



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Cambios en la vía de señalización de TGF- β
asociados a la disfunción de la BHE en un modelo
de isquemia y reperfusión”**

T E S I S

Que presenta

Tania Guadalupe Montero Cosme

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de la Tesis:

Dra. Mónica Díaz Coránguez

Ciudad de México

Diciembre, 2024

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio 15 del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, a cargo de la Dra. Mónica Díaz Coránguez. Para la realización del proyecto se contó con la beca de maestría No. 1227467 del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT); así como con el proyecto CF-2023-G-1516 de Ciencia de Frontera 2023.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por brindarme el apoyo monetario necesario para la culminación de la maestría.

De forma especial, quiero reconocer a la Dra. Mónica Díaz Coránguez, asesora de este trabajo. Su apoyo como mentora ha sido fundamental para la realización de este proyecto. Asimismo, le agradezco profundamente por darme las herramientas que me han permitido alcanzar horizontes más allá de lo que alguna vez soñé posible.

A las Dras. Claudia González Espinosa y Ángeles Concepción Tecalco Cruz, a quienes agradezco por sus comentarios para la mejoría de esta tesis, así como su disponibilidad para apoyarme hasta el final.

A Shareny Andrea Freyffeldt Flores, secretaria del departamento. Quiero expresarte mi más sincero agradecimiento por todo el apoyo y la dedicación para la gestión de los trámites que hemos realizado juntos. Pero más allá de tu profesionalismo, quiero agradecerte de corazón por ser una gran amiga.

A mis amigas, integrantes del club de las introvertidas: Elizabeth Reyes, Annel Rosas, Amayrani Pérez, Estefanía Guerrero-Morán y Elizabeth Reyes. A mis amigos del Lab 15 y asociados: Monserrat Fuentes, Daniel (Dan) Guerrero, Aketzalli Gómez, Valeria Calderón, Julissa González y Rita Zavaleta. Les agradezco por estar en los momentos buenos, en los momentos malos y, sobre todo, en los peores. En especial, agradezco a Elizabeth por todas esas veces en las cuáles tuvimos que salir adelante juntas.

Por último, quiero agradecer a todos aquellos animales que participaron durante todo el proceso experimental. Sin su sacrificio, este trabajo no sería posible.

Dedicatorias

A mis padres, Guadalupe Cosme Tepetla y Jose Luis Montero Acosta, quienes con amor y constancia me han hecho la mujer que soy ahora. Han sido mi mayor fuente de apoyo a lo largo de este proceso. Agradezco profundamente su amor incondicional, su paciencia y su aliento constante. Gracias por creer en mí incluso cuando las dudas me invadían, y por siempre estar a mi lado en los momentos de dificultad y en los de éxito.

A mi hermana Karen Naomi Montero Cosme, mi mejor amiga y mi compañera de vida. Tu compañía y tu amor han sido una fuente constante de motivación para seguir adelante, y no hay palabras suficientes para expresar lo agradecida que estoy por tenerte en mi vida.

A Francisco Javier Zavala Ocón, mi futuro esposo. Gracias por apoyarme en los momentos más difíciles, por darme fuerzas cuando sentía que no podía más, por ser mi mejor amigo y mi compañero en cada paso de este viaje.

Índice

1.	Introducción.....	13
1.1	Desarrollo y maduración del sistema vascular cerebral	13
1.1.1	La barrera hemato-encefálica (BHE)	13
1.2	Señalización de TGF- β	17
1.2.1	Vía dependiente de SMADs	18
1.2.2	Vía independiente de SMADs.....	19
1.2.3	Señalización de TGF- β 1/ALK5 en el desarrollo de la BHE.....	20
1.3	El accidente cerebrovascular (ACV).....	22
2.	Antecedentes	23
3.	Justificación.....	25
4.	Hipótesis	25
5.	Objetivos	25
5.1	Objetivo general	25
5.2	Objetivos específicos	25
6.	Diseño experimental	26
7.	Metodología	28
7.1	Animales	28
7.2	Modelo de isquemia y reperfusión (IR).....	28
7.2.1	Tinción del tejido cerebral con cloruro de trifeníl-2, 3, 5-tetrazolio (TTC).....	29
7.3	Permeabilidad de azul de Evans.....	29
7.4	Inmunofluorescencia	30
7.5	Western blot.....	31
7.6	Cuantificación de angiogénesis.....	33
7.7	Análisis estadístico.....	33

8.	Resultados	34
8.1	La oclusión temporal de la ACC induce la disrupción de la BHE	34
8.2	La oclusión temporal de la ACC no promueve angiogénesis	39
8.3	La oclusión temporal de la ACC activa la señalización mediada por SMADs 42	
9.	Discusión.....	44
10.	Conclusión	48
11.	Perspectivas.....	48
12.	Referencias.....	50

Figura 1. Barrera hemato-encefálica	14
Figura 2. Uniones estrechas inter-endoteliales	15
Figura 3. Mecanismos moleculares que regulan la formación de la barrera hemato-encefálica	16
Figura 4. Señalización de TGF- β dependiente de SMADs.....	18
Figura 5. Señalización de TGF- β independiente de SMADs	19
Figura 6. Papel del TGF- β 1 en el desarrollo del sistema vascular cerebral	21
Figura 7. Oclusión temporal de la arteria carótida común izquierda, modelo de IR ..	28
Figura 8. Regiones de análisis de la permeabilidad de azul de Evans.....	30
Figura 9. Esquema de arborización obtenido para la cuantificación de angiogénesis	33
Figura 10. La oclusión de la ACC aumenta la permeabilidad de azul de Evans después de 3h de reperfusión	36
Figura 11. La oclusión de la ACC aumenta la permeabilidad de azul de Evans después de 24h de reperfusión	37
Figura 12. La oclusión de la ACC aumenta la permeabilidad de azul de Evans después de 7 días de reperfusión.....	38
Figura 13. La oclusión de la ACC no altera la expresión de Cldn5	39
Figura 14. La oclusión de la ACC no promueve angiogénesis en el parénquima cerebral	40
Figura 15. La oclusión de la ACC no induce una zona de infarto.....	42
Figura 16. La oclusión de la ACC no modifica la expresión del receptor ALK5.....	43
Figura 17. La oclusión de la ACC activa señalización mediada por SMADs.....	43
Figura 18. La oclusión de la ACC induce disfunción en la BHE y activa la vía de señalización mediada por SMADs.....	44

Abreviaturas

ACC	Arteria carótida común
ACV	Accidente cerebrovascular
ALK	Cinasa del linfoma anaplásico
BHE	Barrera hemato-encefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
Cldn5	Claudina 5
DE	Día embrionario
DLL4	Proteína delta tipo 4
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
FZD4	Receptor Frizzled 4
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GPR124	Receptor 124 acoplado a proteína G
IB4	Isolectina B 4
IR	Isquemia y reperfusión
JAMs	Moléculas de adhesión de unión
JNK	Cinasa terminal de c-Jun
LRP	Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos

MEK	Cinasa regulada por señales extracelulares activadas por mitógenos
MKK	MAPK polifosforilada
NFκB	Factor nuclear kappa B
OACM	Oclusión de la arteria cerebral media
OtACM	Oclusión temporal de la arteria cerebral media
PBS	Solución amortiguadora salina a base de fosfatos
PECAM	Molécula de adhesión de las células endoteliales a las plaquetas
PI3K	Fosfatidil inositol 3-cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PKB	Proteína cinasa B
Ras	Proteína de virus de sarcoma de rata
REK	Cinasa expresada en retina
RhoA	Miembro de la familia homóloga a ras
ROCK	Proteína cinasa asociada a Rho
SG	Semana gestacional
SMAD	<i>Suppressor of mothers against decapentaplegic</i>
SNC	Sistema nervioso central
TAK1	Cinasa 1 activada por TGF-β
TEM	Transición epitelio-mesénquima

TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TGF β R	Receptor de TGF- β
TRAF	Factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TTC	Cloruro de trifenil-2, 3, 5-tetrazolio
TUNEL	<i>Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling</i>
UE	Uniones estrechas
VE-Cadh	Caderina del endotelio vascular
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial
ZO-1	<i>Zonula occludens 1</i>

Resumen

El accidente cerebrovascular (ACV) isquémico se caracteriza por un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), que se acompaña de la disminución de la expresión de la proteína de unión estrecha 5 (Cldn5) y con la activación de la angiogénesis. Recientemente, se ha propuesto que la señalización mediada por TGF- β aumenta tras una lesión cerebral isquémica. Sin embargo, aún se desconoce el papel del TGF- β en la regulación de las propiedades de la BBB durante el ACV. Dado que la vía de señalización mediada por TGF- β /ALK5/SMAD 2/3 es necesaria para el desarrollo y mantenimiento de la BBB, es posible que esta vía se active como mecanismo de reparación en el ACV. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar los cambios en la señalización mediada por TGF- β inducidos por la oclusión temporal de la arteria carótida común izquierda (ACC), un modelo de isquemia y reperfusión (IR). Para ello, se pinzó la ACC de ratas Wistar macho durante 2h para inducir isquemia. Posteriormente, se permitió la reperfusión natural y después de 3h, 24h y 7 días, se evaluó el efecto de la IR sobre la función y estructura de la BBB, la angiogénesis y la señalización de TGF- β . Observamos que la IR indujo un aumento gradual de la permeabilidad vascular al azul de Evans en el parénquima cerebral, que fue significativamente alto sólo en los hemisferios cerebrales derechos de las ratas con isquemia, cuando éstos fueron comparados con las ratas control. Mediante tinción por inmunofluorescencia, detectamos además que, particularmente en los vasos permeables, la localización de Cldn5 en los contactos entre células endoteliales disminuyó, mientras que la expresión total de esta proteína no se modificó. Curiosamente, cuando cuantificamos la longitud total de los vasos sanguíneos, segmentos y ramas, no encontramos diferencias significativas, sugiriendo que en este modelo de IR, se altera la estructura y función de la BBB, mientras que la angiogénesis no se promueve. Por último, analizamos mediante Western blot la expresión de ALK5, el receptor de TGF- β , y de las proteínas efectoras SMAD 2/3. En el tejido cerebral de ratas con IR, no encontramos cambios en la expresión del receptor ALK5. Sin embargo, cuando analizamos el contenido total de proteínas SMAD 2 y 3, detectamos una banda aproximadamente a 50 kDa con densidad aumentada a las 24h de IR,

mientras que una segunda banda detectada por debajo de este peso molecular no mostró cambios. Es importante destacar que, utilizando un anticuerpo para detectar la fosforilación de SMAD3 en S425, no observamos diferencias entre condiciones, lo que sugiere que los cambios detectados con el anticuerpo para la proteína SMAD2/3 total se deben principalmente a SMAD2 o a sitios adicionales de fosforilación de SMAD3. En conclusión, la oclusión del ACC induce una disfunción gradual de la BBB sin promover la angiogénesis, y activa la señalización mediada por SMADs.

Abstract

Ischemic cerebrovascular accident (CVA) is characterized by increased blood-brain barrier (BBB) permeability, which is accompanied by the decreased expression of the tight junction protein 5 (Cldn5) and with angiogenesis activation. Recently, it has been proposed that TGF- β -mediated signaling increases after ischemic brain injury. However, the role of TGF- β in regulating BBB properties during CVA is still unknown. Since the TGF- β /ALK5/SMAD 2/3-mediated signaling pathway is required for BBB development and maintenance, it is possible that this pathway is activated as a repair mechanism in CVA. Therefore, the main objective of this work was to evaluate changes in TGF- β -mediated signaling induced by temporary occlusion of the left common carotid artery (CCA), a model of ischemia and reperfusion (IR). For this purpose, the ACC of male Wistar rats was clamped for 2h to induce ischemia. Subsequently, natural reperfusion was allowed and after 3h, 24h and 7 days, the effect of IR on BBB function and structure, angiogenesis and TGF- β signaling was evaluated. We observed that IR induced a gradual increase in vascular permeability to Evans blue in the brain parenchyma, which was significantly high only in the right cerebral hemispheres of rats with ischemia, when these were compared with control rats. By immunofluorescence staining, we further detected that, particularly in permeable vessels, the localization of Cldn5 at endothelial cell-cell contacts decreased, whereas the total expression of this protein was unchanged. Interestingly, when we quantified the total length of blood vessels, segments, and branches, we found no significant differences, suggesting that in this model of IR, BBB structure and function is altered, while angiogenesis is not promoted. Finally, we analyzed by Western blot the expression of ALK5, the TGF- β receptor, and the SMAD 2/3 effector proteins. In brain tissue from rats with IR, we found no changes in ALK5 receptor expression. However, when we analyzed the total SMAD 2 and 3 protein content, we detected a band at approximately 50 kDa with increased density at 24h IR, while a second band detected below this molecular weight showed no change. Importantly, using an antibody to detect SMAD3 phosphorylation at S425, we observed no differences between conditions, suggesting that the changes detected with the antibody for total SMAD2/3 protein are mainly due to SMAD2, or to additional SMAD3 phosphorylation sites. In conclusion, ACC occlusion induces gradual BBB dysfunction without promoting angiogenesis, and activates SMADs-mediated signaling.

1. Introducción

1.1 Desarrollo y maduración del sistema vascular cerebral

Durante el desarrollo del sistema vascular cerebral se distinguen dos etapas: la vasculogénesis que hace referencia a la formación de nuevos vasos sanguíneos y la angiogénesis que es la formación de capilares a partir de otros pre-existentes (Gerecht-Nir *et al.*, 2004).

Después de la gastrulación, la vasculogénesis comienza con la diferenciación de células del mesodermo a angioblastos. Este proceso se realiza a través de la liberación de múltiples factores, de los cuales destaca la participación de: 1) el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y 2) el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGFA) (Kovacic y Boehm, 2009). En ratones, esto se desarrolla entre el día embrionario (DE) 8 y el DE 10; en ratas, comienza en el DE 12 (Daneman *et al.*, 2010), mientras que, en humanos, da inicio en la semana gestacional (SG) 3, aproximadamente (Gerecht-Nir *et al.*, 2004).

Posteriormente inicia la angiogénesis. En ratones a partir del DE 9.5, y en humanos, desde de la SG 8. Atraídas por la liberación de VEGFA glial, las células endoteliales embrionarias migran hacia el neuroectodermo y crecen hasta llegar a la corteza cerebral en desarrollo. Cuando los nuevos brotes endoteliales ingresan al parénquima cerebral, establecen contactos con los pericitos y los pies de astrocitos, y adquieren propiedades de barrera hemato-encefálica (BHE). Este proceso está regulado por vías de señalización específicas que incluyen a la vía de DLL4, Notch y Jagged1 (Trindade y Duarte, 2020; Wälchli *et al.*, 2023).

1.1.1 La barrera hemato-encefálica (BHE)

La BHE regula el intercambio de moléculas, iones y células desde la circulación sanguínea periférica hacia el cerebro con el objetivo de proteger al SNC de sustancias tóxicas (Figura 1) (Profaci *et al.*, 2020; Krady *et al.*, 2020). A diferencia de otros vasos sanguíneos periféricos, el endotelio vascular cerebral no presenta fenestraciones

debido a la presencia de uniones estrechas (UE) que mantienen unidas a las células endoteliales (Sasson *et al.*, 2021).

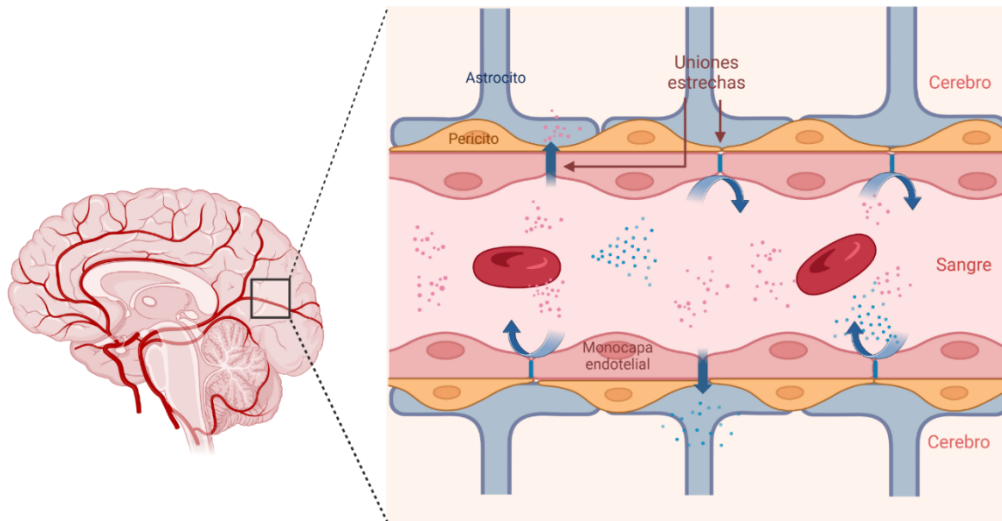


Figura 1. Barrera hemato-encefálica. Se localiza en los vasos sanguíneos que irrigan al cerebro. Se observa la conexión de las células endoteliales por uniones estrechas, además de los pericitos y pies de astrocitos adyacentes que regulan su función. Imagen creada en BioRender.com.

Las UE son complejos proteicos transmembranales que regulan el flujo entre células (paracelular). Las principales proteínas de la unión estrecha son: las claudinas, ocludina y las JAMs. La ocludina regula el flujo dependiente de tamaño a través de la formación de poros inter-endoteliales, mientras que las claudinas regulan el movimiento de iones. Ambas, interactúan con *Zonula occludens* (ZO-1), una proteína localizada en el citoplasma que actúa como una proteína de ensamblaje, conectando a las proteínas transmembranales con los filamentos del citoesqueleto de actina (Figura 2) (Profaci *et al.*, 2020). De esta manera, los complejos de la UE se mantienen anclados en los contactos célula-célula para llevar a cabo su función.

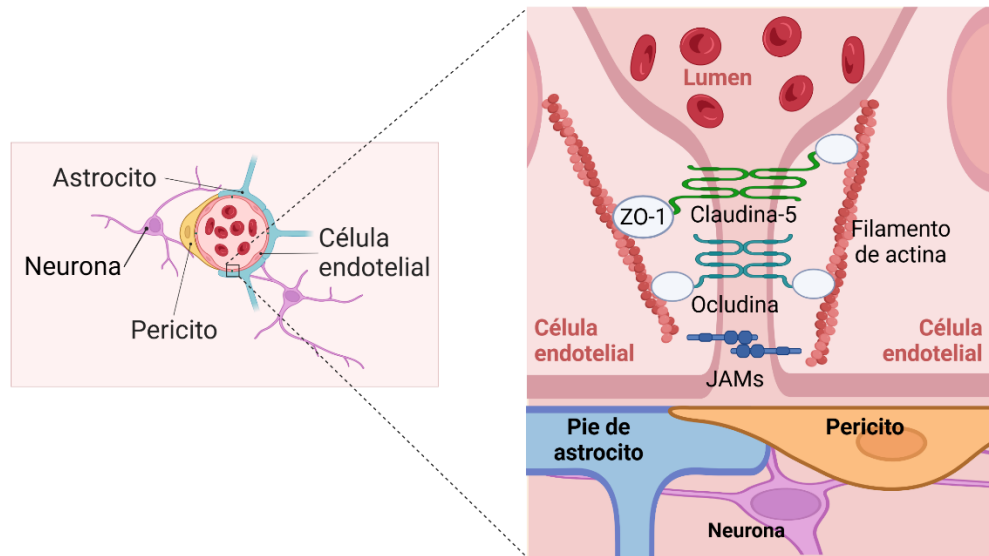


Figura 2. Uniones estrechas inter-endoteliales. Las células endoteliales interactúan con pericitos, pies de astrocitos y neuronas para promover la función de la BHE. Ésta, se regula por la expresión de las proteínas de la unión estrecha: claudina 5 (*Cldn5*), ocludina y moléculas de adhesión de unión (JAMs). Zonula Occludens (ZO-1) mantiene a estas proteínas transmembranales ancladas a la membrana lateral de las células endoteliales y las conecta con los filamentos de actina. Así, los complejos de la unión estrecha restringen la permeabilidad de la sangre al parénquima cerebral. Imagen creada en BioRender.com.

La expresión de *Cldn5* se requiere para la formación de la BHE. Esto ha sido demostrado en embriones de ratones *knockout* (KO) de *Cldn5* y evaluando la permeabilidad de la BHE con un marcador de biotilación. En estos ensayos se observa que los embriones control desarrollan vasos sanguíneos cerebrales con propiedades de BHE, pues el marcador no logra ingresar al SNC. En cambio, en los ratones KO de *Cldn5* se acumula una alta concentración del marcador dentro del parénquima cerebral y la médula espinal, demostrando que sin la expresión de *Cldn5* las células endoteliales no adquieren propiedades de BHE (Nitta *et al.*, 2003). Además, la *Cldn5* se localiza en los contactos inter-endoteliales, ya que en inmunotinciones de montajes completos de embriones de ratón de 12.5 días, se ha observado *Cldn5* localizada en los bordes de las células endoteliales con un patrón similar al obtenido con la tinción de la molécula de adhesión de las células endoteliales a las plaquetas (PECAM, por sus siglas en inglés) (Morita *et al.*, 1999). Consistente con esto, en cerebros de ratones adultos teñidos con anticuerpos para *Cldn5* y caderina del

endotelio vascular (VE-Cadh), ambas marcas co-localizan. Estos resultados indican que la expresión de Cldn5 es necesaria para sellar los espacios inter-celulares de las células endoteliales (Morita *et al.*, 1999).

Maduración de vasos

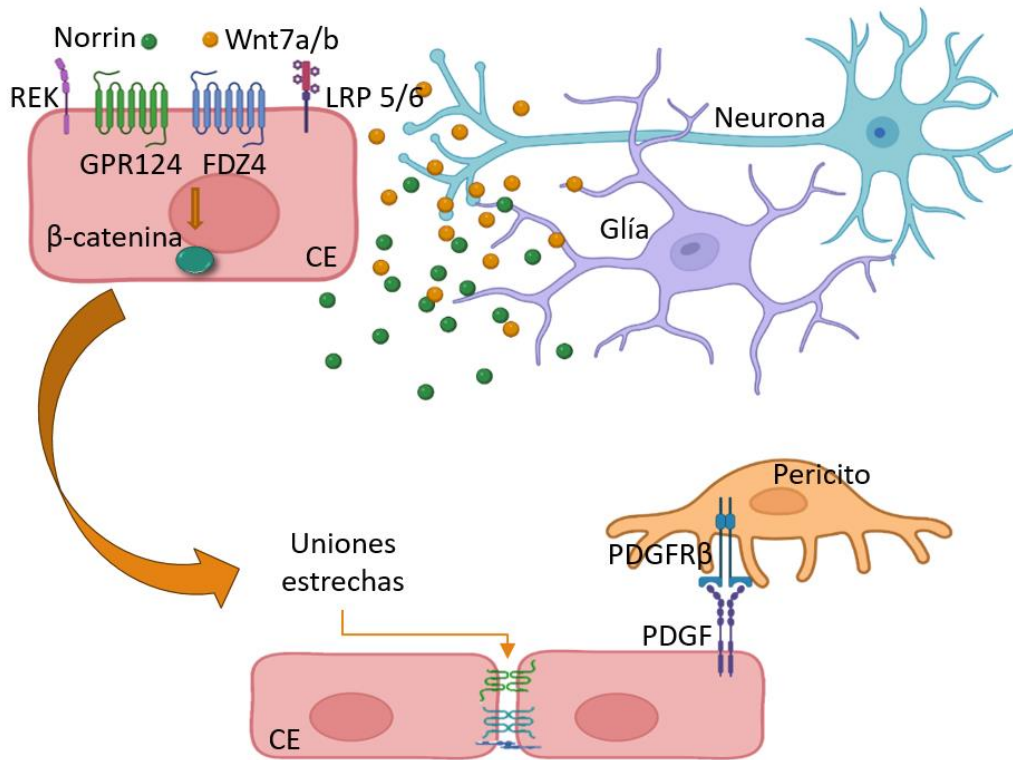


Figura 3. Mecanismos moleculares que regulan la formación de la barrera hemato-encefálica. Los ligandos Wnt7a, Wnt7b y Norrin activan señalización mediada por el receptor Frizzled 4 (FZD4) los co-receptores: proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP 5/6), receptor 124 acoplado a proteína G (GPR124) y cinasa expresada en retina (REK). La β-catenina se activa en las células endoteliales y promueve la transcripción del gen de Cldn5. De manera simultánea, el endotelio secreta el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y se promueve la adhesión de los pericitos, que expresan al receptor PDGFRβ. Imagen creada en BioRender.com.

La expresión de Cldn5 se regula por factores secretados por los astrocitos y los pericitos adyacentes al endotelio (Daneman *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2003) (Figura 4). Los ligandos de Wnt7a, Wnt7b y Norrin, se secretan durante el desarrollo vascular y activan al receptor Frizzled 4 (FZD4) en las células endoteliales. Posteriormente se

reclutan los co-receptores LRP (proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad) 5/6, GPR124 (receptor 124 acoplado a proteína G) y REK (cinasa expresada en retina), y juntos activan a β -catenina. La proteína fosforilada, migra al núcleo y promueve la transcripción de genes que incluyen a *Cldn5*. Además, el endotelio secreta el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que activa la migración de pericitos que se unen con el endotelio a través de su receptor PDGFR β . Juntas, estas señales coordinan la formación de la BHE (Figura 3).

Recientemente se ha propuesto que la señalización mediada por TGF- β 1/ALK5/SMAD 2/3 también se requiere para la formación de la BHE.

1.2 Señalización de TGF- β

En humanos, la familia de TGF- β comprende 33 genes que codifican para diferentes proteínas homodiméricas o heterodiméricas unidas por un enlace disulfuro (Tzavlaki y Moustakas, 2020). En la corteza cerebral de mamíferos, se expresan las isoformas de TGF- β 1, 2 y 3 (Hiew *et al.*, 2021). Aunque estas pueden señalizar a través de los mismos receptores, presentan distinta afinidad con cada uno de ellos y por lo tanto sus efectos biológicos varían dependiendo del contexto celular (Huang, *et al.*, 2014).

TGF- β es una citocina pleiotrópica que, tras su síntesis, sufre modificaciones postraduccionales que generan una forma latente de la proteína. Esta se secreta y se adhiere a la matriz extracelular. Posteriormente, proteasas como la plasmina y metaloproteinasas escinden la forma latente de TGF- β formando dos fragmentos: un segmento largo en el extremo N-terminal, denominado péptido asociado a latencia, y un polipéptido corto en el extremo C-terminal, que corresponde a la forma activa de TGF- β . Cuando este segundo péptido se dimeriza, se une a sus receptores y activa distintas vías de señalización (Tzavlaki y Moustakas, 2020).

Las isoformas de TGF- β 1, 2 y 3 se unen a dos tipos de receptores de serina/treonina: el receptor TGF- β tipo I (TGF β RI) y el receptor TGF- β tipo II (TGF β RII). En células humanas, existen siete isoformas de TGF β RI, también denominados receptores cinasa del linfoma anaplásico (ALK) y cinco isoformas de TGF β RII. El dímero del

ligando TGF- β se une primeramente con el TGF β RII, un receptor de alta afinidad cuyo cambio conformacional permite la aproximación y unión del TGF β RI. Esto favorece que TGF β RII fosforile los sitios de serina localizados en la región intracelular de TGF β RI y se recluten proteínas efectoras que continuarán con la señalización (Tzavlaki y Moustakas, 2020).

1.2.1 Vía dependiente de SMADs

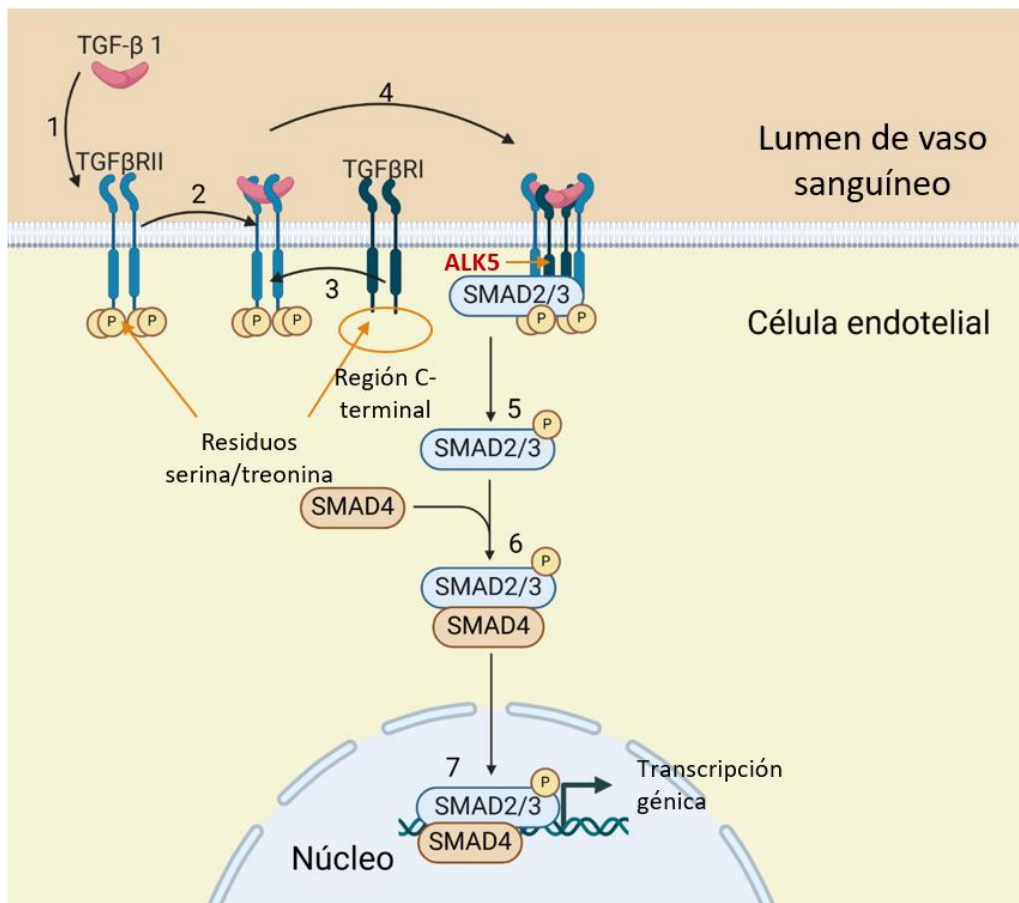


Figura 4. Señalización de TGF- β dependiente de SMADs. 1) El dímero de TGF- β se une a TGF β RII, y forma: 2) el complejo ligando-receptor (L-R). 3) Debido a su cercanía, el complejo L-R interactúa con TGF β RI. 4) El TGF β RII fosforila a TGF β RI para su activación. TGF β RII interactúa con SMAD2/3 para generar la 5) fosforilación y activación de SMAD2/3. 6) La fosforilación de SMAD2/3 permite su interacción con otras SMADs como SMAD4, formando un complejo. 7) El complejo se transporta hacia el núcleo para inducir la expresión de genes. Imagen creada en BioRender.com.

La formación del complejo TGF- β /TGF β RI/TGF β RII induce la fosforilación de diferentes proteínas SMAD (por sus siglas en inglés, *suppressor of mothers against*

decapentaplegic). Específicamente la isoforma 5 del receptor tipo 1, denominado ALK5, se expresa en células endoteliales y activa de manera selectiva a las proteínas SMAD 2 y 3 mediante su fosforilación en residuos de serinas localizadas en las regiones C-terminales. Posteriormente, estas proteínas se unen con SMAD4 para formar un complejo que se transloca al núcleo, se une a factores de transcripción y activan la expresión de genes específicos (Figura 4) (Tzavlaki y Moustakas, 2020).

1.2.2 Vía independiente de SMADs

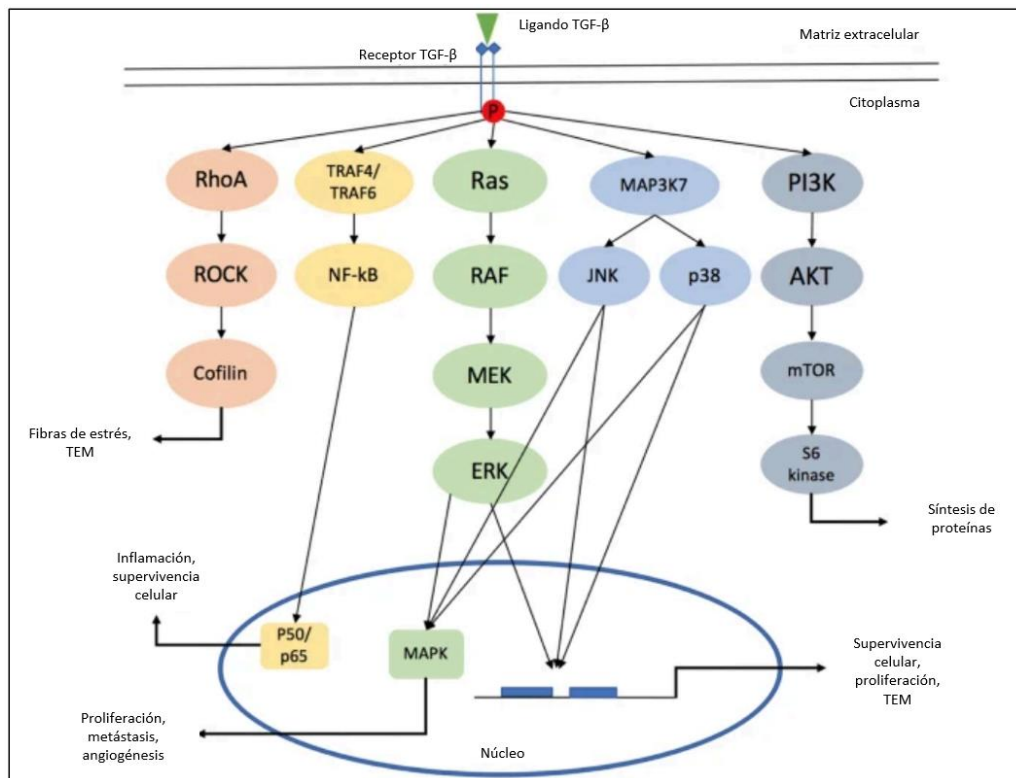


Figura 5. Señalización de TGF- β independiente de SMADs. Las vías de señalización independientes de efectores SMADs tienen distintos efectos celulares incluyendo la regulación de la homeostasis, la supervivencia celular y la activación de la transición epitelio-mesénquima (TEM). Imagen modificada de Alvares et al., 2019.

Otras vías de señalización que se activan a través de los ligandos de TGF- β incluyen: RhoA/ROCK, TRAF4/6, Ras/MEK/ERK, MAP3K7/JNK/p38, y PI3K/AKT (Tie et al., 2022) (Figura 5). En células endoteliales, las vías de Ras, MAP3K7 y PI3K promueven angiogénesis; mientras que la vía RhoA, induce morfogénesis, inflamación y, de acuerdo con algunos estudios, también aumenta la fosforilación de ERK para estimular

proliferación (Deng *et al.*, 2024). La activación de la vía de p38 induce la angiogénesis y junto con otras señales, también controla la permeabilidad endotelial en ratones (Ma *et al.*, 2017). Por otra parte, la vía de MEK/ERK1/2 activa la transcripción de *Elk1* y *c-Fos*, y promueve la migración y proliferación (Harel *et al.*, 2021; Jia *et al.*, 2016).

Los ligandos de TGF- β activan la vía de TRAF4/6 para inhibir la angiogénesis. El complejo TGF- β /TGFBR1/TGFBR2 se asocia con el co-receptor TRAF4/6, que tiene actividad de ligasa de ubiquitina. Esto promueve la poli-ubiquitinación del receptor TGFBR1 y el reclutamiento de la proteína cinasa 1 activada por TGF- β (TAK1). La unión de TAK1 a TRAF4/6 facilita su fosforilación y la activación de las vías de MKK4/p38 y MKK3,6/JNK (Zhang, 2008; Deng *et al.*, 2024). En cultivos celulares, el silenciamiento de TRAF6 induce la migración de células endoteliales a través de la expresión de VEGFA (Bruneau *et al.*, 2012), lo que demuestra su papel inhibitorio en la angiogénesis.

Otra de las vías de señalización mediadas por TGF- β /TGF β RI y TRAF4/6, es a través de la activación del fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K). El complejo de receptores recluta y fosforila a PI3K en la membrana celular (Finnson *et al.*, 2020). En consecuencia, el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) anclado en la membrana se fosforila y forma PIP3. Este último estimula la fosforilación de AKT y de tuberina. Sin un estímulo externo, la tuberina actúa como regulador negativo de mTOR (siglas de *mechanistic target of rapamycin*) y la secuestra en el citoplasma. Sin embargo, cuando AKT se activa, fosforila a tuberina, inactiva su función y libera a mTOR, permitiendo así la transcripción de genes relacionados con la proliferación y diferenciación celular (Deng *et al.*, 2024).

1.2.3 Señalización de TGF- β 1/ALK5 en el desarrollo de la BHE

Recientemente se ha demostrado que la señalización mediada específicamente por TGF- β 1/ALK5 se requiere para la diferenciación de células endoteliales cerebrales. Tanto las células germinales del mesodermo como los angioblastos expresan ARNm de TGF- β 1 (Figura 6) (Yao *et al.*, 2021). Además, en ratones KO de TGF- β 1, los vasos sanguíneos cerebrales presentan tortuosidad y hemorragias entre el DE 12.5 y 14.5

(Dickson *et al.*, 1995; Arnold *et al.*, 2014). Esto es específico de la isoforma TGF- β 1, ya que estas alteraciones vasculares no se observan en los ratones KO de la isoforma TGF- β 3 (Arnold *et al.*, 2014). Un fenotipo semejante se observa en los ratones que se elimina la expresión del receptor ALK5 específicamente en las células endoteliales. Estos animales no sobreviven más allá del DE 10.5 pero además, en los embriones al DE 9.5 se observan agregados vasculares dentro del neuroepitelio que no son funcionales (Nguyen *et al.*, 2011). Consistente con esto, en pez cebra, el tratamiento con un inhibidor de la actividad de ALK5 (LY-364947), impide la diferenciación de angioblastos inmediatamente después de la gastrulación (Abrial *et al.*, 2017). Juntos, estos resultados demuestran el papel del TGF- β 1/ALK5 en la diferenciación vascular cerebral.

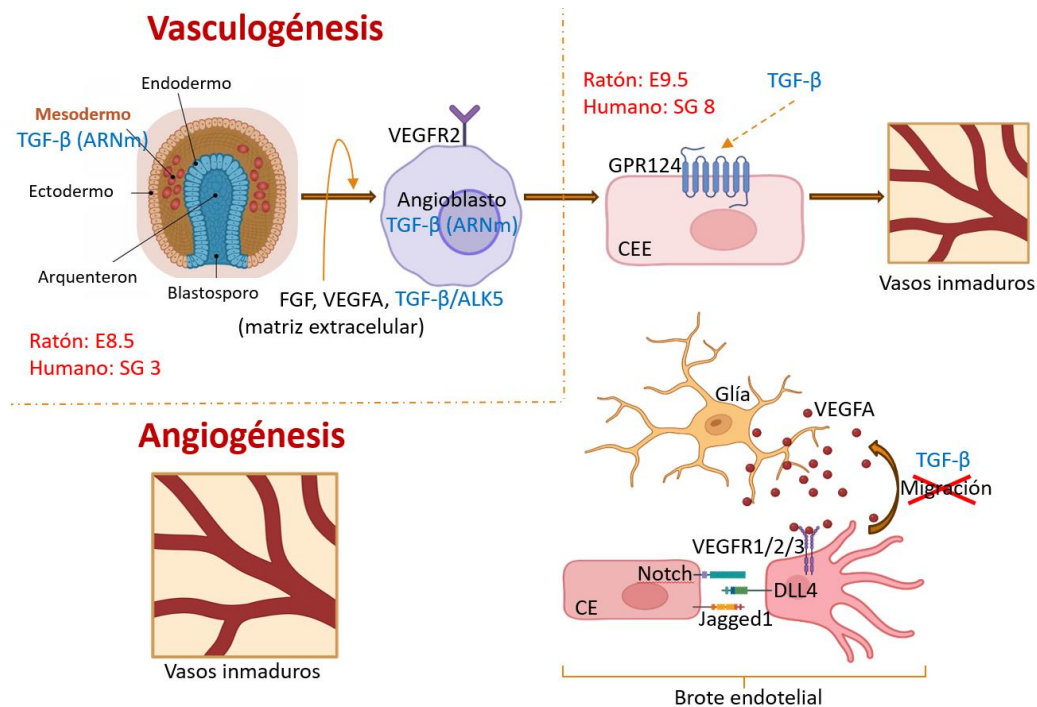


Figura 6. Papel del TGF- β 1 en el desarrollo del sistema vascular cerebral. Durante la vasculogénesis, tanto las células germinales del mesodermo como los angioblastos expresan ARNm de TGF- β 1. Este activa a sus receptores para dar origen a células endoteliales embrionarias (CEE) y formar vasos inmaduros en el neuroectodermo. Posteriormente, las células de la glía secretan VEGFA y estimulan la angiogénesis en la corteza cerebral. Cuando las células endoteliales (CE) ingresan al parénquima cerebral, TGF- β 1 inhibe su migración, las CE expresan DLL4, Notch y Jagged1, se inducen las propiedades de BHE. Imagen creada en BioRender.com.

Otras proteínas de señalización que también regulan el desarrollo vascular cerebral son los receptores de TGF- β tipo 1 (ALK1), tipo 2 (TGF- β RII) y tipo 3 (endoglina). Ratones KO para estas proteínas también provocan angiogénesis aberrante, hemorragias cerebrales y letalidad entre los DE 9.5 y 12.5 (Li *et al.*, 1999; Oh *et al.* 2000; Oshima *et al.*, 1996, Arnold *et al.*, 2014).

Estudios recientes sugieren que la señalización de TGF- β 1 también es necesaria para el mantenimiento de la BHE (Dohgu *et al.*, 2005). Y que, en enfermedades vasculares cerebrales incluyendo el accidente cerebrovascular, su expresión podría conducir a la recuperación de las propiedades de la BHE ocasionadas por el daño isquémico (Zhang *et al.*, 2022). Sin embargo, el papel del TGF- β 1 en la regulación de las propiedades de la BHE aún no se entiende por completo.

1.3 El accidente cerebrovascular (ACV)

El ACV es una lesión caracterizada por la interrupción del flujo sanguíneo al cerebro. Esta afección provoca la muerte del tejido con baja irrigación sanguínea debido a la falta de nutrientes y oxígeno, que además pueden promover el deterioro cognitivo a largo plazo (Zhao *et al.*, 2022).

En el año 2022 se reportaron 6,552,724 defunciones por ACV en el mundo (WSO, 2022). De las cuales, en México ocurrieron alrededor de 35,798, con una tasa de 32.2 muertes por cada 100 mil habitantes (DGIS, 2024). Esto representa la segunda causa de muerte a nivel mundial y la sexta causa de muerte a nivel nacional.

El tratamiento principal para el ACV isquémico es limitado. Consiste en el uso de fármacos trombolíticos que son eficaces únicamente dentro de las primeras 4.5h después de que se presenta el accidente isquémico (Zhao *et al.*, 2022). Pasado este tiempo, los pacientes presentan un mayor núcleo isquémico que ya no es recuperable y tienen el riesgo de que el tratamiento provoque hemorragia y muerte en los pacientes (Mosconi y Paciaroni, 2022).

No todos los pacientes son candidatos para recibir este tratamiento. Este solo es aplicable para aquellos pacientes cuyas lesiones isquémicas están asociadas a la oclusión por trombos (Zhao *et al.*, 2022). Además, existen pacientes que por la ausencia de síntomas no acuden al hospital y, por lo tanto, no reciben el tratamiento. Esto resalta la importancia de generar nuevos tratamientos para el ACV.

Una de las características principales del ACV es la disfunción de la BHE. Esto se ha demostrado en ratones C57BL6/J, en los que la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (OtACM) incrementa la permeabilidad de la BHE (Hone *et al.*, 2018). Consistente con esto, en ratas Sprague-Dawley, la oclusión de la arteria cerebral media (OACM) induce la expresión de VEGFA (Yang y Torbey, 2020) y estimula la angiogénesis de en el núcleo isquémico formando vasos sanguíneos que son altamente permeables (Krupinski *et al.*, 2003). Además, en cultivos de células endoteliales de cerebro de ratón estimuladas con hipoxia, la expresión y localización de Cldn5 se reduce en las uniones inter-endoteliales (Andjelkovic y Keep, 2016). Juntos, estos estudios demuestran las alteraciones en la BHE que se inducen por isquemia durante el ACV.

2. Antecedentes

La vía de TGF- β 1/AK5 se requiere para el desarrollo de la BHE (Arnold *et al.*, 2014; Li *et al.*, 1999; Oh *et al.* 2000; Oshima *et al.*, 1996). Primeramente, ratones que no expresan a estas proteínas muestran una letalidad entre los DE 9.5 y 12.5, lo que coincide con el tiempo de maduración de las células endoteliales en BHE. Además, los brotes endoteliales en desarrollo presentan alteraciones morfológicas y una alta permeabilidad, demostrando la importancia de esta vía de señalización durante la formación de la BHE.

Estudios recientes sugieren que la señalización mediada por el TGF- β 1 también es necesaria para el mantenimiento de la BHE, sin embargo, su papel aún no se entiende por completo. En tejido de ratones adultos, TGF- β 1 se expresa tanto en pericitos como en células endoteliales cerebrales (Walshe *et al.*, 2009). En co-cultivos de endotelio y

pericitos de rata, el tratamiento con SB431542, un antagonista del receptor ALK5, induce la permeabilidad de la monocapa endotelial (Dohgu *et al.*, 2005). Este estudio apoya el papel del TGF- β 1/ALK5 en la inducción de las propiedades de la BHE. Paradójicamente, en el cultivo de células pluripotentes inducidas, cuando estas se diferencian a células endoteliales cerebrales, el tratamiento con otro inhibidor de ALK5 (A-83-01) aumenta la expresión de las proteínas de la unión estrecha ocludina, ZO-1 y Cldn5 (Yamashita *et al.*, 2020). Por lo tanto, se requieren más estudios para dilucidar el papel específico de esta señalización en la regulación de la BHE.

Asimismo, en enfermedades vasculares cerebrales incluyendo el ACV, se ha sugerido que la señalización mediada por TGF- β 1 podría conducir a la recuperación de las propiedades de la BHE ocasionadas por el daño isquémico. El TGF- β aumenta tanto en pacientes como en modelos de ACV. En pacientes con ACV, hay una mayor expresión de proteínas y ARNm de TGF- β 1 localizada en zonas periféricas al infarto cerebral (Krupinski *et al.*, 1996). Mientras que, en ratas sometidas a la OACM, el TGF- β 1 aumenta después de tres días, lo que coincide con el tiempo donde se observa una mayor densidad de microvasos formados tras la IR (Meng *et al.*, 2016). Consistentes con estos resultados, estudios más recientes en ratas Sprague-Dawley con t y posterior reperusión, demuestran que la expresión de TGF- β 1 y la fosforilación de SMAD 2 y 3 aumenta en el tejido isquémico al ser comparado con los grupos control. De manera importante, el tratamiento con vitamina D activa aún más esta señalización y esto correlaciona con la disminución de la permeabilidad de la BHE y la angiogénesis (Zhang *et al.*, 2022), sugiriendo un mecanismo de reparación tisular durante la isquemia cerebral.

3. Justificación

La señalización activada por TGF- β 1, a través de su receptor ALK5 se requiere para la formación de la BHE. Estudios recientes sugieren que esta señalización también es necesaria para el mantenimiento de la BHE y, en el accidente cerebrovascular isquémico, su expresión podría conducir a la recuperación de las propiedades de la BHE. No obstante, el papel del TGF- β 1 en la regulación de las propiedades de la BHE aún no se entiende por completo. Estudiar la activación de la señalización mediada por TGF- β bajo condiciones isquémicas, nos ayudará a describir nuevos mecanismos que promuevan la función de la BHE en enfermedades cerebrovasculares.

4. Hipótesis

La oclusión temporal unilateral de la arteria carótida común:

- a) Inducirá la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica
- b) Disminuirá la expresión de Cldn5 en los contactos endoteliales
- c) Promoverá la angiogénesis
- d) Activará la señalización mediada por TGF- β /ALK5/SMAD 2/3

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la isquemia y reperfusión en la disfunción de la barrera hemato-encefálica, y su asociación con los cambios en la vía de señalización de TGF- β .

5.2 Objetivos específicos

En la oclusión de la arteria carótida común, un modelo de isquemia y reperfusión:

1. Evaluar la disfunción de la barrera hemato-encefálica mediante la permeabilidad de azul de Evans al parénquima cerebral.
2. Observar las alteraciones en la estructura de la barrera hemato-encefálica con la expresión y localización de claudina-5.

3. Determinar la promoción de la angiogénesis mediante el análisis morfométrico de los vasos sanguíneos.
4. Analizar los cambios en la activación de la señalización mediada por TGF- β 1/ALK5/SMAD 2/3 mediante Western blot.

6. Diseño experimental

Para determinar el efecto de la isquemia y reperfusión (IR) en la disfunción de la barrera hemato-encefálica y su asociación con los cambios en la vía de señalización de TGF- β , utilizamos un modelo que consiste en la oclusión temporal unilateral de la arteria carótida común (ACC) izquierda.

En estudios previos en con ratas a las que se induce IR por OtACM, se ha observado que un periodo isquémico menor a 3h produce una lesión con un núcleo de infarto reversible. Posterior a este tiempo, la intervención solo impide la expansión del núcleo de infarto (Ma R. et al. 2020). Además, al inducir reperfusión se observan diversos fisiológicos y patológicos que se dividen en tres fases: aguda (24 h), subaguda (3 días) y de recuperación crónica (7 días). Para ser consistentes con estos estudios y observar la temporalidad de los eventos que ocurren en la oclusión temporal de la ACC, se indujo isquemia en ratas Wistar macho durante 2h. Posteriormente se permitió la reperfusión natural y después de 3h, 24h y 7 días, se evaluó el efecto de la IR sobre la función y estructura de la BBB, la angiogénesis y la señalización de TGF- β .

Se eligió la ACC izquierda debido a que estudios previos reportan que esta arteria tiene una velocidad de flujo sanguíneo significativamente mayor al de la ACC derecha (Hernández S.A.R. et al. 2003). Por lo tanto, el infarto cerebral es mayor cuando se induce isquemia por oclusión de esta arteria. Además, en pacientes con ACV, es más frecuente esta obstrucción (Portegies M.L.P. et al. 2015). Por irrigación sanguínea, se sabe que la obstrucción de la ACC izquierda induce isquemia primordialmente en el hemisferio cerebral derecho y por esta razón, se espera observar la la mayor parte de las alteraciones vassculares en este hemisferio. No obstante, analizamos el efecto de IR en ambos hemisferios cerebrales y en el texto nos referiremos a ellos como: hemisferio derecho (HD) y hemisferio izquierdo (HI).

Los animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales, cada uno de los cuales estuvo formado por 4 animales (n=4):

- 1) Sham. Ratas manipuladas quirúrgicamente a las que no se les realizó la oclusión, pero que permanecieron con la incisión durante 2h.
- 2) IR. Ratas a las que se les realizó la oclusión temporal de la ACC izquierda.

En estos animales se realizaron los siguientes experimentos:

Experimento 1. La disfunción de la barrera hemato-encefálica se evaluó midiendo la permeabilidad de azul de Evans al parénquima cerebral después de 3h, 24h y 7 días de IR.

Experimento 2. Las alteraciones en la estructura de la barrera hemato-encefálica se observaron mediante el análisis de expresión (Western blot) y localización (inmunofluorescencia) de claudina-5 a 3h, 24h y 7 días de IR.

Experimento 3. La promoción de la angiogénesis se determinó mediante el marcaje de vasos sanguíneos cerebrales con IB4. Por análisis morfométrico, se cuantificó la longitud de vasos totales, de ramificaciones y segmentos, así como el número total de estos. Debido a que la angiogénesis en modelos agudos de oclusión se ha observado a los 7 días de IR, esta cuantificación solamente se realizó en este tiempo. Además, puesto que la angiogénesis se promueve principalmente en las zonas de infarto cerebral, también observamos la formación de zonas de infarto mediante tinciones con cloruro de trifeníl-2, 3, 5-tetrazolio (TTC).

Experimento 4. La activación de la señalización mediada por TGF- β 1/ALK5/SMAD 2/3 se evaluó mediante Western blot. Se utilizaron anticuerpos para detectar de manera específica al receptor ALK5 y a las SMAD 2 y 3 totales, y la activación de SMAD3 mediada por su fosforilación en la S425. Estos análisis se realizaron a 3h, 24h y 7 días de IR, ya que estos tiempos nos permiten observar la cinética de activación de estas proteínas y su asociación con las alteraciones vasculares inducidas por IR.

7. Metodología

7.1 Animales

Todo procedimiento ha sido realizado bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y siguiendo el protocolo No. 0357-23, el cual, fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV.

Los animales se obtuvieron del bioterio del Cinvestav – Sede Sur. Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de entre 250-300 g y se mantuvieron dentro de cajas de acrílico, usando un ciclo luz/oscuridad invertido y dejando libre acceso a agua y alimento.

7.2 Modelo de isquemia y reperfusión (IR)

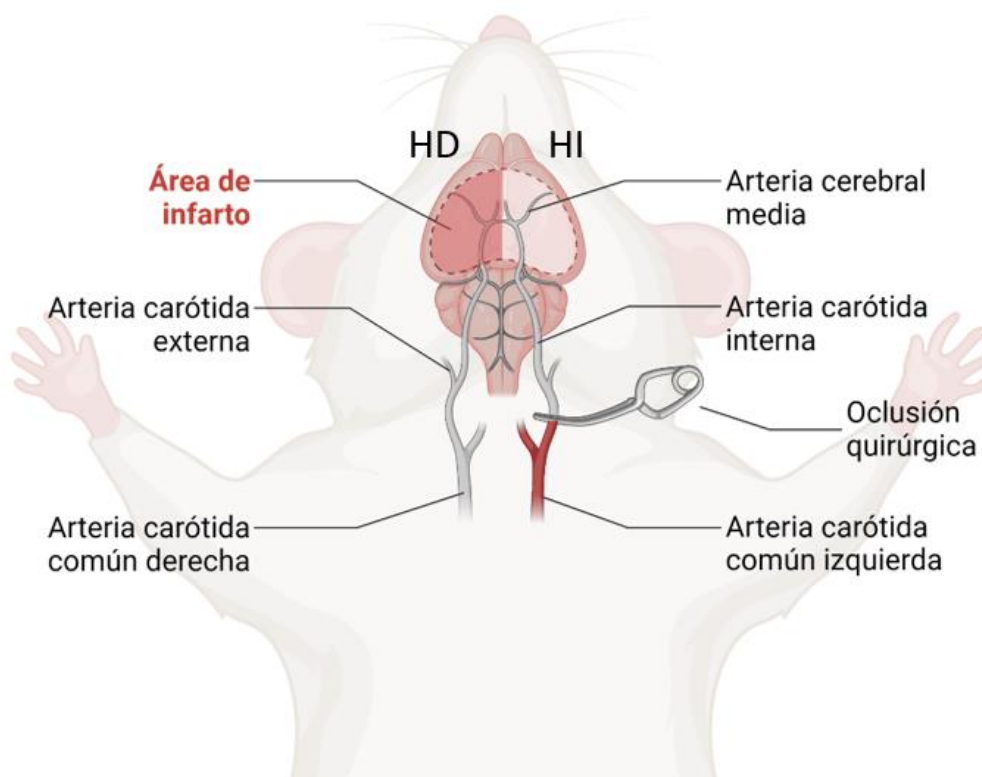


Figura 7. Oclusión temporal de la arteria carótida común izquierda, modelo de IR. Esquema donde se observan las arterias principales que irrigan al SNC. Se ejemplifica el sitio de oclusión y el área de infarto. HD: hemisferio derecho; HI: hemisferio izquierdo. Imagen creada en BioRender.com.

Se realizó la oclusión unilateral de la arteria carótida común (ACC) izquierda (Figura 7) utilizando material de disección lavado y esterilizado. En ratas anestesiadas con ketamina (100 mg/mL/g de peso; vía *I.P*) y xilazina (0.1mg/ml/g de peso; vía *I.M.*), se realizó una incisión de 1 cm (aproximadamente) en la línea media ventral del cuello, separando los tejidos subcutáneos y desplazando de forma lateral los músculos tiroideo, homoideo, esternohioideo y esternocleidomastoideo, y exponiendo la ACC izquierda. Para reducir el flujo de sangre al cerebro, se utilizó una pinza dentada de 12 cm. Después de 2h de oclusión, se retiró la pinza para permitir la reperfusión natural durante 3h, 24h y 7 días.

7.2.1 Tinción del tejido cerebral con cloruro de trifeníl-2, 3, 5-tetrazolio (TTC)

Los cerebros se colectaron y mantuvieron en una disolución de sacarosa al 30%, fría, durante 5 minutos para retirar la sangre. Se realizaron cortes coronales a la altura de bregma +1.0 mm hacia la zona anteroposterior, con un grosor de 1 mm. Las rebanadas fueron sumergidas en solución de cloruro de trifeníl-2, 3, 5-tetrazolio (TTC) al 5% durante 30 min. Posteriormente, las rebanadas fueron lavadas, sumergiendo el tejido en PBS 1x durante 5 minutos, dos veces y se colocaron en solución de formaldehído al 4% durante 5 min para su preservación. Finalmente, se tomaron imágenes de los cerebros con una cámara digital.

7.3 Permeabilidad de azul de Evans

Después de anestesiarse a los animales con ketamina/xilazina, se realizó una incisión en el interior de la pata posterior de cada animal para ubicar la vena femoral. Se inyectó azul de Evans con una dosis de 45g/kg de peso, vía *I.V.* Después de dos horas, los animales fueron decapitados con guillotina. Los cerebros fueron extraídos en frío y se sumergieron en 2-metilbutano durante 5 min a una temperatura de -70 °C. Posteriormente, se almacenaron a una temperatura de -70 °C hasta su procesamiento.

Para obtener muestras de rebanadas de cerebro, se utilizó un criostato marca Leica para realizar los cortes de cerebros. Los cerebros fueron seccionados de forma coronal

a la altura de bregma +1.0 mm - interaural 10.0 mm, en rebanadas con un grosor de 20 micras, las cuales, fueron montadas en portaobjetos tratados con poli-L-lisina.

Para analizar la fluorescencia del colorante de azul de Evans (470 - 540 nm), se observaron las rebanadas utilizando un microscopio de epifluorescencia modelo Nikon eclipse Ti-U. Se tomaron tres imágenes por cada hemisferio analizado (Figura 8) y se determinó la intensidad de fluorescencia emitida (unidades arbitrarias de fluorescencia o UAF) en cada imagen por medio del programa *ImageJ*. Los valores de cada hemisferio se promediaron y el número obtenido fue considerado como el valor representativo de cada muestra.

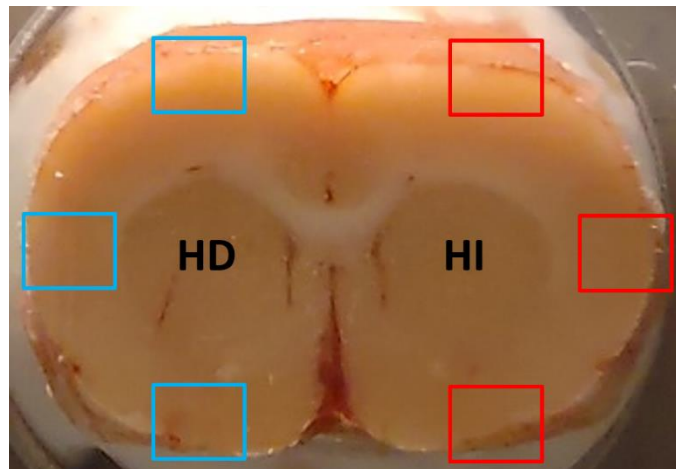


Figura 8. Regiones de análisis de la permeabilidad de azul de Evans. Los cuadros azules indican las regiones analizadas en el hemisferio derecho (HD), mientras que los cuadros rojos señalan las regiones analizadas en el hemisferio izquierdo (HI).

7.4 Inmunofluorescencia

Las rebanadas se fijaron con formaldehído al 4% durante 10 minutos. Posteriormente se hicieron lavados con PBS1x (pH 7.3) durante 5 min, tres veces. Se añadieron 100 microlitros de solución de Quenching (Tris 10 mM; Glicina 100 mM) durante 10 min. Posterior a ello, se realizaron otros tres lavados y las muestras se incubaron con solución de bloqueo (100 μ l de buffer de lavado con BSA al 1%) durante 1 h. Posteriormente, los cortes se incubaron tres días a 4°C con 100 μ l de solución que incluía anticuerpo policlonal de Cldn5 anti-conejo, marca Abcam y anti-isolectina B4

acoplado a Alexa Fluor 647 marca Thermo Fisher, ambos, a una concentración de 1:200. Las muestras fueron lavadas cuatro veces durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras se incubaron durante 1h, usando 200 µl de solución con anticuerpos secundarios anti- conejo acoplado a Alexa Fluor 488, marca Abcam y tinción de Hoechst 33342 marca Thermo Fisher, ambos, con una concentración 1:400. Se realizaron tres lavados durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se les retiró el exceso de líquido y se les añadió una gota de medio de montaje Prolong Gold marca Thermo Fisher para luego cubrirlas con un cubreobjetos limpio y seco. Finalmente, las muestras se dejaron secar durante dos días a temperatura ambiente en un lugar cubierto de la luz.

7.5 Western blot

Se usaron muestras de animales sham y animales con isquemia de 2 h y posterior reperusión de 1 h, 24h y 7 días. La extracción de las muestras se realizó utilizando hielo seco para evitar la degradación proteica. Se extrajo la corteza cerebral, separando los hemisferios. El tejido fue prensado y conservado a -70°C. Posteriormente, se trituroó con el uso de un mortero y se homogeneizó con buffer de lisis con el siguiente contenido:

Reactivo	Concentración
NaCl	150 mM
NP-40	2%
EDTA	2 mM
Glicerol	10 %
Tris	50 mM, pH 7.5
NaVO ₄	1mM
NaF	10 mM
P ₂ O ₇ ⁻⁴ [Na] ⁺¹	10 mM
Benzamidina	1mM
Inhibidor de proteasas	1 tableta por cada 10 mL de solución amortiguadora; marca Roche Diagnostics GmbH, No. De Catálogo 11836170001.
Inhibidor de fosfatasas	1 tableta por cada 10 mL de solución amortiguadora; marca Roche Diagnostics GmbH, No. De Catálogo 04 906 845 001

El lisado se centrifugó durante 10 min (10 000 XG; 4°C). Se hicieron alícuotas y se mantuvieron a -70°C hasta su uso. Para la cuantificación de proteínas, se realizó una curva de calibración a partir de un estándar de albúmina de suero bovino. Las concentraciones de los estándares fueron de 4000, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 y 125 µg/ml. Se utilizó el método de Bradford como se describe a continuación.

Se colocaron 5 µl de cada estándar, muestra desconocida o muestra blanco en una placa de 96 pocillos para analizar por espectrofotometría. Se añadieron 250 µl de reactivo de Bradford y se dejaron reposar las preparaciones durante 10 min en la oscuridad para luego leer la placa completa a 595 nm en un espectrofotómetro.

Se calculó el volumen necesario para obtener 30 µg por muestra, se prepararon las muestras con reactivo de Laemmli 4x (Tris base 6.25 mM; SDS 2%; glicerol 10%; 2-mercaptoetanol 5%; 50 mg de azul de bromofenol por cada 50 mL), y se completaron a un volumen de 30 µL. Se realizó un choque térmico (5 min a baño maría/5 min en hielo) en las muestras ya prearadas para inducir la desnaturalización de las proteínas.

Las muestras se corrieron por electroforesis utilizando geles de poliacrilamida (gel concentrador al 5%; gel separador al 12%). Se corrieron a 70 V durante los primeros 15 min y 90 V durante las siguientes 2 h. Se realizó una transferencia húmeda, utilizando membranas de nitrocelulosa. Luego, las membranas se bloquearon con proteína de leche baja en grasa al 5% durante 1h. Después, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios correspondientes (Cldn5 anti-conejo, marca Abcam; p-SMAD3 S425 anti-ratón, marca Santa Cruz; ALK5 anti-ratón, marca Sino biological; GAPDH anti-ratón, marca Santa Cruz y actina anti-ratón, marca Abcam) a una concentración 1:5000 durante una noche para luego lavar las membranas con TTBS (buffer TBS + Tween 0.1%) 3 veces durante 5 min. Finalmente, se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes (HRP de ratón o conejo; concentración 1:5000) durante 3h y se revelaron con un kit de luminol marca Bio-Rad para la cuantificación de la densidad de las bandas obtenidas utilizando en programa *ImageJ*.

7.6 Cuantificación de angiogénesis

Las imágenes obtenidas fueron procesadas con la herramienta *Angiogenesis analyzer* del programa *ImageJ*. Se realizó un esquema de arborización vascular a partir de tinciones de inmunofluorescencia para isolectina B4 (IB4). El esquema de arborización mostró segmentos de vasos sanguíneos (azul), segmentos principales (amarillo) y sus ramas (verde), puntos de intersección (puntos rojos) (Figura 9). Los valores de longitud total de vasos sanguíneos, longitud total de segmentos, longitud total de ramas, número de segmentos y número de ramificaciones, fueron promediados para obtener un valor representativo de cada muestra.

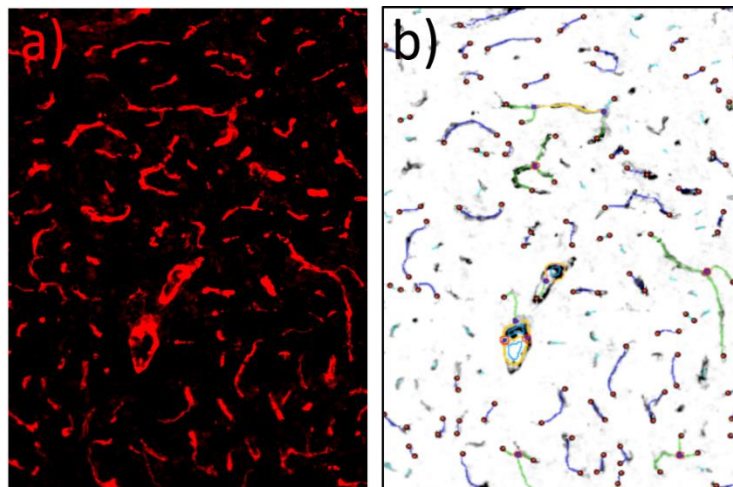


Figura 9. Esquema de arborización obtenido para la cuantificación de angiogénesis. a) Tinción de IB4 en corteza de cerebros de ratas sham. b) Esquema de arborización obtenido de la imagen muestra: segmentos de vasos sanguíneos (azul), vasos sanguíneos principales (amarillo) y sus ramas (verde), puntos de intersección (puntos rojos).

7.7 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de una vía, seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey.

8. Resultados

8.1 La oclusión temporal de la ACC induce la disrupción de la BHE

La disfunción de la barrera hemato-encefálica (BHE) se evaluó mediante la permeabilidad de azul de Evans al parénquima cerebral, después de inducir IR durante 3h, 24h y 7 días. La extravasación del colorante se analizó por fluorescencia en secciones de tejido cerebral. Como marcador de vasos sanguíneos se utilizó la inmunotinción de IB4 y la estructura de la BHE se observó mediante la tinción de Cldn5 en los contactos endoteliales.

Se encontró que en los grupos sham, el colorante de azul de Evans se mantuvo exclusivamente dentro de los vasos sanguíneos y, al examinar la localización de Cldn5, se observó una organización lineal en los bordes de los vasos sanguíneos, lo que corresponde a la morfología típica de Cldn5 (Figura 10a). En el caso de los HI de los animales con IR de 3h, la extravasación del colorante fue mínima por lo que, al analizar la fluorescencia emitida, no hubo un aumento significativo en comparación con los grupos sham. En cambio, en los HD de los animales con oclusión, se observó una permeabilidad significativamente mayor en comparación con el grupo sham (Figura 10b). Además, al analizar la localización de Cldn5, se observó una pérdida de Cldn5 alrededor de los capilares con mayor permeabilidad.

En los animales con IR de 24h, se observó que, similar al grupo IR de 3h, la permeabilidad de los HI aumentaba en comparación con los grupos sham, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. En cambio, los HD presentaron una permeabilidad 10 veces mayor en comparación con los grupos sham, además de mostrar un desarreglo de Cldn5 en los vasos más permeables, es decir, la Cldn5 perdió su estructura lineal que se observa en el grupo control (Figura 11).

En los animales con IR de 7 días, la permeabilidad del azul de Evans aumentó en ambos hemisferios. En comparación con los animales sham, los HI mostraron una permeabilidad 6 veces mayor, mientras que, en los HD, la permeabilidad incrementó 37 veces (Figura 12). En ambos casos, se encontró una baja distribución de Cldn5 en

los contactos endoteliales y especialmente en los vasos sanguíneos permeables. Juntos, estos datos demuestran que la oclusión de la ACC induce gradualmente la disfunción de la BHE.

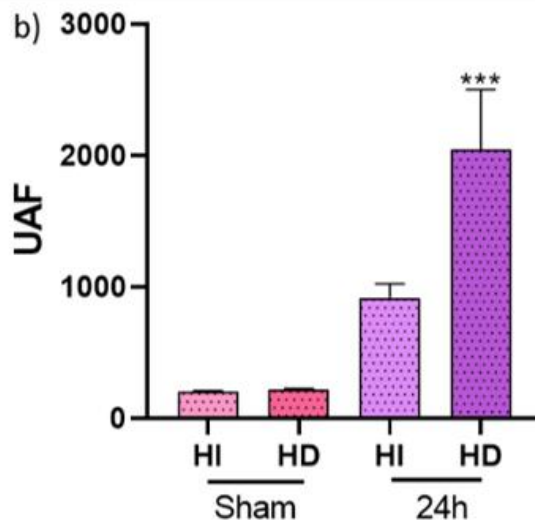
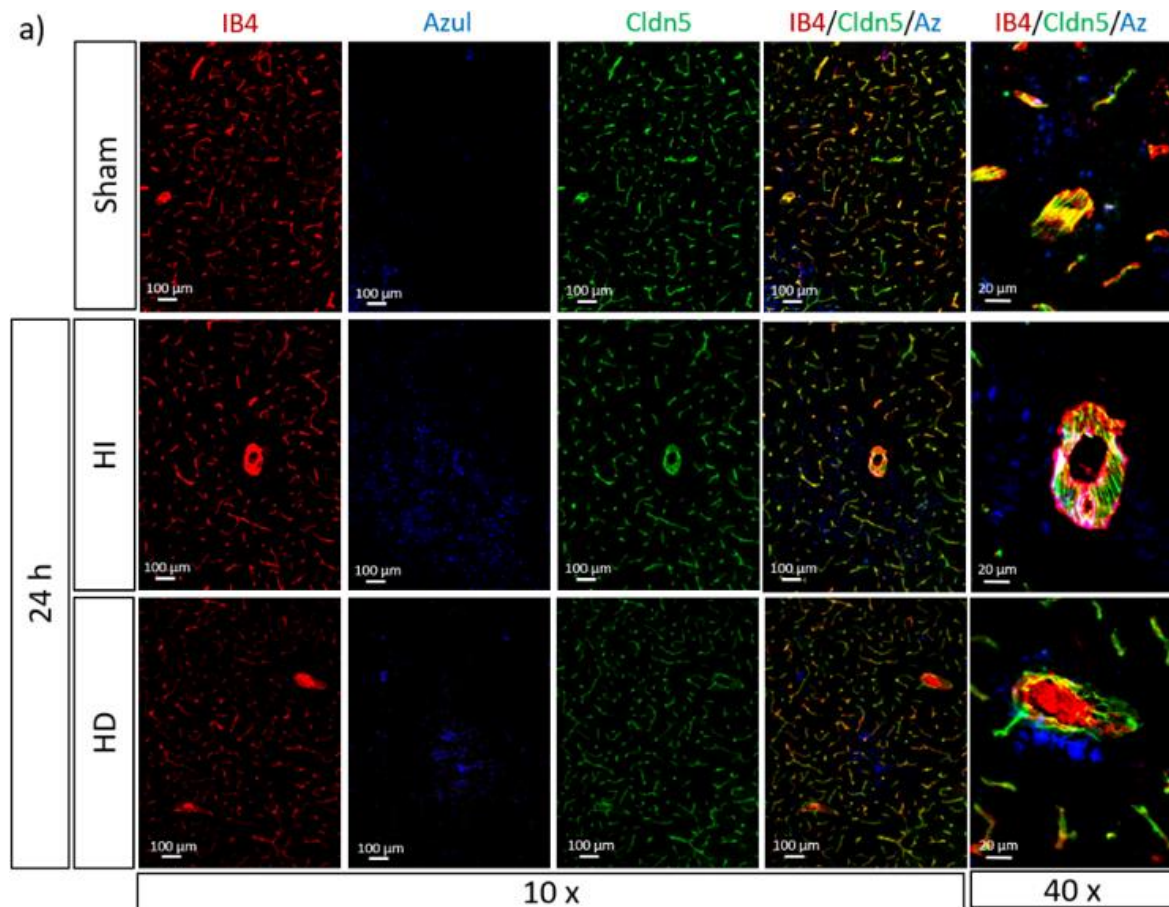


Figura 11. La oclusión de la ACC aumenta la permeabilidad de azul de Evans después de 24h de reperusión.

a) Tinción por inmunofluorescencia de IB4 (rojo), Cldn5 (verde) y azul de Evans (azul, Az) en ratas sham, y con IR de 3h. b) cuantificación de fluorescencia del azul de Evans. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc de Tukey. *** $P < 0.001$ con respecto a sham; $n = 4$. HI: hemisferio izquierdo; HD: hemisferio derecho; UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia. Los datos se reportan como media \pm E.E.

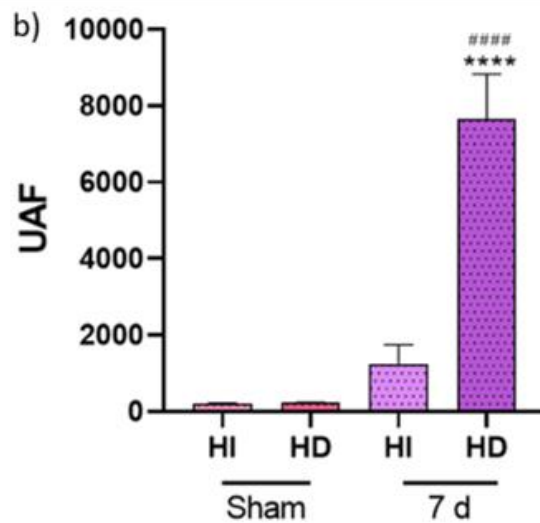
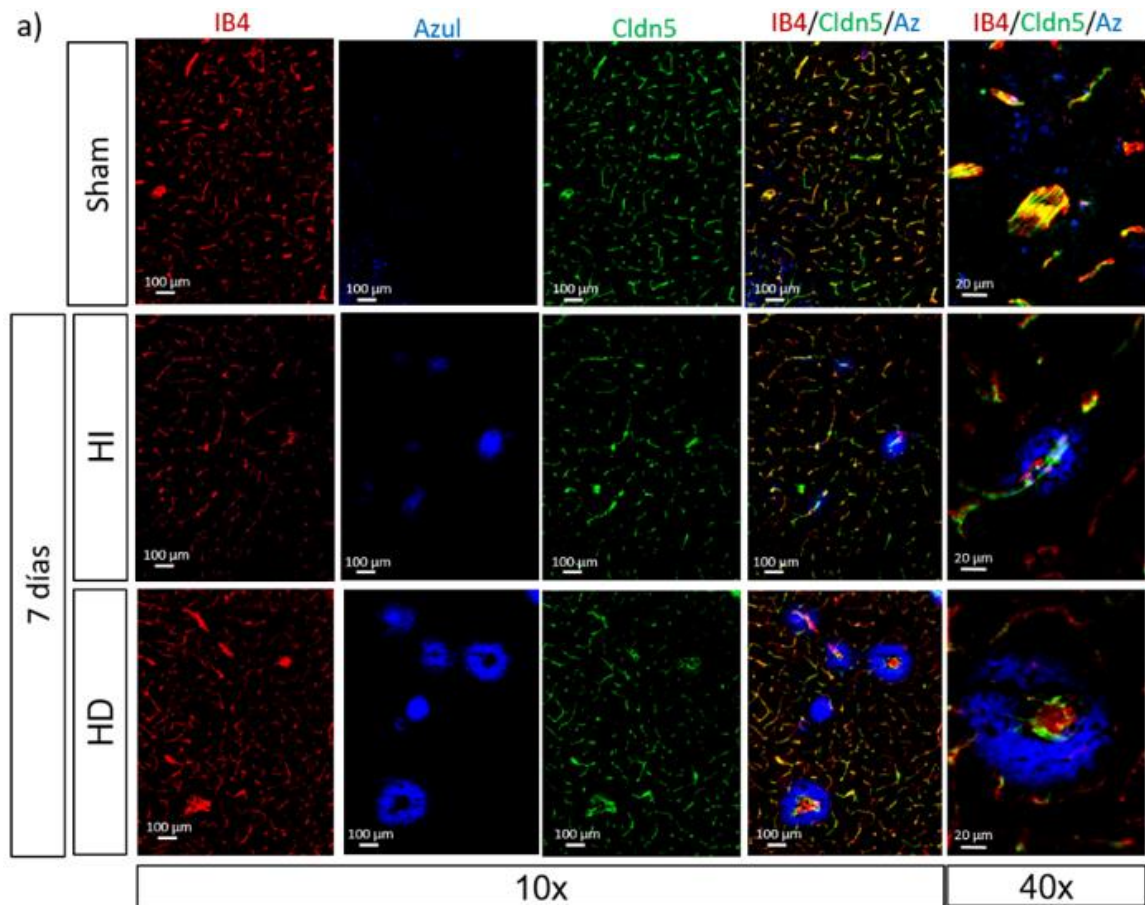


Figura 12. La oclusión de la ACC aumenta la permeabilidad de azul de Evans después de 7 días de reperusión. a) Tinción por inmunofluorescencia de IB4 (rojo), Cldn5 (verde) y azul de Evans (azul, Az) en ratas sham, y con IR de 3h. b) cuantificación de fluorescencia del azul de Evans. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc de Tukey. **** $P < 0.0001$ con respecto a sham, y #### $P < 0.0001$ con respecto al hemisferio contralateral o HI; $n=4$. HI: hemisferio izquierdo; HD: hemisferio derecho; UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia. Los datos se reportan como media \pm E.E.

También analizamos el contenido total de Cldn5. Para esto se utilizaron lisados de tejido cortical tanto de animales con IR como de animales de grupo sham que fueron procesados para su análisis por Western blot. Consistente con los resultados de inmunofluorescencia, observamos que el contenido total de Cldn5 no se modifica con la IR (Figura 13), sugiriendo que los cambios en la permeabilidad vascular están asociados a la localización de Cldn5 y no a su expresión.

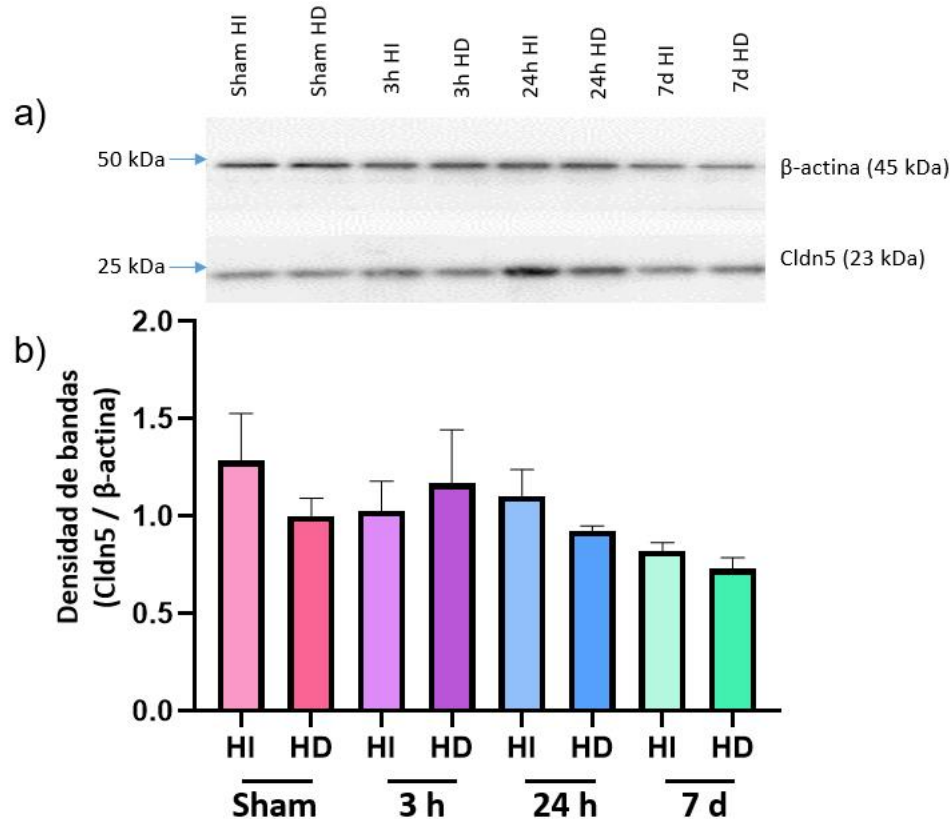


Figura 13. La oclusión de la ACC no altera la expresión de Cldn5. a) Imagen representativa del Western blot de Cldn5 de la corteza cerebral de ratas sham (Control) e IR. b) Densitometría de las bandas de Cldn5 con respecto al control de carga (Actina). Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc de Tukey. Sham, 3h y 24h con una $n=4$, 7 días con $n=3$. HI: hemisferio izquierdo; HD: hemisferio derecho. Los datos se reportan como media \pm E.E.

8.2 La oclusión temporal de la ACC no promueve angiogénesis

Estudios anteriores reportan que la isquemia y reperfusión promueve la angiogénesis principalmente en las zonas de infarto cerebral (Krupinski *et al.*, 2003). Para determinar

si el modelo de oclusión temporal de la ACC puede inducir la angiogénesis de la vasculatura cerebral, se procesaron imágenes de fluorescencia para IB4 de ratas con IR de 7 días para el análisis de distintos patrones vasculares (Figura 14a). Las imágenes fueron convertidas a escala de grises, y a partir de estas, se generó un esquema de la arborización vascular por medio de la herramienta *Angiogenesis analyzer* del programa *ImageJ* (Figura 14b).

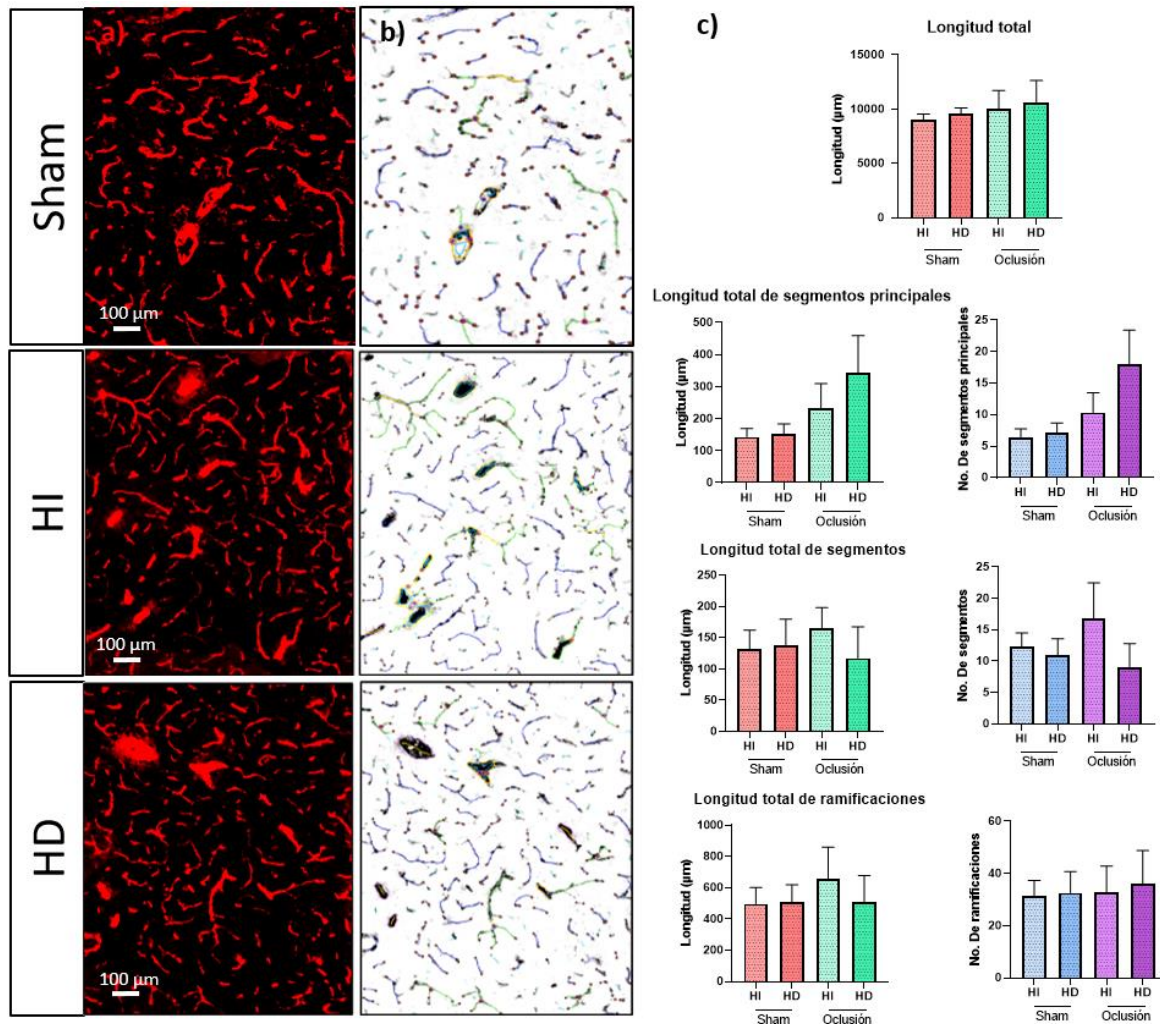


Figura 14. La oclusión de la ACC no promueve angiogénesis en el parénquima cerebral. a) Vasos sanguíneos marcados con IB4 (rojo); b) Arborización de la tinción con IB4 donde se muestran: segmentos de vasos sanguíneos (azul), segmentos principales (amarillo) y sus ramas (verde), puntos de intersección (puntos rojos).; c) Cuantificación de la longitud total de vasos sanguíneos, segmentos principales, ramificaciones y segmentos; así como número de ramificaciones y segmentos a partir de los esquemas de angiogénesis. Los datos se analizaron con la prueba ANOVA de una vía. Ratas sham y con 7 días de IR con una n=4. HI: hemisferio izquierdo; HD: hemisferio derecho. Los datos se reportan como media \pm E.E.

De acuerdo con el análisis de la longitud total de vasos sanguíneos, la longitud total promedio de las imágenes en el grupo sham fue de $1440.29 \mu\text{m} \pm 86.95$ (Figura 14c). En los grupos con IR, los valores obtenidos fueron similares en ambos hemisferios. Además, los valores promedio para la longitud y número de segmentos principales, fueron de $143 \mu\text{m} \pm 26.26$ y 6.33 ± 1.434 , respectivamente. Este valor incrementó en los HD de los grupos IR pero no de manera significativa. En el caso del número y la longitud promedio de los segmentos vasculares, los valores fueron los siguientes. En el grupo sham, se observó un número promedio de segmentos de 12.42 ± 2.119 , con una longitud promedio de $132.77 \mu\text{m} \pm 29.71$. Al comparar con los hemisferios con IR, no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Finalmente, se analizaron el número y la longitud promedio de las ramificaciones de los vasos sanguíneos. En el grupo sham, se observó un número promedio de 31.50 ± 5.844 ramificaciones, con una longitud promedio de $497.35 \mu\text{m} \pm 103.6$. Al comparar estos resultados con el grupo control, no se encontraron diferencias significativas entre las condiciones (Figura 14c). Estos hallazgos indican que, a pesar del aumento en la permeabilidad de la BHE, la oclusión de la ACC no promueve angiogénesis.

Ya que estos resultados contrastan con los modelos de daño isquémico agudo como el OACM, en los que se observa angiogénesis en la zona de infarto que abarca aproximadamente el 15% del total del tejido cerebral (Zhao *et al.*, 2019) (Figura 15a). Nosotros decidimos determinar la formación de zonas de infarto inducidas por la oclusión de la ACC, mediante tinciones del tejido cerebral con cloruro de trifeníl-2, 3, 5-tetrazolio (TTC). Ya que el TTC tiñe de rojo a las células metabólicamente activas, las zonas de infarto se observan sin tinción. Encontramos que, en los cerebros de ratas con IR no se observaron zonas de infarto (Figura 15c), ya que los cerebros se tiñeron con la misma intensidad que en las ratas sham (Figura 15b). Experimentos adicionales nos ayudaran en un futuro a determinar si en el tejido isquémico existe algún tipo de muerte celular. No obstante, aunque estos resultados son distintos a los ya publicados con otros modelos de oclusión, concuerdan con la ausencia de angiogénesis en este modelo.

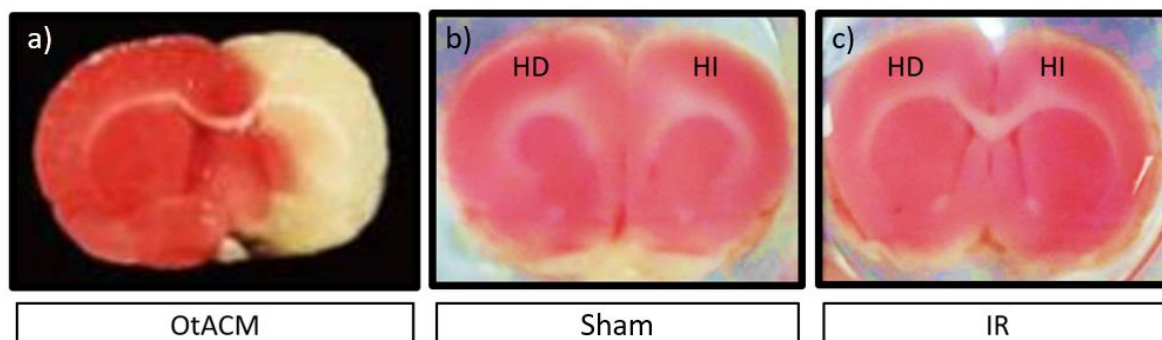


Figura 15. La oclusión de la ACC no induce una zona de infarto. Tinción con TTC de: a) animales con oclusión temporal de la arteria cerebral media (OtACM) con reperusión de 3 días (Imagen tomada de Zhao et al., 2019); b) Imagen representativa de cerebros de animales control (sham) o c) con oclusión de la ACC izquierda (modelo de IR). HI: hemisferio izquierdo; HD: hemisferio derecho.

8.3 La oclusión temporal de la ACC activa la señalización mediada por SMADs

Para evaluar la activación de la vía de señalización de TGF- β 1, se analizó mediante Western blot la expresión de ALK5, el receptor de TGF- β , y de las proteínas efectoras SMAD 2/3. Los resultados mostraron que los niveles de ALK5 permanecieron constantes en todas las condiciones analizadas (Figura 16). En cambio, cuando analizamos la expresión de las proteínas SMAD 2 y 3, detectamos dos bandas (Figura 17a). Una banda aproximadamente a 50 kDa, que corresponde con el peso molecular de SMAD2 (52 kDa) y una segunda banda inferior a 50 kDa, que concuerda con el peso molecular de SMAD3 (48 kDa). Mientras que no se observaron cambios en la banda inferior, de manera interesante, la banda superior mostró un incremento significativo en los HD de ratas con IR de 24h y posteriormente a los 7 días de IR se reduce.

Para determinar si estos cambios en la proteína total eran debido a la fosforilación de SMAD3, utilizamos un anticuerpo específico que detecta a esta proteína fosforilada en la S425. Como se observa en la Figura 17b, no se encontraron diferencias entre condiciones. Esto sugiere que, los cambios detectados con el anticuerpo de SMAD2/3 podrían deberse primordialmente a la SMAD2 o bien, a la activación de distintos sitios de fosforilación en SMAD3. Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para comprobar esto.

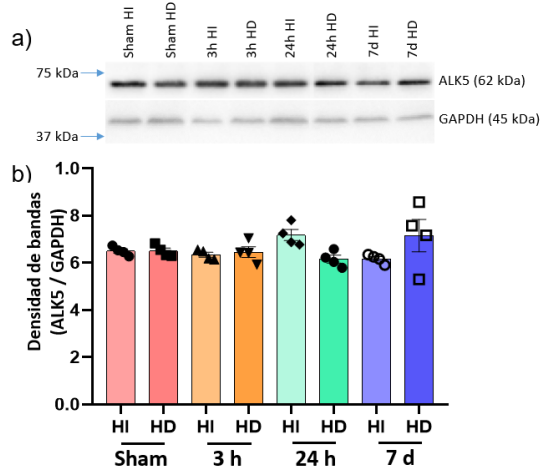


Figura 16. La oclusión de la ACC no modifica la expresión del receptor ALK5. a) Membranas de nitrocelulosa para ALK5 y GAPDH utilizadas para cuantificación. b) Cuantificación de la densidad de las bandas de *Cldn5* con respecto al control de carga (GAPDH). Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc de Tukey. Sham (control) o IR de 3h, 24h y 7 días con una $n=4$. HI: hemisferio izquierdo; HD: hemisferio derecho. Los datos se reportan como media \pm E.E.

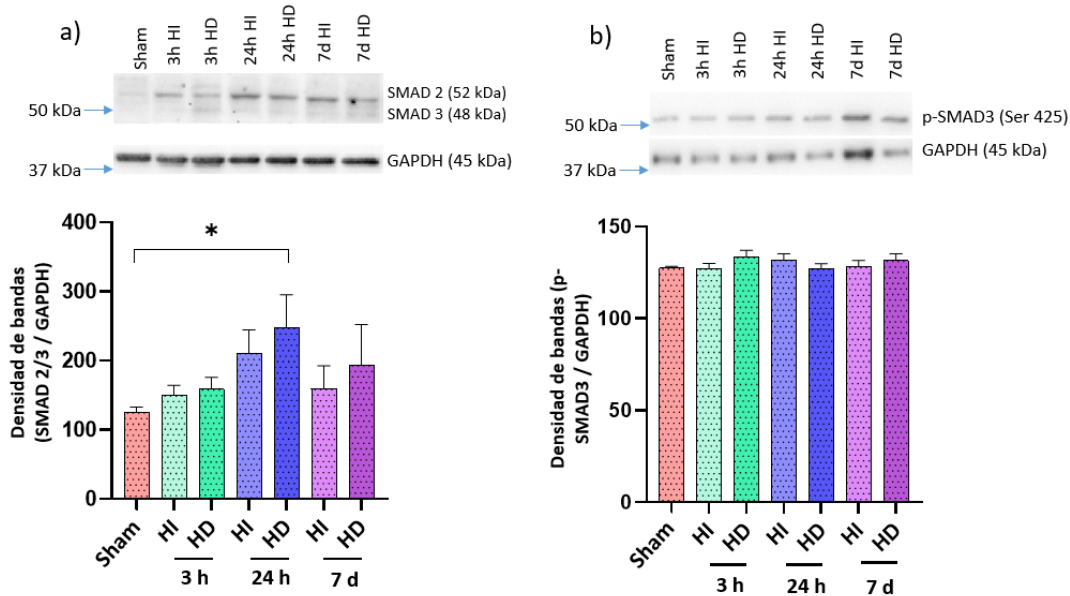


Figura 17. La oclusión de la ACC activa señalización mediada por SMADs. a) Cuantificación de la densidad de bandas de SMAD 2/3 con respecto al control de carga (GAPDH) e imágenes representativas de membranas para SMAD 2/3 y GAPDH. b) Cuantificación de la densidad de bandas de p-SMAD3 con respecto al control de carga (GAPDH) e imágenes representativas de membranas para p-SMAD3 y GAPDH. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc de Tukey. $*P<0.05$; Sham (control) o IR de 3h, 24h y 7 días con una $n=4$. HI: hemisferio izquierdo; HD: hemisferio derecho. Los datos se reportan como media \pm E.E.

9. Discusión

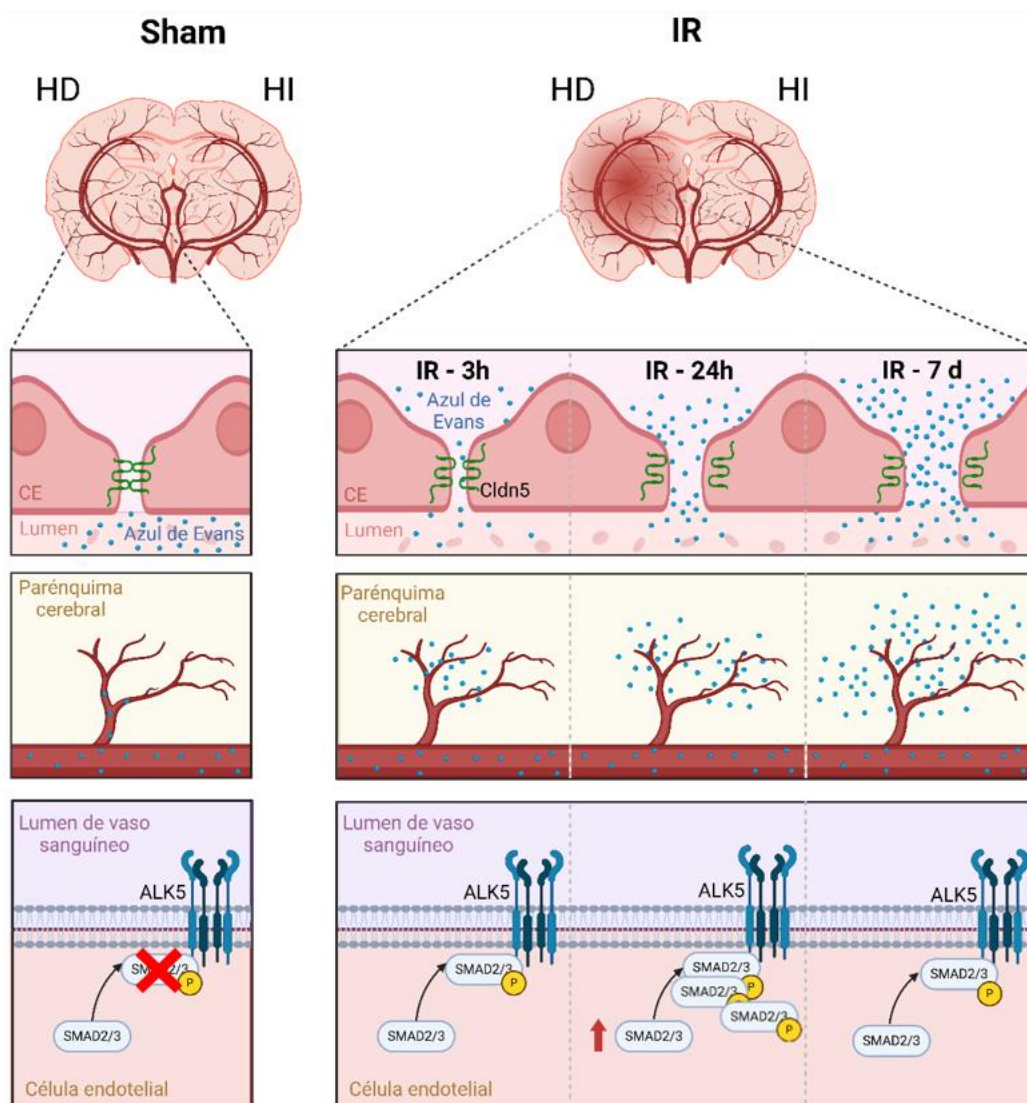


Figura 18. La occlusión de la ACC induce disfunción en la BHE y activa la vía de señalización mediada por SMADs. En el grupo control (Sham), el colorante de azul de Evans se mantuvo dentro del lumen de los vasos sanguíneos cerebrales, y la Cldn5 se observó localizada en los contactos entre células endoteliales. En cambio, en las ratas con IR la permeabilidad de azul de Evans al parénquima cerebral incrementó, especialmente en los vasos sanguíneos en los que se modificó la localización de Cldn5. Estas alteraciones vasculares incrementaron de manera gradual con el tiempo de IR. En cuanto a la activación de la señalización de SMADs, estas proteínas incrementaron su expresión a las 24h de IR y posteriormente disminuyeron.

Nosotros encontramos que la oclusión temporal unilateral de la ACC izquierda induce disrupción gradual en la BHE. La permeabilidad vascular incrementó desde las 3h y hasta los 7 días de IR y principalmente en los hemisferios con mayor impacto isquémico (HD). Además, la principal proteína reguladora de la función de la BHE, claudina-5, disminuyó su localización en los contactos endoteliales y exclusivamente en los vasos sanguíneos con alta permeabilidad. De manera importante, en este modelo no se alteró la angiogénesis y el metabolismo cerebral. Mientras los mayores cambios en la BHE se detectaron después de 7 días de IR, la expresión de SMADs incrementa a las 24h de IR y posteriormente disminuye (Figura 18). Juntos, estos datos demuestran que en este modelo de IR se induce la disfunción de la BHE y la señalización mediada por SMADs se activa.

El incremento en la permeabilidad vascular inducido por la oclusión de la ACC está relacionado con la localización de Cldn5, más no con su expresión. Estos resultados son consistentes con lo obtenido por Yang y colaboradores, quienes demostraron que la isquemia induce la re-distribución de Cldn5 en células endoteliales, provocando la disrupción de la integridad de la BHE lo que indica que la localización Cldn5 es importante para el mantenimiento de las funciones de barrera (Yang *et al.*, 2021). Múltiples estudios además demuestran la importancia específica de Cldn5 en la regulación de la permeabilidad paracelular (Morita *et al.*, 1999), por lo que también podemos inferir que la permeabilidad de azul de Evans al parénquima cerebral en este modelo de IR se lleva a cabo principalmente por esta ruta. No obstante, es posible que la ruta transcelular se esté activando al mismo tiempo, pero en menor proporción, como se observa en otros modelos de disfunción vascular cerebral.

A pesar de la disfunción vascular observada en este modelo, de manera importante no se observó activación de angiogénesis o disfunción de la actividad metabólica cerebral. A diferencia de otros modelos agudos de IR como el OACM, las tinciones de TTC no mostraron zonas de infarto. Es posible que esto explique la ausencia de angiogénesis, ya que, al no existir un centro hipóxico prominente, es posible que la secreción de factores pro-angiogénicos como el VEGFA sea mínima. Otra posibilidad es que el tiempo de IR en el que evaluamos la estructura vascular (7 días) no sea suficiente para

observar los cambios. En cuanto a esto, existe inconsistencia entre modelos de IR. Por ejemplo, en ratas Sprague-Dawley, la OACM induce la aparición de brotes angiogénicos en las zonas de penumbra a partir del tercer día (Krupinski *et al.*, 2003), mientras que en un modelo de ratas hipertensas con OACM, la activación de VEGFA induce la proliferación y posterior formación de vasos sanguíneos dentro de la zona de penumbra hasta la tercera semana de reperfusión (Yang *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2020). Estos cambios en la angiogénesis pueden estar relacionados con nivel de daño inducido por la isquemia cerebral. En algunos casos como en el modelo que utilizamos en este trabajo, al parecer el daño principal ocurre a nivel de los vasos sanguíneos, en cambio en otros modelos, existe una exacerbada citotoxicidad e inflamación que activan varios procesos celulares de manera simultánea (Zhang *et al.*, 2022).

Estudios recientes demuestran que la IR induce la activación de la vía de señalización mediada por TGF- β . Esto incluye al ligando TGF- β 1, a su receptor ALK5 y a las moléculas efectoras SMAD 2 y 3. Debido a esto, nosotros decidimos analizar los cambios en la expresión de algunos de estos componentes. Cuando determinamos la expresión de ALK5 en el tejido cerebral de ratas con IR, no encontramos diferencias en comparación con el grupo sham. Este resultado contrasta con lo obtenido en estudios previos en los que se observa que el daño isquémico inducido por OACM incrementa la expresión de ALK5 en los hemisferios isquémicos en comparación con los grupos control (Zhang *et al.*, 2019). Es probable que, en nuestro estudio, el daño endotelial no sea suficiente para activar la expresión de la proteína como lo muestran otros modelos. Sin embargo, aún no hemos evaluado la fosforilación del receptor, el cuál sería un mejor parámetro para determinar su actividad en este modelo de IR. En cuanto a la activación de las SMADS, en un modelo de OtACM durante 90 min y una posterior reperfusión, se observó que la fosforilación de SMAD 2 y 3 aumenta a las 12 y 24h de reperfusión, respectivamente (Zhan *et al.*, 2022). Consistente con estos estudios, nuestros resultados sugieren una activación temprana de SMADs, ya que se observa un incremento en las bandas alrededor de 50 kDa detectadas por el anticuerpo para las proteínas totales SMAD y 3, a las 24h de IR. Ya que no detectamos cambios en la fosforilación de SMAD3 en la S425, los cambios en la proteína total

podrían deberse a: la activación de SMAD2, cuyo peso molecular corresponde con la banda en la que se detectan los cambios; o a la activación de SMAD3 en residuos distintos a la S425, cuyo peso molecular de la proteína total es menor, pero este podría incrementarse si la proteína posee múltiples modificaciones postraduccionales. Finalmente, aunque todavía no evaluamos la concentración de TGF- β 1 en nuestro modelo de IR, es posible que también se observe un incremento en la expresión de esta proteína, ya que esto se ha observado en modelos como la OtACM (Zhang *et al.*, 2022).

El papel de TGF- β 1/ALK5/SMAD2/3 en el daño vascular inducido por IR aún no ha sido determinado por completo, no obstante, múltiples estudios sugieren que estas moléculas de señalización podrían restaurar las propiedades de la BHE. En ratones, el tratamiento con TGF- β 1 reduce la permeabilidad de la BHE (Wen *et al.*, 2023). Asimismo, la sobre expresión de SMAD3 reduce las zonas de infarto tras la OACM (Liu *et al.*, 2015). Estos datos sugieren que la liberación del ligando de TGF- β 1 o el uso de fármacos que activen su vía de señalización podrían utilizarse como estrategias terapéuticas que recuperen la funcionalidad de la BHE en la IR. No obstante, el estudio de vías de señalización adicionales activadas por TGF- β 1 o su receptor ALK5, podrían ayudarnos a mejorar estas estrategias. De hecho, los cambios que observamos en la activación de SMADs son transitorios, pues se reducen después de 7 días de IR. En contraste, la permeabilidad más alta se observa a este tiempo. Esto sugiere que en este modelo de IR se activan vías de señalización adicionales. En cuanto a esto, existen otros receptores endoteliales que podrían activarse tras el daño endotelial, por ejemplo: el receptor TGF- β RII o la endogлина, un tipo de receptor accesorio tipo 3 (Pál *et al.*, 2014), los cuales también promueven la formación de la BHE durante el desarrollo embrionario. Además, de acuerdo con Lux y colaboradores, el TGF- β 1 también puede señalizar a través del receptor ALK1, el cual, es una cinasa específica del endotelio cerebral que puede unirse a endogлина para mejorar la respuesta de la señalización por TGF- β 1 (Lux *et al.*, 1999). Aunque el ratón KO de ALK1 no muestra defectos vasculares, es posible que de manera individual no regule las propiedades endoteliales, pero si mediante su interacción con endogлина, cuya expresión aumenta

en respuesta a hipoxia y reoxigenación (Haarman *et al.*, 2022). Por ello, estudiar las distintas vías de señalización que se activan con la oclusión de la ACC, nos ayudará a proponer mejores estrategias terapéuticas.

El TGF- β 1 además tiene un efecto neuro protector. En ratones, la activación de la vía TGF- β 1/ALK1/SMAD1/5 protege contra las lesiones cerebrales inducidas por la OACM. Esto se observa no solo por la reducción en la permeabilidad de la BHE y la angiogénesis, también por la recuperación de las zonas de infarto (Du *et al.*, 2021), lo que apoya la idea de activar de esta vía de señalización como un tratamiento para el ACV.

10. Conclusión

La oclusión temporal unilateral de la ACC izquierda es un modelo de IR que nos permite observar la disrupción de la BHE de manera gradual. Estos efectos se observan sin alterar la angiogénesis y el metabolismo cerebral. Por lo tanto, es un modelo ideal para estudiar los cambios en la vía de señalización mediada por TGF- β 1 asociados a esta disfunción. Hasta ahora hemos encontrado que este proceso podría ser mediado por SMADs, sin embargo, no descartamos la posibilidad de la activación de mecanismos de señalización adicionales.

11. Perspectivas

El endotelio vascular cerebral expresa varios receptores de TGF- β , los receptores tipo 1 ALK5 y ALK1, el receptor TGF β RII y endogлина. Estos interactúan entre sí para modular las respuestas celulares. Por lo que, comparar su expresión y activación en la oclusión de la ACC, nos permitirá determinar su papel en el control de la permeabilidad vascular. Además, el uso de inhibidores específicos dirigidos a cada uno de estos receptores nos ayudará a elucidar su contribución específica.

Vías de señalización independientes de SMAD también podrían activarse tras el daño isquémico. Para demostrar esto, podría analizarse mediante Western blot, componentes claves de la señalización mediada por: RhoA/ROCK, TRAF4/6 / NF κ B,

MEK/ERK, MAPK/JNK y PI3K/PKB. De los cambios encontrados en estas vías, posteriormente podemos determinar su contribución específica al inhibirlas farmacológicamente. Es importante considerar que estas vías pueden actuar en sinergia o en oposición con la vía SMAD, por lo que su interacción podría ser un área importante de estudio.

Los experimentos propuestos nos ayudarían a conocer qué vías de señalización se activan tras la oclusión de la ACC y cómo pueden modularse con el fin de establecer nuevas terapias que rescaten la función endotelial tras el daño isquémico.

12. Referencias

1. Abrial, M., Paffett-Lugassy, N., Jeffrey, S., Jordan, D., O'Loughlin, E., Frederick, C. J., Burns, C. G., & Burns, C. E. (2017). TGF- β Signaling Is Necessary and Sufficient for Pharyngeal Arch Artery Angioblast Formation. *Cell Reports*, 20(4), 973-983. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.002>
2. Alvarez, M. A., Freitas, J. P., Mazher Hussain, S., & Glazer, E. S. (2019). TGF- β Inhibitors in Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 50(2), 207-213. <https://doi.org/10.1007/s12029-018-00195-5>
3. Andjelkovic, A. V., & Keep, R. F. (2016). Structural Alterations to the Endothelial Tight Junction Complex During Stroke. En J. Chen, J. H. Zhang, & X. Hu (Eds.), *Non-Neuronal Mechanisms of Brain Damage and Repair After Stroke* (pp. 3-23). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32337-4_1
4. Arnold, T. D., Niaudet, C., Pang, M.-F., Siegenthaler, J., Gaengel, K., Jung, B., Ferrero, G. M., Mukoyama, Y., Fuxe, J., Akhurst, R., Betsholtz, C., Sheppard, D., & Reichardt, L. F. (2014). Excessive vascular sprouting underlies cerebral hemorrhage in mice lacking $\alpha V\beta 8$ -TGF β signaling in the brain. *Development (Cambridge, England)*, 141(23), 4489-4499. <https://doi.org/10.1242/dev.107193>
5. Bruneau, S., Datta, D., Flaxenburg, J. A., Pal, S., & Briscoe, D. M. (2012). TRAF6 inhibits proangiogenic signals in endothelial cells and regulates the expression of vascular endothelial growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(1), 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.128>
6. Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C. J., & Barres, B. A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(2), 641-646. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805165106>
7. Deng, Z., Fan, T., Xiao, C., Tian, H., Zheng, Y., Li, C., & He, J. (2024). TGF- β signaling in health, disease, and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 61. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01764-w>
8. Dickson, M. C., Martin, J. S., Cousins, F. M., Kulkarni, A. B., Karlsson, S., & Akhurst, R. J. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth

- factor-beta 1 knock out mice. *Development* (Cambridge, England), 121(6), 1845-1854. <https://doi.org/10.1242/dev.121.6.1845>
9. Dirección General de Información en Salud (DGIS). Sistema de Información de la Secretaría de Salud; causas de defunción (por año). [Enlace: <https://sinaiscap.salud.gob.mx/DGIS/>]. Citado el día 07 de noviembre de 2024.
 10. Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A., Nakagawa, S., Egawa, T., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., Niwa, M., & Kataoka, Y. (2005). Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Research*, 1038(2), 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.01.027>
 11. Du, J., Yin, G., Hu, Y., Shi, S., Jiang, J., Song, X., Zhang, Z., Wei, Z., Tang, C., & Lyu, H. (2020). Coicis semen protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and promoting angiogenesis via the TGF β /ALK1/Smad1/5 signaling pathway. *Aging* (Albany NY), 13(1), 877-893. <https://doi.org/10.18632/aging.202194>
 12. Finnsen, K. W., Almadani, Y., & Philip, A. (2020). Non-canonical (non-SMAD2/3) TGF- β signaling in fibrosis: Mechanisms and targets. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 101, 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.11.013>
 13. Franco, C. A., Jones, M. L., Bernabeu, M. O., Vion, A.-C., Barbacena, P., Fan, J., Mathivet, T., Fonseca, C. G., Ragab, A., Yamaguchi, T. P., Coveney, P. V., Lang, R. A., & Gerhardt, H. (2016). Non-canonical Wnt signalling modulates the endothelial shear stress flow sensor in vascular remodelling. *eLife*, 5, e07727. <https://doi.org/10.7554/eLife.07727>
 14. Gerecht-Nir, S., Osenberg, S., Nevo, O., Ziskind, A., Coleman, R., & Itskovitz-Eldor, J. (2004). Vascular development in early human embryos and in teratomas derived from human embryonic stem cells. *Biology of Reproduction*, 71(6), 2029-2036. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031930>
 15. Haarmann, A., Zimmermann, L., Bieber, M., Silwedel, C., Stoll, G., & Schuhmann, M. K. (2022). Regulation and Release of Vasoactive Endoglin by Brain Endothelium in Response to Hypoxia/Reoxygenation in Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7085. <https://doi.org/10.3390/ijms23137085>

16. Harel, S., Sanchez, V., Moamer, A., Sanchez-Galan, J. E., Abid Hussein, M. N., Mayaki, D., Blanchette, M., & Hussain, S. N. A. (2021). ETS1, ELK1, and ETV4 Transcription Factors Regulate Angiopoietin-1 Signaling and the Angiogenic Response in Endothelial Cells. *Frontiers in Physiology*, 12, 683651. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.683651>
17. Hiew, L.-F., Poon, C.-H., You, H.-Z., & Lim, L.-W. (2021). TGF- β /Smad Signalling in Neurogenesis: Implications for Neuropsychiatric Diseases. *Cells*, 10(6), 1382. <https://doi.org/10.3390/cells10061382>
18. Hone, E. A., Hu, H., Sprowls, S. A., Farooqi, I., Grasmick, K., Lockman, P. R., Simpkins, J. W., & Ren, X. (2018). Biphasic Blood-Brain Barrier Openings after Stroke. *Neurological Disorders & Stroke International*, 1(2). <https://remedypublications.com/neurological-disorders-stroke-international-abstract.php?aid=971>
19. Huang, T., Schor, S. L., & Hinck, A. P. (2014). Biological activity differences between TGF- β 1 and TGF- β 3 correlate with differences in the rigidity and arrangement of their component monomers. *Biochemistry*, 53(36), 5737-5749. <https://doi.org/10.1021/bi500647d>
20. Jia, J., Ye, T., Cui, P., Hua, Q., Zeng, H., & Zhao, D. (2016). AP-1 transcription factor mediates VEGF-induced endothelial cell migration and proliferation. *Microvascular Research*, 105, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.02.004>
21. Kadry, H., Noorani, B., & Cucullo, L. (2020). A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>
22. Kovacic, J. C., & Boehm, M. (2009). Resident vascular progenitor cells: An emerging role for non-terminally differentiated vessel-resident cells in vascular biology. *Stem Cell Research*, 2(1), 2-15. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2008.05.005>
23. Krupinski, J., Kumar, P., Kumar, S., & Kaluza, J. (1996). Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke*, 27(5), 852-857. <https://doi.org/10.1161/01.str.27.5.852>
24. Krupinski, J., Stroemer, P., Slevin, M., Marti, E., Kumar, P., & Rubio, F. (2003). Three-dimensional structure and survival of newly formed blood vessels after focal cerebral

- ischemia. *Neuroreport*, 14(8), 1171-1176.
<https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000075304.76650.29>
25. Lee, S.-W., Kim, W. J., Choi, Y. K., Song, H. S., Son, M. J., Gelman, I. H., Kim, Y.-J., & Kim, K.-W. (2003). SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nature Medicine*, 9(7), 900-906. <https://doi.org/10.1038/nm889>
26. Li, D. Y., Sorensen, L. K., Brooke, B. S., Urness, L. D., Davis, E. C., Taylor, D. G., Boak, B. B., & Wendel, D. P. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5419), 1534–1537. <https://doi.org/10.1126/science.284.5419.1534>
27. Liu, Z., Sheng, J., Peng, G., Yang, J., Chen, W., & Li, K. (2018). TGF- β 1 Regulation of P-JNK and L-Type Calcium Channel Cav1.2 in Cortical Neurons. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 64(3), 374-384. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1033-2>
28. Lux, A., Attisano, L., & Marchuk, D. A. (1999). Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 9984-9992. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.9984>
29. Ma, R., Xie, Q., Li, Y., Chen, Z., Ren, M., Chen, H., Li, H., Li, J., & Wang, J. (2020). Animal models of cerebral ischemia: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110686. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110686>
30. Ma, S., Santhosh, D., T, P. K., & Huang, Z. (2017). A Brain-Region-Specific Neural Pathway Regulating Germinal Matrix Angiogenesis. *Developmental Cell*, 41(4), 366-381.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.04.014>
31. Meng, H., Song, Y., Zhu, J., Liu, Q., Lu, P., Ye, N., Zhang, Z., Pang, Y., Qi, J., & Wu, H. (2016). LRG1 promotes angiogenesis through upregulating the TGF- β 1 pathway in ischemic rat brain. *Molecular Medicine Reports*, 14(6), 5535-5543. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5925>
32. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol*, 147(1):185-94. doi: 10.1083/jcb.147.1.185.
33. Mosconi, M. G., & Paciaroni, M. (2022). Treatments in Ischemic Stroke: Current and Future. *European Neurology*, 85(5), 349-366. <https://doi.org/10.1159/000525822>

34. Nguyen, H.-L., Lee, Y. J., Shin, J., Lee, E., Park, S. O., McCarty, J. H., & Oh, S. P. (2011). TGF- β signaling in endothelial cells, but not neuroepithelial cells, is essential for cerebral vascular development. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 91(11), 1554-1563. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.124>
35. Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., & Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 161(3), 653-660. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302070>
36. Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S., & Li, E. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), 2626-2631. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.6.2626>
37. Oshima, M., Oshima, H., & Taketo, M. M. (1996). TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Developmental Biology*, 179(1), 297-302. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0259>
38. Pál, G., Lovas, G., & Dobolyi, A. (2014). Induction of transforming growth factor beta receptors following focal ischemia in the rat brain. *PloS One*, 9(9), e106544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106544>
39. Portegies, M. L. P., Selwaness, M., Hofman, A., Koudstaal, P. J., Vernooij, M. W., & Ikram, M. A. (2015). Left-sided strokes are more often recognized than right-sided strokes: The Rotterdam study. *Stroke*, 46(1), 252-254. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007385>
40. Profaci, C. P., Munji, R. N., Pulido, R. S., & Daneman, R. (2020). The blood-brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(4), e20190062. <https://doi.org/10.1084/jem.20190062>
41. Ren, Y., Ma, X., Wang, T., Cheng, B., Ren, L., Dong, Z., & Liu, H. (2021). The Cerebroprotein Hydrolysate-I Plays a Neuroprotective Effect on Cerebral Ischemic Stroke by Inhibiting MEK/ERK1/2 Signaling Pathway in Rats. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 17, 2199-2208. <https://doi.org/10.2147/NDT.S313807>

42. Rodríguez Hernández, S. A., Kroon, A. A., van Boxtel, M. P. J., Mess, W. H., Lodder, J., Jolles, J., & de Leeuw, P. W. (2003). Is there a side predilection for cerebrovascular disease? *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979), 42(1), 56-60. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000077983.66161.6F>
43. Sasson, E., Anzi, S., Bell, B., Yakovian, O., Zorsky, M., Deutsch, U., Engelhardt, B., Sherman, E., Vatine, G., Dzikowski, R., & Ben-Zvi, A. (2021). Nano-scale architecture of blood-brain barrier tight-junctions. *eLife*, 10, e63253. <https://doi.org/10.7554/eLife.63253>
44. Son, H. Y., Jung, H. W., Kim, W.-K., & Park, Y.-K. (2010). The vasoprotective effect of JP05 through the activation of PI3K/Akt-dependent eNOS and MEK/ERK pathways in brain endothelial cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(3), 607-613. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.050>
45. ten Dijke, P., & Arthur, H. M. (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(11), 857-869. <https://doi.org/10.1038/nrm2262>
46. Tie, Y., Tang, F., Peng, D., Zhang, Y., & Shi, H. (2022). TGF-beta signal transduction: Biology, function and therapy for diseases. *Molecular Biomedicine*, 3(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00109-9>
47. Torres-Viloria, A., Montiel-López, L., & Elizalde-Barrera, C. I. (2022). Epidemiología y mortalidad hospitalaria por evento vascular cerebral en un hospital de la Ciudad de México: estudio prospectivo de 2 años. *Epidemiología del accidente cerebrovascular y mortalidad hospitalaria en un hospital de la Ciudad de México: un estudio prospectivo de dos años. Cirugía y cirujanos*, 90(5), 659–664. <https://doi.org/10.24875/CIRU.22000069>
48. Trindade, A., & Duarte, A. (2020). Notch Signaling Function in the Angiocrine Regulation of Tumor Development. *Cells*, 9(11), 2467. <https://doi.org/10.3390/cells9112467>
49. Truebestein, L., Hornegger, H., Anrather, D., Hartl, M., Fleming, K. D., Stariha, J. T. B., Pardon, E., Steyaert, J., Burke, J. E., & Leonard, T. A. (2021). Structure of autoinhibited Akt1 reveals mechanism of PIP3-mediated activation. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America, 118(33), e2101496118.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2101496118>
50. Tzavlaki, K., & Moustakas, A. (2020). TGF- β Signaling. *Biomolecules*, 10(3), 487.
<https://doi.org/10.3390/biom10030487>
51. Villapol, S., Logan, T. T., Symes, A. J., Villapol, S., Logan, T. T., & Symes, A. J. (2013). Role of TGF- β Signaling in Neurogenic Regions After Brain Injury. In *Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision*. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/53941>
52. Wälchli, T., Bisschop, J., Carmeliet, P., Zadeh, G., Monnier, P. P., De Bock, K., & Radovanovic, I. (2023). Shaping the brain vasculature in development and disease in the single-cell era. *Nature Reviews. Neuroscience*, 24(5), 271-298.
<https://doi.org/10.1038/s41583-023-00684-y>
53. Walshe, T. E., Saint-Geniez, M., Maharaj, A. S. R., Sekiyama, E., Maldonado, A. E., & D'Amore, P. A. (2009). TGF- β Is Required for Vascular Barrier Function, Endothelial Survival and Homeostasis of the Adult Microvasculature. *PLoS ONE*, 4(4), e5149.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005149>
54. Wen, H., Tan, J., Tian, M., Wang, Y., Gao, Y., & Gong, Y. (2023). TGF- β 1 ameliorates BBB injury and improves long-term outcomes in mice after ICH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 654, 136-144.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.03.007>
55. World Stroke Organization (WSO). Global Stroke Fact Sheet 2022. [Enlace: https://www.world-stroke.org/assets/downloads/WSO_Global_Stroke_Fact_Sheet.pdf]. Citado el día 07 de noviembre de 2024.
56. Yamashita, M., Aoki, H., Hashita, T., Iwao, T., & Matsunaga, T. (2020). Inhibition of transforming growth factor beta signaling pathway promotes differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived brain microvascular endothelial-like cells. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00197-1>
57. Yang, Y., Thompson, J. F., Taheri, S., Salayandia, V. M., McAvoy, T. A., Hill, J. W., Yang, Y., Estrada, E. Y., & Rosenberg, G. A. (2013). Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis

- during recovery. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(7), 1104-1114. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.56>
58. Yang, Y., & Torbey, M. T. (2020). Angiogenesis and Blood-Brain Barrier Permeability in Vascular Remodeling after Stroke. *Current Neuropharmacology*, 18(12), 1250-1265. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200720173316>
59. Yang, Z., Lin, P., Chen, B., Zhang, X., Xiao, W., Wu, S., Huang, C., Feng, D., Zhang, W., & Zhang, J. (2021). Autophagy alleviates hypoxia-induced blood-brain barrier injury via regulation of CLDN5 (claudin 5). *Autophagy*, 17(10), 3048-3067. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1851897>
60. Yao, Y., Shaligram, S. S., & Su, H. (2021). Chapter 4—Brain vascular biology. En S. W. Hetts & D. L. Cooke (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 176, pp. 49-69). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64034-5.00005-5>
61. Zhang, Y., Mu, Y., Ding, H., Du, B., Zhou, M., Li, Q., Gong, S., Zhang, F., Geng, D., & Wang, Y. (2022). $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ Promotes Angiogenesis After Cerebral Ischemia Injury in Rats by Upregulating the TGF- β /Smad2/3 Signaling Pathway. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 769717. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.769717>
62. Zhang, K., Zhang, Q., Deng, J., Li, J., Li, J., Wen, L., Ma, J., & Li, C. (2019). ALK5 signaling pathway mediates neurogenesis and functional recovery after cerebral ischemia/reperfusion in rats via Gadd45b. *Cell Death & Disease*, 10(5), 360. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1596-z>
63. Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Research*, 19(1), 128-139. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>
64. Zhao, Y., Zhang, X., Chen, X., & Wei, Y. (2022). Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review). *International journal of molecular medicine*, 49(2), 15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5070>
65. Zhou, Y., Wang, Y., Tischfield, M., Williams, J., Smallwood, P. M., Rattner, A., Taketo, M. M., & Nathans, J. (2014). Canonical WNT signaling components in vascular development and barrier formation. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(9), 3825-3846. <https://doi.org/10.1172/JCI76431>