en PBS suplementado con 0.05% Tween-20 y tampón de bloqueo Odyssey al 10 % a 4 °C durante la noche, seguido de incubación con anticuerpo secundario IRDye 800CW de cabra anti-conejo y anticuerpo secundario IRDye 680RD de cabra anti-ratón en PBS (1:20.000) a temperatura ambiente durante 1 hora. Las transferencias de proteínas se visualizaron con Odyssey LiCor Imaging System. Las intensidades de las bandas se cuantificaron utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda). Los datos se presentan como intensidad relativa de las bandas ACE2 en muestras tratadas con S1, S2 o RBD en comparación con las muestras no tratadas y normalizadas a β-actina.

2.11. Inmunohistoquímica e imagen

Bloques de tejido cortical humano incluidos en parafina y fijados en formalina de origen normal ($N = 3$) y enfermo (demencia, $N = 4$ casos e hipertensión $N = 4$ casos) se obtuvieron de ProteoGenex, Inc. (Inglewood, CA) y se seccionaron en serie con un grosor de $5 \mu\text{m}$ cada uno. La edad de los donantes osciló entre 34 y 89 años de ambos sexos. La información del donante, incluidas las comorbilidades y la causa de la muerte, se enumeran en la tabla complementaria 1. Para los casos de demencia, el donante 1–3 se clasificó como enfermedad de Alzheimer y el donante 4 era demencia de tipo mixto. Las secciones montadas en portaobjetos de vidrio se aclararon, rehidrataron y colocaron mediante recuperación de epítomos inducida por calor (HIER) utilizando tampón Tris-EDTA (pH 9,0) en preparación para la tinción inmunohistoquímica. Las secciones pretratadas con HIER se bloquearon para la actividad de fosfatasa alcalina endógena y la unión de anticuerpos no específicos usando Bloxall (Vector Laboratories, SP-6000) y suero de caballo normal al 2,5 % (Vector Laboratories, S-2012), respectivamente. Posteriormente, las secciones se incubaron en anticuerpo ACE2 antihumano de conejo (1:500, Abcam, ab15348) durante 1 h a temperatura ambiente. La unión positiva de anticuerpos se detectó utilizando el reactivo de polímero IgG ImmPRESS-AP anti-conejo (Vector Laboratories, MP-5401) y se visualizó mediante una incubación de 10 minutos en sustrato Vector Blue AP (Vector Laboratories, SK-5300). Las secciones teñidas se deshidrataron, aclararon y montaron permanentemente con VectaMount (Vector Laboratories, H-5000) para obtener imágenes de campo claro posteriores.

Para la obtención de imágenes, todas las secciones se escanearon con un escáner de portaobjetos EasyScan (Motic Instruments Inc.). Las imágenes se examinaron en regiones de interés (ROI) de $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ para determinar la expresión de ACE2 en los vasos sanguíneos (según la apariencia morfológica). El análisis de imágenes se realizó con el software de imágenes NIS Elements AR (Nikon) utilizando las herramientas de medición y perfil de intensidad de línea. Se examinaron 50 vasos de tamaño capilar (menos de $10 \mu\text{m}$ de diámetro/calibre) para cada ROI (3 por caso) como se indicó anteriormente y se calcularon el promedio y SEM.

2.12. análisis estadístico

Los experimentos se realizaron de forma independiente varias veces (al menos tres veces para todos los datos mostrados) para permitir análisis estadísticos. Dentro de cada conjunto experimental individual, se usaron células primarias de al menos 3 donantes, y cada condición/por donante se evaluó en al menos tres repeticiones. Se usó ANOVA unidireccional con la prueba post-hoc de Tukey para analizar la diferencia entre tres o más grupos con distribución normal (gaussiana). Se utilizó ANOVA unidireccional con la prueba post-hoc de Dunnett cuando se realizaron comparaciones de grupos múltiples contra un control de referencia. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar conjuntos de datos distribuidos no paramétricos ([Figura 1D](#) y [F](#)). Los resultados se expresan como la media \pm SEM con diferencias consideradas significativas en $p < 0,05$. Los datos recopilados se analizaron utilizando Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

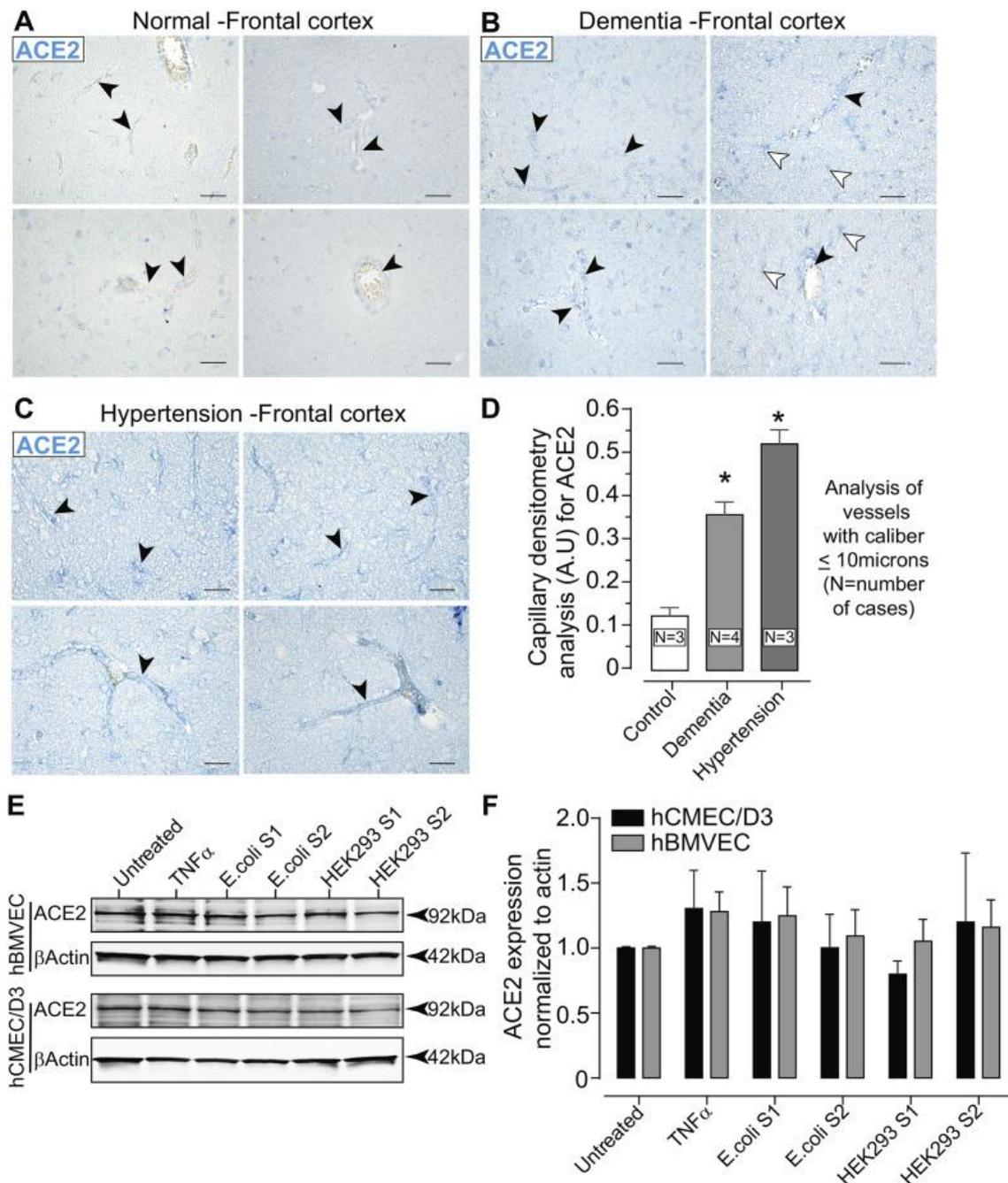


Figura 1

ACE2 se expresa en la vasculatura cerebral y en las células endoteliales microvasculares primarias del cerebro humano (hBMVEC). El tejido cerebral incluido en parafina se seccionó a 5 μ m y se inmunotizó para ACE2. Imágenes representativas de la corteza frontal de casos sin neuropatología anormal (control) (A), demencia (B) e hipertensión (C). Las imágenes se escanearon con un aumento objetivo de 40x con la expresión de ACE2 mostrada en azul (Vector azul). Las puntas de flecha negras indican la presentación vascular de la expresión de ACE2 en vasos de varios calibres. Las puntas de flecha blancas apuntan a la expresión de ACE2 en las células parenquimatosas. Barras de escala = 25 μ m. (D) Gráfico de barras de la cuantificación de la expresión de ACE2 en vasos de tamaño capilar (menos de 10 μ m de diámetro/calibre). (E) Western blots de lisados celulares hBMVEC y hCMEC/D3 sondeados con anticuerpos ACE2 después de que las células se

expusieran a 10 nM de la subunidad S1 o la subunidad S2 del SARS-CoV-2 expresada en E.coli o en células HEK293. (F) Gráfico de barras de la densitometría de la inmunotransferencia ACE2 normalizada a β -actina. El experimento con hBMVEC se realizó con tres donantes diferentes y se repitió tres veces. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. (Para la interpretación de las referencias al color en la leyenda de esta figura, se remite al lector a la versión web de este artículo). No se observaron diferencias significativas entre los grupos. (Para la interpretación de las referencias al color en la leyenda de esta figura, se remite al lector a la versión web de este artículo). No se observaron diferencias significativas entre los grupos. (Para la interpretación de las referencias al color en la leyenda de esta figura, se remite al lector a la versión web de este artículo).

[Ir:](#)

3. Resultados

3.1. Expresión de ACE2 en vasculatura cerebral humana y en células endoteliales primarias de cerebro humano (hBMVEC) *in vitro*

Los informes anteriores sobre la estructura y las interacciones bioquímicas de la proteína de punta del SARS-CoV-2 con los objetivos de la proteína celular han revelado que la unión a la proteína membranosa ACE2 es un paso crítico para que el SARS-CoV-2 ingrese a las células objetivo. Aunque se ha informado que la enzima ACE-2 se expresa en la vasculatura cerebral ([Kehoe et al., 2016](#) ; [Hamming et al., 2004](#)), se dispone de poca información sobre si se observa ACE2 en vasos de tamaño capilar y si los niveles de ACE2 se ven afectados en función de la neuropatología existente. Por lo tanto, la inmunotinción para ACE2 se realizó en tejidos cerebrales post mortem de casos normales que carecían de cualquier neuropatología detectable y de casos de pacientes que tenían un diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa (demencia) o antecedentes de hipertensión (consulte la Tabla 1 en la información complementaria para obtener detalles sobre la demografía). e historia clínica de los casos evaluados). Se eligieron la demencia y la hipertensión ya que se sabe que tales condiciones subyacentes aumentan la gravedad de la enfermedad por COVID-19. Como se muestra en [Figura 1](#), la expresión de ACE2 se detecta claramente en las regiones frontocorticales del cerebro. ACE2 aparece en pequeños vasos que forman redes capilares ([Figura 1A](#), arriba a la izquierda) y también se observan vasos de mayor calibre ([Figura 1A](#), arriba a la izquierda, abajo a la izquierda y abajo a la derecha). Los vasos transversales muestran tinción en toda la pared del vaso y dentro de las capas mediales. Las secciones de tejido de casos de demencia tenían un mayor grado de expresión de ACE2 que también se encontró en todo el parénquima cerebral en astrocitos de apariencia morfológica y en todo tipo de calibres de vasos. [Figura 1B](#)). En casos de hipertensión ([Figura 1C](#)), ACE2 parecía tener la expresión más alta pero sin células parenquimatosas inmunorreactivas de ACE2. El análisis de imágenes se realizó en vasos capilares que medían menos de 10 μ m de diámetro, ya que este es el sitio principal para el intercambio de BBB. La densitometría de imágenes basada en los perfiles de línea de intensidad de píxeles a través de los vasos capilares reveló que, en comparación con el control, los casos de demencia tenían un aumento promedio de $3,5 \pm 0,29$ (media \pm SEM) veces en la expresión de ACE2 y los casos de hipertensión indicaron un aumento de $5,1 \pm 0,32$ (media). \pm SEM) veces en la expresión de ACE2. Los resultados demuestran que el objetivo principal de la proteína espiga del SARS-CoV-2 se expresa en la vasculatura cerebral y también parece estar regulado al alza en las condiciones de salud subyacentes que se sabe que empeoran los resultados de la COVID-19.

Antes de examinar si la proteína SARS-CoV-2 afecta las propiedades de la BBB, se determinó el estado de expresión de ACE2. Actualmente no hay información disponible sobre si ACE2 se expresa en hBMVEC cultivadas o en la línea celular hCMEC/D3 y si la exposición a las proteínas del pico del SARS-CoV-2 altera el perfil de expresión de ACE2 en estas células. Las monocapas confluentes de hBMVEC y hCMEC/D3 se trataron con la subunidad S1 o la subunidad S2 del SARS-CoV-2 10 nM durante 24 h y los lisados de células enteras se sometieron a inmunotransferencia y sonda contra ACE2. Para tener en cuenta cualquier efecto debido a la glicosilación, se usaron ambas formas de proteínas de pico de SARS-CoV-2 expresadas en E.coli (no glicosilada) y en la línea celular de mamífero HEK293 (glicosilada). Como se ve en el [Figura 1E](#), ACE2 se expresa en lisados de células completas de ambos cultivos de células endoteliales probados. Además, la expresión de la proteína ACE2 no se vio significativamente afectada cuando las células se expusieron a las formas de subunidades glicosiladas (HEK293) o no glicosiladas (E.coli). Para hBMVEC, análisis de densitometría ([Figura 1F](#)) de ACE2 normalizado a bandas de β -actina no mostró ninguna diferencia entre el grupo de control no tratado (media \pm SEM) $0,98 \pm 0,07$ y cualquiera de los grupos de tratamiento (TNF α $1,28 \pm 0,26$; subunidad S1 expresada en E.coli $1,25 \pm 0,22$, subunidad S2 expresada por E.coli $1,09 \pm 0,35$, subunidad S1 expresada por HEK293 $1,19 \pm 0,37$, subunidad S2 expresada por HEK293 $1,20 \pm 0,31$). De manera similar, para hCMEC/D3, no se observaron diferencias significativas observables entre la expresión de la proteína ACE2 en el grupo de control no tratado ($0,93 \pm 0,05$) o en cualquiera de los grupos de tratamiento (TNF α $1,30 \pm 0,51$; subunidad S1 expresada en E.coli $1,20 \pm 0,68$, subunidad S2 expresada por E.coli $1,00 \pm 0,44$, subunidad S1 expresada por HEK293 $0,79 \pm 0,17$, subunidad S2 expresada por HEK293 $1,20 \pm 0,92$). Los resultados se expresan como media \pm SEM.

Por lo tanto, nuestros resultados confirman hallazgos previos de expresión de ACE2 en el cerebro ([Hamming et al., 2004](#)) y demuestran además que los vasos de todos los calibres expresan la proteína. Además, los niveles de ACE2 aumentaron en la vasculatura cerebral como resultado de la neurodegeneración o la hipertensión, que son dos afecciones subyacentes que se sabe que empeoran los resultados de la COVID-19. La expresión de ACE2 también se evaluó en células (es decir, cultivos de células hBMVEC primarias y hMEC/D3) que se utilizan normalmente para modelar la BBB in vitro. No se observaron cambios en la expresión de ACE2 en función de la subunidad de la proteína de punta en los cultivos celulares probados.

3.2. La proteína espiga del SARS-CoV-2 no afecta la viabilidad de las células endoteliales del cerebro

Es posible que los efectos neurológicos observados del SARS-CoV-2 puedan explicarse por la citotoxicidad inducida por la proteína espiga. Hasta la fecha, no hay información publicada disponible sobre si la proteína de punta del SARS-CoV-2 afecta la viabilidad de las células endoteliales del cerebro humano. Por lo tanto, para evaluar la viabilidad celular, las hBMVEC se expusieron a dos concentraciones diferentes (1 nM y 10 nM) de la subunidad S1, la subunidad S2 o RBD del SARS-CoV-2 durante 48 h o 72 h y se analizaron utilizando la citotoxicidad viva/muerta. ensayo. El ensayo utiliza la combinación de acetometoxi-derivado de calceína permeable a células vivas (calceína-AM) y homodímero-1 de etidio impermeable a células vivas (EthD-1). El detergente suave, saponina al 0,1%, se usó como control positivo para inducir la muerte celular. Los datos se representan como porcentaje de células que eran fluorescentes a 515 nm (calceína, células vivas) o 617 nm (EthD-1, células muertas). los resultados en [Figura 2](#) no muestran evidencia de citotoxicidad a las 48 h con las concentraciones ensayadas. Los valores para las células

vivas fueron los siguientes (media \pm SEM): sin tratar 99,85 % \pm 0,30 %, saponina 39,35 % \pm 1,18 % ($p < 0,05$), subunidad S1 del SARS-CoV-2 a 1 nM 99,78 % \pm 0,77 % (ns) ya 10 nM 99,70% \pm 0,49% (ns); SARS-CoV-2 RBD a 1 nM 99,49 % \pm 0,43 % (ns) y a 10 nM 99,16 % \pm 0,27 % (ns); Subunidad S2 del SARS-CoV-2 a 1 nM 98,65 % \pm 0,36 % (ns) y a 10 nM 98,30 % \pm 0,66 % (ns). Los valores de células muertas fueron los siguientes: media \pm SEM): sin tratar 0,15 % \pm 0,30 % (ns), saponina 60,65 % \pm 1,18 % ($p < 0,05$), subunidad S1 del SARS-CoV-2 a 1 nM S1 0,22 % \pm 0,77 % (ns) ya 10 nM 0,30% \pm 0,49% (ns); SARS-CoV-2 RBD a 1 nM 0,51 % \pm 0,43 % (ns) y a 10 nM 0,84 % \pm 0,27 % (ns); Subunidad S2 del SARS-CoV-2 a 1 nM 1,35 % \pm 0,36 % (ns) y a 10 nM 1,70 % \pm 0,66 % (ns).

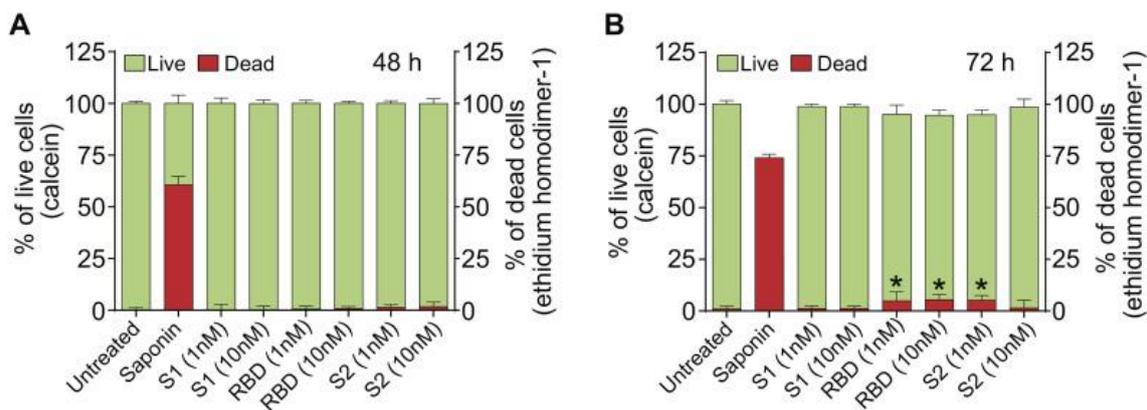


Figura 2

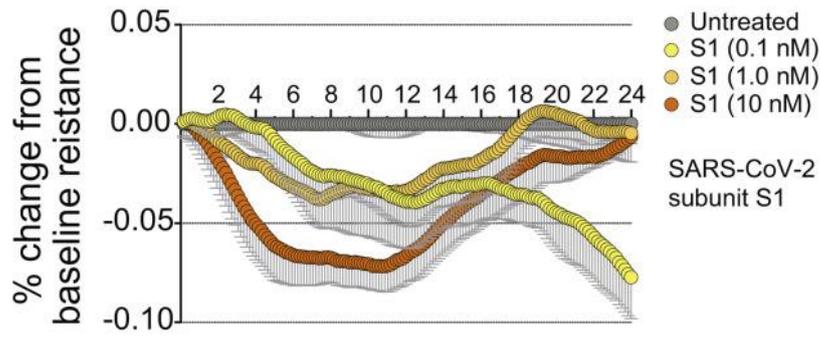
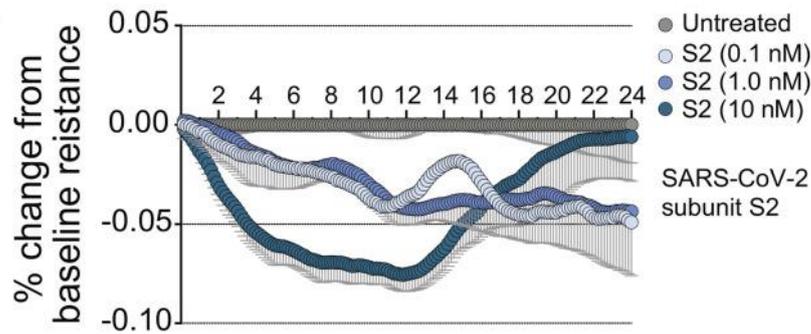
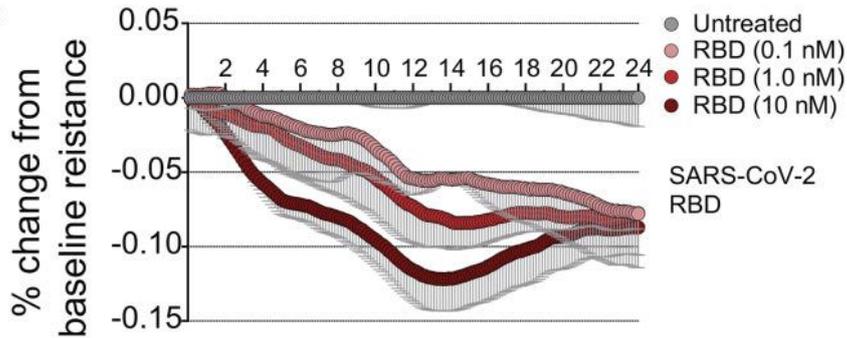
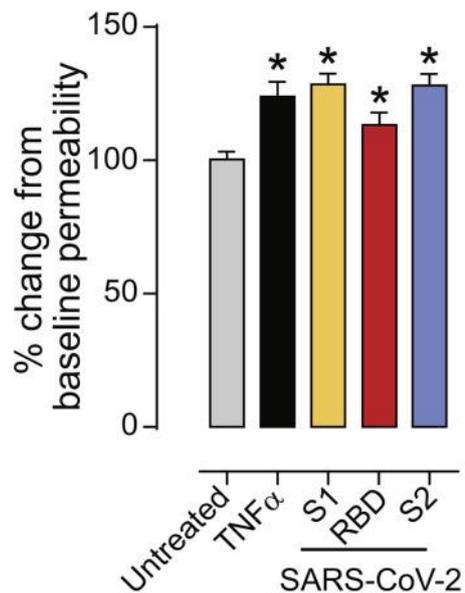
La proteína espiga del SARS-CoV-2 no afecta la viabilidad de las células endoteliales del cerebro. Las hBMVEC se trataron con 1 nM y 10 nM de la subunidad S1 del SARS-CoV-2, RBD del SARS-CoV-2 y la subunidad S2 del SARS-CoV-2 durante 48 h (A) y 72 h (B). La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de citotoxicidad vivo/muerto. La calceína positiva (verde) indica células vivas, mientras que el homodímero-1 de etidio (EthD-1, rojo) indica células muertas. La saponina se utilizó como control positivo. Los datos representan la proporción de células vivas o muertas en el número total de células y se obtuvieron de dos donantes diferentes, cada uno realizado en 6 repeticiones. Los resultados se presentan como media \pm SEM, $n = 12$, * $p < 0,05$. *pag* Los valores se calcularon usando ANOVA unidireccional y prueba post-hoc de Tukey. (Para la interpretación de las referencias al color en la leyenda de esta figura, se remite al lector a la versión web de este artículo).

72 h de incubación con SARS-CoV-2 RBD y la subunidad S2 de SARS-CoV-2 dieron como resultado una tasa ligeramente mayor de muerte celular. Los valores para las células vivas fueron los siguientes: sin tratar 100,08 % \pm 0,47 %, saponina 26,00 % \pm 0,52 % ($p < 0,05$), subunidad S1 del SARS-CoV-2 a 1 nM 98,83 % \pm 0,35 % (ns) y a 10 nM 98,83 % \pm 0,35 % (ns); SARS-CoV-2 RBD a 1 nM 95% \pm 1,27% ($p < 0,05$) y a 10 nM 94,58% \pm 0,74% ($p < 0,05$); Subunidad S2 del SARS-CoV-2 a 1 nM 94,83 % \pm 0,69 % ($p < 0,05$) y a 10 nM 98,58 % \pm 1,11 % (ns). Los valores de células muertas fueron los siguientes: sin tratar 0,97 % \pm 0,38 %, saponina 74,00 % \pm 0,54 % ($p < 0,05$), subunidad S1 del SARS-CoV-2 a 1 nM 1,67 % \pm 0,35 % (ns) y a 10 nM 1,67 % \pm 0,35% (ns); SARS-CoV-2 RBD a 1 nM 4,83 % \pm 1,27 % ($p < 0,05$), ya 10 nM 5,42% \pm 0,74% ($p < 0,05$); Subunidad S2 del SARS-CoV-2 a 1 nM 5,17 % \pm 0,69 % ($p < 0,05$) y a 10 nM 1,42 % \pm 1,11 % (ns).

En general, estos hallazgos indican que la proteína espiga del SARS-CoV-2 no parece afectar la viabilidad de las células endoteliales del cerebro después de una exposición a corto plazo, lo que sugiere que es poco probable que los efectos patológicos en las propiedades de la barrera endotelial informadas en este trabajo se atribuyan a un efecto citotóxico desencadenado. .

3.3. La proteína del pico SARS-CoV-2 induce la pérdida de la integridad BBB

La principal característica que distingue al endotelio vascular cerebral del endotelio de la periferia es la abundante presencia de uniones estrechas formadas por células adyacentes. Las uniones estrechas forman la barrera física de la BBB, impidiendo el libre flujo paracelular de iones y moléculas pequeñas. Realizamos un estudio de impedancia de sustrato de célula eléctrica (ECIS) para determinar si se observan cambios en la función de barrera tras la exposición a la proteína de punta SARS-CoV-2. Esta medida de las propiedades eléctricas de la monocapa endotelial proporciona un método analítico para evaluar directamente los estímulos exógenos que pueden inducir la "estrechez" de la barrera (mayor resistencia) o "fugas" (menor resistencia). Las mediciones de ECIS se adquirieron como se describe en Materiales y Métodos. La resistencia de línea de base medida a 4000 Hz fue de 670, 590 y 780 ohmios para los 3 donantes, respectivamente. y todos los cambios de resistencia se calcularon como un % de cambio. Como se muestra en [Fig. 3A](#), la resistencia eléctrica de las monocapas tratadas con la subunidad S1 del SARS-CoV-2 alcanzó el nivel más bajo y se estabilizó a las 8-12 h después de la exposición inicial (media \pm SEM): (-7,18 % \pm 2,64 % ($p < 0,001$) para 10 nM, -3,79 % \pm 1,27 % ($p < 0,001$) para 1 nM) seguido de una recuperación completa en el caso de concentraciones de 1 nM y 10 nM y una disminución continua en el caso de una concentración de 0,1 nM (hasta -10,78 % \pm 3,52% ($p < 0,001$)). [Fig. 3B](#), la subunidad S2 del SARS-CoV-2 a 10 nM provocó que la resistencia cayera y se estabilizara antes (de 6 h a 14 h) con una disminución promedio de -7,56 % \pm 2,43 % ($p < 0,001$) seguida de una recuperación a las 24 h. Las concentraciones de 1 nM y 0,1 nM de la subunidad S2 del SARS-CoV-2 mostraron una disminución gradual constante a lo largo de todo el experimento y alcanzaron el máximo a las 24 h (-6,29 % \pm 1,62 % ($p < 0,001$) y -6,54 % \pm 1,75 % ($p < 0,001$)). En el caso del SARS-CoV-2 RBD ([Fig. 3C](#)), se produjo una caída de la barrera dependiente de la dosis que alcanzó el máximo a las 14 h después de la exposición (-12,19 % \pm 2,74 % ($p < 0,001$) para 10 nM, -8,42 % \pm 2,53 % ($p < 0,001$) para 1 nM y -5,4 % \pm 2,84 % ($p < 0,001$) para una concentración de 0,1 nM).

A**B****C****D**

[Fig. 3](#)

La proteína del pico SARS-CoV-2 compromete las propiedades de la barrera endotelial. (CA) La resistencia eléctrica de la barrera se modeló en función de las lecturas continuas de impedancia del sustrato celular registradas a 6 frecuencias (400 Hz - 48 kHz) cada 6 minutos durante el tiempo que se muestra. Las monocapas endoteliales se trataron con 0,1 nM, 1 nM o 10 nM de la subunidad S1 del SARS-CoV-2, RBD del SARS-CoV-2, subunidad S2 del SARS-CoV-2 o se dejaron sin tratar para que sirvieran como referencia. Los tratamientos se iniciaron en el punto de tiempo 0. El experimento se realizó por cuadruplicado y se repitió tres veces usando células primarias obtenidas de tres donantes diferentes. Cada punto de datos se representa como el porcentaje de cambio desde la línea de base (media \pm SEM), $n = 12$. D. Se determinó la permeabilidad de la barrera a un trazador molecular pequeño 1 h después del tratamiento usando DEAE-dextrano conjugado con FITC de 3 kDa. Las monocapas endoteliales se trataron con 100 ng/mL de TNF- α , 10 nM de la subunidad S1 del SARS-CoV-2, RBD del SARS-CoV-2, subunidad S2 del SARS-CoV-2 o se dejaron sin tratar para que sirvieran como base. El experimento se realizó por cuadruplicado y se repitió tres veces usando células primarias obtenidas de tres donantes diferentes. Cada punto de datos se representa como media \pm SEM, $n = 12$, los valores de p se calcularon mediante ANOVA unidireccional y prueba post-hoc de Tukey.

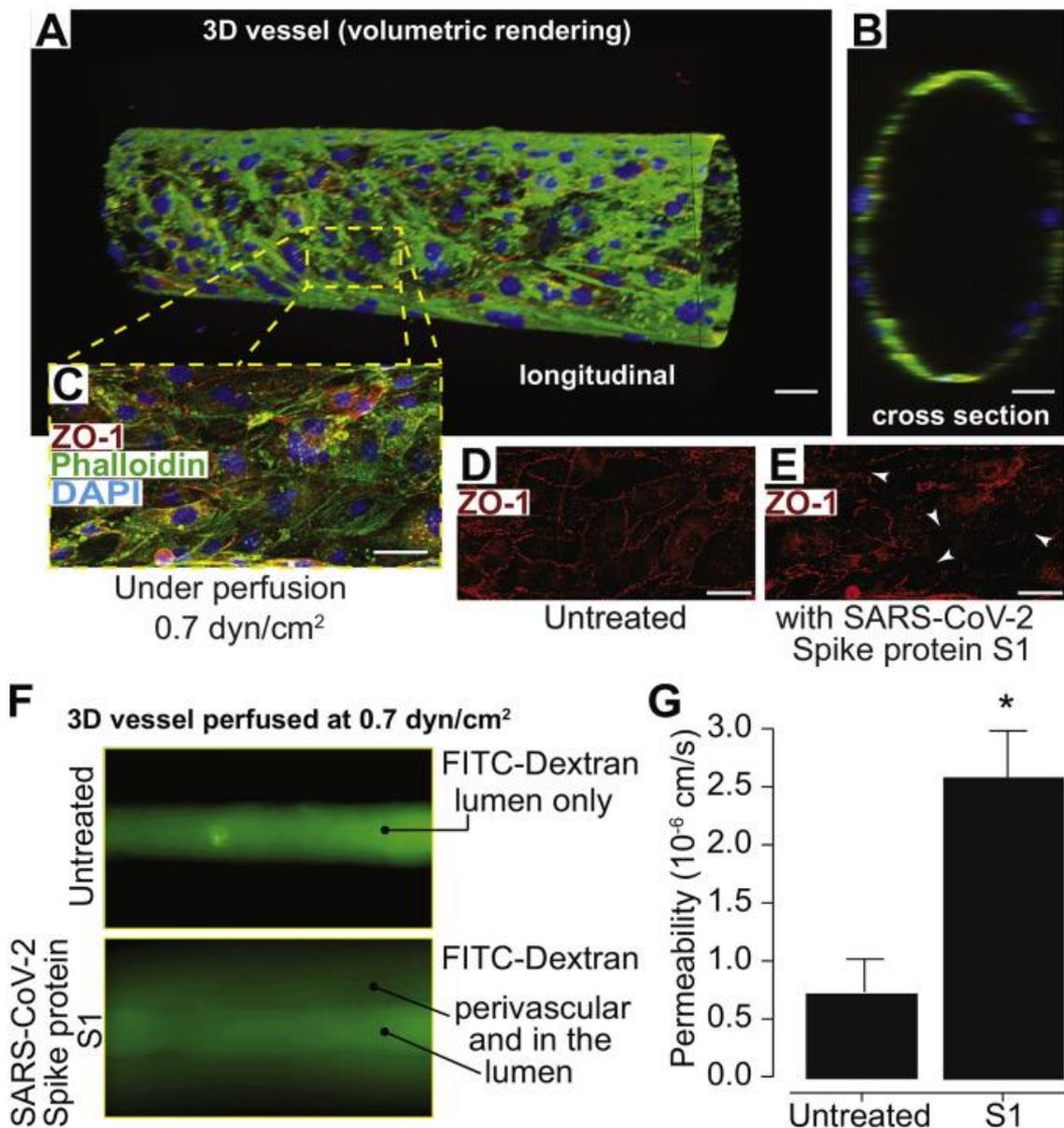
Para determinar cómo se relaciona la disminución observada en la resistencia eléctrica con el flujo de moléculas a través de las uniones estrechas, se realizaron ensayos de permeabilidad. Para centrarnos completamente en el paso paracelular a través de las uniones intercelulares, excluimos la transcitosis y las rutas de los canales transendoteliales mediante el uso de un trazador de peso molecular más pequeño con carga positiva (DEAE-dextrano conjugado con FITC de 3 kDa). Como se muestra en [Fig. 3D](#), a 1 h, 10 ng/ml de TNF α (control positivo) inducido (media \pm SEM) 123,90 % \pm 5,60 % ($p < 0,001$) permeabilidad, 10 nM de la subunidad S1 del SARS-CoV-2 inducida 128,5 % \pm 4,11 % ($p < 0,001$), 10 nM de la subunidad S2 del SARS-CoV-2 dieron como resultado un 128,1 % \pm 4,25 % ($p < 0,001$) y 10 nM de SARS-CoV-2 RBD no mostraron cambios en el 113,3 % \pm 4,57 % (ns). Además, los efectos sobre la permeabilidad no se vieron afectados por el estado glicosilado de las proteínas de punta (Figura 1 complementaria).

En conjunto, nuestros datos sugieren fuertemente que la proteína espiga del SARS-CoV-2 tiene la potencia para causar una disfunción crónica de bajo grado de la BBB que es una función del tiempo y la concentración. Sin embargo, la fuga observada de la BBB no puede atribuirse exclusivamente a la interacción del SARS-CoV-2 con su objetivo celular principal ACE2, ya que los efectos inducidos por el dominio de unión al receptor (RBD), la subunidad de unión al receptor S1 y la subunidad de fusión de membrana S2 son todos de magnitud y perfil temporal comparables. Por lo tanto, la explicación probable sería que el SARS-CoV-2 ejecuta su efecto nocivo en la vasculatura cerebral al comprometer varios objetivos celulares que probablemente incluyen cascadas proinflamatorias.

3.4. La subunidad S1 del SARS-CoV-2 desencadena una mayor permeabilidad de la BBB en un modelo de la BBB diseñado con tejidos en 3D

Para evaluar el efecto de la proteína de punta del SARS-CoV-2 en las células endoteliales del cerebro en un entorno *in vitro* que imita la tridimensionalidad de la vasculatura *in vivo*, se realizaron experimentos de barrera utilizando un modelo 3D BBB. El modelo 3D BBB se perfundió durante cuatro días con 0,7 dyn/cm² de esfuerzo cortante para asegurar la formación de uniones estrechas necesarias para la función de barrera ([Figura](#)

4AG). Después de esos cuatro días, los vasos se perfundieron durante dos horas con 50 nM de la subunidad S1 del SARS-CoV-2 o con medio de cultivo celular. Ambas condiciones estuvieron expuestas a la misma magnitud de esfuerzo cortante del fluido, $0,7 \text{ dyn/cm}^2$. La evaluación de la permeabilidad de la barrera con FITC-dextrano de 4 kDa indicó un aumento de casi tres veces en el coeficiente de permeabilidad después de la exposición a la subunidad S1 del SARS-CoV-2 (Figura 4F y G). Las imágenes de los vasos después de la perfusión de dextrano validaron las mediciones de permeabilidad; los vasos no tratados exhibieron un fuerte gradiente de fluorescencia en la pared del vaso, mientras que los vasos tratados mostraron una fuga sustancial (Figura 4F). Además, la inmunotinción para zonula-occludens-1 (ZO-1), una proteína de andamiaje en el complejo de unión estrecha, presentó una localización reducida de ZO-1 en las uniones célula-célula, lo que es indicativo de ruptura de la barrera (Figura 4DELAWARE). La localización de la unión célula-célula se cuantificó calculando la variación en la intensidad de fluorescencia de la tinción ZO-1 en una longitud de $100 \mu\text{m}$ del vaso, lo que produjo una reducción del 38 % en la condición tratada con proteína de pico en comparación con el control. En general, estos resultados respaldan los hallazgos de los estudios 2D al demostrar que la subunidad S1 del SARS-CoV-2 interviene en la ruptura de la barrera en una configuración 3D perfundible.



[Figura 4](#)

La subunidad S1 del SARS-CoV-2 altera el estado de la barrera en un modelo de microfluidos de ingeniería tisular 3D de la BBB humana. Se utilizaron microscopía confocal y representación volumétrica para visualizar el vaso diseñado por ingeniería tisular. (A) Muestra una vista longitudinal de un vacío endotelializado después de la perfusión que formó una geometría vascular predictiva análoga a la que se encuentra dentro del cerebro. (B) proporciona una perspectiva transversal que indica una sola capa de células endoteliales. En (C), una imagen fusionada representativa de las construcciones de vasos diseñadas fijadas e inmunoteñidas para la proteína de unión estrecha, ZO-1, junto con faloidina para marcar la actina y la tinción nuclear, DAPI. (D) muestra el patrón membranoso típico de ZO-1 esperado en células endoteliales cerebrales formadoras de barrera maduras. (E) después de la perfusión durante 2 h de la subunidad S1 del SARS-CoV-2 (10 nM), las construcciones también se fijaron e inmunomarcaron para ZO-1. Las flechas apuntan a áreas en las que el patrón celular ZO-1 es discontinuo, punteado o ausente, lo que significa áreas de ruptura de la barrera. Barra de escala = 20 μ m. (F) Intensidad de la fluorescencia después de diez minutos de perfusión con FITC-dextrano de

4 kDa, lo que indica la función de barrera deteriorada en los vasos perfundidos después de 2 h de la proteína de pico S1 frente a los controles no tratados. G) Mediciones cuantitativas de los coeficientes de permeabilidad de los vasos expuestos a la subunidad S1 del SARS-CoV-2 en comparación con los controles no tratados. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Willis, lo que indica la función de barrera deteriorada en los vasos perfundidos después de 2 h de la proteína de pico S1 frente a los controles no tratados. G) Mediciones cuantitativas de los coeficientes de permeabilidad de los vasos expuestos a la subunidad S1 del SARS-CoV-2 en comparación con los controles no tratados. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Willis, lo que indica la función de barrera deteriorada en los vasos perfundidos después de 2 h de la proteína de pico S1 frente a los controles no tratados. G) Mediciones cuantitativas de los coeficientes de permeabilidad de los vasos expuestos a la subunidad S1 del SARS-CoV-2 en comparación con los controles no tratados. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Willis, $n = 3$, * $p < 0,05$.

3.5. La proteína del pico SARS-CoV-2 induce la activación de las células endoteliales del cerebro

Los experimentos anteriores mostraron que la proteína del pico del SARS-CoV-2 afecta significativamente la integridad de la barrera. Es posible que la proteína del pico viral desencadene la activación y la respuesta proinflamatoria de las células endoteliales, lo que da como resultado una disfunción de la barrera. Para probar esta posibilidad, se realizaron experimentos de citometría de flujo para analizar la expresión de la superficie de la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y la expresión de la proteína de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) en función del tiempo (4 h, 24 horas). h). La subunidad S1 del SARS-CoV-2, la subunidad S2 del SARS-CoV-2 y el RBD del SARS-CoV-2 provocaron un aumento sólido en ICAM-1 (Figura 5AC, E) y VCAM-1 (Figura 5FH, J) a las 4 h y que se mantuvo elevada a las 24 h. TNF- α se utilizó como control para la activación endotelial (Figura 5D, E, I, J). La intensidad fluorescente media (MFI) inicial fue media \pm SEM 565,7 \pm 19,1 para ICAM-1 y 394,0 \pm 19,2 para VCAM-1. La subunidad S1 del SARS-CoV-2 elevó el MFI para ICAM-1 a 2279,0 \pm 60,7 (4 h) y 2644,7 \pm 93,1 a las 24 h y representó un aumento de 4 a 4,5 veces (Figura 5A,E). VCAM-1 se vio afectado de manera similar y aumentó a MFI 1281,3 \pm 28,5 (4 h) y 1572,7 \pm 43,3 (24 h) (Figura 5F, J). En la respuesta al SARS-CoV-2 RBD, también se incrementaron ICAM-1 y VCAM-1, aunque en menor grado. ICAM-1 MFI fue 1223,0 \pm 49,7 (4 h) y 1632,0 \pm 160,1 (24 h) (Figura 5B, E) mientras que VCAM-1 MFI aumentó a 718 \pm 28,1 (4 h) y 1101,3 \pm 88,5 (24 h) (Figura 5G, J). Finalmente, el tratamiento con la subunidad S2 del SARS-CoV-2 indujo una respuesta similar a la subunidad S1 con ICAM-1 MFI aumentó a 2203,6 \pm 61,3 a las 4 h y 2409 \pm 154,7 a las 24 h (Figura 5C,E); y VCAM-1 MFI aumentó a 1340,0 \pm 56,7 a las 4 h y 1487,3 \pm 74,6 a las 24 h (Figura 5H, J). Si bien el aumento en ICAM-1 y VCAM-1 MFI fue de una magnitud similar a las 4 h para las subunidades S1 y S2 del SARS-CoV-2 en comparación con TNF- α , la respuesta a las proteínas de pico se estancó y no aumentó más. por 24 h a diferencia de lo visto para TNF- α .

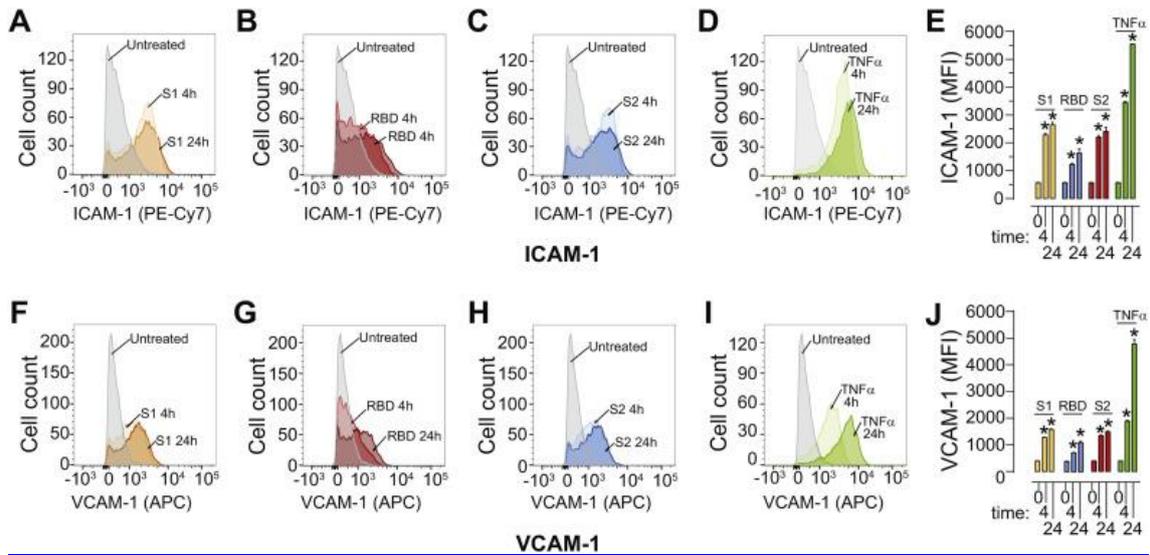


Figura 5

La proteína espiga del SARS-CoV-2 desencadena una expresión superficial mejorada de las moléculas de adhesión. Se trataron células endoteliales microvasculares de cerebro humano (hBMVEC) con 10 nM de subunidad S1 del SARS-CoV-2, RBD del SARS-CoV-2, subunidad S2 del SARS-CoV-2 o 100 ng/mL de TNF- α durante 4 h o 24 horas. Las células se tiñeron para la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACS Canto II. Se muestran histogramas representativos de la expresión de ICAM-1 en respuesta a la subunidad S1 del SARS-CoV-2 (A), RBD del SARS-CoV-2 (B), subunidad S2 del SARS-CoV-2 (C), TNF- α (D) y la cuantificación del gráfico de barras de la Intensidad Fluorescente Media (MFI) (E). Histograma representativo para la expresión de VCAM-1 en respuesta a la subunidad S1 (F) del SARS-CoV-2, RBD del SARS-CoV-2 (G), subunidad S2 del SARS-CoV-2 (H), TNF- α (I) y el gráfico de barras cuantificación de MFI (J), $n = 3$, * $p < 0,05$.

Juntos, estos resultados proporcionan evidencia de la inducción de un fenotipo proinflamatorio cuando las hBMVEC se exponen a la proteína de pico SARS-COV-2.

3.6. La proteína espiga del SARS-CoV-2 desencadena una respuesta proinflamatoria y una regulación positiva de las metaloproteinasas de la matriz en las células endoteliales del cerebro humano

Una posibilidad que podría explicar los efectos desestabilizadores de la proteína del pico SARS-CoV-2 observados para la función BBB puede deberse a la respuesta proinflamatoria endotelial. Evaluamos la expresión génica de citocinas en hBMVEC cultivadas tratadas con la proteína de pico SARS-CoV-2. Como se muestra en [Figura 6AB](#), la expresión del gen IL-1 β aumentó significativamente en las células endoteliales expuestas a 10 nM de SARS-CoV-2 RBD (media \pm SEM, a las 4 h: $2,313 \pm 1,05$, $p < 0,001$) y la subunidad S1 del SARS-CoV-2 (4 h: $2,378 \pm 0,865$, $p < 0,001$ y 24 h: $2,412 \pm 0,317$, $p < 0,001$). De manera similar, el ARNm de IL-6 aumentó significativamente después de 4 h de exposición a la subunidad S1 del SARS-CoV-2 ($1,796 \pm 0,533$, $p = 0,014$), SARS-CoV-2 RBD ($2,383 \pm 1,311$, $p < 0,001$) y Subunidad S2 del SARS-CoV-2 ($2,051 \pm 0,449$, $p < 0,001$). Mientras que el tratamiento de 24 h arrojó resultados significativos solo para la subunidad S1 ($1,779 \pm 0,702$, $p = 0,017$). Se observó una marcada significación en la expresión del gen CCL5 en todas las condiciones probadas y en ambos puntos de tiempo (subunidad S1 a las 4 h: $9,793 \pm 7,151$, $p < 0,0001$, y a las 24 h: $13,99 \pm 5,093$, $p < 0,001$; RBD a las 4 h: $6,181 \pm 1,852$, $p =$

0,026 y a las 24 h: $6,344 \pm 1,603$, $p = 0,02$; subunidad S2 a las 4 h: $6,644 \pm 4,352$, $p = 0,01$ y a las 24 h $8,529 \pm 5,959$, $p < 0,005$). El ARNm de CXCL10 se reguló significativamente en las células tratadas con la subunidad S1 del SARS-CoV-2 a las 4 h ($16,62 \pm 7,33$, $p < 0,001$) y a las 24 h ($5,251 \pm 1,686$, $p = 0,014$); y después de 4 h de tratamiento con la subunidad S2 ($6,963 \pm 4,409$, $p < 0,001$). Aunque las respuestas inflamatorias de las células endoteliales del cerebro contrarrestan la estabilidad de la barrera, también es posible que otros procesos celulares puedan contribuir a la ruptura observada de la BBB. Otro posible objetivo molecular conocido por inducir un compromiso en la integridad de la barrera es la familia de las metaloproteinasas de matriz (MMP). Por lo tanto, examinamos la expresión génica de MMP específicamente relevantes para el desglose de BBB. Como se muestra en [Figura 6CD](#), [discos compactos](#), 44h de exposición al SARS-CoV-2 RBD resultó en una expresión elevada (cambio de veces \pm SEM) de MMP2 ($1,406 \pm 0,076$, $p = 0,012$), MMP3 ($4,398 \pm 0,223$, $p = 0,003$), MMP9 ($1,720 \pm 0,140$, $p < 0,005$) y MMP12 ($3,271 \pm 0,450$, $p < 0,001$) en hBMVEC cultivadas. 24 h de exposición al SARS-CoV-2 RBD dieron como resultado niveles elevados de MMP2 ($1,378 \pm 0,134$, $p < 0,022$), MMP3 ($4,319 \pm 0,437$, $p = 0,0004$), MMP9 ($1,66 \pm 0,167$, $p = 0,011$) y MMP12 ($3,01 \pm 0,177$, $p < 0,001$) expresión génica. La exposición a la subunidad S1 del SARS-CoV-2 a las 4 h afecta solo a MMP3 ($3,401 \pm 0,304$, $p = 0,016$) y MMP12 ($3,416 \pm 0,406$, $p < 0,001$) expresión génica. Sin embargo, 24 h de exposición a la subunidad S1 dieron como resultado niveles elevados de MMP3 ($5,557 \pm 0,531$, $p < 0,0001$), MMP9 ($1,594 \pm 0,254$, $p = 0,027$) y MMP12 ($3,305 \pm 0,219$, $p < 0,0001$). De manera similar, la subunidad S2 del SARS-CoV-2 a las 4 h indujo una regulación positiva de MMP3 ($7,849 \pm 1,120$, $p < 0,0001$) y MMP12 ($3,021 \pm 0,135$, $p < 0,0001$), sin cambios en MMP2 y MMP9. Después de 24 h de tratamiento con la subunidad S2 del SARS-CoV-2, MMP2 ($1,613 \pm 0,052$, $p < 0,001$), MMP3 ($3,520 \pm 0,528$, $p = 0,010$), MMP9 ($1,705 \pm 0,098$, $p = 0,0058$) y MMP12 ($4,076 \pm 0,295$, $p < 0,001$) fueron todos significativamente más altos.

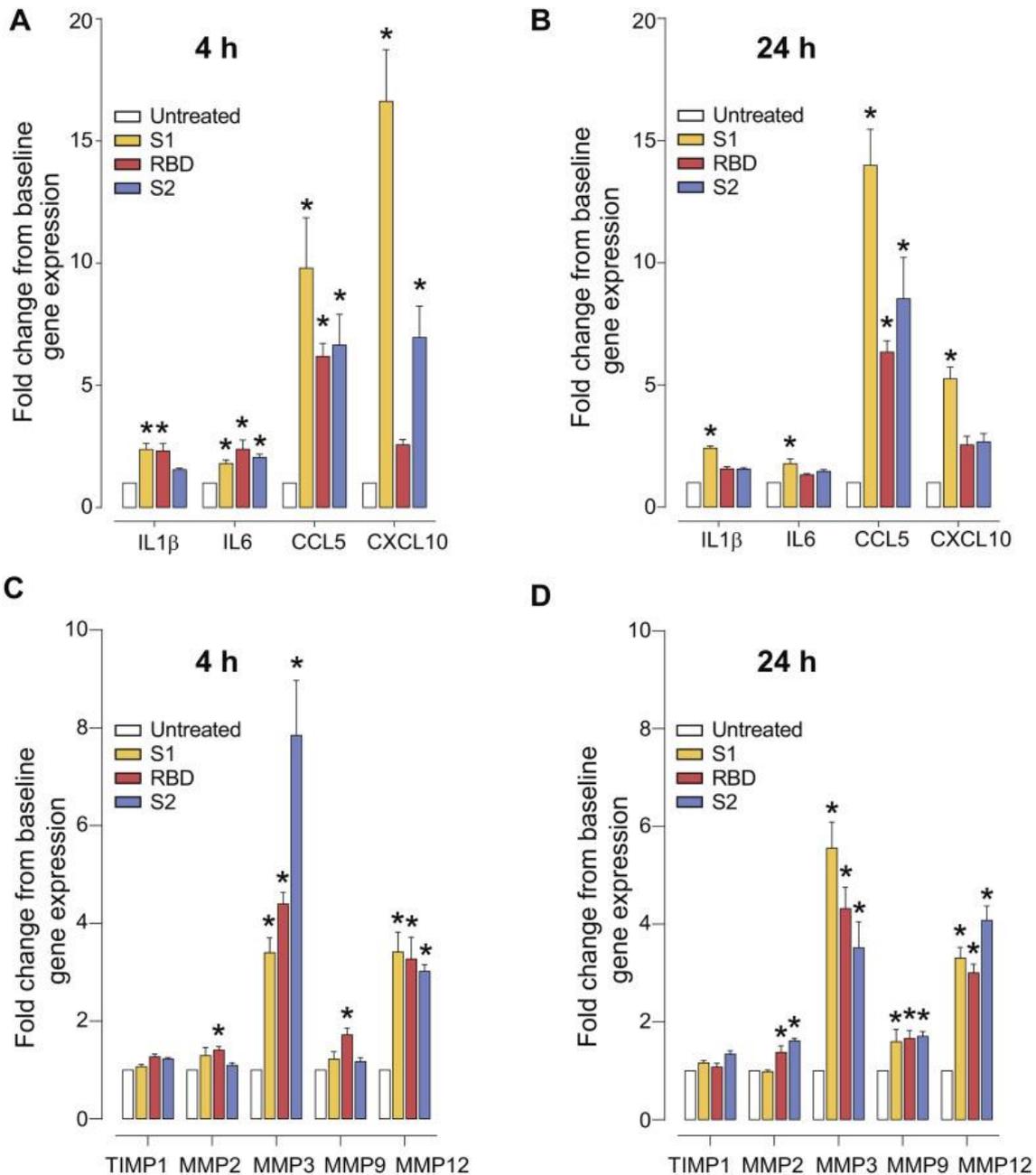


Figura 6

La proteína de punta SARS-CoV-2 desencadena respuestas proinflamatorias y regulación positiva de MMP en hBMVEC. Se incubaron monocapas de hBMVEC confluentes con 10 nM de subunidad S1 de SARS-CoV-2, RBD de SARS-CoV-2, subunidad S2 de SARS-CoV-2, durante el tiempo indicado o se dejaron sin tratar para que sirvieran como control de referencia. Los genes de citoquinas objetivo analizados incluyeron: IL1 β , IL6, CCL5, CXCL10 a las 4 h (A) y 24 h (B). Se muestran análisis de expresión génica para MMP2, MMP3, MMP9, MMP12 y el inhibidor de MMP TIMP1 durante 4 h (C) y 24 h (D) respectivamente. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se repitieron tres veces usando células primarias obtenidas de tres donantes diferentes. Cada barra representa una media de cambio de veces \pm SEM, $n = 12$. Los conjuntos de datos se analizaron usando ANOVA unidireccional y la comparación post-hoc con la condición no tratada se calculó usando la prueba post-hoc de Tukey con * $p < 0,05$.

Este análisis respalda la idea de que la proteína de punta del SARS-CoV-2 puede desencadenar una respuesta proinflamatoria muy específica que incluye la regulación positiva de la expresión de MMP en las células endoteliales del cerebro, lo que ofrece un medio por el cual el SARS-CoV-2 puede violar la BHE.

[Ir:](#)

4. Discusión

La aparición de la pandemia de COVID-19 y sus consiguientes consecuencias en la salud pública ha cambiado drásticamente nuestra forma de vida. Las personas con COVID-19 pueden ser asintomáticas o presentar una amplia gama de síntomas que influyen de manera crítica en la recuperación de la infección. La respuesta proinflamatoria del huésped, particularmente en casos de fenotipos inflamatorios agresivos, contribuye fuertemente al pronóstico de la enfermedad. En casos severos, los pacientes pueden progresar a síndrome de dificultad respiratoria aguda, shock séptico, acidosis metabólica, coagulopatía y disfunción multiorgánica. Los pacientes con COVID-19 a menudo presentan complicaciones neurológicas como náuseas, dolor de cabeza, anosmia, mialgia, alteración de la conciencia y enfermedades cerebrovasculares agudas ([Carod-Artal, 2020](#) ; [Li et al., 2020](#) ; [Koralnik y Tyler, 2020](#)). El análisis dentro de este informe proporciona evidencia de que la proteína de punta SARS-CoV-2 puede afectar directamente la función de barrera de la BBB, lo que brinda una visión más profunda de la neuropatología asociada con COVID-19.

El SARS-CoV-2 puede inducir la formación de microcoágulos en la vasculatura de los tejidos periféricos y dentro de los vasos del SNC. De hecho, Bryce et al.³² encontraron que 6 de 20 casos tenían microtrombos e infarto agudo en el cerebro ([Bryce et al., 2005](#)). Aquí informamos la descomposición evidente de la BBB por la proteína espiga del SARS-CoV-2, lo que ofrece una posible vía para contrarrestar las consecuencias del accidente cerebrovascular isquémico agudo observado en pacientes con COVID-19 menores de 50 años ([Oxley et al., 2020](#)). Sin embargo, los estudios futuros deben centrarse en interrogar la conexión entre la interrupción de la barrera mediada por virus y la coagulación para determinar los mecanismos cerebrovasculares únicos responsables de aumentar el riesgo de accidentes cerebrovasculares en pacientes con COVID-19.

La enzima convertidora de angiotensina 2 o ACE2 es el principal objetivo de unión celular para la proteína espiga del SARS-CoV-2. La expresión de ACE2 o su actividad enzimática se ha detectado previamente en la vasculatura cerebral de sujetos sanos, pacientes con enfermedades neurodegenerativas y en pacientes con COVID-19 ([Kehoe et al., 2016](#) ; [Bryce et al., 2005](#) ; [Hamming et al., 2004](#)). Se desconoce si la expresión de ACE2 cambia en pacientes con comorbilidades (hipertensión, diabetes, etc.). Kehoe et al. informó recientemente una reducción de la actividad de ACE2 en el tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) ([Kehoe et al., 2016](#)). Sin embargo, el estudio mencionado anteriormente no proporcionó una comparación de los patrones de expresión de proteínas en los casos de EA frente a los de control. Por lo tanto, nuestros resultados hacen dos afirmaciones importantes al comparar la corteza normal con la corteza de los casos de demencia. La primera es que la proteína ACE2 se encuentra en vasos de diferentes calibres, incluidos los capilares, las arteriolas y las vénulas. [Figura 1](#)). La segunda es que la expresión de ACE2 aparece sobrerregulada en los capilares de los casos de demencia. Es de destacar que nuestros casos de demencia incluyeron 3 con Alzheimer y 1 demencia de tipo mixto. También incluimos un análisis de ACE2 en casos de hipertensión, que al igual que la demencia también se asocia con malos resultados de

COVID19. Curiosamente, los casos hipertensos mostraron una expresión de ACE2 aún mayor en vasos de tamaño capilar. La expresión de ACE2 en células de parénquima (es decir, astrocitos, neuronas, etc.) no fue evidente en casos normales o hipertensos. Por el contrario, los astrocitos inmunopositivos para ACE2 estaban presentes en los casos de demencia. En lo que respecta a la expresión de ACE2 en otros tipos de células asociadas con la vasculatura cerebral, no podemos descartar la posibilidad de la contribución de la expresión de ACE2 en pericitos y células de músculo liso que han informado otros ([Hamming et al., 2004](#) ; [Él et al., 2005](#)). En general, la demencia y la hipertensión aumentan claramente la expresión vascular de ACE2, lo que sugiere que el SARS-CoV-2 podría tener una mayor probabilidad de encontrar su objetivo clave de unión celular en personas con estas comorbilidades.

Ahora está bien aceptado que COVID-19 puede afectar a todos los grupos de edad, incluidos los niños. Una complicación observada de la infección por SARS-CoV-2 en niños es similar al síndrome de shock de la enfermedad de Kawasaki atípico caracterizado por hiperinflamación multisistémica, edema y vasculitis ([Riphagen et al., 2020](#)). Un estudio reciente atribuye los trastornos vasculares y endoteliales encontrados en pacientes con COVID-19 a la infección viral directa de las células endoteliales ([Varga et al., 2020](#)). En nuestro estudio, demostramos que incluso la proteína espiga del SARS-CoV-2 por sí sola es un potente inductor de la disfunción endotelial y que las manifestaciones del síndrome de shock por COVID-19 en los niños pueden atribuirse, al menos parcialmente, a su acción. Por lo tanto, el edema observado clínicamente resulta de la barrera endotelial hiperpermeable y la hiperinflamación difusa generalizada puede ser causada por la secreción elevada de citocinas proinflamatorias en el endotelio. Estos hallazgos brindan dos nociones importantes para las intervenciones terapéuticas: 1) estabilizar el endotelio en pacientes con COVID-19 con condiciones preexistentes asociadas con una mayor vulnerabilidad del lecho vascular; y 2) la infección viral productiva de las células endoteliales no es un requisito absoluto para la disfunción endotelial, ya que también puede ocurrir como resultado de la eliminación de proteínas virales.

El lecho endotelial de la BBB es el lugar principal de ataque de varios virus neuroinvasivos, como la rabia ([Wang et al., 2013](#) ; [Chai et al., 2014](#)), el VIH-1 ([Marshall, 1988](#) ; [Resnick et al., 1988](#) ; [Berger y Avison, 2004](#)), Nilo Occidental ([Diamond and Klein, 2004](#) ; [Paterson, 2005](#)), Zika ([Leda et al., 2019](#)) e influenza ([Chaves et al., 2014](#)). Los patógenos virales ejercen su efecto negativo sobre la BBB no solo por la interacción directa con el endotelio que da como resultado una infección productiva o no productiva de las células endoteliales, sino también por el inicio de respuestas inmunitarias del huésped y una expresión elevada de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, células endoteliales. moléculas de adhesión, lo que en última instancia conduce a la desaparición de la integridad estructural y funcional de la BBB ⁵⁴ . La interrupción de la BBB desencadena el paso libre de partículas virales y células inmunitarias infectadas al parénquima cerebral, eleva aún más los niveles de mediadores inflamatorios y agrava la brecha en la función de barrera endotelial ([Dahm et al., 2016](#) ; [Spindler y Hsu, 2012](#) ; [Daniels et al. al., 2014](#) ; [Al-Obaidi et al., 2018](#)). Durante el curso de muchas infecciones virales sistémicas, las proteínas virales eliminadas son potentes inductores de la disfunción BBB, por lo que evaluamos el efecto de la proteína de punta esencial SARS-CoV-2 en las células endoteliales del cerebro. Examinamos el efecto citotóxico de la proteína espiga del SARS-CoV-2 en las células endoteliales y descubrimos que solo la exposición crónica (>72 h) a la proteína espiga del SARS-CoV-2 da como resultado una tasa ligeramente mayor de muerte celular. Estos hallazgos amplían los datos clínicos recientes que informan la muerte de células endoteliales en casos graves de COVID-19 ([Varga et al., 2020](#)). Sin embargo, no

podemos excluir la posibilidad de que otras células que forman y mantienen el lecho vascular (pericitos, células inmunitarias perivasculares, células parenquimatosas, etc.) sean susceptibles a la citotoxicidad de la proteína espiga del SARS-CoV-2.

A continuación, evaluamos la proteína de pico SARS-CoV-2 por su capacidad para modular la función de barrera endotelial. Para evaluar la integridad de la barrera, medimos la resistencia eléctrica (un medio analítico para examinar la "estrechez" de la barrera) y la permeabilidad paracelular ("fugas" de la barrera) de las hBMVEC expuestas a cualquiera de las subunidades de la proteína espiga del SARS-CoV-2. Incluso la aplicación única de las subunidades de la proteína espiga dio como resultado una pérdida dependiente de la dosis de la resistencia eléctrica de la barrera que alcanzó su punto máximo a las 12-14

h. Curiosamente, la subunidad S1 o S2 del SARS-CoV-2 causaron efectos similares y una pérdida transitoria de resistencia eléctrica que se recuperó por completo a las 24 h, lo que plantea la posibilidad de que se produzca una reorganización estructural en lugar de una pérdida total del complejo de unión estrecha ([Fig. 3A y B](#)). Para determinar si la disminución de la resistencia transendotelial por parte de las proteínas de pico corresponde a la barrera con fugas, realizamos un ensayo de permeabilidad FITC. Los resultados muestran que cada subunidad de la proteína espiga del SARS-CoV-2 aumenta significativamente la tasa de paso paracelular pasivo de trazadores moleculares pequeños, lo que proporciona un segundo indicador de la disfunción de la barrera ([Fig. 3D](#)). La observación de que las subunidades S1, S2 y RBD ejercen efectos nocivos similares sobre la función BBB es particularmente interesante, ya que sugiere que el receptor ACE2 no es el punto de contacto exclusivo entre el SARS-CoV-2 y las células endoteliales del cerebro. Lo más probable es que la interacción entre el SARS-CoV-2 y la BBB sea multifocal e implique una activación reversible en más de un receptor o cascada de señalización.

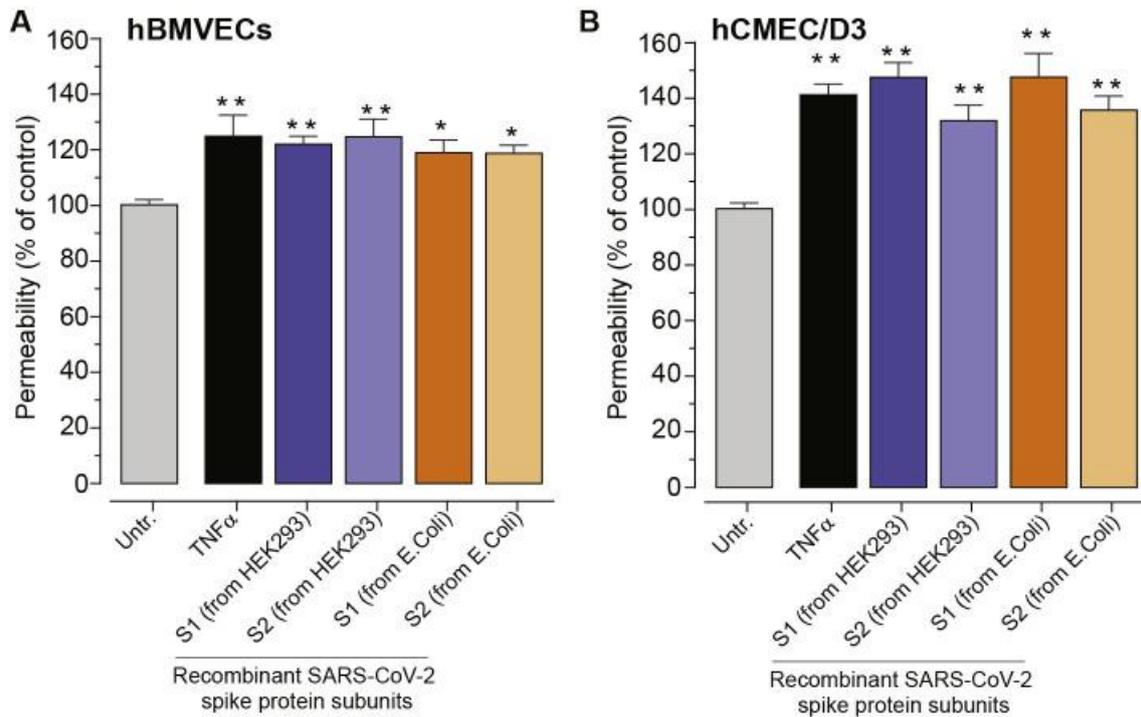
Las células endoteliales están constantemente expuestas a la tensión de cizallamiento del fluido de la sangre. Por lo tanto, es importante validar los hallazgos de los sistemas estáticos en modelos BBB que tienen en cuenta parámetros fisiológicos como el flujo dinámico y las geometrías intercelulares. Con este fin, realizamos experimentos utilizando células endoteliales cerebrales cultivadas en un espacio cilíndrico dentro de una matriz de gel como se describió anteriormente ([Partyka et al., 2017](#)). Después de la endotelización, se introdujo la perfusión para promover la génesis de la barrera que genera propiedades destacadas en la BBB. En [Figura 4](#) se muestra que estas construcciones vasculares maduran como una sola capa (sección transversal) de endotelio que forma uniones estrechas intercelulares y restringe el movimiento de marcadores fluorescentes. Estos sistemas (cuando también se combinan con otras células) representan la recapitulación más avanzada de la barrera hematoencefálica. Una vez que se introdujo la subunidad S1 del SARS-CoV-2, la presencia de permeabilidad de barrera (desde el lumen hasta el compartimento parenquimatoso) fue claramente evidente a las 2 h. Estos resultados sugieren que si las proteínas de pico virales libres o las que se encuentran en la superficie del virus presentes durante la infección por SARS-CoV-2 podrían inducir una permeabilidad de la barrera (aunque una vez que se alcanza cierto umbral) equívoca a las concentraciones utilizadas aquí. Como este es el primer informe sobre el tema, queda mucho trabajo por hacer,

Las células endoteliales son una parte esencial de la respuesta inflamatoria ya que la activación del endotelio permite el reclutamiento y la movilización de células inmunes a los tejidos que están bajo el ataque de patógenos. Una vez activadas, las células endoteliales del cerebro aumentan la expresión de moléculas de adhesión celular (CAM) y citocinas proinflamatorias que desempeñan un papel inicial clave en el proceso de

neuroinflamación y migración transendotelial de células inmunitarias en respuesta al desafío inflamatorio ([Hurwitz et al., 1994](#) ; [Roe et al., 2014](#)). Las células endoteliales expuestas a cada subunidad de la proteína espiga del SARS-CoV-2 mostraron una expresión elevada de las moléculas de adhesión celular (ICAM-1 y VCAM-1, [Figura 5](#)), factores de quimiotaxis leucocitaria (CXCL10 y CCL5 (RANTES) [Figura 6](#)), y citocinas proinflamatorias (IL-1 β e IL-6, [Figura 6](#)). Junto con la reducción de la hermeticidad de la barrera ([Figura 2](#)) nuestro hallazgo de que el SARS-CoV-2 activa las hBMVEC indica claramente el potencial de una mayor infiltración inmunitaria en el SNC.

La activación endotelial también presenta una mayor expresión de metaloproteinasas de matriz o MMP, una familia de enzimas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular en procesos fisiológicos y patológicos normales. Activadas por citocinas proinflamatorias ([Daneman y Prat, 2015](#)), las MMP también regulan la degradación de proteínas de unión estrecha y las modificaciones postraduccionales ([Louboutin et al., 2010](#) ; [Yang y Rosenberg, 2015](#) ; [Roe et al., 2012](#)). En este estudio, informamos que la proteína espiga aumenta la expresión de los genes MMP3 y MMP12 y, en menor medida, MMP2 y MMP9. MMP3 se ha implicado previamente en lesiones cerebrales traumáticas ([Falo et al., 2006](#)) al digerir proteínas de uniones estrechas seguidas de la apertura de BBB ([Yang y Rosenberg, 2011](#)). Estos informes corroboran nuestros hallazgos de disminución de la resistencia de barrera ([Fig. 3](#)) y aumento de la secreción de quimiocinas quimiotácticas ([Figura 5](#)). MMP12, por el contrario, no está involucrada en el daño de BBB, pero juega un papel en la extravasación y migración de células inmunes al cerebro ([Ulrich et al., 2006](#)). Si juntamos nuestros datos de niveles elevados de MMP3, CCL5, CXCL10 y CAM, podemos especular que el SARS-CoV-2 es un virus potencialmente neuroinvasivo, ya que activa la maquinaria para facilitar la migración de las células inmunitarias infectadas como "caballos de Troya" al cerebro. parénquima.

Hasta donde sabemos, esta es la primera evaluación informada que examinó los efectos de la proteína del pico del SARS-CoV-2 en la BHE. Nuestros hallazgos brindan información sobre el tema continuo de que este nuevo coronavirus desencadena respuestas en el endotelio. Específicamente, con respecto al endotelio cerebral, la proteína de punta del SARS-CoV-2 indujo la desestabilización de la BBB, promovió un estado proinflamatorio pero no pareció alterar la viabilidad celular de manera aguda. La disfunción de la barrera ofrece una explicación plausible de las complicaciones neurológicas observadas en COVID-19. Por último, la apertura de la BBB, insinúa los posibles medios en los que el patógeno SARS-CoV-2 también podría neuroinvasión.



[Los siguientes son los datos complementarios relacionados con este artículo. Figura complementaria S1](#)

La proteína espiga del SARS-CoV-2 desencadena un aumento de la permeabilidad paracelular en las monocapas hCMEC/D3.

Tabla Suplementaria. S1:

Detalles demográficos de casos post-mortem utilizados para determinar los niveles de expresión de ACE.

[Haga clic aquí para ver.](#) ^(685K, jpg) Tabla complementaria. S1

[Ir:](#)

Contribuciones de los autores

TPB, SHR, RP, PAG y AMA coescribieron el manuscrito y diseñaron experimentos. TPB, AMA, ABL, TAB, HMM, JAK, RR realizaron experimentos y analizaron los resultados. Todos los autores han leído y aprobado el manuscrito.

[Ir:](#)

Fondos

Las metodologías y los reactivos utilizados fueron desarrollados en parte por las siguientes fuentes de financiación: T32 DA007237 (TPB), 5R01DA046833 (SHR & RP) y K01DA046308 (AMA).

[Ir:](#)

Disponibilidad de datos y materiales.

Los resultados de los datos analizados presentados en este estudio están todos incluidos aquí.

[Ir:](#)

Aprobación ética

Los estudios en este informe se realizaron con la aprobación de la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Temple (Filadelfia, PA) y en pleno cumplimiento de las pautas éticas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH).

[Ir:](#)

Declaración de interés en competencia

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

[Ir:](#)

Agradecimientos

El tejido fetal humano para el aislamiento de células endoteliales microvasculares de cerebro fetal humano se obtuvo del Laboratorio de Investigación de Defectos de Nacimiento, que cuenta con el apoyo del premio NIH número 5R24HD000836 del Instituto Nacional de Salud Infantil y Desarrollo Humano Eunice Kennedy Shriver. Nos gustaría agradecer al comité IBC de la Universidad de Temple (en particular, a la coordinadora del programa, Mary B. Pultró) por su revisión atenta y eficiente que permitió que estos experimentos se realizaran de manera oportuna.

[Ir:](#)

Referencias

1. Ackermann M. Endotelialitis vascular pulmonar, trombosis y angiogénesis en Covid-19. *N. ingl. J. Med.* 2020 doi: 10.1056/NEJMoa2015432. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Adamson RH, Lenz JF, Curry FE Microscopía confocal de barrido láser cuantitativa en capilares individuales: medición de la permeabilidad. *Microcirculación.* 1994; 1 :251–265. doi: 10.3109/10739689409146752. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
3. Al-Obaidi MMJ La interrupción de la barrera hematoencefálica es una propiedad vital de la infección viral neurotrópica del sistema nervioso central. *Acta Virol.* 2018; 62 :16–27. doi: 10.4149/av_2018_102. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
4. Andrews AM La caracterización de las células endoteliales del cerebro fetal humano revela propiedades de barrera adecuadas para el modelado in vitro de la BHE con cocultivos singénicos. *J. Cereb. Metab. del flujo sanguíneo.* 2018; 38 :888–903. doi: 10.1177/0271678X17708690. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Berger JR, Avison M. La barrera hematoencefálica en la infección por VIH. *Parte delantera. Biosci.* 2004; 9 :2680–2685. doi: 10.2741/1427. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
6. Bradley BT Histopatología y hallazgos ultraestructurales de infecciones fatales por COVID-19. *medRxiv.* 2004; 2020 doi:

- 10.1101/2020.04.17.20058545(2020). 2017.20058545. [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
7. Bryce C. Fisiopatología del SARS-CoV-2: la orientación de las células endoteliales genera una enfermedad compleja con microangiopatía trombótica y respuesta inmune aberrante. La experiencia de la autopsia de Mount Sinai COVID-19. *medRxiv*. 2005; 2020 doi: 10.1101/2020.05.18.20099960(2020). 2018.20099960. [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
 8. Buja LM El espectro emergente de la patología cardiopulmonar de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19): informe de 3 autopsias de Houston, Texas, y revisión de los hallazgos de autopsias de otras ciudades de los Estados Unidos. *Cardiovasc. Patol.* 2020; 48 doi: 10.1016/j.carpath.2020.107233. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 9. Carod-Artal FJ Complicaciones neurológicas del coronavirus y COVID-19. *Rev. Neurol.* 2020; 70 :311–322. doi: 10.33588/rn.7009.2020179. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
 10. Chai Q., He WQ, Zhou M., Lu H., Fu ZF La mejora de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la reducción de la expresión de la proteína de la unión estrecha están moduladas por quimiocinas/citocinas inducidas por la infección por el virus de la rabia. *J.Virol.* 2014; 88 :4698–4710. doi: 10.1128/JVI.03149-13. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 11. Chan JF Un grupo familiar de neumonía asociado con el nuevo coronavirus de 2019 que indica transmisión de persona a persona: un estudio de un grupo familiar. *Lanceta.* 2020; 395 :514–523. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 12. Chaves AJ La neuroinvasión del virus de la influenza altamente patógeno H7N1 es causada por la interrupción de la barrera hematoencefálica en un modelo aviar. *Más uno.* 2014; 9 doi: 10.1371/journal.pone.0115138. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 13. Chen G. Características clínicas e inmunológicas de la enfermedad por coronavirus grave y moderada 2019. *J. Clin. Invertir.* 2020; 130 :2620–2629. doi: 10.1172/JCI137244. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 14. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, V La especie coronavirus relacionado con el síndrome respiratorio agudo severo: clasificar 2019-nCoV y nombrarlo SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020; 5 :536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 15. Dahm T., Rudolph H., Schwerk C., Schrotten H., Tenenbaum T. Neuroinvasión e inflamación en infecciones virales del sistema nervioso central. *mediat. inflamacion* 2016 doi: 10.1155/2016/8562805 (2016). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

16. Daneman R, Prat A. La barrera hematoencefálica. *Harb de primavera fría. Perspectiva. Biol.* 2015; 7 doi: 10.1101/cshperspect.a020412. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Daniels BP Los patrones moleculares asociados a patógenos virales regulan la integridad de la barrera hematoencefálica a través de señales de citocinas innatas en competencia. *mBío.* 2014; 5 doi: 10.1128/mBio.01476-14. e01476-01414. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
18. DeOre BJ, Galie PA, Sehgal CM El caudal de líquido dicta la eficacia de la terapia de ultrasonido antivascular de baja intensidad en un modelo de microfluidos. *Microcirculación.* 2019; 26 :e12576. doi: 10.1111/micc.12576. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Diamond MS, Klein RS Virus del Nilo Occidental: cruzando la barrera hematoencefálica. *Nat. Medicina.* 2004; 10 :1294–1295. doi: 10.1038/nm1204-1294. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
20. Dosch SF, Mahajan SD, Collins AR La respuesta inmunitaria innata inducida por la proteína del pico del coronavirus del SARS se produce mediante la activación de la vía NF-kappaB en macrófagos de monocitos humanos *in vitro* . *Resolución de virus* 2009; 142 :19–27. doi: 10.1016/j.virusres.2009.01.005. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Faló MC, Fillmore HL, Reeves TM, Phillips LL El perfil de expresión de la metaloproteínasa-3 de Matrix diferencia la plasticidad sináptica adaptativa y la desadaptativa inducida por una lesión cerebral traumática. *J. Neurosci. Res.* 2006; 84 :768–781. doi: 10.1002/jnr.20986. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
22. Guan WJ Características clínicas de la enfermedad por coronavirus 2019 en China. *N. ingl. J. Med.* 2020; 382 :1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Guzik TJ COVID-19 y el sistema cardiovascular: implicaciones para la evaluación de riesgos, diagnóstico y opciones de tratamiento. *Cardiovasc. Res.* 2020 doi: 10.1093/cvr/cvaa106. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Hamming I. Distribución tisular de la proteína ACE2, el receptor funcional del coronavirus del SARS. Un primer paso en la comprensión de la patogenia del SARS. *J. Pathol.* 2004; 203 :631–637. doi: 10.1002/ruta.1570. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Hassan SA, Sheikh FN, Jamal S, Ezeh JK, Akhtar A. Coronavirus (COVID-19): una revisión de las características clínicas, el diagnóstico y el tratamiento. *Cureo.* 2020; 12 doi: 10.7759/cureus.7355. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
26. He L. Expresión vascular específica de pericito del receptor ACE2 del SARS-CoV-2: implicaciones para la inflamación microvascular y la hipercoagulopatía en COVID-19. *bioRxiv.* 2005; 2020 doi:

- 10.1101/2020.05.11.088500(2020). 2011.088500. [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
27. Huang C. Características clínicas de pacientes infectados con el nuevo coronavirus 2019 en Wuhan, China. *Lanceta*. 2020; 395 :497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 28. Hurwitz AA, Berman JW, Lyman WD El papel de la barrera hematoencefálica en la infección por VIH del sistema nervioso central. *Adv. Neuroimmunol*. 1994; 4 :249–256. doi: 10.1016/s0960-5428(06)80263-9. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
 29. Kehoe PG, Wong S., Al Mulhim N., Palmer LE, Miners JS La enzima convertidora de angiotensina 2 se reduce en la enfermedad de Alzheimer en asociación con el aumento de la patología beta-amiloide y tau. *Res. de Alzheimer. El r*. 2016; 8:50 . doi: 10.1186/s13195-016-0217-7. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 30. Koralnik IJ, Tyler KL COVID-19: una amenaza global para el sistema nervioso. *Ana. Neurol*. 2020 doi: 10.1002/ana.25807. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 31. Lauer SA El período de incubación de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) a partir de casos confirmados informados públicamente: estimación y aplicación. *Ana. Interno. Medicina*. 2020; 172 :577–582. doi: 10.7326/M20-0504. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 32. Leda AR Interrupción selectiva de la barrera hematoencefálica por el virus Zika. *Parte delantera. Microbiol*. 2019; 10 :2158. doi: 10.3389/fmicb.2019.02158. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 33. Li H., Xue Q., Xu X. Implicación del sistema nervioso en la infección por SARS-CoV-2. *neurotoxicidad. Res*. 2020; 38 :1–7. doi: 10.1007/s12640-020-00219-8. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 34. Liu Y. Índices clínicos y bioquímicos de pacientes infectados con 2019-nCoV vinculados a cargas virales y lesión pulmonar. *ciencia Ciencias de la vida de China*. 2020; 63 :364–374. doi: 10.1007/s11427-020-1643-8. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 35. Louboutin JP, Agrawal L., Reyes BA, Van Bockstaele EJ, Strayer DS Lesión inducida por VIH-1 gp120 en la barrera hematoencefálica: papel de las metaloproteinasas 2 y 9 y relación con el estrés oxidativo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 2010; 69 :801–816. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181e8c96f. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 36. Lu R. Caracterización genómica y epidemiología del nuevo coronavirus de 2019: implicaciones para los orígenes del virus y la unión al receptor. *Lanceta*. 2020; 395 :565–574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 37. Mali SN, Thorat BR, Chopade AR Un punto de vista sobre la enzima convertidora de angiotensina 2, los antihipertensivos y la enfermedad por coronavirus 2019

- (COVID-19) *Infect Disord. Blancos de drogas*. 2020 doi: 10.2174/1871526520666200511005546. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
38. Marshall DW Penetración del VIH del BBB. *Neurología*. 1988; 38 :1000–1001. doi: 10.1212/wnl.38.6.1000-b. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
 39. Martines RB Patología y patogenia del SARS-CoV-2 asociado a la enfermedad mortal por coronavirus, Estados Unidos. *emergente Infectar. Dis*. 2020; 26 doi: 10.3201/eid2609.202095. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 40. Mora-Diaz JC, Pineyro PE, Houston E., Zimmerman J., Gimenez-Lirola LG Virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina: una revisión. *Veterinario delantero. ciencia* 2019; 6:53 . doi: 10.3389/fvets.2019.00053. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 41. Moriguchi T. Un primer caso de meningitis/encefalitis asociado al SARS-Coronavirus-2. *En t. J. infectar. Dis*. 2020; 94 :55–58. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.062. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 42. Natoli S., Oliveira V., Calabresi P., Maia LF, Pisani A. Does. ¿El SARS-Cov-2 invade el cerebro? Lecciones traslacionales de modelos animales. *EUR. J. Neurol*. 2020 doi: 10.1111/ene.14277. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 43. Netland J., Meyerholz DK, Moore S., Cassell M., Perlman S. La infección por coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo causa muerte neuronal en ausencia de encefalitis en ratones transgénicos para ACE2 humano. *J.Virol*. 2008; 82 :7264–7275. doi: 10.1128/JVI.00737-08. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 44. Ou X. Caracterización de la glicoproteína de punta de SARS-CoV-2 en la entrada del virus y su reactividad cruzada inmune con SARS-CoV. *Nat. común* 2020; 11 :1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 45. Oxley TJ Accidente cerebrovascular de grandes vasos como característica de presentación de Covid-19 en los jóvenes. *N. ingl. J.Med*. 2020; 382 :e60. doi: 10.1056/NEJMc2009787. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
 46. Partyka PP El estrés mecánico regula el transporte en un modelo 3D compatible de la barrera hematoencefálica. *Biomateriales*. 2017; 115 :30–39. doi: 10.1016/j.biomateriales.2016.11.012. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
 47. Paterson R. Cómo el virus del Nilo Occidental cruza la barrera hematoencefálica. *Lancet Neurol*. 2005; 4:18 . doi: 10.1016/s1474-4422(04)00957-3. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
 48. Pranata R., Huang I., Lim MA, Wahjoepramono PEJ, July J. Impacto de las enfermedades cerebrovasculares y cardiovasculares en la mortalidad y la gravedad de la COVID-19: revisión sistemática, metanálisis y metarregresión. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis*. 2020 doi:

- 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104949. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
49. Resnick L, Berger JR, Shapshak P., Tourtellotte WW Penetración temprana de la barrera hematoencefálica por el VIH. *Neurología*. 1988; 38 :9–14. doi: 10.1212/wnl.38.1.9. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
50. Riphagen S., Gomez X., Gonzalez-Martinez C., Wilkinson N., Theocharis P. Shock hiperinflamatorio en niños durante la pandemia de COVID-19. *Lanceta*. 2020; 395 :1607–1608. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31094-1. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
51. Rissi DR Un estudio retrospectivo de la neuropatología y el diagnóstico de la peritonitis infecciosa felina natural. *J. Vet. Diagnóstico investigando* 2018; 30 :392–399. doi: 10.1177/1040638718755833. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
52. Roe K. La alteración de la barrera hematoencefálica en ratones inducida por el virus del Nilo Occidental se caracteriza por la degradación de las proteínas del complejo de unión y el aumento de múltiples metaloproteinasas de matriz. *J. Gen. Virol.* 2012; 93 :1193–1203. doi: 10.1099/vir.0.040899-0. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
53. Roe K, Orillo B, Verma S. West. Las moléculas de adhesión celular inducidas por el virus del Nilo en las células endoteliales microvasculares del cerebro humano regulan la adhesión de los leucocitos y modulan la permeabilidad del modelo de barrera hematoencefálica in vitro. *Más uno*. 2014; 9 doi: 10.1371/journal.pone.0102598. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
54. Roth-Cross JK, Bender SJ, Weiss SR El virus de la hepatitis del ratón por coronavirus murino es reconocido por MDA5 e induce interferón tipo I en macrófagos/microglía cerebrales. *J. Virol.* 2008; 82 :9829–9838. doi: 10.1128/JVI.01199-08. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
55. Santos RA Angiotensina-(1-7) *Hipertensión*. 2014; 63 :1138–1147. doi: 10.1161/HIPERTENSIONAHA.113.01274. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
56. Spindler KR, Hsu TH Alteración viral de la barrera hematoencefálica. *Tendencias Microbiol.* 2012; 20 :282–290. doi: 10.1016/j.tim.2012.03.009. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
57. Tay MZ, Poh CM, Renia L., MacAry PA, Ng LFP La trinidad de COVID-19: inmunidad, inflamación e intervención. *Nat. Rev. Inmunol.* 2020; 20 :363–374. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
58. Ulrich R. MMP-12, MMP-3 y TIMP-1 están notablemente regulados al alza en la encefalomiелitis murina de theiler desmielinizante crónica. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006; 65 :783–793. doi: 10.1097/01.jnen.0000229990.32795.0d. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]

59. Varga Z. Infección de células endoteliales y endotelitis en COVID-19. *Lanceta*. 2020; 395 :1417–1418. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
60. Wang L., Cao Y., Tang Q., Liang G. Papel de la barrera hematoencefálica en la infección y protección del virus de la rabia. *Célula de proteína*. 2013; 4 :901–903. doi: 10.1007/s13238-013-3918-8. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
61. Wang Y., Wang Y., Chen Y., Qin Q. Las características epidemiológicas y clínicas únicas de la nueva neumonía por coronavirus emergente de 2019 (COVID-19) implican medidas de control especiales. *J. Med. Virol.* 2020 doi: 10.1002/jmv.25748. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
62. Weksler BB Propiedades específicas de la barrera hematoencefálica de una línea de células endoteliales de cerebro adulto humano. *FASEB J.* 2005; 19 :1872–1874. doi: 10.1096/fj.04-3458fje. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
63. Yang Y., Rosenberg GA Ruptura de la barrera hematoencefálica en la enfermedad cerebrovascular aguda y crónica. *Carrera*. 2011; 42 :3323–3328. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.608257. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
64. Yang Y., Rosenberg GA Matrix metaloproteinasas como objetivos terapéuticos para el accidente cerebrovascular. *Res. cerebral*. 2015; 1623 : 30–38. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.024. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
65. Yang J. Prevalencia de comorbilidades y sus efectos en pacientes infectados con SARS-CoV-2: revisión sistemática y metanálisis. *En t. J. infectar. Dis.* 2020; 94 :91–95. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.017. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
66. Zhang Y. Coagulopatía y anticuerpos antifosfolípidos en pacientes con Covid-19. *N. ingl. J. Med.* 2020; 382 :e38. doi: 10.1056/NEJMc2007575. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

OTROS FORMATOS

- [PubReader](#)
- [PDF \(7.6M\)](#)

COMPORTAMIENTO

- [Citar](#)
- [Favoritos](#)

CUOTA

- -

- -

-

<https://w>

RECURSOS

- [Artículos similares en PubMed](#)

SEGUIR NCBI

[Conéctese con NLM](#)

-

-

-

Biblioteca Nacional de Medicina

[8600 Rockville Pike](#)

[Bethesda, MD 20894](#)

[Políticas Web](#)

[FOIA](#)

[Ayuda](#)