

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Los movimientos intracelulares de calcio espontáneos generados por las células endoteliales meníngeas son influenciados por las células cerebrales



TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

1942

Presenta

**Miguel Angel Valencia Nuñez**

Hermosillo, Sonora

Marzo de 2023

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Miguel Angel Valencia Nuñez**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



---

**Dr. Marcelino Montiel Herrera**  
Director Académico



---

**Dr. Alonso Alexis López Zavala**  
Codirector / Secretario



---

**Dr. Humberto Francisco Astiazarán García**  
Sinodal



---

**Dr. Amir Darío Maldonado Arce**  
Sinodal

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Sonora por abrirme sus puertas y permitirme desarrollarme en una nueva área del conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico recibido para realizar mis estudios de posgrado.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Hugo y Norma por su apoyo incondicional. Son la fuerza que me motiva a seguir luchando en mis proyectos de vida.

A mis hermanos Lina y Sebastian, que me inspiran a lograr las metas por más complejas que sean.

A mis tutores de la maestría, que me brindaron parte de su conocimiento y experiencia para poder cumplir este logro.

A mis compañeros de laboratorio y maestría por compartir sus ideas y permitirme crecer junto con ellos.

Al Dr. Montiel por ayudarme a obtener las competencias necesarias para terminar este proyecto de tesis. Sus enseñanzas me hicieron crecer como científico y como persona.

## ÍNDICE

LISTA DE TABLAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
OBJETIVOS.....	viii
General.....	viii
Específicos .....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
Células Endoteliales Meníngeas .....	3
Unión Neurovascular .....	4
Modelos Experimentales de CEM .....	7
Movimientos Intracelulares de Ca <sup>2+</sup> .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
Animales.....	10
Soluciones y Reactivos.....	10
Cultivos Primarios Celulares.....	10
Ensayos de Inmunocitoquímica.....	11
Movimientos Intracelulares de Ca <sup>2+</sup> .....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
Cultivos Primarios Celulares.....	14
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Espontáneos en CEM.....	17
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Espontáneos en CP de Astrocitos y CEM .....	22
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Espontáneos en CP de BO.....	23
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> Espontáneos en CP de BO y CEM.....	26
CONCLUSIONES .....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Características de los $[Ca^{2+}]_i$ espontáneos en CP de CEM en condiciones fisiológicas, 10 $\mu$ M CPA y 50 $\mu$ M 2-APB.....	19
<b>Tabla II.</b> Características de $[Ca^{2+}]_i$ espontáneos en CP de astrocito y CEM ....	25
<b>Tabla III.</b> Características de $[Ca^{2+}]_i$ espontáneos en CP de BO y CEM. ....	28

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo de la unión neurovascular. ....	5
<b>Figura 2.</b> Principales sistemas de transporte de las CEM.....	6
<b>Figura 3.</b> CP de CEM de ratas Wistar P <sub>0</sub> -P <sub>21</sub> con tinción azul de Evans.....	15
<b>Figura 4.</b> CP de cuerpo calloso. ....	15
<b>Figura 5.</b> CP de astrocitos y CEM .....	16
<b>Figura 6.</b> CP de BO y CEM cargados con Fluo-4.....	16
<b>Figura 7.</b> [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> espontáneos en CP de CEM en ratas Wistar (P <sub>0</sub> -P <sub>21</sub> ) .....	18
<b>Figura 8.</b> Trazo representativo de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> espontáneos en CP de astrocitos y CEM.....	24
<b>Figura 9.</b> Trazo representativo de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> espontáneos en CP de BO y CEM..	27
<b>Figura 10.</b> Esquema representativo de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> espontáneos en cultivos primarios. ....	29



## **OBJETIVOS**

### **General**

Caracterizar los movimientos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneos generados por las células endoteliales meníngeas en un modelo murino *in vitro*.

### **Específicos**

1. Caracterizar las propiedades cinéticas de los movimientos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneos en cultivos primarios de células endoteliales meníngeas.
2. Evaluar la cinética de los movimientos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneos en células endoteliales meníngeas en un microambiente con astrocitos del cuerpo calloso y células cerebrales del bulbo olfatorio.
3. Determinar la vía de señalización intracelular responsable de generar los movimientos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneos generados en cultivos primarios de células endoteliales meníngeas con astrocitos del cuerpo calloso y células cerebrales de bulbo olfatorio.

## RESUMEN

Algunas células endoteliales meníngeas (CEM) forman una monocapa en la parte interna de los vasos sanguíneos que irrigan al cerebro. Por su proximidad a las células cerebrales, las CEM se encuentran en constante estímulo por estas células y su función se modula de acuerdo con las necesidades del metabolismo cerebral.

Las CEM modifican sus concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en distintas vías fisiológicas, en particular como respuesta a agonistas que inducen procesos de comunicación celular. Si bien, ciertas vías de respuesta por agonistas están descritas, las CEM generan movimientos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) de forma espontánea. A pesar de que la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  espontánea se observa en varios modelos endoteliales celulares, estos  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos están poco caracterizados y se desconoce su participación fisiológica.

En este trabajo de tesis se investigaron los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos generados en cultivos primarios (CP) de CEM y su modulación por las células cerebrales en un modelo murino *in vitro*. Inicialmente, se registraron los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos en CP de CEM obtenidas de tejido meníngeo de ratas Wistar ( $P_0 - P_{21}$ ), encontrándose que el 13.6 % ( $n = 36/264$ ) de las CEM generó  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos; los CP de astrocitos y CEM aumentaron a 19.7 % ( $n = 37/188$ ) su actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  espontánea; y los CP de bulbo olfatorio y CEM a 27.9 % ( $n = 56/201$ ). Adicionalmente, los estudios farmacológicos con 2-APB y CPA sugirieron la participación de los receptores de  $\text{IP}_3$  y el sistema de  $\text{Ca}^{2+}$ -SERCA en la generación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos. La ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en CP de astrocitos y CEM disminuyó la cantidad de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos (15.4 %,  $n = 37/188$ ), contrario a lo reportado previamente en cultivos de CEM.

Los resultados reportados en este trabajo de investigación sugieren que los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos en CEM son modificados por la presencia de células

cerebrales. Además, que estos  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos están vinculados a la vía de receptores  $IP_3$  y la vía de  $ATPasa-Ca^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico en todos los modelos *in vitro* estudiados. Por último, las alteraciones de las características cinéticas sugieren que los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CEM son un sistema de comunicación endotelio-cerebral.

## INTRODUCCIÓN

El cerebro humano representa el 2 % del peso corporal, consume hasta el 20 % de oxígeno sistémico y el 25 % de la glucosa que ingerimos (Guerra et al., 2018). Para mantener las necesidades energéticas, el cerebro de un adulto cuenta con un sistema de vasos sanguíneos, que de ser estirado tendría una longitud de 640 km (Kisler et al., 2017).

Las células endoteliales meníngeas (CEM) cubren el interior de los vasos sanguíneos y son las encargadas de limitar el paso de moléculas desde la sangre al cerebro. A diferencia de las células endoteliales periféricas, las CEM tienen características únicas de barrera selectiva llamada barrera hematoencefálica (BHE). Asimismo, las CEM expresan receptores y canales en sus membranas, que son responsables de transportar los nutrientes necesarios para el cerebro (Goncharov et al., 2020). Además de su rol como interfaz hemato-cerebral, las CEM liberan factores de diferenciación glial (Mi et al., 2001), expresan receptores de reconocimiento de patrones (Pais & Penha-Gonçalves, 2019) y liberan óxido nítrico al ser estimuladas por histamina (Berra-Romani et al., 2020), por mencionar algunas funciones de las CEM.

Las neuronas y los astrocitos se encuentran en constante intercambio de información química. Debido a esta liberación de moléculas durante la sinapsis neuronal, los receptores de membrana de las CEM les permiten interactuar y modificar su fenotipo dependiendo de las condiciones del microambiente. Las CEM responden a agonistas producidos por los astrocitos y estos últimos son los responsables de regular el fenotipo del endotelio en el cerebro (Urich et al., 2012). Los estímulos generados por estos agonistas se traducen como movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en las CEM.

Los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  son aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, que provienen de reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  o del espacio extracelular (García-Carlos et al., 2021).

Las organismos multicelulares utilizan los incrementos de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero en diversas vías metabólicas como la expresión de genes o por respuesta a estímulos externos (Bazargani & Attwell, 2016). En consecuencia, debido a las moléculas liberadas por los astrocitos, los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en CEM tienen cinéticas relacionadas con el mecanismo celular estimulado (García-Carlos et al., 2021). Más aún, las células cerebrales generan  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de forma espontánea y esta actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  se ha relacionado con la activación de receptores por agonistas en procesos de comunicación celular (Kanemaru et al., 2007).

En modelos *in vitro*, la interacción entre astrocitos y CEM modifica el comportamiento en comparación de cultivos primarios (CP) puros de CEM (Mi et al., 2001; Urich et al., 2012). Enfatizando la importancia del microambiente de las células en sus procesos fisiológicos.

Las células endoteliales periféricas generan  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos que son modulados por células de músculo liso vascular (Kansui et al., 2008). Las CEM expresan la maquinaria molecular para generar y recibir señales químicas, se desconoce si tengan la capacidad de comunicarse mediante  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos con las células cerebrales. Por ende, en este proyecto de investigación se exploró la influencia celular que generan las células cerebrales sobre la actividad del  $\text{Ca}^{2+}$  espontáneo intracelular en las CEM. Hasta ahora, nuestro grupo de investigación identificó patrones  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos y sincrónicos de  $\sim 5$  mHz generados por las CEM. No obstante, se desconoce su rol fisiológico o bien, el impacto que estos  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos tienen en el cerebro.

## **ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

### **Células Endoteliales Meníngicas**

Las CEM conforman la capa interna de los vasos sanguíneos del cerebro y tienen su origen de células mesodérmicas (Douarin et al., 1999). Las CEM son diferentes a las células endoteliales periféricas, por ejemplo, presentan uniones estrechas, una reducción en la cantidad de fenestraciones y pinocitosis limitada (Galla, 2018).

En el cerebro de los mamíferos los vasos sanguíneos se originan de las meninges. Tres capas de tejido que rodean el cerebro llamadas duramadre, aracnoides y piamadre. Los vasos sanguíneos, que inician en la duramadre, atraviesan la aracnoides y perforan la piamadre para suministrar sangre a las células cerebrales (Adeeb et al., 2012).

La BHE se describió a principios del siglo 20, cuando Paul Ehrlich y Edwin Goldman reportaron que soluciones de anilina y el azul de tripano inyectados en animales, marcaban todos los órganos a excepción del cerebro (Ma & Liu, 2019). Por lo anterior, la BHE se definió por el conjunto de características que poseen los vasos sanguíneos del sistema nervioso central, que permiten regular la transferencia de iones, proteínas, moléculas y células del sistema circulatorio hacia la masa encefálica (Daneman & Prat, 2015).

Las CEM están interconectadas por uniones estrechas, que son complejos proteicos estimulados por factores tróficos producidos por los astrocitos (Janzer & Raff, 1987). Las uniones estrechas en la BHE limitan el paso de moléculas de forma paracelular (Abbott et al., 2006) y la alta resistencia eléctrica de la BHE restringe el paso de moléculas por esta vía (Butt et al., 1990). Las uniones estrechas están formadas por claudinas y ocludinas, proteínas transmembranales unidas al citoesqueleto mediante proteínas accesorias como la proteína de unión estrecha-1 (Hawkins & Davis, 2005).

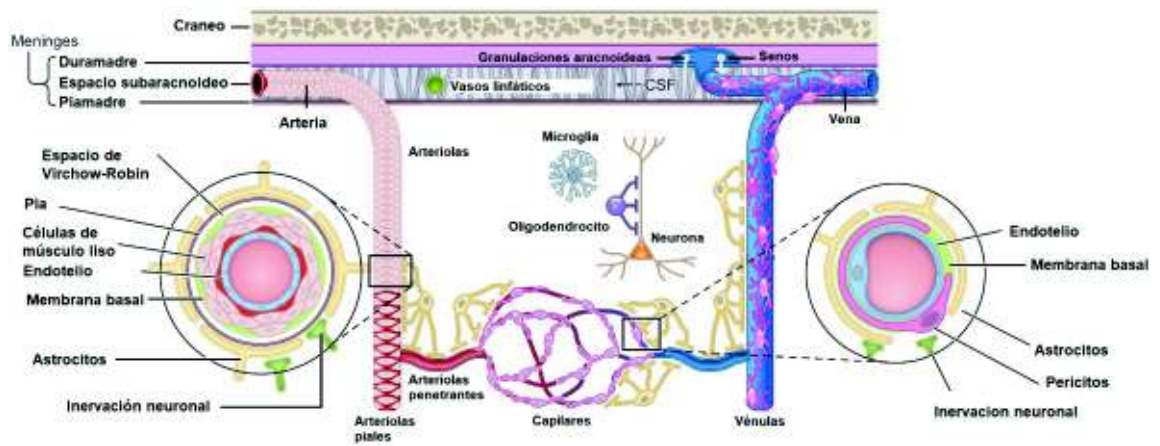
## Unión Neurovascular

La unión neurovascular (Figura 1) se compone de todas las células involucradas en la dinámica de flujo sanguíneo cerebral. Las células en este sistema son las CEM, pericitos, células murales y astrocitos. La comunicación entre estas células permite modular el flujo de sangre dependiendo de la demanda cerebral (Iadecola, 2017).

La BHE necesita de la comunicación con las células cerebrales para mantener sus propiedades (Sweeney et al., 2019). Para esto, las CEM interactúan con los astrocitos mediante componentes estructurales como las uniones comunicantes (Simard et al., 2003). Ambas células tienen vías de comunicación semejantes (ej. metabolitos del ácido araquidónico, adenosina y liberación de  $K^{1+}$ ) que les permiten modular el comportamiento del músculo liso vascular y regular la irrigación sanguínea cerebral (Vanhoutte et al., 2009).

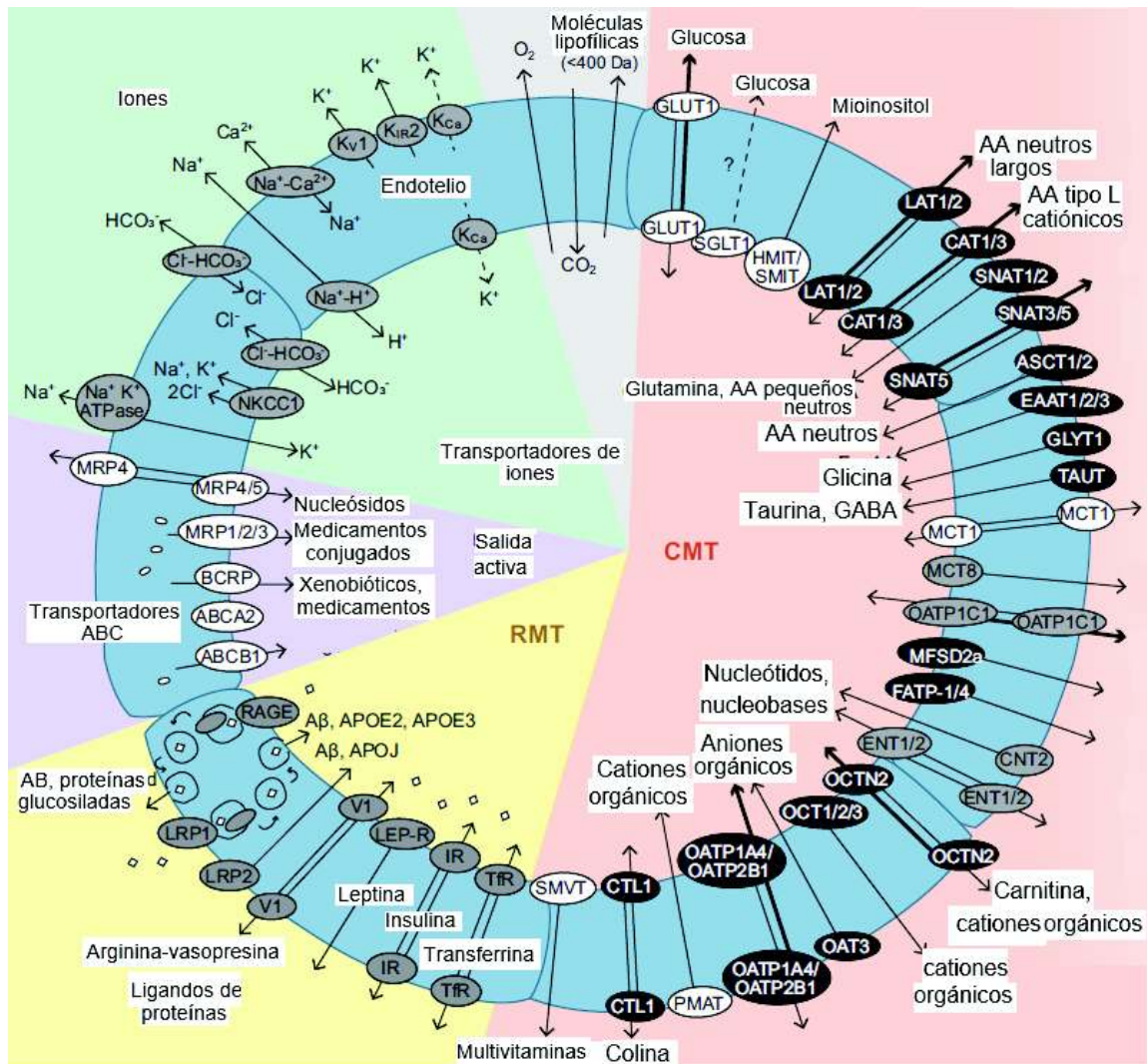
En arterias cerebrales del polígono de Willis, la estimulación causada por el aumento de la presión arterial activa canales de receptor de potencial transitorio que permiten la entrada de  $Ca^{2+}$  al citosol. Este aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  estimula canales de potasio activados por  $Ca^{2+}$  de conductancia pequeña e intermedia. La hiperpolarización mediada por estos canales se extiende al músculo liso vascular mediante uniones comunicantes. Estos cambios generan dilatación de arterias y aumento de flujo sanguíneo en las áreas cerebrales que lo requieran (Filosa & Iddings, 2013). De forma interesante, este proceso solo explica menos del 15 % de la irrigación sanguínea cerebral, debido a que los capilares cerebrales (vasos de  $\sim 5 \mu m$  de diámetro), formados por una monocapa de CEM, representan hasta el 85 % de la red vascular cerebral (Sweeney et al., 2019).

Las CEM expresan transportadores selectivos de moléculas en su membrana (Figura 2), entre estos se encuentran los transportadores de glucosa 1 y aminoácidos tipo L 1 (Abbott et al., 2010).



**Figura 1.** Esquema representativo de la unión neurovascular (Sweeney et al., 2019).





**Figura 2.** Principales sistemas de transporte de las CEM (Sweeney et al., 2019).

También, las CEM cuentan con mecanismos que expulsan xenobióticos y drogas como los transportadores dependientes de ATP ABCC1 y ABCA2 (Bernstein et al., 2014; Warren et al., 2009). A su vez, expresan canales para nucleótidos como los transportadores de aminoácidos catiónicos CAT-1 y CAT-3 (Mann et al., 2003).

La BHE tiene la característica de expresar bajos niveles de moléculas de adhesión leucocitaria, lo que evita la migración de células inmunes al sistema nervioso central (Rössler et al., 1992). Asimismo, las CEM tienen un aumento en su densidad mitocondrial, que es necesario para la integridad de la BHE (Oldendorf et al., 1977).

Por lo antes descrito, las CEM que componen la BHE tienen propiedades que permiten a las células cerebrales obtener los nutrientes necesarios para su metabolismo, protegen de sustancias potencialmente nocivas, expulsa desperdicios al torrente sanguíneo y generan un ambiente aislado que permite a las neuronas mantener su función.

### **Modelos Experimentales de CEM**

Las líneas celulares inmortalizadas de endotelio cerebral y meníngeo se han usado para estudiar la respuesta de agonistas como la acetilcolina (Zuccolo et al., 2019) e histamina (Berra-Romani et al., 2020), para el desarrollo de modelos de BHE en la industria farmacéutica (Helms et al., 2016), entre otras utilidades. Sin embargo, las líneas celulares endoteliales *in vitro*, no generan estructuras tubulares como los vasos sanguíneos, tienen resistencias eléctricas de  $20 \Omega \text{ cm}^2$  a diferencias de los  $1000 \Omega \text{ cm}^2$  registrados en modelos *in vivo* (Eigenmann et al., 2013), su expresión genética es diferente a las células endoteliales humanas (Urich et al., 2012), entre otras diferencias importantes que las hacen un modelo limitado para el estudio de la fisiología de las CEM.

Los modelos transgénicos permiten registrar *in vivo* la fisiología de las CEM y se han utilizado para registrar la despolarización evocada por  $K^{1+}$  (Longden et al., 2017), determinar el comportamiento de capilares cerebrales por agonistas liberados por astrocitos (Thakore et al., 2021) y establecer la participación de los pericitos en la contracción capilar cerebral (Hartmann et al., 2021), por mencionar algunas. Si bien, los modelos transgénicos tienen la ventaja de dar una visión más semejante de la fisiología celular, tienen la desventaja de que las mutaciones pueden originar patologías en los animales, desde inflamación axonal en el cerebro hasta cardiomiopatía dilatada en el corazón (Lipták et al., 2019).

Los CP celulares se realizan al obtener células disociadas directamente del tejido (Uysal et al., 2018). En las neurociencias, se han empleado para determinar la dinámica del  $Ca^{2+}$  en neuronas (Apuschkin et al., 2013), astrocitos (Bazargani & Attwell, 2016) y CEM (García-Carlos et al., 2021), en experimentos que permiten observar la interacción de CEM y astrocitos (Mi et al., 2001; Urich et al., 2012), por ejemplificar algunos.

### **Movimientos Intracelulares de $Ca^{2+}$**

La concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  se relacionó a la excitabilidad membranal en 1966 (Hagiwara & Nakajima, 1966). En 1967, con el uso del indicador de  $Ca^{2+}$  aequorina, se generó el primer registro de movimientos intracelulares de  $Ca^{2+}$ , ambos experimentos realizados en fibras musculares del percebe *Balanus nubilus* (Ridgway & Ashley, 1967).

Los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos se reportaron por primera vez en 1991 en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*. Estos  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos tenían características cinéticas parecidas a los reportados por agonistas de receptores de  $IP_3$  (Parker & Yao, 1991). Los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en neuronas y astrocitos están relacionados a procesos de diferenciación neuronal (Gu et al., 1994), plasticidad

(Spitzer et al., 1995), y gliotransmisión (Santello et al., 2012) por mencionar algunos.

Las CEM tienen mecanismos que regulan las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. En particular, hay organelos que secuestran el  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol (ej. retículo endoplásmico y mitocondria) y las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana que expulsan  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extracelular (ej. intercambiador sodio-calcio). De ahí que se mantiene una concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  baja (50 - 100 nM) a comparación del espacio extracelular (2.2 - 2.6 mM) (Atchison & Beierwaltes, 2013).

Las CEM expresan receptores de membrana que modulan la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Tal como los canales de potencial transitorios que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula (Thakore et al., 2021), receptores de histamina H1 que inician oscilaciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en células hCMEC/D3 (Berra-Romani et al., 2020), y receptores muscarínicos M5 (Zuccolo et al., 2019), entre otros.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las políticas éticas de cuidado y manejo animal aplicables en México, bajo la NOM-062-ZOO-1999, el estudio contó con aprobación ética por parte de la Universidad de Sonora CEI-UNISON 01/2021. En este estudio se utilizaron ratas Wistar (machos y hembras) de 0 a 21 días postnatal ( $P_0$ - $P_{21}$ ). Los animales se mantuvieron en ciclos día/noche de 12 h y se alimentaron *ad libitum*.

### **Soluciones y Reactivos**

El Líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) se preparó de forma diaria y contuvo (en mM): 125 NaCl (793566, Sigma-Aldrich, USA), 5.4 KCl (793590, Sigma-Aldrich, USA), 1 MgCl<sub>2</sub> (M-2670, Sigma-Aldrich, USA), 1.8 CaCl<sub>2</sub> (442909, Sigma-Aldrich, USA), 10 D-(+)-Glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>; G8270, Sigma-Aldrich, USA), 5 HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico; H3375; Sigma-Aldrich, USA); pH ajustado a 7.2.

El indicador de Ca<sup>2+</sup> Fluo-4 AM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) se preparó diario a una concentración de 1 μM diluido en aCSF. Todos los demás reactivos fueron de Sigma-Aldrich a menos que se indique lo contrario.

### **Cultivos Primarios Celulares**

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (PiSA agropecuaria) 120 mg/1 kg de peso y se practicó la eutanasia. Se extrajo el cerebro de los animales con material de disección (1 min/rata). Los cerebros se depositaron en una placa de Petri de 35 mm de diámetro con aCSF frío (4 - 8 °C). Se obtuvieron CP de CEM (aislados de las

meninges), astrocitos (aislados del cuerpo calloso) o células cerebrales (aisladas de bulbo olfatorio).

Para los CP de CEM, se obtuvieron cortes de lóbulo frontal que se colocaron en una placa de Petri estéril con aCSF, para separar el tejido meníngeo del resto del cerebro. Se seleccionaron pequeños trozos de tejido meníngeo y se colocaron en un tubo Eppendorf que contenía 1 mL de medio basal de células endoteliales suplementado con 100 U/mL de penicilina, 2 mM L-glutamina y 10 % suero bovino fetal. El tejido meníngeo se disoció mecánicamente pasándolo varias veces a través de una pipeta estéril para obtener las CEM. A continuación, se colocaron 50  $\mu$ L de esta alícuota de células disociadas sobre un cubreobjetos de vidrio recubierto con poli-L-ornitina al 0.01 %, en una placa de Petri estéril de 35 mm de diámetro. Las CEM se dejaron sedimentar durante 2 min y se agregaron 2 mL de medio de células endoteliales. Los CP se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera mixta de aire y 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada tres días.

Los CP de astrocitos se hicieron del cuerpo calloso. El procedimiento de disociación mecánica y cultivo celular fue similar a los CP de CEM con la diferencia del medio Neurobasal en lugar del medio de células endoteliales.

Los CP mixtos se realizaron con un CP de astrocitos o BO (mezcla de neuronas y glía) al que se le cultivó células disociadas obtenidas de tejido meníngeo.

### **Ensayos de Inmunocitoquímica**

La inmunocitoquímica se realizó según lo descrito por Montiel-Herrera et al. (2006) con algunas modificaciones. Brevemente, se usó una pieza de cubreobjetos de CP de cuerpo calloso para identificar proteína ácida fibrilar glial, expresada en astrocitos, con anticuerpo anti-proteína ácida fibrilar glial (anti-GFAP, 1:200; G9269, Sigma- Aldrich, EE. UU.).

Primero, las células se fijaron en metanol al 99.8 % a - 20 °C durante 45 min para después sumergirlas en solución de bloqueo (aCSF y suero fetal bovino al 10 %) durante 45 min. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario a una dilución 1:200 durante 8 h a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con solución de bloqueo, he incubar con el anticuerpo secundario de cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-IgG de conejo (F0382, 1:300; Sigma Aldrich, EE. UU.) durante 1 h. Finalmente, las células se lavaron tres veces con solución de bloqueo y se examinaron con un microscopio de epifluorescencia (Leica DM500). Como control, se usó un trozo del cubreobjetos con células cultivadas con el procedimiento descrito, excepto por el desafío con el anticuerpo primario, los inmunoensayos se repitieron tres veces.

### **Movimientos Intracelulares de $Ca^{2+}$**

Para registrar los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos se usaron CP de CEM, CEM con astrocitos y CEM con BO de la siguiente manera: se cargó una pieza de cubreobjetos con 1  $\mu$ M Fluo-4 AM diluido en aCSF durante 15 min en un cuarto oscuro. Luego, las células cargadas con Fluo-4 se colocaron en una cámara de perfusión en la platina de un microscopio óptico vertical (Leica Microsystems, EE. UU.). El Fluo-4 se excitó con un sistema de iluminación LED X-cite XY LIS™ (Excelitas technologies, EE. UU.), a una onda de 490 nm y emitió a 510 nm. Se recolectó con una cámara ElectroRetiga (Teledyne Photometrics). Las células se localizaron a través de un objetivo de inmersión en agua plano-apocromático 20x/0.8 NA (Leica Microsystems, EE. UU.). Los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos se registraron a una exposición de 250 ms y un retraso de 100 ms durante 5 - 10 min. La intensidad del sistema de iluminación se mantuvo a 5 % para proteger de blanqueamiento a las muestras.

Además, para explorar los mecanismos implicados en los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos, se utilizó ácido ciclopiazónico (10  $\mu$ M; CPA; C1530, Sigma-

Aldrich, EE. UU.), inhibidor reversible de la ATPasa- $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico y 2-aminoetil difenil borato (2-APB; 20  $\mu\text{M}$ ; D9754, Sigma-Aldrich, Germany), inhibidor reversible de receptores de  $\text{IP}_3$ ; estos se diluyeron en aCSF y se aplicaron durante 3 min a través del sistema de perfusión.

Los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos se representaron como la relación de intensidad de fluorescencia ( $\% \Delta F$ , unidades arbitrarias, AU). La adquisición de datos de fluorescencia y el análisis de imágenes se realizaron con el software Ocular (Teledyne Photometrics, EE. UU.). Los datos se procesaron e ilustraron con el software ImageJ-FIJI (NIH, EE. UU.) y se analizaron con Origin Pro 9.65 (OriginLab Corporation, Northampton, EE. UU.). Los resultados se informaron con estadísticas descriptivas (media  $\pm$  error estándar) de grupos de células confluentes o células aisladas (García-Carlos et al., 2021).

Las variaciones de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene una función exponencial, el eje "Y" representa la fluorescencia del Fluo-4 en unidades arbitrarias (AU) y el eje "X" el tiempo en segundos (s). La fórmula para valorar el incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos fue:

$$y = y_0 + A_1 e^{(x-x_0)/t_1}$$

Donde  $y_0$  y  $x_0$  fueron las coordenadas donde inició el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneo;  $A_1$  fue la amplitud del crecimiento exponencial y  $t_1$  la constante de tiempo. La fórmula para valorar el decaimiento de los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos fue:

$$y = y_0 + A_1 e^{-x/t_1}$$

Donde  $y_0$  fue la coordenada donde inició el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneo,  $A_1$  fue la amplitud del crecimiento exponencial y  $t_1$  la constante de tiempo.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cultivos Primarios Celulares

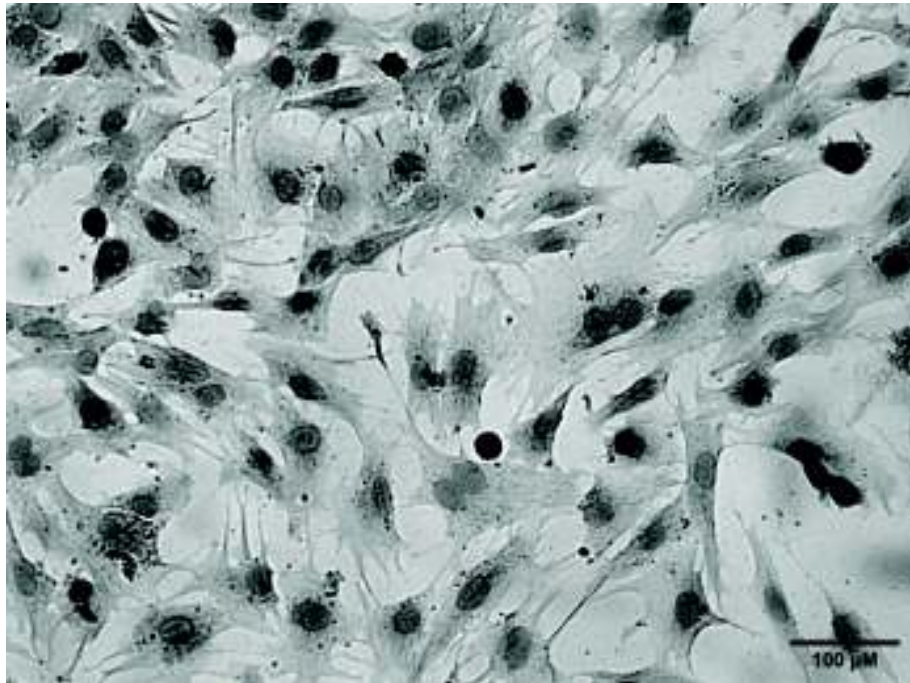
Los CP de CEM exhiben morfología poligonal fusiforme que forma una monocapa confluyente con patrón empedrado arremolinado (Figura 3). Esta morfología se ha reportado en CP de CEM obtenidos de ratas Wistar (Veszelka et al., 2018), endotelio aórtico bovino (Malek & Izumo, 1996) y líneas celulares humanas endoteliales HBMECs (Reinitz et al., 2015).

Los CP de astrocitos se obtuvieron del cuerpo caloso; que es el principal tracto de materia blanca y hasta el 99 % de las células son gliales después del día 5 postnatal (Reyes-Haro et al., 2013). Los astrocitos tienen un volumen citoplasmático reducido y procesos alargados ramificados (Figura 4A) (Goursaud et al., 2009). De las 11 células valoradas, todas fueron positivas para GFAP (Figura 4B). Esto concuerda con lo descrito por Goursaud y colaboradores, donde reportaron hasta un 95 % células positivas a GFAP en CP de cuerpo caloso en ratas Wistar (Goursaud et al., 2009).

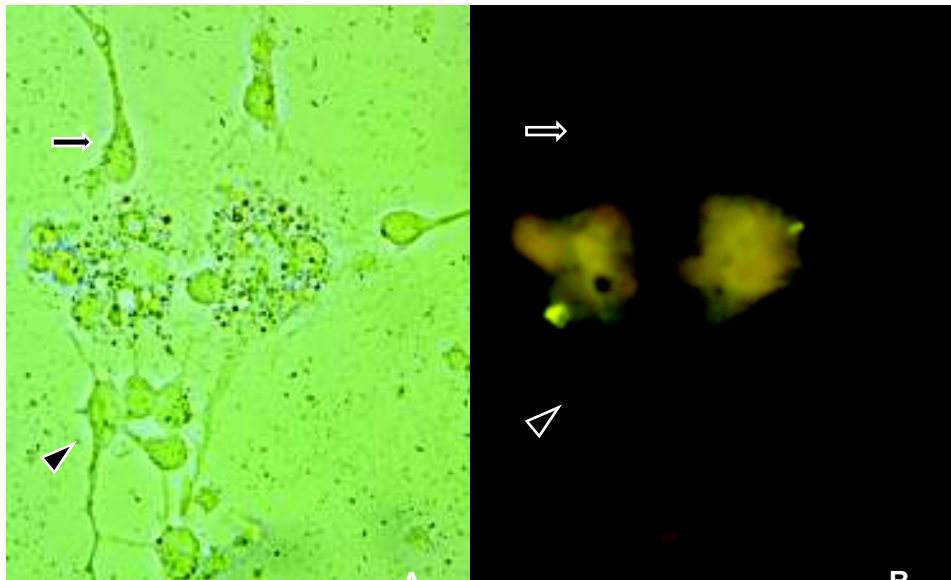
Los CP de astrocitos y CEM (Figura 5) tienen células con morfología poligonal (Figura 5; cabeza de flecha), como las observadas en monocultivos de CEM (Figura 1) y células con volumen citoplasmático reducido y procesos alargados (Figura 5; flecha), como las células gliales (Figura 5).

Se hicieron CP de BO y CEM para imitar el microambiente cerebral (Goshi et al., 2020; Zheng et al., 2020). Estos CP también poseen diferentes morfologías (Figura 6) parecidas a las observadas en los monocultivos (Figura 3 y 4).

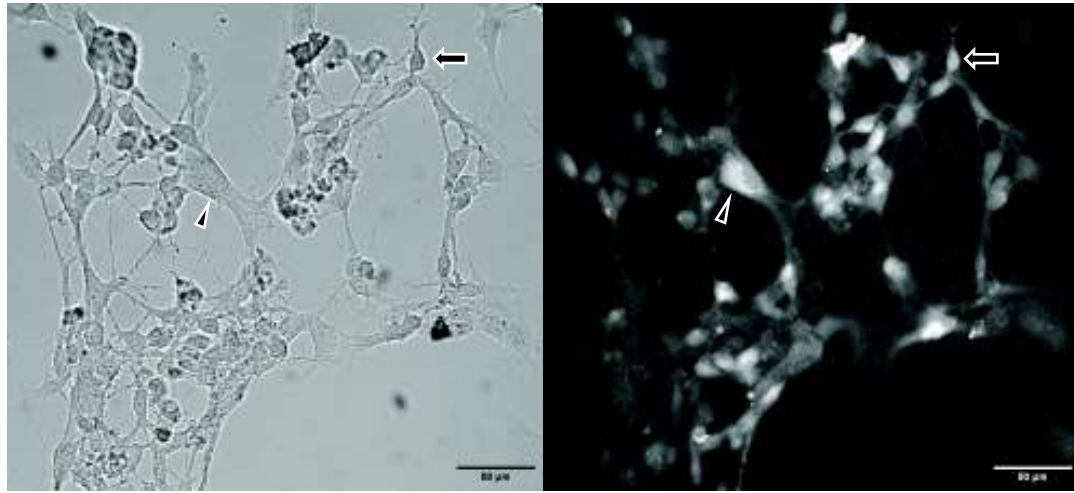
En los CP de astrocitos y CEM (Figura 5) se observan 59.3 células/0.1 mm<sup>2</sup> y en los CP de BO y CEM (Figura 6) 78.3 células/0.1 mm<sup>2</sup> (correspondiente a un incremento del 30 %). Los astrocitos liberan factores que promueven las características de las CEM en la unión neurovascular (Sobue et al., 1999) y a su vez las CEM generan factores de diferenciación en células gliales (Mi et al., 2001).



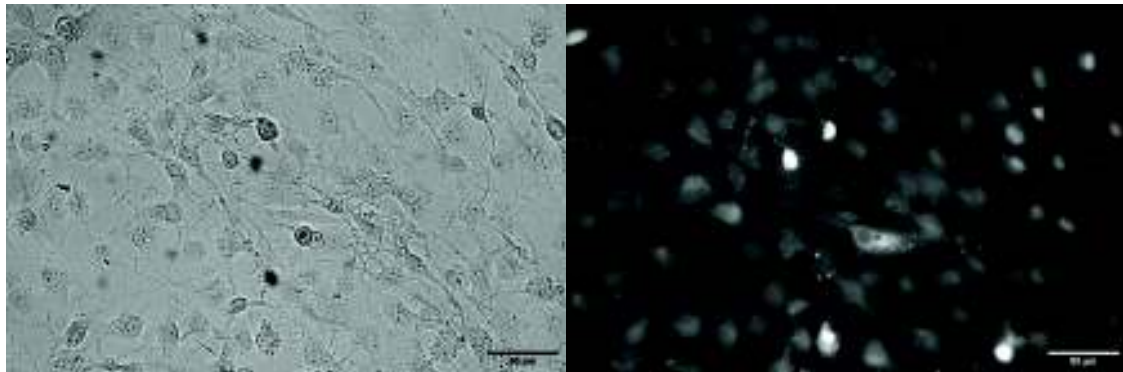
**Figura 3.** CP de CEM de ratas Wistar P<sub>0</sub>-P<sub>21</sub> con tinción azul de Evans.



**Figura 4.** CP de cuerpo calloso. En A) CP de cuerpo calloso en campo claro y en B) CP de cuerpo calloso positivo para GFAP en microscopía de fluorescencia. La flecha y la cabeza de flecha señalan la misma célula en campo claro y en fluorescencia.



**Figura 5.** CP de astrocitos y CEM. En A) CP de astrocitos y CEM en campo claro y en B) CP de astrocitos y CEM en microscopía de fluorescencia cargados con Fluo-4. La flecha y la cabeza de flecha señalan a células con morfología de astrocito y CEM, respectivamente.



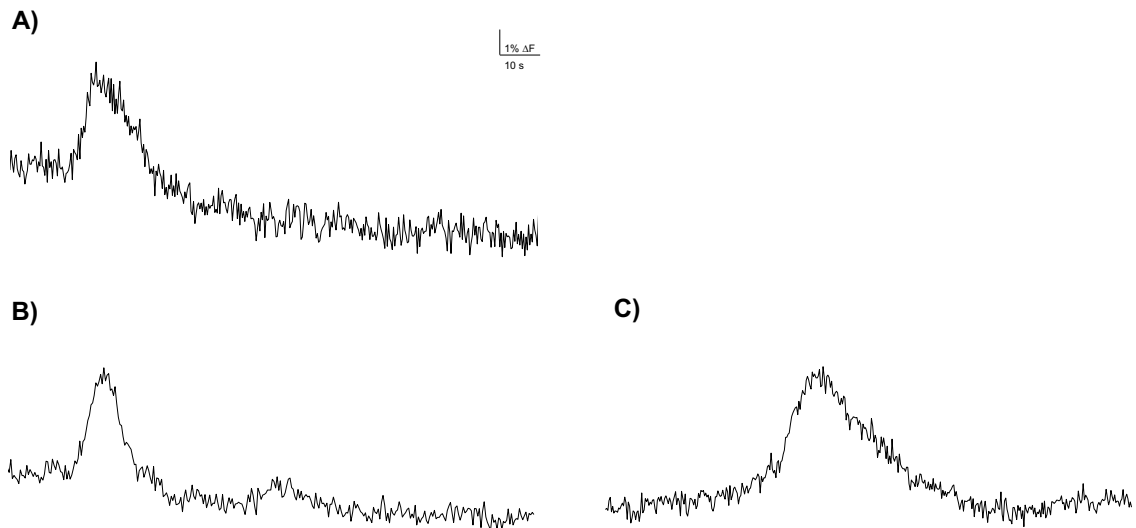
**Figura 6.** CP de BO y CEM cargados con Fluo-4. En A) CP de BO y CEM en campo claro y en B) CP de BO y CEM en microscopía de fluorescencia.

## [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Espontáneos en CEM

Los [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> espontáneos se han reportado en células endoteliales de diferentes modelos animales, por ejemplo en cultivos de endotelio corneal bovino (Justet et al., 2019), experimentos *ex vivo* en arterias mesentéricas de ratas Wistar (Kansui et al., 2008) y previamente en nuestro grupo de investigación se reportó que los CP de CEM generaban [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> espontáneos en condiciones fisiológicas (actividad basal) (García-Carlos et al., 2021).

El fluo-4 presenta una fluorescencia basal (Figura 7) que aumenta hasta 100 veces al unirse a Ca<sup>2+</sup> citosólico libre, este aumento llega a un pico y regresa a una basal con una caída exponencial (Gee et al., 2000). El Ca<sup>2+</sup> libre en citosol es de  $\leq 10^{-7}$  M debido a que se encuentra secuestrado en organelos (ej. Retículo endoplásmico o mitocondria) o es expulsado por ATPasa-Ca<sup>2+</sup> hacia el espacio extracelular.

Las CEM tienen un 13.6 % de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> espontáneos (Tabla I) con una frecuencia de  $3.9 \pm 2.8$  mHz (García-Carlos et al., 2021). Así mismo, otros autores han reportado 19.8 % de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> espontáneos en CP de células endoteliales aórticas bovinas (Malek & Izumo, 1996), cortes cerebelares y en la interfaz del tallo cerebral (Apuschkin et al., 2013). La amplitud es la diferencia entre el punto máximo registrado y el valor de la actividad basal (Knopp, 2013). Las amplitudes de los CP en condiciones fisiológicas vs. CPA y 2-APB; no presentan diferencias estadísticamente significativas en sus medias, esto probablemente se deba a que son el mismo tipo celular en todos los CP de CEM (Tabla I). En CP de hipocampo, las neuronas generan actividad de Ca<sup>2+</sup> menor a 1 s (Kloskowska et al., 2008), lo que contrasta con los CP de CEM, con duraciones entre 20 y 60 s. También, los CP de CEM tienen duraciones 10 veces más largas que las registradas en CP de endotelio aórtico bovino ( $3.0 \pm 0.5$  s) (Miyazaki et al., 2001). La duración de los [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> espontáneos en CP de CEM es lento a comparación de las células eléctricamente excitables (Alberts et al., 2002).



**Figura 7.** [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> espontáneos en CP de CEM en ratas Wistar (P<sub>0</sub>-P<sub>21</sub>). En A) registro representativo de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> espontáneos de CEM en condiciones fisiológicas; en B) registro representativo de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> espontáneos de CEM perfundidas con 10 μM CPA y C) registro representativo de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> espontáneos de CEM perfundidas con 50 μM 2-APB.

**Tabla I.** Características de los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CP de CEM en condiciones fisiológicas, 10  $\mu$ M CPA y 50  $\mu$ M 2-APB.

Condiciones	$[Ca^{2+}]_i$ (%)	Amplitud (% $\Delta F$ )	Duración (s)	$\tau$ Incremento (s)	$\tau$ Decaimiento (s)	Frecuencia (mHz)
Fisiológicas	13.6 (36/264)	$3.4 \pm 2.1$	$41.5 \pm 24.2$	$9 \pm 6.6$	$14.2 \pm 11.8$	$3.9 \pm 2.8$
10 $\mu$ M CPA	5.4 (18/332)	$2.8 \pm 1.2$	$23.9 \pm 10.1^a$	$4.3 \pm 2.9^a$	$6.2 \pm 2.8^c$	$2.5 \pm 1.3^a$
50 $\mu$ M 2-APB	10.1 (9/89)	$3.9 \pm 2$	$53.2 \pm 12.6$	$12.1 \pm 4.8^c$	$22.8 \pm 6.7^b$	$1.9 \pm 0.6^b$

Los valores están expresados como valor medio  $\pm$  DE. Comparación de las medias de los valores basales contra 10  $\mu$ M CPA y 50  $\mu$ M 2-APB con la prueba de Kruskal-Wallis. a,  $p < 0.05$ ; b,  $p < 0.01$ ; c,  $p < 0.001$ .

Esto podría deberse a que las primeras no necesitan mecanismos de respuesta rápida como lo requieren las neuronas y el músculo estriado.

Las células cardiacas generan  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos que duran entre 20 a 60 s, relacionados con mecanismos de actividad física, lucha y huida (Cheng & Lederer, 2008). De forma interesante, los CP de CEM tienen los mismos intervalos temporales, esto podría indicar que se activan mecanismos parecidos en ambos tipos de células. Esto sugiere que las células endoteliales deben ser capaces de responder a las alteraciones de la presión sanguínea, de tal modo, poder adaptarse cuando el flujo sanguíneo sea modificado.

Los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos tienen morfología exponencial y se utilizó las fórmulas descritas en Materiales y Métodos para valorar sus cinéticas (Cheng & Lederer, 2008; Hobbie & Roth, 2007). El valor tau ( $\tau$ ) es inversamente proporcional a la velocidad de los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos. Los  $\tau$  de incremento y decaimiento, al igual que las duraciones en los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CP de CEM son más largas que los reportados en células eléctricamente excitables. A comparación de los  $9.0 \pm 6.6$  s en CP de CEM, los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos de neuronas espinales de la rana *Xenopus* tienen un tiempo promedio a su pico  $1.1 \pm 0.1$  s y  $\tau$  de decaimiento de  $7.5 \pm 1.0$  s (Gu et al., 1994).

Los CP de CEM perfundidos con  $10 \mu\text{M}$  de CPA y  $50 \mu\text{M}$  de 2-APB, presentan porcentajes de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos menores en comparación a las condiciones fisiológicas (Tabla I). De forma interesante, ninguno de los fármacos elimina completamente estos aumentos de  $Ca^{2+}$ , sugiriendo que los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos están vinculados a ambas vías intracelulares. Estos  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos requieren la activación de receptores de  $IP_3$  y su respuesta es parecida a la descrita en experimentos con acetilcolina en líneas celulares de endotelio hCMEC/D3; los CP de CEM mantienen estos  $[Ca^{2+}]_i$  por sistemas de entrada de  $Ca^{2+}$  operados por almacenamiento explicando la razón por la cual

al remover el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular la actividad espontánea de  $\text{Ca}^{2+}$  desaparece (García-Carlos et al., 2021; Zuccolo et al., 2017).

Las características de los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos en condiciones fisiológicas fueron comparadas con los registros de 10  $\mu\text{M}$  CPA y 50  $\mu\text{M}$  2-APB utilizando la prueba estadística de Kruskal Wallis para determinar diferencias en las medias (Tabla I). La duración y el  $\tau$  incremento de los registros con 10  $\mu\text{M}$  CPA tiene valores que representan la mitad de los observados en los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos en condiciones fisiológicas ( $p < 0.05$ ), el  $\tau$  decaimiento es menor en los experimentos con 10  $\mu\text{M}$  CPA ( $p < 0.001$ ) y mayor en 50  $\mu\text{M}$  2-APB ( $p < 0.01$ ) a comparación con la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  fisiológica y en ambos experimentos la frecuencia es menor (10  $\mu\text{M}$  CPA,  $p < 0.05$ ; 50  $\mu\text{M}$  2-APB,  $p < 0.01$ ) (Tabla I).

Las cinéticas de los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos están relacionadas con el mecanismo intracelular que los fármacos bloquean. Esto sugiere que la vía de  $\text{Ca}^{2+}$ -SERCA, bloqueada por CPA, está asociado con  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  con características temporales largas (Figura 3B). También, los receptores  $\text{IP}_3$ , bloqueados por 2-APB, están relacionados con  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos rápidos (Figura 3C). Zuccolo y colaboradores describieron respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  evocadas por acetilcolina en líneas celulares bEND5 de rata (Zuccolo et al., 2017) y hCMEC/D3 de humano (Zuccolo et al., 2019) que están vinculadas a receptores de  $\text{IP}_3$  y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por reservorios intracelulares.

Los  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos en CP de CEM tienen dos morfologías relacionadas con la activación de SERCA y/o receptores de  $\text{IP}_3$ , esto explica la presencia de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  espontáneos en ambos experimentos. De forma interesante, en ambas preparaciones (CPA o 2-APB) sus características temporales son opuestas y sus frecuencias son menores a la actividad fisiológica. Esto indica que la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$  evaluada proviene de dos componentes.



Los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CEM son suprimidos al sustituir el  $Ca^{2+}$  del aCSF por  $Mg^{2+}$  EGTA (García-Carlos et al., 2021); junto con lo observado en estos CP de CEM, esto sugiere que los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos inician por la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular (Thakore et al., 2021) y son amplificados por las vías de  $Ca^{2+}$  intracelular. Las neuronas tienen  $[Ca^{2+}]_i$  con duración inferior a 5 s (Rosenberg & Spitzer, 2011) a comparación de las  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CEM que son hasta 10 veces más largos ( $42.7 \pm 23.4$  s). Lo que implica que tendrían un propósito diferente y probablemente diferentes vías intracelulares vinculadas al metabolismo.

Se registró la actividad basal de  $Ca^{2+}$  en CP de astrocitos obtenidos del cuerpo calloso. El 7.9 % ( $n = 6/76$ ) de las células presentaron  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos y estos tienen una amplitud de  $2.6 \pm 0.9$  %  $\Delta F$ , una duración de  $24.3 \pm 10.0$  s y una frecuencia de  $5.0 \pm 2.8$  mHz. Se han reportado frecuencias de hasta 10 mHz en astrocitos del tálamo cerebral de ratas Wistar (Parri et al., 2001). También, presentan un crecimiento exponencial de  $\tau$   $4.9 \pm 2.7$  s y un  $\tau$  decaimiento de  $8.8 \pm 4.5$  s.

Los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos se han reportado en células endoteliales periféricas y se han vinculado a la comunicación endotelio-músculo liso (Kansui et al., 2008). En nuestro grupo de investigación se describieron  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CEM (García-Carlos et al., 2021); No obstante, este trabajo de tesis es la primera vez que sus características cinéticas son valoradas y las vías intracelulares relacionadas son reportadas.

### **$[Ca^{2+}]_i$ Espontáneos en CP de Astrocitos y CEM**

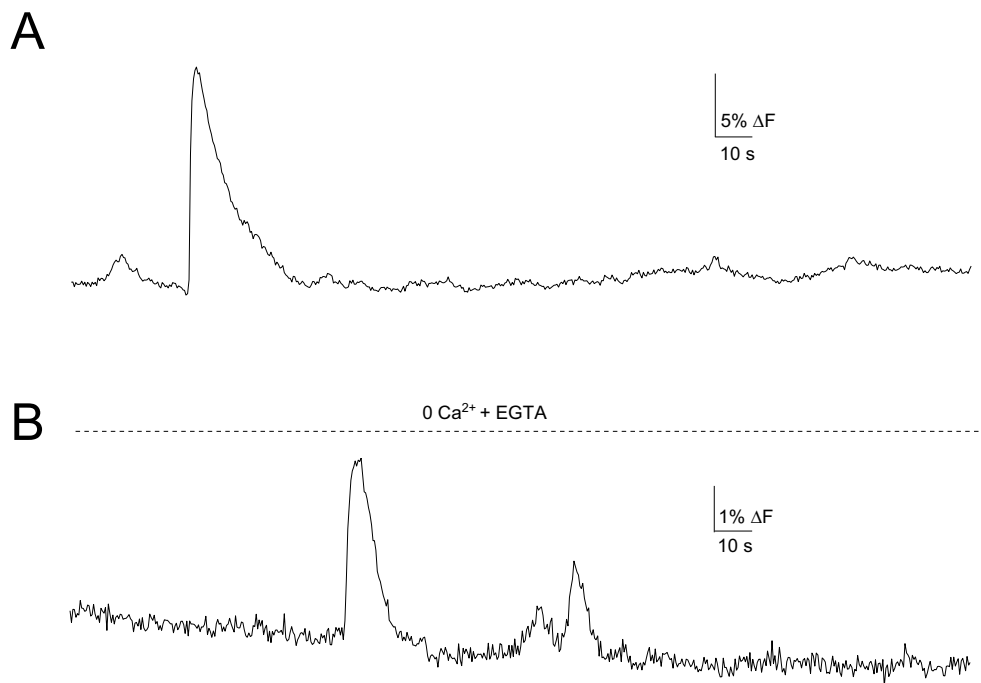
Los CP de astrocitos y CEM generan un 6.1% más de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos a comparación de los reportados en CP de CEM (Tabla I). El aumento de los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en estos CP puede estar explicado por la liberación de factores de crecimiento por las CEM necesarios para los astrocitos. Uno de

estos factores es el factor inhibidor de leucemia (Mi et al., 2001). Además, las  $\tau$  de incremento y decaimiento de los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CP de astrocitos y CEM duran más que los encontrados en CP de CEM ( $p = 0.014$  y  $p = 0.045$ , respectivamente). Los cambios podrían estar ligados a un incremento a la complejidad de señales intracelulares derivado a la interacción de diferentes linajes (Cheng & Lederer, 2008).

Los CP de astrocitos y CEM tienen  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos al remover el  $Ca^{2+}$  extracelular (Figura 8B). Esto contrasta con lo descrito en CP de CEM puros, donde se observó que los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos son suprimidos al retirar el  $Ca^{2+}$  de la solución de perfusión (García-Carlos et al., 2021). Los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en  $0 Ca^{2+}$  EGTA se encuentran en un porcentaje menor, tienen una duración menor, las  $\tau$  de incremento y decaimiento son más cortas y su frecuencia aumenta (Tabla II). Las variaciones en los valores de la actividad espontánea de  $Ca^{2+}$  podrían deberse a que los astrocitos sean capaces de detectar las alteraciones en la concentración extracelulares de  $Ca^{2+}$ , como lo hacen detectando las variaciones de  $K^{1+}$  en la sinapsis (Hertz & Chen, 2016).

### **$[Ca^{2+}]_i$ Espontáneos en CP de BO**

Los CP de BO se utilizaron como modelo de interacción celular más compleja, debido a que en estos encontramos astrocitos y neuronas que liberan factores al microambiente de los cultivos. El 11.7 % ( $n = 11/94$ ) de las células valoradas tienen  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos con amplitud de  $5.2 \pm 5.2$  %  $\Delta F$ , duración de  $21.0 \pm 10.1$  s y frecuencia de  $2.1 \pm 1.1$  mHz. Los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos registrados en BO tienen un crecimiento exponencial de  $\tau$   $2.9 \pm 2.2$  s y decaimiento de  $\tau$   $6.6 \pm 3.7$  s. Utilizando indicadores radiométricos de  $Ca^{2+}$ , se han reportado  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en modelos *in vivo* de bulbo olfatorio en ratones C57BL/6 (Maslyukov et al., 2018). Esta actividad de  $Ca^{2+}$  está relacionada con procesos de comunicación sináptica.



**Figura 8.** Trazo representativo de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CP de astrocitos y CEM. En A) Trazo representativo de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en condiciones fisiológicas y B) trazo representativo de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en perfusión en 0  $Ca^{2+}$  + EGTA.

**Tabla II.** Características de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CP de astrocito y CEM.

Condiciones	$[Ca^{2+}]_i$ (%)	Amplitud (% $\Delta F$ )	Duración (s)	$\tau$ Incremento (s)	$\tau$ Decaimiento (s)	Frecuencia (mHz)
Fisiológicas	19.7 (37/188)	$5.0 \pm 5.5$	$50.9 \pm 20.9$	$15.7 \pm 15.3$	$18.9 \pm 13.0$	$2.0 \pm 0.8$
0 $Ca^{2+}$ + EGTA	15.4 (12/78)	$3.2 \pm 0.7$	$18.2 \pm 11.8^b$	$4.0 \pm 3.2^b$	$6.1 \pm 3.2^b$	$2.4 \pm 1.4^a$

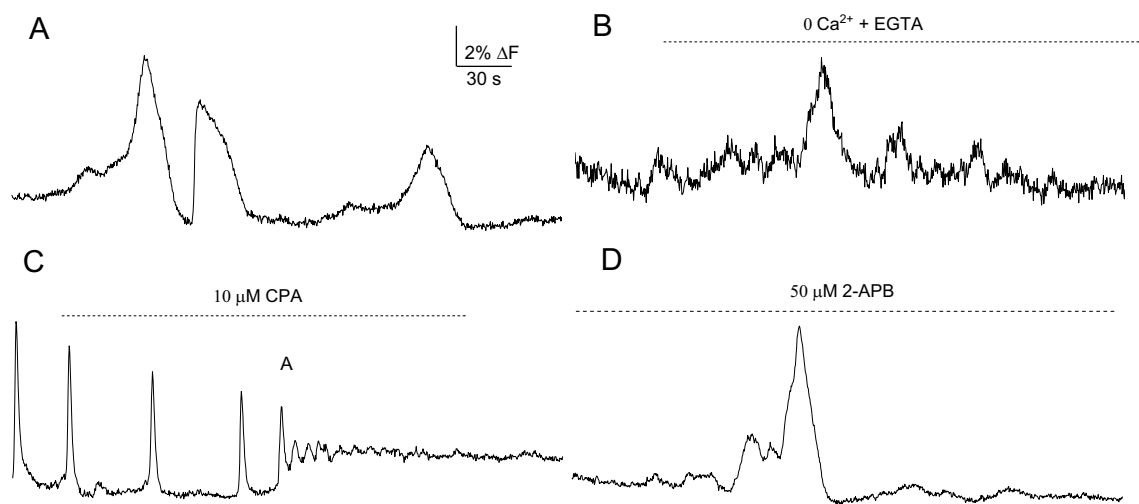
Los valores están expresados como valor medio  $\pm$  DE. Comparación de las medias de los valores fisiológicos contra 0  $Ca^{2+}$  + EGTA usando la prueba Kruskal-Wallis. <sup>a</sup>,  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup>,  $p < 0.001$ .

De igual forma, los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CP de BO podrían estar vinculados a mecanismos de comunicación por células cerebrales.

### **$[Ca^{2+}]_i$ Espontáneos en CP de BO y CEM**

El modelo de tres células (neuronas, astrocitos y CEM) se realizó con un CP de BO que fue cultivado con CEM disociadas (Ito et al., 2019). Los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en estos CP de BO y CEM tienen características diferentes a los otros modelos registrados. Los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos son sincrónicos y se propagan a células vecinas. También, fueron suprimidos al perfundir CPA (Figura 9C). Esto indica que los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos están generados por una reentrada de  $Ca^{2+}$  al retículo endoplásmico mediante  $Ca^{2+}$ -SERCA.

Los  $[Ca^{2+}]_i$  sincrónicos y rítmicos (Figura 9C) son similares a los observados en CP de neuronas corticales al ser perfundidas con bloqueadores de receptores GABA (Murphy et al., 1992) y en CP de hipocampo estimulados con antagonistas GABA (Bengtson et al., 2013) (Tabla III). En ambos artículos se relacionó esta actividad sincrónica y rítmica a la despolarización de neuronas causado por comunicación sináptica. Esto nos lleva a suponer la presencia de neuronas en los CP de BO y CEM, que estos  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos son resultado de un sistema de comunicación sináptica y que, a nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se reporta como el sistema  $Ca^{2+}$ -SERCA está directamente relacionado a la despolarización neuronal y a la comunicación sináptica (Figura 10).

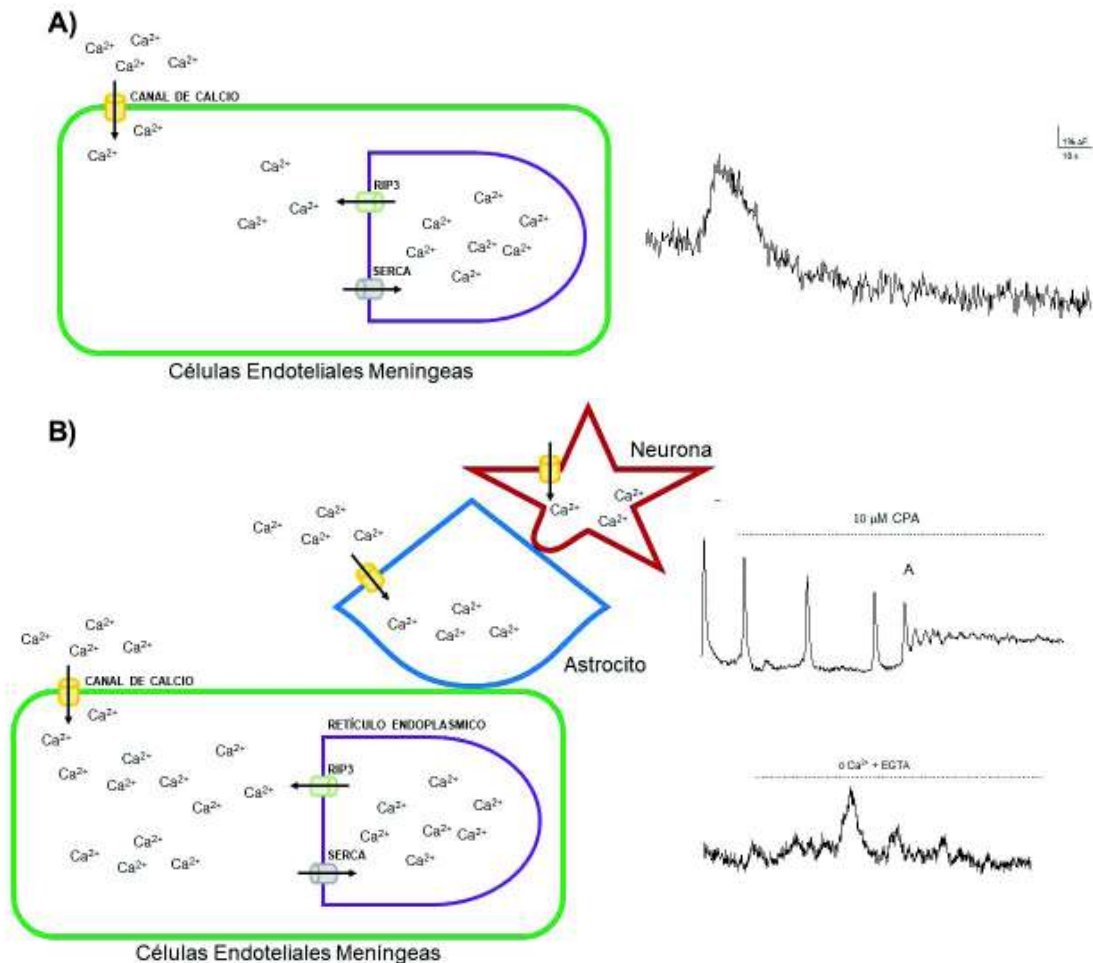


**Figura 9.** Trazo representativo de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CP de BO y CEM. En A) trazo representativo de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en condiciones fisiológicas, B) trazo representativo de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en  $0\text{ Ca}^{2+}$  + EGTA. C) registro representativo de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos durante la perfusión con  $10\ \mu\text{M CPA}$  y D) registro representativo de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos durante la perfusión con  $50\ \mu\text{M 2-APB}$ .

**Tabla III.** Características de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CP de BO y CEM.

Condiciones	$[Ca^{2+}]_i$ (%)	Amplitud (% $\Delta F$ )	Duración (s)	$\tau$ Incremento (s)	$\tau$ Decaimiento (s)	Frecuencia (mHz)
Fisiológicas	27.9 (56/201)	$2.6 \pm 1.6$	$36.3 \pm$ 16.1	$8.3 \pm 5.2$	$11.1 \pm 5.5$	$3.4 \pm 1.7$
0 $Ca^{2+}$ + EGTA	4.9 (12/241)	$3.0 \pm 1.0$	$27.5 \pm$ $20.6^a$	$5.6 \pm 3.9^a$	$6.4 \pm 4.3^b$	$2.9 \pm 1.4$
10 $\mu M$ CPA	22.8 (18/79)	$4.5 \pm 3.5^c$	$15.3 \pm$ $6.2^c$	$3.0 \pm 2.1^c$	$4.5 \pm 3.2^c$	$5.1 \pm 3.7$
50 $\mu M$ 2- APB	19.1 (33/173)	$4.4 \pm 2.6^c$	$33.5 \pm$ 12.5	$6.3 \pm 3.1$	$7.7 \pm 3.3^a$	$3.1 \pm 2.4$

Los valores están expresados como valor medio  $\pm$  DE. Comparación de las medias de los valores fisiológicos vs. fármacos con la prueba de Kruskal-Wallis. <sup>a</sup>,  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup>,  $p < 0.01$ ; <sup>c</sup>,  $p < 0.001$ .



**Figura 10.** Esquema representativo de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en cultivos primarios. (A) Las CEM generan  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos que dependen de la presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, de receptores de  $IP_3$  (RIP3) y de la ATPasa- $Ca^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico (SERCA). (B) En CP de CEM y BO los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos que se observan aumentan en porcentaje y no son bloqueados por falta de  $Ca^{2+}$  extracelular.



## CONCLUSIONES

- Las CEM generan  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en el 13.6 % de las células valoradas.
- Los CP de CEM con astrocitos o células del BO aumentan el número de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos. Además, presentan actividad espontánea de  $Ca^{2+}$  en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular.
- Los estudios de farmacología indican que los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos reportados están vinculados a 2 vías intracelulares: la vía de receptores  $IP_3$  y la vía de ATPasa- $Ca^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico.
- Las características cinéticas de los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos en CEM son modificadas en presencia de células cerebrales.
- Los resultados obtenidos de este trabajo de investigación sugieren a los  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos como un sistema de comunicación intercelular entre las CEM y las células cerebrales murinas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Adeeb, N., Mortazavi, M. M., Tubbs, R. S., & Cohen-Gadol, A. A. (2012). The cranial dura mater: A review of its history, embryology, and anatomy. *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 28(6), 827–837. <https://doi.org/10.1007/s00381-012-1744-6>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Ion Channels and the Electrical Properties of Membranes. *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26910/>
- Apuschkin, M., Ougaard, M., & Rekling, J. C. (2013). Spontaneous calcium waves in granule cells in cerebellar slice cultures. *Neuroscience Letters*, 553, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.08.022>
- Atchison, D. K., & Beierwaltes, W. H. (2013). The influence of extracellular and intracellular calcium on the secretion of renin. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 465(1), 59–69. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1107-x>
- Bazargani, N., & Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: The third wave. *Nature Neuroscience*, 19(2), 182–189. <https://doi.org/10.1038/nn.4201>
- Bengtson, C. P., Kaiser, M., Obermayer, J., & Bading, H. (2013). Calcium responses to synaptically activated bursts of action potentials and their synapse-independent replay in cultured networks of hippocampal neurons.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(7), 1672–1679. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.022>
- Bernstein, H.-G., Hölzl, G., Dobrowolny, H., Hildebrandt, J., Trübner, K., Krohn, M., Bogerts, B., & Pahnke, J. (2014). Vascular and extravascular distribution of the ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 in aged human brain and pituitary. *Mechanisms of Ageing and Development*, 0, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2014.08.003>
- Berra-Romani, R., Faris, P., Pellavio, G., Orgiu, M., Negri, S., Forcaia, G., Vargaz-Guadarrama, V., Garcia-Carrasco, M., Botta, L., Sancini, G., Laforenza, U., & Moccia, F. (2020). Histamine induces intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations and nitric oxide release in endothelial cells from brain microvascular circulation. *Journal of Cellular Physiology*, 235(2), 1515–1530. <https://doi.org/10.1002/jcp.29071>
- Butt, A. M., Jones, H. C., & Abbott, N. J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: A developmental study. *The Journal of Physiology*, 429, 47–62.
- Cheng, H., & Lederer, W. J. (2008). Calcium sparks. *Physiological Reviews*, 88(4), 1491–1545. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2007>
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Douarin, N. L., LeDouarin, N. M., & Kalcheim, C. (1999). *The Neural Crest*. Cambridge University Press.
- Eigenmann, D. E., Xue, G., Kim, K. S., Moses, A. V., Hamburger, M., & Oufir, M. (2013). Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 33. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-33>

- Filosa, J. A., & Iddings, J. A. (2013). Astrocyte regulation of cerebral vascular tone. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 305(5), H609-619. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00359.2013>
- Galla, H.-J. (2018). Monocultures of primary porcine brain capillary endothelial cells: Still a functional in vitro model for the blood-brain-barrier. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 285, 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.07.016>
- García-Carlos, C. A., Camargo-Loaiza, J. A., García-Villa, D., López-Cervantes, J. G., Domínguez-Avila, J. A., González-Aguilar, G. A., Astiazaran-García, H., & Montiel-Herrera, M. (2021). Angiotensin II, ATP and high extracellular potassium induced intracellular calcium responses in primary rat brain endothelial cell cultures. *Cell Biochemistry and Function*. <https://doi.org/10.1002/cbf.3635>
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., & Johnson, I. (2000). Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium*, 27(2), 97–106. <https://doi.org/10.1054/ceca.1999.0095>
- Goncharov, N. V., Popova, P. I., Avdonin, P. P., Kudryavtsev, I. V., Serebryakova, M. K., Korf, E. A., & Avdonin, P. V. (2020). Markers of Endothelial Cells in Normal and Pathological Conditions. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 14(3), 167–183. <https://doi.org/10.1134/S1990747819030140>
- Goshi, N., Morgan, R. K., Lein, P. J., & Seker, E. (2020). A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 155. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01819-z>
- Goursaud, S., Kozlova, E. N., Maloteaux, J.-M., & Hermans, E. (2009). Cultured astrocytes derived from corpus callosum or cortical grey matter show

- distinct glutamate handling properties. *Journal of Neurochemistry*, 108(6), 1442–1452. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05889.x>
- Gu, X., Olson, E. C., & Spitzer, N. C. (1994). Spontaneous neuronal calcium spikes and waves during early differentiation. *Journal of Neuroscience*, 14(11), 6325–6335. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-11-06325.1994>
- Guerra, G., Lucariello, A., Perna, A., Botta, L., Luca, A. D., & Moccia, F. (2018). The Role of Endothelial Ca<sup>2+</sup> Signaling in Neurovascular Coupling: A View from the Lumen. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 938. <https://doi.org/10.3390/ijms19040938>
- Hagiwara, S., & Nakajima, S. (1966). Effects of the Intracellular Ca Ion Concentration upon the Excitability of the Muscle Fiber Membrane of a Barnacle. *The Journal of General Physiology*, 49(4), 807–818.
- Hartmann, D. A., Berthiaume, A.-A., Grant, R. I., Harrill, S. A., Koski, T., Tieu, T., McDowell, K. P., Faino, A. V., Kelly, A. L., & Shih, A. Y. (2021). Brain capillary pericytes exert a substantial but slow influence on blood flow. *Nature Neuroscience*, 24(5), 633–645. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00793-2>
- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological Reviews*, 57(2), 173–185. <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4>
- Helms, H. C., Abbott, N. J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P.-O., Deli, M. A., Förster, C., Galla, H. J., Romero, I. A., Shusta, E. V., Stebbins, M. J., Vandenhoute, E., Weksler, B., & Brodin, B. (2016). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 36(5), 862–890. <https://doi.org/10.1177/0271678X16630991>

- Hertz, L., & Chen, Y. (2016). Importance of astrocytes for potassium ion (K<sup>+</sup>) homeostasis in brain and glial effects of K<sup>+</sup> and its transporters on learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 71, 484–505. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.018>
- Hobbie, R. K., & Roth, B. J. (2007). Exponential Growth and Decay. In R. K. Hobbie & B. J. Roth (Eds.), *Intermediate Physics for Medicine and Biology* (pp. 31–47). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-49885-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-49885-0_2)
- Iadecola, C. (2017). The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron*, 96(1), 17–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>
- Ito, R., Umehara, K., Suzuki, S., Kitamura, K., Nunoya, K.-I., Yamaura, Y., Imawaka, H., Izumi, S., Wakayama, N., Komori, T., Anzai, N., Akita, H., & Furihata, T. (2019). A Human Immortalized Cell-Based Blood-Brain Barrier Triculture Model: Development and Characterization as a Promising Tool for Drug-Brain Permeability Studies. *Molecular Pharmaceutics*, 16(11), 4461–4471. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00519>
- Janzer, R. C., & Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325(6101), Article 6101. <https://doi.org/10.1038/325253a0>
- Justet, C., Chifflet, S., & Hernandez, J. A. (2019). Calcium Oscillatory Behavior and Its Possible Role during Wound Healing in Bovine Corneal Endothelial Cells in Culture. *BioMed Research International*, 2019, 8647121. <https://doi.org/10.1155/2019/8647121>
- Kanemaru, K., Okubo, Y., Hirose, K., & Iino, M. (2007). Regulation of Neurite Growth by Spontaneous Ca<sup>2+</sup> Oscillations in Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 27(33), 8957–8966. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2276-07.2007>
- Kansui, Y., Garland, C. J., & Dora, K. A. (2008). Enhanced spontaneous Ca<sup>2+</sup> events in endothelial cells reflect signalling through myoendothelial gap

- junctions in pressurized mesenteric arteries. *Cell Calcium*, 44(2), 135–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.11.012>
- Kisler, K., Nelson, A. R., Montagne, A., & Zlokovic, B. V. (2017). Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(7), 419–434.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2017.48>
- Kloskowska, E., Malkiewicz, K., Winblad, B., Benedikz, E., & Bruton, J. D. (2008). APP<sup>swe</sup> mutation increases the frequency of spontaneous Ca<sup>2+</sup>-oscillations in rat hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*, 436(2), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.03.034>
- Knopp, K. (2013). *Theory of Functions, Parts I and II*. Courier Corporation.
- Lipták, N., Bősze, Z., & Hiripi, L. (2019). GFP transgenic animals in biomedical research: A review of potential disadvantages. *Physiological Research*, 68(4), 525–530. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934227>
- Longden, T. A., Dabertrand, F., Koide, M., Gonzales, A. L., Tykocki, N. R., Brayden, J. E., Hill-Eubanks, D., & Nelson, M. T. (2017). Capillary K<sup>+</sup> sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow. *Nature Neuroscience*, 20(5), Article 5.  
<https://doi.org/10.1038/nn.4533>
- Ma, X., & Liu, W. (2019). Calcium signaling in brain microvascular endothelial cells and its roles in the function of the blood-brain barrier. *Neuroreport*, 30(18), 1271–1277. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001357>
- Malek, A. M., & Izumo, S. (1996). Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *Journal of Cell Science*, 109 ( Pt 4), 713–726. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.4.713>
- Mann, G. E., Yudilevich, D. L., & Sobrevia, L. (2003). Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiological Reviews*, 83(1), 183–252.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2002>

- Maslyukov, A., Li, K., Su, X., Kovalchuk, Y., & Garaschuk, O. (2018). Spontaneous calcium transients in the immature adult-born neurons of the olfactory bulb. *Cell Calcium*, 74, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.06.001>
- Mi, H., Haerberle, H., & Barres, B. A. (2001). Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(5), 1538–1547.
- Miyazaki, T., Ohata, H., Yamamoto, M., & Momose, K. (2001). Spontaneous and Flow-Induced Ca<sup>2+</sup> Transients in Retracted Regions in Endothelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(1), 172–179. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4331>
- Murphy, T. H., Blatter, L. A., Wier, W. G., & Baraban, J. M. (1992). Spontaneous synchronous synaptic calcium transients in cultured cortical neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(12), 4834–4845.
- Oldendorf, W. H., Cornford, M. E., & Brown, W. J. (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Annals of Neurology*, 1(5), 409–417. <https://doi.org/10.1002/ana.410010502>
- Pais, T. F., & Penha-Gonçalves, C. (2019). Brain Endothelium: The “Innate Immunity Response Hypothesis” in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03100>
- Parker, I., & Yao, Y. (1991). Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. *Proceedings Biological Sciences*, 246(1317), 269–274. <https://doi.org/10.1098/rspb.1991.0154>



- Parri, H. R., Gould, T. M., & Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nature Neuroscience*, 4(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/90507>
- Reinitz, A., DeStefano, J., Ye, M., Wong, A. D., & Searson, P. C. (2015). Human brain microvascular endothelial cells resist elongation due to shear stress. *Microvascular Research*, 99, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2015.02.008>
- Reyes-Haro, D., Mora-Loyola, E., Soria-Ortiz, B., & García-Colunga, J. (2013). Regional density of glial cells in the rat corpus callosum. *Biological Research*, 46(1), 27–32. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000100004>
- Ridgway, E. B., & Ashley, C. C. (1967). Calcium transients in single muscle fibers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 29(2), 229–234. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(67\)90592-x](https://doi.org/10.1016/0006-291x(67)90592-x)
- Rosenberg, S. S., & Spitzer, N. C. (2011). Calcium Signaling in Neuronal Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), a004259. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004259>
- Rössler, K., Neuchrist, C., Kitz, K., Scheiner, O., Kraft, D., & Lassmann, H. (1992). Expression of leucocyte adhesion molecules at the human blood-brain barrier (BBB). *Journal of Neuroscience Research*, 31(2), 365–374. <https://doi.org/10.1002/jnr.490310219>
- Santello, M., Cali, C., & Bezzi, P. (2012). Gliotransmission and the tripartite synapse. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 970, 307–331. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_14)
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q. S., & Nedergaard, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(27), 9254–9262.
- Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M. E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K., & Kato, T. (1999).

- Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neuroscience Research*, 35(2), 155–164. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(99\)00079-6](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(99)00079-6)
- Spitzer, N. C., Olson, E., & Gu, X. (1995). Spontaneous calcium transients regulate neuronal plasticity in developing neurons. *Journal of Neurobiology*, 26(3), 316–324. <https://doi.org/10.1002/neu.480260304>
- Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiological Reviews*, 99(1), 21–78. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017>
- Thakore, P., Alvarado, M. G., Ali, S., Mughal, A., Pires, P. W., Yamasaki, E., Pritchard, H. A. T., Isakson, B. E., Tran, C. H. T., & Earley, S. (2021). Brain endothelial cell TRPA1 channels initiate neurovascular coupling. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.63040>
- Urich, E., Lazic, S. E., Molnos, J., Wells, I., & Freskgård, P.-O. (2012). Transcriptional Profiling of Human Brain Endothelial Cells Reveals Key Properties Crucial for Predictive In Vitro Blood-Brain Barrier Models. *PLOS ONE*, 7(5), e38149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038149>
- Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., & Eker Sariboyaci, A. (2018). Chapter 17 - Cell and Tissue Culture: The Base of Biotechnology. In D. Barh & V. Azevedo (Eds.), *Omics Technologies and Bio-Engineering* (pp. 391–429). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00017-8>
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Tang, E. H. C., & Feletou, M. (2009). Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 196(2), 193–222. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x>
- Veszeka, S., Tóth, A., Walter, F. R., Tóth, A. E., Gróf, I., Mészáros, M., Bocsik, A., Hellinger, É., Vastag, M., Rákhely, G., & Deli, M. A. (2018). Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With

- Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00166>
- Warren, M. S., Zerangue, N., Woodford, K., Roberts, L. M., Tate, E. H., Feng, B., Li, C., Feuerstein, T. J., Gibbs, J., Smith, B., de Morais, S. M., Dower, W. J., & Koller, K. J. (2009). Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacological Research*, 59(6), 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.02.007>
- Zheng, Y.-F., Zhou, X., Chang, D., Bhuyan, D. J., Zhang, J.-P., Yu, W.-Z., Jiang, X.-S., Seto, S. W., Yeon, S., Li, J., & Li, C. G. (2020). A Novel Tri-culture Model for Neuroinflammation. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.15171>
- Zuccolo, E., Laforenza, U., Negri, S., Botta, L., Berra-Romani, R., Faris, P., Scarpellino, G., Forcaia, G., Pellavio, G., Sancini, G., & Moccia, F. (2019). Muscarinic M5 receptors trigger acetylcholine-induced Ca<sup>2+</sup> signals and nitric oxide release in human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 4540–4562. <https://doi.org/10.1002/jcp.27234>
- Zuccolo, E., Lim, D., Kheder, D. A., Perna, A., Catarsi, P., Botta, L., Rosti, V., Riboni, L., Sancini, G., Tanzi, F., D'Angelo, E., Guerra, G., & Moccia, F. (2017). Acetylcholine induces intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations and nitric oxide release in mouse brain endothelial cells. *Cell Calcium*, 66, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.003>