
Barreras inmunitarias y p73 en cerebros
humanos postmortem neuroinvasidos por
SARS-Cov 2

Autora

Elsa Asunción Martínez Zurita

Tutor/a

Miriam González Gómez

Cotutor/a

Ibrahim González Marrero

Área

Anatomía y Embriología Humana

Curso académico 2020/2021

Índice

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Protección inmunológica del cerebro.....	5
1.1.1. Barreras cerebrales.....	5
1.2. Proteína p73.....	12
1.3. SARS-CoV-2 en el cerebro.....	15
1.3.1. Estructura del SARS-CoV-2.....	15
1.3.2. Vías de entrada al SNC.....	17
1.4. Manifestaciones neurológicas.....	20
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	21
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1. Muestras de cerebros humanos.....	22
4.2. Tinciones topográficas.....	22
5. CONCLUSIONES.....	23
6.REFERENCIAS.....	25

RESUMEN

La actual pandemia requiere un mejor entendimiento de los mecanismos que regulan las barreras inmunológicas del sistema nervioso central (SNC), en especial en relación con la activación de la respuesta inmune en las barreras que protegen al SNC. Dicha respuesta se da gracias a las células inmunitarias que se encuentran en el sistema nervioso central (microglía) y en las barreras cerebrales: barrera hematoencefálica (BHE), barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR) en los plexos coroideos y en las meninges.

Por otro lado, debido a la expresión preferencial de la proteína p73 en algunas de estas barreras y a los defectos inmunológicos que tiene el ratón knock-out P73 (KO P73), nos proponemos estudiar la expresión de este factor de transcripción y su papel en la integridad de las barreras cerebrales, así como, analizar la distribución y cantidad de las células inmunitarias en las mismas. Para abordar estos objetivos, utilizaremos técnicas de inmunohistoquímica, western blot y microscopía electrónica (ultraestructura e inmuno-oro) en cerebros humanos postmortem fijados en formol con y sin SARS-Cov2.

El abordaje de este problema científico, que hasta ahora ha sido poco estudiado, puede ayudar a entender lo que ocurre en las barreras inmunitarias cuando el SNC es invadido por agentes extraños como el virus SARS-Cov2, en este momento de gran actualidad, así como, el papel de p73 en la protección inmunológica del cerebro.

ABSTRACT

The current pandemic requires a better understanding of the mechanisms that regulate the immune barriers of the central nervous system (CNS), especially in relation to the activation of the immune response at the barriers that protect the CNS.

This response is triggered by immune cells found in CNS (microglia) and in brain barriers: blood-brain barrier (BBB), blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier in the choroid plexus and in the meninges.

Furthermore, due to the preferential expression of the p73 protein in some of these barriers and the immunological defects in the P73 knock-out mouse (KO P73), we propose to study the expression of this transcription factor and its role in the integrity of the protective barriers of the brain, as well as to analyse the distribution and quantity of immune cells in these barriers. To address these objectives, we will use immunohistochemistry, western blotting and electron microscopy techniques (ultrastructure and immuno-gold) in postmortem formalin-fixed human brains with and without SARS-Cov2.

Confronting this scientific problem, on which there has been little research so far, may help to understand what happens at the immune barriers when the CNS is invaded by foreign agents such as the SARS-Cov2 virus, which is very present in everyone's minds, as well as the role of p73 in the immunological protection of the brain.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Protección inmunológica del cerebro

La protección inmunológica del cerebro se logra a través de las células inmunitarias de las barreras cerebrales y mediante las células residentes en el cerebro, la microglía. El papel de las barreras cerebrales para contener el virus y evitar que acceda al SNC debe explorarse más a fondo en pacientes diagnosticados con COVID-19.

1.1.1. Barreras cerebrales

Las barreras cerebrales comprenden; las **meninges**, específicamente a nivel de la membrana aracnoidea y de los vasos sanguíneos sellados en el espacio subaracnoideo. La **barrera hematoencefálica**, es quizás la barrera protectora más impenetrable debido a las estrechas uniones entre las células endoteliales y la densa capa de pies terminales astrogiales y pericitos que las rodean. La **barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (LCR)**: está constituida por los plexos coroideos. El epitelio del plexo coroideo es otra barrera protectora que contiene una gran variedad de células inmunitarias en el estroma que, a su vez, está rodeado por las células epiteliales, que formarían una barrera propiamente dicha, debido a sus uniones estrechas entre las células epiteliales, regulando el transporte de moléculas y células hacia el líquido cefalorraquídeo (LCR). **El epéndimo** es la barrera entre el LCR y el parénquima cerebral, aunque su función de barrera es bastante limitada, sin embargo, la pérdida de epéndimo está relacionada con la hidrocefalia.

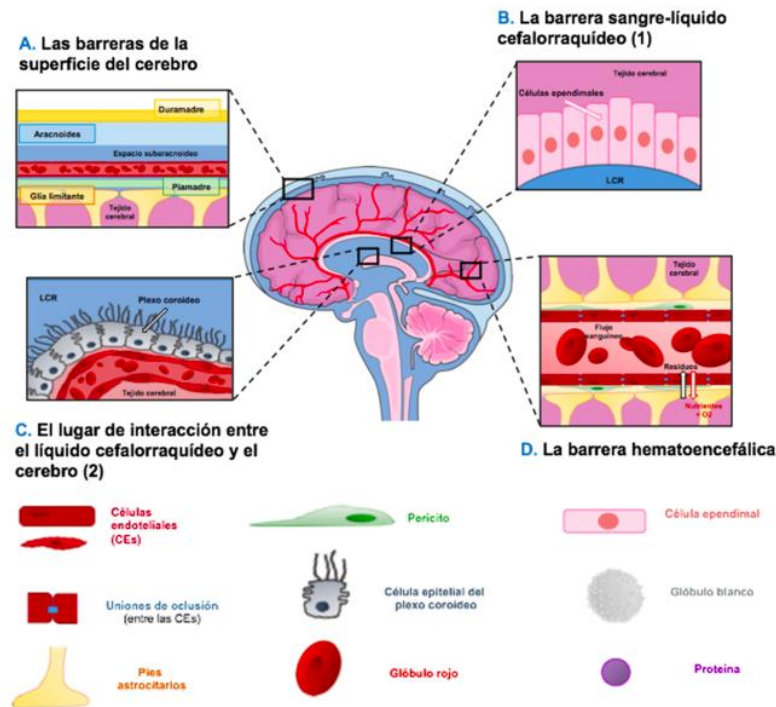


Figura 1: Esquema de las distintas barreras cerebrales y las distintas células que se encuentran en cada una de ellas. A) Meninges. B) Plexos coroideos. Interacción entre la sangre y el líquido cefalorraquídeo. C) Epéndimo. Interfaz líquido cefalorraquídeo-parénquima cerebral. D) Barrera hematoencefálica. Tomada de la página BrainBarriers4You

- **Meninges:** El parénquima cerebral está envuelto por tres membranas que en su conjunto se denominan meninges. Estas capas celulares se denominan duramadre, aracnoides y piamadre. La duramadre es la capa más externa y se encuentra adherida al cráneo. Se trata de una membrana colágena, densa y resistente que está muy vascularizada, esto permite el paso de macromoléculas procedentes de la sangre. Esta capa, contiene gran cantidad de células inmunitarias como células dendríticas (DC), mastocitos (MC), células linfoides innatas (ILC), macrófagos, células T y células B (Rua R y McGavern DB, 2018; Alves de Lima et al., 2020). La capa aracnoidea separa a la duramadre del SNC, se trata de una fina capa formada por células que crean uniones herméticas y limitan el transporte de moléculas al interior del SNC. A esta barrera se le denomina **barrera aracnoidea (BA) o barrera cerebral externa.**

La piamadre es la membrana que va contigua al parénquima cerebral, esta membrana solo permite el paso de moléculas pequeñas al interior del SNC.

Por tanto, podemos decir que las meninges son una barrera impermeable donde ocurren la mayoría de las respuestas inmunitarias y que tiene como finalidad proteger al cerebro de lesiones e infecciones.

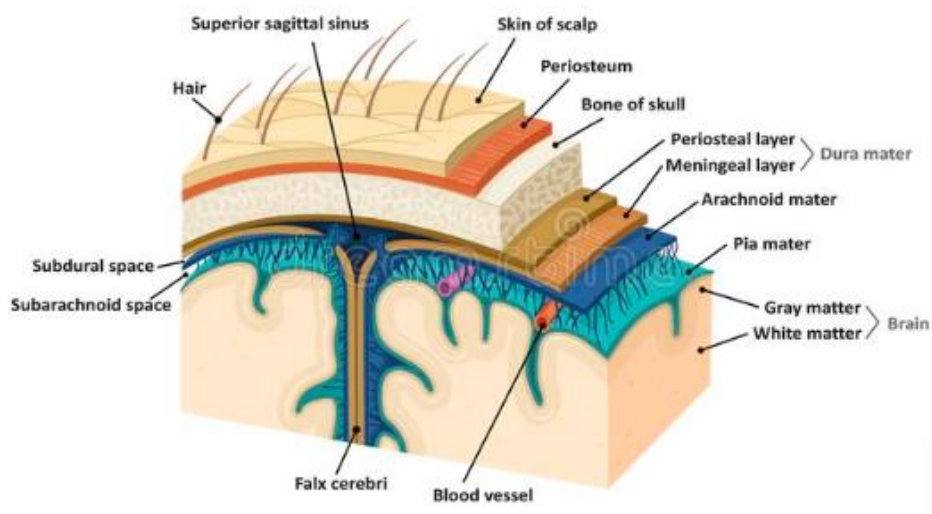


Figura 2: Ilustración donde se muestran las diferentes capas de las meninges. De más externa a más interna: duramadre, aracnoides y piamadre. Figura tomada de la página dreamstime.

- **Barrera hematoencefálica (BHE):** Se trata de una estructura distribuida por todo el parénquima cerebral que permite el intercambio de sustancias entre la circulación sanguínea y el cerebro de manera bidireccional. La BHE está constituida por tres capas; un endotelio capilar que está en contacto con la circulación sanguínea, pericitos y astrocitos. Su función principal es controlar el paso de diferentes moléculas, así como la eliminación de sustancias nocivas. Esta barrera juega un importante papel en la protección del SNC contra patógenos puesto que separa el SNC de la sangre circulante. Cuando hay un proceso inflamatorio y/o lesión vascular, aumenta la permeabilidad siendo más sencilla la entrada de las células inmunitarias (Luissint et al., 2012; Tietz y Engelhardt, 2015).

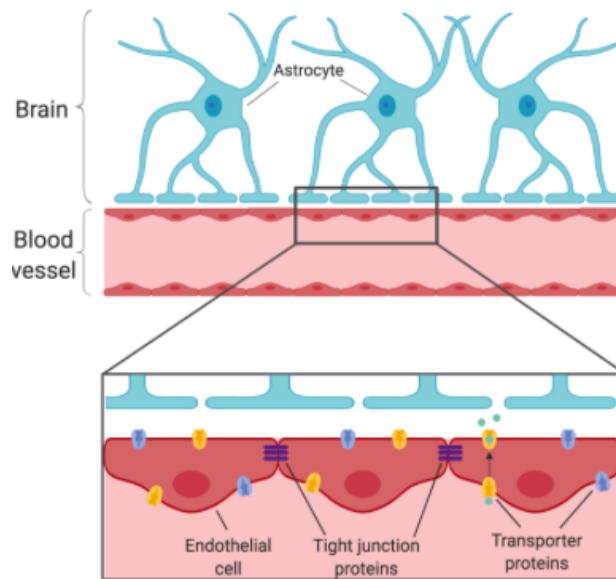


Figura 3: Barrera hematoencefálica, formada las células endoteliales unidas entre sí por tight junctions (uniones estrechas) de los capilares, rodeados por los pies astrocíticos. Tomada de Reitz, 2019.

- **Plexos coroideos (PC):** Se trata de una estructura formada por un **estroma central** que contiene capilares fenestrados y una gran variedad de células inmunitarias, como células dendríticas, mastocitos, células T CD4 + y pericitos y una capa epitelial que lo rodea, formada por células polarizadas que presentan microvellosidades y cilios en su polo apical, también denominadas células epiteliales. Las células epiteliales son p73 positivas y están conectadas por uniones estrechas y uniones en hendidura, formando una barrera protectora, conocida como: **barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCR)**, que regula el transporte de agua, proteínas, moléculas de señalización y células hacia el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Los PC se encargan de formar el líquido cefalorraquídeo (LCR) el cual tiene como misión proteger y regular el entorno interno del cerebro a través de la BSLCR. Además, los PC sirven de puerta de entrada para el tráfico de células inmunitarias hacia el LCR y proporciona una vigilancia inmunitaria continua frente a enfermedades y traumatismos por parte de las células T CD4⁺, los macrófagos y las células dendríticas.

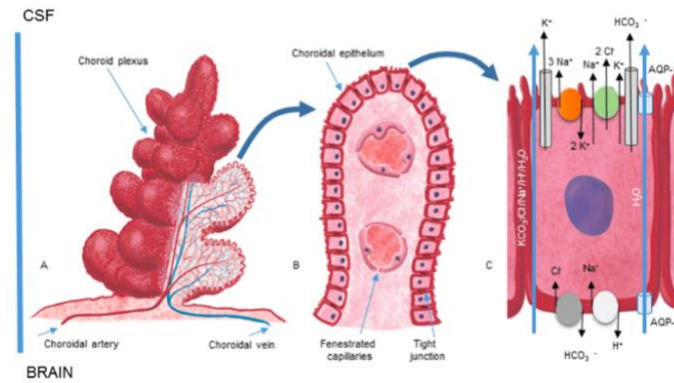


Figura 4: Plexos coroideos. A) Morfología de los plexos coroideos. B) Se puede apreciar el estroma con vasos fenestrados en su interior y en la parte más externa se disponen formando una capa, las células epiteliales de los plexos coroideos que presentan microvellosidades y cilios en su parte apical. C) Intercambio de sustancias que se da en los plexos coroideos. Figura tomada Orešković et al., 2017.

Las células inmunes que se infiltran migran, primero; desde la sangre, a través del endotelio fenestrado, hacia el espacio estromal y luego a lo largo de la superficie basolateral de las células epiteliales hasta llegar a los ventrículos cerebrales. La expresión de las moléculas de adhesión VCAM y cadherina en el epitelio de los plexos coroideos sugiere que el tráfico está controlado en gran medida por el epitelio. VCAM-1, ICAM-1 y MadCAM están activas durante la infección, lesión cerebral traumática y después de la exposición a moléculas proinflamatorias, lo que ilustra la capacidad de respuesta a los estímulos inflamatorios. Señales secretadas distribuidas en el LCR (por ejemplo; interleucina-13, interleucina-10 y factor de crecimiento transformante) atraen macrófagos a los sitios de la lesión. Normalmente se encuentran hasta 450.000 glóbulos blancos dentro del LCR de adultos sanos (0-3 células / mm³) con un ratio LCR:sangre de 1/2500 linfocitos y 1/2000 monocitos, lo que indica que las células que entran en el LCR están muy seleccionadas (Meeker et al., 2012). La mayoría de las células T en el LCR son células T de memoria central CD4 + y T CD8 +. Las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos B son escasos en el LCR de personas sanas y pueden no estar involucrados en la vigilancia inmunológica del SNC a través de los PC.

Las funciones de las células T y los monocitos que circulan en el LCR no se conocen bien hasta el momento. La expresión de VCAM-1 e ICAM en la parte luminal de las células epiteliales de los PC sugiere que las células inmunes del LCR podrían regresar al plexo coroideo, donde podrían interactuar con los macrófagos/células dendríticas residentes y/o volver a entrar a la circulación sanguínea.

- **Epéndimo:** Es una monocapa de células cuboides que cubre los ventrículos cerebrales y el conducto central de la médula espinal. Está formada por células endimarias o endimocitos, las cuales derivan de la glía y expresan altos niveles de p73. Es importante saber que las células endimarias no forman uniones estrechas ni una membrana basal. Estas células, se conectan entre sí por medio de uniones en hendidura y juegan un papel fundamental en el intercambio de sustancias entre el LCR y el parénquima cerebral dando lugar a la interfaz LCR-cerebro. Esta barrera ha sido poco estudiada y, por lo tanto, desconocemos su función. Lo que se sabe es que el movimiento de los cilios es importante para el flujo del LCR y su propulsión y que esta capa endimaria es esencial para la homeostasis del cerebro. La polaridad de sus células es clave para su función. Defectos en la polaridad de estas células o en la ciliogénesis, puede dar lugar a una acumulación anormal del LCR y a la hidrocefalia (Jiménez et al., 2014). P73 es un gen maestro en la ciliogénesis y la pérdida de p73 conduce a la pérdida del epéndimo y su sustitución por astrocitos anormales, que son incapaces de prevenir la hidrocefalia (Medina-Bolívar et al., 2014; Nemajerova et al., 2016). Todavía hay muchas preguntas sin respuesta con respecto a las funciones del epéndimo, las diversas funciones de p73 en la generación y mantenimiento de células endimarias y su relación con la hidrocefalia.

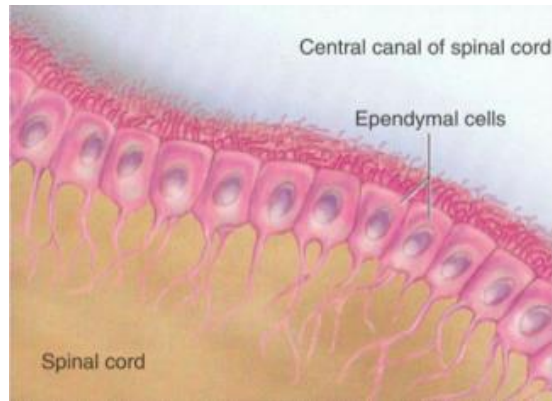


Figura 5. Epéndimo (interfaz LCR-Parénquima cerebral), formado por una monocapa de células cúbicas, llamadas células ependimarias, que presentan cilios en su parte apical, unidas entre sí por uniones en hendidura (gap junctions). Figura tomada de Swailes.

- **Microglía:** Las células microgliales son los macrófagos residentes del SNC y constituyen la primera línea de defensa inmunitaria innata en el cerebro.

Estos macrófagos interactúan con prácticamente todas las células del cerebro para mantener la homeostasis, ayudar en la reparación de tejidos lesionados o contribuir a la patología de enfermedades.

Ante una posible amenaza, se activa ya que reconoce a los patógenos y los cambios en el microambiente a través de sus receptores, los cuales reconocen las diferentes células inmunitarias (inmunoglobulinas, moléculas de adhesión, receptores de quimioquinas (CCR), receptores tipo Toll (TLR), entre otros) presentes en el SNC. Y como respuesta libera citoquinas y desencadena el estado inflamatorio (Kettenmann et al., 2011; Li y Barres, 2018).

Las células microgliales tienen dos estados principales, en reposo y activadas. En condiciones normales, la microglía está "inactiva" o "en reposo", a pesar de que vigilan constantemente el entorno local con sus finos procesos altamente ramificados que están en constante movimiento y contactan activamente con otros componentes neurales. Cuando la microglía en reposo detecta señales o moléculas potencialmente

peligrosas experimentan un cambio morfológico y funcional en ameboide, microglía activada, caracterizada por un cuerpo celular redondo con cortos y grueso pseudópodos que les permiten moverse activamente hacia la lesión o hacia los invasores infecciosos mediante gradientes quimiotácticos. La microglía activada puede inducir la muerte celular a través de la activación del receptor de NMDA seguida de la regulación positiva de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la secreción de múltiples factores inflamatorios y citotóxicos (Kettenmann et al., 2011). Esto puede resultar en un aumento de la permeabilidad de la BHE y la migración de células inmunes desde la periferia al SNC. La microglía también fagocita los detritos celulares y los agregados de proteínas citotóxicas, limpiando el espacio extracelular. Las etapas finales de la fagocitosis son la absorción y la digestión.

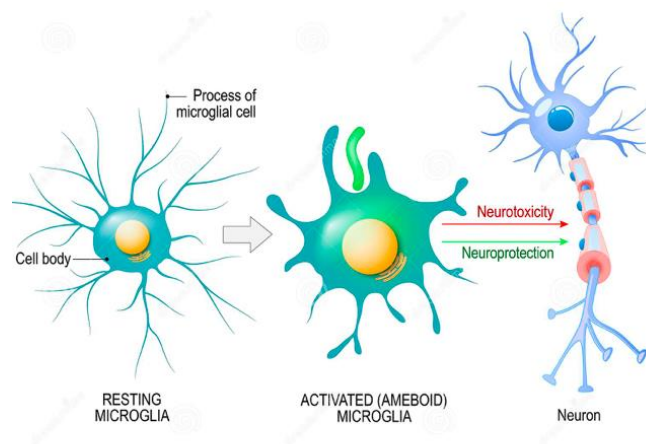


Figura 6: Cambio morfológico que sufre una célula microglial cuando detecta moléculas peligrosas. La primera célula se encuentra en estado de reposo o inactiva mientras que la segunda célula, en estado activado, ha cambiado su conformación a ameboide. Figura tomada de la página dreamstime.

1.2. Proteína p73

p73 es una proteína que, junto con la p63, pertenecen a la familia de proteínas de p53. Estas proteínas, juegan un papel fundamental en las células pues regulan muchos procesos biológicos como la diferenciación, la proliferación y la apoptosis celular (Kaghad et al., 1997).

Todos los miembros de la familia poseen 5 dominios en su estructura:

1. Dominio de unión al ADN (DBD): Reconoce y se une a los genes diana.
2. Dominio de transactivación (TA): Se une a otros genes diana y activa su transcripción.
3. Dominio de oligomerización (OD): Es una región capaz de unirse a proteínas similares y producir tetrámeros funcionales.
4. Dominio de transactivación (TID): Inhibe la actividad transcripcional de TA.
5. Dominio SAM (Sterile alpha motif): Interacciona con otras proteínas, creando un dominio proteína-proteína y regula el desarrollo de estas.

Es importante saber que este gen es bifuncional, pues posee dos isoformas proteicas con funciones opuestas. TAp73 es la isoforma completa e incluye el dominio de transactivación. Si se unen a genes diana de p53, van a inducir la apoptosis. Sin embargo, la isoforma Δ Np73 está truncada puesto que no posee el dominio de transactivación y por tanto tendrá actividad anti-apoptótica (Yang et al, 2000).

La proteína tumoral y factor de transcripción p73 se expresa en altos niveles en el epéndimo, donde actúa como gen maestro de la ciliogénesis y en los plexos coroideos, pudiendo ser secretado al LCR (Medina-Bolívar et al., 2014; Nemajerova et al., 2016). Durante el desarrollo, p73 también se expresa en las células de Cajal-Retzius, que están próximas a la membrana basal de la pia madre, cerca de la barrera aracnoidea (Meyer et al., 2002).

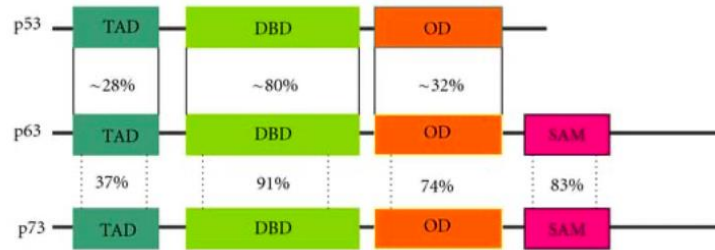


Figura 7: Dominios funcionales de las proteínas de la familia p53. Los miembros de la familia p53 contienen el dominio de transactivación (TAD), el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de oligomerización (OD). Sin embargo, p73 y p63 codifican un dominio adicional, el motivo alfa estéril (SAM). Se muestran los porcentajes de homología de los residuos entre p53, p63 y p73. Tomado de Wei et al.,2012.

El ratón knock-out p73 (KO p73) tiene un fenotipo complejo, caracterizado por pérdida de las células de Cajal-Retzius, malformaciones cerebrales, hidrocefalia e inmunodeficiencia con inflamaciones crónicas (Yang et al, 2000; Medina-Bolivar et al., 2014; Meyer & González-Gómez, 2018, Báez-Ferrer 2020).

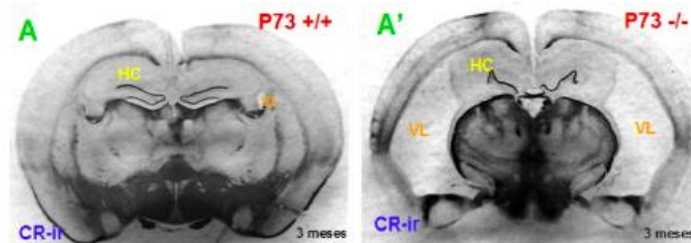


Figura 8: Cortes coronales de un cerebro de un ratón WT (p73+/+) y un ratón KO p73 (p73 -/-). Se puede observar la grave hidrocefalia que presenta el ratón KO p73, mostrando una dilatación muy marcada de los ventrículos laterales (A'). Imágenes obtenidas en nuestro laboratorio.

1.3. SARS-CoV-2 en el cerebro

La enfermedad COVID-19, causada por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), es una patología infectocontagiosa predominantemente respiratoria; no obstante, la evidencia creciente indica que la enfermedad no se limita al tracto respiratorio, sino que también puede afectar a otros sistemas, incluyendo el sistema nervioso, además, este nuevo coronavirus tiene propiedades neuroinvasivas.

El SARS-CoV-2 y sus interacciones con el SNC son de gran importancia para la comprensión de los eventos fisiopatológicos que explican las manifestaciones clínicas y complicaciones neurológicas de la COVID-19. Sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos por los cuales el virus SARS-CoV-2 accede al cerebro y muchas veces son meras extrapolaciones en relación con otros virus neurotrópicos.

La mayoría de los virus no cruzan las barreras cerebrales de los mamíferos o no tienen acceso al sistema nervioso. Sin embargo, existen importantes excepciones en las que los virus entran al sistema nervioso y esa entrada es la base o una contribución a sus efectos sobre la función del sistema nervioso. En algunos casos, los efectos de un virus en el SNC son muy leves, en otros casos los efectos sobre el SNC son parte de un síndrome mayor (por ejemplo, VIH-1), y en otros casos, los efectos sobre el SNC pueden producir un síndrome tan significativo como para definir los peores resultados del virus (rabia, sarampión). Dónde se encuentra el SARS-CoV-2 en este espectro es todavía una incógnita.

1.3.1. Estructura del SARS-CoV-2

Podemos definir a los coronavirus como virus encapsulados de ARN monocatenario de sentido positivo, con un genoma de 26 a 32 kilobases (kb). (Huang et al., 2020; Schoeman et al., 2020; Corman et al., 2012b; Su et al., 2016; Li, F. 2013).

El SARS-CoV-2 genéticamente es muy similar al SARS-CoV y al MERS-CoV. Consta de 4 proteínas estructurales: las proteínas de la envoltura (E), proteínas de membrana (M), proteínas de la nucleocápside (N) y las denominadas proteínas S o de espiga, que le confieren forma de corona. (Wu et al., 2020^a,2020^b; Rabaan A et al.,2020; Wan Y et al.,2020; Wrapp D et al.,2020; Neuman et al. 2011).

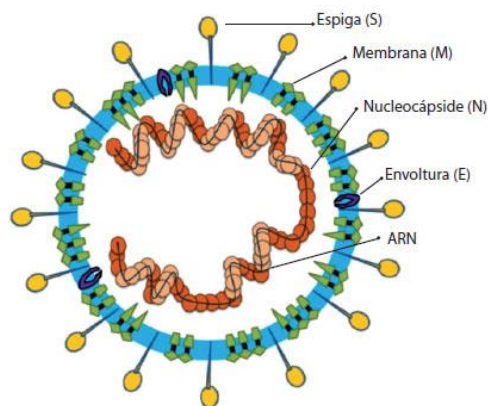


Figura 9: Estructura del virus SARS-Cov 2. El virus posee una nucleocápside compuesta de ARN genómico y la proteína de la nucleocápside (N) cubierta por glucoproteínas con forma de espiga (S). La proteína de membrana (M) y la proteína de envoltura (E) se encuentran entre las proteínas S en la envoltura del virus. Modificado de Li et al.,2020.

La proteína S, consta de dos subunidades (S1 y S2) que son las responsables de la adhesión y posterior entrada del virus a la célula huésped. De modo que, durante el proceso de entrada del virus, utiliza el dominio de unión al receptor (RBD) que se encuentra en la subunidad S1 para poder unirse al receptor de la membrana de la célula huésped, es decir el receptor ACE2.

Por otro lado, la subunidad S2 es escindida por una serina proteasa de transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), provocando un cambio conformacional e irreversible, consiguiendo así, la entrada a la célula por endocitosis. (Walls AC et al., 2020; Wrapp D et al.2020) Una vez en el interior de la célula, el ARN viral es liberado para iniciar su replicación, traducción y posterior ensamblaje. Finalmente, los viriones maduros saldrán de la célula huésped por exocitosis.

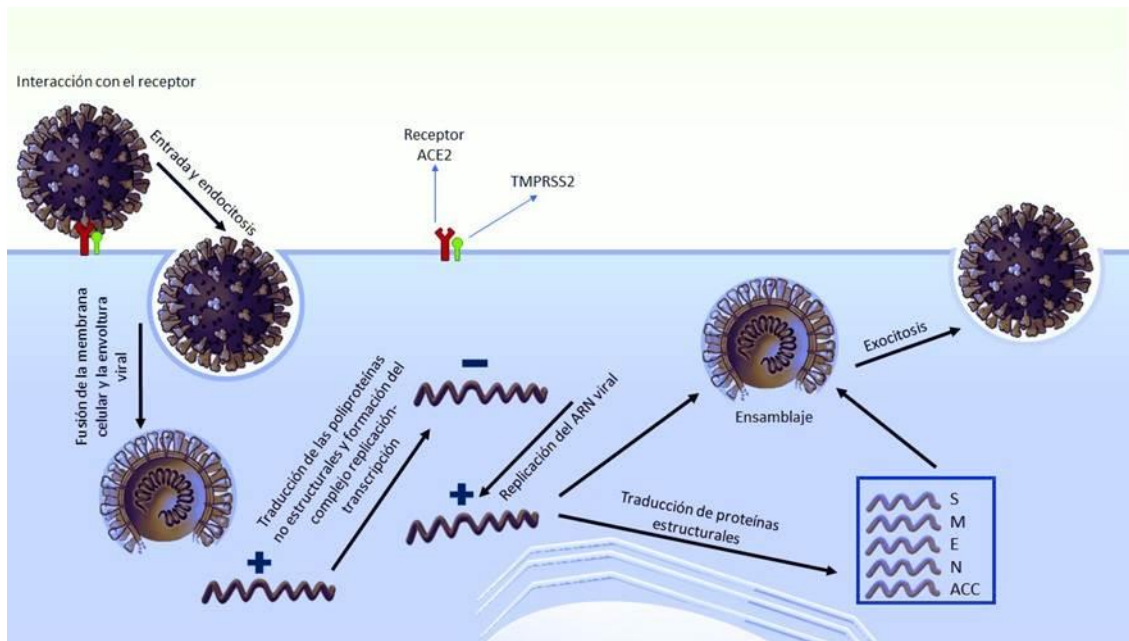


Figura 10: Ciclo de replicación viral del SARS-CoV-2. Tomado de Gómez-Tejera, 2020.

1.3.2. Vías de entrada al SNC

Se han propuesto dos vías principales de entrada al SNC de los virus respiratorios neurotrópicos: ruta neuronal retrógrada y hematogena.

En la actualidad, no está claro el mecanismo de neuroinvasión específico del SARS-CoV-2. Sin embargo, se sabe que el SARS-CoV-2 usa la enzima ACE2 y TMPRSS2 como receptores por los que entrar en las células.

- **Diseminación neuronal retrógrada:** Algunos virus llegan al cerebro al infectar los nervios periféricos y luego se propagan al cerebro mediante un proceso denominado transmisión nerviosa retrógrada.

Los virus que entran al cerebro directamente desde las fosas nasales utilizan el nervio olfatorio que se extiende más allá de la placa cribiforme hacia los conductos nasales y el nervio trigémino que se proyecta a las paredes de los conductos nasales. Chou y Dix afirman que estas vías "se consideran de importancia secundaria" y "se limitan principalmente a infecciones adquiridas en circunstancias inusuales". El coronavirus de ratón puede entrar en el cerebro a través de los nervios olfatorio y

trigémino (Perlman et al., 1990). Dado que el SARS-CoV-2 se distribuye por las vías respiratorias que produce síntomas como anosmia, hiposmia e hipogeusia entre otros (Yachou et al., 2020; Céspedes et al., 2020), el nervio olfativo podría ser una de las vías de propagación en el SNC, sin embargo, aún no se ha demostrado.

Por otro lado, también se ha planteado la hipótesis de que el virus podría propagarse al bulbo raquídeo en el tronco encefálico a través de la infección de los receptores olfativos en el neuroepitelio. La infección del tronco encefálico podría dañar las células quimiosensibles asociadas con los centros respiratorios y cardiovasculares, que conducirían a una insuficiencia respiratoria aguda (Ceccarelli et al, 2020).

- **Vía hematogena:** Esta vía incluye a las barreras; hematoencefálica (BHE) y sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCR) (plexos coroideos), pudiéndose ver afectadas por el SARS-Cov2, aunque, actualmente, no hay ningún estudio realizado sobre los mecanismos por los cuales el SARS-CoV-2 ingresa al SNC. Sin embargo, existen estudios sobre: la capacidad de la proteína S1 para cruzar la BHE murina (Rhea et al., 2021), la aparición de virus vivos en cerebros de ratones después de inducir la infección (Song et al., 2021; Virhammar et al., 2020; Sun et al., 2020), y el análisis de tejido cerebral humano y/o LCR que sugiere que puede producirse una entrada en el cerebro o una infección (Matschke et al., 2020; Solomon et al., 2020; Song et al., 2021; Trypsteen et al., 2020; Paniz-Mondolfi et al., 2020).

Además, recientemente, se ha detectado la expresión de ACE2 en los capilares cerebrales y en células endoteliales microvasculares y en las células epiteliales de los plexos coroideos del cerebro humano cultivadas *in vitro* (Nascimento Conde et al., 2020). Otros estudios *in vitro* demostraron que la proteína espiga del SARS-CoV-2 puede inducir una respuesta proinflamatoria de las células endoteliales del cerebro, que puede provocar cambios en el funcionamiento de la BHE (Buzhdygan et

al., 2020). Estas evidencias sugieren que el SARS-CoV-2 puede usar células endoteliales cerebrales para cruzar la BHE y las células epiteliales coroideas de la BSLCR para pasar al LCR, invadiendo finalmente el SNC, pero para confirmar esto aún se necesitan más pruebas. Por otro lado, en comparación con adultos sanos, los pacientes infectados con SARS-CoV-2 tienen niveles más altos de IFN- γ , TNF- α y VEGF, entre otros (Huang et al., 2020). Estas citocinas tienen un cierto efecto destructor de la barrera, pero no está claro si la inflamación sistémica inducida por el SARS-CoV-2 cambia la permeabilidad de la BHE, facilitando la neuroinvasión.

Los virus que cruzan la BHE lo pueden hacer por tres vías:

1. Migración transcelular: Mediante este mecanismo, el SARS-CoV-2 se puede unir a los receptores ACE2 del endotelio, alterando la BHE y produciendo un aumento de permeabilidad de la barrera debido a la liberación de mediadores inflamatorios, consiguiendo una posterior entrada al SNC.
2. Migración paracelular: Por esta vía, el virus puede invadir las uniones estrechas formadas por las células endoteliales de la BHE.
3. "Caballo de Troya": El virus podrá ser fagocitado por neutrófilos o macrófagos procedentes del torrente circulatorio, traspasando la barrera hematoencefálica.

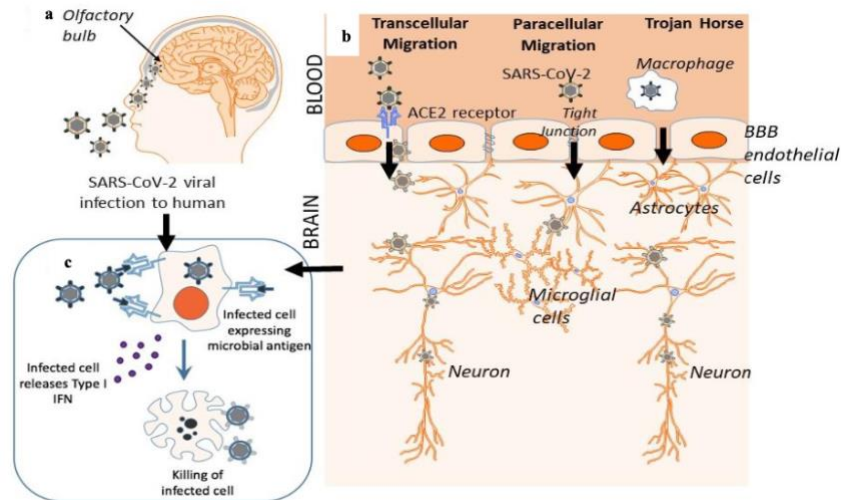


Figura 11: Diferentes vías de entrada del SARS-CoV-2 al SNC. A) Diseminación neuronal retrógrada. B) Vía hematogena. Tomada de Achar et al., 2020.

1.4. Manifestaciones neurológicas

Se ha asociado una amplia gama de complicaciones neurológicas con la infección por el SARS-CoV2. Entre los síntomas neurológicos más prevalentes están: dolor de cabeza, anosmia y disgeusia, estos síntomas suelen resolverse con el tiempo en la mayoría de los casos leves. Sin embargo, también puede cursar con complicaciones neurológicas más graves como; alteración de la conciencia, eventos cerebrovasculares, encefalopatía/encefalitis, encefalomiелitis aguda diseminada, síndrome de Guillain-Barré, convulsiones, delirio, síndrome similar a la demencia y desórdenes psiquiátricos que incluyen psicosis, catatonia y manía.

Existe también un fenómeno de secuelas crónicas de COVID-19 que afecta a una proporción de personas infectadas, actualmente denominado "COVID prolongado" que incluye síntomas neurológicos. Las manifestaciones neurológicas de la infección por SARS-CoV-2 podrían atribuirse a efectos del virus en el sistema nervioso, enfermedad para- o post-infecciosa mediada por el sistema inmunológico, coagulopatías y/o complicaciones de enfermedades críticas.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El sistema nervioso central está protegido por tres principales sistemas de barrera inmunológica denominados colectivamente como las barreras cerebrales, que comprenden la barrera sangre-parénquima cerebral (BHE), sangre-LCR (BSLCR) en el plexo coroideo y la barrera cerebral externa formada por las células de la barrera aracnoidea (BA).

La principal célula inmunitaria innata del cerebro es la microglía. Juntos, evitan la entrada de toxinas en sangre y patógenos exógenos a través de conjuntos específicos de células inmunitarias. Las uniones estrechas (tight junctions) son las responsables de la función de barrera y se localizan en las barreras: BHE, BSLCR y BA.

Además, existe otra barrera entre el LCR y el parénquima cerebral cuyas células endoteliales están conectadas mediante uniones en hendidura (gap junctions) que permiten la difusión de fluidos y moléculas más grandes. Nuestra proteína de elección de este proyecto es la proteína tumoral p73, una proteína multifuncional involucrada en muchos aspectos de las funciones del SNC. Sorprendentemente, tiene una alta expresión en la BSLCR y en el epéndimo. Además, se expresa también en las células de Cajal-Retzius de la corteza en desarrollo, adyacentes a la BA. Sobre la base de este patrón de expresión, planteamos la hipótesis de que la proteína p73 puede estar involucrada en el mantenimiento de las barreras protectoras del SNC.

Nuestros objetivos, por lo tanto, serán estudiar la integridad de las barreras cerebrales y los sistemas de células inmunitarias en relación con la expresión de p73, en cerebros humanos postmortem de autopsias con y sin SARS-Cov2, con la esperanza de contribuir con datos novedosos sobre un sistema que en la pandemia actual es un desafío.

3. OBJETIVOS

3.1. Análisis de la integridad de las distintas barreras cerebrales y su relación con la expresión de p73 y las proteínas de unión en cerebros humanos postmortem con y sin neuroinvasión por SARS-Cov2.

3.2. Estudio comparativo de tipos de células inmunocompetentes (expresión de proteínas, su número y distribución) y proteínas pro y anti-inflamatorias en los diversos sistemas de barrera (BHE, BSLCR, BA, Epéndimo) del SNC, en cerebros humanos postmortem con y sin SARS-Cov2.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Muestras de cerebros humanos

Usaremos muestras de cerebros humanos postmortem con y sin neuroinvasión por SARS-Cov2, procedentes del Instituto Anatómico Forense de Tenerife fijados por inmersión en PFA 4% (24-48 h) mediante el protocolo de acción para SARS-CoV2, que combina la protección de la seguridad de los trabajadores con la optimización de la recolección de tejidos (González-Arnay et al., 2020). Las muestras serán incluidas en parafina para ser, posteriormente, cortadas en un microtomo a 10 μ ms.

4.2. Tinciones topográficas

-Hematoxilina-Eosina: Los cortes se tienen que sumergir en la Hematoxilina para, posteriormente, ser lavados con agua corriente y sumergidos en Eosina.

- Violeta de cresilo: Éste es un colorante acidófilo que tiñe el núcleo celular y el retículo endoplasmático rugoso (sustancia de Nissl). Los cortes de cerebro se tienen que sumergir en violeta de cresilo al 1%, previo calentamiento hasta unos 60°C, para posteriormente lavarlos en agua destilada (durante 1 minuto) y sumergirlos en etanol al 70° mezclado con ácido acético.

4.3. Inmunohistoquímica, confocal y microscopía electrónica

El análisis inmunohistoquímico se realizará sobre cortes previamente desparafinado de acuerdo con protocolos rutinarios de nuestro equipo de

Barreras inmunitarias y p73 en cerebros humanos postmortem neuroinvasidos por SARS-Cov 2.

investigación (González-Gómez y Meyer G, 2014). La visualización del marcaje con inmunofluorescencia se llevará a cabo mediante el microscopio confocal así como, la inmunoperoxidasa mediante el revelador diaminobenzidina (DAB) y microscopio convencional. Para la cuantificación del marcaje se utilizará la aplicación Image-J.

Para el análisis de microscopía electrónica las muestras serán fijadas con PFA4% y glutaraldehido. Para la inmuno-oro los cortes se incubarán los anticuerpos contra la proteína S1 del SARS-Cov2 antes de contrastarlos con acetato de uranilo, para la detección de virus y para el estudio ultraestructural de las barreras cerebrales usaremos tetróxido de osmio.

5. CONCLUSIONES

En base a la bibliografía estudiada, podemos concluir que:

- 1) Las barreras cerebrales se pueden ver alteradas por la neuroinvasión del virus SARS-CoV-2, aunque aún no está comprobado en humanos y debe explorarse más a fondo en pacientes diagnosticados con COVID-19.
- 2) La alteración de la estructura y función de las uniones estrechas que hay entre las células que forman las barreras, así como la inflamación inducida por la exposición viral; pueden dar lugar a la disrupción de las barreras cerebrales y, por lo tanto, a la entrada de células y virus al SNC.
- 3) Los mecanismos de interacción del SARS CoV-2 con las barreras cerebrales pueden contribuir a la disfunción neurológica asociada con la enfermedad COVID-19.
- 4) Para concluir, hemos creado este proyecto con el fin de estudiar cómo se ven afectadas las barreras inmunitarias en cerebros humanos postmortem procedentes de autopsias y las posibles alteraciones del factor de transcripción p73, por su implicación en la integridad de algunas barreras.

6.REFERENCIAS:

1. Achar A, Ghosh C. COVID-19-Associated Neurological Disorders: The Potential Route of CNS Invasion and Blood-Brain Barrier Relevance. *Cells*. 2020; 9(11): 2360.doi:10.3390/cells9112360
2. Ahmadi-rad, N., Ghasemi, Z. COVID-19 and Central Nervous System: Entry Routes and Probable Dam- ages. *Basic and Clinical Neuroscience*, 2020 Jul 8. 11 (2) :217-224. doi:10.32598/bcn.11. covid19.2360.1
3. Alves de Lima K, Rustenhoven J, Kipnis J. Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease. *Annu Rev Immunol*. 2020 Apr 26; 38:597-620. doi: 10.1146/annurev-immunol-102319-103410.
4. Báez Ferrer, Implicación de las acuaporinas en la hidrocefalia en modelos de ratón deficiente de p73,2020.
5. Barrantes J.F. Central nervous system targets and routes for SARS-CoV-2: Current views and new hypotheses. *ACS Chemical Neuroscience* 2020 11 (18), 2793-2803. doi: 10.1021/acscchemneuro.0c00434
6. Buzhdygan TP, DeOre BJ, Baldwin-Leclair A, et al. The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in vitro models of the human blood-brain barrier. *bioRxiv* 2020.
7. Cortical hypoplasia and ventriculomegaly of p73-deficient mice: Developmental and adult analysis. *J Comp Neurol*. 2014 Aug 1;522(11):2663-79. doi: 10.1002/cne.23556. Epub 2014 Apr 3.
8. González- Marrero I, Hernández-Abad L:G, Castañeyra-Ruiz L, et al., Variaciones de los plexos coroideos y las barreras cerebrales en la hipertensión arterial y el envejecimiento, *Neurología*, 2018, Jul, 27. ISSN 0213-4853. doi: 10.1016/j.nrl.2018.06.001.
9. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395: 497–506.
10. Huang J, Zheng M, Tang X, et al. Potential of SARS-CoV-2 to cause CNS infection: Biologic fundamental and clinical experience. Review Experience. *Front. Neurol*. 11:659. doi:10.3389/fneur.2020.00659

11. Jiménez AJ, Domínguez-Pinos MD, Guerra MM, Fernández-Llebrez P, Pérez-Fígares JM. Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Review Tissue Barriers*. 2014 Mar 19;2: e28426. doi: 10.4161/tisb.28426.
12. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan J C, et al., Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):809-19. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80540-1.
13. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Review Physiol Rev*. 2011 Apr;91(2):461-553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
14. Li Q, Barres BA. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Review Nat Rev Immunol*. 2018 Apr;18(4):225-242. doi: 10.1038/nri.2017.125. Epub 2017 Nov 20.
15. Lima, M., Siokas, V., Aloizou, AM. *et al.* Unraveling the Possible Routes of SARS-COV-2 Invasion into the Central Nervous System. *Curr Treat Options Neurol* 22, 37 (2020). doi.10.1007/s11940-020-00647-z
16. Luissint, A.C.; Artus, C.; Glacial, F.; Ganeshamoorthy, K.; Couraud, P.O. Tight junctions at the blood brain barrier: Physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 2012, 9, 23.
17. Lun MP, Monuki ES, Lehtinen MK. Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat Rev Neurosci*. 2015 Aug;16(8):445-57. doi: 10.1038/nrn3921.
18. Matschke, J.; Lutgehetmann, M.; Hagel, C.; Sperhake, J.P.; Schroder, A.S.; Edler, C.; Mushumba, H.; Fitzek, A.; Allweiss, L.; Dandri, M.; et al. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: A post-mortem case series. *Lancet Neurol*. 2020, 19, 919–929.
19. Medina-Bolívar C, González-Arnay E, Talos F, González-Gómez M, Moll UM, Meyer G, Meeker RB, Williams K, Killebrew DA, Hudson LC. Cell trafficking through the choroid plexus. *Cell Adh Migr*. Sep-Oct 2012;6(5):390-6. doi: 10.4161/cam.21054.
20. Meinhardt, J., Radke, J., Dittmayer, C. *et al.* Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat Neurosci* 24, 168–175 (2021). doi.10.1038/s41593-020-00758-5

21. Meyer G & González-Gómez M. The heterogeneity of human Cajal-Retzius neurons. *Semin Cell Dev Biol.* 2018 Apr; 76:101-111. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.059.
22. Meyer G, Perez-Garcia CG, Abraham H, Caput D. Expression of p73 and Reelin in the developing human cortex. *J Neurosci.* 2002 Jun 15;22(12):4973-86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-12-04973.2002.
23. Nascimento Conde, J.; Schutt, W.R.; Gorbunova, E.E.; Mackow, E.R. Recombinant ACE2 Expression Is Required for SARS-CoV-2 To Infect Primary Human Endothelial Cells and Induce Inflammatory and Procoagulative Responses. *mBio* 2020, 11, eabe5575.
24. Nemajerova A, Kramer D, Siller SS, Herr C, Shomroni O et al., TAp73 is a central transcriptional regulator of airway multiciliogenesis. *Genes Dev.* 2016 Jun 1;30(11):1300-12. doi: 10.1101/gad.279836.116.
25. Orešković A, Radoš M, Klarica M, Role of choroid plexus in cerebrospinal fluid hydrodynamics, *neuroscience.*2017 apr, 0306-4522,,doi: 10.1016/j
26. Paniz-Mondolfi, A.; Bryce, C.; Grimes, Z.; Gordon, R.E.; Reidy, J.; et al. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J. Med. Virol.* 2020, 92, 699–702.
27. Perlman, S.; Evans, G.; Afifi, A. (1990). Effect of olfactory bulb ablation on spread of a neurotropic coronavirus into the mouse brain. *J. Exp. Med.* 172, 1127–1132.
28. Rhea, E.M.; Logsdon, A.F.; Hansen, K.M.; Williams, L.M.; Reed, M.J.; et al. The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood-brain barrier in mice. *Nat. Neurosci.* 2021, 24, 368–378.
29. Rua R, McGavern DB. Advances in Meningeal Immunity. *Trends Mol Med.* 2018 Jun;24(6):542-559. doi: 10.1016/j.molmed.2018.04.003. Epub 2018 May 3. DOI: 10.1016/j.molmed.2018.04.003
30. Sáenz, J., Tatis, K., Bohórquez, J., Guzmán, R. (2021). Aspectos fisiopatológicos y manifestaciones neurológicas asociadas a la infección por SARS-CoV-2/COVID- 19. *Revista Ciencias Biomédicas*, 10(1), 39-54.
31. Solomon, I.H.; Normandin, E.; Bhattacharyya, S.; Mukerji, S.S.; Keller, K.; et al. Neuropathological Features of Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020, 383, 989–992.

32. Song, E.; Zhang, C.; Israelow, B.; Lu-Culligan, A.; Prado, A.V.; et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J. Exp. Med.* 2021, 218.
33. Sun, S.H.; Chen, Q.; Gu, H.J.; Yang, G.; Wang, Y.X.; et al. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host Microbe* 2020, 28, 124–133.
34. Tietz, S.; Engelhardt, B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J. Cell Biol.* 2015, 209, 493–506
35. Trypsteen, W.; Van Cleemput, J.; Snippenberg, W.V.; Gerlo, S.; Vandekerckhove, L. On the whereabouts of SARS-CoV-2 in the human body: A systematic review. *PLoS Pathog.* 2020, 16, e1009037.
36. Virhammar, J.; Kumlien, E.; Fallmar, D.; Frithiof, R.; Jackmann, S.; et al. Acute necrotizing encephalopathy with SARS-CoV-2 RNA confirmed in cerebrospinal fluid. *Neurology* 2020, 95, 445–449.
37. Wei J, Zaika E, Zaika A. (2012). *p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer*. *J Nucleic Acids* (9) 1-19.
38. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, et al., p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*. 2000 Mar 2;404(6773):99-103. doi: 10.1038/35003607.