



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENDO

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA BIOFISICA Y NEUROCIENCIAS

“Participación de STAT2 en la regulación de la integridad de la barrera
hematoencefálica”

TESIS

Que presenta

CAROLINA IVONNE SERRANO GARCÍA

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. Porfirio Nava Domínguez

Dr. Benjamín Florán Garduño

México, D.F.

AGOSTO 2015

A mis padres:
Gilberto Serrano Callejas
Mercedes García Valencia

A mis hermanas:
Alba Jazmín Serrano García
Claudia Nayeli Serrano García



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Agradecimiento especial al CONACYT por todas las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Porfirio Nava Domínguez

Por la confianza y el apoyo brindado para la realización de este proyecto de tesis, gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

Dr. Benjamín Florán Garduño

Por el apoyo brindado y guía en la realización de esta tesis.

Dr. José C. Luna Muñoz

Gracias por su apoyo, su guía, sus consejos. Por los comentarios y aportaciones en mejora de este trabajo.

Al jurado de la presente tesis

Por la atención prestada, por su guía, sus consejos y comentarios, con el fin de enriquecer el trabajo y apoyar mi crecimiento profesional.

Dr. José Antonio Gilberto Arias Montaña

Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño

Dr. Dr. Michael Schnoor

Un agradecimiento especial al **Dr. Marco Antonio Meraz Rios** quien donó los animales empleados en este trabajo.

A mi padre

Por enseñarme que siempre es posible, aun cuando creemos lo contrario. Gracias por tu apoyo, por impulsarme, por motivarme, por creer en mí aun cuando yo dejaba de hacerlo.

A mi madre

Por tu fortaleza, tus consejos, tu amor incondicional. Por sostenerme y guiarme siempre.

A mis hermanas

Por darme tantos momentos de alegría y compartir conmigo cada paso en la vida. Las amo.

Juan Carlos

Por acompañarme en esta aventura, por estar conmigo cuando más lo necesité. Por ayudarme a crecer, por hacer de esto algo mejor.

Dulce

Gracias por ser mi gran apoyo, por ser como una hermana y estar conmigo siempre.

Itzel y Toño

Gracias por su amistad incondicional y sus consejos. Gracias por motivarme a ser mejor.

Aurora

Por tus consejos, por compartir tu experiencia y tiempo con el fin de mejorar. Muchas gracias.

A los integrantes del laboratorio

Mauricio, Azucena, Diego, Dimelza, gracias por su apoyo.

A mis amigos y compañeros de la maestría.

Gracias por ser mis cómplices, maestros, amigos... porque sin ustedes esto no habría sido igual.

Los experimentos realizados en este trabajo se llevaron a cabo en el laboratorio 41 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV bajo la dirección de:

Dr. Porfirio Nava Domínguez

Dr. Benjamín Florán Garduño

INDICE DE CONTENIDO

I.	ANTECEDENTES	
1.1	La barrera hematoencefálica.....	1
1.2	Deterioro de la barrera hematoencefálica por inflamación.....	2
1.3	STAT como regulador de la señalización en inflamación.....	4
1.4	mTOR como regulador de la función de barrera.....	5
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
III.	HIPOTESIS.....	8
IV.	OBJETIVOS	
4.1	Objetivo general.....	8
4.2	Objetivos particulares.....	8
V.	METODOLOGIA	
5.1	Animales.....	9
5.2	Tratamiento con DSS.....	9
5.3	Tratamiento con inhibidores de mTOR.....	9
5.4	Inmunofluorescencia.....	9
5.5	Aislamiento de capilares cerebrales para western blot.....	10
5.6	Western blot.....	11
5.7	Ensayo para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.....	12
VI.	RESULTADOS	
6.1	Genotipificación de ratones knockout de STAT2.....	13
6.2	La eliminación de STAT2 induce a disminución de β -catenina y ZO-1 y aumenta a la claudina-5 en los capilares cerebrales.....	13
6.3	La eliminación de STAT2 no incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al azul de Evans.....	16
6.4	mTOR regula los niveles de claudina-5 en la barrera hematoencefálica.....	17
6.5	Efecto de la inflamación periférica en la permeabilidad e integridad de la barrera hematoencefálica.....	18
VII.	DISCUSION.....	20
VIII.	CONCLUSIONES.....	22
IX.	PERSPECTIVAS.....	23
X.	BIBLIOGRAFIA.....	24

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia.

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados para western blot.

Figura 1. Vía de señalización de mTOR.

Figura 2. Genotipificación de ratones knockout de STAT2.

Figura 3. Evaluación de las proteínas de la unión endotelial en la BHE de ratones knockout de STAT2.

Figura 4. Modificaciones de las proteínas de unión endotelial en capilares cerebrales de ratones knockout de STAT2.

Figura 5. La ausencia de STAT2 no altera la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Figura 6. La inhibición de mTORC1 revierte el incremento de claudina-5 en los ratones knockout de STAT2.

Figura 7. Efecto de la inflamación periférica en la integridad de la BHE.

AVREVIATURAS

BCA: Bicinchoninic acid

BHE: Barrera hematoencefálica

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DSS: Dextran sulfato de sodio

IL-6: Interleucina 6

IL-1 β : Interleucina 1 beta

INF γ : Interferon gamma

JAK: Janus quinasas

JAM: Junctional adhesion molecule

mTOR: Mechanistic Target Of Rapamycin

mTORC1: Mammalian target of rapamycin complex 1

mTORC2: Mammalian target of rapamycin complex 2

PI3K: Fosfatidilinositol- 3-kinasa

PKC α : Proteína cinasa C-alfa

pS6: Phospho-S6 Ribosomal Protein

SGK1: Serine/threonine-protein kinase

SNC: Sistema nervioso central

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TSC: Tuberous sclerosis complex

UA: Unión adherente

UE: Unión estrecha

ZO: Zonula occludens

RESUMEN

La Barrera Hematoencefálica (BHE) está formada por células endoteliales, unidas entre sí por proteínas de la unión adherente y proteínas de la unión estrecha, las cuales confieren una alta selectividad y baja permeabilidad. Procesos inflamatorios neuronales y periféricos han sido relacionados directamente con una disminución de las proteínas de unión estrecha en la BHE y pérdida de su función. Uno de los moduladores inflamatorios que regula de forma importante la estabilidad de la barrera hematoencefálica es el interferón gama (IFN γ) a través del incremento en la expresión de proteínas como ZO-1, ocludina y claudina-5 en las células endoteliales. Los efectos ejercidos por el IFN γ sobre la BHE pueden deberse a la activación de la vía JAK/STAT. En este trabajo evaluamos cuál es la función de STAT2 en la conservación de la integridad de la BHE. Para ello empleamos ratones C57Bl/6J silvestres y knockout de STAT2. La determinación de las proteínas de unión endotelial fue realizada por inmunofluorescencia y western blot de los capilares cerebrales, mientras que la función de la BHE fue determinada por la inyección intravenosa de azul de Evans. Los resultados obtenidos muestran que en los ratones knockout de STAT2 hay una disminución de β -catenina y ZO-1; sin embargo se observa un incremento en la presencia de claudina-5. Este incremento de claudina 5 en los ratones knockout podría ser un mecanismo de compensación que permite mantener la integridad de la BHE. La inyección de azul de evans por vía intravenosa muestra que en efecto no hay un incremento en la permeabilidad paracelular de la BHE, indicativo del mantenimiento de su función. El mantenimiento de baja permeabilidad de la BHE al azul de Evans, debido posiblemente al incremento de claudina-5, podría estar siendo regulado por la activación de la vía de mTOR, ya que en los animales knockout de STAT2 observamos un incremento en la actividad de mTORC1 y una inhibición en la actividad de este complejo conlleva al restablecimiento de los niveles de claudina-5, similares a los observados en los animales silvestres. Finalmente evaluamos cual era el efecto de un proceso inflamatorio periférico, como es la inflamación intestinal, sobre la integridad de la BHE. La inducción de inflamación en los animales realizo con la administración de DSS, observando que después del tratamiento hay una disminución en la proteína ZO-1 y un incremento en β -catenina, sin encontrarse alteraciones en claudina-5. Los resultados obtenidos permiten concluir que el proceso inflamatorio intestinal provoca un deterioro de la BHE denotado por la modificación de las proteínas de la UEs, debido posiblemente al incremento de citocinas proinflamatorias en los animales. Sin embargo aún es necesario dilucidar cuales son las vías de señalización encargadas de regular estos procesos.

ABSTRACT

The Blood-Brain Barrier (BBB) is formed by endothelial cells, bound together by adherent and tight junction proteins, which confer a high selectivity and low permeability. Neural and peripheral inflammatory processes are directly related to a decrease of tight junction proteins in the BBB and loss of function. One of inflammatory modulators which regulates significantly the stability of the blood brain barrier is interferon gamma (IFN γ) through the increased expression of proteins such as ZO-1, occludin and claudin-5 in endothelial cells. The effects exerted by the IFN γ on the BBB may be due to activation of the JAK / STAT pathway. We evaluated the function of STAT2 in preserving the integrity of the BBB. For this, we use C57BL / 6J wild and STAT2 knockout mice. Determining endothelin binding proteins was performed by immunofluorescence and western blot of brain capillaries, whereas the function of the BBB was determined by intravenous injection of Evans blue. The results show that in the knockout mice STAT2 there is a decrease β -catenin and ZO-1; however an increase is observed in the presence of claudin-5. This increase of claudin 5 knockout mice could be a compensatory mechanism that maintains the integrity of the BBB. The injection of Evans blue intravenously shows that indeed there is an increase in paracellular permeability of the BBB, indicative of maintaining its function. Maintaining low BBB permeability to Evans blue, due to increased claudin-5, possibly being regulated by the activation of mTOR, since in knockout animals STAT2 observed an increase in activity mTORC1 and inhibition in the activity of this complex leads to the restoration of the levels of claudin-5, similar to those seen in wild animals. Finally we evaluated the effect of which was a peripheral inflammatory process, such as intestinal inflammation, on the integrity of the BBB. Induction of inflammation in animals performed with DSS administration, observing that after treatment there is a decrease in protein ZO-1 and increased β -catenin, without encountering changes in claudin-5. The results obtained indicate that the intestinal inflammatory process causes a deterioration in BBB denoted by the modification of proteins TJs, possibly due to an increase in proinflammatory cytokines in animals. However it is still necessary to determine which are the signaling pathways that regulate these processes.

I. ANTECEDENTES

1.1 La barrera hematoencefálica

El sistema nervioso central (SNC) está protegido del medio ambiente por barreras que impiden la entrada de compuestos presentes en la periferia. Una de las barreras físicas más importantes en el SNC es la barrera hematoencefálica (BHE), que se encarga de impedir el transporte paracelular de solutos hidrofóbicos, mediar el transporte de nutrientes y desechos del cerebro y regular la migración de células sanguíneas y patógenos. La barrera hematoencefálica mantiene la homeostasis cerebral, y la composición química adecuada para el óptimo funcionamiento neuronal.

La barrera hematoencefálica se localiza en la interfaz entre la sangre y el tejido cerebral, está formada por las células endoteliales de los vasos sanguíneos que expresan un fenotipo caracterizado por la presencia de fuertes uniones intercelulares y numerosos sistemas de transporte polarizados (*Wolburg y Lippoldt, 2002; Persidsky y cols., 2006*). La impermeabilidad relativa de la barrera hematoencefálica resulta de las uniones estrechas (UE) y uniones adherentes (UA) presentes en las células endoteliales de los capilares cerebrales (*Bazzoni y Dejana, 2004; Matter y Balda, 2003*). Las uniones adherentes están formadas por proteínas transmembranales llamadas cadherinas, las cuales se anclan al citoesqueleto de actina a través de proteínas intermediarias conocidas como cateninas. La interacción entre estas proteínas lleva a la formación de contactos adhesivos entre las células (*Niessen, 2007*). En las uniones adherentes de la barrera hematoencefálica se han identificado diversas proteínas como la VE-cadherina y las proteínas de anclaje: cateninas α , β , γ y p120 (*Wolburg y Lippoldt, 2002*).

Las uniones estrechas son el elemento estructural más importante de la barrera hematoencefálica ya que regulan el transporte paracelular (*Tsukita y Furuse, 1999*), están constituidas principalmente por tres tipos de proteínas transmembranales: ocludina, claudinas y JAMs (Junctional Adhesion Molecule). Las proteínas transmembranales se

unen con proteínas citoplasmáticas de andamiaje como zonula occludens, MAGI y MUPP1, que conectan el citoesqueleto de actina con las proteínas transmembranales estabilizando así la unión célula-célula en la barrera endotelial (*Wolburg y Lippoldt 2002*).

La proteína integral de membrana ocludina, la primera proteína transmembranal de las uniones ocluseras en ser descubierta, atraviesa cuatro veces la membrana y sus dominios amino y carboxilo terminal están orientados hacia el citosol. La expresión de ocludina en las UEs se ha relacionado fuertemente con el mantenimiento de la barrera epitelial (*Bamforth y cols., 1999*) y el funcionamiento de la barrera hematoencefálica (*Hirase y cols., 1997*). Se ha reportado que ocludina tiene un papel importante en la regulación de la resistencia eléctrica y cambios en la permeabilidad, la disminución en la expresión de ocludina está relacionada con la ruptura de la barrera hematoencefálica (*Willis y Davis, 2008*). Las claudinas tienen una topología similar a la de la ocludina y forma los poros de transporte paracelular, pues tienen asas extracelulares cargadas lo cual les confiere selectividad iónica. Aunque se sabe que la familia de las claudinas de mamíferos incluye más de 20 únicamente se ha demostrado la presencia de claudina-5, -3 y -12 en la barrera hematoencefálica (*Wolburg, 2006*). Estas claudinas confieren al endotelio cerebral características muy específicas de permeabilidad y selectividad (*Nitta y cols., 2003*).

Las proteínas transmembranales de las uniones estrechas, como ocludina y claudina, se anclan al citoesqueleto de actina a través de su interacción con proteínas de andamiaje, entre las que se encuentra la familia de las zonula occludens (ZO) 1, 2 y 3 (*Niessen, 2007*). ZO-1 se expresa en el endotelio cerebral, donde participa en la formación de complejos de unión intercelular de la barrera hematoencefálica. La interacción de ZO-1 con proteínas integrales de membrana como ocludina, es importante en la formación de las uniones estrechas en las células endoteliales del cerebro (*Watson y cols., 1991*).

1.2 Deterioro de la barrera hematoencefálica por inflamación

Bajo condiciones fisiológicas normales la barrera hematoencefálica es altamente

selectiva y poco permeable; sin embargo, existen diversas condiciones patológicas que deterioran la función de barrera de las UEs y por ende, incrementan la permeabilidad paracelular (*Ballabh y cols., 2004*). Múltiples factores causan este proceso, entre los cuales se han identificado a los aminoácidos excitadores, el óxido nítrico, TNF α , interleucinas proinflamatorias y radicales libres (*Abbott, 2000; Chen y cols., 2000; St'astny y cols., 2000*). El incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica está íntimamente relacionada con una disminución en la expresión de las proteínas formadoras de las uniones estrechas. Así, una expresión disminuida de proteínas como ocludina y ZO-1 ha sido involucradas en las anomalías y deterioro presentes en el endotelio cerebral (*Kirk y cols., 2003; Hawkins y cols., 2007*). Las alteraciones en la integridad de la BHE debidas a alguno de los factores antes mencionados o como causa de padecimientos neurodegenerativos han sido estudiadas mediante el empleo de marcadores que permiten evaluar la permeabilidad y alteraciones en las proteínas de la unión estrecha. El aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que ha sido observado durante procesos neuroinflamatorios (*Petty y Lo, 2002*) e inflamatorios periféricos (*Huber y cols., 2001*) se ha asociado al deterioro de las uniones estrechas por moduladores inflamatorios como citocinas y quimiocinas (*Abbott, 2000*). Las citocinas TNF α , IL-1 β e IFN- γ inducen la pérdida de ZO-1 y ocludina en la microvasculatura cerebral (*Bolton y cols., 1998; Kirk y cols., 2003; Song y Pachter, 2004; Minagar y Alexander, 2003*).

Hasta el momento poco se ha explorado acerca de cómo un proceso inflamatorio periférico puede afectar la estructura y función de la barrera hematoencefálica; sin embargo, algunos estudios en los que se ha inducido inflamación periférica muestran que aumenta la permeabilidad debido a la disminución de claudina-5, ocludina y JAMs (*Huber y cols., 2001; Brooks y cols., 2006*). Aunque no se ha descrito el mecanismo por el cual un proceso inflamatorio periférico puede deteriorar a la barrera hematoencefálica se sospecha que el incremento de citocinas proinflamatorias liberadas al torrente sanguíneo podría inducir aumento de la permeabilidad endotelial cerebral como resultado de una disminución en la expresión de moléculas de las uniones celulares de la barrera hematoencefálica

(Huber y cols., 2001). Sin embargo, hasta el momento, se desconoce que señal puede mediar esta respuesta.

1.3 STAT como regulador de la señalización en inflamación

Las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT por sus siglas en inglés) conforman una familia de siete miembros, cada una con funciones específicas. Diferentes estímulos inducen su activación, como son citocinas, hormonas y factores tróficos. Cuando una señal extracelular se une a su receptor, induce el acoplamiento de la cinasa JAK al dominio intracelular del receptor. En consecuencia JAK se fosforila y fosforila a su vez a las proteínas STAT en sus residuos de tirosina. La fosforilación de STAT permite que las proteínas formen homo o hetero dímeros en el citosol y se transloquen al núcleo donde actúan como factores de transcripción específicos (Akira, 1999). En la mayoría de los casos la activación de las STAT se da por medio de la cinasa JAK, sin embargo, algunas evidencias indican que estas proteínas también pueden ser activadas directamente por receptores tirosina cinasa, como el receptor del factor de crecimiento epidermal y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, así como también por receptores acoplados a proteínas G, como el receptor de angiotensina II (Marrero y cols., 1995; Vignais y cols., 1996). Tras su activación las proteínas STAT regulan diversos procesos biológicos, según el contexto celular (Levy y Darnell, 2002).

Durante un proceso inflamatorio el aumento de las citocinas, especialmente de los interferones, activa a las proteínas STAT. De hecho, se sabe que STAT2 es necesaria en la señalización desencadenada por IFN para reducir la proliferación (Stark y cols., 1998). Se ha demostrado que el IFN participa en la regulación de las vías de muerte e inhibición de la proliferación celular (Qureshi y cols., 1996; Clifford y cols., 2003).

1.4 mTOR como regulador de la función de barrera

mTOR (por sus siglas en inglés Mechanistic Target Of Rapamycin) es una cinasa que funciona como un regulador central de procesos celulares, como la síntesis de proteínas y macromoléculas, regulación del metabolismo, crecimiento y sobrevivencia celular. mTOR controla la función celular a través de la formación de dos complejos multiproteicos: el complejo sensible a rapamicina mTORC1 y el complejo mTORC2 que es insensible a rapamicina. El complejo mTORC1 está formado por la asociación de mTOR con la proteína raptor, a diferencia del complejo mTORC2, en el cual mTOR se asocia con la proteína rictor. Además de ser estructuralmente distintos ambos complejos cumplen también funciones diferentes (*Bet y Hall, 2013*).

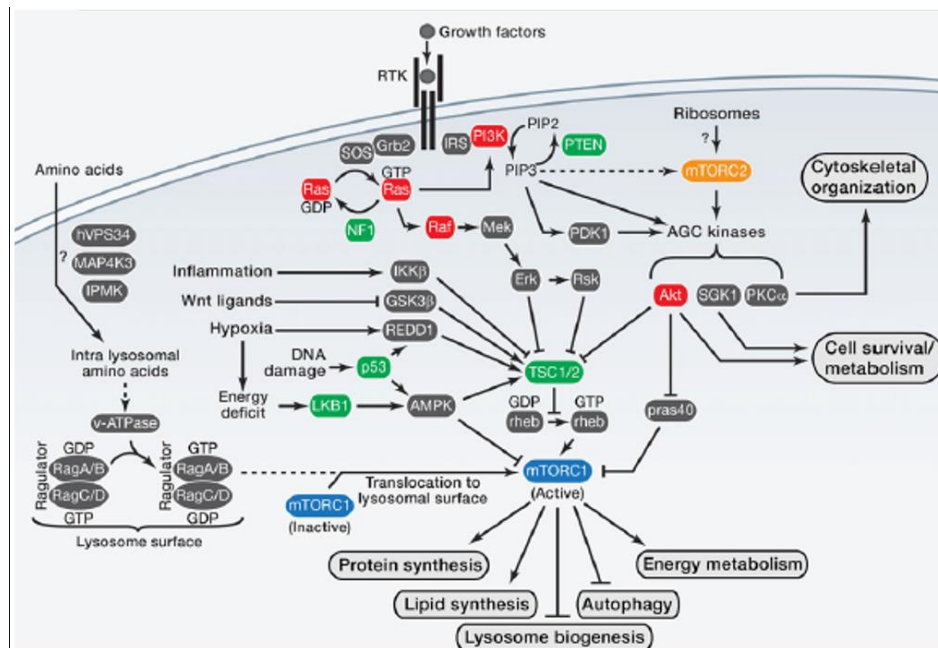


Figura 1. Vía de señalización de mTOR. Regulación de los complejos mTORC1 y mTORC2.

El complejo mTORC1 se regula por la presencia de nutrientes y factores de crecimiento, a través de las proteínas TSC 1/2 y Rheb. mTORC1 se ha involucrado principalmente en la regulación del crecimiento y proliferación celular a través de PS6 y 4EBPs. mTORC2 es activado también por factores de crecimiento y se ha propuesto que lo

hace a través de la cinasa PI3K. El complejo mTORC2 participa en la regulación del citoesqueleto y polaridad por medio de la fosforilación de cinasas como Akt, PKC α , Rho/Rac y SGK1 (*Laplante y Sabatini, 2012*).

mTOR tiene un papel importante en la formación y regulación de endotelios y epitelios, pues regula la expresión de proteínas de los complejos de unión adherente y unión estrecha. Una sobreactivación de mTOR disminuye los niveles de E-cadherina y ZO-1 (*Inoki y cols., 2015*), los inhibidores de mTOR, como rapamicina, estabilizan la función de barrera al incrementar la resistencia eléctrica transepitelial, como resultado del aumento en las proteínas de la unión estrecha como ocludina y claudina (*Mok y cols., 2012*).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La barrera hematoencefálica constituye la protección más importante del sistema nervioso central y funcionamiento mantiene la homeostasis cerebral y las funciones neuronales. La integridad de la barrera hematoencefálica depende de la expresión de una serie de proteínas de las uniones estrechas y uniones adherentes (*Wolburg y Lippoldt, 2002*). Dicha expresión se regula por múltiples factores, entre ellos procesos inflamatorios. Debido a que las citocinas proinflamatorias, entre ellas los interferones ejercen muchos de sus efectos a través de la vía de señalización de las JAK/STAT, es posible que estos factores de transcripción puedan estar implicados en la regulación a nivel transcripcional de algunas proteínas de las uniones intercelulares. En este trabajo proponemos evaluar la participación de STAT-2 en la regulación de la integridad de la barrera hematoencefálica empleando ratones knock out de esta proteína.

III. HIPOTESIS

STAT2 regula la expresión de proteínas de las uniones interendoteliales, contribuyendo al mantenimiento de la integridad de la barrera hematoencefálica.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la participación de STAT2 en la regulación de la integridad y función de la barrera hematoencefálica.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar la presencia de β -catenina, ZO-1 y Claudina-5 en el endotelio vascular cerebral en ratones silvestres y KO de STAT2.
2. Evaluar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica por inyección intravenosa de un trazador en ratones silvestres y KO de STAT2.
3. Analizar el efecto de una inflamación periférica en la regulación de las proteínas β -catenina, ZO-1 y claudina-5 en la barrera hematoencefálica.
4. Determinar la participación de mTOR en la regulación de las proteínas de unión estrecha en la barrera hematoencefálica.

V. METODOLOGÍA

5.1 Animales

Se emplearon ratones silvestres de la cepa C57BL/6J y ratones knockout de STAT2, de 6 a 8 semanas de edad. Los animales fueron alojados en un ciclo luz/obscuridad de 12/12h. Finalizados los protocolos experimentales correspondientes, los animales fueron sacrificados empleando una cámara de CO₂. El cerebro fue extraído y procesado según fuera requerido. Todos los procedimientos con animales fueron examinados y aprobados por el Comité Interno de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV.

5.2 Tratamiento con DSS

Para el tratamiento con dextran sulfato de sodio (DSS) los animales fueron divididos en dos grupos: el grupo control, al cual solo le fue proporcionado agua y el grupo tratado con dextran sulfato de sodio. El DSS fue diluido en agua normal a una concentración de 5% y colocado en sustitución del agua de beber. Ambos grupos fueron tratados durante cuatro días consecutivos.

5.3 Tratamiento con inhibidores de mTOR

Ratones silvestres y knockout fueron administrados vía intraperitoneal con Everolimus, un inhibidor selectivo del complejo uno de mTOR (mTORC1), a una dosis de 10 mg/kg durante 5 días consecutivos y última administración se realizó tres horas antes del sacrificio. Los ratones control recibieron solamente el vehículo (DMSO).

5.4 Inmunofluorescencia

El cerebro fue colocado en una criobase, embebido en Tissue-tek® O.C.T. y

almacenado a -80°C . Se realizaron cortes coronales del tejido de 20 micras de grosor. Los cortes realizados se montaron en portaobjetos gelatinizados; las muestras que no fueron procesadas de forma inmediata se almacenaron nuevamente a -80°C .

Anticuerpo	Isotipo	Dilución
β -catenina	RbIgG	1:500
ZO-1	RbIgG	1:500
Claudina-5	RbIgG	1:500

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia.

Para la inmunofluorescencia los cortes de cerebro se fijaron y permeabilizaron con metanol durante 20 min a -20°C , posterior a esto se lavaron con PBS y se bloquearon con BSA al 0.2% durante 1 h a temperatura ambiente. Terminado el bloqueo las muestras se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) toda la noche a 4°C . Al día siguiente, las muestras se lavaron con PBS para retirar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron con el anticuerpo secundario en obscuridad durante 1 h. Los anticuerpos secundarios acoplados a un fluoróforo se usaron a una dilución de 1:1000. Los núcleos fueron teñidos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Una vez terminada la incubación del anticuerpo secundario se realizó un último lavado con PBS y finalmente las muestras se montaron con vectashield y se sellaron con barniz. Los tejidos se analizaron con un microscopio confocal Leica TCS SP8.

5.5 Aislamiento de capilares cerebrales para western blot

Para la determinación de las diferentes proteínas de unión en la barrera hematoencefálica mediante western blot los cerebros extraídos se lavaron con PBS frío y se homogenizaron con DMEM. El homogenado se centrifugó durante 10 min a 1700 g y 4°C , el sobrenadante se desechó y la pastilla se mezcló con dextran al 20%, nuevamente se realizó una centrifugación de 10 min a 5000 g, la capa grasa obtenida se retiró y la pastilla

fue resuspendida en DMEM. La solución fue filtrada en una malla de 110 micras, el filtrado obtenido se centrifugó a 1700 g durante diez minutos, el pellet obtenido de esta última centrifugación fue resuspendió en RIPA.

5.6 Western blot

Anticuerpo	Isotipo	Dilución
Ocludina	Conejo IgG	1:6000
Claudina-5	Conejo IgG	1:1000
Claudina-3	Conejo IgG	1:1000
ZO-1	Conejo IgG	1:1000
ZO-2	Conejo IgG	1:1000
β -catenina	Conejo IgG	1:1000
STAT1	Cabra IgG	1:1000
STAT3	Ratón IgG	1:1000
pS6	Conejo IgG	1:1000
pAkt 473	Conejo IgG	1:1000

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados para western blot.

La medición de proteínas por western blot se realizó empleando los capilares cerebrales aislados previamente. Inicialmente se midió la concentración de proteínas totales en la muestra mediante un ensayo de BCA, posteriormente la muestra se incubó con β -mercaptoetanol y buffer de carga a 95°C durante 10 min. La muestra preparada se cargó en un gel de poliacrilamida al 10%, y se fraccionó durante aproximadamente 1 hora y media. Terminado este tiempo se transfirió a una membrana de nitrocelulosa; una vez que la muestra fue transferida se realizó el bloqueo con leche al 2% durante 1 h y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2). Finalizada la incubación del anticuerpo primario, la membrana se lavó y se incubó con el anticuerpo secundario, durante 1 h.

Finalmente se reveló para la observación y análisis de las bandas de interés, mediante quimioluminiscencia.

5.7 Ensayo para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

Para el ensayo de permeabilidad se administró azul de Evans en la vena caudal del ratón. Doce horas después los animales fueron sacrificados y el cerebro fue extraído y homogenizado en ácido tricloroacético al 60%. El homogenizado obtenido fue sonicado y centrifugado durante 30 min a 15000 rpm. La concentración de colorante en la muestra se determinó por espectrofotometría (620 nm) y se comparó contra una curva estándar.

VI. RESULTADOS

6.1 Genotipificación de ratones knockout de STAT2

Para asegurar que los animales empleados en los experimentos tuvieran el genotipo correspondiente lo primero que realizamos fue una genotipificación por PCR de los animales de experimentación. Se amplificó por PCR a STAT2 murino. En la figura 2 se observa que en el caso de los animales knockout de STAT2 no hay amplificación del gen, por el contrario en el ratón silvestre aparece una banda de 450 pb correspondiente a la región del gen de STAT2 amplificada.

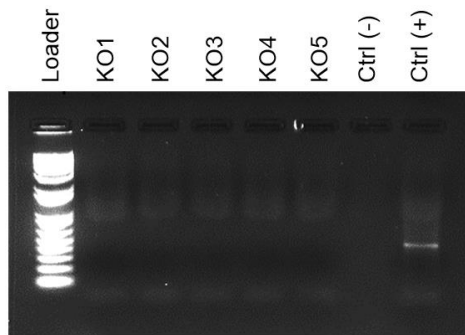


Figura 2. Genotipificación de ratones knockout de STAT2. Se realizó una PCR para amplificar la región deletada del gen de STAT2. Se muestra en el control positivo (ratón silvestre) la banda de 450 pb correspondiente al gen de STAT2.

Basados en estos resultados, los animales fueron seleccionados para realizar los experimentos posteriores.

6.2 La eliminación de STAT2 induce a disminución de β -catenina y ZO-1 y aumenta a la claudina-5 en los capilares cerebrales

En los ratones silvestres β -catenina, ZO-1 y claudina-5 presentan una distribución normal (Figura 3A, B y C). La eliminación de STAT2 induce una disminución de la señal

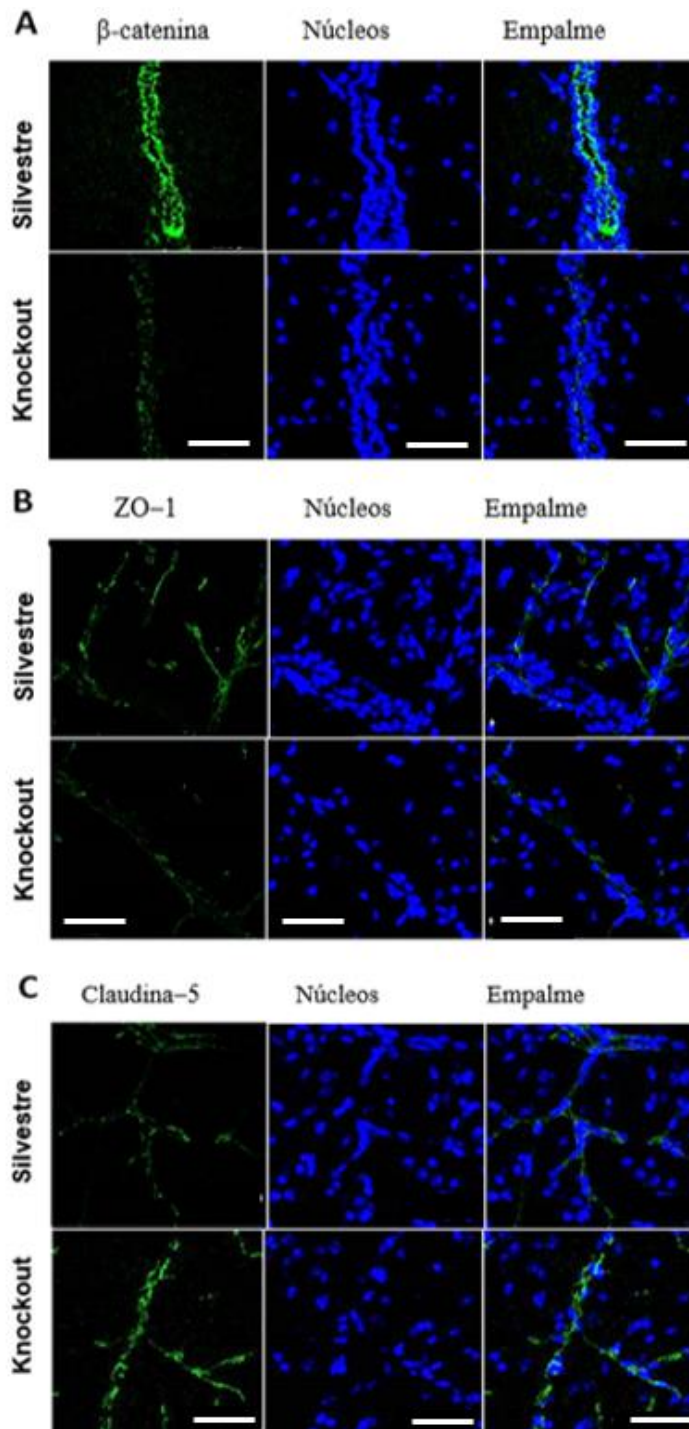


Figura 3 Evaluación de las proteínas de la unión endotelial en la BHE de ratones knockout de STAT2. Se observa una disminución en la intensidad de la marca para β -catenina y ZO-1 en el cerebro de ratones knock out de STAT2 (A y B). Contrario a esto en el caso de claudina-5, los capilares de ratones knock out muestran un incremento en la presencia de esta proteína. β -catenina, ZO-1 y claudina-5 en verde, núcleos en azul (n=3). Barra= 50 μ m.

fluorescente de β -catenina (Figura 3A) y ZO-1 (Figura 3B) en la barrera hematoencefálica, mientras que claudina-5 aumenta en los capilares cerebrales de los ratones que no expresan STAT2 (Figura 3C).

Para confirmar los cambios en las proteínas de adhesión de la barrera hematoencefálica observados por inmunofluorescencia, se aislaron los capilares cerebrales de los ratones para medir la cantidad de β -catenina, ZO-1 y claudina-5 por Western blot.

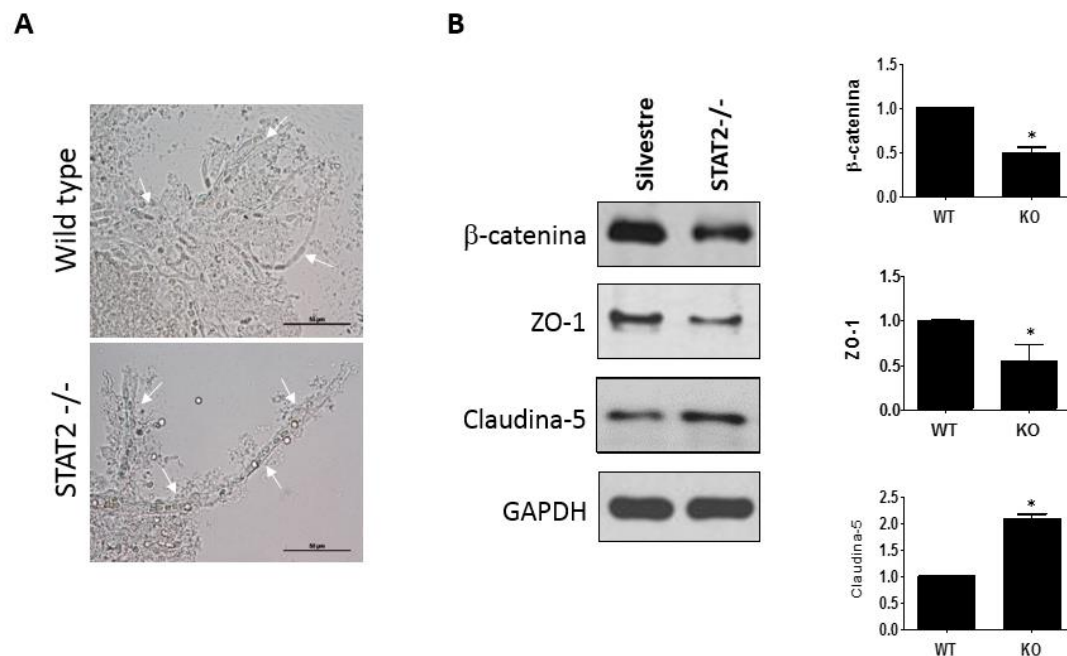


Figura 4. Modificaciones de las proteínas de unión endotelial en capilares cerebrales de ratones knockout de STAT2. A) Capilares aislados de cerebro de ratón. B) Determinación de la presencia de las proteínas de uniones inter-endoteliales por western blot y análisis densitométrico (n=6). (t-Student p< 0.001).

En la figura 4 se observa una imagen de los capilares aislados, antes de ser procesados por Western blot y pueden observarse como estructuras filamentosas, en ambos casos. Los resultados obtenidos confirman lo observado por inmunofluorescencia. El análisis densitométrico realizado muestra que en los ratones carentes de STAT2 disminuye β -catenina y ZO-1 en un 50% y aumenta Claudina-5 a más del doble con respecto a las proteínas de los capilares obtenidos de los animales silvestres.

6.3 La eliminación de STAT2 no incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al azul de Evans

Una forma de evaluar la integridad de la barrera hematoencefálica consiste en la inyección de un trazador que se administra de forma periférica, si la barrera está abierta este trazador atravesará la barrera hematoencefálica y se acumulará en el parénquima cerebral (*Manaenko y cols., 2011*).

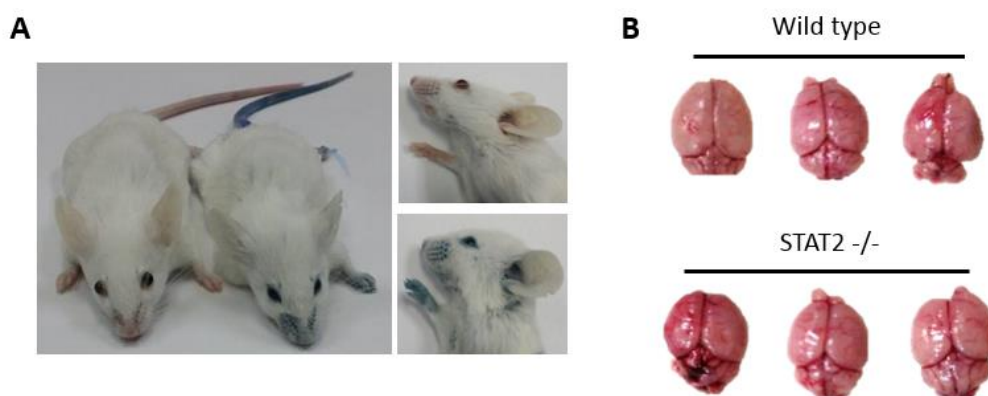


Figura 5. La ausencia de STAT2 no altera la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Inyección intravenosa de azul de Evans al 2% (4ml/kg). A) Ratones administrados con PBS (izquierda) y azul de Evans (derecha). B) Cerebros de ratones silvestres y knockout 12 h después de la administración con azul de Evans al 2% (4ml/kg).

Como se puede observar en la figura 6A, la inyección intravenosa de Azul de Evans en la vena de la cola de los ratones BALBC origina una coloración azul de las patas, orejas y nariz de los ratones que recibieron el colorante, no así en los ratones a los que únicamente se les administró PBS. Estos resultados demuestran que el depósito del colorante en el torrente sanguíneo se realizó correctamente. Sin embargo, como se muestra en la figura 6B tanto los cerebros de los ratones WT como los cerebros de los ratones carentes de STAT2 no se tiñeron de azul cuando los animales fueron administrados con Azul de Evans, por lo que creemos que la barrera hematoencefálica de ambos animales es impermeable a este compuesto. Cabe señalar que al realizar la necropsia observamos que en ambos ratones el colorante se depositó en todos los demás órganos, haciendo evidente la presencia del colorante en el torrente sanguíneo.

6.4 mTOR regula los niveles de claudina-5 en la barrera hematoencefálica

Debido a que el primer análisis realizado en los ratones carentes de STAT2 muestra que existe una modificación en las proteínas de unión endotelial que conforman a la barrera hematoencefálica decidimos explorar qué posibles vías de señalización están involucradas en su regulación.

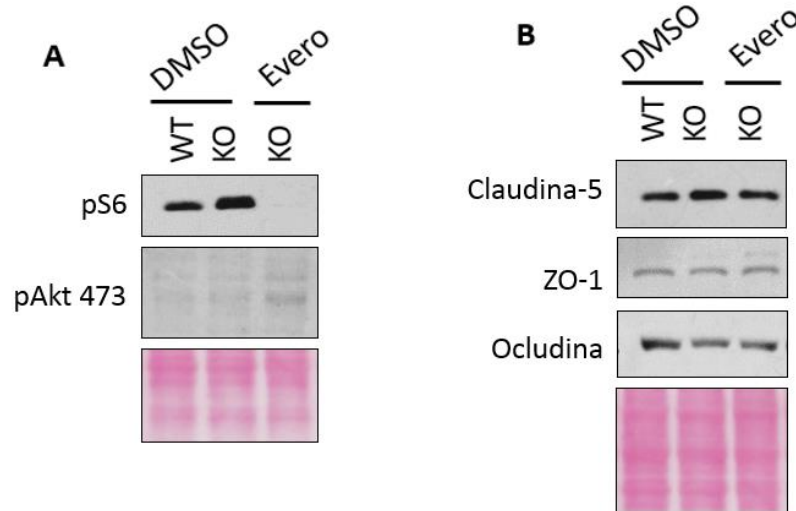


Figura 6. La inhibición de mTORC1 revierte el incremento de claudina-5 en los ratones knockout de STAT2. A) Análisis de las proteínas de unión endotelial con el tratamiento de everolimus. B) Efecto del Everolimus sobre los niveles de PS6, STAT 1 y 3 e isoformas 1 y 2 de Akt (n=3).

Varias vías de señalización se han implicado en la regulación de las proteínas de la unión estrecha en la barrera hematoencefálica, incluidas mTORC1 y mTORC2, en este trabajo investigamos cual era el estado de estas vías de señalización en nuestros animales, para ello analizamos los niveles de sus sustratos pS6 y pAkt473 en muestras obtenidas de los ratones silvestres y en ratones carentes de STAT2. Como se muestra en la figura 6A los niveles del sustrato directo de mTORC1 pS6, en los animales knockout de STAT2 se encuentran aumentados indicando que existe una sobreactivación de mTORC1 en los ratones carentes de STAT2, sin observar un cambio en la activación del complejo mTORC2 determinado por pAkt 473.

El tratamiento de los ratones carentes de STAT2 con Everolimus, un inhibidor de mTORC1, muestra que al inhibir mTORC1 pS6 desaparece e incrementa la presencia pAkt 473, indicando que hay un incremento en la actividad del complejo 2 de mTOR cuando se suprime a mTORC1. La inhibición de la actividad de mTORC1 en los animales knockout resulta en una disminución de los niveles de claudina 5 la cual alcanza niveles similares a los observados en los animales silvestres, sin embargo no se observa una variación importante en las demás proteínas (Figura 6B). Estos resultados sugieren que mTORC1 podría ser el responsable de regular lo niveles de claudina 5 en los ratones carentes de STAT2.

6.5 Efecto de la inflamación periférica en la permeabilidad e integridad de la barrera hematoencefálica

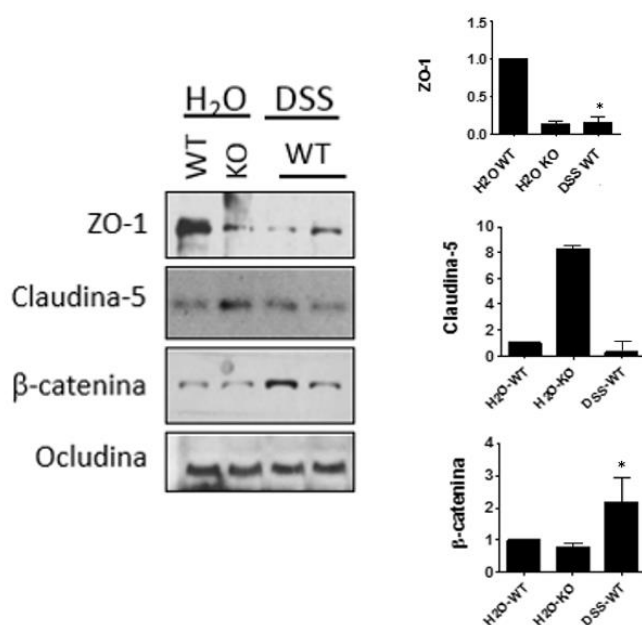


Figura 7. Efecto de la inflamación periférica en la integridad de la BHE. Determinación de las proteínas de unión endotelial en la barrera hematoencefálica por western blot. Se observa una disminución en ZO-1 y Cl-5 después del tratamiento con DSS y un incremento en β-catenina. Se realizó el análisis densitométrico de todas las proteínas (n=6).

Los procesos neuroinflamatorios como los inflamatorios periféricos, modifican la estructura y función de la barrera hematoencefálica través del aumento de citocinas

proinflamatorias y de la activación de diversas vías de señalización, incluidas las de mTOR y STAT. Dado que la actividad de mTORC1 se incrementa en los capilares de los ratones knockout de STAT2, nuestro siguiente objetivo fue investigar si los cambios observados en los capilares de los ratones carentes de STAT2, eran similares a los observados en los capilares obtenidos de los ratones que tienen procesos inflamatorios agudos.

Para este objetivo, llevamos a cabo el análisis de diferentes proteínas que forman parte de la barrera hematoencefálica en muestras de capilares cerebrales obtenidos de ratones silvestres o con inflamación experimental crónica inducida con DSS (*Chassaing y cols., 2014*). Realizamos una evaluación de las proteínas de unión endotelial por la técnica de western blot, observando que la inflamación inducida por el tratamiento con DSS disminuye ZO-1 e incrementa β -catenina; sin encontrar cambios en la proteína ocludina ni en claudina-5 (Figura 7). Comparando estos resultados con los obtenidos en muestras de los capilares de los ratones carentes de STAT2 solamente ZO-1 tiene un comportamiento similar pero esto no se observa en claudina-5 o β -catenina sugiriendo que durante inflamación STAT2 podría estar implicada en la regulación de ZO-1 y que el proceso inflamatorio en los animales carentes de STAT2 es diferente al observado en los ratones con inflamación crónica.

VII. DISCUSIÓN

La función de barrera del endotelio cerebral depende principalmente de los complejos de proteínas que forman las uniones intercelulares y que regulan el transporte paracelular. Las alteraciones en la composición u organización de estos complejos repercuten en la función de la barrera hematoencefálica. Las uniones estrechas junto con las uniones adherentes son dos complejos intercelulares que regulan la función de la barrera hematoencefálica. Proteínas como ZO-1, ocludina, claudinas, cateninas y cadherinas, que son parte del núcleo de adhesión de estas estructuras, se han involucrado directamente en el mantenimiento de la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Se sabe que las uniones intercelulares, incluyendo las presentes en la barrera hematoencefálica son estructuras dinámicas que pueden sufrir modificaciones en respuesta a una gran variedad de estímulos extracelulares que ponen en marcha mecanismos reguladores de la permeabilidad y selectividad iónica, de acuerdo a las necesidades del organismo (*Huber y cols., 2001*).

En la presente tesis se demuestra que la eliminación de STAT2 induce la disminución de β -catenina y ZO-1. Es posible que esta disminución se deba a disminución en la tasa de transcripción en la ausencia de STAT2 o a la pérdida de complejos de unión como consecuencia de la desorganización en el citoesqueleto de las células (*Wolburg y Lippoldt 2002*). En el caso de β -catenina, la disminución de la proteína podría asociarse con su translocación al núcleo para participar en la regulación de la transcripción en las células endoteliales.

La claudina-5 es la principal proteína involucrada en el mantenimiento de la integridad de las uniones estrechas en los endotelios (*Furuse y cols., 1999, Huber y cols., 2001*). El incremento en claudina-5 observado en el endotelio cerebral de los ratones KO podría asociarse con el mantenimiento de una permeabilidad baja al azul de Evans en los ratones que no expresan STAT2. Es posible que el aumento de claudina-5 provoque una disminución aún mayor de la permeabilidad que no se pueda detectar con el ensayo de azul de Evans lo cual debería ser analizado en el futuro. De los resultados de esta tesis también

queda claro que la disminución de β -catenina y ZO-1 no incrementan la permeabilidad paracelular probablemente porque otros mecanismos compensatorios, entre los que podría incluirse el aumento de claudina-5, se ponen en operación.

Un proceso inflamatorio, como el ocasionado en colón por el tratamiento con DSS, modifica la estructura e integridad de la barrera hematoencefálica, posiblemente como resultado del incremento de los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias que el daño en el tejido intestinal provoca. Estas citocinas podrían estar induciendo vías de señalización involucradas en la regulación de los complejos de unión en la barrera hematoencefálica. Si bien, se han propuesto diferentes mecanismos que podrían estar participando en el mantenimiento de la función e integridad de la barrera hematoencefálica no se sabe con exactitud cuáles son las vías de señalización involucradas en estos procesos. Debido a esto exploramos si mTOR está involucrado en la regulación de la barrera hematoencefálica. Nuestros resultados muestran que la inhibición del complejo mTORC1 restablece los niveles de claudina-5, proteína a la cual se ha atribuido la función de la barrera hematoencefálica. Se sabe que mTOR puede regular la estabilidad de algunos endotelios a través de la activación del complejo mTORC1/rpS6, además es sabido que la activación de mTOR está involucrado en la regulación del citoesqueleto celular, lo cual afecta de forma directa la estabilidad de los complejos de unión intercelular (*Mok y cols., 2012*).

VIII. CONCLUSIONES

1. La ausencia de STAT2 reduce los niveles de β -catenina y ZO-1 y aumenta los de claudina-5 en la barrera hematoencefálica esto sin afectar la permeabilidad al azul de Evans.
2. STAT2 disminuye los niveles de claudina-5 en el endotelio cerebral a través de la inhibición de mTORC1.
3. La inflamación periférica inducida con DSS disminuye los niveles de ZO-1 e incrementa β -catenina en la BHE, pero no afecta los niveles de claudina-5.

IX. PERSPECTIVAS

1. Determinar si los cambios observados en las proteínas de la unión estrecha en la barrera hematoencefálica de los ratones knockout de STAT2 se deben a cambios en su expresión o degradación.
2. Dilucidar la vía de señalización responsable del incremento de claudina- la barrera hematoencefálica de los ratones knockout de STAT2.
3. Determinar que citocinas proinflamatorias están involucradas en la regulación de la barrera hematoencefálica durante un proceso inflamatorio intestinal inducido con DSS.
4. Determinar si los procesos inflamatorios periféricos que afectan a la barrera hematoencefálica pueden detonar un proceso neuroinflamatorio.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol.* 2000;20:131-47.
- Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells.* 1999;17:138-46.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004;16:1-13.
- Bamforth SD, Kniesel U, Wolburg H, Engelhardt B, Risau W. A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J Cell Sci.* 1999;112:1879-88.
- Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 2004;84:869-901.
- Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience.* 1998;86:1245-57.
- Camire RB, Beaulac HJ, Willis C. Transitory loss of glia and the subsequent modulation in inflammatory cytokines/chemokines regulate paracellular claudin-5 expression in endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 2015;15:57-66.
- Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788:864-71.
- Chen Y, McCarron RM, Azzam N, Bembry J, Reutzler C, Lenz FA, Spatz M. Endothelin-1 and nitric oxide affect human cerebrovascular endothelial responses and signal transduction. *Acta Neurochir Suppl.* 2000;76:131-5.
- Cheng T, Petraglia AL, Li Z, Thiyagarajan M, Zhong Z, Wu Z, Liu D, Maggirwar SB, Deane R, Fernández JA, LaRue B, Griffin JH, Chopp M, Zlokovic BV. Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. *Nat Med.* 2006;12:1278-85.
- Clifford JL, Yang X, Walch E, Wang M, Lippman SM. Dominant negative signal transducer and activator of transcription 2 (STAT2) protein: stable expression blocks interferon alpha action in skin squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2003;2:453-9.
- Furuse M, Sasaki H, and Tsukita S. Manner of Interaction of Heterogeneous Claudin Species within and between Tight Junction Strands. *J Cell Biol.* 1999;147:891-903.
- Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005;57:173-85.
- Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci.* 1997;110:1603-13.
- Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H1241-8.
- Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 2001;24:719-25.
- Jander S, Pohl J, Gillen C, Schroeter M, Stoll G. Vascular cell adhesion molecule-1 mRNA is expressed in immune-mediated and ischemic injury of the rat nervous system. *J Neuroimmunol.* 1996;70:75-80.
- Kirk J, Plumb J, Mirakhor M, McQuaid S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol.* 2003;201:319-27.
- Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:651-62.
- Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF α induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability

-
- requires NF κ B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:G367-76.
- Manaenko A., Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood–brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods.* 2011;195:206-10.
- Mark KS, Davis TP. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H1485-94.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature.* 1995;375:247-50.
- Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:225-36.
- Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2003;9:540-9.
- Nag Sukriti. *The Blood-brain Barrier: Biology and Research Protocols. Metodos in molecular medicine.* Humana Press, 2003.
- Ni C, Wang C, Zhang J, Qu L, Liu X, Lu Y, Yang W, Deng J, Lorenz D, Gao P, Meng Q, Yan X, Blasig IE, Qin Z. Interferon- γ Safeguards Blood-Brain Barrier during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2014;184:3308-20.
- Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 2007;127:2525-32.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 2003;161:653-60.
- Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006;1:223-36.
- Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol.* 2002;68:311-23.
- Qureshi SA, Leung S, Kerr IM, Stark GR, Darnell JE Jr. Function of Stat2 protein in transcriptional activation by alpha interferon. *Mol Cell Biol.* 1996;16:288-93.
- Rolf Dermietzel, David C. Spray and Maiken Nedergaard Hartwig. *The Endothelial Frontier In Blood-Brain Barriers: From Ontogeny to Artificial Interfaces, Volume 1.* Wolburg Published Online: 31 MAY 2007.
- Shorning BY, Griffiths D, Clarke AR. Lkb1 and Pten Synergise to Suppress mTOR-Mediated Tumorigenesis and Epithelial-Mesenchymal Transition in the Mouse Bladder. *PLoS One.* 2011;6:e16209.
- Song L, Pachter JS. Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 2004;67:78-89.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:227-64.
- St'astný F, Skultétyová I, Pliss L, Jezová D. Quinolinic acid enhances permeability of rat brain microvessels to plasma albumin. *Brain Res Bull.* 2000;53:415-20.
- Staykova M, Maxwell L, Willenborg D. Kinetics and polarization of the membrane expression of cytokine-induced ICAM-1 on rat brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000;59:120-8.
- Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol.* 1999;9:268-73.
- Van Vliet VQ, Forte G, Holtman L, den Burger ZCG, Sinjewel Z, de Vries XE, Aronica E, Gorter J. Inhibition of mammalian target of rapamycin reduces epileptogenesis and blood–brain barrier leakage but not microglia activation. *Epilepsia.* 2012;53:1254-63.
- Vignais ML, Sadowski HB, Watling D, Rogers NC, Gilman M. Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol Cell Biol.* 1996;16:1759-69.
-

Watson PM, Anderson JM, Vanlallie CM, Doctrow SR. The tight-junction-specific protein ZO-1 is a component of the human and rat blood-brain barriers. *Neurosci Lett.* 1991;129:6-10.

Willis CL, Davis TP. Chronic Inflammatory Pain and the Neurovascular Unit: A Central Role for Glia in Maintaining BBB Integrity? *Curr Pharm Des.* 2008;14:1625-43.

Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:323-37.

Ye D, Ma I, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290:G496-504.

Youakim A, Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol.* 1999;276:G1279-88.

Zlokovic BV. Remodeling after stroke. *Nat Med.* 2006;12:390-1.

Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008;57:178-201.