



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

TRÁNSITO DE CÉLULAS TRONCALES A TRAVÉS DE LA
BARRERA HEMATO-ENCEFÁLICA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
MÓNICA DÍAZ CORÁNGUEZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. LORENZA GONZÁLEZ-MARISCAL
DEPTO. DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS, CINVESTAV

COMITÉ TUTOR
DRA. MARTHA ROBLES FLORES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. ALFONSO CÁRABEZ TREJO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D. F. JUNIO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicada a los responsables de mi intromisión en la ciencia, porque siempre han apoyado mis ideas por descabelladas que éstas sean.

A mis papás:

Ma. de los Angeles Coránguez Jácome y José de Jesús Díaz Ruíz

Gracias por creer en mí e impulsarme a hacer más allá de lo posible.
¡Los quiero con toda mi alma y siempre los llevo en mi corazón!

A mis hermanos:

Ma. de los Angeles Díaz Coránguez y José Díaz Coránguez

Gracias por estar siempre a mi lado apoyándome en todo.

Los días más felices son aquellos que nos hacen sabios.

John Massfield

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada bajo la tutoría de la **Dra. Lorenza González Mariscal** quien puso todo su profesionalismo y dedicación en mi formación como investigadora. Le agradezco de manera especial y sincera por aceptarme en su grupo de trabajo, por su guía y orientación constantes, pero sobre todo, por creer en mí y siempre motivarme a dar lo mejor.

Se realizó con la colaboración del **Dr. José Segovia Vila**, a quien le agradezco su continua contribución y opinión en el proyecto. Su participación sin duda, fue una fuente muy importante para el enriquecimiento de este trabajo.

Agradezco la participación en el desarrollo del proyecto de:

- *Adolfo López Ornelas*, estudiante del *Dr. José Segovia Vila*, por la ayuda en el cultivo de células ReNcell CX y el montaje de los experimentos *in Vivo*.
- *Dr. Juan Ludert* y su estudiante de doctorado *Henry Puerta Guardo*, por la detección de citosinas y PGE₂, mediante ensayos de ELISA.
- *Dra. Bibiana Cruz Chávez*, por la elaboración de la microscopía electrónica de transmisión y de barrido, con la ayuda de la *Q.F.B. Sirenia González Pozos*.
- *Dra. Noemí Meráz Cruz*, por la detección de MMPs a través de zimogramas.
- *Dra. Concepción Gutiérrez* y su estudiante *Natalia Nuño*, por la determinación de HGF en los MCs.

Gracias por su colaboración y entusiasmo para la construcción de grandes ideas.

El proyecto fue apoyado por los donativos **98448 (LGM) y 127357 (JS)**, otorgados por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, y por el **proyecto multidisciplinario del CINVESTAV-IPN**.

Agradezco a **CONACYT** por la beca otorgada durante todo el programa de doctorado, con el **número 267383**.

Esta tesis se realizó en el
lab. 29 del depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV

con el apoyo técnico de:

*M. en C. Dolores Martín Tapia, Q.F.B. María de Lourdes Alarcón Mortera,
M. en C. María Luisa Roldán Guitérrez, M. en C. María del Socorro Islas
Mendoza, Paula Vergara Subillaga, Alicia Teudocio Díaz, Biól. Miguel
Angel Rojas Sierra y Rubén Sánchez Islas*

El sistema *in vitro* de BHE se montó en el laboratorio de la Dra. Lorenza González Mariscal, gracias a la asesoría del *Dr. István Krisbai* y de la *Dra. Imola Wilhelm*, del Instituto de Biofísica en el Centro de Investigación Biológica de Szeged, Hungría.

Agradezco a las instituciones que me albergaron durante mi formación:
Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV-IPN
Facultad de Medicina e Instituto de Investigaciones Biomédicas de la
Universidad Nacional Autónoma de México
especialmente al:
Programa de doctorado en ciencias biomédicas (PDCB-UNAM)

Mis mayores agradecimientos a mi comité tutorial, que cada semestre estuvo pendiente de los avances en el proyecto:
Dra. Martha Robles Flores y Dr. Alfonso Cárabez Trejo

A mis revisores de tesis, por brindarme su conocimiento y experiencia:
Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia
Depto. de fisiología de la Facultad de Medicina
Dra. Magdalena Guerra Crespo
Depto. de Neuropatología Molecular del IFC, UNAM
Dra. Diana María Escalante Alcalde
Depto. de Desarrollo Neural y Fisiología, del IFC, UNAM
Dr. Héctor Mayani Viveros
Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas en el Hospital de Oncología
en Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

De manera especial agradezco a todos los que me apoyaron académica y personalmente:
A la *Dra. Norma Hernández Rodríguez*, quien me preparó para ingresar al programa de doctorado.
A mis profesores, por poner su conocimiento en mis manos.
A mis amigos y compañeros del laboratorio, por las discusiones científicas y personales que tanto han enriquecido mi vida.
A *Atzin González Andrade*, por todo el amor, la compañía, la confianza y el apoyo incondicionales. Gracias por enriquecer mi corazón y mi alma.

ÍNDICE

	Pág.
Lista de Abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	4
I. Introducción	5
1.1. Las células troncales neurales	5
1.2. Los gliomas	10
1.2.1. Epidemiología	10
1.2.2. Factores de riesgo	10
1.2.3. Síntomas	11
1.2.4. Diagnóstico	11
1.2.5. Tratamiento	12
1.2.6. Terapia basada en el uso de células que transportan genes suicidas	12
1.3. Las uniones estrechas	15
1.3.1. Estructura	15
1.3.2. Función	18
1.3.3. Composición	18
a) Las claudinas	20
b) Proteínas periféricas de la UE	23
1.4. La barrera hematoencefálica	24
1.4.1. Descubrimiento de la barrera hematoencefálica	24
1.4.2. Características particulares del EMC	27
1.4.3. Transporte a través del EMC	28
1.4.4. Medición de la propiedad de barrera del EMC	30
1.4.5. Modelos <i>in vitro</i> de BHE	32
1.4.6. Participación de los astrocitos y pericitos en el sellado de la BHE	35
1.4.7. La UE en las patologías del SNC	38
1.5. Transmigración	38
1.5.1. Transcelular	39
1.5.2. Paracelular	40
II. Justificación	42
III. Hipótesis	42
IV. Objetivos	43

V. Materiales y Métodos	44
5.1. Comité de ética para el cuidado de animales	44
5.2. Líneas celulares	44
5.3. Cultivos primarios	44
5.3.1. Cultivo de astrocitos de rata	44
5.3.2. Cultivo de EMC de rata	45
5.4. Medio condicionado	46
5.5. Medición de la resistencia eléctrica transendotelial	46
5.6. Ensayos de migración	47
5.7. Microscopía electrónica de transmisión	48
5.8. Microscopía electrónica de barrido	48
5.9. Western blot	49
5.10. Detección de citosinas	49
5.11. Detección de VEGF, HGF, EGF y PGE ₂	50
5.12. Zimografía	50
5.13. Inmunofluorescencia	50
5.14. Migración <i>in vivo</i> de células ReNcell CX	51
VI. Resultados	52
6.1. Las células de glioma C6 o su medio condicionado, inducen la transmigración de las células troncales neurales a través de un modelo <i>in vitro</i> de barrera hematoencefálica	52
6.2. El MC de glioma C6 disminuye la RET del EMC e induce la formación de orificios a lo largo de los bordes celulares de la monocapa endotelial	54
6.3. El HGF estimula la transmigración de células ReNcell CX en un modelo <i>in vitro</i> de BHE	56
6.4. El VEGF estimula la transmigración de las células ReNcell CX en un modelo <i>in vitro</i> de BHE	57

6.5. La baja cantidad de EGF en el MC de glioma C6 estimula la transmigración de las células ReNcell CX en un modelo <i>in vitro</i> de BHE	58
6.6. La presencia de PGE ₂ y la falta de EGF en el MC de glioma C6 promueve la apertura de la BHE	60
6.7. La presencia de zonulina/prehaptoglobina-2 en el MC de glioma C6 promueve la apertura de la BHE y la transmigración de las células ReNcell CX	61
6.8. Los MCs de astrocitos y glioma C6 contienen cantidades similares de MMP-2 y -9	62
6.9. La expresión exógena de ocludina en los fibroblastos-L incrementa su transmigración a través del EMC	63
6.10. La presencia de ocludina y claudina-5 en el EMC disminuye en los sitios de transmigración de las células ReNcells CX	65
6.11. La adhesión mediada por CRTAM facilita la transmigración de las células ReNcell CX a través del EMC	65
6.12. Las células ReNcell CX inyectadas vía intravenosa llegan a los sitios del glioma en el cerebro	67
VII. Discusión	69
VIII. Conclusión	73
IX. Producción científica durante el doctorado	75
9.1. Artículo original derivado del proyecto de doctorado	75
9.2. Revisiones y capítulos de libro	76
9.3. Resúmenes publicados/Participación en reuniones científicas	76
9.4. Premios	77
X. Referencias	78

Lista de abreviaturas

AQP	acuaporina
BHE	barrera hematoencefálica
bFGF	factor básico de crecimiento de fibroblastos
CD	citosina deaminasa
Cl	claudina
CRTAM	molécula asociada a linfocitos T restringida a clase I
dHSCs	células troncales hematopoyéticas diferenciadas
EGF	factor de crecimiento epidermal
EMC	endotelio microvascular cerebral
EPCs	células pluripotentes endoteliales
ESCs	células troncales embrionarias
GBM	glioblastoma multiforme
GDNF	factor neurotrófico derivado de la glía
H	hipocampo
HGF	factor de crecimiento de hepatocitos
HPCs	células progenitoras hematopoyéticas
HSV-1 TK	timidina cinasa del virus de herpes simple tipo 1
IFN- α	interferón alfa
IL	interleucina
iPSCs	células troncales pluripotenciales inducidas
JAM	molécula de adhesión intercelular
LRS	receptor de lipoproteína estimulado por lipólisis
MC	medio condicionado
MMP	metaloproteinasas
MSCs	células troncales mesenquimales
NSCs	células troncales neurales

OAPs	ordenaciones ortogonales de partículas
PECAM	molécula de adhesión plaqueto-endotelial
PEX	proteína parecida a hemopexina
PGE ₂	prostaglandina E ₂
RET	resistencia eléctrica transendotelial
SG	zona subgranular
SNC	sistema nervioso central
TGFβ	factor de crecimiento tumoral beta
TRAIL	ligando de muerte relacionado con la familia del factor de necrosis tumoral
ZSV	zona subventricular
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
UE	unión estrecha
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
VL	ventrículo lateral

Resumen

En este trabajo se evaluó la transmigración de las células troncales neurales humanas, ReNcell CX, en un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica (BHE) y en ratones desnudos. El modelo de BHE se basa en un co-cultivo que comprende el cultivo primario de células del endotelio microvascular cerebral (EMC) sembrado sobre membranas con poros (insertos Millicell). Además, el sistema incluye el cultivo primario de astrocitos de rata sembrado en la base del pozo que contiene al inserto. Encontramos que el cambio de astrocitos primarios por células de glioma, o su medio condicionado (MC), induce un incremento significativo en la transmigración de las ReNcell CX a través del EMC. La presencia de HGF, VEGF, zonulina y PGE₂ en el MC de glioma, y la falta de EGF, promueve la transmigración de las ReNcell CX. En contraste, las citosinas IFN- α , TNF- α , IL-12p70, IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10, así como las metaloproteinasas -2 y -9, no juegan un papel importante en la transmigración ya que no inducen cambios significativos y están presentes en concentraciones similares en los MCs de astrocitos y de glioma. Las ReNcell CX expresan a las proteínas de unión estrecha ocludina y claudinas 1, 3 y 4, y a la molécula de adhesión CRTAM; mientras que el EMC expresa a ocludina, claudinas 1 y 5, y a CRTAM. Esta última es una molécula esencial para la transmigración como se demostró al competir la adhesión mediada por CRTAM con la adición de CRTAM soluble. En los sitios de transmigración, se observó que disminuye la expresión de ocludina y claudina-5. En los ratones desnudos a los que se les inyectó vía intravascular a las ReNcell CX, éstas atravesaron la BHE y llegaron a los gliomas inducidos con las células C6, y en particular a las zonas donde se detecta HGF, VEGF y zonulina/prehaptoglobina 2.

Abstract

Transit of human neural stem cells, ReNcell CX, through the blood brain barrier (BBB) was evaluated in an in vitro model of BBB and in nude mice. The BBB model was based on rat brain microvascular endothelial cells (RBMECs) cultured on Millicell inserts bathed from the basolateral side with conditioned media (CM) from astrocytes or glioma C6 cells. Glioma C6 CM induced a significant transendothelial migration of ReNcells CX in comparison to astrocyte CM. The presence in glioma C6 CM of high amounts of HGF, VEGF, zonulin and PGE2, together with the low abundance of EGF, promoted ReNcells CX transmigration. In contrast cytokines IFN- α , TNF- α , IL-12p70, IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10, as well as metalloproteinases -2 and -9 were present in equal amounts in glioma C6 and astrocyte CMs. ReNcells expressed the tight junction proteins occludin and claudins 1, 3 and 4, and the cell adhesion molecule CRTAM, while RBMECs expressed occludin, claudins 1 and 5 and CRTAM. Competing CRTAM mediated adhesion with soluble CRTAM, inhibited ReNcells CX transmigration, and at the sites of transmigration, the expression of occludin and claudin-5 diminished in RBMECs. In nude mice we found that ReNcells CX injected into systemic circulation passed the BBB and reached intracranial gliomas, which overexpressed HGF, VEGF and zonulin/prehaptoglobin 2.

I. Introducción

1.1. Las células troncales neurales

Las células troncales son células indiferenciadas con capacidad de proliferar y diferenciarse en células de distintos linajes. Mediante la división simétrica, se generan células idénticas que mantienen a la población troncal. A esta propiedad se le conoce como auto-renovación. Mientras que, a través de la división asimétrica se genera una célula idéntica a la original, y una célula progenitora, que ya ha avanzado un paso en la diferenciación (D. Amat, 2012).

Las células troncales presentan diferente potencial de diferenciación en tejidos específicos, órganos o embriones completos, de acuerdo con su localización (figura 1). Este potencial nos permite clasificarlas en los siguientes grupos:

Células troncales totipotentes: Estas células son capaces de diferenciarse en cualquier linaje embrionario o extraembrionario. Por ejemplo, del cigoto y de cada una de las células de la mórula se puede reconstituir un organismo completo.

Células troncales pluripotentes: Estas células pueden dar origen a los linajes derivados de cualquiera de las tres capas embrionarias. Por ejemplo, las células de la masa celular interna, también llamadas células troncales embrionarias (ESCs, por las siglas en inglés de Embryonic Stem Cells) (Thomson et al., 1998), se diferencian para formar todos los tejidos embrionarios.

Células troncales multipotentes: Estas células sólo pueden diferenciarse en el linaje derivado de una capa embrionaria específica, ya sea ectodermo, endodermo o mesodermo (figura 1). Algunas de éstas células troncales se conservan a lo largo de la vida de los organismos, y residen en los tejidos adultos. A éstas células también se les conoce como células troncales adultas o somáticas, y son las responsables de mantener la homeostasis en los tejidos adultos a través del balance entre proliferación y muerte celular. Normalmente se mantienen en estado quiescente y cuando reciben un estímulo externo, activan su programa de proliferación y diferenciación (D. Amat, 2012).

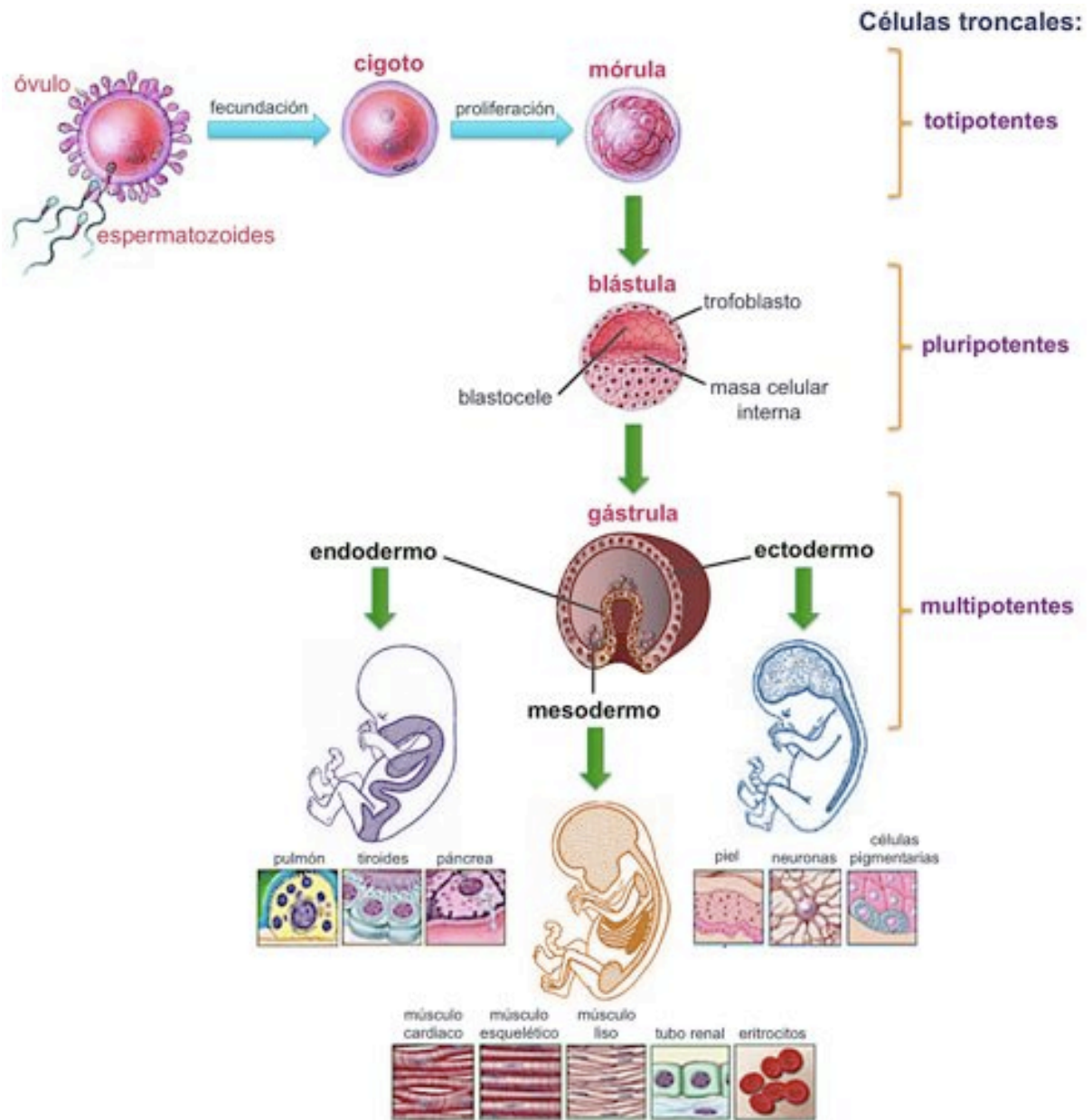


Figura 1. Localización de las células troncales durante el desarrollo embrionario. A partir de la fecundación se forma una célula troncal totipotente o cigoto, que prolifera para generar un conjunto de células idénticas llamado mórula. Posteriormente, las células de la mórula se diferencian en las células troncales pluripotentes que conforman la blástula: las células del trofoblasto, que darán origen a los tejidos extraembrionarios, y las células de la masa celular interna o ESCs, que darán origen al embrión. En seguida, las ESCs se diferencian en las células troncales multipotentes que conforman las tres capas embrionarias de la gástrula: endodermo, mesodermo y ectodermo, cada una de las cuales tiene el potencial de generar linajes celulares específicos.

Las células troncales neurales (NSCs, por las siglas en inglés de Neural Stem Cells) constituyen una población de células multipotentes que se encuentran presentes en el sistema nervioso central (SNC) durante el desarrollo embrionario y en la etapa adulta. Se caracterizan por su potencial de auto-renovación, es decir, se dividen para dar lugar a una célula igual a ellas mismas y que se mantiene en estado multipotente, a la par de generar otra célula con la capacidad de producir células maduras del linaje glial (astrocitos y oligodendrocitos) y neural. Esta diferenciación terminal neural se alcanza a través de la formación de precursores celulares intermedios (Gage, 2000).

Las propiedades de las NSCs se regulan por el microambiente especializado en el que residen, convencionalmente llamado nicho germinal. Los factores ambientales y el programa genético intrínseco de las NSCs, mantienen la troncalidad y regulan o dirigen la proliferación y diferenciación en los nichos (Doetsch, 2003). Se han aislado NSCs de tejidos embrionarios, fetales y neonatales (días 1-4) (Gritti *et al.*, 1996). En el tejido adulto éstas células residen en la corteza cerebral, principalmente en la zona subventricular (ZSV) de la pared del ventrículo lateral y en la zona subgranular (SG) del giro dentado del hipocampo (figura 2) (Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Christie and Turnley, 2012).

A partir de la identificación de las NSCs en el cerebro de los mamíferos adultos (Morshead *et al.*, 1994; Palmer *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1997), se han desarrollado diversos protocolos de estudio para su aislamiento, expansión y mantenimiento, e incluso se han generado líneas celulares inmortalizadas de origen murino como C17.2 (Snyder *et al.*, 1992) y humano como HB1.F3 (Kim *et al.*, 2002) y ReNcell CX/VM (Donato *et al.*, 2007).

El mantenimiento de las NSCs en cultivo, requiere de la presencia de factores de crecimiento específicos tales como el factor de crecimiento epidermal (EGF, por las siglas del inglés Epidermal Growth Factor) y el de fibroblastos (FGF, por las siglas del inglés Fibroblast Growth Factor). Estos factores y la ausencia de suero, promueven la proliferación celular y la conservación de las propiedades y los marcadores de las células troncales en las NSCs. Así mismo, la diferenciación de las NSCs ocurre de manera espontánea, al eliminar del cultivo el EGF y el bFGF o ante la presencia de suero (Gritti *et al.*, 1996).

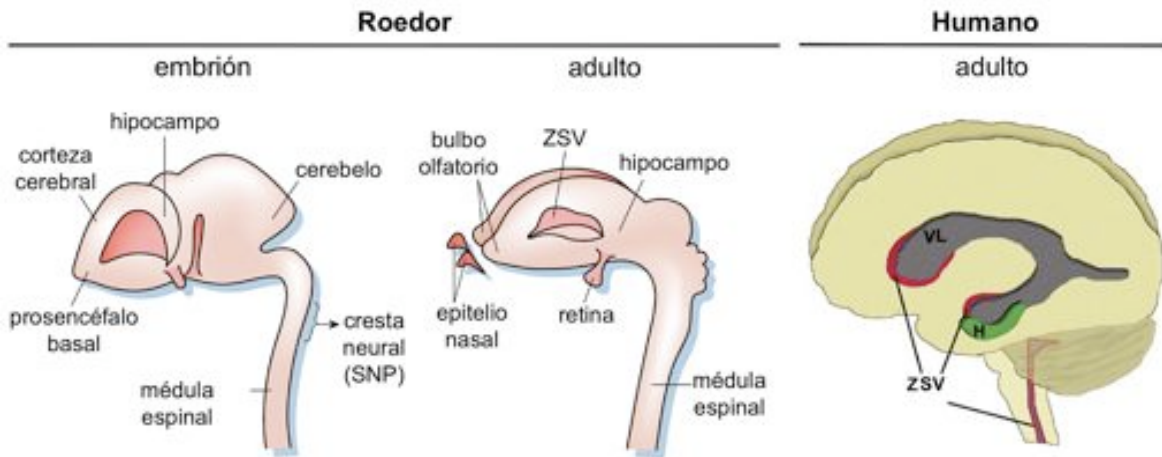


Figura 2. Localización de las NSCs en el cerebro de mamíferos. El esquema muestra la sección sagital del VL del cerebro en un roedor y en humanos. Las NSCs se han aislado o identificado en las zonas señaladas. H, hipocampo; ZSV, zona subventricular; VL, ventrículo lateral. Modificado de (Brazel and Rao, 2004; Temple, 2001).

Las terapias con células troncales se basan en la posibilidad de que reemplacen a neuronas en enfermedades neurodegenerativas, o que sirvan como vehículo para transferir genes terapéuticos como enzimas y factores neurotróficos u oncolíticos, a los sitios de enfermedad en el cerebro (Kim et al., 2013; Muller et al., 2006). Con respecto a esto último, cabe resaltar que las NSCs presentan tropismo por los sitios dañados en el cerebro (Muller et al., 2006; Tyler et al., 2009). Particularmente en el tratamiento de los tumores cerebrales, se ha observado que las NSCs que residen en la ZSV, migran hacia los tumores de origen glial (Synowitz et al., 2006) y tienen una respuesta antitumorigénica (Chirasani et al., 2010; Stock et al., 2012; Walzlein et al., 2008).

La movilización de las NSCs endógenas para el tratamiento de las patologías cerebrales es posible, sin embargo, la inflamación del SNC altera los componentes del nicho germinal y hace que la reparación a largo plazo sea ineficiente (Goldman, 2004). Por ello, el trasplante de NSCs representa una alternativa potencial.

En modelos experimentales *in vivo*, se ha observado que el trasplante de NSCs disminuye significativamente algunos síntomas de la esclerosis múltiple (Einstein et al., 2003; Pluchino et al., 2003), la apoplejía (Kelly et al., 2004), la enfermedad de Parkinson (Richardson et al., 2005), la enfermedad de Huntington (McBride et al., 2004) y el daño en la médula espinal (Cummings et al., 2005; Hofstetter et al., 2005).

En los tumores intracraniales inducidos en los roedores, las NSCs implantadas cerca del tumor, se distribuyen a lo largo de la masa tumoral. Cuando las NSCs se implantan intracranialmente en sitios distantes al tumor, se observa que las células migran del tejido normal hacia las células tumorales y finalmente, cuando las NSCs se administran intravascularmente en un sitio distante al cerebro como la vena de la cola, las NSCs llegan al sitio del tumor cerebral (figura 3) (Aboody et al., 2000; Tyler et al., 2009). Cabe resaltar que las NSCs implantadas no solo se localizan en la masa tumoral, sino que también se distribuyen en los sitios de micro metástasis (Benedetti et al., 2000; Herrlinger et al., 2000).

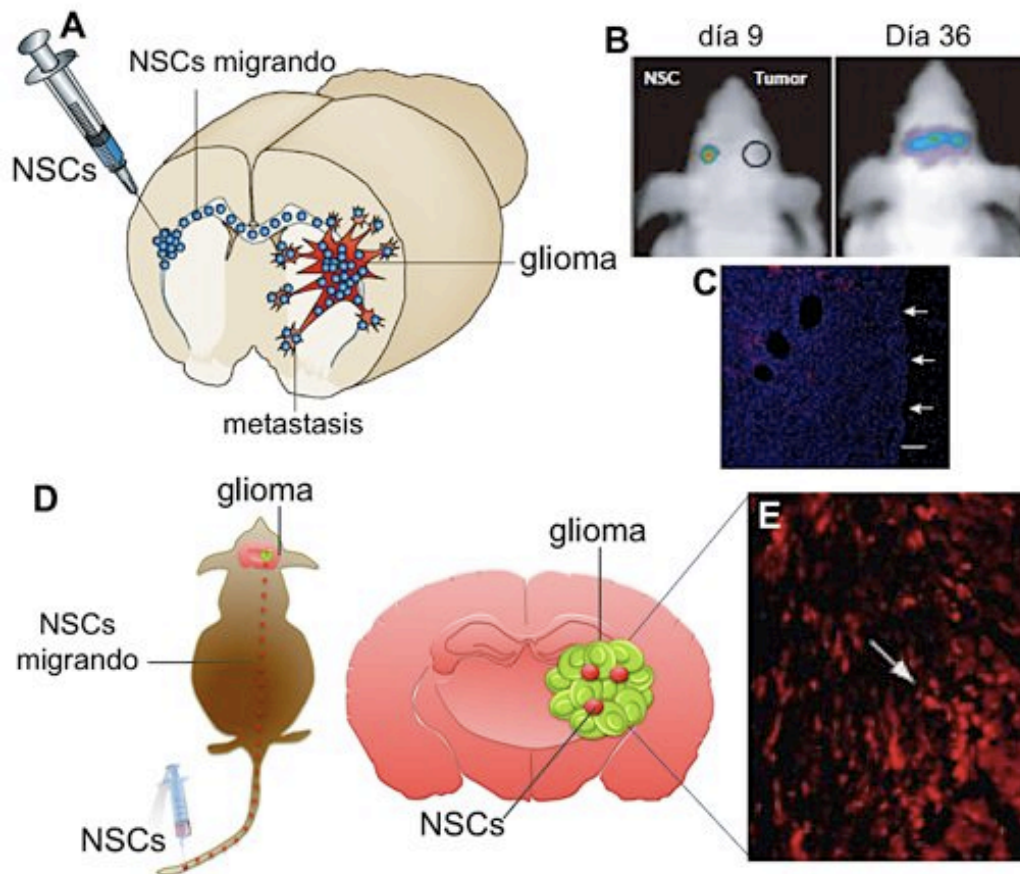


Figura 3. En un modelo murino, las NSCs trasplantadas muestran tropismo por las células tumorales cerebrales. A) Esquema de la migración intracranial de las NSCs. B) Migración de células C17.2 de origen murino transfectadas con el gen de la luciferasa e implantadas en el hemisferio opuesto al sitio del tumor. Fotografía con una cámara criogénica de carga acoplada (CCD) que detecta la bioluminiscencia emitida por la transfección de luciferasa en las NSCs inyectadas intracranialmente, a los días 9 y 36 (Weissleder and Ntziachristos, 2003). C) Distribución de las células HB1-F3 de origen humano (rojo) en el tumor inducido con las células de glioma U87. Flechas, borde del tumor; morado, núcleos. D) Esquema de la migración de las NSCs trasplantadas por vía intravenosa. E) Inmunocitoquímica de anti- β -galactosidasa para identificar a las NSCs (flecha) en el sitio del tumor, 4 días después de su trasplante. Modificado de (Muller et al., 2006) A, B y C; de (Aboody et al., 2000) E.

1.2. Los gliomas

Los tumores del SNC se clasifican de manera histopatológica en astrocitomas, oligodendriomas, oligo-astrocitomas mixtos y ependinomas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), presentan cuatro grados ascendentes de malignidad (I-IV) (Louis et al., 2007). Los tumores grados I y II son de crecimiento lento, mientras que los de alto grado (III y IV) son tumores malignos con una alta tasa de proliferación (Kelly et al., 1984).

El glioblastoma multiforme (GBM), un astrocitoma grado IV, es el tumor más frecuente del SNC (Louis et al., 2007). Es un tumor maligno e infiltrante que puede alcanzar un gran tamaño antes de ser diagnosticado y puede formar focos distales en la médula espinal o en las meninges a través del transporte de células malignas por el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Birbilis et al., 2010).

El GBM puede ser primario o secundario, si proviene de otro tumor. La mayoría de los gliomas grado IV se presentan de *novo* como GBM primarios, son los más agresivos y tienen por tanto, una menor tasa de sobrevivencia. De acuerdo a sus características histopatológicas, es difícil distinguir a un GBM primario de un secundario, pero a nivel molecular, presentan diferentes mutaciones genéticas y características moleculares (Agnihotri et al., 2013).

1.2.1. Epidemiología

El GBM representa el 25% de los tumores cerebrales (Adamson et al., 2009). Cada año se diagnostican aproximadamente 74,000 nuevos casos a nivel mundial (Reardon et al., 2006) y la incidencia de este tipo tumoral va en aumento (Hess et al., 2004b). Se presentan en ambos sexos, pero son más frecuentes los tumores de origen primario en hombres y de origen secundario en mujeres. Su incidencia y por tanto el riesgo de desarrollarlo, aumenta con la edad, aproximadamente el 90% de los gliomas se presentan en personas mayores de 45 años (Schwartzbaum et al., 2006).

1.2.2. Factores de riesgo

Se desconocen las causas del desarrollo de los gliomas. La exposición a radiación ionizante es hasta ahora el único factor identificado, responsable del desarrollo de estos tumores. Entre los años 60's y el 2003 se reportaron 116 casos de GBM causados por

radiación y se ha estimado que después de la radioterapia, el riesgo de desarrollar un GBM es del 2.5% (Salvati et al., 2003). También se ha sugerido que el uso del teléfono celular por las pequeñas cantidades de radiación electromagnética no ionizante que genera, así como la exposición a pesticidas, podrían ser factores de riesgo, pero su impacto en el desarrollo de los GBM aún no está bien establecido (Adamson et al., 2009).

Otras evidencias sugieren que las personas que padecieron un traumatismo cerebral tienen mayor probabilidad de desarrollar tumores cerebrales (Holly et al., 1998). Esto se piensa porque durante el trauma se produce hipertrofia y multiplicación de la glía o gliosis, que va acompañada de un cambio en la arquitectura de la barrera hematoencefálica. Este cambio en la vascularización permite el acceso al parénquima cerebral de factores de crecimiento y agentes carcinógenos con el potencial de generar células malignas (Magnavita et al., 2003).

1.2.3. Síntomas

Los síntomas dependen del tamaño del tumor y su localización. Por ejemplo, un paciente con un tumor en el lóbulo temporal puede tener problemas de visión y audición, mientras que un paciente con un tumor en el lóbulo frontal experimenta cambios de personalidad. Otros síntomas que pueden presentarse son: dolores de cabeza, náusea, ataques epilépticos, cansancio muscular y pérdida de la función cognitiva. El desarrollo rápido de síntomas cerebrales se relaciona con edema cerebral, hemorragia y necrosis, siendo éstas las causas principales de muerte en los pacientes con gliomas.

1.2.4. Diagnóstico

El diagnóstico se lleva a cabo mediante estudios de imagen que muestran la presencia, el tamaño y la localización del glioma. El método más usado es la imagen de resonancia magnética aumentada por gadolinio (Adamson et al., 2009). Otros métodos son la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), la tomografía de emisión de positrones (PET) y la tomografía axial computarizada (CAT) (Kelly et al., 1984). A nivel patológico, los GBM presentan un gran número de células con polimorfismos, núcleos hiperromáticos y tejido necrótico (Adamson et al., 2009). En los GBM se pueden identificar astrocitos y astroblastos, células tumorales gigantes y células en mitosis. En las células endoteliales de los capilares que rodean al tumor, se observa hiperplasia, necrosis,

hemorragia y/o trombosis. A nivel molecular, los GBM pueden presentar algunas modificaciones genéticas como: depleción en el cromosoma 10 (70%), amplificación del EGFR (40-60%), depleción de p16INK4a (30%), mutaciones en p14ARF (30%), en p53 (30%) y PTEN (25%), y metilación en RB1 (15%) y MGMT (36%) (Kanu et al., 2009).

1.2.5. Tratamiento

El tratamiento estándar para los GBM consta de cirugía, seguida de quimio y radioterapia (Stupp et al., 2009). Durante la cirugía se intenta retirar la mayor masa tumoral posible, sin embargo, la localización del tumor puede dificultar su extirpación total. Realizando únicamente el procedimiento quirúrgico, los pacientes sobreviven 14 semanas y pocos llegan más allá del año, por lo tanto, es necesario continuar el tratamiento con quimio y radioterapia. El tratamiento más utilizado en la quimioterapia de GBM es la temozolomida. Este es un agente alquilante, que administrado por vía oral, inhibe los mecanismos de reparación del DNA en las células tumorales. El uso de la temozolomida aumenta la supervivencia de los pacientes y disminuye la recurrencia del GBM, y además tiene la ventaja de que sólo el 4% de los pacientes experimenta efectos colaterales. Otros tratamientos que se administran en paralelo son: la carmustina (BCNU), la dexametasona, que mejora la función neurológica, y la radioterapia de 60 grays (gy) durante 30 días consecutivos.

A pesar de estos tratamientos, es excepcional la supervivencia de los pacientes más allá de los dos años. La mayoría de los pacientes presentan recurrencia de la enfermedad y mueren en menos de un año, debido a que presentan resistencia a la terapia, micro metástasis y angiogénesis, y a que en ellos se establece un ambiente inmunosupresor que favorece la supervivencia de las células tumorales.

1.2.6. Terapia basada en el uso de células que transportan genes suicidas

El tratamiento con células que presentan tropismo por las células tumorales cerebrales podría ser una terapia complementaria para el tratamiento de los gliomas. Así, al modificar a éstas células *ex vivo*, se las podría emplear para transportar genes suicidas, para que éstos sean liberados en el sitio del tumor.

Se ha observado que la implantación de células HEK-293 modificadas para producir endostatina (Bjerkvig et al., 2003), o de fibroblastos con un vector adenoviral que contiene al gen para la timidina cinasa del virus de herpes simple tipo 1 (HSV-1 TK) (Barzon et al., 2006; Chiocca et al., 2003; Rainov and Ren, 2003), reduce la masa tumoral y produce un efecto anti-angiogénico en los gliomas. Sin embargo, la baja motilidad de éstas células hace que la liberación de los genes sea inespecífica (Tabatabai et al., 2011).

Debido al tropismo que presentan las células troncales por los tumores cerebrales, se comienza a estudiar el potencial de éstas células para migrar desde un sitio distante hacia el tumor y liberar ahí los genes terapéuticos (Bexell et al., 2013). Para estos experimentos, en los ratones desnudos (nu/nu) o atímicos, se induce la formación de un tumor cerebral mediante la implantación intracraneal de células de glioma. Las líneas celulares más utilizadas para este fin son las de humano como A172, LN229, U251, U251MG, U87 y U87MG, de rata como C6 y N32, o de ratón como GL26.

Por otra parte, las células troncales se manipulan *in vitro* para insertar a los vectores que contienen a los genes suicidas. Posteriormente se inyectan por vía intracraneal en el hemisferio colateral al sitio del tumor, o por vía intravenosa, en la vena de la cola del animal, o en la aorta.

Se han observado varios casos donde la administración de las células troncales modificadas para el tratamiento de los gliomas, produce una disminución en el tamaño tumoral y un aumento en la sobrevivencia de los animales experimentales. En estos trabajos se han utilizado diferentes variedades de células troncales que transportan a distintos genes terapéuticos, tales como:

- Células pluripotentes endoteliales humanas (EPCs). Estas células derivan de la sangre periférica humana y se han modificado para la expresión de:
 - el virus del sarampión oncolítico (Wei et al., 2007).
 - un lentivirus con el gen del transportador de yodo, NIS, que facilita la incorporación de yodo radiactivo en los tumores cerebrales para su diagnóstico y tratamiento (Varma et al., 2012).

- Células pluripotentes hematopoyéticas (HPCs). Se obtienen de la médula ósea de ratones C57BL/6, o de humanos. En éstas células se han incorporado lentivirus que contienen a los genes de:
 - TGF β RII-DN, una dominante negativa del receptor tipo II para el factor de crecimiento tumoral beta (TGF β) que evita el progreso de la transformación tumoral (Noyan et al., 2012).
 - IFN- α 1, o interferón alfa 1, que incrementa el reclutamiento de células T en el tumor y en consecuencia, la inmunidad antitumoral (De Palma et al., 2008).

- Células troncales mesenquimales (MSCs). Se obtienen del tejido adiposo o de la sangre periférica humana. En ellas se han introducido adenovirus con los siguientes genes:
 - IL-12, o interleucina 12. La administración de ésta citosina, en complemento con el IFN- β , incrementa la inmunidad antitumoral (Ryu et al., 2011).
 - El ligando de muerte relacionado con la familia del factor de necrosis tumoral, o TRAIL, que induce la apoptosis en las células tumorales (Kim et al., 2008).
 - La proteína parecida a hemopexina, o PEX, que inhibe la angiogénesis en los tumores (Goren et al., 2010).
 - La citosina deaminasa (CD) en conjunto con la enzima uracil fosforibosiltransferasa, que promueven la apoptosis a través de la activación del proteosoma (Altanerova et al., 2012).

- Células troncales neurales (NSCs). Debido a que el origen de éstas células dificulta su obtención, se han desarrollado diversas líneas celulares humanas, como las HB1.F3 y las ReNcell, y de ratón como las C17.2. En éstas células, modificadas con adenovirus, se han introducido los genes de:
 - La enzima carboxilesterasa, que facilita la incorporación del quimioterapéutico derivado de captotecina, CPT-11, en las células tumorales (Lim et al., 2011).
 - aaTSP-1, que es una trombospodina modificada para tener efecto anti-angiogénico (van Eekelen et al., 2010).

- Oligonucleótidos que bloquean la expresión de miR-21, haciendo susceptibles a las células tumorales para la terapia citotóxica con TRAIL (Corsten et al., 2007).
- HSV-1 TK, la timidina cinasa del virus de herpes simple tipo 1, que está modificada para su replicación en células cancerosas. Al administrar ganciclovir, un fármaco para el tratamiento del virus, éste inhibe la incorporación de nucleótidos y provoca la muerte celular, en las células infectadas por HSV-1. Esta terapia se complementa con el uso de CD (Wang et al., 2012).
- CD e IFN- β como complemento (Ito et al., 2010).
- Células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs). Se obtienen *in vitro* a partir de la inducción de pluripotencia en células terminalmente diferenciadas como por ejemplo fibroblastos de embrión de ratón. Estas células se han utilizado como vehículo de la HSV-TK (Lee et al., 2011).
- Células troncales hematopoyéticas diferenciadas (dHSCs). Estas células, que provienen de la sangre periférica humana, se diferenciaron *in vitro* a NSCs. Se han usado para el transporte de HSV-TK (Zhao et al., 2012).

La migración de las células troncales es específica hacia los sitios tumorales. Sin embargo, los factores que determinan esta especificidad han sido poco estudiados, y los mecanismos por los cuáles éstas células atraviesan la barrera hematoencefálica se desconocen.

1.3. Las uniones estrechas

1.3.1. Estructura

Las uniones estrechas (UEs) son estructuras de adhesión célula-célula presentes en las células epiteliales y endoteliales. Se encuentran en el límite entre la cara apical, dirigida hacia el lado del ambiente externo o el lumen de ductos y cavidades, y la membrana basolateral, que se encuentra en contacto con el medio interno (Cereijido et al., 1998).

Las UEs epiteliales fueron observadas por primera vez en imágenes de microscopía electrónica de transmisión, como puntos de contacto intercelular o “besos” donde las membranas exteriores de las células vecinas parecen fusionarse y ocluir el espacio paracelular (figura 4A). Al observar el interior de la membrana plasmática, a través de su ruptura por crio-fractura, la UE se observa como una red de filamentos lineares o cadenas de partículas llamados filamentos de la UE, que se localizan por debajo de las microvellosidades (figura 4B). Por inmunofluorescencia, las proteínas de la UE forman un patrón de distribución en el borde celular que asemeja a una malla de gallinero, cuando la muestra se observa desde arriba (figura 4C); mientras que, cuando el tejido se observa de lado, las proteínas de la UE forman puntos en la porción más apical de la membrana lateral (figura 4D).

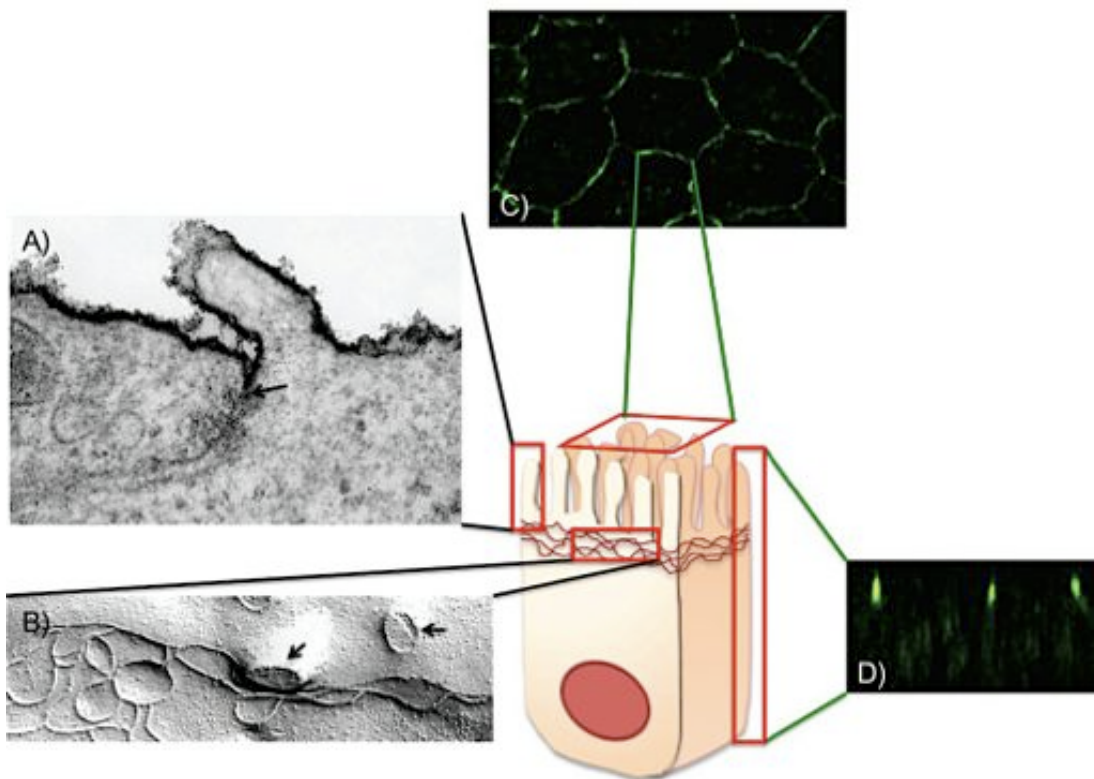


Figura 4. Estructura de la unión estrecha por microscopía electrónica y por inmunofluorescencia. A) Por microscopía electrónica de transmisión, la UE se observa como puntos de contacto célula-célula donde las membranas de las células adyacentes parecen fusionarse (flecha). Se observa cómo el marcador electrodenso, rojo de rutenio, adicionado a la superficie apical, no tiñe la ruta paracelular por debajo de la UE. B). Por crio fractura, la UE se observa como una red de filamentos por debajo de las microvellosidades (flechas). Por inmunofluorescencia, las proteínas de la UE dan un patrón de malla de gallinero al ser visto el tejido desde arriba (C); mientras que en la vista lateral (D), la UE se observa como un punto que limita la membrana apical de la basolateral. Tomado de (Gonzalez-Mariscal L., 2012).

Las células endoteliales cerebrales, a diferencia de las epiteliales, son largas y aplanadas, y sus bordes se superponen con los de la célula vecina, formando grupos celulares que parecen empalizadas. En las imágenes de microscopía electrónica de transmisión, las UEs de las células endoteliales cerebrales se observan como un conjunto de puntos de contacto intercelulares a lo largo de la membrana lateral, que ocuyen por completo el espacio paracelular (figura 5A).

En imágenes de inmunofluorescencia se confirma la estructura alargada y plana de las células del EMC. Cuando el tejido se ve desde arriba, se observa el patrón de malla de gallinero que, a diferencia de los epitelios, en los endotelios parece como una malla estirada (figura 5B). En la vista lateral, la UE se observa como una línea horizontal punteada, ya que las células son planas (figura 5C).

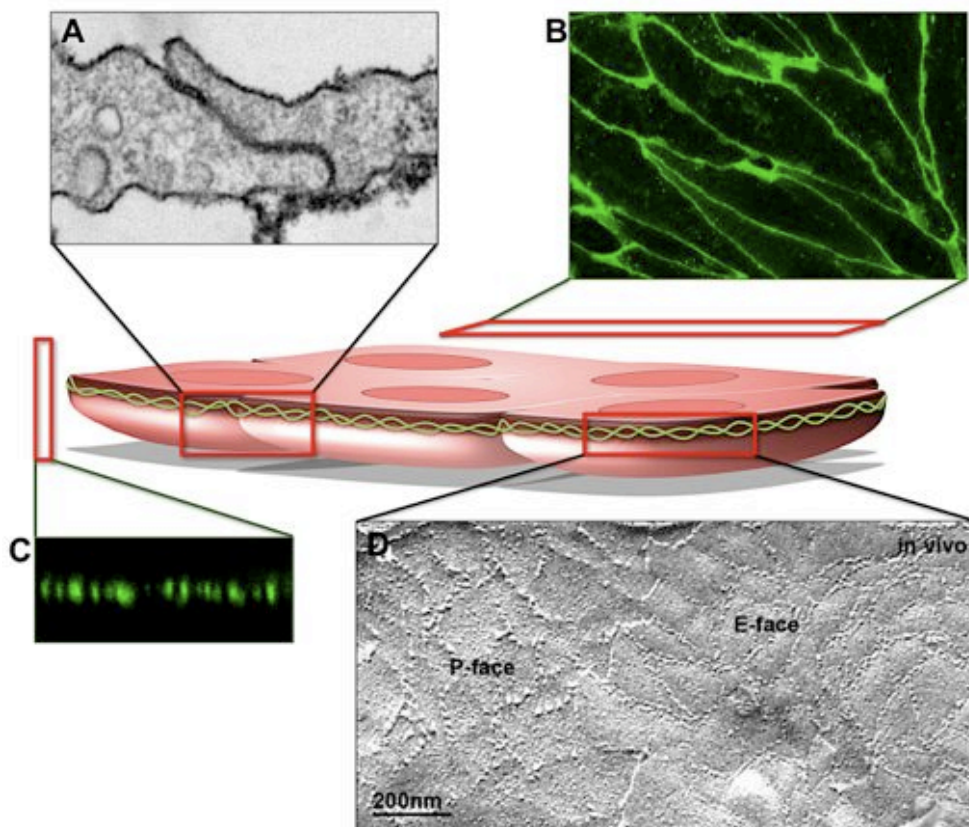


Figura 5. Estructura de la unión estrecha en las células del EMC. A) Por microscopía electrónica de transmisión, la UE se observa como un conjunto de puntos del contacto entre dos células adyacentes. Por inmunofluorescencia, las proteínas de la UE dan un patrón de malla de gallinero al ser vistas desde arriba, pero a diferencia de los epitelios, las células endoteliales son alargadas (B). En la vista lateral (C), las células endoteliales se observan planas y sus UE corresponden a los puntos entre ellas. D) Por crio-fractura, la UE presenta una alta asociación de partículas a la cara-P. D, tomado de (Wolburg et al., 2009).

Por crio-fractura, existen dos parámetros que determinan la calidad funcional de las UEs: la complejidad de la red de filamentos y la asociación de las partículas intramembranales a la cara-P o protoplásmica, o a la cara-E o exoplásmica (Madara and Dharmasathaphorn, 1985). Las UEs de los epitelios de baja RET tienen filamentos discontinuos en la cara-P y partículas en la cara-E, mientras que las UEs de los epitelios de alta RET, tienen una alta asociación de filamentos y partículas a la cara-P y aparecen partículas en la cara-E (Furuse et al., 2001). En las células endoteliales periféricas, las partículas se asocian predominantemente a la cara-E (Simionescu et al., 1976). En cambio, las UEs del EMC poseen una alta asociación de partículas a la cara-P (figura 5D), semejante a lo que sucede en los epitelios de alta resistencia (Reese and Karnovsky, 1967). Desafortunadamente, éste patrón no se conserva en los cultivos *in vitro* de EMC (Wolburg et al., 1994).

1.3.2. Función

La UE tiene dos funciones canónicas: 1) de compuerta, por medio de la cual se regula el paso de iones, agua, moléculas y células por la vía paracelular; y 2) de cerca, a través de la cual se evita el movimiento en el plano de la membrana plasmática de lípidos y proteínas entre las caras apical y basolateral (figura 6).

1.3.3. Composición

Las proteínas que forman a las UEs son de dos tipos: integrales y periféricas (figura 7). Dentro de las proteínas integrales se encuentra ocludina, MARVELD3, tricelulina y la familia de las claudinas. Estas proteínas se denominan “tetraspan” porque atraviesan cuatro veces la membrana plasmática, poseen dos dominios extracelulares, que les permiten el contacto con la célula vecina, y sus extremos amino y carboxilo se orientan hacia el citoplasma.

Otra proteínas integrales de las UEs son el receptor de lipoproteína estimulado por lipólisis (LSR, por las siglas en inglés de Lipolysis Stimulated lipoprotein Receptor) y la familia de las moléculas de adhesión intercelular (JAMs, por las siglas en inglés de Junctional Adhesion Molecules), pero a diferencia de las “tetraspan”, éstas atraviesan una sola vez la membrana plasmática, y contienen en su región extracelular dominios semejantes a las inmunoglobulinas.

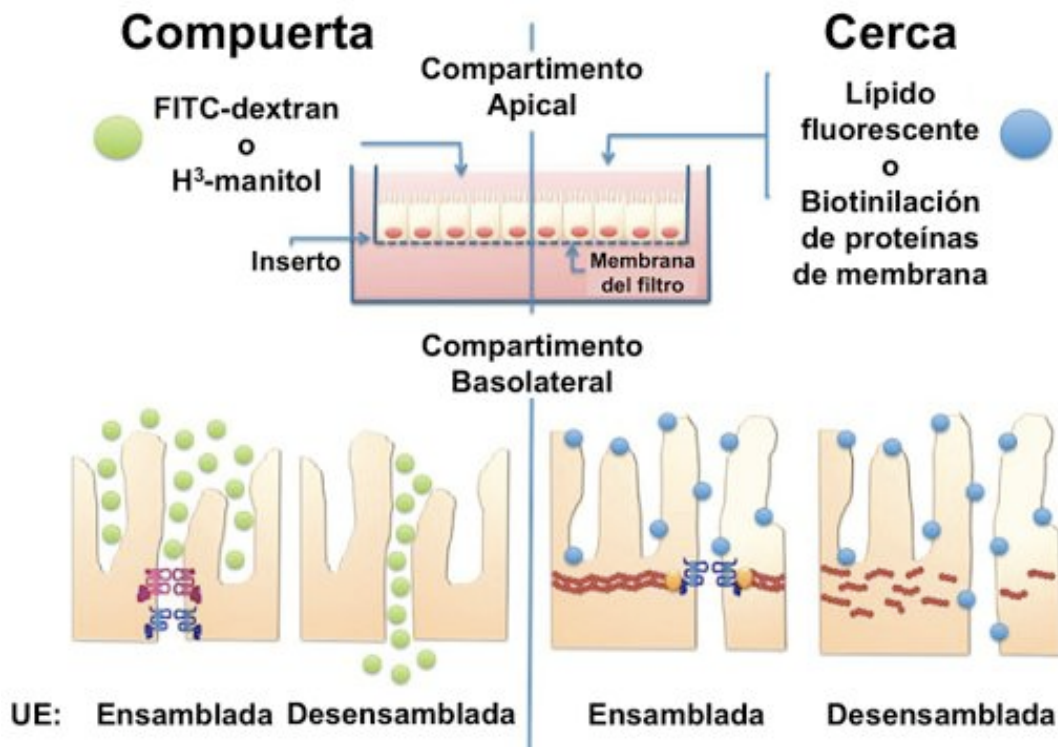


Figura 6. La UE funciona como una compuerta paracelular y una cerca membranar. La función de compuerta de la UE se evalúa midiendo el paso de rastreadores por la ruta paracelular, del compartimento apical al basolateral. La función de cerca se determina al evaluar la libre difusión de lípidos o proteínas en el plano de la membrana. Modificado de (Gonzalez-Mariscal L., 2012).

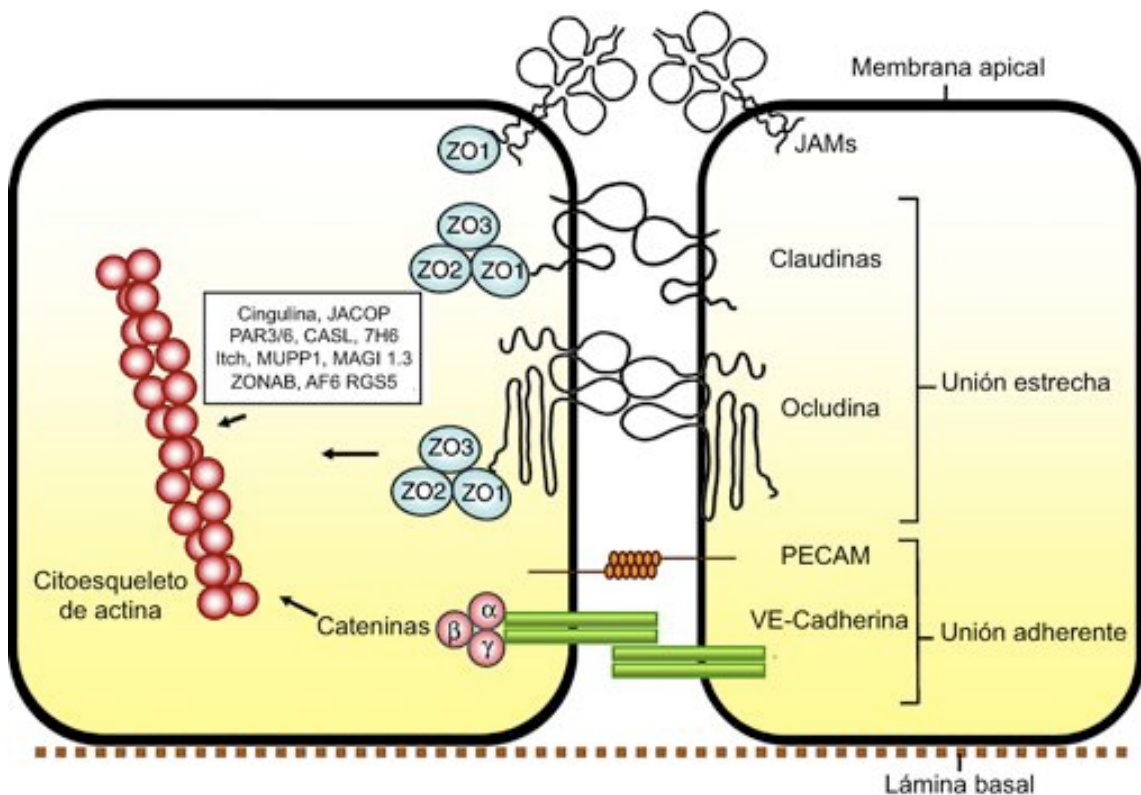


Figura 7. Composición molecular de las UEs. El complejo transmembranal de la UE está formado por ocludina, claudinas, LSR y JAMs. Las cadherinas de la unión adherente, proveen el contacto inicial entre las células vecinas, necesario para la formación ulterior de la UE. Las claudinas de las células vecinas se unen entre sí a través del espacio intercelular. La expresión diferencial de las claudinas modifica las propiedades de la UE, ya que éstas forman poros que restringen o facilitan el paso de los distintos iones. El papel de las JAMs y LSR es definir el sitio de formación de las UEs bi y tricelulares. Las claudinas, la ocludina, LSR y las JAMs se asocian a las proteínas adaptadoras: ZO-1, -2 y -3. Estas últimas crean un vínculo con el citoesqueleto de actina/miosina. Modificado de (Abbott et al., 2010).

La función principal de las proteínas integrales de las UEs es establecer el contacto célula-célula, a través de la interacción de sus dominios extracelulares con su contraparte en la célula vecina. Las claudinas en particular, y a través de los aminoácidos presentes en su primer asa extracelular, determinan la selectividad iónica del tejido (Angelow et al., 2008), mientras que las JAMs y LSR marcan el sitio donde se establecerán las UEs bi y tricelulares, respectivamente (Liu et al., 2000).

a) Las claudinas

Las claudinas en los vertebrados, constituyen una familia de 24 miembros. Su primer asa extracelular es más larga que la segunda, y contiene un par de cisteínas que dan estabilidad a la molécula al establecer puentes disulfuro, y aminoácidos cargados que determinan la selectividad iónica de la ruta paracelular.

Las claudinas en una célula interactúan con otras claudinas en la célula vecina, lo que se conoce como interacción en *trans*. También se asocian con otras claudinas en el plano de la misma membrana, en la llamada interacción en *cis*, a través de su segunda asa extracelular (figura 8). La cola citoplasmática, en cambio, es el blanco de modificaciones postraduccionales que modulan el grado de sellado y la estabilidad de la unión. El motivo de unión a dominios PDZ, presente en el extremo carboxilo terminal de las claudinas, permite que se asocien con las proteínas de anclaje ZOs y MUPP1.

Las claudinas forman los filamentos de la UE. Su transfección en células que carecen de proteínas integrales de la UE como los fibroblastos-L, promueve la formación de redes de filamentos similares a las UEs de las células epiteliales. A pesar de que todas las células epiteliales expresan claudinas, cada tejido exhibe un conjunto particular de ellas, y algunas son más ubicuas que otras (figura 9). Por ejemplo, las claudinas 1, 3 y 4 se expresan en la mayoría de los tejidos, mientras que la claudina-5 es la principal claudina del endotelio.

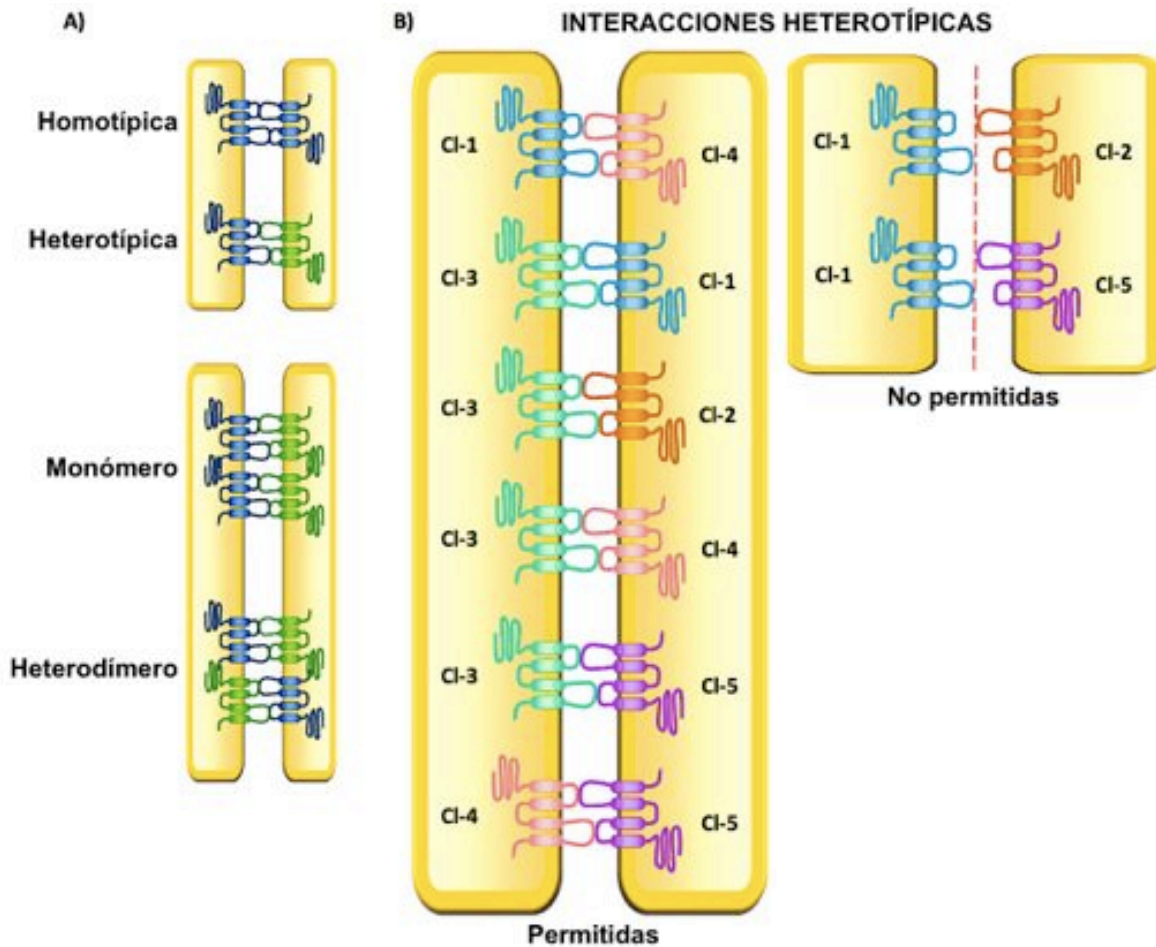


Figura 8. Esquema de la interacción de las claudinas entre las células vecinas. A) Las claudinas establecen interacciones homotípicas y heterotípicas entre las células vecinas, y se dimerizan formando monómeros o heterodímeros. B) Interacciones heterotípicas entre las claudinas, reportadas como permitidas y no permitidas. Modificado de (Gonzalez-Mariscal L., 2012).

Se han identificado grupos de claudinas que funcionan como barreras catiónicas (ej. Cls 1, 5, 8, 11, 14 y 19), canales catiónicos (ej. Cls 2, 10b, 12, 15 y 16), barreras aniónicas (ej. Cls 6 y 9) y poros aniónicos (ej. Cls 4 y 10a).

La expresión particular de las claudinas corresponde a las condiciones fisiológicas y patológicas del tejido en cuestión. Por ejemplo, la nefrona expresa claudinas específicas en cada uno de sus segmentos. Así, en el túbulo proximal y en el segmento descendente del asa Henle, donde se lleva a cabo el mayor intercambio iónico, se expresa la claudina-2 que funciona como un canal catiónico, mientras que en el túbulo distal y el tubo colector donde el líquido contenido es prácticamente orina, se expresan las claudinas 4 y 8, que son barreras catiónicas (figura 9).

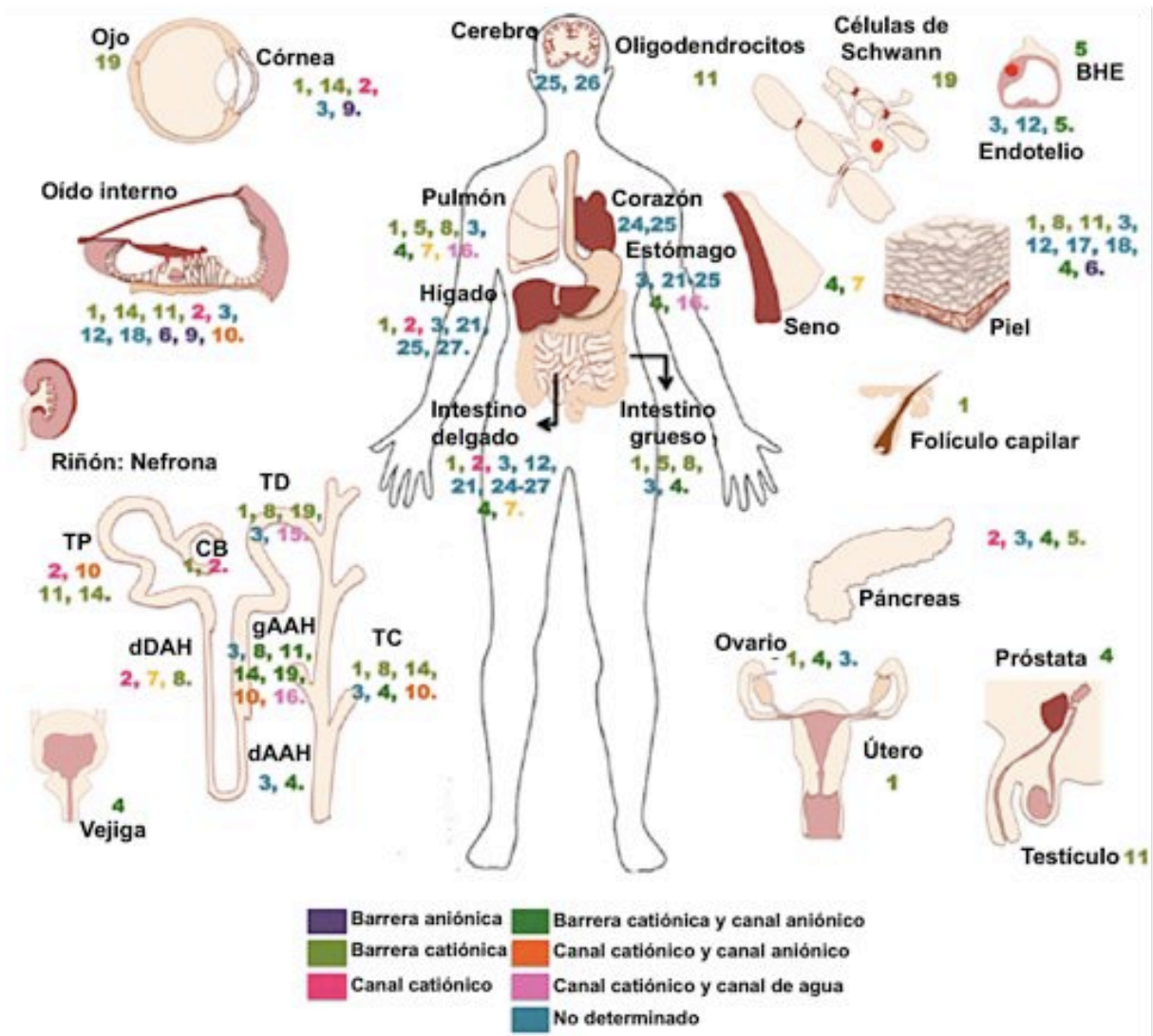


Figura 9. Expresión de diferentes conjuntos de claudinas en cada tejido del organismo. dAAH, rama delgada ascendente del asa de Henle; BHE, barrera hematoencefálica; CP, cápsula de Bowman; dDAH, rama delgada descendente del asa de Henle; gAAH, rama gruesa ascendente del asa de Henle; TC, túbulo colector; TD, túbulo distal; TP, túbulo proximal.

La expresión de las claudinas responde también al estado fisiológico del organismo. Así, se ha visto que durante la lactancia en los mamíferos, por la secreción de prolactina, aumenta la expresión de la claudina-12 en la porción proximal del intestino delgado. Esta claudina es un poro catiónico, lo que permite una gran absorción de Ca^{2+} que evita en consecuencia el desarrollo de osteoporosis en las madres lactantes (Charoenphandhu et al., 2009).

La expresión de claudinas también se altera en condiciones patológicas. Por ejemplo, en el esófago de los pacientes con reflujo o enfermedad de Barrett, como

mecanismo de defensa al ácido que lo lastima, se desarrolla un epitelio columnar en remplazo del epitelio escamoso dañado, que expresa predominantemente a la claudina-18. Esta claudina incrementa la RET y reduce la permeabilidad al H^+ (Jovov et al., 2007).

Otro caso interesante se observa en la pouchitis, una enfermedad que en ocasiones aparece después de la anastomosis entre la bolsa ileal y el ano en los pacientes con colitis ulcerosa crónica. En la bolsa íleo-anal que se forma, la claudina-1 disminuye, mientras que la claudina-2 aumenta. Este cambio es muy negativo para el paciente, ya que la claudina-2 forma poros de cationes, y se piensa que su sobre-expresión en el intestino de los pacientes con colitis ulcerativa, Crohn's y enfermedad celiaca es uno de las causas de la enfermedad (Amasheh et al., 2009).

En las patologías del SNC la BHE se encuentra comprometida, porque disminuye la expresión de las claudinas. Así, se ha visto que en el edema (Tang et al., 2010), la esclerosis múltiple (Kirk et al., 2003) y los aneurismas (Tada et al., 2010), la expresión de claudina-5 en el EMC disminuye. En cambio, en la encefalomiелitis y en los GBMs, la expresión de claudina-5 se mantiene, mientras que la de claudina-3 disminuye (Wolburg et al., 2003).

La función de las claudinas no es redundante. Los experimentos con ratones carentes de claudinas (denominados en inglés "*knock-out*"), silenciados (denominados en inglés "*knock-down*"), transgénicos y con mutaciones puntuales, muestran que cada claudina es necesaria para un fenotipo en particular. Por ejemplo, el ratón carente de claudina-5 muere después del nacimiento, debido a que la barrera hematoencefálica se encuentra severamente comprometida. Esto demuestra que la claudina-5 es esencial para el establecimiento de la barrera hematoencefálica (Nitta et al., 2003).

b) Proteínas periféricas de la UE

En cuanto a las proteínas de la cara citoplásmica de las UEs encontramos a la familia de las proteínas ZO (zona occludens) y a varias otras que poseen dominios PDZ, tales como Pals1, MAGI -1, -2 y -3, Par-3 y -6, MUPP1, AF6 y PATJ, así como cingulina y JACOP que son semejantes a la miosina y que carecen de dominios PDZ. Estas proteínas se caracterizan porque forman el vínculo entre las proteínas integrales y el citoesqueleto de actina (figura 7).

1.4. La barrera hematoencefálica

1.4.1. Descubrimiento de la barrera hematoencefálica

En el SNC existen cuatro tipos de barreras que controlan el flujo de sustancias a distintos niveles (figura 10): la barrera hematoliquoral (o hemato-LCR), localizada entre el contenido de los vasos sanguíneos del plexo coroideo y el líquido cefalorraquídeo (LCR); la barrera hematoencefálica (BHE), ubicada entre el lumen de los vasos cerebrales y el parénquima neural; la barrera interna cerebral-LCR, separando el LCR y el parénquima neural, presente solamente durante el desarrollo temprano; y la barrera externa cerebral-LCR (o subaracnoidea), entre el espacio subaracnoideo que está lleno de LCR y el cerebro.

La primera vez que se observó la existencia de una barrera biológica entre el cerebro y la sangre fue cuando Paul Ehrlich en 1885 inyectó azul de Evans, un colorante *Vitae* derivado de la anilina, en la sangre de ratas. Buscando teñir estructuras finas en el organismo, encontró que el colorante se dispersaba por todo el organismo, excepto en el SNC (Figura 11A). Más tarde en 1913, Edwin Goldmann inyectó el mismo colorante directamente en el LCR. Esta vez, el colorante se dispersó en el parénquima neural, mientras que el resto del organismo permaneció sin tinte (Figura 11B). A partir de estas observaciones se concluyó que el SNC se encuentra protegido por una barrera.

La microscopía electrónica de transmisión (MET) permitió que en 1967, Reese y Karnovsky observaran que el elemento clave que determina la propiedad de barrera se encuentra en el endotelio cerebral. Al inyectar peroxidasa vía intravenosa e inducir su reacción, ésta se dispersó en los vasos cerebrales pero no en el tejido neural (figura 11C). Con esto se concluyó, que la barrera que limita el paso de sustancias entre la sangre y el cerebro, se encuentra en las células del endotelio microvascular cerebral (EMC) (Reese and Karnovsky, 1967).

Lewandovsky fue el primero en utilizar el término de *bluthirnschranke* o BHE en 1900, al estudiar el tráfico de drogas de la sangre al cerebro. Hoy se concibe a la BHE como una propiedad funcional del EMC, que impide el intercambio libre de iones, moléculas y células entre el plasma sanguíneo y el tejido cerebral.

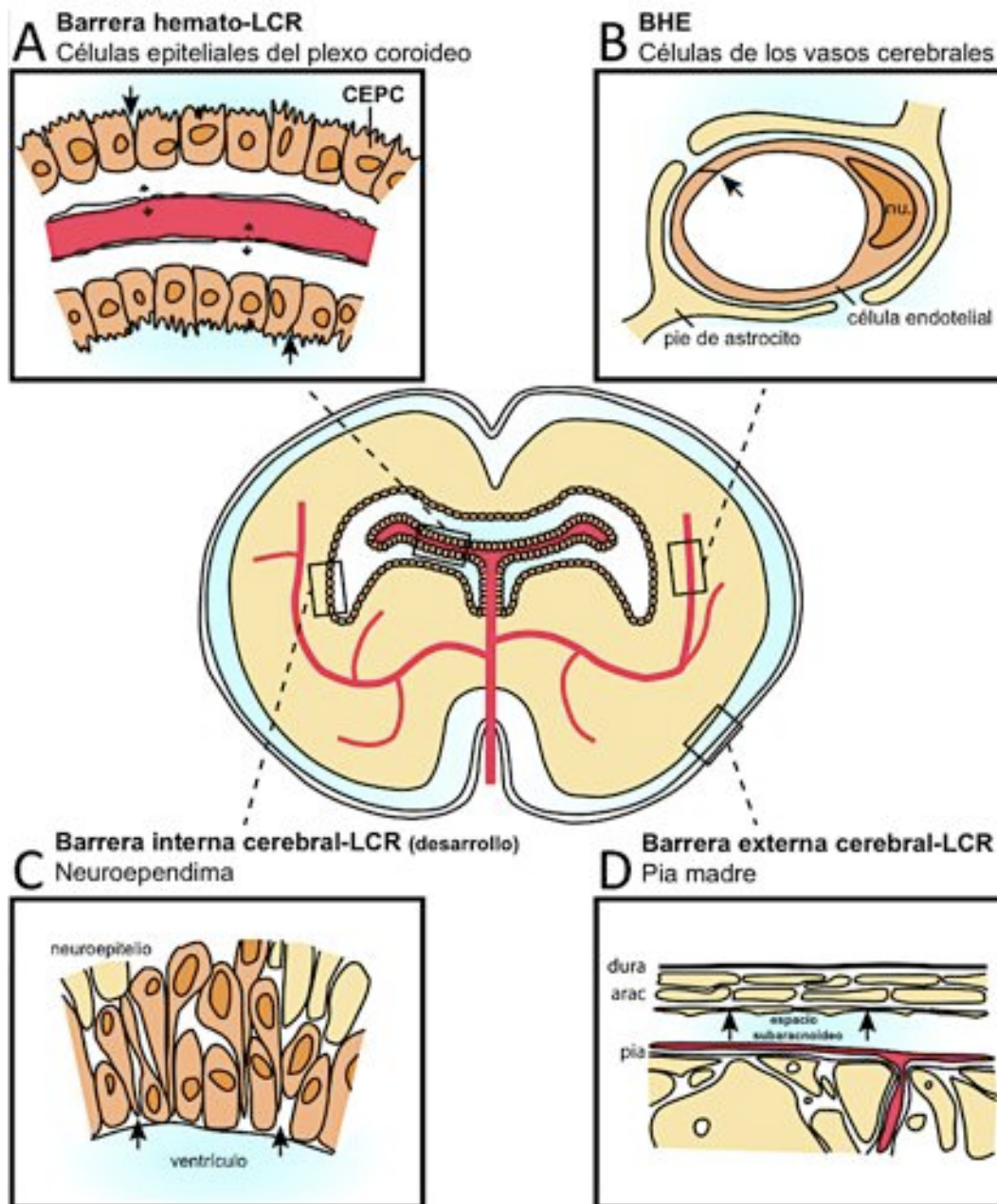


Figura 10. Barreras del SNC. A) Barrera hemato-LCR. Es una barrera entre los vasos sanguíneos del plexo coroideo y el LCR. Los vasos del plexo coroideo están fenestrados y forman una barrera no restrictiva (flechas discontinuas). Las CPECs están unidas por UEs que restringen el movimiento de moléculas (flechas). B) BHE. Barrera entre el lumen de los vasos cerebrales y el parénquima neural. Las células endoteliales tienen UEs (flechas) que restringen el movimiento de moléculas. C) Barrera interna cerebral-LCR. Está presente solamente durante las etapas tempranas del desarrollo, es una barrera entre el LCR y el parénquima neural. Las células neuroependimales que limitan la pared ventricular (naranja), están conectadas por uniones que restringen el movimiento de proteínas entre el LCR y el cerebro (flechas), pero no de moléculas pequeñas como la sacarosa. En la etapa adulta, las uniones entre las células neuroependimales se pierden. D) Barrera externa cerebral-LCR. Barrera entre el espacio subaracnoideo que está lleno de LCR y el cerebro. Los vasos sanguíneos están fenestrados, pero las células externas de la aracnoides están conectadas por uniones estrechas. Arac, aracnoides; CPEC, células epiteliales del plexo coroideo; Dura, dura madre; LCR, líquido cefalorraquídeo; nu, núcleo; Pía, pía madre. Modificado de (Liddelw, 2011).

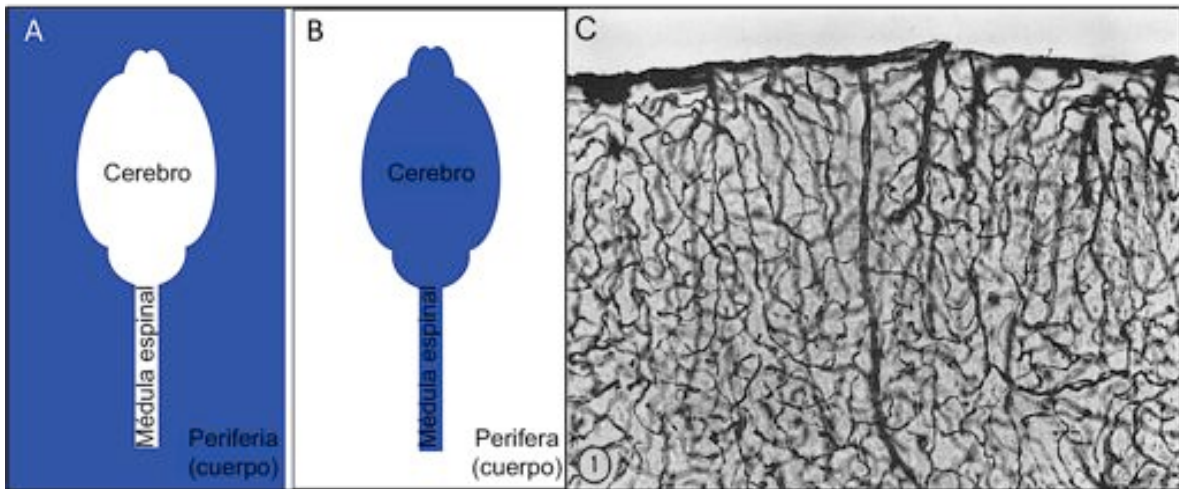


Figura 11. Primeros experimentos en demostrar la existencia de una barrera entre el cerebro y el resto del organismo. A) La tinción con azul de tripano derivado de la periferia no penetró al SNC. B) Al inyectar azul de tripano en el LCR, el colorante se dispersó por el cerebro y la médula espinal, pero no tiñó los tejidos de la periferia. C) Corte de cerebro a nivel de la corteza cerebral que muestra la distribución de la peroxidasa administrada por vía intravenosa. El producto de la reacción de la peroxidasa se encuentra en los vasos cerebrales pero deja libre el área del parénquima neural. En la parte superior se observa la superficie de la corteza cerebral; 175X. Tomado de (Liddelow, 2011), A y B; de (Reese and Karnovsky, 1967), C.

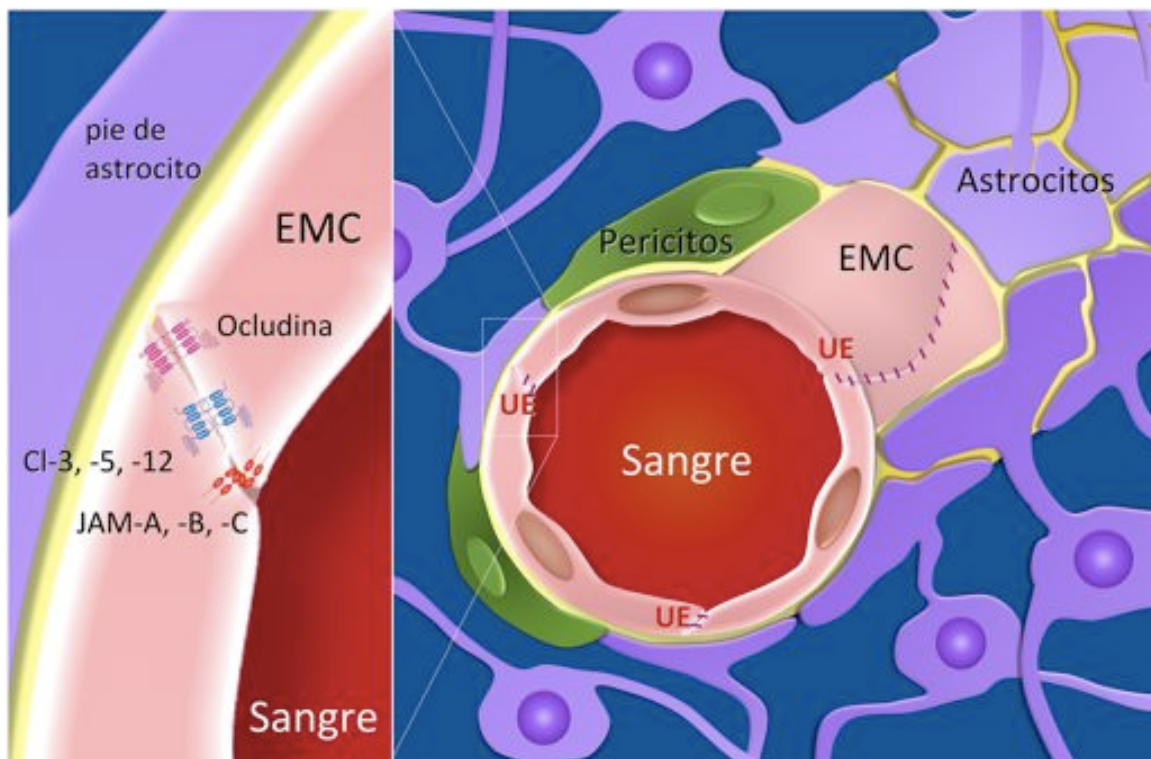


Figura 12. Esquema de la barrera hematoencefálica. Las células del endotelio microvascular cerebral (EMC) se encuentran unidas entre sí por las UEs, que regulan el tránsito paracelular de sustancias de la sangre al cerebro y viceversa. Los capilares cerebrales están rodeados por una lámina basal (amarillo) que permite el contacto directo del EMC con los pericitos y los pies de los astrocitos. La secreción de factores por éstas células promueve la expresión de proteínas de la UE (amplificación). Modificado de (Gonzalez-Mariscal L., 2012).

A nivel molecular, la UE es la estructura responsable del flujo paracelular de sustancias en las células endoteliales (Wolburg H *et al.* 2008). En el EMC se expresa principalmente la claudina-5 y en menor proporción las claudinas 3 (originalmente identificada como claudina-1 y ahora referida como claudina 1/3), 10 y 12, y posiblemente otros subtipos de claudinas (Ohtsuki *et al.*, 2008). Otras proteínas integrales del EMC son la ocludina (Morita *et al.*, 1999) y las JAMs A, B y C (Wilhelm *et al.*, 2011), mientras que las proteínas periféricas del EMC son ZO-1, -2 y -3; MAGI-1, -2 y -3; PAR3, -6; MUPP1; RGS5, cingulina y JACOP (Abbott *et al.*, 2006). Los pericitos y los astrocitos adyacentes al EMC regulan el funcionamiento de la BHE, al inducir el sellado de las UEs, lo que además mantiene la expresión polarizada de los transportadores en las membranas luminal y adluminal del EMC (figura 12) (Rubin *et al.*, 1991a).

1.4.2. Características particulares del EMC

Las células del EMC poseen las siguientes características morfológicas y funcionales que las diferencian de otros endotelios (figura 13) (Rubin and Staddon, 1999):

- Expresan proteínas de la UE. Las UEs en los endotelios periféricos son escasas o ausentes, mientras que en el EMC, particularmente en los capilares y las vénulas, forman una red compleja de filamentos que sellan el espacio intercelular (Brightman and Reese, 1969; Nagy *et al.*, 1984).
- Poseen alta resistencia eléctrica transendotelial (RET). Mientras un endotelio periférico alcanza de 2 a 20 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, en el EMC, la RET es de $\sim 1800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Butt *et al.*, 1990).
- No presentan fenestraciones, por medio de las cuales, el endotelio periférico difunde las sustancias hacia los tejidos (Bearer and Orci, 1985).
- Presentan baja endocitosis de fase fluida y en cambio, predomina la mediada por receptores, lo que da la selectividad al tráfico de moléculas (Villegas and Broadwell, 1993).
- Tienen una gran cantidad de mitocondrias, lo que permite la operación de múltiples sistemas de transporte activo (Villegas and Broadwell, 1993).
- Poseen una lámina basal simple, que permite el contacto directo con las células adyacentes, los pericitos y astrocitos (Prat *et al.*, 2001).

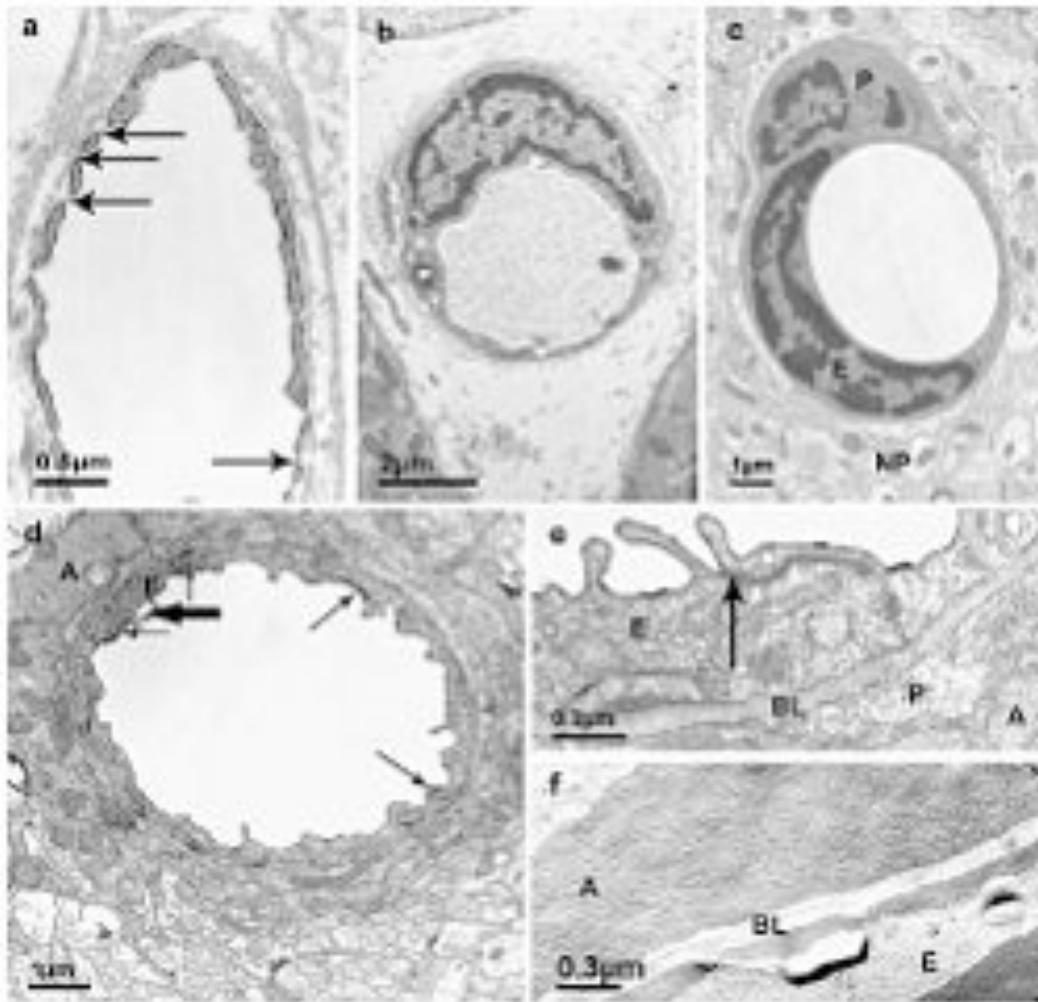


Figura 13. Microscopía electrónica de distintos tipos de vasos. a) capilares fenestrados en el plexo coroideo del ojo de ratón (flechas, algunas fenestras). b) capilar muscular de una biopsia humana. El capilar es continuo pero el espacio entre el capilar y las células musculares es grande. c) Capilar cerebral de ratón (E, célula endotelial; P, pericito). El capilar es continuo y está integrado al parénquima neural (NP). d) Vaso constituido por más de una célula endotelial (E) en su circunferencia; cerebro de ratón (flechas delgadas, UE entre las células endoteliales; flecha gruesa, área aumentada; A, pie de astrocito). e) Área aumentada de la zona de la UE (flecha) entre dos células endoteliales (BL, lámina basal). f) Criofractura de la membrana de un pie de astrocito (A) del cerebro de ratón, caracterizada por una alta densidad de partículas en arreglos ortogonales (BL, lámina basal; E, célula endotelial). Tomado de (Wolburg et al., 2009).

1.4.3. Transporte a través del EMC

El EMC que se encarga de proveer al cerebro de los nutrientes esenciales para su funcionamiento, tiene los siguientes sistemas de transporte (Wilhelm et al., 2011):

- Paracelular. Regulado por las UEs que restringen el paso de agua y componentes solubles entre las células adyacentes.
- Transcelular. Está formado por los sistemas de transporte que regulan la endocitosis y transcitosis a través del citoplasma.

- Eflujo. Está formado por las bombas ABC como ABCB1/glicoproteína-P, ABCC1, ABCC4 y ABCG2/BCRP a través de las cuáles se expulsan productos de desecho y sustancias tóxicas que puedan dañar al cerebro.

El flujo de iones y moléculas a través de la BHE es esencial para la producción de un fluido intersticial óptimo para el SNC. Por ejemplo, la concentración de proteínas, K^+ y Ca^{2+} es menor en el fluido intersticial en comparación con el plasma sanguíneo, en cambio el Mg^{2+} se encuentra en mayor concentración en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Abbott, 2004). Los iones, moléculas hidrofílicas y células, cruzan el EMC por la ruta paracelular, mientras que las moléculas liposolubles pequeñas y algunos gases como el O_2 y el CO_2 se difunden de manera pasiva por la ruta transcelular. Los nutrientes polares como la glucosa y los aminoácidos requieren de transportadores específicos presentes en la membrana de las células endoteliales (figura 14).

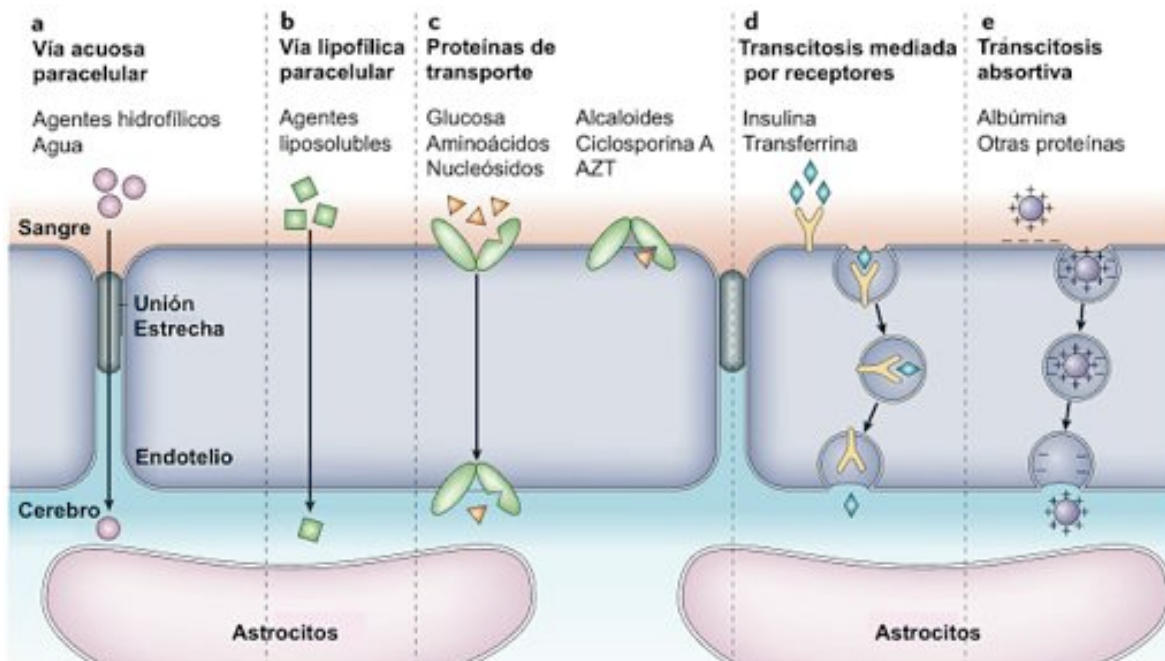


Figura 14. Rutas de tránsito molecular a través de la BHE. Esquema de las células endoteliales que forman la BHE en asociación con los pies de los astrocitos. Se observan las principales rutas de tráfico molecular. a) La unión estrecha restringe el paso de componentes solubles en agua. b) A través de la membrana lipídica del EMC, se difunden agentes liposolubles. c) El EMC contiene sistemas de transporte o acarreadores para la glucosa, aminoácidos, bases púricas, nucleósidos y otras sustancias. Algunos de los transportadores son dependientes de energía (como la glicoproteína-P) y actúan como transportadores de eflujo. AZT, acidotimidina. d) Proteínas como la insulina y la transferrina, se transfieren por endocitosis y transcitosis mediada por receptores. e) No es frecuente el transporte de proteínas como la albúmina, pero su acoplamiento a cationes puede incrementar su difusión por endocitosis y transcitosis absorbiva. La mayoría de las drogas que entran al SNC, utilizan la ruta b. Tomado de (Abbott et al., 2006).

1.4.4. Medición de la propiedad de barrera del EMC

En modelos *in vitro* se puede determinar la propiedad de barrera de los endotelios mediante dos métodos:

- Resistencia eléctrica transepidotelial (RET). Para esta medición, las células endoteliales se siembran sobre filtros semipermeables contenidos en un inserto. Estos definen dos compartimentos: el apical y el basolateral. Para la medición se utilizan dos electrodos que se colocan separados por la monocapa endotelial, se pasa un pulso de corriente y se mide la deflexión en el voltaje producido. De acuerdo a la ley de Ohms se calcula la resistencia del endotelio. La figura 15 muestra el circuito eléctrico a través de una monocapa epitelial/endotelial y la relación entre las distintas resistencias del circuito.

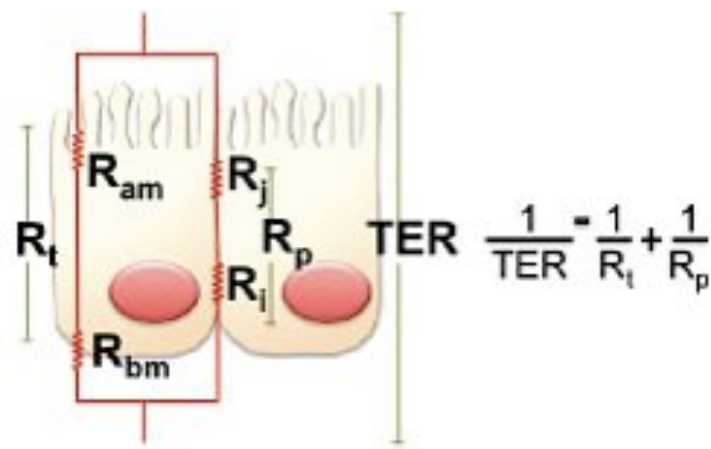


Figura 15. Esquema del circuito eléctrico a través de una monocapa epitelial. TER, resistencia eléctrica transepidotelial/transendotelial; R_t , resistencia transcelular; R_{am} , resistencia de la membrana apical; R_{bm} , resistencia de la membrana basolateral; R_p , resistencia paracelular; R_j , resistencia de la UE; R_i , Resistencia del espacio intercelular. Tomado de (Gonzalez-Mariscal L., 2012).

El análisis de la propiedad de barrera de una monocapa endotelial, puede determinarse con la medición de la capacitancia eléctrica (C_{CL}). Este parámetro provee información adicional acerca de la expresión de microvellosidades, cilios y otras extrusiones en las células endoteliales, que modifican la RET de la monocapa. Los valores de RET y de C_{CL} obtenidos en una monocapa, se combinan para dar la impedancia total, que puede medirse electrónicamente mediante el sistema CellZscope®.

Como se ilustra en la figura 16A, en este sistema se colocan las monocapas endoteliales cultivadas sobre insertos semipermeables que pueden ser de diferente diseño, material y tamaño de poro. A cada lado de la membrana se encuentra un electrodo que aplica un voltaje de corriente alterna (V_{AC}). El sistema CellZscope® considera además, al medio celular y al de cultivo, y a la interface entre los electrodos, que contribuyen con la impedancia. La RET total se calcula electrónicamente, en base al circuito eléctrico generado que se muestra en la figura 16B. El CellZscope®, tiene además la ventaja de que puede medir la RET de varias monocapas y de manera constante sin que el cultivo se manipule, evitando así, una posible contaminación. Los resultados se capturan y grafican automáticamente en el programa de cómputo que se incluye en el sistema CellZscope®.

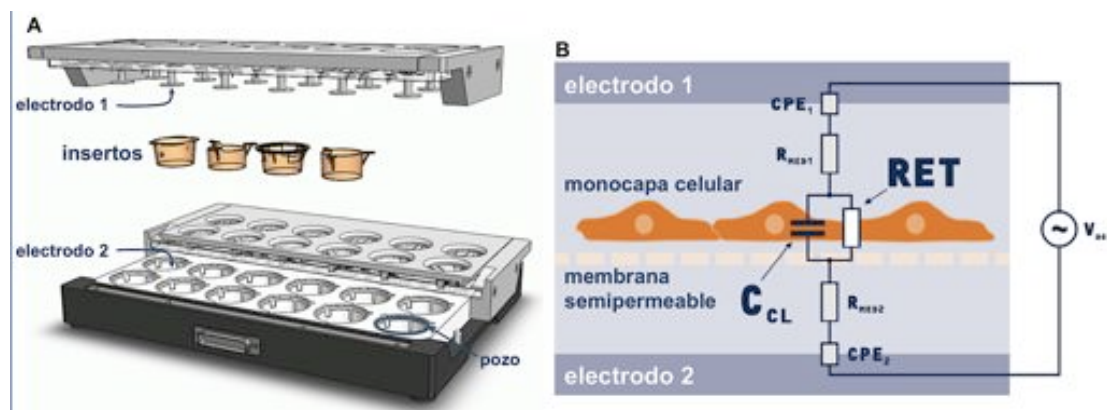


Figura 16. Esquema del sistema CellZscope® y el circuito eléctrico que utiliza. A) El CellZscope® contiene un plato multipozos en el que se pueden colocar los diferentes tipos de insertos. Un electrodo se localiza a cada lado de la membrana, y se aplica una corriente alterna que en base al circuito eléctrico generado, medirá la impedancia total del sistema. B) Circuito eléctrico de una monocapa endotelial montada en el sistema CellZscope®. C_{CL} , capacitancia eléctrica; CPE_1 , elemento de fase constante apical; CPE_2 , elemento de fase constante basal; RET, resistencia eléctrica transendotelial; R_{MED1} , resistencia del medio de cultivo en el compartimento apical; R_{MED2} , resistencia del medio de cultivo en el compartimento basal; V_{ac} , voltaje de corriente alterna. Modificado de la nota técnica del sistema CellZscope®. <http://www.nanoanalytics.com/>

- Permeabilidad. Para determinar la permeabilidad paracelular de un endotelio se emplean moléculas hidrosolubles que no induzcan endocitosis, y para las cuales las célula no ofrezca un transportador específico. Por ejemplo se utilizan el dextrán acoplado a FITC y el manitol tritiado (H^3). La permeabilidad aparente se determina mediante la siguiente fórmula: $P_{app} = dQ / (dt \times A \times C_0)$, donde: dQ = cantidad transportada; dt = tiempo de incubación; A = superficie del filtro; C_0 = concentración inicial.

1.4.5. Modelos *in vitro* de BHE

Se han establecido diversos modelos *in vitro* para el estudio de las propiedades de la BHE. Sin embargo, esto no ha sido una tarea fácil, ya que las células endoteliales cerebrales en cultivo pierden la propiedad de la BHE y requieren para mantener esta propiedad, del co-cultivo con las células gliales (Wolburg et al., 2009).

- Modelos de BHE basados en células de origen no cerebral.

Las células epiteliales de riñón de perro, MDCK (Mardin-Darby canine kidney), se utilizaron originalmente por su alto contenido de proteínas de la UE. Sin embargo, mientras que en éstas predomina la expresión de la claudina-1, en el EMC el componente fundamental es la claudina-5. Se empleó este modelo porque las células MDCK son fáciles de cultivar y de transfectar con moléculas propias del EMC (Wang et al., 2005).

Las células HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) son la línea celular endotelial más utilizada. Su origen es el cordón umbilical humano, por lo que no poseen todas las propiedades de la BHE, pero algunas de éstas características pueden ser inducidas mediante su co-cultivo con las células gliales (Hurst and Fritz, 1996).

- Modelos basados en el co-cultivo de células del EMC y células gliales.

Para lograr tener un sistema *in vitro* de BHE, fue necesario desarrollar lo siguiente: 1) aislar capilares cerebrales (Joo and Karnushina, 1973), 2) lograr su cultivo primario (DeBault et al., 1979; Panula et al., 1978), 3) mantener el cultivo en filtros semipermeables (Bowman et al., 1983), y 4) descubrir que los astrocitos secretan factores que sellan la BHE (Lattera et al., 1990; Rubin et al., 1991a; Tao-Cheng et al., 1987).

Desde que se observó que las propiedades de la BHE en el EMC se inducen por los factores que secretan los astrocitos (DeBault and Cancilla, 1980), o por el contacto directo con los pies de los astrocitos (Tao-Cheng et al., 1987), se establecieron diversos modelos de BHE basados en el co-cultivo de EMC y células gliales. En estos modelos se emplean células del EMC provenientes de cultivos primarios o líneas celulares.

Cultivos primarios. Las células del EMC se han aislado de diversos mamíferos como rata, ratón, puerco y bovino (Deli et al., 2005). El uso de roedores se facilita por la disponibilidad de los animales experimentales, de anticuerpos y de genes clonados. Estos

modelos están bien caracterizados e incluso pueden llevarse a cabo con ratones transgénicos. Sin embargo, tienen la desventaja de que el tamaño de éstos animales limita la cantidad de células disponibles por animal. Del puerco y del bovino se puede obtener un número mayor de células, pero la disponibilidad de éstos animales es limitada. Las células de puerco y bovino presentan buenas propiedades de permeabilidad, sin embargo, sus características bioquímicas y moleculares aun no están bien definidas. Las células gliales pueden provenir de cultivos primarios de la misma especie que el EMC, o de diferente origen.

Se han utilizado células endoteliales de origen bovino y astrocitos de rata. Pero también se ha usado a la línea celular de glioma C6 (Hu et al., 2010). Los valores de RET varían dependiendo del modelo utilizado, pero generalmente se ha observado una RET mayor a los $100 \Omega \times \text{cm}^2$ en los siguientes modelos:

- EMC de origen bovino en co-cultivo con:
 - astrocitos de origen bovino (Zysk et al., 2001), o su MC (Rubin et al., 1991b)
 - células de un tumor inducido en rata, glioma C6 (Raub, 1996)
- EMC y astrocitos de rata (Deli et al., 2003; Hutamekalin et al., 2008)
- EMC y astrocitos de ratón (Hutamekalin et al., 2008)
- EMC de puerco y células de glioma C6 (Smith et al., 2007).

Para el desarrollo de un modelo humano de BHE, la disponibilidad del tejido cerebral humano constituye la principal limitación y los valores de RET hasta ahora obtenidos en este modelo son menores a los $100 \Omega \times \text{cm}^2$ (Megard et al., 2002).

Líneas celulares. Las células endoteliales cerebrales pueden formar líneas celulares de manera espontánea sin sufrir transformación y son utilizadas por arriba de los pasajes 35-40, en el caso de las de ratón y de puerco (DeBault et al., 1981; Tontsch and Bauer, 1989). Existen varias líneas celulares de EMC que expresan la glicoproteína-P y que tienen UEs, éstas se obtuvieron por la inmortalización del EMC proveniente de diferentes especies. Por ejemplo, de rata se obtuvieron RBE4, GP8, RBE4 y GPNT, de ratón a b-end3-5, y de humano a hCMEC/D3 y hMEC (Wilhelm et al., 2011).

Las líneas celulares que se han utilizado como modelo *in vitro* de BHE son:

- ECV304 de humano y astrocitos de rata
- b-end3-5 de ratón y células de un tumor inducido en rata, glioma C6
- RBE4 y astrocitos de rata
- RBE4.B, astrocitos y neuronas de rata

En comparación con los cultivos primarios, las líneas celulares tienen la ventaja de su disponibilidad y bajo costo, sin embargo, tienen la desventaja de presentar baja RET ($<100 \Omega \times \text{cm}^2$) y alta permeabilidad.

El uso de la línea celular ECV304, derivada de la transformación espontánea del cultivo de células endoteliales de la vena de un cordón umbilical humano, HUVEC, ha resultado controversial. Se han utilizado para estudios de angiogénesis y transducción de señales, sin embargo, existen varias diferencias entre las células ECV304 y las células HUVEC. Además, las células EVC304 muestran semejanza con la línea celular de cáncer de vejiga humana, T24/83, ya que expresan a los receptores para adenosina, adrenalina y calcitonina, y su proliferación es independiente de suero, mientras que las células de endotelio de puerco y bovino, presentan proliferación dependiente de suero. Por estas razones, las células ECV304 se considera un modelo inapropiado para el estudio de la biología de las células endoteliales (Brown et al., 2000).

- Modelos basados en el co-cultivo de las células del EMC y otros tipos celulares.

Estudios recientes demuestran que al poner en co-cultivo a los pericitos con una monocapa de EMC, se incrementa la RET de ésta (Hayashi et al., 2004). La RET puede ser aun mayor si además se incorpora el cultivo de astrocitos, es decir, si se tiene el tri-cultivo de endotelio/pericitos/astrocitos (Nakagawa et al., 2009). Sin embargo, otros estudios indican que el co-cultivo con pericitos induce en el EMC la secreción de metaloproteinasas que pueden afectar de manera negativa el desarrollo de la RET (Zozulya et al., 2008). Otros tipos celulares que inducen las propiedades de BHE en el EMC son las neuronas y las células progenitoras neurales. Así, se ha demostrado que las neuronas corticales secretan factores que promueven el sellado de las células RBE4.B (Tontsch and Bauer, 1991).

- Modelos dinámicos.

Se han desarrollado modelos dinámicos *in vitro* de BHE, en los que se emplean fibras huecas que simulan vasos sanguíneos y en las que se administra un flujo regulado del lado apical de las células endoteliales. Estos modelos también emplean el co-cultivo con células gliales, pues de lo contrario no se formaría la BHE. Resulta interesante, que los modelos de flujo presentan una RET diez veces mayor que los correspondientes al modelo estático (Cucullo et al., 2008).

La gran cantidad de modelos *in vitro* de BHE indica que no existe “el mejor modelo”, sino que, dependiendo del estudio en cuestión, un modelo puede ser más adecuado que otro. Por ejemplo, para el estudio de los mecanismos de señalización, el cultivo de EMC en cajas Petri es lo más conveniente por la cantidad de células disponibles. Sin embargo, en este sistema no puede medirse la permeabilidad ni la RET. Para el estudio del estado de la UE en las células EMC, éstas se cultivan en filtros semipermeables y se usan células de cultivos primarios que alcanzan $RET >100 \Omega \times cm^2$. El modelo que utilizamos en este trabajo fue estandarizado en el laboratorio de la Dra. Lorenza González Mariscal, con la ayuda de los Dres. István Krizbai e Imola Wilhelm, del Instituto de Biofísica en el Centro de Investigación Biológica de Szeged, Hungría, y se basa en un co-cultivo primario de EMC y astrocitos de rata, cuya RET es $>100 \Omega \times cm^2$ (Wilhelm et al., 2011).

1.4.6. Participación de astrocitos y pericitos en el sellado de la BHE

En los invertebrados y en algunos vertebrados como los elasmobranquios, la envoltura glial pericapilar ejerce la función de BHE de manera independiente del sellado endotelial con las UEs (Cserr and Bundgaard, 1984). Esto sugiere que durante la evolución, el desarrollo de una envoltura pericapilar fue un paso previo a la aparición de las UEs endoteliales en las especies con un SNC más complejo.

Janzer y Raff demostraron que los astrocitos, y particularmente sus procesos o pies gliales, son un factor determinante para el desarrollo de la BHE. Al implantar astrocitos cultivados *in vitro* en un tejido extracerebral, observaron que éstos inducían neovascularización mediante la liberación de factores angiogénicos, y que los pies de los astrocitos rodeaban a los capilares en los que se inducía la formación de las UEs (Janzer and Raff, 1987).

El análisis de la microestructura de los pies de los astrocitos por crio-fractura, demostró que los pies gliales contienen relieves con formas ortogonales, similares al patrón que dan los edificios de una ciudad que se fotografían desde una gran altura (figura 13F). A estas estructuras se les llaman ordenaciones ortogonales de partículas (OAPs), y están constituidas por proteínas transmembranales agrupadas (Landis and Reese, 1989).

Los OAPs están formados por el canal de agua, acuaporina-4 (AQP4) y el canal de potasio Kir4.1 (Wolburg et al., 2009). Su expresión es dependiente de las proteínas de la lámina basal, como la agrina y el heparán sulfato (Warth et al., 2004). La isoforma Y0Z0 de agrina es específica del EMC y su expresión es crucial para mantener la integridad de la BHE, pues regula la localización de la AQP4 en los pies astrocitarios (Barber and Lieth, 1997). Además, se une a α -dístroglicano, un miembro del complejo dístrofina-dístroglicano que se acopla a la AQP, a través de la α 1-sintrofina, y ésta última a su vez se une al canal Kir4.1.

La formación de éstos complejos de proteínas en la membrana de los pies de los astrocitos, ancladas por agrina a la lámina basal, y su papel en la permeabilidad del EMC, sugiere que la interacción del EMC con los astrocitos induce la propiedad de BHE en el EMC. Así se ha visto que los ratones deficientes de agrina, además de presentar una baja expresión de AQP4, también tienen una alta permeabilidad vascular debido a la pérdida de los componentes de la UE (Nico et al., 2004).

Existe una correlación entre la diferenciación de los astrocitos perivasculares y la maduración de la BHE. Los astrocitos se polarizan e inducen la propiedad de BHE en el EMC, no sólo porque recubren gran parte de la superficie endotelial, sino porque expresan conforme maduran, a un conjunto de factores que inducen la formación de las UEs interendoteliales (Kacem et al., 1998; Pekny et al., 1998).

Factores como las metaloproteinasas -2 y -9 (MMP-2 y MMP-9, respectivamente) inducen la apertura de la BHE a través de la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas de la UE (Haorah et al., 2007). Estas proteasas las expresan los astrocitos, pericitos y el EMC, sin embargo, la presencia de astrocitos disminuye la secreción de MMP-9 en el EMC. Algunos glucocorticoides como la hidrocortisona y la dexametasona, y el AMP cíclico también reducen el nivel de MMP-9 endotelial (Forster et al., 2006).

Otros factores secretados por los astrocitos, que inducen el sellado de la BHE en el EMC son el TGF- β , el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, por las siglas en inglés de Glial cell-Derived Neurotrophic Factor), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF, por las siglas en inglés de basic Fibroblast Growth Factor), la angiopoyetina-1 y el AMPc (Abbott et al., 2006). Estos factores, al colocarse en el cultivo del EMC inducen el incremento en la RET del EMC, pero no son suficientes para alcanzar la RET del EMC *in vivo*, que es de $\sim 1800 \Omega \times \text{cm}^2$.

Existen más factores que promueven el sellado de la BHE en el EMC. Además de los astrocitos, los pericitos también tienen un papel importante en la organización del complejo perivascular. Durante el desarrollo temprano, los pericitos secretan angiopoyetina-1, que al activar a su receptor en la membrana del EMC induce la secreción de factores quimiotácticos para los pericitos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por las siglas en inglés de Platelet-Derived Growth Factor). En consecuencia, los pericitos migran hacia los vasos cerebrales e inducen la secreción del factor TGF- β en el EMC, que a su vez, promueve la producción de matriz extracelular (Folkman and D'Amore, 1996). En los ratones deficientes en PDGF-B y su receptor específico, PDGF-R β , los pericitos no migran hacia los vasos cerebrales, y en consecuencia, las células del EMC presentan malformaciones en la superficie basal, lo que sugiere que los pericitos regulan la morfogénesis de los vasos cerebrales (Hellstrom et al., 2001).

El papel de los pericitos en la formación de las UEs interendoteliales, aun no se conoce bien. El tri-cultivo endotelio/pericitos/astrocitos incrementa la RET del EMC, pero no está claro si esto se debe a la inducción de la formación de la lámina basal, o a la secreción de factores que inducen el sellado de las UEs (Wilhelm et al., 2011).

Las neuronas no influyen directamente en la formación de la BHE, sin embargo, pueden inducir la expresión de enzimas que modulan la función de BHE en el EMC (Tontsch and Bauer, 1989).

Las MMPs son proteasas que se secretan tanto en el EMC como en el parénquima neural. En condiciones normales, estas proteasas se encargan de remodelar la matriz extracelular, que permite el contacto directo entre las células del EMC y el parénquima neural. No obstante, en algunas patologías del SNC, como el Alzheimer y en los tumores

cerebrales, las MMPs rompen la lámina basal. El mecanismo aun no se encuentra bien descrito, pero se ha sugerido que está asociado con la activación de receptores que inducen la secreción de factores proinflamatorios, tales como el TNF- α . Esto produce en consecuencia, la apertura de la BHE y contribuye a la formación de edema y derrames cerebrales (Yang et al., 2011).

1.4.7. La UE en las patologías del SNC

En diversas patologías del SNC como derrame cerebral, trauma, procesos inflamatorios o infecciosos, esclerosis múltiple, infección por VIH, Alzheimer, Parkinson, epilepsia y tumores cerebrales, la UE del EMC se encuentra comprometida (Abbott et al., 2010). Esto se debe a la sobre-expresión de moléculas que inducen la deslocalización de las proteínas de la UE, y que producen en consecuencia, la apertura de la BHE.

Paradójicamente, la permeabilidad de la BHE aún en estas patologías sigue siendo baja, lo que hace que los fármacos utilizados para tratarlas, no lleguen a su destino eficientemente. Además, las bombas de eflujo localizadas en la cara apical de las células endoteliales, expulsan a la mayor parte de éstos fármacos, antes de que lleguen al sitio de la lesión en el cerebro (Jeffrey and Summerfield, 2010).

En los tumores cerebrales de alto grado como el glioblastoma multiforme, se pierde la expresión de la claudina 1/3 en el EMC, pero no de la claudina-5 y la ocludina, lo que indica que la ruptura de la UE es parcial (Liebner et al., 2000). El uso de células con tropismo hacia las enfermedades del SNC, podría ser una alternativa para el tratamiento de estas patologías, pues se ha visto que la transmigración de éstas células a través del EMC no compromete las propiedades de la BHE.

1.5. Transmigración

Las células de la médula ósea derivadas del linaje monocítico, entran al cerebro durante el desarrollo embrionario y se convierten en la microglia residente con características inmunocompetentes (Glezer et al., 2007). En la etapa previa al nacimiento, la infiltración de leucocitos disminuye debido al desarrollo de la BHE, razón por la cuál, el cerebro se considera un sitio “inmunoprivilegiado”.

En la etapa adulta, el reclutamiento de las células del sistema inmune al SNC se incrementa en condiciones patológicas donde la BHE se encuentra comprometida (Scholz et al., 2007). En el SNC, los macrófagos reclutados tienen un papel complementario a la microglia residente (Davoust et al., 2008) y en algunos casos, se convierten al fenotipo glial (Hess et al., 2004a). Las células reclutadas a sitios de inflamación atraviesan el EMC y se sitúan alrededor de los microvasos, especialmente en el espacio perivascular de las vénulas, el cuál actúa como un nicho que coordina la respuesta inmune (Bechmann et al., 2001).

La migración de las células hacia el SNC, es un mecanismo complejo en el que las células migrantes deben cumplir con dos características fundamentales. La primera de ellas, es la expresión de receptores para citosinas. La razón por la que éstas células llegan a los sitios de inflamación en el cerebro es, porque son atraídas por la expresión de citosinas secretadas por los macrófagos residentes activados. La segunda característica es que las células migrantes expresan moléculas de adhesión que les permiten completar los pasos necesarios para su extravasación en el cerebro como captura, rodamiento, arresto, adhesión firme, arrastre y transmigración. La inhibición de éstas moléculas, ya sea en la célula migrante o en el endotelio, impide que el proceso se complete. La secuencia de proteínas de adhesión necesarias o “cascada de adhesión” se encuentra bien descrita (Ley et al., 2007) y se ilustra en la figura 17.

Al final del proceso de extravasación ocurre la transmigración o diapédesis. Esta se refiere al mecanismo por el cuál las células atraviesan el endotelio. Durante esta etapa, las células pueden atravesar por dos vías:

1.5.1. Transcelular

En esta vía, la célula transmigrante atraviesa por el citoplasma de las células endoteliales. Para ello, desarrolla prolongaciones o protrusiones que se asocian a sitios de la membrana endotelial (figura 18A), que se caracterizan por tener un alto contenido de caveolas y moléculas como ICAM y VE-caderina (Carman, 2009). Los linfocitos (Cinamon et al., 2001) y los neutrófilos (Phillipson et al., 2008), transmigran por esta ruta.

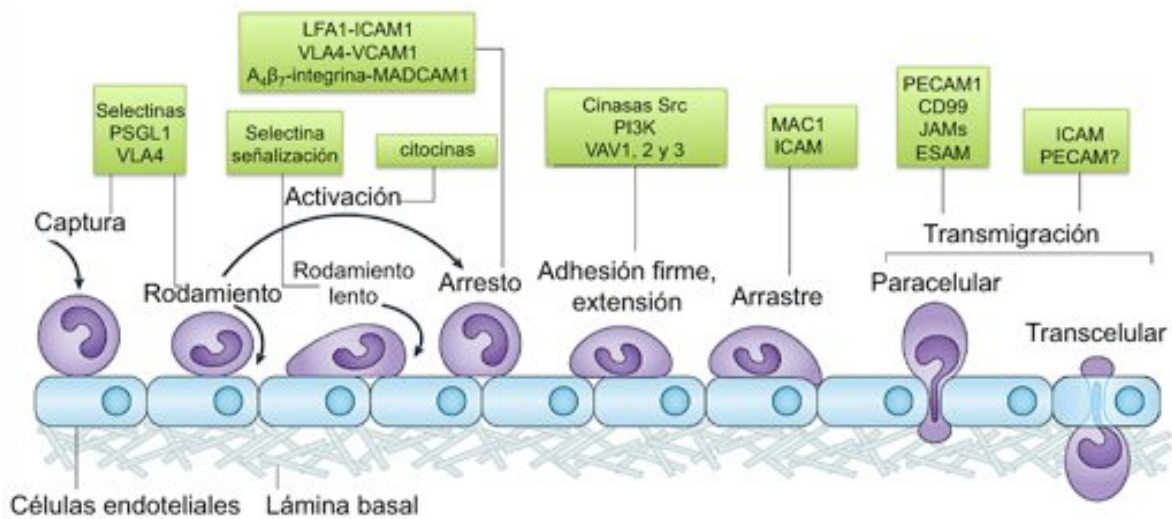


Figura 17. Cascada de adhesión de leucocitos. Los pasos identificados por primera vez fueron: rodamiento, mediado por selectinas; activación, mediada por citosinas, y arresto, mediado por integrinas. Progresivamente fueron identificados otros pasos adicionales como la captura, rodamiento lento, adhesión firme y extensión, arrastre y trans migración (paracelular y transcelular). En las cajas se indican las moléculas clave involucradas en cada paso. ESAM, molécula de adhesión selectiva de células endoteliales; ICAM1, molécula de adhesión intercelular 1; LFA1, antígeno asociado a la función de linfocitos 1 (o integrina- $\alpha_4\beta_2$); MAC1, antígeno de macrófago 1; MADCAM1, molécula de citoadhesión adreina mucosa 1; PSGL1, glicoproteína ligando de P-selectina 1; PECAM1, molécula de adhesión de células endoteliales/plaquetas 1; PI3K, fosfoinositol 3-cinasa; VCAM, molécula de adhesión de células vasculares 1; VLA1, antígeno muy tardío 4 (o integrina- $\alpha_4\beta_1$). Modificado de (Ley et al., 2007).

1.5.2. Paracelular.

En esta vía, la célula transmigrante atraviesa por el espacio existente entre dos células endoteliales formando a su paso contactos con ellas (figura 18B). Se ha demostrado que los contactos célula transmigrante-célula endotelial en los sitios de trans migración, se establecen con proteínas de la unión adherente como ICAM, VE-caderina, PECAM y CD99 (Aghajanian et al., 2008; Vestweber, 2007).

Para llegar a los sitios de inflamación en el cerebro, las células transmigrantes deben atravesar la BHE. No obstante, el papel de las proteínas de la UE durante la trans migración ha sido muy poco estudiado. Los estudios de la trans migración de neutrófilos (Burns et al., 2000), monocitos (Reijerkerk A *et al.* 2005), células dendríticas (Zozulya et al., 2007), células de melanoma (Fazakas et al., 2011) y células troncales mesenquimales (Matsushita et al., 2011) sugieren que las proteínas de las UE endoteliales, claudina-5 y ocludina, se pierden sólo en los sitios de trans migración.

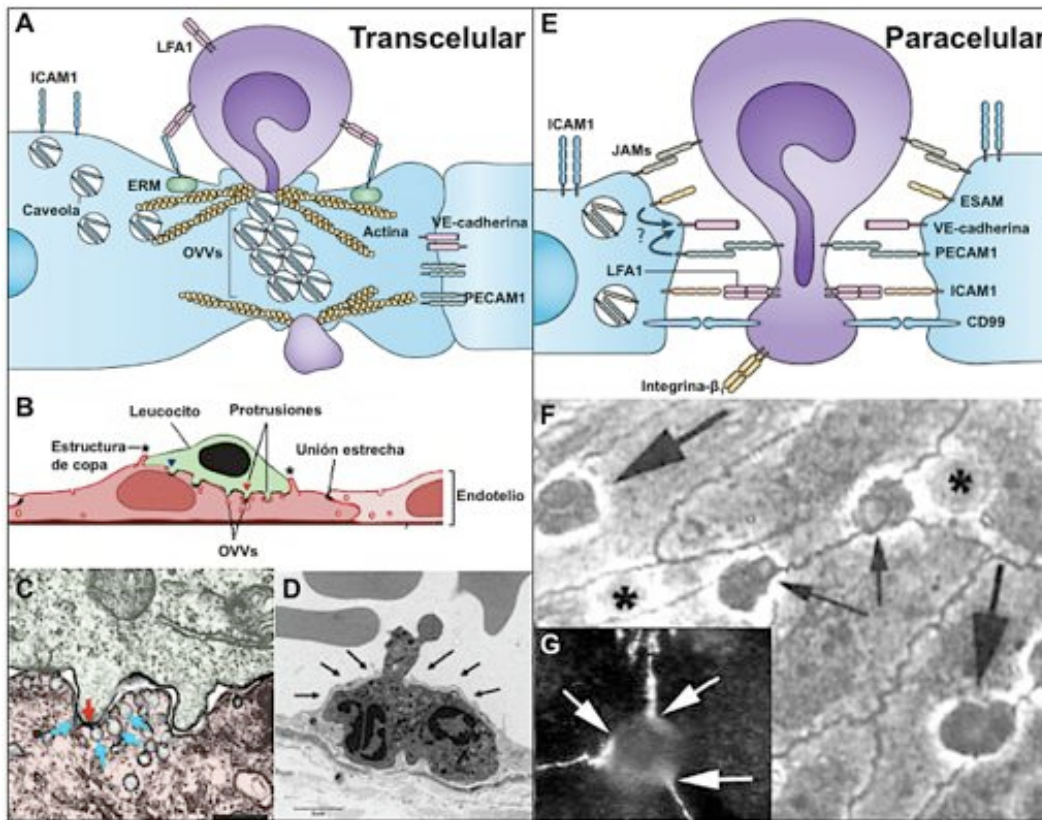


Figura 18. Mecanismos de transmisión. A-D: *Rata transcellular*. A y B, esquema; C, protrusiones asociadas a vesículas de caveola vistas por microscopía electrónica de transmisión; D, estructura de copa (microscopía electrónica de transmisión). ICAM1 se transloca a los sitios ricos en actina y caveolas para formar a los organelos vesiculo-vacuolares (OVVs). Estos forman un canal intracelular a través del cuál el leucocito puede migrar. Ezrina, radixina y moesina (ERM) forman un vínculo entre ICAM1 y actina/vimentina, causando su localización alrededor del canal y proporcionando un soporte estructural a la célula endotelial. Las protrusiones (flechas rojas) del leucocito se asocian a los OVVs (flechas azules). El endotelio envuelve al leucocito en una estructura con forma de copa (* y flechas en B). E-G: *Rata paracellular*. E, esquema; F, transmisión entre células endoteliales (microscopía de luz); G, transmisión por los contactos tricelulares. La transmisión paracellular induce la expresión de VE-cadherina, y se facilita por los compartimentos en la membrana lateral que contienen PECAM1, JAM-A, ESAM y CD99. Algunos autores sugieren que la migración de leucocitos se facilita en los bordes tricelulares. Flechas, leucocitos migrando por la ruta paracellular; *, leucocitos adheridos a la monocapa endotelial pero que aun no han migrado. Modificado de (Burns et al., 2000; Carman, 2009; Ley et al., 2007).

La pérdida de ocludina se observa cuando las células endoteliales se transfectan con ocludina acoplada a GFP. Paradójicamente, si se tiñe la ocludina endógena, se observa que la ocludina endotelial no desaparece y en cambio, también la expresan las células transmigrantes (Fazakas et al., 2011; Zozulya et al., 2007). En apoyo a esta observación, se ha visto que en el testículo, la migración de las células germinales entre las células de Sertoli depende del contacto célula-célula a través de las JAMs (Wang and Cheng, 2007) y de la remodelación de las claudinas 3 y 11 en las células de Sertoli (Smith and Braun, 2012).

II. Justificación

Las NSCs podrían usarse como vehículos para el transporte de genes terapéuticos para enfermedades del SNC. Estas células presentan tropismo por los tumores cerebrales y pueden migrar desde un sitio lejano al cerebro, atravesando la BHE.

El tratamiento actual que incluye cirugía, radiación y quimioterapia, no es suficiente para erradicar a los tumores del SNC, y los pacientes mueren generalmente en un periodo menor a un año. Varios de los fármacos utilizados no llegan al sitio de la enfermedad, ya sea por su inespecificidad, o porque no logran atravesar la BHE, a pesar de que ésta se encuentre comprometida por la enfermedad.

Las UEs del EMC son el componente fundamental de la BHE. El estudio de las UEs endoteliales cerebrales durante la transmigración de las NSCs, podría apoyar el uso de éstas células como vehículos para el tratamiento de los gliomas.

Más aún, el comprender la regulación de las UEs en la BHE durante la transmigración de las NSCs inducida por los gliomas, podría contribuir a mejorar la transmigración de las NSCs hacia los tumores cerebrales, haciendo más eficiente su uso.

Por lo tanto, en este proyecto nos propusimos estudiar cuáles son los factores que secretan los gliomas para inducir la transmigración de las NSCs, y analizar el papel de las UEs en este proceso.

III. Hipótesis

- 1) Los gliomas inducen la transmigración de las NSCs a través del EMC por los factores solubles que secretan.
- 2) La expresión de proteínas de adhesión y de la UE en las NSCs facilita su paso a través de la BHE.

IV. Objetivos

Objetivo general:

Identificar los factores que secretan los gliomas y que inducen la transmigración de las NSCs, así como determinar el papel que desempeñan las proteínas de las UEs en el paso de las células troncales a través del endotelio microvascular cerebral.

Objetivos específicos:

1ª Fase: *In Vitro*

- 1) Determinar si los factores secretados por el glioma C6 inducen la migración de las células ReNcell CX.
- 2) Determinar si las células ReNcell CX pueden migrar a través de una monocapa de EMC bajo el estímulo de los factores secretados por el glioma C6.
- 3) Analizar si los factores secretados por el glioma C6 alteran la integridad del EMC.
- 4) Observar qué factores secretados por el glioma C6 se encuentran involucrados en la transmigración de las células ReNcell CX a través de la monocapa endotelial.
- 5) Analizar si para la transmigración de células a través del EMC se requiere de la expresión de proteínas de la UE en las células transmigrantes.
- 6) Analizar si durante la migración de las células ReNcell CX a través del endotelio cerebral se modifica la expresión de las proteínas de la UE.

2ª Fase: *In vivo*

- 1) Corroborar si las células ReNcell CX pueden migrar hacia el glioma C6 al ser inyectadas por vía intravenosa.
- 2) Analizar si los factores secretados por el glioma C6, e involucrados en la transmigración de las células ReNcell CX, están presentes en la zona del tumor a la que llegan las células ReNcell CX.

V. Material y métodos

5. 1. Comité de ética para el cuidado de los animales

El protocolo de experimentación en animales fue aprobado por el comité de ética local (CICUAL-Cinvestav), de acuerdo con la norma oficial mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (Permiso: NOM-062-ZOO-1999). Las ratas fueron eutanizadas a través de la inhalación de CO₂. Los ratones desnudos se anestesiaron con sodio pentorbital para su cirugía e inyección, y con anestesia letal para obtener los segmentos cerebrales. Se hizo todo el esfuerzo posible para minimizar el sufrimiento de los animales.

5. 2. Líneas celulares

A todos los medios de cultivo se les añadieron los antibióticos penicilina (100 U/ml)/estreptomina (100 mg/ml) (In Vitro, México DF., A-01)]; y todas las líneas celulares se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% CO₂. La lista de las líneas celulares utilizadas y sus especificaciones de cultivo se describen a continuación:

Nombre	Tipo celular	Origen	Medio de cultivo	Suplemento	Fuente
ReNcell CX	Células progenitoras neurales inmortalizadas humanas	Región cortical del cerebro de un feto de 14 semanas	ReNcell CX (Merck Millipore, SCM005)	EGF, bFGF (20 ng/ml)	Merck Millipore (SCC007)
C6	Células de glioma	Glioma inducido por la administración repetitiva de metilnitrosourea en ratas Wistar-Furth (Benda et al., 1968)	DMEM/F12 (Invitrogen, 12500-062)	SFB al 10%	ATCC (CCL-107)
Fibroblastos-L	Fibroblastos de ratón	Tejido normal areolar subcutáneo y adiposo de un ratón macho C3H/An de 100 días de edad	DMEM (Invitrogen, 31600-026)	10% de SFB y 0.08 U/ml de insulina	ATCC (CCL-1)
NIH-3T3	Fibroblastos	Embrión de ratón	DMEM (Invitrogen, 31600-026)	10% de SFB	ATCC (CRL-1658)

5.3. Cultivos primarios

5.3.1. Cultivo de astrocitos de rata

El cultivo primario de astrocitos derivados de la corteza cerebral de ratas recién nacidas, se hizo de acuerdo al protocolo previamente descrito (Booher and Sensenbrenner, 1972). Para ello, se removieron las meninges de 2 ratas Wistar de 2 días de edad, los cerebros se colocaron en 4 ml de DMEM y se cortaron en pequeños pedazos.

En seguida se hizo una digestión con 1.25 mg/ml de tripsina (Invitrogen, 15050-065) durante 10 min. Posteriormente se cambió el medio por DMEM con 10% de SFB y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 mg/ml, 1 µg/ml gentamicina, 1 µg/ml canamicina y 1 µg/ml fungizona), y las células se resuspendieron 15 veces con una micropipeta de 5 ml en un tubo Falcon de 15 ml. Después de 3 min, el sobrenadante se pasó por un colador celular de nylon con poros de 40 µm (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, 352340). Se repitió este procedimiento hasta obtener 24 ml del filtrado. La suspensión celular obtenida se sembró en cajas de 12 pozos tratadas con 10 µg/ml de poli-L-lisina hidrobromuro (Sigma-Aldrich, P6282). Se cambió el medio cada tercer día hasta que la monocapa llegó a confluencia y madurez.

5.3.2. Cultivo de endotelio microvascular cerebral de rata

Las células endoteliales se aislaron de ratas Wistar de 2 semanas de edad, de acuerdo al método descrito previamente (Deli et al., 2005). Para ello, se removieron las meninges de los cerebros aislados, se cortó el tejido en trozos pequeños y se digirió con 1 mg/ml de colagenasa tipo 2 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, C6885) a 37°C durante 75 min. Las vainas de mielina se separaron de la mezcla anterior, por centrifugación a 1000 g durante 20 min, en 20% de albúmina. Se realizó entonces una segunda digestión con 1 mg/ml de colagenasa/dispasa (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, 11097113001) a 37 °C durante 50 min. Los microvasos fragmentados se centrifugaron en un gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich, P1644) durante 10 min a 1000 g, y posteriormente se colectaron para ser sembrados en cajas tratadas con fibronectina y colágeno. Se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con 20% de suero derivado de plasma (Animal Technologies Inc., Tyler, TX, 11-090423), 500 ng/ml de bFGF (Bioworld, Atlanta, Georgia, 507361), 0.2 M de glutamato (Invitrogen, 35050079), 8 µg/ml de heparina (Lab. Pisa S.A. de C.V., Guadalajara, Jal., México 177M90 SSA IV) y antibióticos [penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 mg/ml, 1 µg/ml de gentamicina (Schering-Plough S.A. de C.V., México D.F. 63671 SSA IV), 1 µg/ml de canamicina (Bistol-Myers Squibb de México, S. de R.L. de C.V., México, D.F., 53508 SSA-IV) y 1 µg/ml de fungizona (Invitrogen, 15290-018)]. Para eliminar la contaminación por otros tipos celulares, se añadió 1 µg/ml de puomicina durante los dos primeros días de cultivo (Sigma-Aldrich, P9620).

5.4. Medio condicionado (MC)

Se obtuvieron dos tipos de medios condicionados:

- Del cultivo de células ReNcells CX, EMC, astrocitos o glioma C6; durante 4 días.
- De los compartimentos apical y basal de los filtros Millicell, 8 horas después de que las células ReNcells CX se colocaron en la cara apical de la monocapa de EMC en presencia de los MCs de astrocitos o de glioma C6 en el compartimento basal.

En algunos ensayos de trans migración y resistencia eléctrica transendotelial, los MCs de astrocitos y glioma C6 se incubaron durante 1 hora con los siguientes anticuerpos neutralizantes:

- α -HGF, rata (Abcam, Cambridge UK, Ab10679, concentración 8 μ g/ml)
- α -VEGF, rata (Peprotech, Rocky Hill, NJ, 500-P275, concentración 0.1 μ g/ml)
- α -EGF, rata (Peprotech, 500-P277, concentración 0.1 μ g/ml).

Se inmunoprecipitó a la zonulina del MC de astrocitos y glioma, mediante el uso del anticuerpo monoclonal contra zonulina (Abcam, Ab118056, dilución 1:250). Se utilizó el inhibidor de amplio espectro de metaloproteinasas, GM6001 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, M5939) a una concentración de 100 nM, colocándolo en el MC de astrocitos y glioma una hora antes de su uso. Los MCs de astrocitos y de glioma C6 sin zonulina, con los anticuerpos neutralizantes, o con el inhibidor de MMPS, se colocaron en el compartimento basal de los filtros Millicell.

Los ensayos de ELISA se hicieron en los MCs de astrocitos y de glioma C6, depletados o no, por inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para los factores de crecimiento: EGF (dilución 1:250), o VEGF (dilución 1:250).

Para obtener el MC de glioma C6 con baja expresión en PGE₂, las células de glioma C6 se trataron a las 24 y 72 horas después de sembradas, con 2.5 μ M del inhibidor de COX-2, NS398 (EMD Biosciences, La Jolla, CA, 349254); el MC se colectó a los 4 días.

5.5. Medición de la resistencia eléctrica transendotelial (RET)

Se sembraron las células del endotelio microvascular cerebral en filtros semipermeables (poro de 8.0 μ m, 0.6 cm² Millicell standing cell culture 24 well PCF, Millipore PI8P01250 o en insertos con poro de 8.0 μ m, 1.12 cm² Millicell hanging culture 12 well PET, Millipore PIEP15R48).

Las monocapas confluentes se suplementaron en ambos compartimentos con 12.5 mg/ml de adenosina 3', 5'- cíclica monofosfato sal de sodio (Sigma-Aldrich, C3912), 9.75 mg/ml del inhibidor de fosfodiesterasa específico de AMP cíclico RO-20-1724 (SIGMA, B8279) y 50 µg/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, HO888). Se colocaron en la placa del detector de impedancia CellZcope® (nanoAnalytics, Münster, Germany) o en una placa multipozos con el MC de 4 días de cultivo de astrocitos o de células de glioma C6. La RET se midió con el CellZcope o utilizando el voltímetro EVOM (Word Precision Instruments, New Haven, CT). Para analizar el efecto de la transmigración de las células ReNcell CX en la RET, las células ReNcell CX se colocaron en el compartimento apical.

5.6. Ensayos de migración

Las células ReNcell CX se incubaron toda la noche sin factores de crecimiento y posteriormente se trataron con acutasa (Sigma-Aldrich, A6964) durante 8 min. La suspensión celular se hizo en medio fresco para sembrar 1×10^5 células/cm² en la superficie apical de cada inserto Millicell con poro de 8 µm (Millicell Cell culture insert, Millipore, Bilerica, MA, PI8P01250) con o sin monocapa de células endoteliales.

En algunos experimentos, el ensayo se llevó a cabo con fibroblastos NIH-3T3, o fibroblastos-L con o sin ocludina de pollo transfectada (generosamente otorgada por la Dra. María Susana Balda, University College, London, UK) con Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen, 11668019). En el compartimento basal de los insertos se añadió: DMEM, DMEM con SFB al 10%, con o sin hEGF (Sigma-Aldrich, E9644) o hHGF (Peprotech, 1039), el cultivo primario de astrocitos, las células de glioma C6, o los MCs derivados de células ReNcells CX, astrocitos o glioma C6. En algunos experimentos, la fracción soluble de la proteína CRTAM (CRTAM-Fc, R&D Systems, Minneapolis, MN, 1695-CR) se añadió al compartimento apical de los filtros Millicell a una concentración de 20 µg/ml.

El número de células que migraron se evaluó 8 horas después. Para ello, se fijaron las células con paraformaldehído al 3% durante 20 min, se permeabilizaron con saponina al 0.03% y posteriormente se removieron con un hisopo de algodón húmedo, las células que no migraron y que permanecieron en el compartimento apical. Las células que migraron se tiñeron con azul de toluidina al 1% durante 10 min, se lavaron, se cortaron las membranas de los insertos y se observaron por microscopía de luz (Nikon Eclipse E600).

El número de células teñidas con azul de toluidina, presentes en la superficie basal de la membrana de los filtros Millicell, se contó utilizando el programa ImageJ. Se consideraron para cada condición, 16 campos ópticos por filtro en al menos 3 filtros por condición.

5.7. Microscopía electrónica de transmisión

Se utilizaron monocapas de EMC sembradas sobre insertos Millicell (poro de 8 μm). Las células ReNcell CX se colocaron en la superficie apical y se indujo su transmigración durante 8 horas por la incubación con el MC de glioma en el compartimento basal. Los insertos se fijaron con glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de cacodilatos 0.1 M, pH 7.2 durante 1 hora. En seguida se fijaron en tetróxido de osmio al 1% durante 1 hora para posteriormente deshidratarlos en etanol y óxido de propileno. Las membranas se separaron del filtro cortando el borde con una navaja, se embebieron en resina de eponato y polimerizaron a 60 °C durante 24 horas. Se obtuvieron secciones de 60 nm contrastadas con acetato de uranilo y se mantuvieron en citrato para su observación en un microscopio electrónico Zeiss EM910.

5.8. Microscopía electrónica de barrido

Se utilizaron monocapas de EMC sembradas sobre insertos Millicell con poro de 8 μm . Las células ReNcell CX se colocaron en la superficie apical y se indujo su transmigración durante 8 horas al ser incubadas con el MC de glioma en el compartimento basal. Los insertos se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en solución amortiguadora de cacodilatos 0.1 M pH 7.4, con 0.1 M de sacarosa, durante 1 hora. Las membranas se separaron del filtro con una navaja y se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio preparado en la misma solución amortiguadora, durante 1 hora. En seguida, las membranas se deshidrataron en grados seriales de etanol. Al final se colocaron en hexametildisilazano (HMDS) (Polysciences Inc. Warrington. PA). Después de 10 minutos se reemplazó el HMDS por nuevo y 10 minutos después se removió el reactivo para dejar secar las muestras al aire durante 30 minutos. Las muestras se montaron en una laminilla cubierta con metal y oro (JEOL-JFC-1100), y posteriormente se examinaron en el microscopio de barrido JEOL (JSM-6510-LV).

5.9. Western blot

Esta técnica se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar previamente descrito (Gonzalez-Mariscal et al., 2011) utilizando los siguientes anticuerpos:

- Policlonales en conejo:
 - ocludina (Invitrogen, Cat. 71-1500, dilución 1:1000)
 - claudina-1 (Invitrogen, Cat. 51-9000, dilución 1:500)
 - claudina-2 (Invitrogen, Cat. 51-6100, dilución 1:250)
 - claudina-3 (Invitrogen, Cat. 34-1700, dilución 1:250)
- Monoclonales en ratón:
 - claudina-4 (Invitrogen, Cat. 32-9400, dilución 1:250)
 - claudina-5 (Invitrogen, Cat. 187364, dilución 1:1000)
 - CRTAM (R&D Systems, Cat. Mab1695, dilución 1:100)
 - zonulina (Abcam, Cat. Ab118056, dilución 1:500)
 - actina (un regalo del Dr. José Manuel Hernández, departamento de Biología Celular, Cinvestav, México).

Como anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa se utilizaron:

- α -ratón (Zymed Laboratories, Grand Island, NY, Cat. 62-6420, dilución 1:5000)
- α -conejo (Zymed Laboratories, Grand Island, NY, Cat. A9169, dilución 1:5000)

Se utilizó el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL + PLUS (GE Health-Care, Piscataway, NJ, Cat. RNP 2132).

5.10. Detección de citosinas

La cuantificación de las citosinas se hizo en MC de 4 días derivado del cultivo de astrocitos o células de glioma C6. Se utilizó un sistema con un arreglo de perlas de citometría (BD™ CBA Flex Set, BD Biosciences, US, Cat. 558264) específico para detectar a las siguientes citosinas: IL-8 (1.2) (Cat. 558277), IFN- α (1.5) (Cat. 560379), IL-1 β (2.3) (Cat. 558279), TNF- α (0.7) (Cat. 558273), IL-12p70 (0.6) (Cat. 558283), IL-10 (0.13) (Cat. 558274), e IL-6 (1.6) (Cat. 558276). Brevemente, los sobrenadantes se inmunoprecipitaron con un arreglo de perlas de captura, cubiertas con anticuerpos específicos. Posteriormente se añadió el agente de detección conjugado con ficoeritrina y finalmente se realizó un ensayo de citometría de flujo. Los datos se obtuvieron y analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCalibur™ y con el programa BD CellQuest™ Pro Software (BD Biosciences, US 342976). Se realizaron las curvas estándar correspondientes ($R^2 > 0.9957$), y los valores promedio de la intensidad de fluorescencia permitieron el análisis y la cuantificación de la proteína soluble en Microsoft® Excel.

5.11. Detección de VEGF, HGF, EGF y PGE₂

La cuantificación de las citosinas se llevó a cabo en el MC derivado del cultivo de astrocitos o células de glioma C6, de 4 días. Se utilizaron ensayos de ELISA específicos para VEGF (Invitrogen, KHG0111), HGF (Ray Biotech Inc., ELM-HGF-001), EGF (Peprotech, 900-M390) y PGE₂ (ENZO Life Science, Farmingdale, NY, ADI-900-001).

5.12. Zimografía

Los MCs se colectaron y centrifugaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. Los sobrenadantes se concentraron usando una unidad de filtración para centrifuga Amicon ultra-0.5 con membrana ultracel-30 (Millipore, UFC503096). Las muestras se corrieron por electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, en geles de poliacrilamida al 8% y gelatina al 1%. Para determinar la actividad proteolítica, los geles se lavaron 2 veces por 15 min en una solución de Tritón X-100 al 2.5% y se incubaron con una solución amortiguadora con Tris base 50 mM (pH 7.4), 150 mM de NaCl y 20 mM de CaCl₂. La actividad de gelatinasa se observó tiñendo los geles con azul de Coomassie al 0.25%, R-250 en metanol al 45% y ácido acético al 10%. En seguida los geles se destiñeron con una solución de metanol al 20% y ácido acético al 10%. El sobrenadante del cultivo de promielocitos (U937) se utilizó como patrón de la actividad enzimática de las MMPs 2 y 9, como se describió previamente (Morodomi et al., 1992).

5.13. Inmunofluorescencia

La inmunodetección se hizo en las monocapas de EMC cultivadas en cubreobjetos, e incubadas con MC de astrocitos o de glioma, durante 8 horas; o en ensayos de trans migración. Para éstos últimos, las células ReNcell CX en cultivo se tiñeron con el rastreador de células fluorescente CellTracker™ Orange CMTMR (Invitrogen, Cat. C2927), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las células ReNcell CX se levantaron con acutasa, se resuspendieron y se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/cm² en la superficie apical de monocapas de EMC cultivadas sobre filtros Millicell, con MC de astrocitos o de glioma C6 en el compartimento basal. Después de 8 horas, se lavaron los insertos con PBS para eliminar las células ReNcell CX que no se adhirieron a la monocapa del EMC.

La inmunofluorescencia se realizó siguiendo los protocolos previamente descritos (Lechuga et al., 2010) empleando el anticuerpo policlonal contra ocludina, hecho en conejo (Invitrogen, Cat. 71-1500, dilución 1:100), y el anticuerpo monoclonal contra claudina-5, hecho en ratón (Invitrogen, Cat. 187-364, dilución 1:100); y los anticuerpos secundarios acoplados a FITC de conejo (Zymed 62-6111, dilución 1:300) y de ratón (Zymed, 62-6511, dilución 1:300). Las muestras se observaron en el microscopio confocal Leica SP-2 con láseres de Argón y Helio-Neón.

5.14. Migración *In vivo* de las células ReNcells CX hacia los gliomas intracraniales

Para los experimentos de migración *in vivo*, se emplearon: 1) ratones desnudos (*nu/nu*), 2) células de glioma C6 previamente infectadas con un retrovirus que contenía a la proteína verde fluorescente (GFP), y seleccionadas por citometría de flujo como fue descrito previamente (Lara et al., 2012), y 3) células ReNcell CX teñidas con CellTracker™ Orange CMTMR. El día de la cirugía, los ratones se anestesiaron con 100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina. Se resuspendieron 1×10^6 células de glioma C6-GFP en 3 μ l de DMEM-F12, y se inyectaron en el cuerpo estriado (Bregma AP: + 0.5 mm; ML: 2 mm and DV: 3 mm) del cerebro.

Se utilizaron dos controles, uno que recibió solamente al vehículo (3 μ l de DMEM-F12), y uno que no fue operado. Siete días después, los ratones se anestesiaron para la inyección de las células ReNcell CX. Se resuspendieron 1.5×10^6 células ReNcell CX teñidas con CellTracker™ Orange CMTMR, en 200 μ l de medio sin factores de crecimiento, y se inyectaron en la vena de la cola. Después de una semana, se aplicó una anestesia letal en los ratones, se perfundieron con solución salina con 1000 U/ml de heparina, y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Finalmente se obtuvieron cortes de cerebro de 30 μ m.

Por inmunofluorescencia, se detectó la presencia de HGF, VEGF, zonulina y claudina-5. Para ello, las rebanadas de cerebro se permeabilizaron con PBS-Tritón al 0.25% durante 30 minutos. Posteriormente se bloquearon con BSA al 1% en PBS-Tritón durante 1 hora, y se incubaron con los anticuerpos primarios durante 24 horas. En seguida se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 24 horas y finalmente se montaron para su observación en un microscopio confocal (Leica Microsystems).

VI. Resultados

6.1. Las células de glioma C6 o su medio condicionado, inducen la trans migración de las células troncales neurales a través de un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica.

El primer objetivo fue determinar si las NSCs presentaban tropismo por las células de glioma. Para demostrar esto, las células ReNcell CX se colocaron en el compartimento apical de los filtros Millicell con un poro de 8 μm . Se realizaron los ensayos de migración en presencia de DMEM, DMEM con FBS al 10%, o los MCs de las células ReNcell CX, astrocitos o glioma C6. En la figura 19 se observa que el MC de glioma C6 induce un incremento significativo de la migración de las células ReNcell CX, en comparación con el MC de astrocitos o DMEM con FBS al 10%. Como se esperaba, el DMEM y el MC de las células ReNcell CX, no indujeron migración.

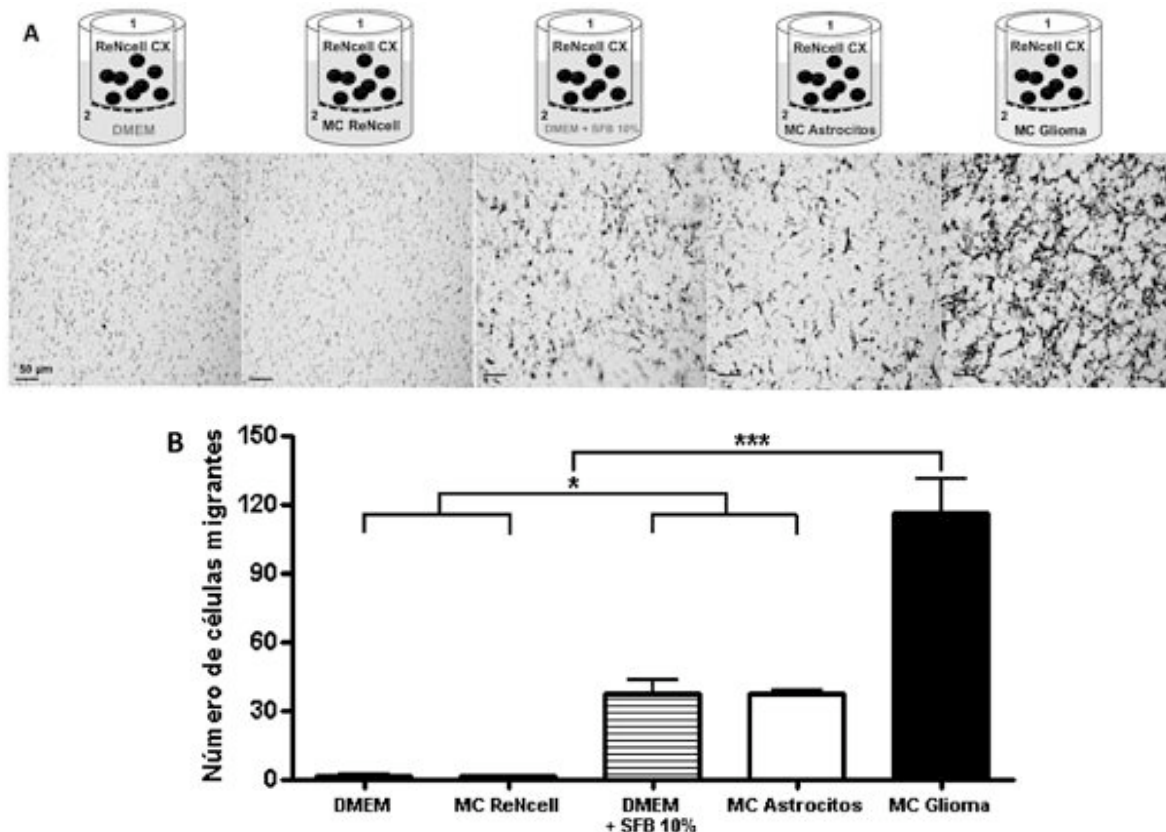


Figura 19. El MC de glioma C6 induce la migración de las células ReNcell CX. A) Imagen representativa de microscopía de campo claro de las células presentes en la superficie basal del filtro teñidas con azul de toluidina, acompañada del esquema que ilustra cada ensayo. B) Gráfica de datos. $N=4$, $F(4,15)=40.64$; $*P<0.05$, $***P<0.001$; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. Los ensayos de migración de células ReNcell CX se hicieron en filtros Millicell con poros de 8 μm .

En seguida probamos si el MC de glioma C6 era capaz de inducir la trans migración de las células ReNcell CX a través de un modelo *in vitro* de BHE, basado en el cultivo primario de las células del EMC de rata. Las figuras 20 A y B, y 21 muestran que el MC de glioma indujo la trans migración de las células ReNcell CX a través de una monocapa de EMC, de manera dependiente del tiempo. Posteriormente probamos si la presencia de células de glioma en el compartimento basal, podía inducir una respuesta mayor que la generada por el MC de glioma C6. Las figuras 20 C y D muestran que la presencia de células de glioma C6 o su MC, tuvieron el mismo resultado en la trans migración de las células ReNcell CX.

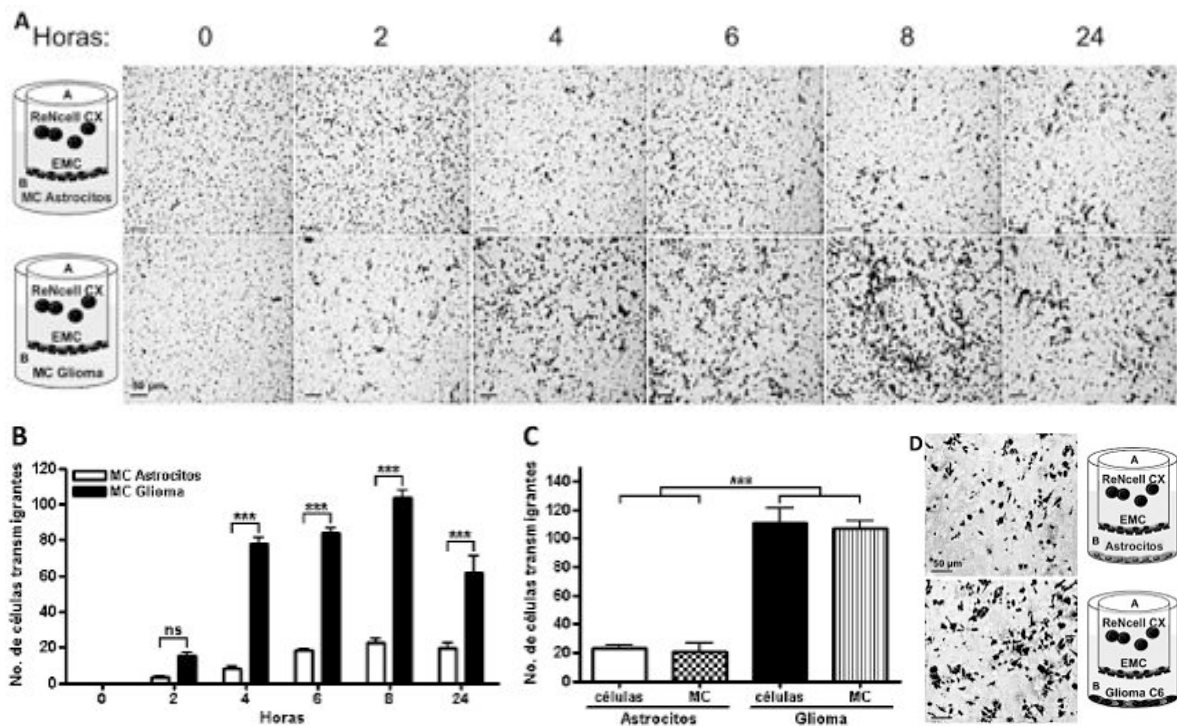


Figura 20. El MC de glioma C6 induce la trans migración de las ReNcell CX a través del EMC. A) Trans migración de las células ReNcell CX a través del EMC inducida por el MC de astrocitos o de glioma C6. Imagen representativa de microscopía de luz de las células presentes en la superficie basal del filtro teñidas con azul de toluidina, acompañada del esquema que ilustra cada ensayo. B) Gráfica de datos. N=3, F(1,12)=343.8; *** p<0.001; Prueba estadística de ANOVA de dos vías, seguida de Bonferroni. C) En un ensayo de trans migración durante 8 horas, las células de glioma C6 y su MC, inducen un grado semejante de trans migración de las células ReNcell CX. N=10, F(3,36)=60.74; ***P<0.001; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. D) Imagen representativa de microscopía de campo claro de las células presentes en la superficie basal del filtro teñidas con azul de toluidina, acompañada del esquema que ilustra cada ensayo.

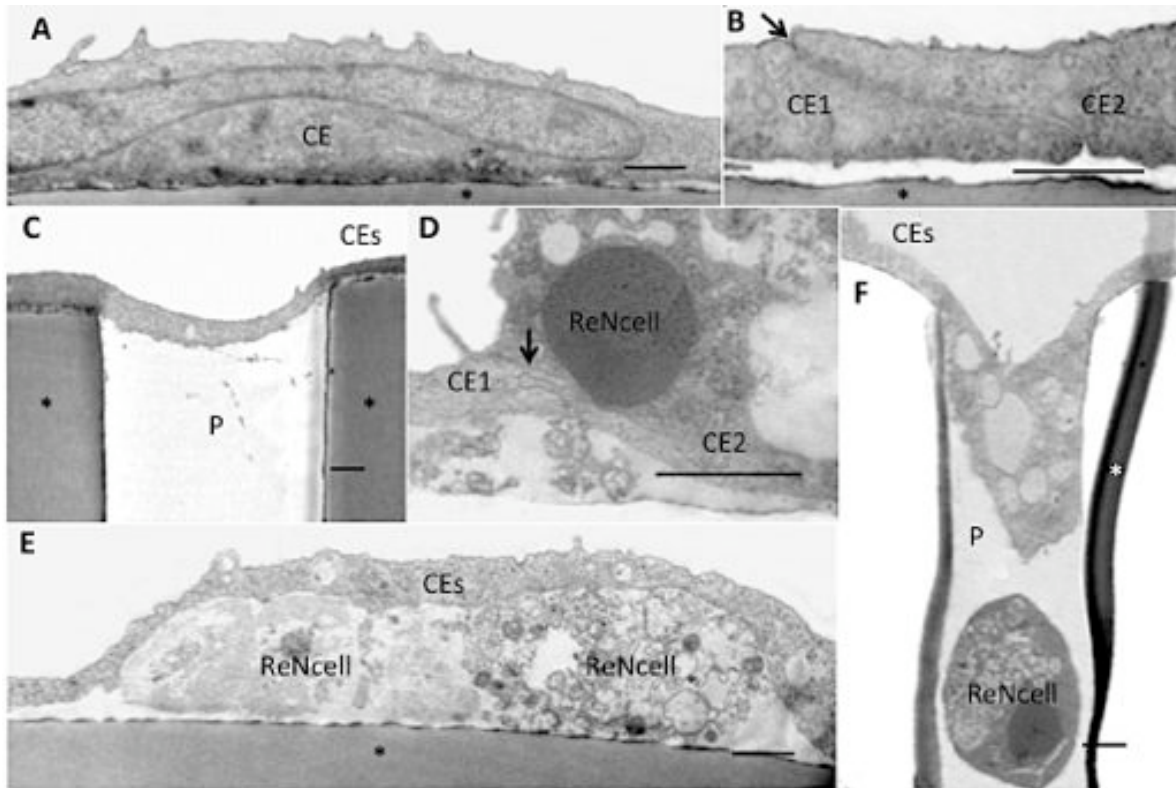


Figure 21. Microscopía electrónica de transmisión de una monocapa de EMC con células ReNcell CX transmigrando. Monocapa de EMC sembrada sobre filtros Millicell con poros de 8 μm . A) Morfología típica elongada de una célula endotelial. B) Borde entre dos células vecinas; las células endoteliales se sobrelapan parcialmente. C) Monocapa endotelial que atraviesa un poro del filtro Millicell. D) Célula ReNcell CX sobre dos células vecinas de EMC. E) Dos células ReNcell CX localizadas por debajo de la monocapa endotelial. F) Célula ReNcell CX atravesando por un poro del filtro Millicell. *, filtro Millicell; flecha, ruta paracelular. CE, célula endotelial; P, poro de filtro Millicell. Barra = 1 μm .

6.2. El MC de glioma C6 disminuye la RET del EMC e induce la formación de orificios a lo largo de los bordes celulares de la monocapa endotelial.

Una manera por la que el MC de glioma C6 podría facilitar la trans migración de las células ReNcell CX, podría ser mediante la inducción de una monocapa de EMC más permeable. Para probar esto, medimos la resistencia RET del EMC, en presencia del MC de astrocitos o de glioma C6 en el compartimento basal. La figura 22A muestra que el MC de glioma C6 disminuyó la RET del EMC, en comparación con lo que sucede en la monocapa incubada con MC de astrocitos. La adición de células ReNcell CX en el compartimento apical disminuyó parcialmente la RET del EMC cuando el compartimento basal contenía MC de astrocitos, mientras que ésta disminución no se recuperó en presencia del MC de glioma C6.

En la figura 29A se observa que la incubación con MC de glioma C6 no tuvo efecto en el contenido total de ocludina y claudina-5, detectado por Western blot, mientras que los ensayos de inmunofluorescencia muestran una disminución en la expresión de claudina-5 en los bordes celulares. Además, se observó la aparición de orificios a lo largo de los bordes celulares del EMC incubado con MC de glioma C6 (figura 22B), mientras que por microscopía electrónica de barrido, se observaron células ReNcell CX migrando a través de ellos (figura 22C).

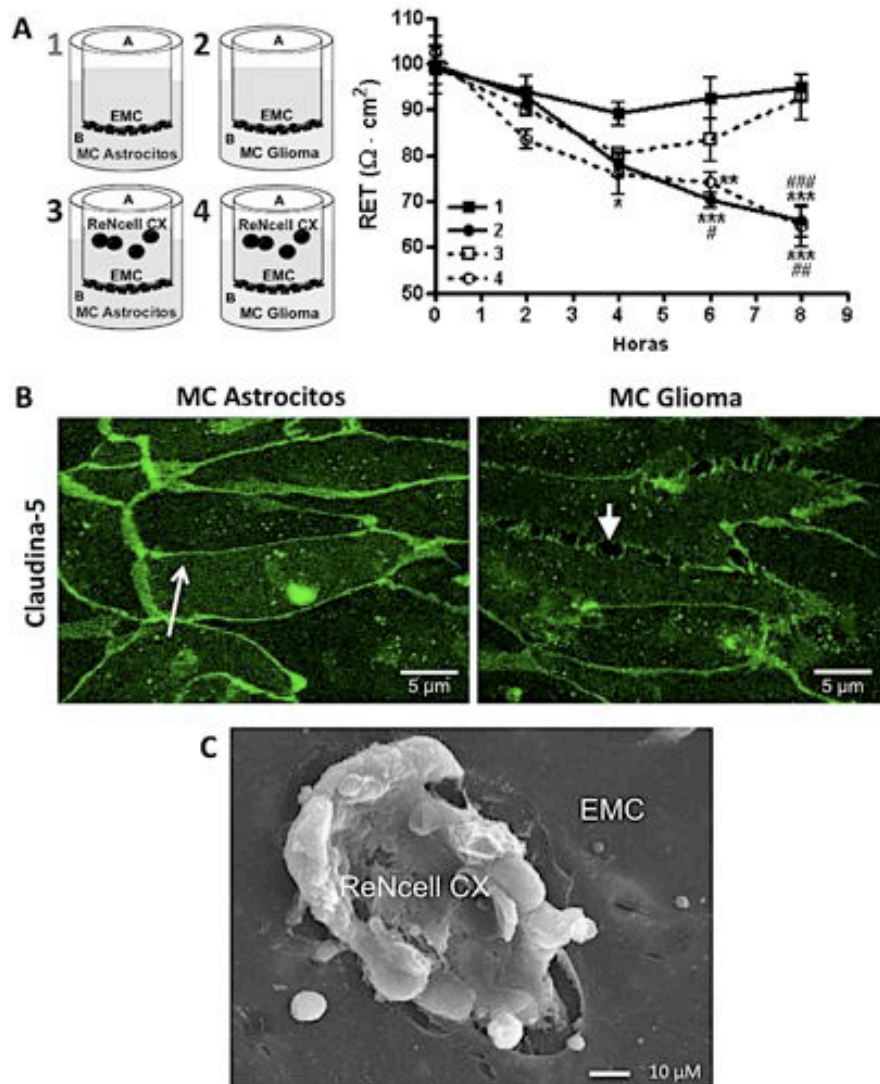


Figura 22. El MC de glioma C6 abre la BHE del EMC. A) RET del EMC en las condiciones ilustradas en el esquema. N=3, $F(3,30)=19.97$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, con respecto a 1; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, con respecto a 3; Prueba estadística de ANOVA de dos vías, seguida de Bonferroni. B) Inmunofluorescencia de claudina-5 en el EMC incubado con el MC de astrocitos o de glioma C6. Flecha, borde continuo; cabeza de flecha, orificios en los bordes celulares. C) Microscopía electrónica de barrido de las células ReNcell CX moviéndose a través de un orificio en la monocapa endotelial.

6.3. El HGF estimula la trans migración de células ReNcell CX en un modelo *in vitro* de BHE.

Ya que nuestros resultados indicaron que el MC de glioma C6 promueve la trans migración de células ReNcell CX a través del EMC, en seguida buscamos identificar a los factores presentes en el MC de glioma C6 responsables de éste efecto. Comenzamos explorando el efecto del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por las siglas en inglés de Hepatocyte Growth Factor), ya que éste se había reportado como el factor que promueve con alta eficiencia la migración de las NSCs (Kendall et al., 2008). Se encontró que el MC de glioma C6 contiene 3.2 veces más HGF que el MC de astrocitos (figura 23A).

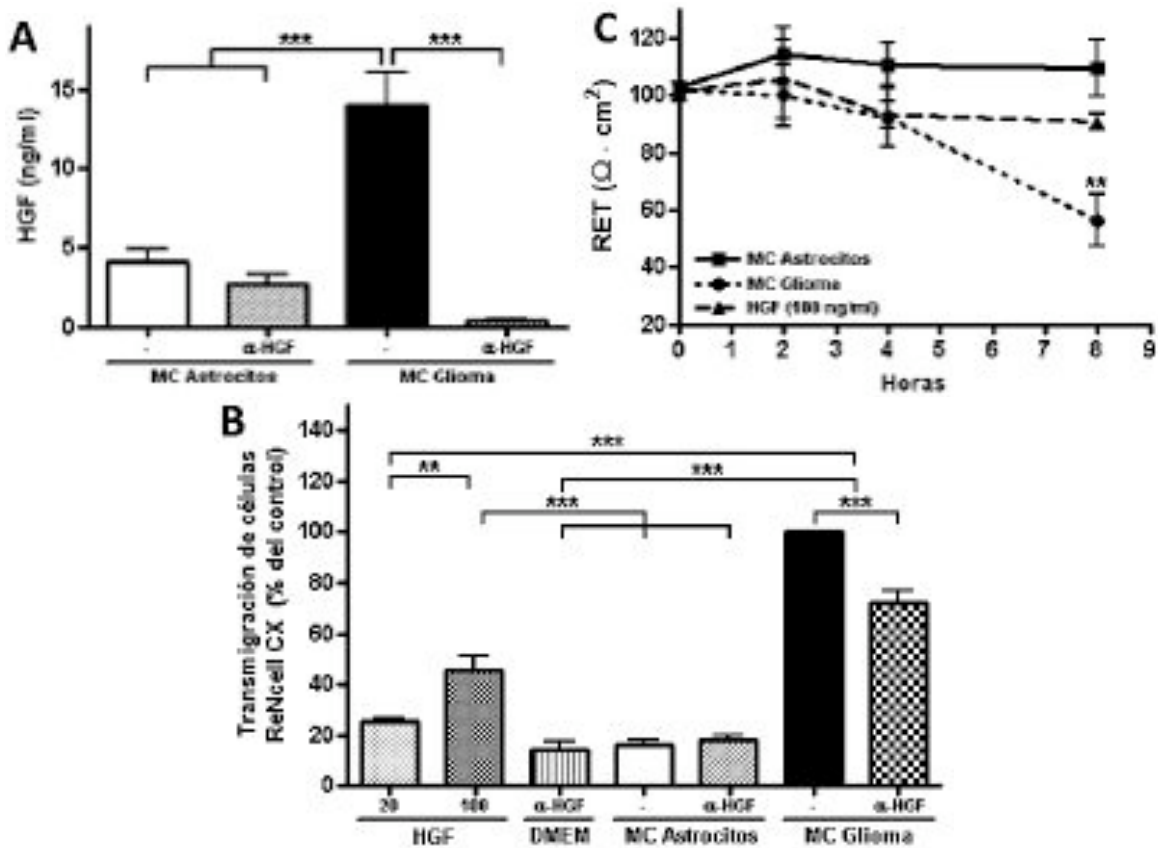


Figure 23. El HGF en el MC de glioma C6 induce la trans migración de las NSCs a través de la BHE. A) La cantidad de HGF, determinada por ELISA, es mayor en el MC de glioma C6 que en el MC de astrocitos. La inmunoprecipitación de HGF reduce la cantidad de HGF presente en el MC de glioma C6. N=4, $F(3,12)=26.54$; $***P<0.001$; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. B) Ensayo de trans migración de células ReNcell CX a través del EMC cuando en el compartimento basal se encuentra: DMEM con HGF; o DMEM con el anticuerpo neutralizante contra HGF; o MC de astrocitos o de glioma C6, con o sin el anticuerpo neutralizante contra HGF. El control corresponde a la trans migración inducida por el MC de glioma C6, y se considera el 100% de la trans migración. N=3, $F(6,14)=124.7$; $**P<0.01$, $***P<0.001$; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. C) El EMC cultivado durante 8 horas en DMEM con HGF tiene una RET similar a la obtenida con el MC de astrocitos. N=3, $F(2,16)=5.668$; $**P<0.01$ con respecto al MC de astrocitos. Prueba estadística de ANOVA de dos vías, seguida de Bonferroni.

En los ensayos de transmigración de las células ReNcell CX, encontramos que la adición de 100 ng/ml de HGF en el compartimento basal, incrementó la transmigración de las células ReNcell CX, en comparación con el MC de astrocitos (figura 23B). Sin embargo, la transmigración inducida por HGF fue menor en comparación con la obtenida por el MC de glioma C6.

Para demostrar la importancia del HGF en la transmigración inducida por el MC de glioma C6, agregamos un anticuerpo que neutraliza la actividad del HGF al MC de glioma C6 y observamos una disminución en la transmigración de las células ReNcells CX. En seguida probamos si el HGF alteraba la RET del EMC. La figura 23C muestra que el HGF no tuvo efecto en la RET, y en concordancia con este resultado, observamos que no hubo cambio en el contenido total de ocludina y claudina 5 (figura 29A). Estos resultados indican que HGF tiene un efecto quimiotáctico sobre las células ReNcell CX pero que no abre las UE del EMC.

6.4. El VEGF estimula la transmigración de las células ReNcell CX en un modelo *in vitro* de BHE

Además del HGF, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por las siglas en inglés de Vascular Endothelial Growth Factor) también es uno de los principales factores quimiotácticos de NSCs producido por gliomas (Kendall et al., 2008). Por ésta razón, en seguida analizamos el efecto del VEGF en la transmigración de las células ReNcell CX a través del EMC. La figura 24A muestra que el MC de glioma C6 contenía 7.6 veces más VEGF que el MC de astrocitos, y que el contenido de VEGF en el MC de glioma C6 disminuyó cuando se utilizó un anticuerpo neutralizante específico para el VEGF. En ensayos de transmigración observamos que, cuando se neutralizó el VEGF en el MC de glioma C6, disminuyó la transmigración de las células ReNcell CX a través del EMC, confirmando el efecto quimioatractivo del VEGF (figura 24B).

En experimentos de RET observamos que la neutralización del VEGF revirtió la disminución inducida por el MC de glioma C6 (figura 24C). Nuestros resultados indican que el VEGF tiene un efecto quimiotáctico en las células ReNcell CX, y que además facilita su transmigración mediante la apertura de la UE en el EMC.

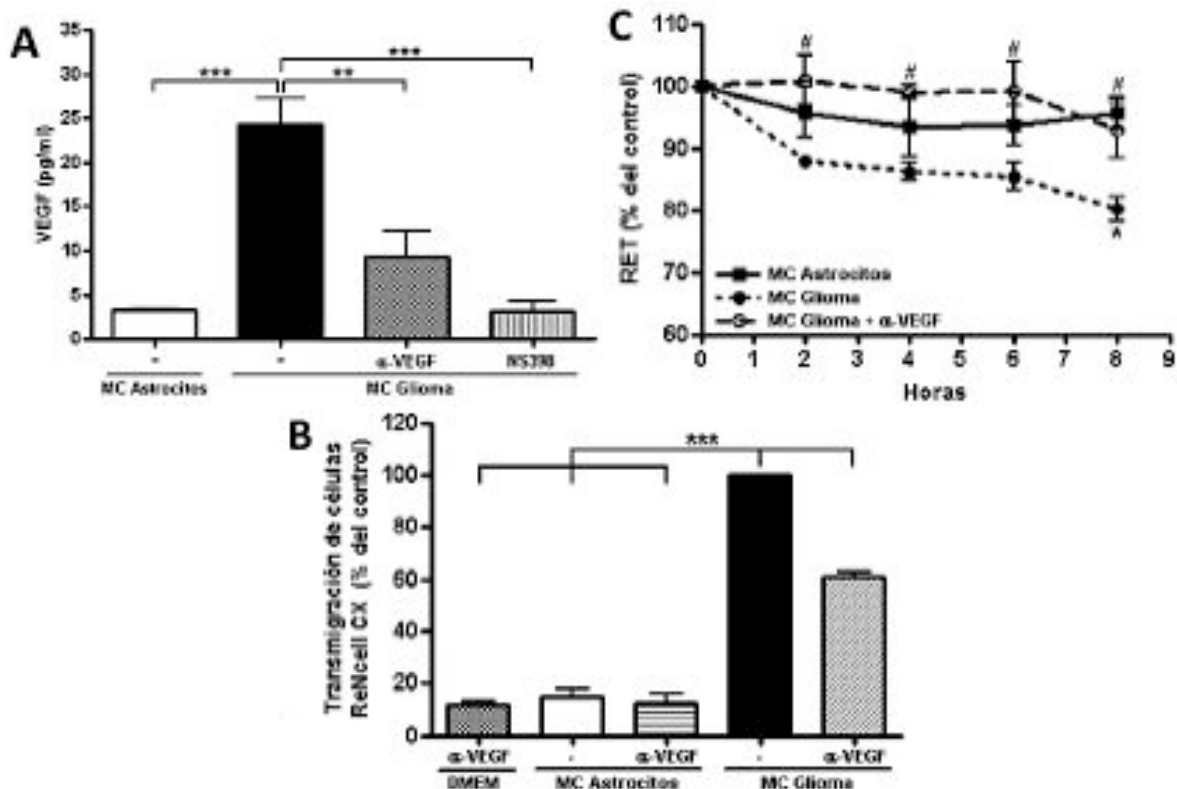


Figure 23. El VEGF en el MC de glioma C6 induce la trans migración de las NSCs a través de la BHE. A) La cantidad de VEGF, determinada por ELISA, es mayor en el MC de glioma C6 que en el MC de astrocitos. La inmunoprecipitación de VEGF reduce la cantidad de VEGF presente en el MC de glioma C6. N=3, F(3,8)=20.98; **P<0.01, ***P<0.001; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. B) Ensayo de trans migración de las células ReNcell CX a través del EMC cuando en el compartimento basal se encuentra: DMEM con el anticuerpo neutralizante contra VEGF; o MC de astrocitos o de glioma C6, con o sin el anticuerpo neutralizante contra VEGF. El control corresponde a la trans migración inducida por el MC de glioma C6, y se considera el 100% de la trans migración. N=3, F(4,10)=275.5; ***P<0.001; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. C) La inmunoprecipitación de VEGF revierte la disminución de la RET inducida por el MC de glioma C6. N=3, F(2,20)=14.64; *P<0.05 con respecto al MC de astrocitos; #P<0.05 con respecto al MC de glioma C6. Prueba estadística de ANOVA de dos vías, seguida de Bonferroni.

6.5. La baja cantidad de EGF en el MC de glioma C6 estimula la trans migración de las células ReNcell CX en un modelo *in vitro* de BHE

Se ha reportado que el factor de crecimiento epidermal (EGF, por las siglas en inglés de Epidermal Growth Factor), aunque no se produce en una cantidad significativa en los gliomas, estimula la migración de las NSCs (Kendall et al., 2008).

Para explorar el efecto del EGF en nuestro modelo, comenzamos determinando mediante un ensayo de ELISA, la cantidad de EGF presente en los MCs de astrocitos y de glioma C6. La figura 25A confirmó que el MC de astrocitos contenía 3.8 veces más EGF que el MC de glioma C6, y que el anticuerpo neutralizante específico para EGF podía ser usado para disminuir la cantidad de EGF en el MC de astrocitos.

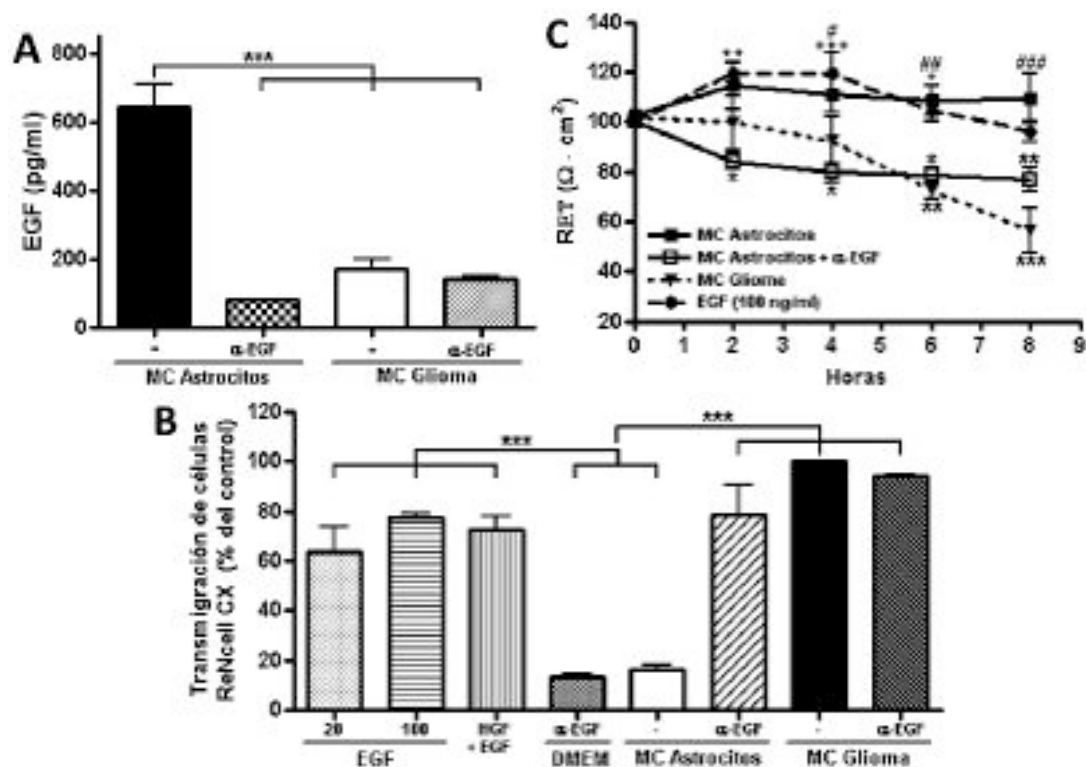


Figura 25. La falta de EGF en el MC de glioma C6 induce la trans migración de las NSCs a través de la BHE. A) La cantidad de EGF, determinada por ELISA, es mayor en el MC de astrocitos que en el MC de glioma C6. La inmunoprecipitación de EGF reduce la cantidad de EGF presente en el MC de astrocitos. N=3, F(3,8)=44.52; ***P<0.001; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. B) Ensayo de trans migración de células ReNcell CX a través del EMC cuando en el compartimento basal se encuentra: DMEM con EGF; o DMEM con el anticuerpo neutralizante contra EGF; o MC de astrocitos o de glioma C6, con o sin el anticuerpo neutralizante contra EGF. El control corresponde a la trans migración inducida por el MC de glioma C6, y se considera el 100% de la trans migración. N=3, F(7,16)=30.77; ***P<0.001; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. C) El EMC cultivado durante 8 horas en DMEM con EGF tiene una RET similar a la obtenida con el MC de astrocitos, mientras que la inmunoprecipitación del EGF en el MC de astrocitos disminuye la RET de manera similar a la obtenida con el MC de glioma C6. N=3, F(3,30)=23.07; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 con respecto al MC de astrocitos; #P<0.05, ###P<0.01, ####P<0.001 con respecto al MC de glioma C6; +P<0.05, ++P<0.01, +++P<0.001 con respecto al MC de astrocitos + α-EGF; Prueba estadística de ANOVA de dos vías, seguida de Bonferroni.

En ensayos de trans migración se observó que la adición de 20 y 100 ng/ml de EGF al compartimento basal, incrementó la trans migración de las células ReNcell CX a través del EMC, en comparación con el MC de astrocitos (figura 25B). La adición de HGF junto con EGF no indujo una mayor trans migración de células ReNcell CX que la inducida solamente por el EGF, y ésta última fue muy semejante a la inducida por el MC de glioma C6. Para demostrar la importancia del EGF en la trans migración de las células ReNcell CX, se colocó el anticuerpo neutralizante contra EGF en el MC de glioma C6 y, ante la baja cantidad de EGF presente en el MC de glioma C6, no se observó efecto, como era de esperarse. En cambio, cuando el anticuerpo neutralizante se añadió al MC de astrocitos,

se observó un incremento en la trans migración de las células ReNcell CX. De acuerdo con estos resultados, el EGF indujo un incremento en la RET (figura 25C) pero sin modificar la cantidad total de claudina-5 en el EMC (figura 29A). La neutralización del EGF en el MC de astrocitos disminuyó la RET del EMC. En conjunto, estos datos sugieren que la ausencia de EGF en el MC de glioma C6, favorece la permeabilidad del EMC y contribuye a la trans migración de las células ReNcell CX a través del EMC.

6.6. La presencia de PGE₂ y la falta de EGF en el MC de glioma C6 promueve la apertura de la BHE

Se ha reportado que la prostaglandina E₂ (PGE₂) disminuye la RET epitelial e inhibe el incremento de la RET inducido por el EGF (Flores-Benitez et al., 2009). Por ello, decidimos determinar la concentración de PGE₂ en los MCs de astrocitos y de glioma C6. La cuantificación por ELISA de PGE₂ mostró un incremento pequeño pero significativo en la concentración de PGE₂ en el MC de astrocitos, en comparación con el MC de glioma C6 (figura 26A). Sin embargo, ante la ausencia de EGF en el MC de glioma C6, la presencia de PGE₂ podría disminuir la RET.

Adicionalmente, se administró el inhibidor de COX-2, NS398, a las células de glioma C6, y como se muestra en la figura 26A, en el MC producido por estas células se observó una disminución en la cantidad de PGE₂. En ensayos de RET, la inhibición de COX-2 produjo un incremento significativo en la RET del EMC, incluso por arriba de los valores obtenidos con el MC de astrocitos (figura 26B). En el MC producido por las células de glioma C6 tratadas con NS398 también se encontró una disminución en la cantidad de VEGF (figura 24A), lo que se explica porque la PGE₂ también induce la expresión de VEGF (Ghosh et al., 2000). Por lo tanto, el incremento en la RET del EMC podría deberse a la baja cantidad de PGE₂ y VEGF presente en el MC de las células de glioma C6 tratadas con el inhibidor de COX-2. En seguida analizamos la concentración de citosinas presentes en los MCs de astrocitos y de glioma. El análisis cuantitativo de la concentración de INF- α , TNF- α , IL-12p70, IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 reveló que éstas citosinas se encuentran en la misma concentración en ambos MCs (figura 26C). Este resultado sugiere que éstas citosinas no son responsables de la trans migración de las células ReNcell CX, inducida por el MC de glioma C6.

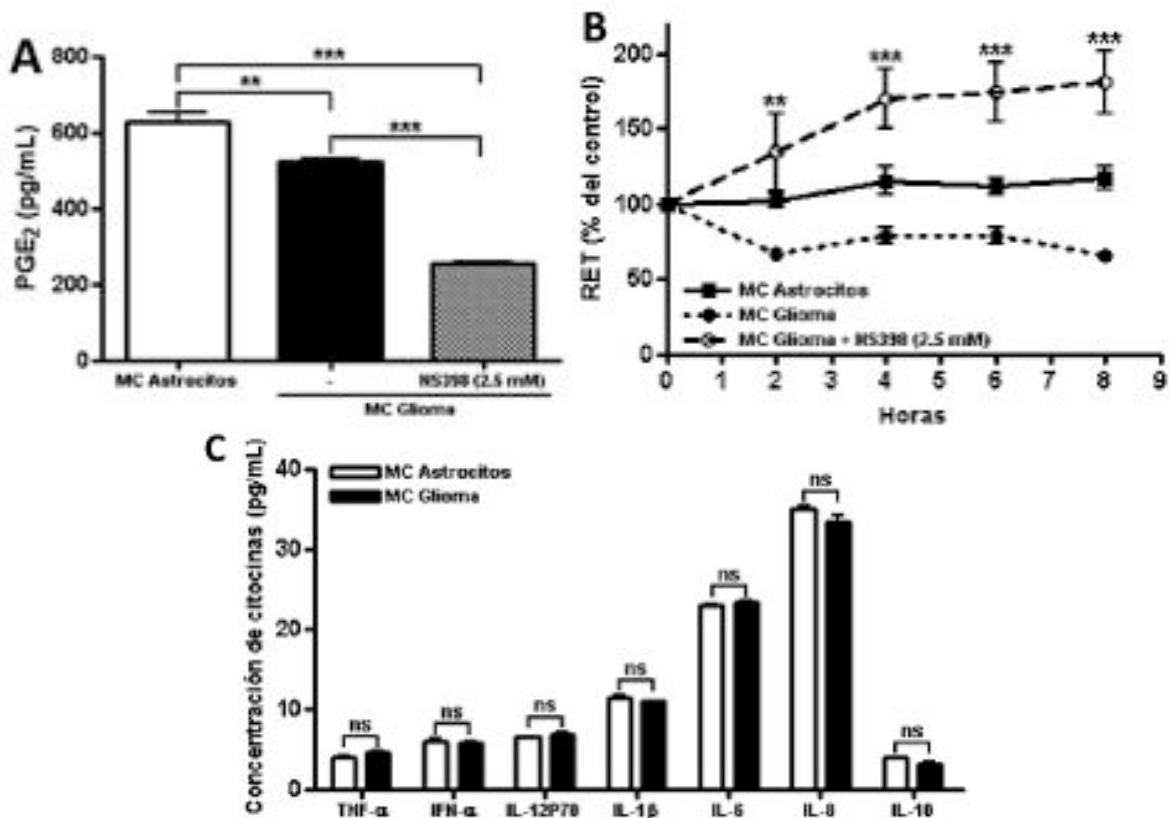


Figura 26. La presencia de PGE₂ y la falta de EGF en el MC de glioma C6 incrementa la permeabilidad de la BHE. A) Cuantificación por ELISA de PGE₂ en los MCs de astrocitos y de glioma C6 tratados o no con el inhibidor de COX-2 (NS398). N=3, F(2,6)=161.9; **P<0.01, ***P<0.001; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. B) RET del EMC incubado con los MCs derivados de astrocitos, glioma C6 o células C6 tratadas con NS398. N=3, F(2,20)=53.56; *P<0.05, **P<0.01 con respecto al MC de astrocitos; ##P<0.01, ###P<0.001 con respecto al MC de glioma C6; Prueba estadística de ANOVA de dos vías, seguida de Bonferroni. C) Análisis cuantitativo de las citocinas IFN-α, TNF-α, IL-12p70, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10, presentes en los MCs de astrocitos y de glioma C6. N=3, df=2, prueba estadística de t de Student.

6.7. La presencia de zonulina/prehaptoglobina-2 en el MC de glioma C6 promueve la apertura de la BHE y la trans migración de las células ReNcell CX

La zonulina identificada recientemente como preheptaglobina-2 (Tripathi et al., 2009), es el análogo eucariota de la toxina Zot (por las siglas en inglés de Zona Ocludens Toxin), producida por la bacteria *Vibrio cholera*. La zonulina abre la ruta paracelular al unirse a su receptor, que activa una vía de señalización dependiente de la fosfolipasa C y la proteína cinasa C, que lleva a la polimerización de actina y a la contracción del anillo cortical de actina-miosina (Fasano, 2011). La identificación del receptor de zonulina en el cerebro humano (Lu et al., 2000), así como su sobre-expresión en gliomas, y su correlación con la degradación de la BHE (Skardelly et al., 2009), nos llevó a analizar la presencia de la zonulina en el MC de glioma C6.

En la figura 27A se muestra cómo por Western blot pudimos detectar la presencia de zonulina en el MC de glioma C6 y no en el MC de astrocitos. Mediante ensayos de transmigración, se observó cómo la eliminación de la zonulina por inmunoprecipitación con un anticuerpo específico, en el MC de glioma C6, disminuyó en un 36% la transmigración de las células ReNcell CX a través del EMC (figura 27B). Este efecto se debió al cierre de la BHE, puesto que la eliminación de zonulina del MC de glioma C6, revirtió el efecto deletéreo del MC de glioma C6 en la RET del EMC (figura 27C).

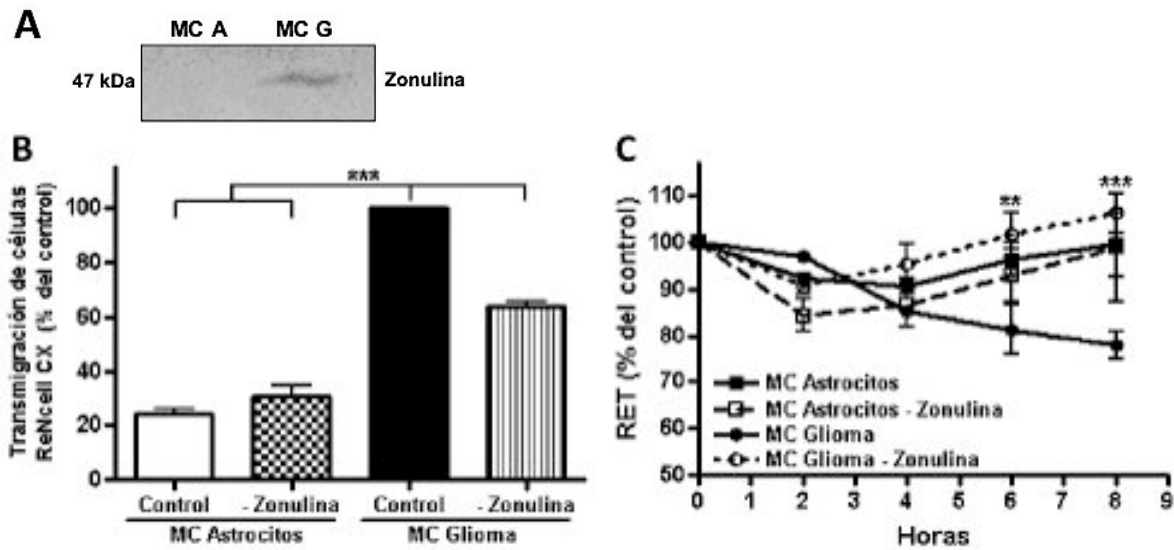


Figura 27. La zonulina presente en el MC de glioma C6 abre la BHE y favorece la transmigración de las células ReNcells CX. A) Detección de zonulina por Western blot en el MC de glioma C6 y no en el el MC de astrocitos. B) Ensayo de transmigración de las células ReNcells CX a través del EMC con los MCs de astrocitos y de glioma C6, con o sin zonulina. N=6, F(3,20)=228.2; *** p<0.001; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni. C) La eliminación de la zonulina del MC de glioma C6 revierte la caída de la RET inducida por el MC de glioma C6. N=3, F(3,30)=5.981; **P<0.01, ***P<0.001 con respecto al MC de glioma C6; Prueba estadística de ANOVA de dos vías, seguida de Bonferroni.

6.8. Los MCs de astrocitos y glioma C6 contienen cantidades similares de MMP-2 y -9

Nuestro siguiente objetivo fue analizar por zimografía, si el glioma producía MMPs que facilitarían el movimiento de las NSCs a través del EMC. La figura 28 muestra que los MCs de astrocitos y de glioma C6 contenían la misma cantidad de pro-MMP-2 y pro-MMP-9. En seguida analizamos si la adición de las células ReNcell CX a la monocapa endotelial modificaba el patrón obtenido en el zimograma. En la segunda línea de la figura 28 observamos que el MC de las células ReNcell CX contiene pro-MMP-2 pero no pro-MMP-9, mientras que en las últimas cuatro líneas observamos que los MCs de los compartimentos apicales y basales que provienen del co-cultivo de EMC/ReNcell CX incubados con el MC

de astrocitos o de glioma C6, contienen pro-MMP-2 y pro-MMP-9. Esto sugiere que las MMPs no son la causa de la caída en la RET del EMC inducida por el MC de glioma C6.

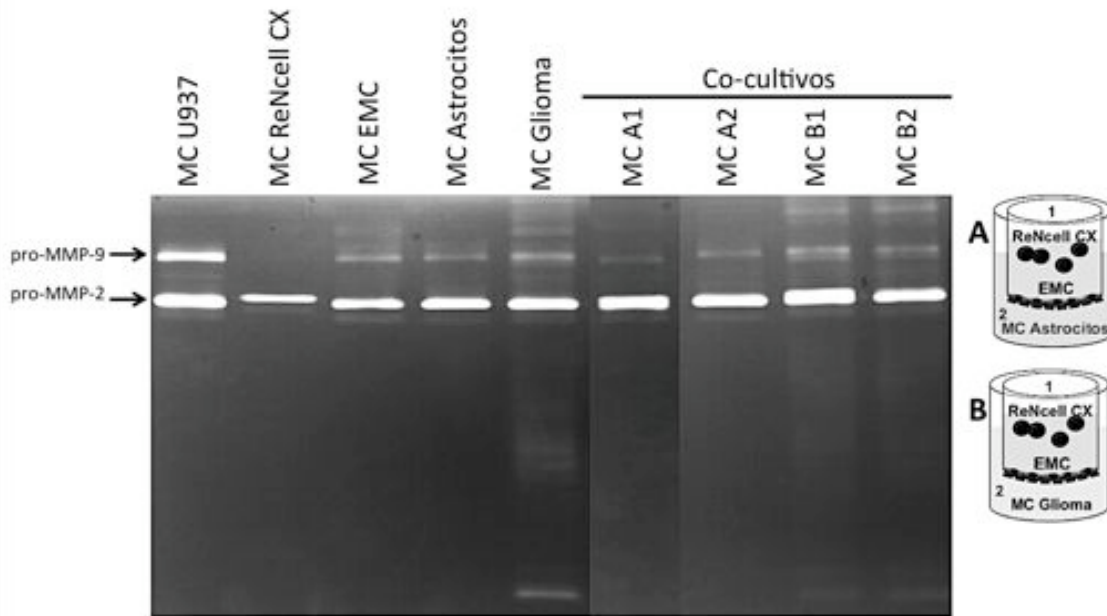


Figura 28. Los MCs de astrocitos y de glioma C6 contienen cantidades similares de pro-MMP-2 y -9. Los MCs derivados de diferentes cultivos (células ReNcells CX, del EMC, astrocitos y glioma C6) y de los co-cultivos esquematizados del lado derecho, se corrieron por electroforesis en condiciones no desnaturizantes, en geles con 8% de poliacrilamida y 1% de gelatina. La actividad proteolítica se indujo por la incubación con una solución amortiguadora con Ca^{2+} y las bandas se observaron por tinción con azul de Coomassie. El MC de las células U937 de melanoma, se usó como patrón control del peso molecular de las MMP-2 y -9. MC A1, MC del ensayo A presente en el compartimento apical (1); MC A2, MC del ensayo A presente en el compartimento basal (2); MC B1, MC del ensayo B presente en el compartimento apical (1); MC B2, MC del ensayo B presente en el compartimento basal (2).

6.9. La expresión exógena de ocludina en los fibroblastos-L incrementa su trans migración a través del EMC

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si la presencia de las proteínas de la UE en la célula que transmigra podía facilitar su paso a través de las células del EMC. Para resolver esta pregunta, utilizamos a los fibroblastos-L, que no expresan proteínas de la UE (Furuse et al., 1998), y a los fibroblastos NIH-3T3, que expresan a la claudina-2 (hoja de datos del anticuerpo hecho en conejo contra claudina-2, Abcam, AB53032) (figura 29A). En la figura 29B se muestra que los fibroblastos NIH-3T3 migraron a través del EMC en mayor cantidad que los fibroblastos-L, de manera independiente del MC presente en el compartimento basal. Estos datos sugieren que la expresión de proteínas de la UE en la célula transmigrante, facilita su paso a través del EMC.

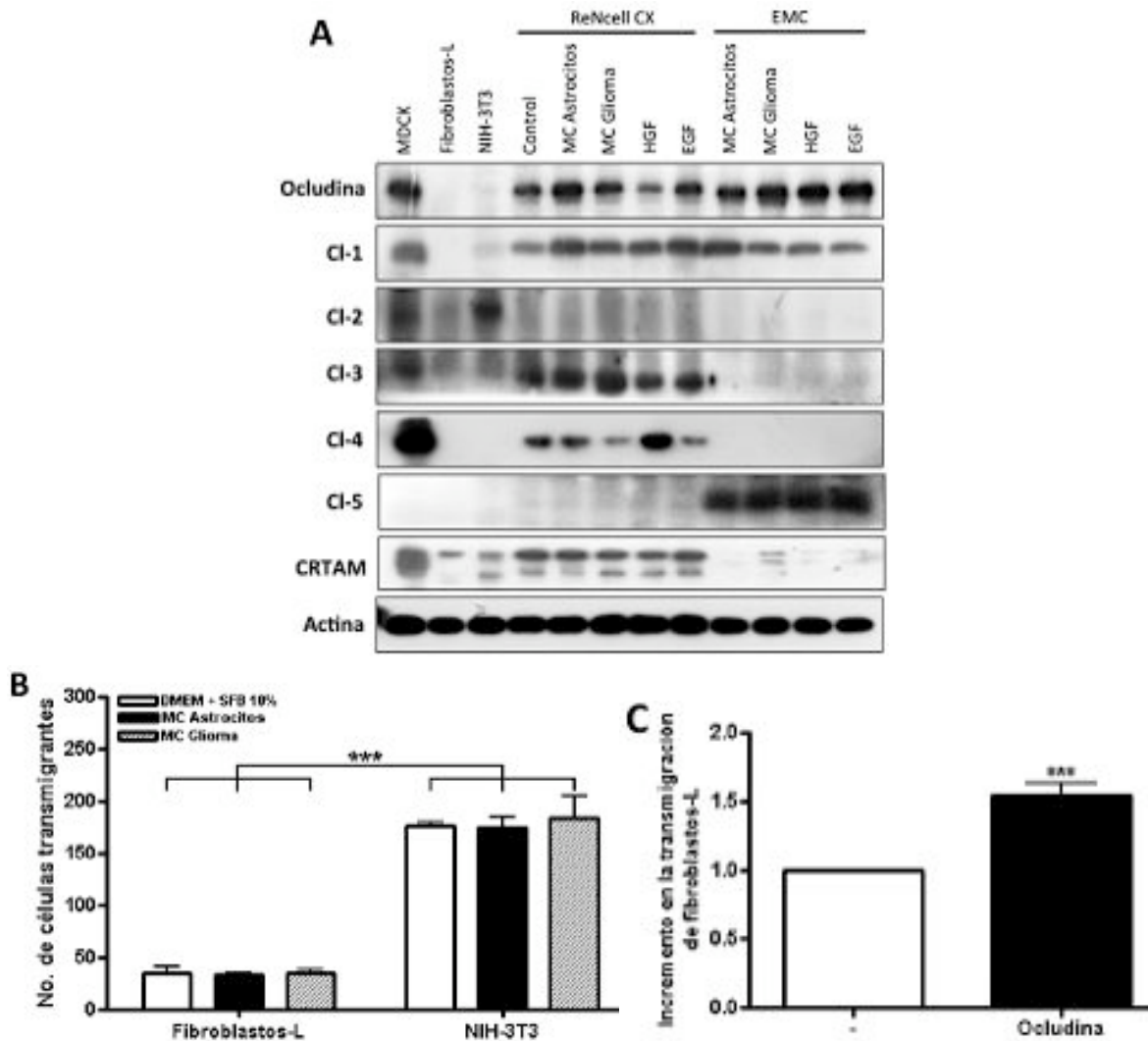


Figura 29. La expresión de proteínas de la UE en las células transmigrantes favorece su paso a través del EMC. A) Análisis por Western blot de la expresión de ocludina, claudinas 1-5 y CRTAM en los fibroblastos-L, NIH-3T3, células ReNcell CX y del EMC. B) La trans migración de fibroblastos-L y NIH-3T3 a través del EMC es independiente del MC presente en el compartimento basal, pero es significativamente mayor en los fibroblastos NIH-3T3 que expresan claudina-2, que en los fibroblastos-L que no expresan proteínas de la UE. N=3, $F(1,6)=232.22$, $***P<0.001$; $F(2,8)=0.0895$; Prueba estadística de ANOVA de dos vías, seguida de Bonferroni. C) La expresión exógena de ocludina en los fibroblastos-L incrementa su trans migración a través del EMC. N=9, $t=6.411$, $df=8$; $***P<0.001$; Prueba estadística de t de Student.

A continuación analizamos por Western blot, si las células ReNcell CX expresaban proteínas integrales de la UE. En la figura 29A se observa que las células ReNcell CX expresaron ocludina y las claudinas 1, 3 y 4 en todas las condiciones probadas, mientras que las células del EMC expresaron ocludina y claudinas 1 y 5. La presencia de proteínas de la UE en las células ReNcell CX podría permitir el establecimiento de contactos célula-célula homotípicos y heterotípicos, con las proteínas homólogas presentes en el EMC, lo que facilitarían la trans migración de las células a través del EMC.

Para probar este principio, se transfectó ocludina en los fibroblastos-L y se probó su trans migración. La figura 29C muestra que los fibroblastos-L que expresan ocludina transmigraron más que los fibroblastos-L control. Esto sugiere que la presencia de ocludina y claudinas 1, 3 y 4 en las células ReNcell CX podría facilitar su trans migración.

6.10. La presencia de ocludina y claudina-5 en el EMC disminuye en los sitios de trans migración de las células ReNcell CX

En seguida analizamos por inmunofluorescencia la expresión de ocludina y claudina-5 en el EMC durante la trans migración de las células ReNcell CX. La figura 30 muestra que la presencia del MC de glioma C6 indujo la desaparición de ocludina y claudina-5 en los sitios de trans migración de las células ReNcell CX, que se tiñeron con CMTMR. Sin embargo, por Western blot no se detectó cambio en la cantidad de éstas proteínas (datos no mostrados). Estos datos sugieren que el MC de glioma C6 induce la desaparición de las proteínas de la UE en los puntos de contacto entre las células endoteliales y las células transmigrantes.

6.11. La adhesión mediada por CRTAM facilita la trans migración de las células ReNcell CX a través del EMC

En nuestro grupo de trabajo, recientemente se identificó a la proteína de adhesión CRTAM, como un nuevo miembro de la familia de proteínas JAM, y se determinó que induce la adhesión célula-célula en la membrana lateral de las células epiteliales (Garay et al., 2010). La figura 29A muestra que CRTAM se expresa en los fibroblastos-L, NIH-3T3, y en las células ReNcell CX, y que en cambio, apenas se detecta en las células del EMC. Sin embargo, llama la atención que la incubación de éstas células con el MC de glioma C6, indujo la expresión de CRTAM. Para determinar el papel de CRTAM en la trans migración de las células ReNcell CX a través del EMC, se compitió la adhesión célula-célula mediada por CRTAM, añadiendo CRTAM soluble (CRTAM-Fc) al compartimento apical donde se encontraban las células ReNcell CX. La figura 31 muestra que la adición de CRTAM soluble inhibió la trans migración de las células ReNcell CX inducida por el MC de glioma C6. Estos datos sugieren que la adhesión mediada por CRTAM es crucial para la trans migración de las células ReNcell CX a través del EMC.

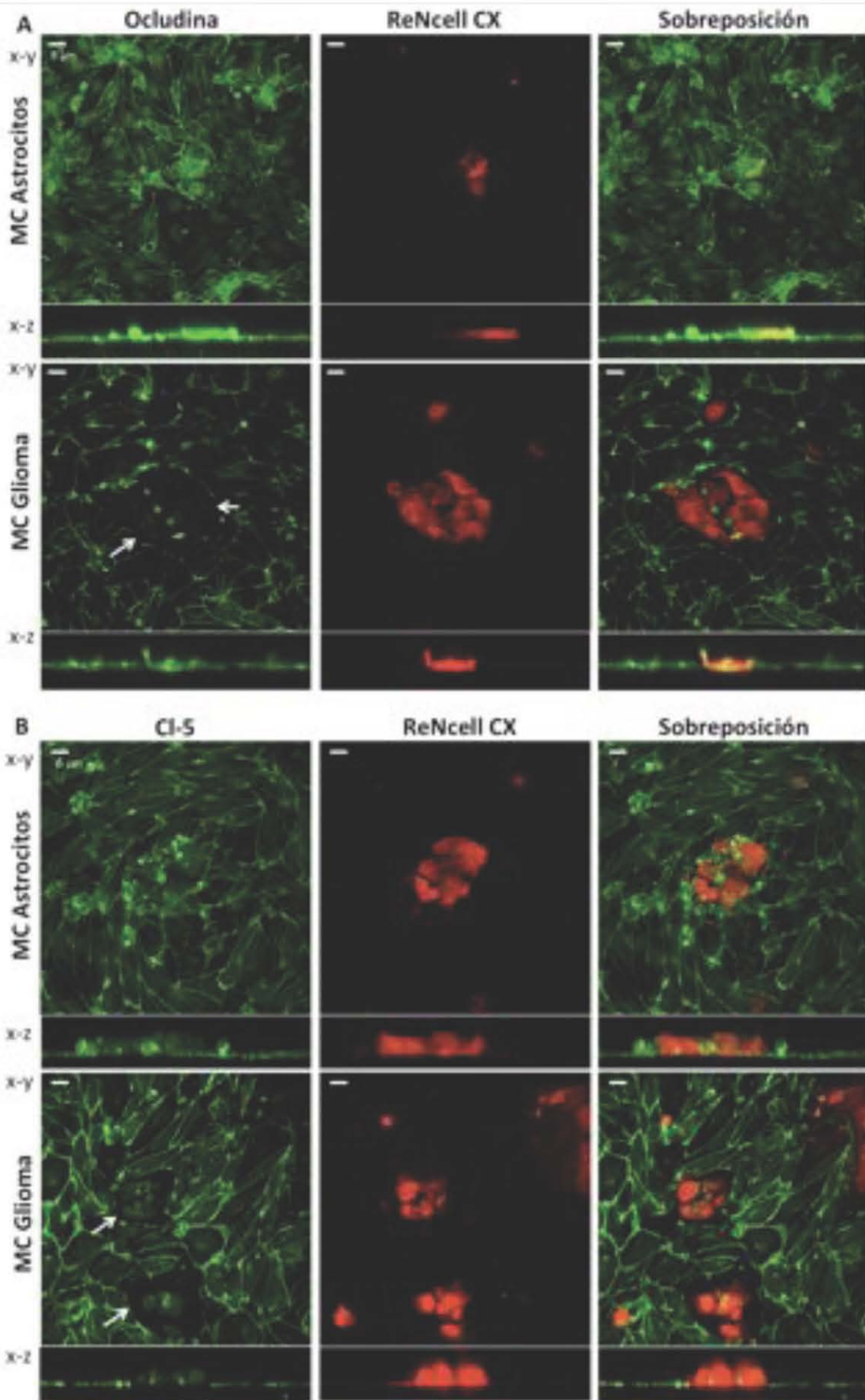


Figura 30. La expresión de ocludina y claudina-5 disminuye en los sitios de transmigración de las células ReNcell CX, en las monocapas de EMC incubadas con el MC de glioma C6 en el compartimento basal. Ocludina (A) y claudina-5 (B) se detectaron con anticuerpos primarios específicos, y con anticuerpos secundarios acoplados a FITC. Las células ReNcell CX transmigrantes, se tiñeron en rojo con el marcador CMTMR. Las flechas apuntan a las áreas donde la expresión de ocludina y claudina-5 se perdió.

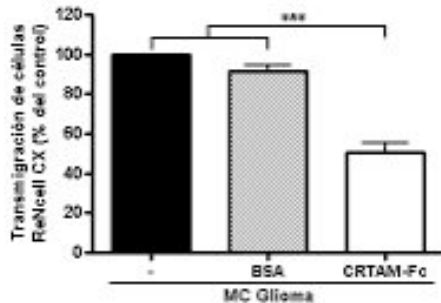


Figura 31. La adhesión mediada por CRTAM es importante para la transmigración de las células ReNcell CX a través del EMC. Se compitió la adhesión célula-célula añadiendo CRTAM soluble (CRTAM-Fc) al compartimento apical de los filtros Millicell. N=4, F(2,6)=73.86; ***P<0.001; Prueba estadística de ANOVA de una vía, seguida de Bonferroni.

6.12. Las células ReNcell CX inyectadas vía intravenosa llegan a los sitios del glioma en el cerebro

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si las células ReNcell CX, al ser inyectadas vía intravenosa, eran capaces de llegar al sitio de los tumores cerebrales. En la figura 32 se muestra que 1 semana después de la inyección en la vena de la cola de los ratones desnudos, un importante número de células ReNcell CX teñidas con CMTMR (fluorescencia en rojo) se distribuyeron en la masa tumoral formada por las células de glioma C6 (fluorescencia en verde). En cambio, en el hemisferio cerebral contralateral, donde no se inyectaron las células de glioma C6, o en el cerebro de los ratones que sólo se inyectaron con el vehículo, o en los ratones no operados (datos no mostrados), no se encontraron las células ReNcell CX. En concordancia con los resultados *in vitro*, en el área tumoral se encontró una fuerte señal de HGF y VEGF, y la zonulina y claudina-5 tiñeron el borde de los vasos sanguíneos del tumor (flechas). La alta expresión de claudina-5 encontrada en el área tumoral se debe a que el glioma induce una alta vascularización (Tamiya et al., 1995). En cambio, no se encontró tinción de HGF en la sección del vehículo y sólo se detectó una pequeña cantidad en la sección contralateral. Por otra parte, no se encontró zonulina en la sección contralateral y solamente se detectó una pequeña cantidad en la sección del vehículo. Con respecto a la claudina-5, se detectó en pequeñas cantidades alrededor de los vasos tanto en el lado contralateral, como en los cortes del vehículo. Los experimentos *in vivo* demuestran la capacidad de las células ReNcell CX de atravesar la BHE y llegar a los sitios de tumores cerebrales, y confirman la sobre-expresión de HGF, VEGF y zonulina en los gliomas.

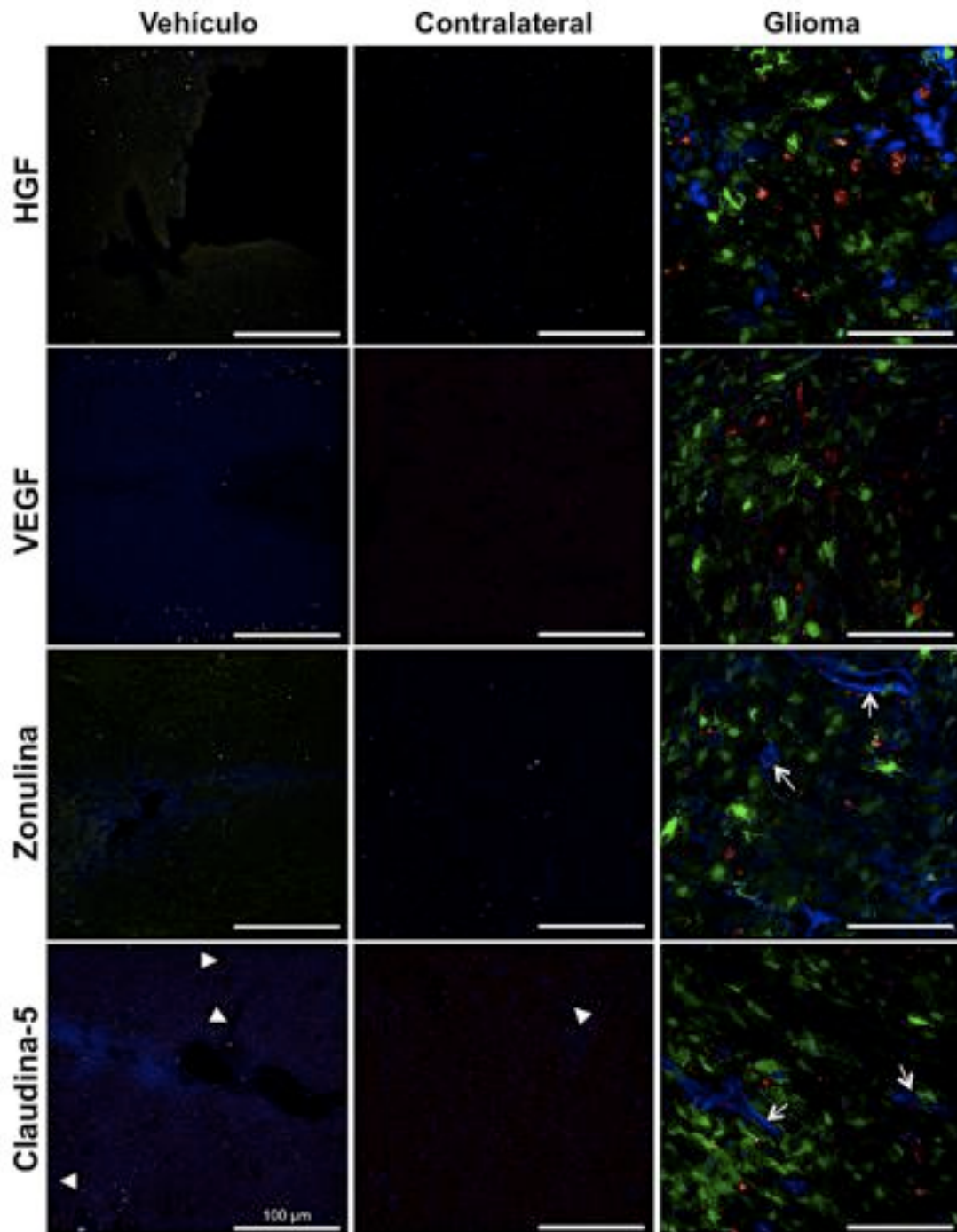


Figura 32. Las células ReNcells CX inyectadas por vía intravenosa atraviesan la BHE y llegan a los sitios del glioma. Detección por inmunofluorescencia de HGF, VEGF, zonulina y claudina-5 (azul) en los cortes de cerebro de los ratones desnudos. Los animales se inyectaron previamente en la región del estriado con el vehículo o con células de glioma C6-GFP (verde). Una semana después se inyectaron las células ReNcell CX marcadas con CMTMR (rojo) en la vena de la cola. Una semana después se obtuvieron las rebanadas de cerebro. Solamente en el área tumoral se detectó una señal fuerte de HGF y VEGF, mientras que la zonulina y la claudina-5 marcaron fuertemente los bordes de los vasos (flechas). La zonulina también se detectó pero en baja intensidad en la zona donde se administró el vehículo (cabeza de flecha). La claudina-5 dio un patrón punteado en la sección contralateral (cabeza de flecha) y tiñó, aunque con baja densidad, los vasos en la sección del vehículo (cabeza de flecha).

VII. Discusión

Los GBM son tumores cerebrales que a pesar de su tratamiento con cirugía, radiación y quimioterapia, resultan letales. Basados en la observación de que las sustancias derivadas de éstos tumores, específicamente atraen a las células troncales, se ha propuesto un tratamiento potencial basado en el uso de las células troncales, particularmente las NSCs como vectores para la liberación de genes terapéuticos a los gliomas (Ahmed et al., 2010; Bexell et al., 2012). La migración de las NSCs inyectadas por vía intravenosa, hacia los tumores cerebrales (Aboody et al., 2000; Li et al., 2007; Tang et al., 2003) indica que éstas células tienen la capacidad de atravesar la BHE. Este aspecto es particularmente relevante no sólo para los gliomas, que presentan zonas de BHE permeable, sino también para los grupos de células de glioma que se dispersaron e infiltraron en el parénquima cerebral donde la BHE se encuentra intacta.

El objetivo de este estudio fue analizar qué factores presentes en el MC de glioma inducen la transmigración de las NSCs a través de un modelo *in vitro* de BHE, y el impacto de éstos factores en la función de la BHE. El sistema *in vitro* de BHE consiste de una monocapa de EMC sembrada sobre insertos Millicell con poro de 8 μm de diámetro, en co-cultivo con astrocitos de rata en el compartimento basal. Nuestros resultados indican que el cambio de astrocitos por su MC, mantiene la RET de la monocapa endotelial, mientras que la presencia de glioma C6 o su MC, reduce significativamente la RET.

Los ensayos de transmigración demostraron que las células ReNcell CX de origen humano, que fueron utilizadas para éste estudio, son capaces de transmigrar a través del EMC, y que ésta respuesta es significativamente mayor si en el compartimento basal se encuentra el MC de glioma C6.

Los análisis de ELISA y Western blot revelaron que el VEGF, el HGF y la zonulina están presentes en mayor concentración en el MC de glioma C6 en comparación con el MC de astrocitos, mientras que el EGF y la PGE_2 son más abundantes en el MC de astrocitos. Estos datos concuerdan con previas observaciones que muestran la expresión de zonulina en gliomas humanos (Skardelly et al., 2009), y la falta de EGF y la producción significativa de HGF y VEGF en las líneas celulares de glioma humano, U251 y U87 (Kendall et al., 2008).

Nuestros resultados muestran que el VEGF, el HGF y la zonulina inducen la transmigración de las células ReNcell CX a través del EMC. Esto puede explicarse fácilmente pues el VEGF produce una respuesta quimiotáctica para las NSCs (Kendall et al., 2008); (Schmidt et al., 2005) y la neutralización de éste factor en el MC de glioma C6 induce la recuperación de la RET del modelo *in vitro* de BHE, confirmando que el VEGF es un factor quimiotático y que abre la BHE (Takahashi and Shibuya, 2005).

Estaba descrito previamente que ZOT, el homólogo procariota de zonulina, incrementa la permeabilidad de las células endoteliales de origen bovino (Karyekar et al., 2003), pero para nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se muestra que la zonulina facilita la transmigración de las células a través del EMC.

La zonulina se encuentra elevada en el suero de los pacientes con diabetes tipo I, enfermedad celiaca, Crohn's y esquizofrenia (Fasano, 2012), lo que sugiere que un incremento en la permeabilidad intestinal y de la BHE, podría ser la base común que predispone para éstas enfermedades, al facilitar la autoinmunidad o el contacto con sustancias tóxicas al SNC, por el acceso no debidamente restringido al cuerpo de antígenos y tóxicos presentes en el lumen intestinal y/o en la sangre.

Recientemente se encontraron variaciones genéticas de un solo nucleótido, SNPs (por las siglas en inglés Single Nucleotide Polymorphisms) específicas asociadas al desarrollo de la enfermedad celiaca y la esquizofrenia. Se observó que, en la región cromosómica donde se encuentran éstas variables, se localiza el gen de la claudina-5. Esto sugiere que la presencia de éste patrón genético podría predisponer el desarrollo de la enfermedad celiaca y de la esquizofrenia en el mismo individuo, como de hecho ocurre con frecuencia (Wei and Hemmings, 2005). Además, el incremento de zonulina en el suero, podría contribuir de manera gradual con el desarrollo de la esquizofrenia, y posiblemente de otras enfermedades del SNC.

Ya se sabía que el HGF era el quimioatrayente más eficiente para las NSCs producido por las líneas celulares de glioma (Kendall et al., 2008). Sin embargo, aquí encontramos que, a pesar de que el HGF induce la transmigración de las células ReNcell CX, no disminuye la RET del EMC. Estos resultados indican que el HGF solo contribuye a la transmigración a través de la quimioatracción.

Se sabía con anterioridad que la vía de señalización del EGF está activada en el GBM, pero no quedaba claro si esto se debía a la actividad descontrolada de su receptor (EGFR) o al incremento del ligando. La mutación ganadora de función, más común en el GBM, es la amplificación y sobre-expresión del EGFR y ésta contribuye mayoritariamente a un fenotipo invasor (Masui et al., 2012). La amplificación del *EGFR* se encuentra en aproximadamente el 50 % de los GBMs, y se debe a rearrreglos intragénicos y/o deleciones (Wong et al., 1992) que producen varias mutantes de los EGFRs (Frederick et al., 2000).

La variante III del receptor de EGFR (EGFRvIII) es la mutante más común, y se encuentra en el ~40% de los GBMs en los que el EGFR se incrementa, y está presente en ~20% de todos los GBMs. El EGFRvIII incrementa la invasividad del tumor, a través de su actividad constitutiva, es decir, independientemente de la unión del ligando a su receptor (Steck et al., 1988; Yamazaki et al., 1988).

Se ha reportado una gran variación en el nivel del EGF secretado por los GBMs. Los estudios con líneas celulares de glioma indican que el EGF se expresa escasamente en estos tumores (Kendall et al., 2008), y en concordancia con esto, aquí observamos que el MC de glioma C6 contiene una baja cantidad de EGF. Paradójicamente, en los pacientes con GBM, el nivel de EGF en suero se encuentra elevado (da Silveira et al., 2012). Las mutaciones encontradas en el gen de *EGF* aumentan su transcripción en el GBM (Bhowmick et al., 2004), sin embargo, el aumento en la transcripción no necesariamente indica un aumento en el nivel de la proteína (Marcus et al., 2010). Con estas observaciones, es difícil establecer una conclusión en cuanto a la producción de EGF en el GBM.

En éste trabajo encontramos que el EGF induce la trans migración de las ReNcell CX e incrementa la RET del EMC. La respuesta a ésta paradoja, podría ser que el EGF es un factor quimioatrayente para las NSCs (Kendall et al., 2008), y que cuando la que la BHE está sellada, las células ReNcell CX atraviesan el EMC por la ruta transcelular de manera similar a la previamente reportada en los neutrófilos (von Wedel-Parlow et al., 2011).

El incremento en la trans migración de las células ReNcell CX debido a la neutralización del EGF en el MC de astrocitos, puede deberse a la apertura de la BHE que ocurre cuando la PGE₂ está presente en ausencia de EGF (Flores-Benitez et al., 2009). Esta sugerencia se refuerza con la observación de que las células de glioma C6 tratadas con el inhibidor de COX-2, NS398, generan un MC con poca cantidad de PGE₂ y de VEGF, que incrementa los valores de RET por arriba de los obtenidos con el MC de astrocitos.

La eliminación por neutralización o inmunoprecipitación de VEGF, HGF o zonulina en el MC de glioma C6, no fue suficiente para eliminar la trans migración de las células ReNcell CX, indicando que ninguno de éstos factores por sí solos son los responsables de éste proceso y que más bien, todos contribuyen a la trans migración de las NSCs.

Las MMPs -2 y -9, al encontrarse en las mismas concentraciones en los MCs de astrocitos y de glioma, parecen no tener un papel significativo en la trans migración de las células ReNcell CX a través del EMC.

En el experimento de transfección de ocludina en los fibroblastos-L, observamos que el paso de las células por la ruta paracelular del EMC se facilita con la expresión de las proteínas de la UE en las células trans migrantes. Aquí encontramos por primera vez, que las NSCs expresan a las proteínas de la UE ocludina y claudinas 1, 3 y 4, las cuáles podrían facilitar su trans migración a través de la monocapa endotelial. Además demostramos, que la adhesión mediada por CRTAM es importante para la trans migración de las NSCs a través del EMC. Es notorio cómo el MC de glioma C6 disminuyó la expresión de ocludina y claudina-5 en el EMC, en los sitios de trans migración de las células ReNcell CX. Este resultado es semejante al reportado anteriormente durante la trans migración de las células de melanoma (Fazakas et al., 2011).

La disminución en la expresión de las proteínas de la UE en los sitios de trans migración, podría corresponder a un recambio de proteínas de la UE en estos sitios, de manera semejante a la observada en la barrera hematotesticular, donde las espermatogonias migran por la ruta paracelular entre las células de Sertoli (Smith and Braun, 2012b).

La atracción del MC de glioma parece ser específica para las NSCs, pues ésta inducción no se observó durante la trans migración de los fibroblastos. Este resultado concuerda con estudios previos que muestran la falta de tropismo de los fibroblastos por los gliomas (Aboody et al., 2000; Tamiya et al., 1995).

En los experimentos *in vivo* demostramos la capacidad de las células ReNcells CX, inyectadas vía intravenosa, de migrar hacia el glioma C6 intracerebral y confirmamos nuestros hallazgos *in vitro*, pues encontramos un incremento en la expresión de HGF, VEGF y zonulina en el sitio del tumor.

VIII. Conclusión

Considerando que las NSCs tienen el potencial para ser usadas como vehículos para el trasplante de genes terapéuticos a los gliomas, aquí hemos caracterizado en un modelo *in vitro* de BHE a los factores presentes en el MC de glioma que controlan la trans migración de las NSCs. Encontramos que HGF, VEGF, zonulina y PGE₂, en ausencia de EGF en el MC de glioma C6, inducen la trans migración. Que VEGF, zonulina y PGE₂ abren la BHE. Que las ReNcell CX expresan CRTAM, ocludina y claudinas 1, 3 y 4, que podrían facilitar su migración paracelular, y que en los sitios de trans migración, la expresión de ocludina y claudina-5 disminuye en el EMC. En los ratones desnudos observamos que las ReNcell CX, inyectadas por vía intravenosa, atravesaron la BHE y llegaron a los gliomas intracraneales, los cuáles expresaron HGF, VEGF y zonulina/prehaptoglobina 2 (figura 33).

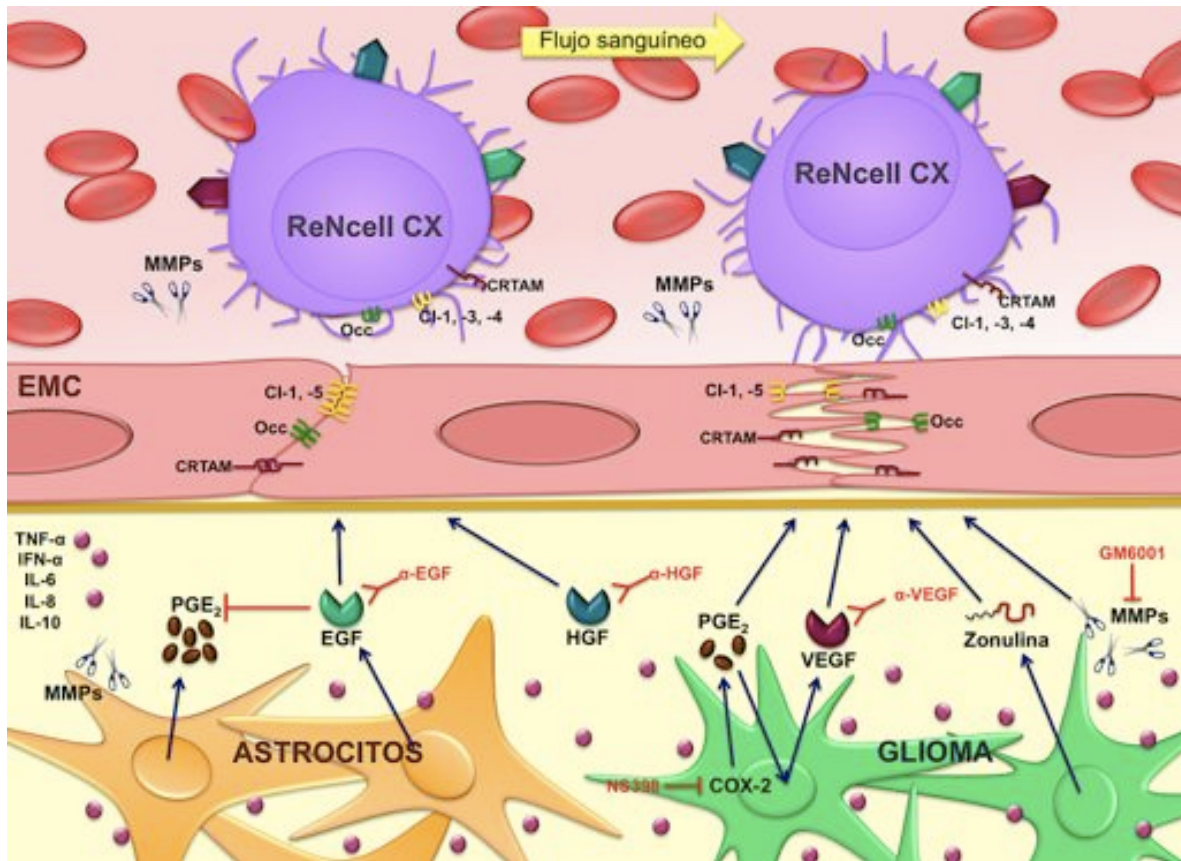


Figura 33. Esquema representativo de los factores involucrados en la trans migración de las NSCs a través de la BHE. Las células de glioma C6 secretan HGF, VEGF y zonulina, que junto con la ausencia de EGF, inducen la trans migración de las células ReNcell CX a través del EMC. VEGF, zonulina y PGE₂, al ser secretadas por las células de glioma C6, abren la BHE, mientras que la secreción de EGF en los astrocitos, incrementa el sellado de la UE. Las células ReNcell CX expresan CRTAM, ocludina y claudinas 1, 3 y 4, que podrían facilitar su trans migración por la vía paracelular del EMC, el cuál, tiene UEs formadas por CRTAM, ocludina y las claudinas 1 y 5.

IX. Producción científica durante el doctorado

9.1. Artículo original derivado del proyecto de doctorado

Transmigration of Neural Stem Cells across the Blood Brain Barrier Induced by Glioma Cells

Mónica Díaz-Coránguez^{1,4}, José Segovia¹, Adolfo López-Ornelas², Henry Puerta-Guardo³, Juan Ludert³, Bibiana Chávez⁵, Noemi Meraz-Cruz^{4,5}, Lorenza González-Mariscal^{1*}

1 Department of Physiology, Biophysics and Neuroscience, Cuernavaca, Mexico City, Mexico, **2** Department of Pharmacology, Cuernavaca, Mexico City, Mexico, **3** Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Cuernavaca, Mexico City, Mexico, **4** Faculty of Medicine, UNAM, Mexico City, Mexico, **5** National Institute of Genomic Medicine, Mexico City, Mexico

Abstract

Transit of human neural stem cells, ReNcell CX, through the blood brain barrier (BBB) was evaluated in an in vitro model of BBB and in nude mice. The BBB model was based on rat brain microvascular endothelial cells (RBMECs) cultured on Millicell inserts bathed from the basolateral side with conditioned media (CM) from astrocytes or glioma C6 cells. Glioma C6 CM induced a significant transendothelial migration of ReNcell CX in comparison to astrocyte CM. The presence in glioma C6 CM of high amounts of HGF, VEGF, zonulin and PGE₂, together with the low abundance of EGF, promoted ReNcell CX transmigration. In contrast cytokines IFN- α , TNF- α , IL-12p70, IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10, as well as metalloproteinases -2 and -9 were present in equal amounts in glioma C6 and astrocyte CMs. ReNcells expressed the tight junction proteins occludin and claudins 1, 3 and 4, and the cell adhesion molecule CRTAM, while RBMECs expressed occludin, claudins 1 and 5 and CRTAM. Competing CRTAM mediated adhesion with soluble CRTAM inhibited ReNcell CX transmigration, and at the sites of transmigration, the expression of occludin and claudin-5 diminished in RBMECs. In nude mice we found that ReNcell CX injected into systemic circulation passed the BBB and reached intracranial gliomas, which overexpressed HGF, VEGF and zonulin/prehaptoglobin 2.

Citation: Díaz-Coránguez M, Segovia J, López-Ornelas A, Puerta-Guardo H, Ludert J, et al. (2013) Transmigration of Neural Stem Cells across the Blood Brain Barrier Induced by Glioma Cells. PLoS ONE 8(4): e60855. doi:10.1371/journal.pone.0060855

Editor: Joseph Najbauer, University of Pecs Medical School, HUNGARY

Received: January 14, 2013; **Accepted:** March 1, 2013; **Published:** April 5, 2013

Copyright: © 2013 Díaz-Coránguez, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Mexican Council of Science and Technology, CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) S/R; <http://www.conacyt.mx>, grants 98448 (LGM) and 127317 (JS) and by a multidisciplinary grant from CONESTIV (Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional) S/R; <http://www.conestiv.mx>. Mónica Díaz-Coránguez, Adolfo López-Ornelas and Henry Puerta were recipients of doctoral fellowships from CONACYT (267383, 204882 and 223917). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: lmariscal@fisicocuernavaca.mx

Introduction

Neural stem cells (NSCs) constitute a population that continually self-renews and generates the neurons and glia of the brain. NSCs are highly migratory and appear to be attracted to areas of brain pathology. In particular, endogenous neural precursor cells (NPCs) located in the brain subventricular zone have been found to migrate to glial brain tumors [1], where they exert an age dependent antitumorigenic response [2] mediated in part by the release of endostatin [3] and bone morphogenetic protein 7 [4]. This ability renders the possibility of using NSC for replacing neurons in degenerative disorders, to express the proliferation of tumor cells and to deliver therapeutic genes to diseased regions in the brain including remote brain metastasis after brain tumor resection [for review see [5]]. Thus, NPCs, when systemically injected reach the cerebral parenchyma, induce recovery in animal models of multiple sclerosis [6], and NSCs when implanted into experimental intracranial gliomas *in vivo* in adult rodents, distribute extensively throughout the tumor bed, and when implanted intracranially at distant sites from the tumor, migrate through normal tissue to the tumor cells. What is more, when NSCs are implanted outside of the CNS intravascularly, they are capable of targeting intracranial gliomas [7].

Transendothelial migration of NSCs is regulated by inflammation, reactive astrocytosis and angiogenesis. These processes induce the release of numerous chemokines and growth factors that stimulate the directed migration of NSC towards the site of injury. For example, NPCs express receptors of the chemokines IL-8 and CXCL12 and migrate *in vitro* across brain endothelial cells in response to these chemokines [8]. NSC migrate from the contralateral hemisphere towards an infarcted brain area where local astrocytes and endothelium upregulate the expression of stromal cell derived factor 1 (SDF-1)/chemokine CXCL12 [9] and intravenously transplanted NSC migrate to the injured spinal cord in an CXCL12 and hepatocyte growth factor (HGF) dependent manner [10]. In NSC lines, HGF induces the strongest chemotactic response from a variety of multiple tumor-derived growth factors including vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor alpha (TGF- α) [11]. VEGF, a growth factor that promotes vasculogenesis, is able to induce long-range attraction of transplanted NSC from distant sites in the brain [12]. Conversely, other factors inhibit NPCs homing. For example, semaphorin 3A/vascular endothelial growth factor-165 acts as a repellent guidance cue for migrating NPCs [13] and hyaluronic acid, the major ligand of the adhesion molecule CD44, and anti CD44

9.2. Revisiones y capítulos de libro:

1. González-Mariscal Lorenza, Quirós Miguel and **Díaz-Coránguez Mónica**. ZO proteins and redox dependent processes. *Antioxid Redox Signal*. **2011** Sep 1;15(5):1235-53. Epub 2011 June 6.
2. Lorenza Gonzalez-Mariscal, Miguel Quiros, **Mónica Diaz-Coranguez** and Pablo Bautista (**2012**). Tight Junctions, Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology, Stevo Najman (Ed.), ISBN: 978-953-51-0544-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-and-perspectives-in-cell-biology/tight-junctions>.
3. Lorenza González-Mariscal, **Mónica Díaz-Coránguez** and Miguel Quirós. Book chapter: Regulation of tight junctions for therapeutic advantages. Tight junctions in cancer metastasis. Cancer Metastasis, Biology and Treatment series. Springer publisher. Vol. 19, **2013**, pp 197-246.

9.3. Resúmenes publicados/Participación en reuniones científicas:

1. **Mónica Díaz Coránguez** and Norma Alicia Hernández Rodríguez. “Role of PAR1-4 receptors in cell signaling leading to proliferation of breast cancer cell lines”. II Signal Transduction Meeting. Ixtapan de la Sal, Edo. De México. **Septiembre, 2009**.
2. **Mónica Díaz Coránguez**, José Segovia Vila, Bibiana Chavez Munguía, Noemí Meraz Cruz y Lorenza González-Mariscal. “Diapédesis de células troncales neurales a través de la barrera hemato-encefálica”. XXVIII Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Noviembre, **2010**.
3. **Díaz-Coránguez M.**, Segovia J., Chávez-Munguía B., Meraz-Cruz N. and González-Mariscal L. “Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier depends on their the expression of tight junction proteins and on the loosening of the barrier induced by secreted factors in glioma cells”. Cell Signaling Networks Conference (CSN2011). Mérida, Yucatán. Octubre, **2011**.

4. **M. Díaz-Coránguez**, A. López-Ornelas, N. Meráz-Cruz, H. Puerta-Guardo, J. Ludert, J. Segovia, B. Chávez-Munguía and L. González-Mariscal. "Glioma cells induce neural stem cells to cross the blood brain barrier". Molecular Structure and Function of the Apical Junctional Complex in Epithelia and Endothelia. Mérida, Yucatán. Noviembre **2012**.
5. **M. Díaz-Coránguez**, A. López-Ornelas, N. Meráz-Cruz, H. Puerta-Guardo, J. Ludert, J. Segovia, B. Chávez-Munguía and L. González-Mariscal. "Glioma cells induce neural stem cells to cross the blood brain barrier". ASCB Annual Meeting. San Francisco, CA, USA. Diciembre, **2012**.
6. **M. Díaz-Coránguez**, A. López-Ornelas, N. Meráz-Cruz, H. Puerta-Guardo, J. Ludert, J. Segovia, B. Chávez-Munguía and L. González-Mariscal. "Glioma cells induce neural stem cells to cross the blood brain barrier". 21st Jerusalem Summer School in Life Sciences. "Stem Cells and Regenerative Biology". Israel Institute for Advanced Studies, at the Edmond J. Safra Campus, Givat Ram, of The Hebrew University of Jerusalem. Julio 21-25, **2013**.

9.4. Premios:

1. Beca para estudiantes de posgrado
otorgada por la Sociedad Americana de Biología Celular (ASCB)
Reunión anual de la ASCB
San Francisco, California. Diciembre 15-19, 2012
2. Beca "Roberto González Barrera"
otorgada por los Amigos Mexicanos de la Universidad Hebrea de Jerusalén, A.C.
21º Curso sobre ciencias de la vida, Células troncales y Biología Regenerativa
Instituto de Estudios Avanzados de la Universidad Hebrea de Jerusalén
Jerusalén, Israel. Julio 21-25, 2013

X. Referencias

- Abbott, N.J. 2004. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int.* 45:545-552.
- Abbott, N.J., A.A. Patabendige, D.E. Dolman, S.R. Yusof, and D.J. Begley. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37:13-25.
- Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7:41-53.
- Aboody, K.S., A. Brown, N.G. Rainov, K.A. Bower, S. Liu, W. Yang, J.E. Small, U. Herrlinger, V. Ourednik, P.M. Black, X.O. Breakefield, and E.Y. Snyder. 2000. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:12846-12851.
- Adamson, C., O.O. Kanu, A.I. Mehta, C. Di, N. Lin, A.K. Mattox, and D.D. Bigner. 2009. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs.* 18:1061-1083.
- Aghajanian, A., E.S. Wittchen, M.J. Allingham, T.A. Garrett, and K. Burridge. 2008. Endothelial cell junctions and the regulation of vascular permeability and leukocyte transmigration. *J Thromb Haemost.* 6:1453-1460.
- Agnihotri, S., K.E. Burrell, A. Wolf, S. Jalali, C. Hawkins, J.T. Rutka, and G. Zadeh. 2013. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 61:25-41.
- Altanerova, V., M. Cihova, M. Babic, B. Rychly, K. Ondicova, B. Mravec, and C. Altaner. 2012. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing yeast cytosinedeaminase::uracil phosphoribosyltransferase inhibit intracerebral rat glioblastoma. *Int J Cancer.* 130:2455-2463.
- Altman, J., and G.D. Das. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 124:319-335.
- Alvarez-Buylla, A., and D.A. Lim. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 41:683-686.
- Amasheh, S., S. Dullat, M. Fromm, J.D. Schulzke, H.J. Buhr, and A.J. Kroesen. 2009. Inflamed pouch mucosa possesses altered tight junctions indicating recurrence of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis.* 24:1149-1156.
- Angelow, S., R. Ahlstrom, and A.S. Yu. 2008. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295:F867-876.
- Barber, A.J., and E. Lieth. 1997. Agrin accumulates in the brain microvascular basal lamina during development of the blood-brain barrier. *Dev Dyn.* 208:62-74.
- Barzon, L., M. Zanusso, F. Colombo, and G. Palu. 2006. Clinical trials of gene therapy, virotherapy, and immunotherapy for malignant gliomas. *Cancer Gene Ther.* 13:539-554.
- Bearer, E.L., and L. Orci. 1985. Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study. *J Cell Biol.* 100:418-428.
- Bechmann, I., J. Priller, A. Kovac, M. Bontert, T. Wehner, F.F. Klett, J. Bohsung, M. Stuschke, U. Dirnagl, and R. Nitsch. 2001. Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci.* 14:1651-1658.
- Benda, P., J. Lightbody, G. Sato, L. Levine, and W. Sweet. 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science.* 161:370-371.
- Benedetti, S., B. Pirola, B. Pollo, L. Magrassi, M.G. Bruzzone, D. Rigamonti, R. Galli, S. Selleri, F. Di Meco, C. De Fraja, A. Vescovi, E. Cattaneo, and G. Finocchiaro. 2000. Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med.* 6:447-450.

- Bexell, D., A. Svensson, and J. Bengzon. 2013. Stem cell-based therapy for malignant glioma. *Cancer Treat Rev.* 39:358-365.
- Birbilis, T.A., G.K. Matis, S.G. Eleftheriadis, E.N. Theodoropoulou, and E. Sivridis. 2010. Spinal metastasis of glioblastoma multiforme: an uncommon suspect? *Spine (Phila Pa 1976).* 35:E264-269.
- Bjerkvig, R., T.A. Read, P. Vajkoczy, P. Aebischer, W. Pralong, S. Platt, J.E. Melvik, A. Hagen, and M. Dornish. 2003. Cell therapy using encapsulated cells producing endostatin. *Acta Neurochir Suppl.* 88:137-141.
- Booher, J., and M. Sensenbrenner. 1972. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology.* 2:97-105.
- Bowman, P.D., S.R. Ennis, K.E. Rarey, A.L. Betz, and G.W. Goldstein. 1983. Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol.* 14:396-402.
- Brazel, C.Y., and M.S. Rao. 2004. Aging and neuronal replacement. *Ageing Res Rev.* 3:465-483.
- Brightman, M.W., and T.S. Reese. 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.* 40:648-677.
- Brown, J., S.J. Reading, S. Jones, C.J. Fitchett, J. Howl, A. Martin, C.L. Longland, F. Michelangeli, Y.E. Dubrova, and C.A. Brown. 2000. Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: a comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell line T24/83. *Lab Invest.* 80:37-45.
- Burns, A.R., R.A. Bowden, S.D. MacDonell, D.C. Walker, T.O. Odebunmi, E.M. Donnachie, S.I. Simon, M.L. Entman, and C.W. Smith. 2000. Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci.* 113 (Pt 1):45-57.
- Butt, A.M., H.C. Jones, and N.J. Abbott. 1990. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol.* 429:47-62.
- Carman, C.V. 2009. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *J Cell Sci.* 122:3025-3035.
- Cereijido, M., J. Valdes, L. Shoshani, and R.G. Contreras. 1998. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol.* 60:161-177.
- Charoenphandhu, N., L.I. Nakkrasae, K. Kraidith, J. Teerapornpantakit, K. Thongchote, N. Thongon, and N. Krishnamra. 2009. Two-step stimulation of intestinal Ca(2+) absorption during lactation by long-term prolactin exposure and suckling-induced prolactin surge. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297:E609-619.
- Chiocca, E.A., M. Aghi, and G. Fulci. 2003. Viral therapy for glioblastoma. *Cancer J.* 9:167-179.
- Chirasani, S.R., A. Sternjak, P. Wend, S. Momma, B. Campos, I.M. Herrmann, D. Graf, T. Mitsiadis, C. Herold-Mende, D. Besser, M. Synowitz, H. Kettenmann, and R. Glass. 2010. Bone morphogenetic protein-7 release from endogenous neural precursor cells suppresses the tumorigenicity of stem-like glioblastoma cells. *Brain.* 133:1961-1972.
- Christie, K.J., and A.M. Turnley. 2012. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain. *Front Cell Neurosci.* 6:70.
- Cinamon, G., V. Shinder, and R. Alon. 2001. Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines. *Nat Immunol.* 2:515-522.
- Corsten, M.F., R. Miranda, R. Kasmieh, A.M. Krichevsky, R. Weissleder, and K. Shah. 2007. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res.* 67:8994-9000.
- Cserr, H.F., and M. Bundgaard. 1984. Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Am J Physiol.* 246:R277-288.

- Cucullo, L., P.O. Couraud, B. Weksler, I.A. Romero, M. Hossain, E. Rapp, and D. Janigro. 2008. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28:312-328.
- Cummings, B.J., N. Uchida, S.J. Tamaki, D.L. Salazar, M. Hooshmand, R. Summers, F.H. Gage, and A.J. Anderson. 2005. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:14069-14074.
- D. Amat, J.B., M.A. Medina, A.R. Quesada and M. Marí-Beffa. 2012. Stem Cell Therapies. *In Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics.* P.L.V. Pereira, editor. InTech.
- Davoust, N., C. Vauillat, G. Androdias, and S. Nataf. 2008. From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol.* 29:227-234.
- De Palma, M., R. Mazziere, L.S. Politi, F. Pucci, E. Zonari, G. Sitia, S. Mazzoleni, D. Moi, M.A. Venneri, S. Indraccolo, A. Falini, L.G. Guidotti, R. Galli, and L. Naldini. 2008. Tumor-targeted interferon-alpha delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Cell.* 14:299-311.
- DeBault, L.E., and P.A. Cancilla. 1980. gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science.* 207:653-655.
- DeBault, L.E., E. Henriquez, M.N. Hart, and P.A. Cancilla. 1981. Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: II. Establishment, identification, and preliminary characterization of an endothelial cell line. *In Vitro.* 17:480-494.
- DeBault, L.E., L.E. Kahn, S.P. Frommes, and P.A. Cancilla. 1979. Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: isolation and preliminary characterization. *In Vitro.* 15:473-487.
- Deli, M.A., C.S. Abraham, Y. Kataoka, and M. Niwa. 2005. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 25:59-127.
- Deli, M.A., C.S. Abraham, M. Niwa, and A. Falus. 2003. N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine increases the permeability of primary mouse cerebral endothelial cell monolayers. *Inflamm Res.* 52 Suppl 1:S39-40.
- Doetsch, F. 2003. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 13:543-550.
- Donato, R., E.A. Miljan, S.J. Hines, S. Aouabdi, K. Pollock, S. Patel, F.A. Edwards, and J.D. Sinden. 2007. Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neurosci.* 8:36.
- Einstein, O., D. Karussis, N. Grigoriadis, R. Mizrachi-Kol, E. Reinhartz, O. Abramsky, and T. Ben-Hur. 2003. Intraventricular transplantation of neural precursor cell spheres attenuates acute experimental allergic encephalomyelitis. *Mol Cell Neurosci.* 24:1074-1082.
- Fazakas, C., I. Wilhelm, P. Nagyoszi, A.E. Farkas, J. Hasko, J. Molnar, H. Bauer, H.C. Bauer, F. Ayaydin, N.T. Dung, L. Siklos, and I.A. Krizbai. 2011. Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One.* 6:e20758.
- Folkman, J., and P.A. D'Amore. 1996. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell.* 87:1153-1155.
- Forster, C., J. Waschke, M. Burek, J. Leers, and D. Drenckhahn. 2006. Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific. *J Physiol.* 573:413-425.
- Furuse, M., K. Furuse, H. Sasaki, and S. Tsukita. 2001. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol.* 153:263-272.
- Gage, F.H. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science.* 287:1433-1438.
- Glezer, I., A.R. Simard, and S. Rivest. 2007. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience.* 147:867-883.

- Goldman, S.A. 2004. Directed mobilization of endogenous neural progenitor cells: the intersection of stem cell biology and gene therapy. *Curr Opin Mol Ther.* 6:466-472.
- Gonzalez-Mariscal, L., E. Garay, and M. Quiros. 2011. Identification of claudins by western blot and immunofluorescence in different cell lines and tissues. *Methods Mol Biol.* 762:213-231.
- Gonzalez-Mariscal L., Q.M., Díaz-Coránguez M. and Bautista P. 2012. Tight Junctions. *In Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology.* P.S. Najman, editor. InTech.
- Goren, A., N. Dahan, E. Goren, L. Baruch, and M. Machluf. 2010. Encapsulated human mesenchymal stem cells: a unique hypoimmunogenic platform for long-term cellular therapy. *FASEB J.* 24:22-31.
- Gritti, A., E.A. Parati, L. Cova, P. Frolichsthal, R. Galli, E. Wanke, L. Faravelli, D.J. Morassutti, F. Roisen, D.D. Nickel, and A.L. Vescovi. 1996. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci.* 16:1091-1100.
- Haorah, J., S.H. Ramirez, K. Schall, D. Smith, R. Pandya, and Y. Persidsky. 2007. Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem.* 101:566-576.
- Hayashi, K., S. Nakao, R. Nakaoke, S. Nakagawa, N. Kitagawa, and M. Niwa. 2004. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept.* 123:77-83.
- Hellstrom, M., H. Gerhardt, M. Kalen, X. Li, U. Eriksson, H. Wolburg, and C. Betsholtz. 2001. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* 153:543-553.
- Herrlinger, U., C. Woiciechowski, M. Sena-Esteves, K.S. Aboody, A.H. Jacobs, N.G. Rainov, E.Y. Snyder, and X.O. Breakefield. 2000. Neural precursor cells for delivery of replication-conditional HSV-1 vectors to intracerebral gliomas. *Mol Ther.* 1:347-357.
- Hess, D.C., T. Abe, W.D. Hill, A.M. Studdard, J. Carothers, M. Masuya, P.A. Fleming, C.J. Drake, and M. Ogawa. 2004a. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol.* 186:134-144.
- Hess, K.R., K.R. Broglio, and M.L. Bondy. 2004b. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000. *Cancer.* 101:2293-2299.
- Hofstetter, C.P., N.A. Holmstrom, J.A. Lilja, P. Schweinhardt, J. Hao, C. Spenger, Z. Wiesenfeld-Hallin, S.N. Kurpad, J. Frisen, and L. Olson. 2005. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci.* 8:346-353.
- Holly, E.A., P.M. Bracci, B.A. Mueller, and S. Preston-Martin. 1998. Farm and animal exposures and pediatric brain tumors: results from the United States West Coast Childhood Brain Tumor Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7:797-802.
- Hu, J.G., X.F. Wang, J.S. Zhou, F.C. Wang, X.W. Li, and H.Z. Lu. 2010. Activation of PKC-alpha is required for migration of C6 glioma cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 70:239-245.
- Hurst, R.D., and I.B. Fritz. 1996. Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Physiol.* 167:81-88.
- Hutamekalin, P., A.E. Farkas, A. Orbok, I. Wilhelm, P. Nagyoszi, S. Veszeka, M.A. Deli, K. Buzas, E. Hunyadi-Gulyas, K.F. Medzihradzky, D. Meksuriyen, and I.A. Krizbai. 2008. Effect of nicotine and polyaromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. *Cell Biol Int.* 32:198-209.
- Ito, S., A. Natsume, S. Shimato, M. Ohno, T. Kato, P. Chansakul, T. Wakabayashi, and S.U. Kim. 2010. Human neural stem cells transduced with IFN-beta and cytosine deaminase genes intensify bystander effect in experimental glioma. *Cancer Gene Ther.* 17:299-306.

- Janzer, R.C., and M.C. Raff. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*. 325:253-257.
- Jeffrey, P., and S. Summerfield. 2010. Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery. *Neurobiol Dis*. 37:33-37.
- Joo, F., and I. Karnushina. 1973. A procedure for the isolation of capillaries from rat brain. *Cytobios*. 8:41-48.
- Jovov, B., C.M. Van Itallie, N.J. Shaheen, J.L. Carson, T.M. Gambling, J.M. Anderson, and R.C. Orlando. 2007. Claudin-18: a dominant tight junction protein in Barrett's esophagus and likely contributor to its acid resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 293:G1106-1113.
- Kacem, K., P. Lacombe, J. Seylaz, and G. Bonvento. 1998. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*. 23:1-10.
- Kanu, O.O., B. Hughes, C. Di, N. Lin, J. Fu, D.D. Bigner, H. Yan, and C. Adamson. 2009. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol*. 3:39-52.
- Kelly, K.A., J.M. Kirkwood, and D.S. Kapp. 1984. Glioblastoma multiforme: pathology, natural history and treatment. *Cancer Treat Rev*. 11:1-26.
- Kelly, S., T.M. Bliss, A.K. Shah, G.H. Sun, M. Ma, W.C. Foo, J. Masel, M.A. Yenari, I.L. Weissman, N. Uchida, T. Palmer, and G.K. Steinberg. 2004. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:11839-11844.
- Kim, S.M., J.Y. Lim, S.I. Park, C.H. Jeong, J.H. Oh, M. Jeong, W. Oh, S.H. Park, Y.C. Sung, and S.S. Jeun. 2008. Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma. *Cancer Res*. 68:9614-9623.
- Kim, S.U., H.J. Lee, and Y.B. Kim. 2013. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology*.
- Kim, S.U., E. Nakagawa, K. Hatori, A. Nagai, M.A. Lee, and J.H. Bang. 2002. Production of immortalized human neural crest stem cells. *Methods Mol Biol*. 198:55-65.
- Kirk, J., J. Plumb, M. Mirakhur, and S. McQuaid. 2003. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol*. 201:319-327.
- Landis, D.M., and T.S. Reese. 1989. Substructure in the assemblies of intramembrane particles in astrocytic membranes. *J Neurocytol*. 18:819-831.
- Lara, E., J.Q. Beltran, J. Segovia, and R. Gutierrez. 2012. Granule cells born in the adult rat hippocampus can regulate the expression of GABAergic markers. *Experimental neurology*. 237:134-141.
- Laterra, J., C. Guerin, and G.W. Goldstein. 1990. Astrocytes induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structures in vitro. *J Cell Physiol*. 144:204-215.
- Lechuga, S., L. Alarcon, J. Solano, M. Huerta, E. Lopez-Bayghen, and L. Gonzalez-Mariscal. 2010. Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2. *Experimental cell research*. 316:3124-3139.
- Lee, D.H., Y. Ahn, S.U. Kim, K.C. Wang, B.K. Cho, J.H. Phi, I.H. Park, P.M. Black, R.S. Carroll, J. Lee, and S.K. Kim. 2009. Targeting rat brainstem glioma using human neural stem cells and human mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res*. 15:4925-4934.
- Lee, E.X., D.H. Lam, C. Wu, J. Yang, C.K. Tham, W.H. Ng, and S. Wang. 2011. Glioma gene therapy using induced pluripotent stem cell derived neural stem cells. *Mol Pharm*. 8:1515-1524.
- Ley, K., C. Laudanna, M.I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 7:678-689.
- Liddelov, S.A. 2011. Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint. *Fluids Barriers CNS*. 8:2.

- Liebner, S., A. Fischmann, G. Rascher, F. Duffner, E.H. Grote, H. Kalbacher, and H. Wolburg. 2000. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 100:323-331.
- Lim, S.H., S.A. Choi, J.Y. Lee, K.C. Wang, J.H. Phi, D.H. Lee, S.H. Song, J.H. Song, X. Jin, H. Kim, H.J. Lee, I. Lim, S.U. Kim, and S.K. Kim. 2011. Therapeutic targeting of subdural medulloblastomas using human neural stem cells expressing carboxylesterase. *Cancer Gene Ther.* 18:817-824.
- Liu, Y., A. Nusrat, F.J. Schnell, T.A. Reaves, S. Walsh, M. Pochet, and C.A. Parkos. 2000. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci.* 113 (Pt 13):2363-2374.
- Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer, and P. Kleihues. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114:97-109.
- Madara, J.L., and K. Dharmasathaphorn. 1985. Occluding junction structure-function relationships in a cultured epithelial monolayer. *J Cell Biol.* 101:2124-2133.
- Magnavita, N., R.A. Placentino, D. Mei, D. Ferraro, and G. Di Trapani. 2003. Occupational head injury and subsequent glioma. *Neurol Sci.* 24:31-33.
- Matsushita, T., T. Kibayashi, T. Katayama, Y. Yamashita, S. Suzuki, J. Kawamata, O. Honmou, M. Minami, and S. Shimohama. 2011. Mesenchymal stem cells transmigrate across brain microvascular endothelial cell monolayers through transiently formed inter-endothelial gaps. *Neurosci Lett.* 502:41-45.
- Matter, K., and M.S. Balda. 1999. Occludin and the functions of tight junctions. *Int Rev Cytol.* 186:117-146.
- McBride, J.L., S.P. Behrstock, E.Y. Chen, R.J. Jakel, I. Siegel, C.N. Svendsen, and J.H. Kordower. 2004. Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. *J Comp Neurol.* 475:211-219.
- Megard, I., A. Garrigues, S. Orlowski, S. Jorajuria, P. Clayette, E. Ezan, and A. Mabondzo. 2002. A co-culture-based model of human blood-brain barrier: application to active transport of indinavir and in vivo-in vitro correlation. *Brain Res.* 927:153-167.
- Morita, K., H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita. 1999. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol.* 147:185-194.
- Morodomi, T., Y. Ogata, Y. Sasaguri, M. Morimatsu, and H. Nagase. 1992. Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma cells. *The Biochemical journal.* 285 (Pt 2):603-611.
- Morshead, C.M., B.A. Reynolds, C.G. Craig, M.W. McBurney, W.A. Staines, D. Morassutti, S. Weiss, and D. van der Kooy. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron.* 13:1071-1082.
- Muller, F.J., E.Y. Snyder, and J.F. Loring. 2006. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci.* 7:75-84.
- Nagy, Z., H. Peters, and I. Huttner. 1984. Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. *Lab Invest.* 50:313-322.
- Nakagawa, S., M.A. Deli, H. Kawaguchi, T. Shimizudani, T. Shimono, A. Kittel, K. Tanaka, and M. Niwa. 2009. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 54:253-263.
- Nazer, B., S. Hong, and D.J. Selkoe. 2008. LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid-beta peptide in a blood-brain barrier in vitro model. *Neurobiol Dis.* 30:94-102.

- Nico, B., G. Paola Nicchia, A. Frigeri, P. Corsi, D. Mangieri, D. Ribatti, M. Svelto, and L. Roncali. 2004. Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience*. 125:921-935.
- Nishioku, T., A. Yamauchi, F. Takata, T. Watanabe, K. Furusho, H. Shuto, S. Dohgu, and Y. Kataoka. 2010. Disruption of the blood-brain barrier in collagen-induced arthritic mice. *Neurosci Lett*. 482:208-211.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*. 161:653-660.
- Noyan, F., I.A. Diez, M. Hapke, C. Klein, and R.A. Dewey. 2012. Induced transgene expression for the treatment of solid tumors by hematopoietic stem cell-based gene therapy. *Cancer Gene Ther*. 19:352-357.
- Ohtsuki, S., H. Yamaguchi, Y. Katsukura, T. Asashima, and T. Terasaki. 2008. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem*. 104:147-154.
- Palmer, T.D., J. Ray, and F.H. Gage. 1995. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*. 6:474-486.
- Palmer, T.D., J. Takahashi, and F.H. Gage. 1997. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 8:389-404.
- Panula, P., F. Joo, and L. Rechardt. 1978. Evidence for the presence of viable endothelial cells in cultures derived from dissociated rat brain. *Experientia*. 34:95-97.
- Pekny, M., K.A. Stanness, C. Eliasson, C. Betsholtz, and D. Janigro. 1998. Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia*. 22:390-400.
- Phillipson, M., J. Kaur, P. Colarusso, C.M. Ballantyne, and P. Kubes. 2008. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS One*. 3:e1649.
- Pluchino, S., A. Quattrini, E. Brambilla, A. Gritti, G. Salani, G. Dina, R. Galli, U. Del Carro, S. Amadio, A. Bergami, R. Furlan, G. Comi, A.L. Vescovi, and G. Martino. 2003. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature*. 422:688-694.
- Prat, A., K. Biernacki, K. Wosik, and J.P. Antel. 2001. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia*. 36:145-155.
- Rainov, N.G., and H. Ren. 2003. Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy--what have we learned? *J Neurooncol*. 65:227-236.
- Raub, T.J. 1996. Signal transduction and glial cell modulation of cultured brain microvessel endothelial cell tight junctions. *Am J Physiol*. 271:C495-503.
- Reardon, D.A., J.N. Rich, H.S. Friedman, and D.D. Bigner. 2006. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. *J Clin Oncol*. 24:1253-1265.
- Reese, T.S., and M.J. Karnovsky. 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*. 34:207-217.
- Reynolds, B.A., W. Tetzlaff, and S. Weiss. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*. 12:4565-4574.
- Richardson, R.M., W.C. Broaddus, K.L. Holloway, and H.L. Fillmore. 2005. Grafts of adult subependymal zone neuronal progenitor cells rescue hemiparkinsonian behavioral decline. *Brain Res*. 1032:11-22.
- Rubin, L.L., K. Barbu, F. Bard, C. Cannon, D.E. Hall, H. Horner, M. Janatpour, C. Liaw, K. Manning, J. Morales, and et al. 1991a. Differentiation of brain endothelial cells in cell culture. *Ann N Y Acad Sci*. 633:420-425.

- Rubin, L.L., D.E. Hall, S. Porter, K. Barbu, C. Cannon, H.C. Horner, M. Janatpour, C.W. Liaw, K. Manning, J. Morales, and et al. 1991b. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* 115:1725-1735.
- Ryu, C.H., S.H. Park, S.A. Park, S.M. Kim, J.Y. Lim, C.H. Jeong, W.S. Yoon, W.I. Oh, Y.C. Sung, and S.S. Jeun. 2011. Gene therapy of intracranial glioma using interleukin 12-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther.* 22:733-743.
- Salvati, M., A. Frati, N. Russo, E. Caroli, F.M. Polli, G. Minniti, and R. Delfini. 2003. Radiation-induced gliomas: report of 10 cases and review of the literature. *Surg Neurol.* 60:60-67; discussion 67.
- Scholz, M., J. Cinatl, M. Schadel-Hopfner, and J. Windolf. 2007. Neutrophils and the blood-brain barrier dysfunction after trauma. *Med Res Rev.* 27:401-416.
- Schwartzbaum, J.A., J.L. Fisher, K.D. Aldape, and M. Wrensch. 2006. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol.* 2:494-503; quiz 491 p following 516.
- Simionescu, M., N. Simionescu, and G.E. Palade. 1976. Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J Cell Biol.* 68:705-723.
- Smith, B.E., and R.E. Braun. 2012. Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science.* 338:798-802.
- Smith, M., Y. Omid, and M. Gumbleton. 2007. Primary porcine brain microvascular endothelial cells: biochemical and functional characterisation as a model for drug transport and targeting. *J Drug Target.* 15:253-268.
- Snyder, E.Y., D.L. Deitcher, C. Walsh, S. Arnold-Aldea, E.A. Hartweg, and C.L. Cepko. 1992. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell.* 68:33-51.
- Stock, K., J. Kumar, M. Synowitz, S. Petrosino, R. Imperatore, E.S. Smith, P. Wend, B. Purfurst, U.A. Nuber, U. Gurok, V. Matyash, J.H. Walzlein, S.R. Chirasani, G. Dittmar, B.F. Cravatt, S. Momma, G.R. Lewin, A. Ligresti, L. De Petrocellis, L. Cristino, V. Di Marzo, H. Kettenmann, and R. Glass. 2012. Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1. *Nat Med.*
- Stupp, R., M.E. Hegi, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M.J. Taphoorn, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A.A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C.J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J.G. Cairncross, and R.O. Mirimanoff. 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10:459-466.
- Synowitz, M., J. Kiwit, H. Kettenmann, and R. Glass. 2006. Tumor Young Investigator Award: tropism and antitumorigenic effect of endogenous neural precursors for gliomas. *Clin Neurosurg.* 53:336-344.
- Tabatabai, G., W. Wick, and M. Weller. 2011. Stem cell-mediated gene therapies for malignant gliomas: a promising targeted therapeutic approach? *Discov Med.* 11:529-536.
- Tada, Y., K. Yagi, K.T. Kitazato, T. Tamura, T. Kinouchi, K. Shimada, N. Matsushita, N. Nakajima, J. Satomi, T. Kageji, and S. Nagahiro. 2010. Reduction of endothelial tight junction proteins is related to cerebral aneurysm formation in rats. *J Hypertens.* 28:1883-1891.
- Tang, C., H. Xue, C. Bai, R. Fu, and A. Wu. 2010. The effects of Tanshinone IIA on blood-brain barrier and brain edema after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Phytomedicine.* 17:1145-1149.
- Tao-Cheng, J.H., Z. Nagy, and M.W. Brightman. 1987. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci.* 7:3293-3299.
- Temple, S. 2001. The development of neural stem cells. *Nature.* 414:112-117.

- Thomson, J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282:1145-1147.
- Tontsch, U., and H.C. Bauer. 1989. Isolation, characterization, and long-term cultivation of porcine and murine cerebral capillary endothelial cells. *Microvasc Res*. 37:148-161.
- Tontsch, U., and H.C. Bauer. 1991. Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res*. 539:247-253.
- Tyler, M.A., I.V. Ulasov, A.M. Sonabend, S. Nandi, Y. Han, S. Marler, J. Roth, and M.S. Lesniak. 2009. Neural stem cells target intracranial glioma to deliver an oncolytic adenovirus in vivo. *Gene Ther*. 16:262-278.
- van Eekelen, M., L.S. Sasportas, R. Kasmieh, S. Yip, J.L. Figueiredo, D.N. Louis, R. Weissleder, and K. Shah. 2010. Human stem cells expressing novel TSP-1 variant have anti-angiogenic effect on brain tumors. *Oncogene*. 29:3185-3195.
- Varma, N.R., B. Janic, A.S. Iskander, A. Shankar, M.P. Bhuiyan, H. Soltanian-Zadeh, Q. Jiang, K. Barton, M.M. Ali, and A.S. Arbab. 2012. Endothelial progenitor cells (EPCs) as gene carrier system for rat model of human glioma. *PLoS One*. 7:e30310.
- Vestweber, D. 2007. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation through endothelial cell contacts. *Ernst Schering Found Symp Proc*:151-167.
- Villegas, J.C., and R.D. Broadwell. 1993. Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. II. Adsorptive transcytosis of WGA-HRP and the blood-brain and brain-blood barriers. *J Neurocytol*. 22:67-80.
- Walzlein, J.H., M. Synowitz, B. Engels, D.S. Markovic, K. Gabrusiewicz, E. Nikolaev, K. Yoshikawa, B. Kaminska, G. Kempermann, W. Uckert, L. Kaczmarek, H. Kettenmann, and R. Glass. 2008. The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age. *Stem Cells*. 26:2945-2954.
- Wang, C., A. Natsume, H.J. Lee, K. Motomura, Y. Nishimira, M. Ohno, M. Ito, S. Kinjo, H. Momota, K. Iwami, F. Ohka, T. Wakabayashi, and S.U. Kim. 2012. Neural stem cell-based dual suicide gene delivery for metastatic brain tumors. *Cancer Gene Ther*. 19:796-801.
- Wang, C.Q., and C.Y. Cheng. 2007. A seamless trespass: germ cell migration across the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *J Cell Biol*. 178:549-556.
- Wang, Q., J.D. Rager, K. Weinstein, P.S. Kardos, G.L. Dobson, J. Li, and I.J. Hidalgo. 2005. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int J Pharm*. 288:349-359.
- Warth, A., S. Kroger, and H. Wolburg. 2004. Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol*. 107:311-318.
- Wei, J., J. Wahl, T. Nakamura, D. Stiller, T. Mertens, K.M. Debatin, and C. Beltinger. 2007. Targeted release of oncolytic measles virus by blood outgrowth endothelial cells in situ inhibits orthotopic gliomas. *Gene Ther*. 14:1573-1586.
- Weissleder, R., and V. Ntziachristos. 2003. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med*. 9:123-128.
- Wilhelm, I., C. Fazakas, and I.A. Krizbai. 2011. In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol Exp (Wars)*. 71:113-128.
- Wolburg, H., J. Neuhaus, U. Kniessel, B. Krauss, E.M. Schmid, M. Ocalan, C. Farrell, and W. Risau. 1994. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci*. 107 (Pt 5):1347-1357.
- Wolburg, H., S. Noell, A. Mack, K. Wolburg-Buchholz, and P. Fallier-Becker. 2009. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res*. 335:75-96.

- Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz, J. Kraus, G. Rascher-Eggstein, S. Liebner, S. Hamm, F. Duffner, E.H. Grote, W. Risau, and B. Engelhardt. 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 105:586-592.
- Yang, Y., J.W. Hill, and G.A. Rosenberg. 2011. Multiple roles of metalloproteinases in neurological disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 99:241-263.
- Zhao, Y., D.H. Lam, J. Yang, J. Lin, C.K. Tham, W.H. Ng, and S. Wang. 2012. Targeted suicide gene therapy for glioma using human embryonic stem cell-derived neural stem cells genetically modified by baculoviral vectors. *Gene Ther.* 19:189-200.
- Zozulya, A., C. Weidenfeller, and H.J. Galla. 2008. Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res.* 1189:1-11.
- Zozulya, A.L., E. Reinke, D.C. Baiu, J. Karman, M. Sandor, and Z. Fabry. 2007. Dendritic cell transmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1alpha chemokine and matrix metalloproteinases. *J Immunol.* 178:520-529.
- Zysk, G., B.K. Schneider-Wald, J.H. Hwang, L. Bejo, K.S. Kim, T.J. Mitchell, R. Hakenbeck, and H.P. Heinz. 2001. Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 69:845-852.