



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD SEDE SUR
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

“Evaluación de los receptores a cannabinoides y de la expresión de las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1 en la unidad neurovascular de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal mesial farmacorresistente”

T E S I S

Que presenta

M en C. María de los Ángeles Núñez Lumbreras

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de Tesis: Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta

Ciudad de México

Febrero 2022

La presente investigación se realizó en el laboratorio No. 8 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV, Sede Sur) bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha Arrieta. Con el apoyo de la Dra. Sandra A. Orozco Suárez, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS.

Este proyecto contó con el apoyo del Consejo Nacional De Ciencias y Tecnología (CONACyT) mediante el proyecto A3-S-26782 "Estudio del potencial uso terapeutico de los cannabinoides en el control de la epilepsia resistente a fármacos". Asimismo, a través de la beca de doctorado número 347414.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta** por permitirme formar parte de su laboratorio y confiar en mí para la realización de este proyecto, por los conocimientos transmitidos, por su dedicación, su tiempo pero sobre todo, por su paciencia. Gracias.

A la **Dra. Sandra Orozco Suárez** por todo el apoyo personal y académico recibido durante la realización de este trabajo.

Al **Dr. David Centurión Pacheco** por el apoyo brindado desde el comienzo de este proyecto.

A la **Dra. Claudia González Espinosa** por sus valiosas observaciones para la mejora de esta investigación.

A la **Dra. Claudia Pérez Cruz** por sus acertados comentarios para la mejora de este trabajo.

Al **Dr. José Antonio Arias Montaña** por los comentarios realizados durante el presente proyecto.

A la **Q.F.I. Francia Carmona Cruz** por todo el apoyo técnico recibido durante la elaboración de este proyecto de investigación. Gracias por ser mi *sensei* de química analítica.

Al **Dr. Vadim Pérez Koldenkova** por su invaluable apoyo técnico durante la parte final de este proyecto.

Al **Ing. José Rodolfo Fernández Calderón** por disposición para ayudar en el soporte técnico y mantenimiento de todos los equipos utilizados.

A la **Lic. María del Pilar Quinteros Carrillo** por proporcionar recursos y apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

A la **Dra. Manola Cuéllar Herrera**, la **Dra. Ivette Bañuelos Cabrera**, al **Dr. César Emmanuel Santana Gómez**, al **Dr. Leonardo Lara Valderrabano** y a la **Dra. María Guadalupe Valle Dorado** por sus consejos, por su buena disposición, por sus porras y por todas esas pláticas interminables. Gracias por su amistad a pesar de la distancia.

Al **Dr. Vicente Sánchez Valle** y al **Dr. José Luis Castañeda Cabral** por todo el apoyo y los consejos durante el desarrollo de los experimentos.

A mis compañeros de laboratorio:

Médico Adacrid Colunga Durán por tu apoyo durante los experimentos.

M. C. Alma Delfina Pinedo Rodríguez por tu dedicación y buena disposición.

Médico Ana Torres por tu alegría.

M. C. Christian Lizeth Frías Soria por tus sabios consejos.

M. C. Christopher Alonso Martínez Aguirre por tirar mis muestras importantes...

M. C. Cindy Lizbeth Santiago Castañeda por tu amistad incondicional.

M. C. Daniel Fonseca Barriendos por todos tus chistes.

Dr. Daniel Pérez Pérez por todo tu apoyo a nivel personal y académico.

M. C. Marysol Segovia Oropeza por tu buena vibra.

Índice	Error! Marcador no definido.
I	V
Índice de figuras	VI
Índice de tablas	VIII
Abreviaturas	IX
Resumen	X
Abstract	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Barrera hematoencefálica	1
Figura 1. Estructura de la UNV. La UNV está compuesta por células endoteliales, pericitos, astrocitos y neuronas. Los pericitos y los pies terminales de los astrocitos rodean las células endoteliales microvasculares cerebrales. Las células endoteliales adyacentes están conectadas principalmente por uniones estrechas. Modificada de Yu et al., 2020.	2
Figura 2. Tipos de uniones endoteliales en la microvasculatura cerebral. Modificada de Abbott et al 2010.	3
1.2 BHE y enfermedades neurodegenerativas	4
1.3 Epilepsia	4
1.3.1 Epilepsia y BHE	5
1.4 Sistema endocanabinoide	7
1.4.1 Endocannabinoides	7
1.4.2 Receptores a endocannabinoides	9
1.5 BHE y receptores CB ₁ y CB ₂	9
2. JUSTIFICACIÓN	11
3. HIPÓTESIS	11
4. OBJETIVOS	12

4.1 Objetivo general.....	12
4.2 Objetivos específicos	12
5. METODOLOGÍA GENERAL.....	13
5.1 Selección de pacientes y recolección del tejido	13
5.1.1 Criterios de inclusión	13
5.1.2 Criterios de exclusión.....	13
5.1.3 Obtención de las muestras de pacientes con ELTMF	14
5.1.4 Obtención de las muestras de autopsias	14
5.2. Estandarización del aislamiento y caracterización de la UNV	16
5.2.1 Aislamiento de la UNV	17
5.2.2 Caracterización de las células endoteliales, pericitos y astrocitos.	17
5.3.2 Cuantificación de proteínas	20
5.3.3 Evaluación de la expresión de las proteínas claudina-5, ocludina ZO-1 y los receptores CB ₁ y CB ₂ por Western Blot	20
5.3.4 Inmunofluorescencia para el análisis de las proteínas claudina-5, ocludina, ZO-1 y los receptores CB ₁ y CB ₂	21
5.3.5 Análisis de resultados	21
5.4 Evaluación cualitativa de la co-localización de los receptores CB ₁ y CB ₂ con las proteínas de las uniones estrechas en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF	22
5.5 Capacidad de activación de la proteína G _{αi/o} de los receptores CB ₁ y CB ₂ en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF	22
5.5.1 Extracción de membranas para ensayos de unión con [³⁵S]-GTP_γS.....	22
5.5.2 Cuantificación de proteínas.....	23
5.5.3 Ensayos de unión de [³⁵ S]-GTP _γ S en membranas	23
5.5.4 Análisis de resultados	24
6. RESULTADOS.....	24
6.1 Experimento 1. Estandarización del aislamiento y caracterización de la UNV	24
6.1.1 Discusión.....	26

6.2 Experimento 2. Evaluación de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF	27
6.2.1 UNV de hipocampo.....	27
6.2.1.1 Expresión de las proteínas de las uniones estrechas por Western blot	27
6.2.1.2. Expresión de las proteínas de las uniones estrechas por inmunofluorescencia	27
6.2.1.3 Correlaciones con variables clínicas	28
6.2.2 UNV de corteza temporal.....	30
6.2.2.1 Expresión de las proteínas de las uniones estrechas por Western blot	30
6.2.2.3 Correlaciones con variables clínicas	33
6.2.2.4 Discusión.....	35
6.3 Experimento 3. Evaluación de la expresión de los receptores CB ₁ y CB ₂ en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF.....	38
6.3.1 UNV de hipocampo	38
6.3.1.1 Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ por Western blot.....	38
6.3.1.3 Correlaciones con variables clínicas	39
6.3.2 UNV de corteza temporal.....	41
6.3.2.1 Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ por Western blot.....	41
6.3.2.2. Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ por Inmunofluorescencia	42
6.3.2.3 Correlaciones con variables clínicas	44
6.3.2.4 Discusión	46
6.4. Experimento 4. Evaluación cualitativa de la co-localización de los receptores CB₁ y CB₂ con las proteínas de las uniones estrechas en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF	48
6.4.1 UNV de hipocampo	49
6.4.2 UNV de corteza temporal.....	50

6.4.3 Discusión	52
6.5. Experimento 5. Capacidad de activación de la proteína $G\alpha_{i/o}$ de los receptores CB_1 y CB_2 en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF.....	54
6.5.1 UNV de hipocampo	54
6.5.1.1 Ensayos de unión de $[^{35}S]$-GTPγS para los receptores CB_1 y CB_2 en membranas	54
6.5.1.2 Correlaciones con variables clínicas	56
6.5.2 UNV de corteza temporal	58
6.5.2.1 Ensayos de unión de $[^{35}S]$-GTPγS para los receptores CB_1 y CB_2 en membranas	58
6.5.2.2 Correlaciones con variables clínicas	60
6.5.2.3 Discusión	63
7. DISCUSIÓN GENERAL	65
8. CONCLUSIÓN	72
9. PERSPECTIVAS	72
10. REFERENCIAS	73

.....	I
Índice de figuras	VI
Índice de tablas.....	VIII
Abreviaturas	IX
Resumen.....	X
Abstract.....	XI

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la UNV.....	2
Figura 2. Tipos de uniones endoteliales en la microvasculatura cerebral	3
Figura 3. Mecanismos de síntesis y degradación de AEA y 2-AG.....	8
Figura 4. Fotografías representativas de la UNV aislada de tejido congelado de hipocampo de autopsias y de pacientes con ELTMF.....	26
Figura 5. Expresión de las proteínas claudina-5 y ocludina en la UNV de hipocampo	29
Figura 6. Expresión de las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de la UNV de hipocampo por inmnofluorescencia	30
Figura 7. Expresión de las proteínas claudina-5 y ocludina en la UNV de corteza temporal	32
Figura 8. Expresión de las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de la UNV de hipocampo por inmnofluorescencia	34
Figura 9. Representación de la correlación entre expresión de claudina-5 en la UNV de corteza temporal y las variables clínicas de los pacientes con ELTMF.....	35
Figura 10. Representación de la correlación entre el número de FAE y la expresión del receptor CB ₂ en la UNV de hipocampo y las variables clínicas de los pacientes con ELTMF	41
Figura 11. Expresión de los receptores CB ₁ y CB ₂ en la UNV de hipocampo y corteza temporal	43
Figura 12. Expresión de los receptores CB ₁ y CB ₂ en MV de la UNV de hipocampo y corteza temporal por inmnofluorescencia	45
Figura 13. Representación de la correlación entre el número de fármacos antiepilépticos (FAE) y la expresión del receptor CB ₁ en la UNV de corteza temporal de los pacientes con ELTMF	47
Figura 14. Expresión de CB ₁ , claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTMF	51

Figura 15. Expresión de CB ₂ , claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTMF	51
Figura 16. Expresión de CB ₁ , claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF	52
Figura 17. Expresión de CB ₂ , claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF	53
Figura 18. Representación de la unión de [³⁵ S]-GTPγS estimulada por la activación del receptor CB ₁ y CB ₂ en membranas la UNV de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTMF	56
Figura 19. Representación de la correlación entre los valores de pEC ₅₀ del receptor CB ₁ y las variables clínicas de los pacientes con ELTMF	59
Figura 20. Representación de la Unión de [³⁵ S]-GTPγS estimulada por la activación del receptor CB ₁ y CB ₂ en membranas la UNV de corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF	60
Figura 21. Representación de la correlación entre los valores de E _{max} y pEC ₅₀ del receptor CB ₂ y la frecuencia de crisis (mes) en la UNV de corteza temporal de los pacientes con ELTMF	61
Figura 22. Modulación de la expresión de las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1 por los receptores CB ₁ y CB ₂	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables clínicas de los pacientes con ELTMF.....	15
Tabla 2. Variables clínicas de las Autopsias.	16
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para los experimento de Western blot e inmunofluorescencia.....	19
Tabla 4. Correlación de expresión de proteínas de las uniones estrechas y variables clínicas en hipocampo.....	31
Tabla 5. Correlación de expresión de proteínas de las uniones estrechas y variables clínicas en corteza temporal	36
Tabla 6. Correlación de expresión de los receptores CB ₁ y CB ₂ con las variables clínicas en hipocampo	42
Tabla 7. Correlación de expresión de los receptores CB ₁ y CB ₂ con las variables clínicas en corteza temporal	47
Tabla 8. Valores de E _{max} y pEC ₅₀ para la unión de [³⁵ S]-GTPγS inducida por la activación de los receptores CB ₁ y CB ₂ en la UNV de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTMF.	57
Tabla 9. Correlación de los valores de E _{max} y pEC ₅₀ de los receptores CB ₁ y CB ₂ con las variables clínicas en hipocampo	58
Tabla 10. Valores de E _{max} y pEC ₅₀ para la unión de [³⁵ S]-GTPγS inducida por la activación de los receptores CB ₁ y CB ₂ en la UNV de corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF.	61
Tabla 11. Correlación de los valores de E _{max} y pEC ₅₀ de los receptores CB ₁ y CB ₂ con las variables clínicas en corteza temporal	63

ABREVIATURAS

[³⁵ S]-GTP γ S	Guanosina 5'-O-[γ -tio]-trifosfato marcado con ³⁵ S
2-AG	2- araquidonoilglicerol
AEA	Anandamida
BHE	Barrera hematoencefálica
CB ₁	Receptor canabinoide 1
CB ₂	Receptor canabinoide 2
dpm	Desintegraciones por minuto
ELT	Epilepsia del lóbulo temporal
ELTM	Epilepsia del lóbulo temporal mesial
ELTMF	Epilepsia del lóbulo temporal mesial farmacorresistente
FAAH	Enzima amida hidrolasa de ácidos grasos
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GTP	Trifosfato de guanosina
IL-1 β	Interleucina-1 β
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
MAGL	Enzima monoacilglicerol lipasa
MAGUK	Proteína guanilato-cinasa asociada a la membrana
PDGFR- β	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo β
SEMEFO	Servicio Médico Forense
SNC	Sistema nervioso central
THC	Δ 9-Tetrahidrocannabinol
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
UNV	Unidad neurovascular
VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular A
VEGFR-2	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
ZO-1	Zónula occludens 1

RESUMEN

La barrera hematoencefálica (BHE) describe la función de la unidad neurovascular (UNV) en el sistema nervioso central (SNC). En la UNV, las células endoteliales se encuentran ensambladas especialmente por uniones estrechas. Este tipo de uniones son las responsables de formar una barrera que restringe selectivamente la difusión de sustancias del torrente sanguíneo hacia SNC. Las uniones estrechas están conformadas principalmente por claudina-5, ocludina y zónula ocludens-1 (ZO-1). Por otro lado, los receptores cannabinoides 1 y 2 (CB₁ y CB₂, respectivamente) juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la BHE. Asimismo, la disfunción de la UNV y, por consiguiente, de la BHE es común en los pacientes con epilepsia farmacorresistente. El objetivo del presente estudio fue caracterizar la expresión de los receptores CB₁ y CB₂, así como la activación de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ inducida por dichos receptores en la UNV aislada del cerebro de pacientes con epilepsia del lóbulo temporal mesial resistente a fármacos (ELTMF). Adicionalmente, se investigó su asociación con la integridad de la BHE. La UNV se aisló del hipocampo y la corteza temporal de 12 pacientes con ELTMF y 12 autopsias. Se realizaron experimentos de inmunofluorescencia (IF) para determinar la expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de pacientes con ELTMF y autopsias así como su colocalización con las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1. Los niveles de expresión de las proteínas claudina-5, ocludina, ZO-1 y los receptores CB₁ y CB₂ se determinaron mediante experimentos de Western blot. Se utilizaron ensayos de unión con [³⁵S]-GTP γ S para evaluar la activación de la proteína G $\alpha_{i/o}$ inducida por agonistas selectivos. El doble marcaje con IF mostró que los receptores CB₁ y CB₂ colocalizan con proteínas de las uniones estrechas, GFAP, CD34 y PDGFR- β . Estos resultados indican que los receptores CB₁ y CB₂ se expresan en los componentes de la UNV. La UNV del hipocampo y de la corteza temporal mostró un aumento en la expresión de claudina-5 (34% y 103%, respectivamente; p<0.05). La expresión de ocludina presentó una disminución en la UNV tanto del hipocampo como la corteza temporal (49% y 72%, respectivamente; p<0.001). También la expresión de ZO-1 presentó una disminución en la UNV del hipocampo y de la corteza temporal (63% y 58%, respectivamente; p<0.05). La UNV del hipocampo de pacientes con ELTMF presentó una menor expresión de los receptores CB₁ y CB₂ (66 y 43%, respectivamente; p<0,001). Sin embargo, la activación de la proteína G $\alpha_{i/o}$ mostró alta eficacia (CB₁, 251%, p <0,0008; CB₂, 255%, p <0,0001). La UNV de la corteza temporal presentó sobreexpresión de los receptores CB₁ y CB₂ (35 y 41%, respectivamente; p <0,01). La activación de la proteína G $\alpha_{i/o}$ presentó mayor eficacia para los receptores CB₁ (103%, p <0,006), pero menor potencia (p <0,004) para los receptores CB₂. El presente estudio reveló cambios opuestos en la expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en hipocampo y corteza temporal. Sin embargo, ambos receptores mostraron una alta eficacia para la activación de proteínas G $\alpha_{i/o}$. Los receptores CB₁ y CB₂ podrían representar un blanco terapéutico para mantener la integridad de la BHE en pacientes con ELTMF.

ABSTRACT

The blood-brain barrier (BBB) describes the function of the neurovascular unit (NVU) in the central nervous system (CNS). In the NVU, endothelial cells are especially tight junctions. These types of junctions are responsible for forming a barrier that selectively restricts the diffusion of substances from the bloodstream to the CNS. Tight junctions are mainly made up of claudin-5, occludin, and zonule occludens-1 (ZO-1). On the other hand, cannabinoid receptors 1 and 2 (CB₁ and CB₂, respectively) play an important role in maintaining the integrity of the BBB. Also, dysfunction of the NVU and therefore the BBB is common in patients with drug-resistant epilepsy. The objective of the present study was to characterize the expression of the CB₁ and CB₂ receptors, as well as the activation of the G $\alpha_{i/o}$ proteins induced by these receptors in the NVU isolated from the brain of patients with drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy (DR-TLE). Additionally, its association with the integrity of the BBB was investigated. NVU was isolated from the hippocampus and temporal cortex of 12 patients with DR-TLE and 12 autopsies. Immunofluorescence (IF) experiments were performed to determine the expression of CB₁ and CB₂ receptors in the NVU of patients with ELTMF and autopsies, as well as their colocalization with claudin-5, occludin and ZO-1 proteins. The expression levels of the claudin-5, occludin, ZO-1 proteins and the CB₁ and CB₂ receptors were determined by Western blot experiments. The [³⁵S]-GTP γ S binding assays were used to assess G $\alpha_{i/o}$ proteins activation induced by selective agonists. Double IF labeling showed that CB₁ and CB₂ receptors colocalize with tight junction proteins, GFAP, CD34 and PDGFR- β . These results indicate that the CB₁ and CB₂ receptors are expressed in the components of the UNV. The UNV of the hippocampus and temporal cortex showed an increase of claudin-5 expression (34% and 103%, respectively; $p < 0.05$). The expression of occludin showed a decrease in the NVU of both the hippocampus and the temporal cortex (49% and 72%, respectively; $p < 0.001$). Also, the expression of ZO-1 presented a decrease in the NVU of the hippocampus and the temporal cortex (63% and 58%, respectively; $p < 0.05$). The NVU of the hippocampus of patients with ELTMF presented a lower expression of the CB₁ and CB₂ receptors (66 and 43%, respectively; $p < 0.001$). However, the activation of the G $\alpha_{i/o}$ protein showed high efficacy (CB₁, 251%, $p < 0.0008$; CB₂, 255%, $p < 0.0001$). The NVU of the temporal cortex showed overexpression of the CB₁ and CB₂ receptors (35 and 41%, respectively; $p < 0.01$). The activation of the G $\alpha_{i/o}$ protein was more effective for CB₁ receptors (103%, $p < 0.006$), but lower potency ($p < 0.004$) for CB₂ receptors. The present study revealed opposite changes in the expression of CB₁ and CB₂ receptors in the hippocampus and temporal cortex. However, both receptors showed high efficacy for the activation of G $\alpha_{i/o}$ proteins. The CB₁ and CB₂ receptors could represent a therapeutic target to maintain the integrity of the BBB in patients with DR-TLE.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura que desempeña un papel importante en la homeostasis del sistema nervioso central (SNC). Regula estrictamente la entrada de moléculas en el parénquima cerebral y previene el acceso de neurotoxinas y patógenos al mismo tiempo que promueve la salida de varias moléculas (Hawkins y Davis, 2005; Stanimirovic y Frieman, 2012). La BHE está conformada por células endoteliales, que forman la pared de los microvasos cerebrales. Las células endoteliales se encuentran rodeadas por pericitos, la lámina basal, los pies de los astrocitos y neuronas. En conjunto a esta estructura se le ha denominado unidad neurovascular (UNV) (Abbott et al., 2010). La interacción del endotelio con los componentes celulares y acelulares de la UNV es crucial para el mantenimiento de las propiedades de la BHE (Hawkins y Davis, 2005; Figura 1).

Las células endoteliales que forman los microvasos son el elemento celular central de la BHE. Las células endoteliales de SNC tienen características únicas en comparación con las células endoteliales de otros tejidos, por ejemplo: carecen de fenestraciones, y presentan mayor número de mitocondrias para cumplir con la demanda energética de la BHE. Además, expresan niveles bajos de moléculas de adhesión para células del sistema inmune (ICAM-1 y VCAM-1) y tienen tasas extremadamente bajas de transcitosis, lo que limita el movimiento paracelular y transcelular de moléculas (Abbott et al., 2006). Asimismo, muestran una alta densidad de uniones célula-célula (Rubbin y Staddon 1999; Woulgurg y Lippoldt 2002).

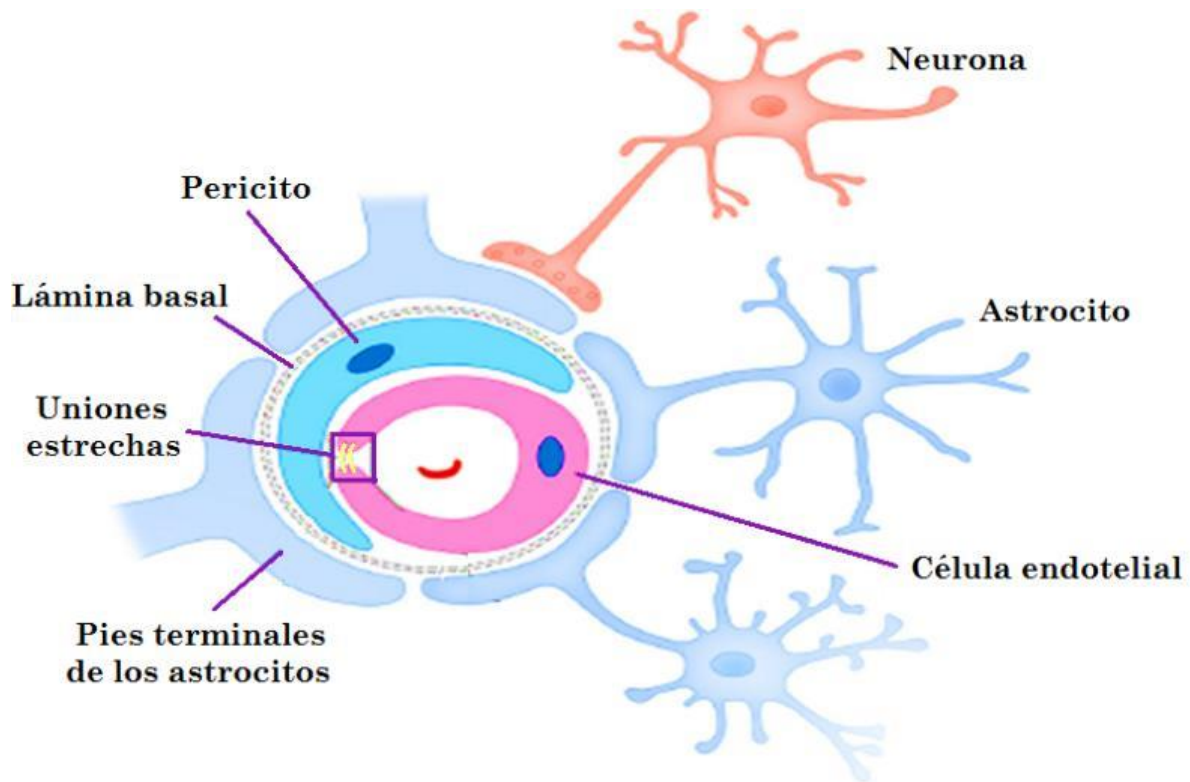


Figura 1. Estructura de la UNV. La UNV está compuesta por células endoteliales, pericitos, astrocitos y neuronas. Los pericitos y los pies terminales de los astrocitos rodean las células endoteliales microvasculares cerebrales. Las células endoteliales adyacentes están conectadas principalmente por uniones estrechas. Modificada de Yu et al., 2020.

Los complejos de unión entre las células endoteliales de la BHE comprenden las uniones adherentes y las uniones estrechas. Las uniones adherentes están conformadas por la proteína cadherina que abarca la hendidura intercelular y se encuentra unida a las proteínas α , β y γ cateninas que se encuentran en el citoplasma. Las uniones adherentes son las encargadas de dar soporte estructural a la BHE (Abbott et al., 2010). Por otro lado, las uniones estrechas entre las células endoteliales forman una barrera que restringe selectivamente la difusión de sustancias nocivas del torrente sanguíneo hacia SNC (Hawkins y Davis, 2005; Marchi et al., 2011). Las uniones estrechas están conformadas por las proteínas transmembranales claudina (principalmente claudina-5) y ocludina. Tanto la claudina como la ocludina se encuentran unidas a las

proteínas citoplasmáticas de la *Zonula occludens*, especialmente la tipo 1 (ZO-1; figura 2).

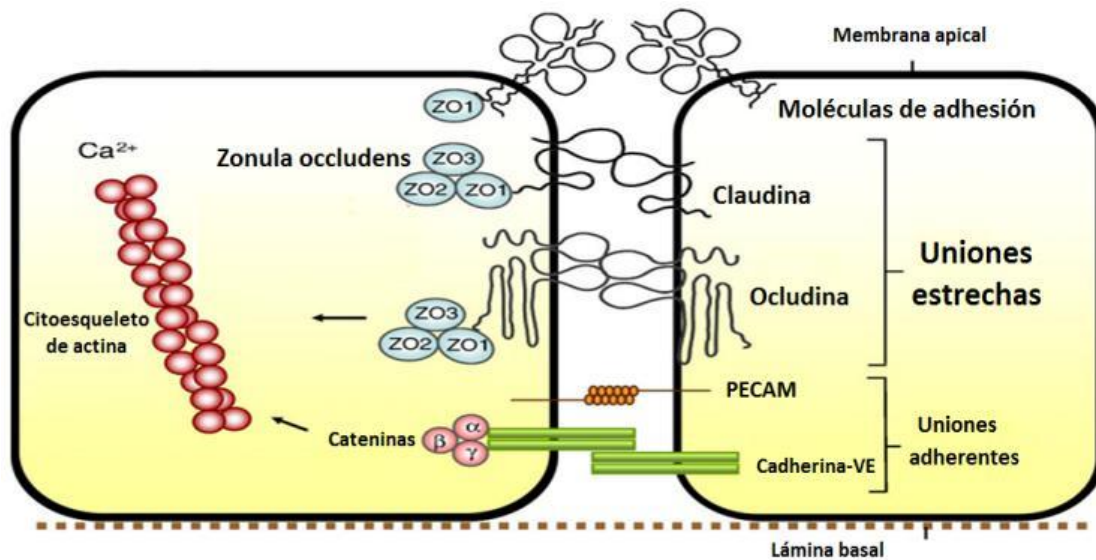


Figura 2. Tipos de uniones endoteliales en la microvasculatura cerebral. Modificada de Abbott et al 2010.

La proteína claudina presenta más de 24 isoformas identificadas, y su peso varía entre 20 - 24 kDa (Krause et al., 2008). Los isotipos de la proteína claudina muestran expresión específica del tejido y su presencia en las células se caracteriza por ser constitutiva y/o inducible. La proteína claudina-5 es constitutiva de la BHE (Nitta et al., 2003; Ohtsuki et al., 2008; Daneman et al., 2010) y es la encargada del sellado paracelular en la BHE.

La proteína ocludina es una fosfoproteína de 65 kDa, formada por cuatro segmentos transmembranales. Se ha sugerido que muestran interacciones homotípicas para disminuir la permeabilidad de la BHE (Saitou et al., 2000; Wong y Gumbiner, 1997). Las proteínas de la *zonula occludens* son las principales proteínas citoplasmáticas accesorias que participan en la formación de las uniones estrechas de la BHE. Su peso molecular varía entre 130 y 220 kDa y pertenecen a la familia de proteínas conocidas como proteína guanilato-cinasa asociada a la membrana (MAGUK) (Itoh, et al. 1999).

Existen varios mecanismos de regulación de las proteínas constitutivas de las uniones estrechas como: su expresión y localización, la integridad y dinámica de asociación con el citoesqueleto de actina y/o modificaciones post-transduccionales que afecten la interacción proteína-proteína (van-Vliet et al., 2014). Todos estos mecanismos son responsables de la integridad de las uniones estrechas y su función. Existen estudios que indican que las alteraciones en la expresión de proteínas de las uniones estrechas afectan directamente la permeabilidad de la BHE (Hawkins y Davis, 2005; Ueno, 2007).

Además, se ha reportado que procesos como excitotoxicidad, inflamación, y estrés oxidativo entre otros, promueven la liberación de factores que disminuyen la expresión de las proteínas de las uniones estrechas, situación que facilita la disfunción de la BHE (Kook et al., 2012).

1.2 BHE y enfermedades neurodegenerativas

La disfunción de la BHE es una característica común de varias enfermedades neurodegenerativas las cuales a su vez se asocian a procesos de excitotoxicidad, inflamación y/o estrés oxidativo. En estas patologías es difícil determinar si la disfunción de la BHE es uno de los eventos iniciales que conducen al desarrollo de la enfermedad o si es una consecuencia. Dentro de las enfermedades neurodegenerativas que presentan disfunción de la BHE se encuentran: la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer (Takeda et al., 2014; Palmer 2011), la enfermedad de Parkinson (Hirsch et al., 2012) y la epilepsia (González et al., 2014; Aronica y Crino, 2011).

1.3 Epilepsia

La epilepsia es un trastorno neurológico caracterizado por una predisposición permanente a presentar crisis epilépticas espontáneas y recurrentes, y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta afección (Fisher, 2015).

Dentro de los distintos tipos de epilepsia, la epilepsia focal de mayor prevalencia es la del lóbulo temporal (ELT), la cual afecta aproximadamente al 40% de los pacientes (de Lanerolle y Lee, 2005; Engel, 1996; Rzezak et al., 2014). En la ELT la actividad epiléptica se origina en estructuras que forman parte del sistema límbico del lóbulo temporal medial, entre las que se encuentran el hipocampo, la amígdala, la corteza entorrinal, y la neocorteza temporal lateral. Dependiendo de las estructuras cerebrales implicadas en la generación de las convulsiones, la ILAE subclasifica a la ELT en dos tipos: la epilepsia del lóbulo temporal mesial (ELTM) y la epilepsia del lóbulo temporal lateral (Engel, 2001).

Aproximadamente el 80% de los pacientes con ELTM presentan crisis epilépticas que tienen su origen en estructuras del lóbulo temporal como el hipocampo (Tatum 2012). La ELTM se manifiesta clínicamente por la presencia de crisis parciales complejas, las cuales como se mencionó anteriormente, se generan en la formación hipocampal (foco epiléptico) y se propagan a otras estructuras a través de la neocorteza temporal (Chagnac-Amitai y Connors, 1989; Chervin et al., 1988; Sloviter, 1994; DeFelipe et al 2002; Engel et al., 2012).

La mayoría de los pacientes con ELTM presentan resistencia al tratamiento farmacológico (Herranz y Argumosa, 2000). La farmacorresistencia se define como un fallo en el control de las crisis a pesar del uso de dos o más fármacos apropiados y bien tolerados, tomados en monoterapia o politerapia (Kwan et al., 2010).

1.3.1 Epilepsia y BHE

La disfunción de la BHE ha sido implicada en la fisiopatología de la epilepsia, porque tal condición podría contribuir con la progresión de la enfermedad y/o la resistencia a los medicamentos utilizados para su control (van Vliet et al., 2014).

Las crisis epilépticas se asocian con la liberación excesiva de glutamato, causando daño en las células que conforman la UNV y aumentando la permeabilidad de la BHE. El aumento de la permeabilidad de la BHE facilita la extravasación de proteínas plasmáticas (Vazana et al., 2016; Librizzi et al., 2012), lo que favorece el paso de leucocitos hacia el parénquima cerebral y la activación de procesos inflamatorios (Gorter et al., 2019). Estos eventos generan gliosis, neuroinflamación y excitotoxicidad crónicas así como reorganización estructural neuronal y vascular aberrante lo que facilita la generación de más crisis epilépticas (Seiffert et al., 2004; Marchi et al., 2007; Gorter et al., 2015; Janigro, 2012; Marchi et al., 2012; DeFelipe 2002).

Por otro lado, en distintos estudios se reporta decremento de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas que se establecen entre las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales, y se cree que esto contribuye a los cambios en la permeabilidad de la BHE. Estas observaciones se han realizado tanto en el tejido cerebral de pacientes con epilepsia como en modelos animales de este padecimiento (Lamas et al., 2002; Rigau et al., 2007; Ahishali et al., 2010; Michalak et al., 2013; Gürses et al., 2013).

Castañeda-Cabral et al. (2020a) describieron que los vasos sanguíneos cerebrales obtenidos de pacientes con ELTMF o epilepsia secundaria a lesión cerebral muestra un decremento en la expresión de ocludina y ZO-1 asociada con una alta expresión de proteínas VEGF-A, VEGFR-2 y claudina-5. Además, los niveles de expresión proteica de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α y su receptor TNF-R1, así como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), un marcador de estrés oxidativo, se encuentran incrementados en la microvasculatura de pacientes con ELTMF (Castañeda-Cabral et al., 2020b). Estos cambios sugieren alteraciones importantes en la integridad de la BHE que pueden contribuir a la patogenia de la epilepsia.

Recientemente se ha encontrado que existen moléculas que participan en la regulación de la permeabilidad de la BHE cuya alteración facilita la disfunción cerebral. Entre estas, se ha propuesto que la actividad de los receptores cannabinoides, CB₁ y CB₂ tienen una participación significativa en el mantenimiento de la permeabilidad de la BHE (González-Mariscal et al., 2018).

1.4 Sistema endocannabinoides

Los cannabinoides son compuestos orgánicos de tipo terpenofenol presentes en la planta *Cannabis sativa*. Dentro de ese grupo de moléculas destaca el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) como principal sustancia psicoactiva. A partir del descubrimiento de esta sustancia en 1964 por Gaoni y Mechoulam, se identificó el sistema endocannabinoides, el cual está conformado por sus receptores, ligandos endógenos y las proteínas para su síntesis y degradación (Bisogno et al., 2005).

El sistema endocannabinoides está formado por moléculas de señalización lipídica (Piomelli, 2003), las cuales participan en la modulación de la comunicación sináptica retrógrada (Alger, 2002; Hashimoto et al., 2007). Además, el sistema endocannabinoides está involucrado en varios procesos fisiológicos y patológicos incluyendo nocicepción, apetito, metabolismo de lípidos, motilidad gastrointestinal, regulación cardiovascular, actividad motora, estado anímico y memoria (Izzo y Sharkey, 2010; Rodríguez et al., 2005). Este sistema también se involucra en procesos de angiogénesis (Solinas et al., 2012), inflamación (Rom y Persidsky, 2013), cáncer (Caffarel et al., 2012; De la Ossa et al., 2013), regulación de la BHE (Vendel y Lange 2014; Gonzalez- Mariscal et al., 2018) y epilepsia (Hofmann y Frazier, 2013).

1.4.1 Endocannabinoides

Los principales endocannabinoides descritos hasta el momento son la N-araquidonoiletanolamina (Anandamida, AEA) y el 2- araquidonoilglicerol (2-AG). La síntesis de los endocannabinoides se da a través de la hidrólisis de

precursores lipídicos membranales (Di Marzo et al., 1999). Después de su síntesis, la AEA es hidrolizada y degradada rápidamente por la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (Di Marzo et al., 1998), mientras la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL) degrada el 2-AG (Cravatt et al., 1996). Los endocannabinoides son liberados bajo demanda en respuesta a diversos estímulos tanto fisiológicos como patológicos (Piomelli, 2003).

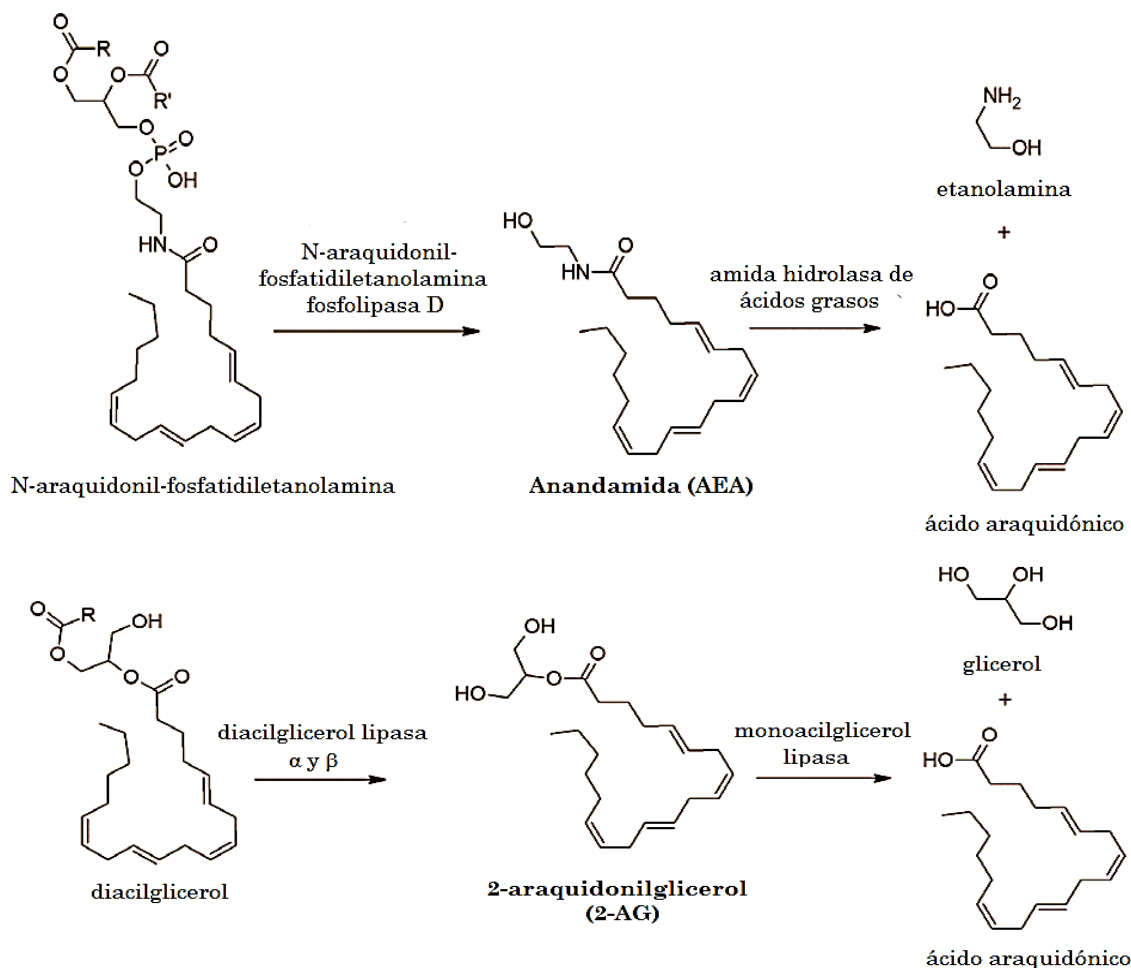


Figura 3. Mecanismos de síntesis y degradación de AEA y 2-AG. La AEA se forma principalmente a partir de N-araquidonil-fosfatidiletanolamina por N-araquidonil-fosfatidiletanolamina-fosfolipasa D y se degrada a etanolamina y ácido araquidónico por la amida hidrolasa de ácidos grasos. El 2-AG se forma principalmente a partir de diacilglicerol (α y β) y es degradado por la monoacilglicerol lipasa en glicerol y ácido araquidónico. Modificada de Brent, 2016.

1.4.2 Receptores a endocannabinoides

En 1990 se identificó el primer receptor endocannabinoide en tejido cerebral y se denominó receptor canabinoide tipo 1 (CB₁) (Matsuda et al., 1990). Más tarde, a nivel periférico, se identificó otro receptor para canabinoides, al cual se denominó receptor canabinoide tipo 2 (CB₂) (Munro et al., 1993). Los receptores CB₁ y CB₂ se encuentran acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ (Abood et al., 1996). Ambos receptores están compuestos por siete dominios transmembranales α -hélice y un dominio C-terminal de 73 aminoácidos (CB₁) o 59 aminoácidos (CB₂). La longitud total de los productos proteínicos más comunes es 472 aminoácidos para CB₁ y 360 para CB₂ (Matsuda et al., 1990; Munro et al., 1993).

La activación de los receptores CB₁ y CB₂ produce la inhibición de la adenilato ciclasa (Childers et al., 1993; Howlett et al., 2002), la activación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Bouaboula et al., 1995; Palazuelos et al., 2006), y activación de las proteínas Rho (Howlet y Aboot, 2017).

Por otro lado, se ha reportado que los endocannabinoides interactúan con otros GPCRs y canales iónicos. Entre ellos se encuentran los canales del receptor vanilloide tipo 1 (TRPV1; Szallasi et al., 2000), receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPAR; Pertwee et al., 2010) y los receptores huérfanos GPR55 y GPR18 (Ryberg et al., 2007).

1.5 BHE y receptores CB₁ y CB₂

Los receptores CB₁ y CB₂ se expresan en diferentes componentes de la UNV y podrían modular la permeabilidad de la BHE (Golech et al., 2004; Zong et al., 2017; Molina-Holgado et al., 2002). Mediante el uso de co-cultivos de células endoteliales y astrocitos de cerebro humano, se describe que la activación del receptor CB₁ evita la disminución de la expresión de las proteínas ZO-1, claudina-5 y JAM-1, y la consiguiente disfunción de la BHE (Lu et al. 2008). Por otra parte, la activación de los receptores CB₂ en células endoteliales disminuye la permeabilidad de la BHE, así como la expresión de proteínas de

las uniones estrechas y reduce los efectos neuroinflamatorios (Ramirez et al., 2012). Al respecto, se ha demostrado que los vasos sanguíneos de pacientes con esclerosis múltiple sobreexpresan al receptor CB₂ en placas inactivas crónicas (Zhang et al., 2011), un hallazgo que respalda su función protectora. Este grupo de evidencia respalda el papel protector de CB₁ y CB₂ en la integridad de BHE. Sin embargo, también existe evidencia que indica que la activación del receptor CB₁ disminuye la expresión de ZO-1 (Barutta et al., 2010).

Por otro lado, se ha demostrado que los receptores CB₁ y CB₂ tienen un efecto dual sobre la expresión de las proteínas de las uniones estrechas, pudiendo actuar en pro- o en contra de la integridad de estas. Este efecto dual depende del tiempo de activación (Maione et al., 2007; Di Marzo, 2008), así como de la disponibilidad de sus ligandos (Acquas et al., 2001).

Si bien es cierto que, la epilepsia altera a la BHE, al presente se desconoce si esta condición se asocia a cambios en el perfil de expresión y capacidad de activación de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de pacientes con ELTM. También se desconoce si estos cambios se asocian a alteraciones en la expresión de proteínas que integran las uniones estrechas.

El presente estudio se diseñó para caracterizar los niveles de expresión de proteínas y la activación inducida por las proteínas G $\alpha_{i/o}$ por receptores CB₁ y CB₂, así como correlacionarlos con el patrón de expresión de las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1 en la UNV aislada de hipocampo y corteza temporal de pacientes con ELTMF.

Inicialmente, los experimentos se enfocaron a estandarizar la técnica de la obtención de vasos sanguíneos de tejido cerebral humano congelado. Después, en los vasos sanguíneos aislados se analizó la expresión de las proteínas que conforman las uniones estrecha, así como los receptores cannabinoides y finalmente se evaluó la activación de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ acopladas a estos receptores.

2. JUSTIFICACIÓN

La UNV es una estructura importante para conservar la homeostasis del parénquima cerebral. Se ha sugerido que la ruptura de las uniones estrechas entre las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales puede contribuir a las alteraciones observadas en la permeabilidad de la BHE, lo que contribuye con el desarrollo o mantenimiento de enfermedades neurodegenerativas, como es el caso de la ELTMF. Por otro lado, se ha demostrado que los receptores canabinoides CB₁ y CB₂ tienen un efecto dual sobre la expresión de las proteínas de las uniones estrechas, pudiendo actuar a favor o en contra de la permeabilidad de la BHE. Sin embargo, en la UNV de pacientes con ELTMF se desconoce el perfil de expresión y capacidad de activación de los receptores canabinoides y si estas características se asocian con la expresión de proteínas que integran las uniones estrechas.

3. HIPÓTESIS

La expresión y la capacidad de activación de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ a través de los receptores CB₁ y CB₂ estarán aumentadas en la UNV de hipocampo y corteza temporal de pacientes con ELTMF, lo que se asociará a una disminución de la expresión de claudina-5, ocludina y ZO-1.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la expresión de los receptores CB₁ y CB₂, así como la capacidad de activación de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ acoplada a estos receptores en la UNV de correlacionarlos con el daño de la BHE de hipocampo y corteza temporal de pacientes con ELTMF.

4.2 Objetivos específicos

1. Aislar vasos sanguíneos de tejido congelado de hipocampo y corteza temporal de autopsias e individuos con ELTMF.
2. Analizar la expresión proteica de claudina-5, ocludina y ZO-1 en la UNV.
3. Evaluar la expresión de CB₁ y CB₂, así como su co-expresión con las proteínas de las uniones estrechas.
4. Analizar la activación de las proteínas G $\alpha_{i/o}$ acoplada a los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de autopsias e individuos con ELTMF.

5. METODOLOGÍA GENERAL

5.1 Selección de pacientes y recolección del tejido

El tejido cerebral se obtuvo de 12 pacientes diagnosticados con ELTMF. Los sujetos que participaron en este estudio son pacientes adultos del Programa de Cirugía de Epilepsia del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN), de la Ciudad de México (protocolo CEI/058/16).

5.1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes candidatos a cirugía de epilepsia con diagnóstico de ELTMF, evaluados por el PROGRAMA DE CIRUGÍA DE EPILEPSIA DEL INNN.
- Género masculino o femenino, con edad de 18 a 60 años.
- Que supieran leer y escribir, con capacidad para cooperación adecuada y coeficiente intelectual mayor de 90.
- Con valoración preoperatoria y neuropsicológica completa.
- Tener antecedentes de haber sido tratados farmacológicamente con politerapia por un espacio ininterrumpido de 2 años, sin haber mostrado mejoría.
- Que su epilepsia haya sido considerada un impedimento para realizar sus actividades cotidianas, asociándose a un deterioro en la calidad de vida.

5.1.2 Criterios de exclusión

- Padecimiento de enfermedades sistémicas graves que contraindicaran una neurocirugía mayor.
- Pacientes con diagnóstico de enfermedad neurodegenerativa.
- Falta de cooperación con el tratamiento.
- Presencia de implantes, prótesis metálicas y/o claustrofobia.
- Pacientes previamente sometidos a cirugía extratemporal por cualquier indicación.

- Pacientes que no hayan sido valorados adecuadamente.

5.1.3 Obtención de las muestras de pacientes con ELTMF

Cada paciente se sometió a una evaluación prequirúrgica, que incluyó video electroencefalograma (EEG), imágenes por resonancia magnética (IRM) y tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT, por sus siglas en inglés). Después, los pacientes se sometieron a una lobectomía anterior ipsilateral al foco epiléptico al menos 48 h después de la última crisis epiléptica. Durante el procedimiento quirúrgico, se realizaron biopsias de la corteza temporal y del hipocampo. Inmediatamente después de la resección, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento. En la tabla 1 se muestran las variables clínicas de los pacientes con ELTMF.

5.1.4 Obtención de las muestras de autopsias

Los resultados obtenidos de los pacientes con ELTMF se compararon con los de autopsias de 10 sujetos que fallecieron por causas no asociadas a trastornos neurológicos y sin antecedentes de los mismos. De las autopsias se obtuvieron muestras de hipocampo y corteza temporal las cuales se congelaron en hielo seco inmediatamente después de su resección y se almacenaron a -70°C hasta el día de su uso. La tabla 2 resume los datos clínicos de las autopsias empleadas.

Tabla 1. Variables clínicas de los pacientes con ELTMF.

Paciente	Edad (años)	Género	Edad de inicio de la epilepsia (años)	Duración de la epilepsia (años)	Frecuencia de crisis (por mes)	Fármacos antiepilépticos antes de la cirugía
461	18	F	9	9	4	

						CBZ, TPM, CNZ, LVT
428	45	M	8	37	3	PHT, VPA, CBZ, OXC, LTG, TPM, CZP
429	34	M	1	33	10	PHT,CBZ,TPM, CZP,CLB,LCM
434	32	F	3	29	4	PHE,OXC, LTG, TPM,LVT
454	26	F	2	26	5	CBZ,OXC
457	35	F	20	15	4	PHT,VPA,OXC
470	30	F	6	24	4	CBZ,TPM,CNZ,LVT
474	44	F	20	24	12	CBZ, CZP
516	17	F	16	1	16	PHT, LVT
517	25	M	24	1	20	VPA, LVT
534	29	F	6	23	8	CBZ, LVT
545	27	M	5	22	5	VPA, CBZ, OXC, TPM
Promedio	30.2 ± 2.5		10.0 ± 2.3	20.8 ± 3.3	7.9 ± 1.6	

CBZ, carbamazepina; CLB, clobazam; CNZ, clonazepam; CZP, clorazepato; F, femenino (n=8); LCM, lacosamida; LTG, lamotrigina; LVT, levetiracetam; M, masculino (n=4); OXC, oxcarbazepina; PHT, fenitoína; TPM, topiramato; VPA, ácido valproico. Los datos resumidos de edad, edad de inicio de la epilepsia, duración de la epilepsia y número de crisis por mes se expresa como la media ± error estándar de la media (SEM).

Tabla 2. Variables clínicas de las autopsias.

Autopsias	Edad	Género	Causa de muerte	IPM
-----------	------	--------	-----------------	-----

	(años)			(horas)
A1	29	M	Contusión visceral	13
A2	29	M	Policontusión	18
A6	49	F	Asfixia	18
A7	45	M	Asfixia	18
A8	73	M	Complicaciones de Diabetes Mellitus	15
A9	33	F	Traumatismo torácico	12
A11	12	F	Asfixia	14
A12	40	F	Herida proyectil arma de fuego	20
A14	45	F	Desconocido	10
A16	57	M	Infarto miocardio	18
A17	25	F	Herida punzocortante en tórax	18
A18	55	M	Trauma tóraco-lumbar	15
Promedio	41.0 ± 4.8			14.8 ± 3.7

F: femenino (n=8), M: masculino (n=4), IPM: intervalo postmortem. Los datos resumidos de edad e IPM se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM).

5.2. Estandarización del aislamiento y caracterización de la UNV

Las técnicas de aislamiento de la UNV reportadas en la literatura se enfocan en el aislamiento a partir de tejido fresco de roedores (Verszelka et al., 2007; Yun-Kyoung Lee et al., 2019). Considerando que las muestras del tejido de autopsias y de pacientes con ELTMF se almacenaron a -70°C se realizaron

modificaciones específicas al protocolo para aislar la UNV a partir de estos tejidos congelados.

5.2.1 Aislamiento de la UNV

La UNV se aisló realizando algunas modificaciones al protocolo descrito por Verszelka et al. (2007). Por ejemplo la solución amortiguadora de sacarosa fue sustituida por la solución amortiguadora Ringer Hepes (RH, [NaCl 150 mM, CaCl₂ 2.2 mM, MgCl₂ 0.2 mM, KCl 5.2 mM, Glucosa 2.8 mM, Hepes 5 mM, NaHCO₃ 6 mM, pH 7.4]). Además, utilizamos mallas para filtrar las muestras (100 y 40 µm) y realizamos lavados con RH-BSA 1%. A continuación se describe el protocolo utilizado.

Las muestras de tejido de corteza temporal e hipocampo se homogenizaron manualmente con pistón de politetrafluoroetileno (PTFE) con solución amortiguadora RH en una proporción de 4 ml/1 g de tejido, se utilizó hielo para mantener el tejido frío. Los homogenizados se centrifugaron a 1000 g, durante 15 min, a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en RH-dextrán al 17.5%, se centrifugó a 1500 g, durante 15 min, a 4°C. La pastilla resultante se resuspendió en 2 ml de RH con-BSA 1%, mientras que el sobrenadante, se centrifugó dos veces más para la obtención de una segunda y una tercer pastilla, respectivamente (bajo las mismas condiciones). Las tres pastillas se filtraron con una malla de 100 µm. El sobrenadante obtenido se filtró nuevamente con una malla de 40 µm. El filtrado se centrifugó a 1000 g, durante 10 min, a 4°C. Finalmente, la pastilla resultante de este último procedimiento se recolectó en un tubo Eppendorf y se almacenó a -70°C hasta su posterior uso.

5.2.2 Caracterización de las células endoteliales, pericitos y astrocitos.

Una muestra de cada pastilla se resuspendió 50 µl de solución amortiguadora RH y se analizó utilizando un microscopio invertido (Leica DMi1) para confirmar las características morfológicas de los microvasos cerebrales de autopsias y pacientes con ELTMF.

A continuación, se tomaron 20 μ l de las muestras, se montaron en portaobjetos previamente recubiertos con poli-L-lisina y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h. El tejido se fijó con acetona fría durante 90 minutos a 4 °C y se permeabilizó con PBS-0.25% Tritón X-100 durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente se realizó el bloqueo utilizando BSA-PBS al 3% durante 50 minutos a 4 °C. Los portaobjetos se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-CD34, anti-PDGFR- β o anti-GFAP (ver tabla de anticuerpos que se muestra al final de esta sección, Tabla 3). Después, se incubaron con anticuerpo secundario marcado con fluorescencia (Tabla 3) durante 2 h a 4 °C. A continuación, los portaobjetos se lavaron con PBS y se incubaron con Hoechst 33342 (1: 5000, Cat. H3570, Lot. 1724829, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), durante 5 minutos a temperatura ambiente para la tinción de núcleos. Finalmente, los portaobjetos se montaron con medio de montaje Vectashield para fluorescencia (Cat. CB-1000, Vector Laboratories Inc., EE. UU.). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal invertido Nikon Ti Eclipse equipado con un sistema de imágenes A1, los cuales fueron controlado por el programa NIS Elements v.4.50. Las imágenes fueron tomadas utilizando el objetivo de 20X (seco, NA 0,8) o 60X (inmersión en aceite, NA 1,4). Los fluoroforos se excitaron en modo secuencial utilizando las líneas láser incorporadas en el siguientes longitudes de onda: 403 nm (Hoechst) y 563 (Alexa Fluor 546). La fluorescencia correspondiente se leyó en los siguientes rangos usando juegos de filtros proporcionados por el fabricante: 425–475 nm (Hoechst 33342) y 570–620 nm (Alexa Fluor 546). La imágenes se adquirieron y analizaron utilizando NIS Elements v.4.50. e ImageJ v.1.50i, respectivamente.

Se consideró que se había aislado la UNV cuando el marcaje para astrocitos, pericitos y células endoteliales en nuestras muestras fue positivo, cada pastilla se dividió en tres fracciones para los siguientes experimentos: análisis por western blot, análisis por inmunofluorescencia y ensayo de unión. Las pastillas se almacenaron en la solución amortiguadora RH a -70 ° C hasta su uso.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para los experimento de Western blot e inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Isotipo	Dilución	Marca comercial	Número de catalogo
CD34	Monoclonal de ratón IgG	1:200 IF	Santa Cruz Biotechnology	sc-7324
GFAP	Policlonal de conejo IgG	1:200 IF	Dako	20334
PDGFR- β	Policlonal de conejo IgG	1:200 IF	Santa Cruz Biotechnology	sc-19995
CB ₁	Monoclonal de ratón IgG	1:1000 WB 1:200 IF	Santa Cruz Biotechnology	sc-293419
CB ₂	Monoclonal de ratón IgG	1:1000 WB 1:200 IF	Santa Cruz Biotechnology	sc-293188
Claudina-5	Policlonal de conejo IgG	1:500 WB 1:200 IF	Santa Cruz Biotechnology	sc-28670
Ocludina	Policlonal de conejo IgG	1:500 WB 1:200 IF	Biorbyt	orb412121
Zónula occludens-1	Policlonal de conejo IgG	1:500 WB 1:200 IF	Santa Cruz Biotechnology	sc-10804
β -actina	Monoclonal de ratón IgG	1:10000	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778
m-IgGk BP-HRP	Anti-ratón IgG	1:10000 WB	Santa Cruz Biotechnology	sc-516102
HRP anti-conejo	Cabra anti-conejo IgG	1:10000 WB	Vector Laboratories	PI-1000
Alexa Fluor 546	Cabra anti-conejo IgG	1:200 IF	Molecular Probes	A11035
Alexa Fluor 488	Anti-ratón IgG	1:200 IF	Jackson Immuno Research Labs	115545003

WB: western blot, IF: inmunofluorescencia.

5.3 Evaluación de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas y de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF

5.3.1 Extracción de proteínas para Western blot

Las muestras de UNV de autopsias y pacientes con ELTMF se homogenizaron en RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, pH

7.5). El amortiguador de lisis celular RIPA permite eficientemente la solubilización de proteínas, evitando su degradación al contener inhibidores de proteasas (Complete Roche Diagnostics GmbH, Alemania). A continuación, las muestras se centrifugaron por 10 min a 14000 rpm a 4°C y finalmente se recolectó el sobrenadante, el cual se congeló en alícuotas a -70°C.

5.3.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó para determinar la concentración de proteínas totales tanto en las muestras de autopsias como de pacientes con ELTMF.

La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo el método de Bradford (1976). Para ello se colocó cada una de las muestras (por duplicado) en una placa de 96 pozos. En seguida, se adicionó el reactivo de Bradford (BioRad). La preparación se incubó a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 10 minutos. Finalmente, las mediciones de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 595 nm del detector de absorbancia en microplaca (iMark™) de la marca Biorad y sus valores se interpolaron en una curva estándar de albúmina de suero bovino.

5.3.3 Evaluación de la expresión de las proteínas claudina-5, ocludina ZO-1 y los receptores CB₁ y CB₂ por Western Blot

Alícuotas de 50 µg de proteína fueron analizadas por medio de SDS-PAGE al 10% y transferidas en membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, BioRad). Las membranas se bloquearon por 2 h a temperatura ambiente con leche baja en grasa al 5% en TBS-Tween al 0.1%. Después, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti claudina-5, ocludina y ZO-1 o con los anticuerpos primarios anti-CB₁ o CB₂. Todos los anticuerpos se utilizaron a una dilución de 1:200 (Tabla 3). Las membranas se lavaron con TBS-T al 0.1% y se incubaron por 1 hora con el anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón correspondiente a una dilución de 1:10000. Como control de carga, se determinó la presencia de la proteína

constitutiva β -actina (Tabla 3). Finalmente, las membranas se expusieron a un sustrato quimioluminiscente (Clarity™ Western ECL Blotting Substrates, BioRad) que permitió revelar la expresión de las proteínas de interés en un imagen fotográfica mediante el equipo ChemiDoc™XRS+ImagingSystem (BioRad) para el posterior análisis densitométrico de las bandas mediante el programa ImageJ v.1.50i.

5.3.4 Inmunofluorescencia para el análisis de las proteínas claudina-5, ocludina, ZO-1 y los receptores CB₁ y CB₂

Las muestras de UNV fueron procesadas como se describió previamente (sección 5.2.2) utilizando los anticuerpos primarios policlonales de conejo para las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1 y los anticuerpos secundarios correspondientes. Para los receptores CB₁ y CB₂ se utilizaron los anticuerpos primarios de ratón y los respectivos anticuerpos secundarios (Tabla 3).

5.3.5 Análisis de resultados

Para el análisis de la presencia de células endoteliales, astrocitos y pericitos se realizó un análisis cualitativo de los resultados obtenidos por inmunofluorescencia. Respecto a la evaluación de la expresión de las proteínas claudina-5, ocludina, ZO-1 y los receptores CB₁ y CB₂ por Western blot e inmunofluorescencia se utilizó la prueba t de Student. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para determinar la posible influencia de las condiciones clínicas en los resultados experimentales. Los valores se expresaron como la media \pm el error estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad (v.6.01 EE. UU.). En todos los casos se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$. Se analizaron tres campos en tres laminillas independientes

5.4 Evaluación cualitativa de la co-localización de los receptores CB₁ y CB₂ con las proteínas de las uniones estrechas en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF

Las muestras de UNV fueron procesados como se describió previamente en la sección 5.2.2 para la expresión de cada uno de los componentes de la UNV (CD34, GFAP o PDGFR- β). Los portaobjetos se incubaron durante la noche a 4 °C con cada anticuerpo primario claudina-5, ocludina o ZO-1 (Tabla 3) en conjunto con los anticuerpos CB₁ o CB₂. Posteriormente se realizó la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (Alexa Fluor 546 anti-conejo, A11035, Molecular Probes y Alexa Fluor 488 anti-ratón, 115545003, Jackson Immuno Research Labs; Tabla 3).

5.5 Capacidad de activación de la proteína G $\alpha_{i/o}$ de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF

5.5.1 Extracción de membranas para ensayos de unión con [³⁵S]-GTP γ S

Para obtención de membranas, las muestras de UNV previamente obtenidas (ver sección 5.2.1) se resuspendieron en la solución amortiguadora A (Tris-EDTA 2 mM, sacarosa 320 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 5mg/ml, MgCl₂ 5 mM, pH 7.4; en relación peso/volumen = 1g/4ml del amortiguador) y se colocaron en un homogenizador. Después de realizarse la homogenización, las muestras se centrifugaron a 1000 g, durante 10 min, a 4°C. El primer sobrenadante (SN1) obtenido se colocó en un tubo nuevo a 4°C. La pastilla se resuspendió en el mismo volumen de solución amortiguadora A y se centrifugó nuevamente a 1000 g durante 10 min a 4°C. El segundo sobrenadante (SN2) se adicionó al SN1. Se repitió el mismo procedimiento para obtener un tercer sobrenadante (SN3) y se descartó la pastilla. El sobrenadante total (SN1+SN2+SN3) se centrifugó a 39000 g durante 30 min a 4°C. La pastilla resultante, se resuspendió en la solución amortiguadora B (Tris-HCl 50 mM, Tris-EDTA 2 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 7.4). Esta última pastilla, que contenía las membranas de las células de la UNV, se congeló en alícuotas a -70°C.

5.5.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó como se describió previamente en la sección 5.3.2.

5.5.3 Ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS en membranas

Para llevar a cabo los ensayos de unión con [³⁵S]-GTPγS, se tomaron 8 μg de proteína de las membranas y fueron incubadas (60 min, 30°C) en 0.8 ml de solución de ensayo C (Tris-HCl 50 mM, Tris-EDTA 2 mM, MgCl₂, BSA 5 mg/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 50 μM, pH 7.4), [³⁵S]-GTPγS (100 μM), y concentraciones crecientes de los agonistas selectivos para el receptor CB₁ (Metanandamida) o el agonista selectivo para CB₂ (CB 65), 10⁻⁹-10⁻⁴, respectivamente, en presencia de GDP (100 μM). La unión total fue determinada en ausencia del agonista mientras la unión no específica fue obtenida en presencia del GTPγS no marcado (100 μM). La unión específica se calculó al restar la unión inespecífica de la unión total. La reacción se inició al añadir [³⁵S]-GTPγS y se detuvo al filtrar las muestras a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B. Los filtros se lavaron tres veces con solución amortiguadora D (Tris-HCl 50 mM, 1 mg/ml BSA, pH 7.4, 4°C). Los filtros se sumergieron en el líquido de centelleo Sigma-Fluor™ y se agregó 500 μl de Tritón al 0.1% en solución amortiguadora D, posteriormente, se colocaron en un vial para cuantificar la radioactividad presente por centellometría con un detector Beckman. Los valores finales expresados en % de activación fueron analizados por regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prisma, Inc., para determinar los valores de concentración efectiva media (EC₅₀, la cual nos indica la concentración que produce el 50% del efecto del agonista) y de estimulación máxima (E_{max}, que nos indica el efecto máximo de un agonista).

5.5.4 Análisis de resultados

Para la evaluación de la capacidad de activación de las proteínas $G\alpha_{i/o}$ de los receptores CB_1 y CB_2 por los ensayos de unión se utilizó la prueba t de Student. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para determinar la posible influencia de las condiciones clínicas en los resultados experimentales. Los valores se expresaron como la media \pm el error estándar. Para el análisis estadístico se utilizó GraphPad Software Inc. (v.6.01 EE. UU.). En todos los casos se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1. Estandarización del aislamiento y caracterización de la UNV

Los resultados de inmunofluorescencia para el marcaje de la proteína CD34 (verde) como indicador de células endoteliales fue positivo a lo largo de la membrana de los microvasos cerebrales, tanto en las autopsias como en los pacientes con ELTMF (Figura 1, B y F). En relación al análisis para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para evaluar la presencia de astrocitos, los

resultados mostraron la expresión de esta proteína (rojo) en segmentos de la membrana de las células endoteliales en ambos grupos de estudio. Finalmente, analizamos la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo β beta (PDGFR- β) para confirmar la presencia de pericitos. El marcaje del PDGFR- β (rojo) de manera similar que para GFAP se encontró en segmentos de la membrana de las células endoteliales tanto en autopsias como en pacientes con ELTMF (Figura 1).

Los resultados obtenidos del presente experimento indican la presencia de los componentes de la UNV (células endoteliales, astrocitos y pericitos) en nuestras muestras. No se realizó la cuantificación de la expresión por inmunofluorescencia ya que la intención sólo fue realizar un análisis cualitativo, sin embargo, no se encontró ninguna diferencia importante.

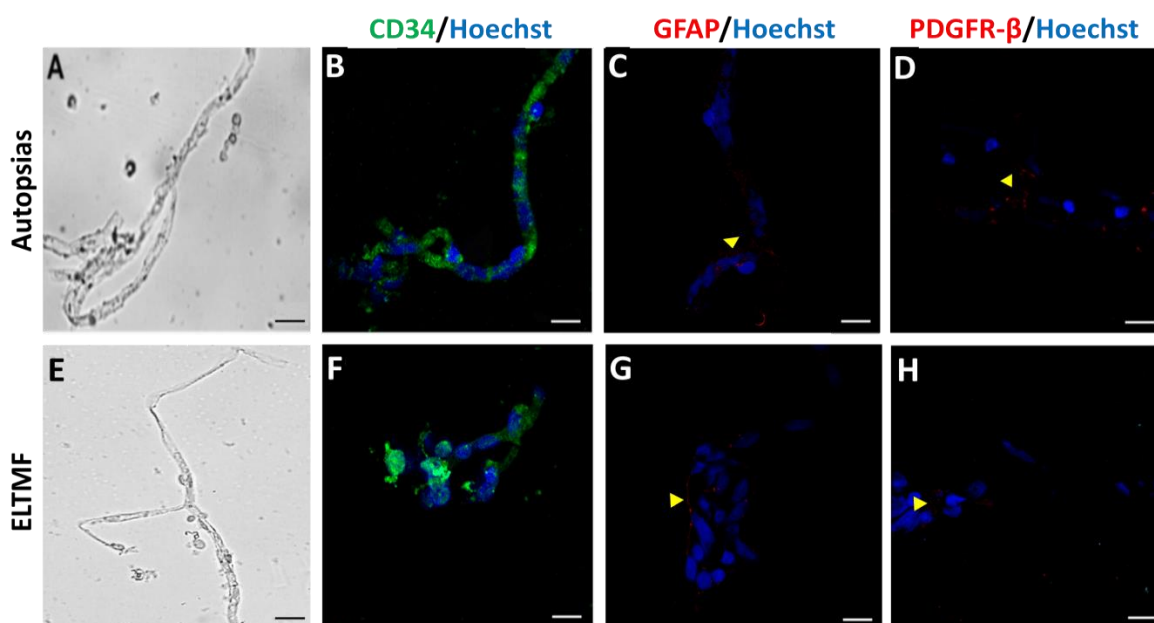


Figura 4. Fotografías representativas de la UNV aislada de tejido congelado de hipocampo de autopsias (A, B, C y D) y de pacientes con ELTMF (E, F, G y H). Las imágenes de los microvasos aislados se obtuvieron con el objetivo de 40X (A y E). La expresión de la proteína CD34 se observa en verde en las células endoteliales de los microvasos cerebrales de autopsias (B) y pacientes con ELTMF (F). La expresión de GFAP, de astrocitos se marca en rojo (puntas de flecha) en muestras de autopsias (C) y pacientes con ELTMF (D). La expresión de PDGFR- β se observa en rojo (puntas de flecha) en muestras de

autopsias (D) y pacientes con ELTMF (F). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul) en autopsias y pacientes (B, C, D, F, G y H). Barra de calibración 20 μ m. Se muestran imágenes de un experimento representativo de tres realizados.

6.1.1 Discusión

Las técnicas de aislamiento de la UNV reportadas en la literatura se enfocan en el aislamiento a partir de tejido fresco de roedores (Wu et al., 2003, Verszelka et al., 2007). Por lo anterior, realizamos modificaciones específicas al protocolo de Verselka et al., (2007) que nos permitieron aislar la UNV a partir de tejido congelado humano.

Se han reportado evidencias que indican que los protocolos de aislamiento de la microvasculatura cerebral de roedores que incluyen digestiones enzimáticas producen muestras consistentes en términos del tamaño de los microvasos y la composición celular (Wu et al., 2003; Munikoti et al., 2012). Sin embargo, el uso de enzimas exógenas y la incubación a 37°C comprometen la integridad del ARN y producen cambios en la activación de fosfoproteínas (Yun-Kyoung Lee et al., 2019). Asimismo, se ha reportado que, al excluir el paso de digestión, las muestras contenían residuos celulares (Wu et al., 2003). Sin embargo, encontramos que al retirar las meninges mediante rodamiento del tejido en papel filtro (Veszka et al., 2007), y la realización de una homogenización del tejido adecuada y lavados con RH-BSA al 1% se disminuye considerablemente la presencia de residuos celulares (datos no mostrados).

Nuestros resultados muestran que las modificaciones al protocolo descrito por Verszelka et al. (2007) permiten el aislamiento de la UNV de hipocampo congelado de autopsias y pacientes con ELTMF, sin la necesidad de digestiones enzimáticas. La evaluación de la morfología de las muestras de la UNV aisladas utilizando un microscopio invertido mostró una composición semejante a células endoteliales, resultado que se confirmó con el marcador CD34 (Zhang et al., 2001). Adicionalmente, la preparación presentó pies de astrocitos que se marcaron con el marcador de GFAP y pericitos con el marcador de PDGFR- β .

Con base en los resultados de este experimento, el siguiente se enfocó a evaluar la expresión de las proteínas que conforman las uniones estrechas en los vasos sanguíneos de autopsias y pacientes con ELTMF en tejido congelado.

6.2 Experimento 2. Evaluación de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF

Una vez que comprobamos que aislamos la UNV a partir de tejido cerebral congelado de autopsias y pacientes con ELTMF se decidió investigar el patrón de expresión de las proteínas que conforman a las uniones estrechas de la BHE. Para ello el tejido aislado se procesó con las técnicas de Western blot e inmunofluorescencia.

6.2.1 UNV de hipocampo

6.2.1.1 Expresión de las proteínas de las uniones estrechas por Western blot

En el grupo de autopsias claudina-5 mostró una expresión relativa a la Beta-actina de 0.76 ± 0.12 . En el grupo de los pacientes con ELTMF la expresión de claudina-5 aumentó 34% ($p < 0.05$) con respecto al grupo de autopsias (Figura 2).

La expresión de ocludina en el grupo de autopsias fue de 1.02 ± 0.09 . Con respecto a los pacientes con ELTMF la expresión de ocludina disminuyó 49% ($p < 0.001$) con respecto a las autopsias (Figura 2).

6.2.1.2. Expresión de las proteínas de las uniones estrechas por inmunofluorescencia

La expresión relativa de las proteínas de las uniones estrechas por inmunofluorescencia para claudina-5, ocludina y ZO-1 fueron de 8.92 ± 1.23 , 17.65 ± 1.58 y 15.65 ± 2.35 respectivamente, en el grupo de autopsias. En este grupo las tinciones de claudina-5, ocludina y ZO-1 presentaron un patrón de expresión lineal y continuo (Figura 3).

En el grupo de los pacientes con ELTMF las proteínas de las uniones estrechas mostraron un incremento en la expresión de claudina-5 del 144% ($p < 0.01$), un

decremento del 47% ($p < 0.05$) en la expresión de ocludina así como también un decremento del 63% ($p < 0.05$) en la expresión de ZO-1. A diferencia del grupo de autopsias, en los pacientes con ELTMF las proteínas de las uniones estrechas perdieron la linealidad y continuidad en su expresión (Figura 3).

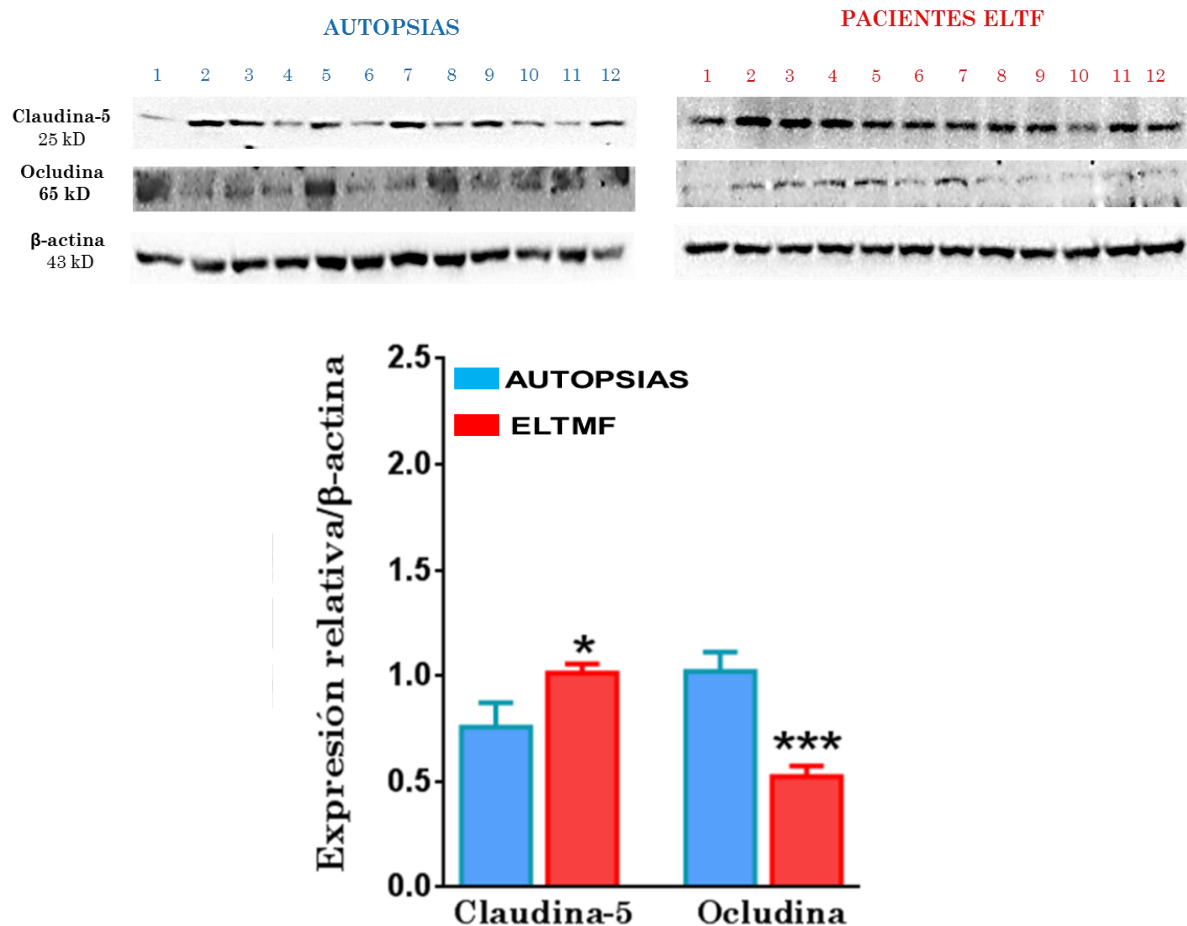


Figura 5. Expresión de las proteínas claudina-5 y ocludina en la UNV obtenida de hipocampo extraída del grupo de autopsias y del grupo ELTMF. Los datos se normalizaron contra β -actina y se expresan como promedio \pm el error estándar. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Prueba *t* de student. (n=12).

6.2.1.3 Correlaciones con variables clínicas

En la UNV de hipocampo de las autopsias y los pacientes con ELTMF los niveles de expresión de claudina-5 y ocludina obtenidos por western blot no mostraron ninguna correlación con las variables clínicas (Tabla 4).

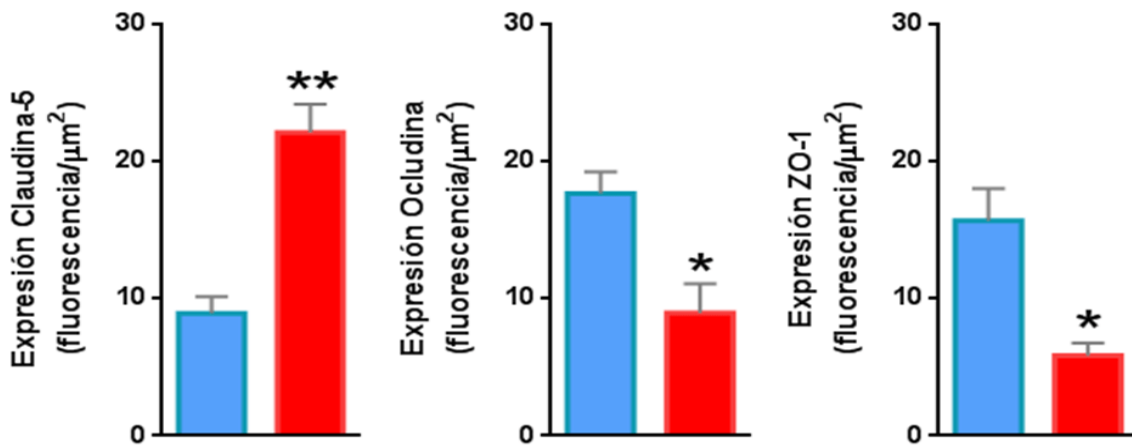
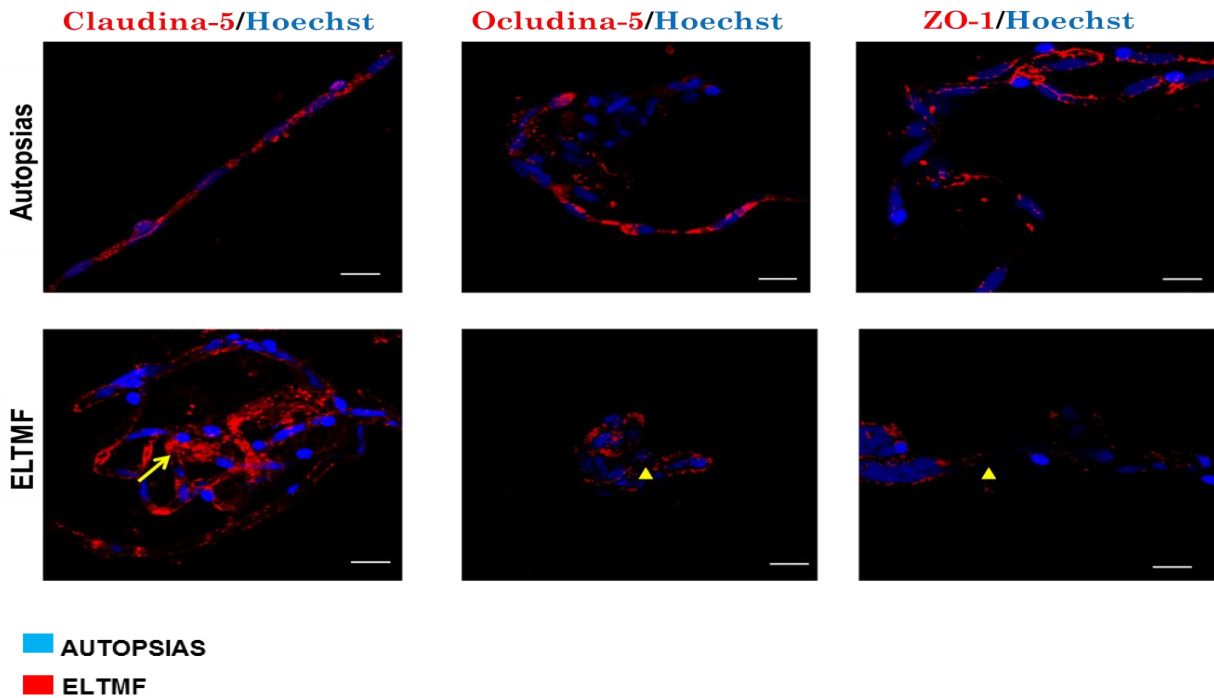


Figura 6. Expresión de las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de la UNV de hipocampo por inmnofluorescencia. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de claudina-5 (rojo), ocludina (rojo) y ZO-1 (rojo) en MV de la UNV de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTMF. Las flechas señalan el aumento en la expresión de Claudina-5 en pacientes con ELTMF y las puntas de flechas señalan la disminución de ocludina y ZO-1 en pacientes. La tinción para claudina-5, ocludina y ZO-1 se cuantificó como intensidad de fluorescencia por μm^2 y se comparó con el grupo de autopsias. Los datos se expresan como promedio \pm el error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Prueba *t* de Student ($n=3$).

Tabla 4. Correlación de expresión de proteínas de las uniones estrechas y variables clínicas en hipocampo

Hipocampo				
	claudina-5		occludina	
Pacientes ELTMF	Valor de r	Valor de <i>p</i>	Valor de r	Valor de <i>p</i>
Edad (años)	0.2018	0.5294	-0.3579	0.2534
Edad de inicio de epilepsia (años)	-0.3690	0.2379	0.0539	0.8678
Duración de la epilepsia (años)	0.2837	0.3715	-0.1784	0.5791
Frecuencia de crisis (por mes)	0.001	0.9962	0.1493	0.6433
No. de FAE antes de la cirugía	0.395	0.204	-0.302	0.341
Autopsias				
Edad (años)	-0.386	0.216	0.154	0.632
IPM (h)	-0.501	0.097	0.252	0.429

FAE: fármacos antiepilépticos; IPM: intervalo postmortem.

6.2.2 UNV de corteza temporal

6.2.2.1 Expresión de las proteínas de las uniones estrechas por Western blot
 En el grupo de autopsias la expresión de claudina-5 fue de 1.01 ± 0.13 . Respecto al grupo de los pacientes con ELTMF la expresión de claudina-5 mostró un incremento de 103%, ($p < 0.05$) en comparación con las autopsias (Figura 4). La

expresión de ocludina en corteza temporal fue de 1.82 ± 0.19 para las autopsias. En los pacientes con ELTMF la expresión de ocludina presentó una disminución de la expresión con respecto al grupo de las autopsias (72%, $p < 0.001$, Figura 4)

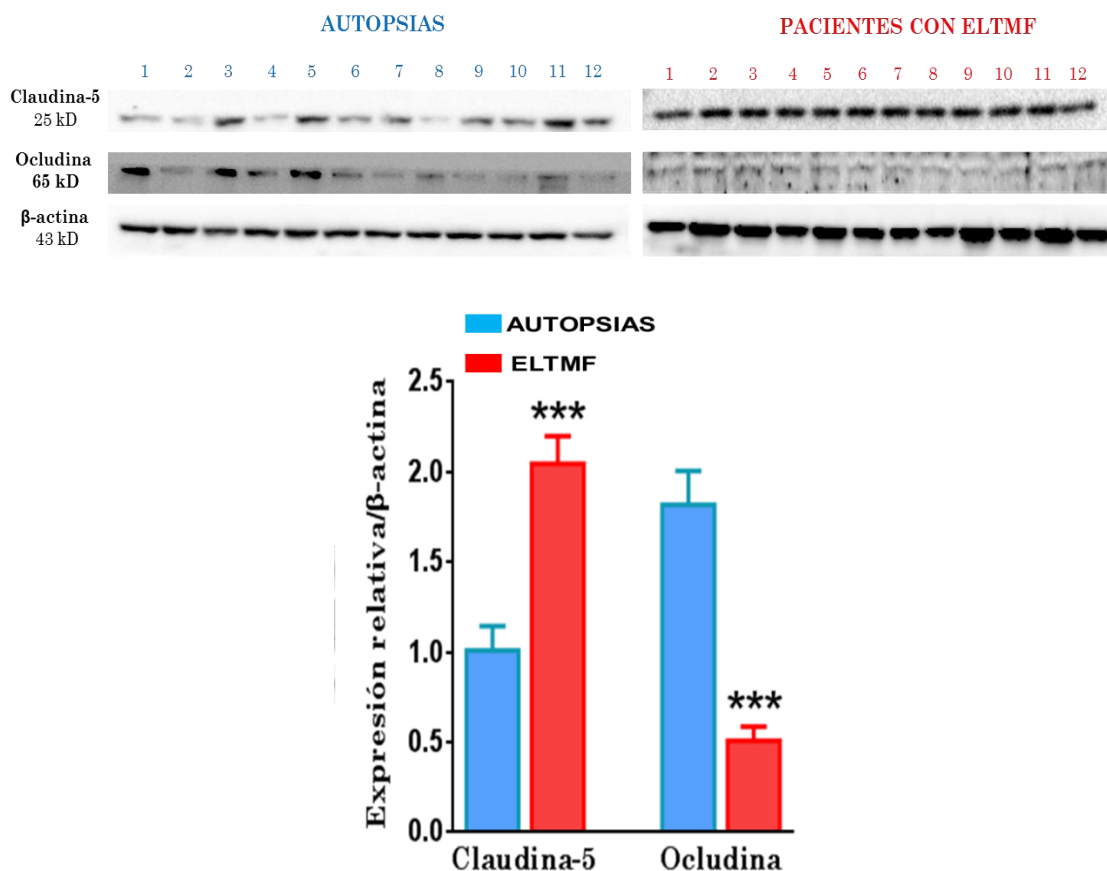


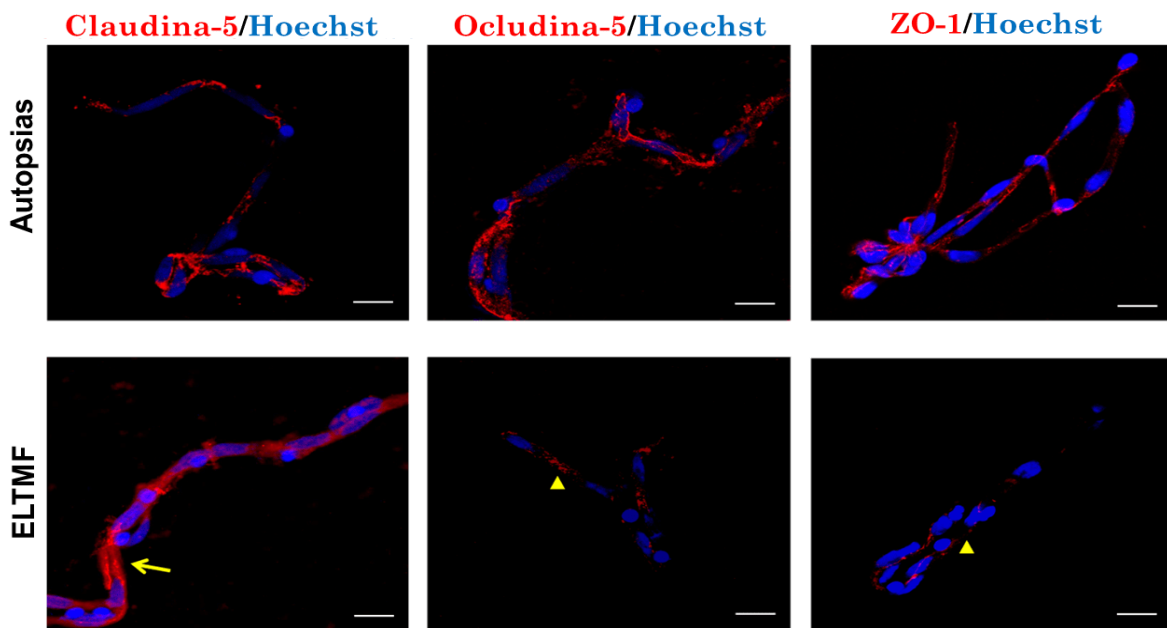
Figura 7. Expresión de las proteínas claudina-5 y ocludina en la UNV de corteza temporal. Los datos se normalizaron contra β -actina y se expresan como promedio \pm el error estándar. *** $p < 0.001$. Prueba *t* de student. (n=12)

6.2.2.2. Expresión de las proteínas de las uniones estrechas por Inmunofluorescencia

La expresión relativa de las proteínas de las uniones estrechas detectada por inmunofluorescencia para claudina-5, ocludina y ZO-1 fueron de 9.35 ± 1.60 , 21.40 ± 1.64 y 12.37 ± 4.98 respectivamente, en el grupo de autopsias. En este

grupo la tinción de claudina-5, ocludina y ZO-1 presentaron un patrón de expresión lineal y continuo (Figura 5).

En los pacientes con ELTMF las proteínas de las uniones estrechas mostraron un incremento en la expresión de claudina-5 del 126% ($p < 0.01$), un decremento del 39% ($p < 0.05$) en la expresión de ocludina, así como un decremento del 58% ($p < 0.05$) en la expresión de ZO-1. A diferencia del grupo de autopsias, en los pacientes con ELTMF las proteínas de las uniones estrechas perdieron la linealidad y continuidad en su expresión (Figura 5).



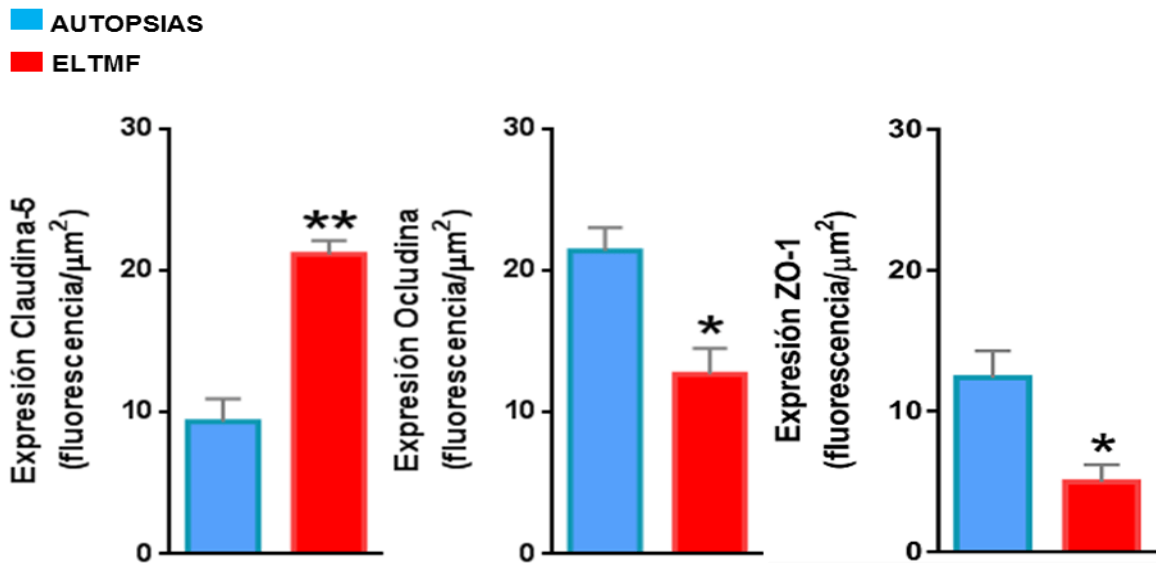


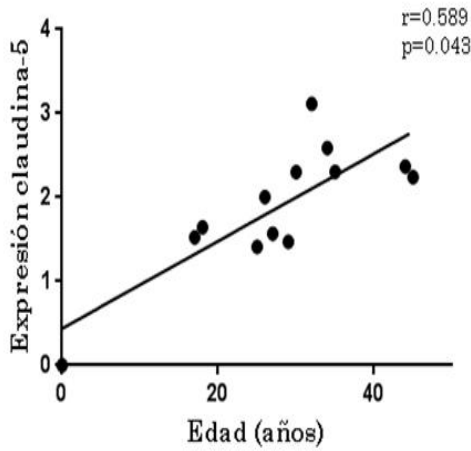
Figura 8. Expresión de las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de la UNV de hipocampo por inmnofluorescencia. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de claudina-5 (rojo), ocludina (rojo) y ZO-1 (rojo) en MV de la UNV de corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF. Las flechas señalan el aumento en la expresión de claudina-5 en pacientes con ELTMF y las puntas de flechas señalan la disminución de ocludina y ZO-1 en pacientes. La tinción para claudina-5, ocludina y ZO-1 se cuantificó como intensidad de fluorescencia por μm^2 y se comparó con el grupo de autopsias. Los datos se expresan como promedio \pm el error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Prueba *t* de Student ($n=3$).

6.2.2.3 Correlaciones con variables clínicas

En la UNV de la corteza temporal de los pacientes con ELTMF los niveles de expresión de claudina-5 obtenidos por western blot mostraron una correlación positiva con la edad ($r=0.5895$, $p < 0.05$; Tabla 4 y Figura 9) y con la duración de la epilepsia ($r=0.6534$, $p < 0.05$; Tabla 5 y Figura 9). Lo que nos indica que a mayor edad y mayor duración de la epilepsia incrementa la expresión de claudina-5.

En la UNV de corteza temporal de las autopsias los niveles de expresión de Claudina-5 y ocludina obtenidos por western blot no mostraron ninguna correlación con las variables clínicas (Tabla 5)

Correlación entre la edad y la expresión de claudina-5 en la UNV de corteza temporal de los pacientes con ELTMF



Correlación de la duración de la epilepsia y la expresión de claudina-5 en la UNV de corteza temporal de los pacientes con ELTMF

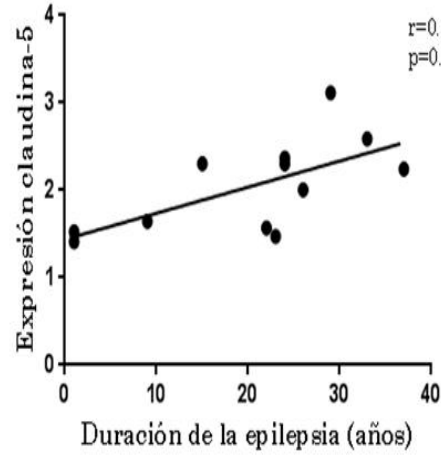


Figura 9. Representación de la correlación entre expresión de claudina-5 en la UNV de corteza temporal y las variables clínicas de los pacientes con ELTMF.

Tabla 5. Correlación de expresión de proteínas de las uniones estrechas y variables clínicas en corteza temporal

Corteza temporal				
Pacientes ELTMF	claudina-5		occludina	
	Valor de r	Valor de p	Valor de r	Valor de p
Edad (años)	0.589	0.043*	-0.287	0.366
Edad de inicio de epilepsia (años)	-0.501	0.097	-0.077	0.811

Duración de la epilepsia (años)	0.653	0.021*	0.084	0.794
Frecuencia de crisis (por mes)	-0.419	0.174	-0.187	0.561
No. de FAE antes de la cirugía	0.531	0.076	-0.202	0.529
Autopsias				
Edad (años)	0.252	0.428	0.232	0.468
IPM	0.118	0.714	-0.653	0.213

FAE fármacos antiepilépticos; IPM: intervalo postmortem; Correlación de Pearson; *p<0.05.

6.2.2.4 Discusión

Para que la UNV lleve a cabo su función de barrera correctamente, es necesario que las proteínas de las uniones estrechas tengan integridad en su composición, la cual se caracteriza por una expresión lineal y homogénea a través de los espacios intercelulares de las células endoteliales (Ng et al., 2003; Wosik et al., 2007; Wolburg et al., 2009). En los vasos sanguíneos cerebrales, las uniones estrechas son un tipo de barrera célula-célula formada por un complejo de proteínas que incluyen la hendidura intercelular principalmente: ocludina, claudinas a nivel membranal (Bauer et al. 1999; Morita et al. 1999; Martín-Padura et al. 1998) y ZO-1 a nivel citoplásmico (Itoh M, et al. 1999; Wolburg y Lippoldt, 2002). Utilizamos UNV de hipocampo y corteza temporal obtenidos de autopsias, como condición control y encontramos que la expresión

de claudina-5, ocludina y ZO-1 presentaron una expresión lineal y homogénea en los MV de ambas estructuras, lo cual es un indicador de la integridad de la BHE de las autopsias. En varios trastornos neurológicos, incluida la epilepsia, se ha demostrado que la permeabilidad de la BHE está alterada (Abbott et al., 2010). La disfunción de la BHE puede tener consecuencias importantes para la excitabilidad neuronal, por lo que puede ser un desencadenante en la generación de convulsiones y / o el desarrollo de epilepsia (Friedman et al., 2009). De ahí nuestro interés en confirmar dichas alteraciones en las muestras de la BHE de los pacientes con ELTMF.

Los resultados obtenidos mostraron que la BHE de los pacientes con ELTMF, presenta una disminución en la expresión de ocludina y ZO-1. Sin embargo, la proteína claudina-5 mostró un aumento en su expresión y correlación significativa con la edad y la duración de la epilepsia.

Uno de nuestros objetivos fue caracterizar la expresión de las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1 en la BHE de hipocampo y corteza temporal de los pacientes con ELTMF. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de claudina-5 tanto en la BHE de hipocampo como en la corteza temporal de los pacientes con ELTMF. Sin embargo, en la BHE de los pacientes con ELTMF, se interrumpe la linealidad y la continuidad en la expresión. Además, encontramos una correlación positiva de la expresión de claudina-5 con la edad y la duración de la epilepsia; esto indica que cuanto mayor es el tiempo de los pacientes con la enfermedad, mayor es la expresión de claudina-5. Estos resultados nos indican un mecanismo compensatorio para contrarrestar la disminución de la expresión de ocludina y de ZO-1. Nuestros resultados con respecto a la expresión de claudina-5 concuerdan con los reportados por Chun Yan et al. (2018), encontraron que en el modelo KA en ratón provocó un aumento en la expresión de las proteínas claudina-5 y ZO-1 72 h después del tratamiento.

Por otro lado, encontramos una disminución en la expresión e inmunorreactividad de ocludina y ZO-1 en la BHE de hipocampo y corteza temporal. Además, la linearidad y la continuidad de expresión también se interrumpen en la BHE de los pacientes con ELTMF. Varios estudios han demostrado que los cambios en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas, la variación en su distribución y / o el funcionamiento anormal de sus estructuras podrían destruir la integridad de las uniones estrechas y provocar cambios en la permeabilidad de la BHE (Ng et al., 2003). Esta disminución en la expresión de ocludina y ZO-1 ha sido asociada con el daño de la BHE en trastornos neurológicos como la epilepsia (Michalak et al., 2012).

András y col. (2007) informaron que la exposición de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (BMEC) al glutamato produce una redistribución celular de ocludina, seguida de una disminución en el nivel total de esta proteína y una disminución de la función de barrera en las BMEC. Además, los estudios en células endoteliales microvasculares de ratas con displasia cortical sometidas a convulsiones inducidas por hipertermia, encontraron una disminución en la expresión e inmunorreactividad de ocludina y apertura de uniones estrechas (Ahishali et al. 2010). Asimismo, en el hipocampo de pacientes con ELT y en el modelo en rata de litio-pilocarpina, se ha informado disminución y alteración en el patrón de expresión de la proteína ZO-1 (Rigau et al. 2007). Estos cambios en la expresión y alteración de las proteínas de las uniones estrechas indican una disfunción de la BHE. La disrupción de la BHE conduce a la extravasación de proteínas plasmáticas y células del sistema inmunológico al parénquima cerebral, cambios en las funciones astrogliales (Ivens et al., 2009), y alteraciones en el equilibrio iónico (Kofuji y Newman, 2004) que a su vez pueden conducir a una mayor excitabilidad neuronal, umbral convulsivo reducido, sinaptogénesis excitadora, plasticidad alterada y epileptogénesis (Cacheaux et al., 2009; Daneman, 2012).

Por otra parte, los receptores CB₁ y CB₂ tienen un papel importante en la integridad de la BHE. Lu et al., (2008) describieron que la activación de CB₁ evita la disminución de la expresión de las proteínas ZO-1, claudina-5 y JAM-1, y la consiguiente disfunción de la BHE. Además, la activación de los receptores CB₂ en células endoteliales disminuye la permeabilidad de la BHE, así como la expresión de proteínas de las uniones estrechas y reduce los efectos neuroinflamatorios (Ramirez et al., 2012). Es posible pensar que la epilepsia se asocia a disminución de la expresión de proteínas y/o las vías transduccionales de estos receptores en la BHE de los pacientes con ELTMF. Por esta razón, se diseñaron experimentos para evaluar los niveles de expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en la BHE de hipocampo (área epileptogénica) y corteza temporal (área involucrada en la propagación de la actividad convulsiva) de pacientes con ELTMF.

6.3 Experimento 3. Evaluación de la expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF. Una vez que analizamos el patrón de expresión de las proteínas que conforman a las uniones estrechas de la BHE se decidió investigar el patrón de expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF. Para ello el tejido aislado se procesó con las técnicas de western blot e inmunofluorescencia.

6.3.1 UNV de hipocampo

6.3.1.1 Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ por Western blot

En el grupo de autopsias los receptores CB₁ y CB₂ mostraron una expresión relativa a la β -actina de 0.62 ± 0.09 y 1.25 ± 0.08 respectivamente. En el grupo de los pacientes con ELTMF la expresión de CB₁ y CB₂ disminuyó 66% y 43% respectivamente ($p < 0.001$) con respecto al grupo de autopsias (Figura 6).

6.3.1.2. Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ por inmunofluorescencia

La expresión relativa a la β -actina de los receptores CB₁ y CB₂ por inmunofluorescencia fueron de 31.8 ± 1.8 y 23.3 ± 2.4 respectivamente, en el grupo de autopsias (Figura 6).

En los pacientes con ELTMF los receptores CB₁ mostraron una disminución en su expresión del 60% ($p < 0.01$) también los receptores CB₂ un presentaron un decremento en su expresión del 57% ($p < 0.05$, Figura 6).

6.3.1.3 Correlaciones con variables clínicas

En la UNV de hipocampo de los pacientes con ELTMF los niveles de expresión del receptor CB₂ obtenidos por western blot mostraron una correlación negativa con el número de fármacos antiepilépticos administrados antes de la cirugía ($r = -0.645$, $p < 0.05$; Tabla 5). Lo que nos indica que a mayor número de fármacos administrados menor será la expresión del receptor CB₂.

En la UNV de hipocampo de las autopsias los niveles de expresión de los receptores CB₁ y CB₂ obtenidos por western blot no mostraron ninguna correlación con las variables clínicas (Tabla 6).

Correlación entre el número de FAE administrados antes de la cirugía y la expresión del receptor CB₂ en la UNV de hipocampo de pacientes con ELTMF

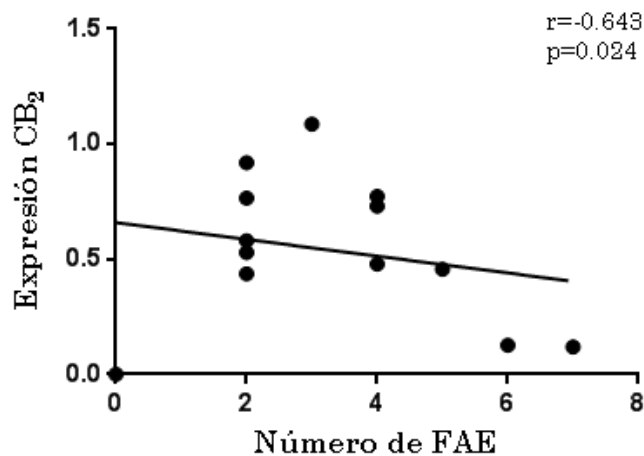


Figura 10. Representación de la correlación entre el número de fármacos antiepilépticos (FAE) y la expresión del receptor CB₂ en la UNV de hipocampo de los pacientes con ELTMF.

Tabla 6. Correlación de expresión de los receptores CB₁ y CB₂ con las variables clínicas en hipocampo

Hipocampo				
	CB₁		CB₂	
Pacientes ELTMF	Valor de r	Valor de <i>p</i>	Valor de r	Valor de <i>p</i>
Edad (años)	-0.145	0.652	-0.033	0.917
Edad de inicio de epilepsia (años)	0.0452	0.889	0.275	0.387

Duración de la epilepsia (años)	-0.123	0.703	-0.273	0.390
Frecuencia de crisis (por mes)	0.287	0.287	-0.106	0.743
No. de FAE antes de la cirugía	0.103	0.745	-0.643	0.024*
Autopsias				
Edad (años)	0.3513	0.2628	-0.3286	0.2971
IPM (h)	0.1009	0.7551	-0.1436	0.6560

FAE fármacos antiepilépticos; IPM: intervalo postmortem; Correlación de Pearson; *p<0.05.

6.3.2 UNV de corteza temporal

6.3.2.1 Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ por Western blot

En el grupo de autopsias los receptores CB₁ y CB₂ mostraron una expresión relativa a la β-actina de 0.93 ± 0.07 y 0.84 ± 0.04 respectivamente. En el grupo de los pacientes con ELTMF la expresión de CB₁ aumentó 35% (p<0.01) y CB₂ mostró un aumento de 41% (p<0.01) ambos con respecto al grupo de autopsias (Figura 6).

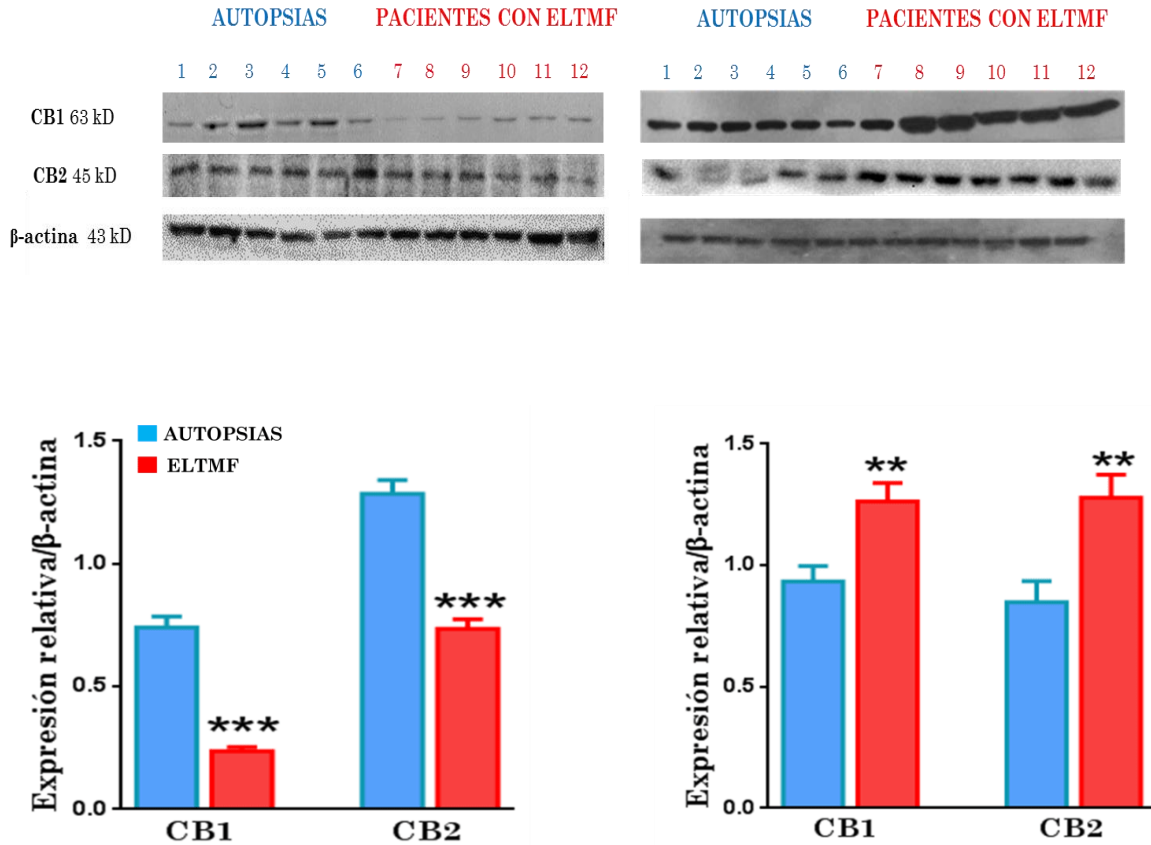
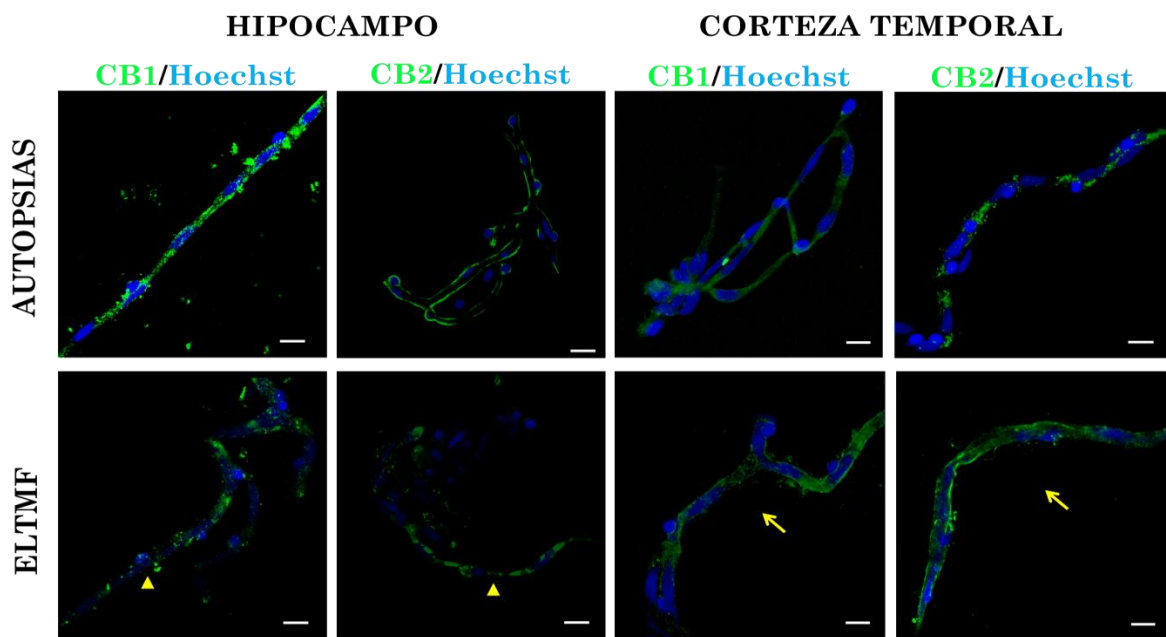


Figura 11. Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de hipocampo y corteza temporal. Los datos se normalizaron contra β-actina y se expresan como promedio ± el error estándar. **p<0.01, ***p<0.001. Prueba *t* de student.

6.3.2.2. Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ por Inmunofluorescencia

La expresión relativa a la β-actina de los receptores CB₁ y CB₂ por inmunofluorescencia fueron de 31.8 ± 1.8 y 23.3 ± 2.4 respectivamente, en el grupo de autopsias (Figura 7).

En los pacientes con ELTMF los receptores CB₁ mostraron un aumento en su expresión del 27% (p<0.05), también los receptores CB₂ un presentaron un incremento en su expresión del 50% (p<0.05, Figura 7).



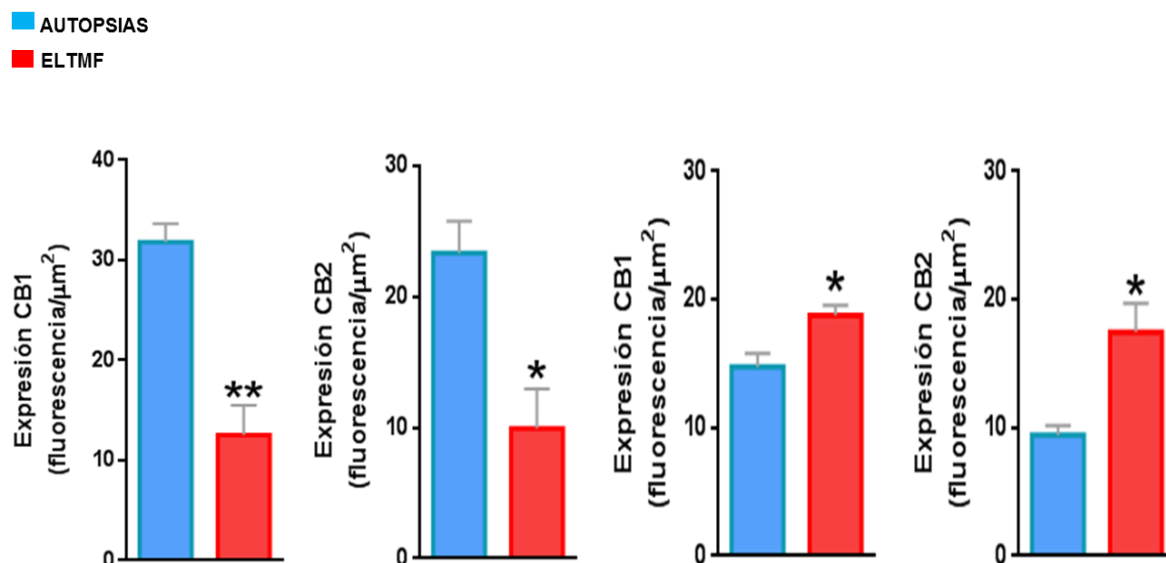


Figura 12. Expresión de los receptores CB₁ y CB₂ en MV de la UNV de hipocampo y corteza temporal por inmunofluorescencia. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de CB₁ y CB₂ (verde), en MV de la UNV de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTMF. Las puntas de flechas señalan la disminución de CB₁ y CB₂ en hipocampo de pacientes y las flechas señalan el aumento en la expresión de CB₁ y CB₂ en la corteza temporal de pacientes con ELTMF. La tinción para CB₁ y CB₂ se cuantificó como intensidad de fluorescencia por μm^2 y se comparó con el grupo de autopsias. Los datos se expresan como promedio \pm el error estándar. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Prueba *t* de student.

6.3.2.3 Correlaciones con variables clínicas

En la UNV de la corteza temporal de los pacientes con ELTMF los niveles de expresión del receptor CB₁ obtenidos por western blot mostraron una correlación positiva con el número de fármacos antiepilépticos administrados antes de la cirugía ($r = -0.644$, $p < 0.05$; Tabla 7). Lo que nos indica que a mayor número de fármacos administrados mayor será la expresión del receptor CB₁.

En la UNV de corteza temporal de las autopsias los niveles de expresión de los receptores CB₁ y CB₂ obtenidos por western blot no mostraron ninguna correlación con las variables clínicas (Tabla 7).

Correlación entre el número de FAE administrados antes de la cirugía y la expresión del receptor CB₁ en la UNV de corteza temporal de pacientes con ELTMF

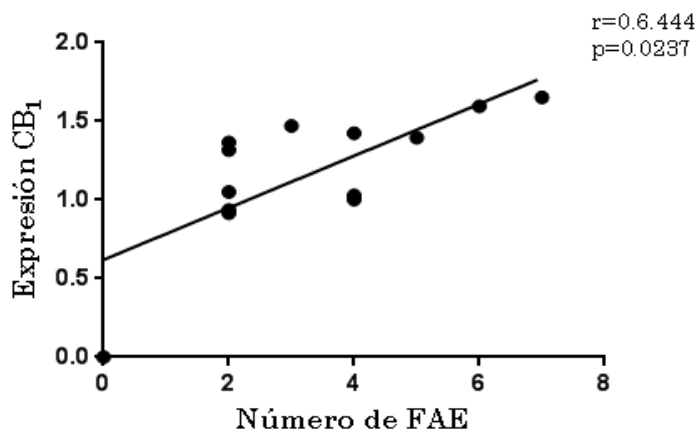


Figura13. Representación de la correlación entre el número de fármacos antiepilépticos (FAE) y la expresión del receptor CB₁ en la UNV de corteza temporal de los pacientes con ELTMF.

Tabla 7. Correlación de expresión de los receptores CB₁ y CB₂ con las variables clínicas en corteza temporal

Pacientes ELTMF	Corteza temporal			
	CB1		CB2	
	Valor de r	Valor de p	Valor de r	Valor de p
Edad (años)	0.280	0.378	-0.451	0.190

Edad de inicio de epilepsia (años)	-0.309	0.329	0.127	0.727
Duración de la epilepsia (años)	0.224	0.484	-0.422	0.224
Frecuencia de crisis (por mes)	-0.051	0.874	0.608	0.062
No. de FAE antes de la cirugía	0.644	0.024*	-0.265	0.459
Autopsias				
Edad (años)	0.5424	0.0848	-0.4276	0.1655
IPM (h)	0.1201	0.7250	-0.1295	0.6883

FAE: fármacos antiepilépticos; Correlación de Pearson; *p<0.05.

6.3.2.4 Discusión

Los receptores CB₁ y CB₂ tienen un papel protector en la integridad de la UNV y, por lo tanto, en la función de la BHE (Lu et al., 2008; Zhang et al., 2011; Ramirez et al., 2012). La activación de los receptores CB₁ y CB₂ por el 2-araquidonoilglicerol contribuye con el mantenimiento de la integridad funcional de la BHE después de un insulto cerebral (Piro et al., 2018). Por otro lado, microvasos de pacientes con ELTMF sobreexpresan VEGF-A y su receptor VEGFR-2 (Castañeda-Cabral et al., 2020a). Estos cambios pueden facilitar la angiogénesis (Marchi y Lerner-Natoli, 2013), la neuroinflamación y el aumento de la permeabilidad de la BHE (Gorter et al., 2015; Baruah et al., 2020). La

activación de los receptores cannabinoides se considera una estrategia para atenuar la señalización de VEGF y la inflamación crónica y por lo tanto, disminuir la neoangiogénesis (Schley et al., 2009; Staiano et al., 2016; Sathyapalan et al., 2017).

Nuestros resultados indican que los receptores CB₁ y CB₂ presentan un decremento en su expresión en el hipocampo. Existe evidencia que indica que la disminución de CB₁ en hipocampo correlaciona con la disminución de la expresión ARNm y la proteína del receptor CB₁ en el hipocampo de pacientes con ELTF (Ludány et al., 2008). Del mismo modo, Falenski et al. (2009), encontraron disminución en los niveles de expresión del receptor CB₁ en el hipocampo de rata después de una semana de la inducción del *status epilepticus* utilizando el modelo de pilocarpina.

Por otra parte, en la corteza temporal, observamos que ambos receptores presentaron un incremento en su expresión en muestras de pacientes con ELTMF. Estos resultados sugieren que los receptores CB₁ y CB₂ tienen un papel diferente en estas estructuras y estos cambios pueden estar asociados con el papel que juegan ambas estructuras en la ELTM. Al respecto, se sabe que la formación hipocampal representa el foco epiléptico mientras que la neocorteza temporal es una estructura que en el inicio del trastorno trata de evitar su propagación a otras estructuras (Chagnac-Amitai y Connors, 1989; Chervin et al., 1988; Sloviter, 1994; DeFelipe et al 2002; Engel et al., 2012).

Los datos obtenidos también se correlacionan con variables clínicas de los pacientes. Al respecto, encontramos que un mayor número de fármacos anticonvulsivos recibidos antes de la cirugía se correlaciona con una menor expresión proteica de los receptores CB₂ en el hipocampo, mientras que en corteza temporal encontramos que a mayor número de fármacos administrados antes de la cirugía es mayor la expresión del receptor CB₁. Futuros estudios

deben de llevarse a cabo para determinar el efecto de los fármacos anticonvulsivantes en la expresión de los receptores CB₁ y CB₂.

Llama la atención que el receptor CB₂ se expresa en niveles muy bajos en neuronas, leucocitos y endotelio cerebral en condiciones fisiológicas (Golech et al. 2004; Schley y col. 2009). Sin embargo, la expresión de este receptor puede regularse positivamente durante la inflamación del cerebro en enfermedades como la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer (Benito et al. 2008; Pacher y Mechoulam 2011). Con base en este grupo de evidencias es posible sugerir que el aumento de la expresión de CB₂ en corteza cerebral puede estar involucrado en un proceso de neuroinflamación y daño de la UNV de la neocorteza temporal de los pacientes con ELTMF.

El siguiente experimento se diseñó para evaluar de manera cualitativa la colocalización de los receptores CB₁ y CB₂ con las proteínas que conforman las uniones estrechas de la UNV.

6.4. Experimento 4. Evaluación cualitativa de la co-localización de los receptores CB₁ y CB₂ con las proteínas de las uniones estrechas en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF

Después de analizar el patrón de expresión de las proteínas que conforman las uniones estrechas de los receptores CB₁ y CB₂, decidimos evaluar si estas proteínas se expresan en la misma región de la UNV de autopsias y pacientes con ELTMF mediante un análisis cualitativo de co-localización. Para ello el tejido aislado se procesó con la técnica de inmunofluorescencia como se describió en la sección 5.2.2. Se utilizaron los anticuerpos primarios

monoclonales de ratón para CB₁ o CB₂, los anticuerpos primarios de conejo para claudina-5, ocludina y ZO-1. Posteriormente las muestras fueron tratadas con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 3).

6.4.1 UNV de hipocampo

En el hipocampo los resultados de la tinción por inmunofluorescencia de los receptores a canabinoides mostraron que tanto CB₁ como CB₂ presentaron co-localización con las proteínas que conforman las uniones estrechas en la UNV de autopsias y pacientes con ELTMF (Figuras 8 y 9).

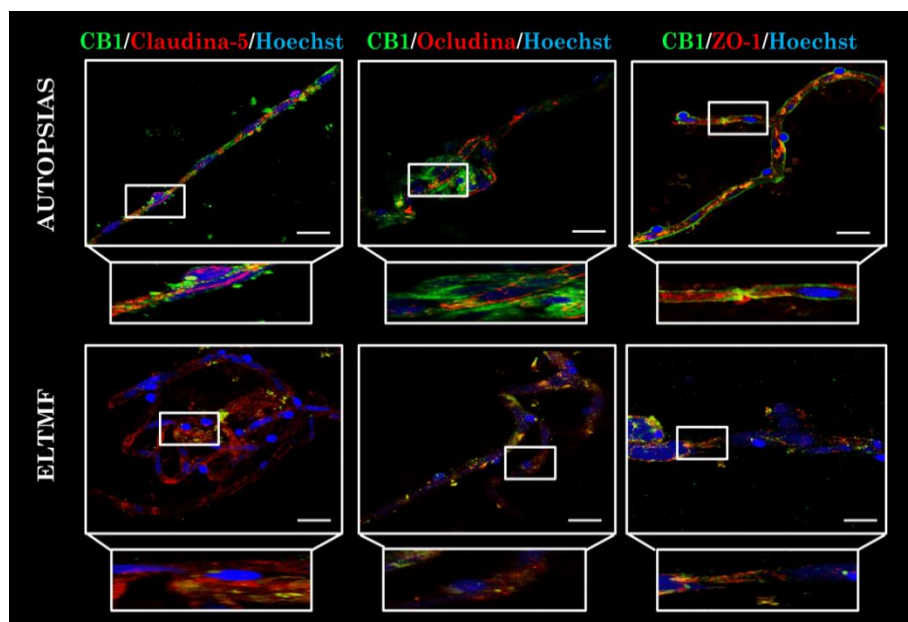


Figura 14. Expresión de CB₁, claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTMF. Núcleos teñidos por Hoechst (azul) en autopsias y pacientes con ELTMF. La barra de calibración corresponde a 20 μ m. Se muestran imágenes representativas obtenidas de tres laminillas de tres extracciones independientes, donde se analizaron tres campos.

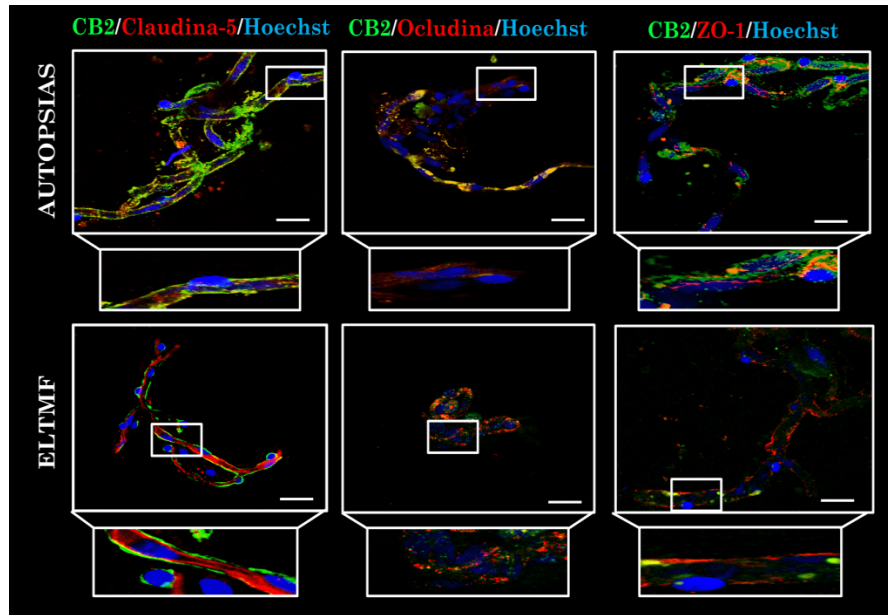


Figura 15. Expresión de CB₂, claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTMF. Núcleos teñidos por Hoechst (azul) en autopsias y pacientes con ELTMF. La barra de calibración corresponde a 20 μ m. Se muestran imágenes representativas obtenidas de tres laminillas de tres extracciones independientes, donde se analizaron tres campos.

6.4.2 UNV de corteza temporal

De manera similar que en hipocampo, en la UNV de corteza temporal también se observó que los receptores CB₁ y CB₂ presentaron co-localización con las proteínas que conforman las uniones estrechas en la UNV de autopsias y pacientes con ELTMF (Figura 10 y 11).

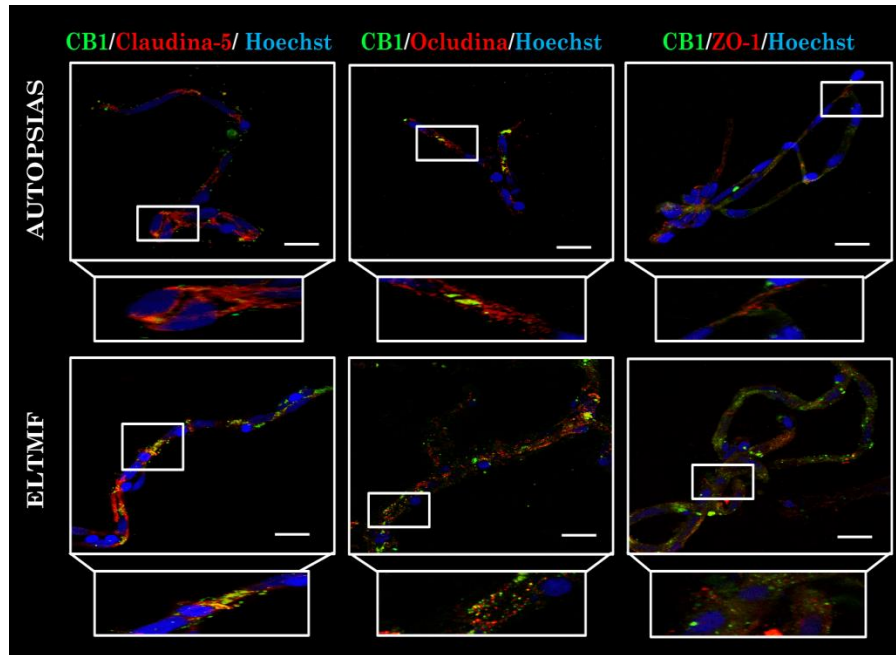


Figura 16. Expresión de CB₁, claudina-5, ocludina y ZO-1 en MV de corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF. Núcleos teñidos por Hoechst (azul) en autopsias y pacientes con ELTMF. La barra de calibración corresponde a 20 um. Se muestran imágenes representativas obtenidas de tres laminillas de tres extracciones independientes, donde se analizaron tres campos.

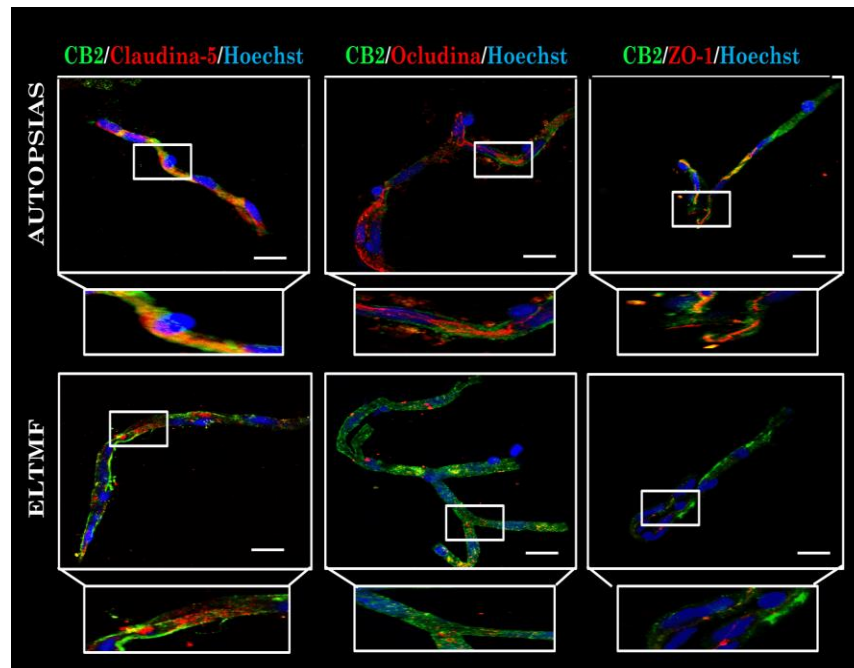


Figura 17. Expresión de CB₂, claudina-5, occludina y ZO-1 en MV de corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF. Núcleos teñidos por Hoechst (azul) en autopsias y pacientes con ELTMF. La barra de calibración corresponde a 20 μ m. Se muestran imágenes representativas obtenidas de tres laminillas de tres extracciones independientes, donde se analizaron tres campos.

6.4.3 Discusión

El objetivo de este experimento fue evaluar si los receptores CB₁ y CB₂ se expresan en la misma región que las proteínas que conforman las uniones estrechas en la UNV de autopsias y pacientes con ELTMF mediante un análisis cualitativo de co-localización.

Nuestros resultados indican que existe co-localización de los receptores CB₁ y CB₂ con las proteínas que conforman las uniones estrechas en algunas regiones de la UNV de autopsias y pacientes con ELTMF.

Como se mencionó anteriormente, los receptores CB₁ y CB₂ tienen un papel protector en la integridad de la UNV y la BHE (Lu et al., 2008; Zhang et al., 2011; Ramirez et al., 2012). Se ha sugerido que los receptores cannabinoides regulan la BHE a nivel molecular. Los agonistas no específicos para los

receptores canabinoides como los agonistas específicos del receptor CB₂ contrarrestaron la inflamación inducida por la disminución en la expresión de las proteínas ZO-1, la molécula de adhesión-1 (JAM-1) y claudina-5 en células endoteliales de la microvasculatura cerebral (Lu et al.2008; Ramirez et al. 2012). Además, Lu et al., en 2008 describió como el agonista no selectivo para receptores canabinoides CP55940 promovió la asociación del receptor CB₁ con la proteína ZO-1 a través del extremo NH₂ de esta última. Esto sugiere que el receptor CB₁, a través de su interacción con la proteína ZO-1 bloquea su degradación.

Por otro lado, después de la inducción de un trauma craneoencefálico en un modelo en ratón se cuantificó la concentración de fluoresceína de sodio en parénquima cerebral como parámetro de integridad de la BHE y se demostró que agonistas CB₂ disminuyen el daño de la BHE al disminuir la cantidad de fluoresceína que penetró en el cerebro de los animales después del daño (Amenta et al. 2012).

Los resultados obtenidos con los experimentos previos indican que existen alteraciones en la expresión proteica de los receptores CB₁ y CB₂ que se localizan en la UNV de pacientes con ELTMF. Sin embargo, dichos resultados no indican cambios en la funcionalidad de los receptores. A continuación se diseñaron experimentos para evaluar la capacidad de activación las proteínas G $\alpha_{i/o}$ acoplada a los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de autopsias y pacientes con ELTMF y determinar si los cambios en la expresión de dichos receptores se correlacionan con cambios en su funcionalidad.

6.5. Experimento 5. Capacidad de activación de la proteína $G\alpha_{i/o}$ de los receptores CB_1 y CB_2 en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF

Después de analizar el patrón de expresión de las proteínas de las uniones estrechas y de los receptores CB_1 y CB_2 así como su co-localización en la UNV de hipocampo y corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF, decidimos evaluar la capacidad de activación de las proteínas $G\alpha_{i/o}$ acopladas a los receptores CB_1 y CB_2 . Para ello el tejido aislado se procesó mediante ensayos de unión con $[^{35}S]$ -GTP γ S y agonistas selectivos para cada receptor.

6.5.1 UNV de hipocampo

6.5.1.1 Ensayos de unión de $[^{35}S]$ -GTP γ S para los receptores CB_1 y CB_2 en membranas

La unión de $[^{35}S]$ -GTP γ S subsecuente a la estimulación del receptor CB_1 en la UNV de hipocampo de autopsias (n=12) presentó una E_{max} de 146 ± 11 fmol/mg de proteína y una pEC_{50} de 6.65 ± 0.34 ; mientras que los pacientes con ELTMF (n=12) presentaron una E_{max} de 513 ± 93 fmol/mg de proteína ($p < 0.05$ vs autopsias) y una pEC_{50} de 6.52 ± 0.7 (Figura 18, Tabla 8).

Respecto a la unión de $[^{35}S]$ -GTP γ S subsecuente a la estimulación del receptor CB_2 en la UNV de autopsias (n=12) presentó una E_{max} de 108.0 ± 10 fmol/mg de proteína y una pEC_{50} de 8.1 ± 0.37 ; mientras que los pacientes presentaron una E_{max} de 384 ± 49 fmol/mg de proteína y una pEC_{50} de 6.7 ± 0.49 , siendo ambos parámetros estadísticamente diferentes de los correspondientes para el grupo de autopsias ($p < 0.05$) (Figura 18, Tabla 8). Estos resultados indican que los receptores CB_2 presentan una potencia menor en los pacientes con ELTMF. Sin embargo, la eficacia de los receptores CB_1 y los receptores CB_2 medida como la activación de la proteína $G\alpha_{i/o}$ fue mayor en muestras de pacientes con ELTMF.

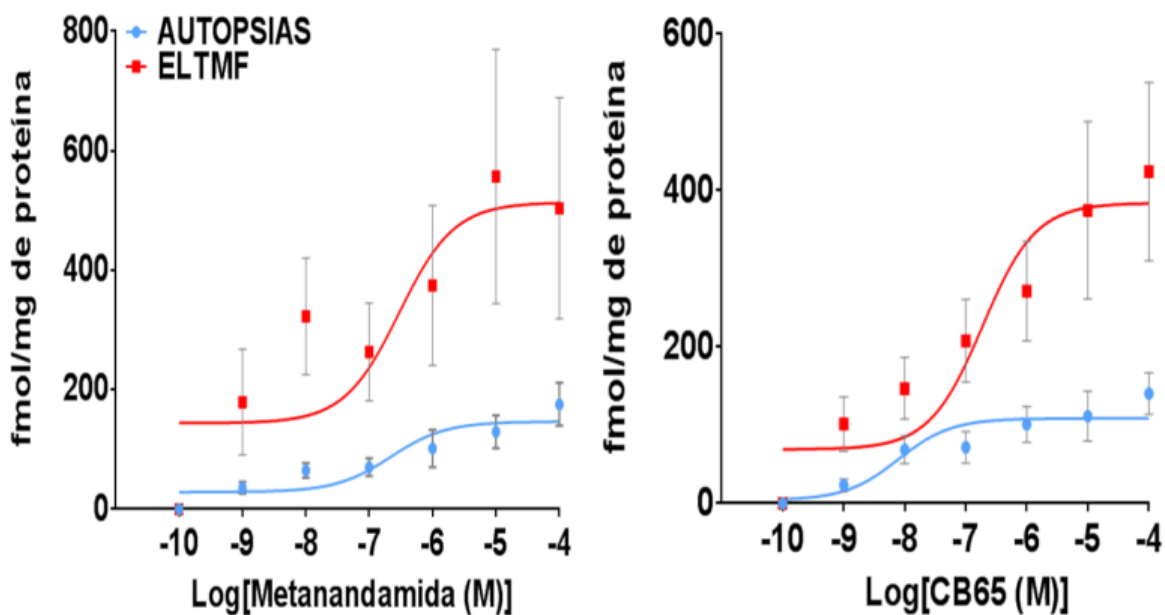


Figura 18. Representación de la unión de $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S estimulada por la activación del receptor CB₁ (izquierda) y CB₂ (derecha) en membranas la UNV de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTMF. Las membranas fueron incubadas con concentraciones crecientes de Metanandamida y CB65 (10^{-10} - 10^{-4} respectivamente). Cada punto representa la media \pm e.e. de 12 sujetos, cuyas determinaciones se hicieron por triplicado. Nótese que los receptores CB₂ presentan una potencia menor. Sin embargo, la activación de los receptores CB₁ y los receptores CB₂ dieron como resultado una mayor eficacia en la activación de la proteína G $\alpha_{i/o}$ en los pacientes con ELTMF.

Tabla 8. Valores de Emax y pEC50 para la unión de [³⁵S]-GTPγS inducida por la activación de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de hipocampo de autopsias y pacientes con ELTMF.

Hipocampo				
		CB ₁	CB ₂	
Receptor y grupo de estudio	Emax fmol/mg proteína	p<	pEC ₅₀	p<
CB ₁ autopsias	146 ± 11	0.0008 *	-6.65 ± 0.3	0.8687
CB ₁ ELTMF	513 ± 93		-6.52 ± 0.7	
CB ₂ autopsias	108 ± 10	0.0001 *	-8.1 ± 0.4	0.035 *
CB ₂ ELTMF	384 ± 49		-6.7 ± 0.5	

Emax: estimulación máxima; pEC₅₀: -log concentración efectiva media; *p<0.05.

6.5.1.2 Correlaciones con variables clínicas

Para evaluar si las variables clínicas de los sujetos se asociaban con los valores se determinó el valor de EC₅₀ y de Emax para cada muestra.

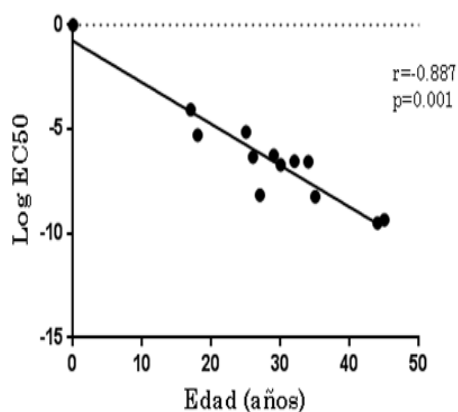
La unión a los receptores CB₁ en la UNV de hipocampo presentó las siguientes correlaciones significativas con las variables clínicas: a) una correlación negativa entre a el valor de pEC₅₀ (potencia) y la edad de los pacientes con ELTMF (r= -0.887, p<0.001, Tabla 8) indicando que a mayor edad la potencia del receptor aumenta y b) una correlación positiva entre el tiempo de duración de la epilepsia y la potencia de este receptor. Estos resultados nos indican que la potencia del acoplamiento funcional de los receptores CB₁ podría aumentar como una respuesta a las convulsiones (r=0.651, p<0.05, Tabla 8).

Tabla 9. Correlación de los valores de Emax y pEC50 de los receptores CB₁ y CB₂ con las variables clínicas en hipocampo

Hipocampo								
	CB ₁				CB ₂			
	Emax		pEC50		Emax		pEC50	
Pacientes	Valor de r	Valor de p	Valor de r	Valor de p	Valor de r	Valor de p	Valor de r	Valor de p
ELTMF								
Edad (años)	-0.026	0.935	-0.887	0.001 ***	0.136	0.672	-0.210	0.512
Edad de inicio de epilepsia (años)	-0.406	0.191	-0.070	0.829	-0.499	0.098	0.040	0.901
Duración de la epilepsia (años)	0.191	0.551	0.651	0.022 *	0.379	0.225	-0.075	0.815
Frecuencia de crisis (por mes)	-0.079	0.807	-0.445	0.445	-0.130	0.687	0.278	0.381
No. de FAE antes de la cirugía	0.531	0.075	-0.349	0.266	0.318	0.312	0.092	0.774
Autopsias								
Edad (años)	-0.178	0.581	0.357	0.255	-0.085	0.804	0.235	0.460
IPM (h)	-0.274	0.388	0.472	0.121	0.426	0.191	0.066	0.838

FAE: fármacos antiepilépticos; Emax: estimulación máxima; pEC50: -log concentración efectiva media; IPM: intervalo postmortem; Correlación de Pearson; *p<0.05, ***p<0.01.

Correlación entre la edad y los valores de pEC50 del receptor CB₁ de la UNV de hipocampo de pacientes con ELTMF



Correlación entre la duración de la epilepsia y los valores de pEC50 del receptor CB₁ en la UNV de hipocampo de pacientes con ELTMF

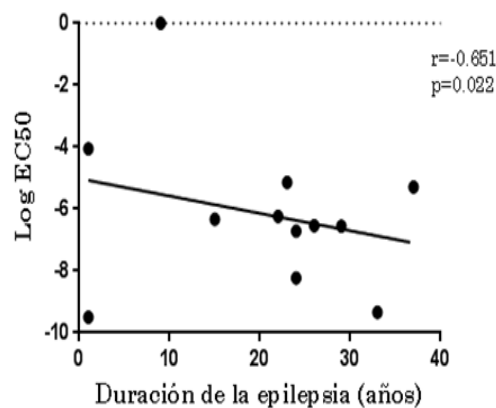


Figura 19. Representación de la correlación entre los valores de pEC50 del receptor CB₁ y las variables clínicas de los pacientes con ELTMF.

6.5.2 UNV de corteza temporal

6.5.2.1 Ensayos de unión de [³⁵S]-GTPγS para los receptores CB₁ y CB₂ en membranas

En cuanto a la unión del [³⁵S]-GTPγS subsecuente a la estimulación del receptor CB₁ en la UNV de corteza temporal, el grupo de autopsias (n=12) presentó una E_{max} de 333 ± 45 fmol/mg de proteína y una pEC₅₀ de 6.23 ± 0.46. Por su parte, los pacientes presentaron una E_{max} de 676 ± 105 fmol/mg de proteína (p<0.05) y una pEC₅₀ de 6.18 ± 0.5 (p=0.9459) (Figura 20, Tabla 10). Por otro lado, la unión de [³⁵S]-GTPγS subsecuente a la estimulación del receptor CB₂ en la UNV de corteza temporal de autopsias presentó una E_{max} de 291 ± 29 fmol/mg de proteína y una pEC₅₀ de 7.86 ± 0.39. En el caso de los pacientes, se obtuvo una E_{max} de 339.7 ± 30 fmol/mg de proteína (p<0.05) y una pEC₅₀ de 5.7 ± 0.26 (p<0.05, Figura 20, Tabla 10). Estos resultados indican que los receptores CB₁ presentaron una eficacia mayor para la activación de la proteína Gα_{i/o} en los pacientes. En cuanto a los receptores CB₂ la eficacia de la activación de la proteína Gα_{i/o} fue similar al grupo de autopsias, pero con menor potencia.

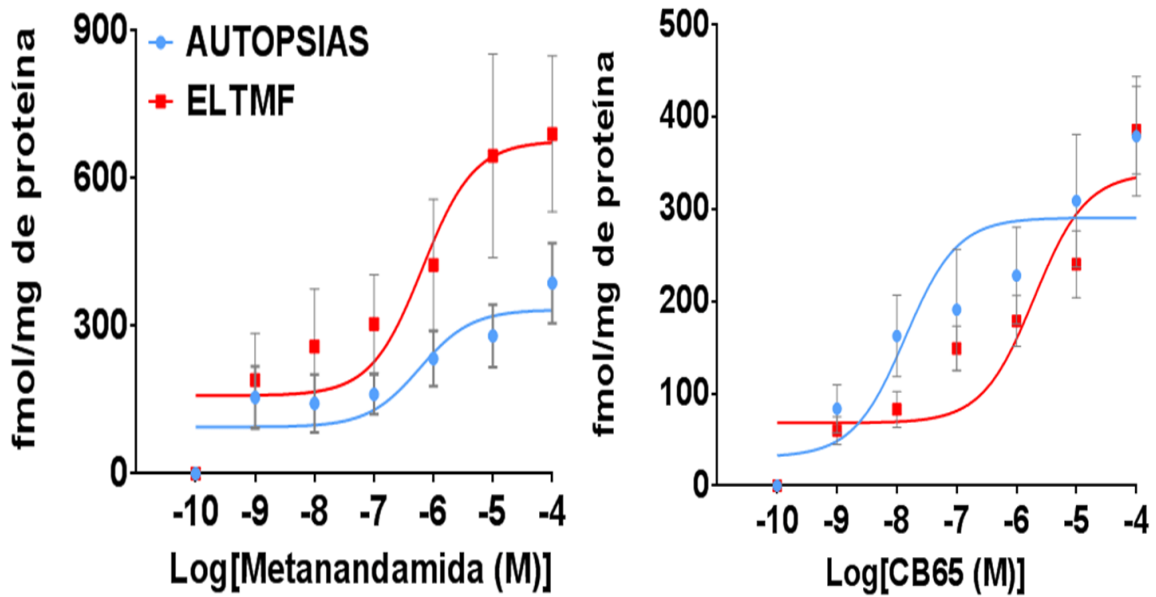


Figura 20. Representación de la Unión de $[^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ estimulada por la activación del receptor CB_1 y CB_2 en membranas la UNV de corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF. Las membranas fueron incubadas con concentraciones crecientes de Metanandamida y CB65 (10^{-10} - 10^{-4} respectivamente). Cada punto representa la media \pm e.e. de 12 sujetos, cuyas determinaciones se hicieron por triplicado.

Tabla 10. Valores de Emax y pEC50 para la unión de [³⁵S] -GTPγS inducida por la activación de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de corteza temporal de autopsias y pacientes con ELTMF.

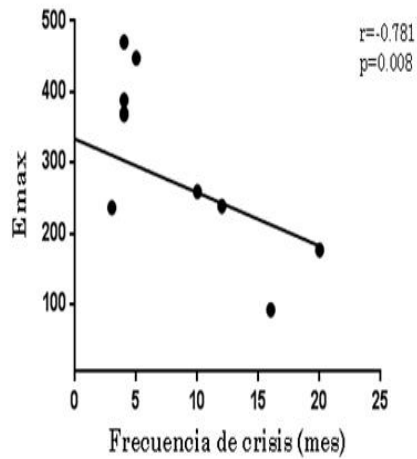
Receptor y grupo de estudio	Corteza temporal			
	CB ₁		CB ₂	
	Emax fmol/mg proteína	p<	pEC ₅₀	p<
CB ₁ autopsias	333 ± 45	0.006 *	-6.23 ± 0.46	0.9459
CB ₁ pacientes ELTMF	676 ± 11		-6.18 ± 0.4	
CB ₂ autopsias	291 ± 29	0.2639 *	-7.86 ± 0.4	0.0002 *
CB ₂ pacientes ELTMF	340 ± 30		-5.7 ± 0.3	

Emax: estimulación máxima; pEC₅₀: -log concentración efectiva media; *p<0.05.

6.5.2.2 Correlaciones con variables clínicas

Los receptores CB₂ en la UNV de corteza temporal presentaron una correlación positiva entre el valor de Emax y el valor de pEC₅₀ (potencia) con la frecuencia de crisis de los pacientes con ELTMF (r= -0.781, p<0.01; r=0.0633, p< 0.05, Tabla 10). Estos resultados nos indican que entre mayor sea la frecuencia de crisis epilépticas de los pacientes con ELTMF, los receptores CB₂ en corteza temporal presentan una potencia mayor.

Correlación entre la frecuencia de crisis y los valores de E_{max} del receptor CB_2 en la UNV de corteza temporal de pacientes con ELTMF



Correlación entre la frecuencia de crisis y los valores de pEC_{50} del receptor CB_2 de la UNV de corteza temporal de pacientes con ELTMF

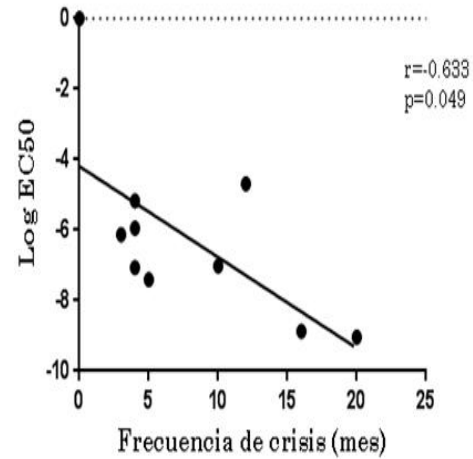


Figura 21. Representación de la correlación entre los valores de E_{max} y pEC_{50} del receptor CB_2 y la frecuencia de crisis (mes) en la UNV de corteza temporal de los pacientes con ELTMF

Tabla 11. Correlación de los valores de Emax y pEC50 de los receptores CB₁ y CB₂ con las variables clínicas en corteza temporal

Corteza temporal								
	CB ₁				CB ₂			
	Emax		pEC50		Emax		pEC50	
Pacientes	Valor de r	Valor de p	Valor de r	Valor de p	Valor de r	Valor de p	Valor de r	Valor de p
ELTMF								
Edad (años)	-0.355	0.257	-0.200	0.533	0.083	0.819	-0.615	0.586
Edad de inicio de epilepsia (años)	-0.277	0.383	0.204	0.524	-0.377	0.282	0.037	0.919
Duración de la epilepsia (años)	-0.136	0.672	-0.399	0.198	0.330	0.351	-0.473	0.167
Frecuencia de crisis (por mes)	0.166	0.606	0.115	0.722	-0.781	0.008 **	0.633	0.049 *
No. de FAE antes de la cirugía	-0.188	0.557	0.167	0.604	0.064	0.860	0.231	0.520
Autopsias								
Edad (años)	0.325	0.302	-0.297	0.348	0.134	0.7130	-0.447	0.195
IPM (h)	0.409	0.187	0.370	0.237	-0.488	0.1521	0.598	0.068

FAE: fármacos antiepilépticos; Emax: estimulación máxima; pEC50: -log concentración efectiva media; IPM: intervalo postmortem; Correlación de Pearson; **p<0.001, *p<0.05.

6.5.2.3 Discusión

La UNV de hipocampo y corteza temporal de los pacientes con ELTMF mostraron una mayor eficacia (E_{max}) para inducir la activación de la proteína $G\alpha_{i/o}$ como consecuencia de la exposición del agonista CB_1 en comparación con el grupo de autopsias. Además, los receptores CB_1 en hipocampo, presentaron una mayor potencia (pEC_{50}) en el grupo de los pacientes con un mayor tiempo de duración de la epilepsia. Estos hallazgos sugieren que la neurotransmisión mediada por los receptores CB_1 es mayor en la UNV de los pacientes con ELTMF.

Respecto a los receptores CB_2 , los ensayos de unión también mostraron una mayor eficacia para inducir la activación de la proteína $G\alpha_i$ como consecuencia de la exposición del agonista CB_2 en hipocampo. Estos resultados indican que los receptores CB_2 activan de manera más eficiente a sus mecanismos transduccionales en la UNV de hipocampo de los pacientes con ELTMF. En la UNV de la corteza temporal de pacientes con ELTMF el valor de la potencia fue menor que el de las autopsias. Sin embargo, los pacientes con la frecuencia más alta de crisis epilépticas presentaron una mayor eficacia y potencia. Estos resultados indican que la potencia del acoplamiento funcional de los receptores CB_2 podría aumentar como respuesta a una alta frecuencia de crisis epilépticas.

En general, estos resultados sugieren un papel diferencial para los receptores CB_1 y CB_2 en la UNV de hipocampo y la UNV de corteza temporal de los pacientes con ELTMF. La señal de alta eficacia de transducción mediada por la activación de los receptores CB_1 y CB_2 en los diferentes componentes de la UNV de hipocampo y corteza temporal no evita el deterioro de la BHE asociado con la epilepsia (van Vliet et al., 2014; Broekaart et al., 2018). La falta de efectos protectores mediados por los receptores CB_1 y CB_2 en la UNV de pacientes con ELTMF puede estar relacionada con niveles bajos de

endocannabinoides en el parénquima cerebral, como 2-araquidonoilglicerol (Rocha et al., 2020).

Por otro lado, se ha reportado que la activación de los receptores CB₁ y CB₂ podría inducir neurotoxicidad, una condición que puede depender de la cronicidad del trastorno (Di Marzo, 2008; Fowler et al., 2010; Vendel y de Lange, 2014). Los estudios de trastornos neurodegenerativos también indican que la activación de los receptores CB₁ y CB₂ puede aumentar la migración de las células del sistema inmune (Miller y Stella, 2008) y así facilitar estrés oxidativo (Mukhopadhyay et al., 2010), inflamación, y la ruptura de la BHE (Persidsky et al., 2006). También se ha reportado que la activación de los receptores CB₁ y CB₂ aumenta el reclutamiento de leucocitos, inflamación y neovascularización (Guabiraba et al., 2013). Con base en este grupo de evidencias es posible sugerir que la alta eficacia en la transducción de señal mediada por la activación de los receptores CB₁ y CB₂ encontrada en el hipocampo y corteza de pacientes con ELTMF puede ser una condición que facilite la neurotoxicidad, la inflamación y la neovascularización aberrante. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para determinar si el acoplamiento de alta eficacia de la señal de los mecanismos de transducción mediados por receptores CB₁ y CB₂ resulta en el deterioro de la UNV en pacientes con ELTMF.

Se sabe que los receptores CB₁ y CB₂ tienen un papel importante en la integridad de la BHE (Lu et al., 2008). Nuestros resultados indican que la epilepsia induce cambios en los niveles de expresión de las proteínas de las uniones estrechas así como también en los niveles de expresión de los receptores CB₁ y CB₂. Además, nuestros resultados indican que los pacientes con ELTMF presentan una alta eficiencia en la transducción de señales mediada por la activación de los receptores CB₁ y CB₂, una condición que pueden facilitar la inflamación y la neovascularización en el hipocampo y la neocorteza temporal.

7. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente estudio utilizamos el protocolo utilizado por Castañeda-Cabral et al., (2020a) el cual permitió el aislamiento de la UNV a partir de tejido cerebral humano congelado de pacientes con ELTMF y de autopsias. La UNV aislada contenía las células endoteliales microvasculares (positivas para CD34), los pies de los astrocitos (positivas para GFAP) y pericitos (positivos para PDGFR- β). La realización de esta técnica permitió la evaluación por primera vez, de la expresión proteica y funcionalidad de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV de humanos, tanto autopsias como pacientes con ELTMF.

Entre los criterios que utilizamos para tomar las autopsias como control fue la expresión de la proteína β -actina como control de carga para los experimentos de western blot. La expresión de la proteína β -actina siempre obtuvo dentro del rango de detección, a pesar del tiempo postmortem. Asimismo, analizamos la correlación de los valores obtenidos en los diferentes experimentos con la edad de cada uno de los sujetos para determinar su posible influencia en los resultados experimentales. De acuerdo con nuestro análisis, el intervalo post mortem o la edad de las autopsias no influyeron en los resultados obtenidos de las autopsias. Sin embargo, no podemos confirmar completamente que los controles no presentaron trastornos neurodegenerativos. Esta situación representa una limitación del presente estudio.

Para que la UNV lleve a cabo su función de barrera correctamente, es necesario que las proteínas de las uniones estrechas tengan integridad en su composición, la cual se caracteriza por una expresión lineal y homogénea a través de los espacios intercelulares de las células endoteliales (Ng et al., 2003; Wosik et al., 2007; Wolburg et al., 2009). En la BHE, las uniones estrechas son un tipo unión célula-célula formada por un complejo de proteínas que incluyen la hendidura intercelular principalmente: ocludina y claudinas a nivel membranal (Bauer et al. 1999; Morita et al. 1999; Martín-Padura et al. 1998) y ZO-1 a nivel citoplásmico (Itoh M, et al. 1999; Wolburg & Lippoldt, 2002). Como

se mencionó anteriormente, utilizamos UNV de hipocampo y corteza temporal obtenidos de autopsias, como condición control y encontramos que la expresión de claudina-5, ocludina y ZO-1 presentaron una expresión lineal y homogénea en los MV de ambas estructuras, lo cual es un indicador de la integridad de la BHE de las autopsias. Por lo anterior, los resultados obtenidos de las autopsias se consideraron una condición control para el presente estudio.

En varios trastornos neurológicos, incluida la epilepsia, se ha demostrado que la permeabilidad de la BHE está alterada (Abbott et al., 2010). Nuestros resultados muestran que la BHE de los pacientes con ELTMF, presenta una disminución en la expresión de ocludina y ZO-1. Sin embargo, la proteína claudina-5 mostró un aumento en su expresión y correlación significativa con la edad y la duración de la epilepsia.

En la BHE de los pacientes con ELTMF, se interrumpe la linealidad y la continuidad en la expresión de las proteínas que conforman las uniones estrechas. Además, encontramos una correlación positiva de la expresión de claudin-5 con la edad y la duración de la epilepsia; esto indica que cuanto mayor es el tiempo de los pacientes con la enfermedad, mayor es la expresión de claudina-5. Estos resultados nos indican un mecanismo compensatorio para contrarrestar la disminución de la expresión de ocludina y de ZO-1. Nuestros resultados con respecto a la expresión de claudina-5 concuerdan con los reportados por Chun Yan et al. (2018), quienes encontraron que en el modelo de ácido kaínico en ratón provocó un aumento en la expresión de las proteínas claudina-5 72 h después del tratamiento.

Por otro lado, encontramos una disminución en la expresión e inmunorreactividad de ocludina y ZO-1 en la BHE de hipocampo y corteza temporal. Además, la linealidad y la continuidad de expresión también se interrumpen en la BHE de los pacientes con ELTMF. Varios estudios han demostrado que los cambios en la expresión de las proteínas de las uniones

estrechas, la variación en su distribución y / o el funcionamiento anormal de sus estructuras podrían destruir la integridad de las uniones estrechas y provocar cambios en la permeabilidad de la BHE (Ng et al., 2003). Esta disminución en la expresión de ocludina y ZO-1 ha sido asociada con el daño de la BHE en trastornos neurológicos como la epilepsia (Michalak et al., 2012).

Nuestros resultados mostraron cambios significativos en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas en la BHE de los pacientes con ELTMF. El incremento en la expresión de claudina-5 y la disminución de ocludina y ZO-1 sugieren alteraciones importantes en la integridad de la BHE que pueden contribuir a la patogénesis de la epilepsia.

Por otra parte, los receptores CB₁ y CB₂ tienen un papel importante en la integridad de la BHE. Lu et al., (2008) describieron que la activación de CB₁ evita la disminución de la expresión de las proteínas ZO-1, claudina-5 y JAM-1, y la consiguiente disfunción de la BHE. Además, la activación de los receptores CB₂ en células endoteliales disminuye la permeabilidad de la BHE, así como la expresión de proteínas de las uniones estrechas y reduce los efectos neuroinflamatorios (Ramírez et al., 2012). Es posible pensar que la epilepsia se asocia a disminución de la expresión de proteínas y/o las vías transduccionales de estos receptores en la BHE de los pacientes con ELTMF. Sin embargo, los resultados obtenidos de los ensayos de unión con GTP γ S indican que la UNV de hipocampo y corteza temporal de los pacientes con ELTMF mostraron una mayor eficacia para inducir la activación de la proteína G $\alpha_{i/o}$ como consecuencia de la exposición al agonista CB₁ en comparación con el grupo de las autopsias. Además, los pacientes con una mayor duración de la epilepsia presentaron receptores CB₁ con una potencia mayor de estimulación en el hipocampo. Estos hallazgos sugieren que la neurotransmisión mediada por los receptores CB₁ es mayor en la UNV de los pacientes con ELTMF. Este efecto fue detectado en el hipocampo a pesar de una menor expresión de los receptores, sugiriendo un

cambio adaptativo en la señalización de los mecanismos transduccionales mediada por estos receptores.

Los ensayos de unión en tejido hipocampal revelaron que los pacientes con ELTMF presentaron receptores CB₂ con mayor capacidad para activar a la proteína G $\alpha_{i/o}$ en la UNV, independientemente de la baja expresión de proteínas. Estos resultados indican que los receptores CB₂ se acoplan de manera más eficiente a los mecanismos de transducción de señales en la UNV de hipocampo de los pacientes con ELTMF. Por otra parte, el acoplamiento funcional de los receptores CB₂ a las proteínas G $\alpha_{i/o}$ en el hipocampo y en la corteza temporal de la UNV de los pacientes con ELTMF fue de menor potencia que en las autopsias. Sin embargo, el análisis de correlación con las variables clínicas indicó que la UNV de corteza temporal de los pacientes que presentaron frecuencia de convulsiones más alta tienen una eficacia más baja, pero la potencia es mayor para el receptor CB₂. Estos resultados indicaron que la potencia del acoplamiento funcional de los receptores CB₂ podría aumentar como una respuesta a una alta frecuencia de convulsiones. Sin embargo, es necesario el análisis de otros componentes de las cascadas de señalización de estos receptores como la actividad de la beta arrestina, la activación de factores de transcripción, entre otros.

En relación a la corteza temporal, la eficacia de activación de la proteína G $\alpha_{i/o}$ inducida por la activación de los receptores CB₁ y CB₂ en la UNV fue similar en el hipocampo (zona epileptogénica) y en la corteza (zona de propagación), a pesar de cambios opuestos en la expresión de proteínas. Lo anterior sugiere que la epilepsia causa cambios similares en ambas estructuras, independientemente de su participación en la generación y propagación de la actividad epileptiforme. Esta es una posibilidad que requeriría una exploración más profunda.

Es importante mencionar que los pericitos y astrocitos también expresan receptores CB₁ y CB₂ (Benyó et al., 2016). Por lo anterior, tanto la presencia como la activación de los receptores CB₁ y CB₂ podría ocurrir en esas células y no podemos descartar la influencia de estos elementos celulares en los resultados obtenidos. Futuros estudios son necesarios para identificar el papel de los receptores CB₁ y CB₂ en cada elemento que conforma la UNV en sujetos con epilepsia.

Algunos estudios apoyan el papel protector de los receptores CB₁ y CB₂ en el mantenimiento de la integridad de BHE (Lu et al., 2008; Zhang et al., 2011; Ramirez et al., 2012). De hecho, la activación de los receptores CB₁ y CB₂ por 2-araquidonoilglicerol, contribuye a mantener la integridad de la BHE después de una lesión cerebral (Piro et al., 2018). Por otro lado, Castañeda-Cabral et al., 2020a reportó que los microvasos cerebrales de pacientes con ELTMF presentan sobreexpresión de VEGF-A y de su receptor VEGFR-2. Estos cambios pueden facilitar el proceso de angiogénesis (Marchi y Lerner-Natoli, 2013), neuroinflamación y aumento de la permeabilidad la BHE (Gorter et al., 2015; Baruah et al., 2020). La activación de los receptores cannabinoides se considera una estrategia para disminuir la señalización de VEGF y reducir la inflamación crónica, para finalmente y disminuir la neoangiogénesis (Schley et al., 2009; Staiano et al., 2016; Sathyapalan et al., 2017). Sin embargo, la alta eficacia de la transducción mediada por la activación de los receptores cannabinoides (presente estudio) no evita el deterioro de la BHE asociada con la epilepsia resistente a fármacos (van Vliet et al., 2014; Broekaart et al., 2018). La falta de efectos protectores mediados por los receptores CB₁ y CB₂ en la microvasculatura cerebral de pacientes con ELTMF puede estar relacionada con los niveles bajos de endocannabinoides en los tejidos, como 2-araquidonoilglicerol (Rocha et al., 2020).

Los nanotransportadores han sido diseñados para atravesar la BHE y administrar fármacos en el parénquima cerebral (Naz y Siddique, 2020). Por

otro lado, la BHE representa un objetivo valioso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos. El presente estudio muestra que los microvasos cerebrales presentan un aumento en la transmisión de señales mediada por receptores CB₁ y CB₂, lo cual puede representar una nueva diana terapéutica para preservar la integridad de la BHE de los pacientes con ELTMF.

Sin embargo, también se ha reportado que la activación de los receptores CB₁ y CB₂ podría inducir neurotoxicidad, una condición que puede depender de la cronicidad del trastorno (Di Marzo, 2008; Fowler et al., 2010; Vendel y de Lange, 2014). Los estudios de trastornos neurodegenerativos también indican que la activación de los receptores CB₁ y CB₂ puede aumentar la migración de células del sistema inmune (Miller y Stella, 2008) y así facilitar procesos como estrés oxidativo (Mukhopadhyay et al., 2010), inflamación, y el daño de la BHE (Persidsky et al., 2006). Guabiraba et al., 2013 reportaron que la activación de los receptores CB₁ y CB₂ aumenta el reclutamiento de leucocitos con lo cual se favorece el desarrollo de inflamación y neovascularización. Nuestros resultados revelaron que los pacientes con ELTMFR presentan una alta eficiencia en la activación de los mecanismos transduccionales mediados por la activación de los receptores CB₁ y CB₂, una condición que pueden facilitar la inflamación y la neovascularización en el hipocampo y la corteza temporal. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios para determinar si el aumento en la eficacia de los mecanismos transduccionales mediados por los receptores CB₁ y CB₂ facilita el deterioro de la BHE en los pacientes con ELTMF.

Una de las vías por la cual los receptores cannabinoides podrían estar disminuyendo la expresión de las proteínas que conforman de las uniones estrechas es a través de la activación de la GTPasa Rho, la cual induce la activación de la cinasa ROCK. Esta cinasa es la encargada de la fosforilación de la cadena ligera de miosina lo que promueve la contracción del citoesqueleto de actina y así se desensamblan las uniones formadas por las proteínas ZO-1,

claudina 5 y ocludina (Barutta et al., 2010, Mai et al., 2015, Wu et al., 2017, figura 14).

Pacientes con ELTMF

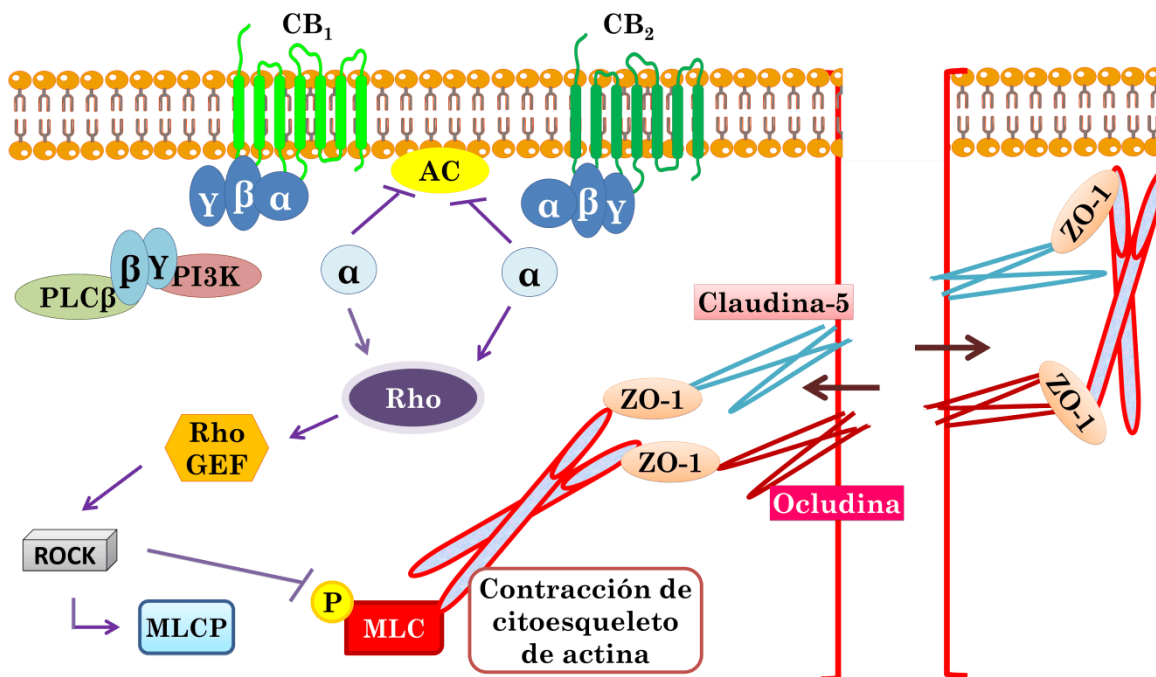


Figura 22. Modulación de la expresión de las proteínas claudina-5, ocludina y ZO-1 por los receptores CB₁ y CB₂. La activación de los receptores CB₁ y CB₂ induce la activación de la proteína Rho. Mientras tanto, las subunidades βγ de la proteína G activan el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rho (Rho GEF), el cual activa a la proteína Rho y forma el complejo GTP-Rho. Después de la activación de la cinasa Rho, ROCK promueve la fosforilación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina e inhibe la desfosforilación de MLC. La fosforilación de la cadena ligera de miosina induce la contracción del citoesqueleto de actina. La proteína ZO-1 por un lado, se encuentra anclada al citoesqueleto de actina y por el otro a las proteínas claudina-5 y ocludina. La contracción del citoesqueleto de actina provoca el desensamblaje de las proteínas que conforman las uniones estrechas y esto podría generar daño en la BHE (Barutta et al., 2010; Mai et al., 2015; Kino et al., 2016).

8. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados mostraron cambios significativos en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas en la BHE de los pacientes con ELTMF. El incremento en la expresión de claudina-5 y la disminución de ocludina y ZO-1 sugieren alteraciones importantes en la integridad de la BHE que pueden contribuir a la patogénesis de la epilepsia.

Los pacientes con ELTMF presentan una alta eficiencia en la activación de los mecanismos transduccionales mediados por la activación de los receptores CB_1 y CB_2 , la eficacia de activación de la proteína $G_{\alpha_{i/o}}$ en el área epileptógena (hipocampo) fue similar a la zona de propagación (neocorteza temporal) a pesar de cambios opuestos en la expresión de proteínas. Lo anterior sugiere que la epilepsia causa cambios similares en ambas estructuras, independientemente de su participación en la generación y propagación de la actividad epileptiforme. Esta condición puede facilitar la inflamación y la neovascularización en el hipocampo y la corteza temporal. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios para determinar si el aumento en la eficacia de los mecanismos transduccionales mediados por los receptores CB_1 y CB_2 facilita el deterioro de la BHE en los pacientes con ELTMF.

Con estos resultados podemos concluir que nuestra hipótesis fue verdadera en cuanto al aumento en la capacidad de activación de las proteínas $G_{\alpha_{i/o}}$ a través de los receptores CB_1 y CB_2 , el aumento en la expresión de los receptores CB_1 y CB_2 en la corteza temporal y la disminución de las proteínas ocludina y ZO-1.

9. PERSPECTIVAS

Los resultados descritos y las limitaciones señaladas previamente permiten proponer para este estudio las siguientes perspectivas:

1. Desarrollar un modelo animal de ELTMF que permita identificar el curso temporal de los efectos de la activación de los receptores cannabinoides en la BHE.

2. Analizar si el aumento en la eficacia de los mecanismos transduccionales mediados por los receptores CB₁ y CB₂ facilita el deterioro de la BHE en los pacientes con ELTMF y en modelos animales.
3. Identificar el mecanismo transduccional por el cual los receptores CB₁ y CB₂ modulan la expresión de las proteínas que conforman las uniones estrechas.
4. Analizar el efecto de los fármacos antiepilépticos en los cambios descritos en el sistema cannabinoide en tejido y en la BHE de hipocampo y corteza temporal de pacientes con ELTMF.
5. Analizar posibles diferencias en los efectos de la activación de los receptores cannabinoides dependiendo de la etiología de la ELTMF y variables clínicas de los pacientes.

10. REFERENCIAS

- Abbott N, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. (2006). *Nat Rev Neurosci.* 7(1):41-53. doi: 10.1038/nrn1824.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ.(2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 37(1):13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- Abood, M. E., and Martin, B. R. (1996). Molecular neurobiology of the cannabinoid receptor. *Int. Rev. Neurobiol.* 39, 197–221. doi: 10.1016/S0074-7742(08)60667-4.
- Acquas, E., Pisanu, A., Marrocu, P., Goldberg, S. R., & Di Chiara, G. (2001). Delta9-tetrahydrocannabinol enhances cortical and hippocampal acetylcholine release in vivo: a microdialysis study. *European journal of pharmacology*, 419(2-3), 155–161. doi: 10.1016/s0014-2999(01)00967-0.
- Ahishali, B., Kaya, M., Orhan, N., Arican, N., Ekizoglu, O., Elmas, I., Kucuk, M., Kemikler, G., Kalayci, R., & Gurses, C. (2010). Effects of levetiracetam on blood-brain barrier disturbances following hyperthermia-induced seizures in rats with cortical dysplasia. *Life sciences*, 87(19-22), 609–619. doi: 10.1016/j.lfs.2010.09.014.

- Alger B. E. (2002). Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in neurobiology*, 68(4), 247–286. doi:10.1016/s0301-0082(02)00080-1.
- Amenta, P. S., Jallo, J. I., Tuma, R. F., & Elliott, M. B. (2012). A cannabinoid type 2 receptor agonist attenuates blood-brain barrier damage and neurodegeneration in a murine model of traumatic brain injury. *Journal of neuroscience research*, 90(12), 2293–2305. doi:10.1002/jnr.23114.
- András, I. E., Deli, M. A., Veszelka, S., Hayashi, K., Hennig, B., & Toborek, M. (2007). The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(8), 1431–1443. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600445.
- Aronica, E., & Crino, P. B. (2011). Inflammation in epilepsy: clinical observations. *Epilepsia*, 52 Suppl 3, 26–32. doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03033.x.
- Barutta, F., Corbelli, A., Mastrocola, R., Gambino, R., Di Marzo, V., Pinach, S., Rastaldi, M. P., Perin, P. C., & Gruden, G. (2010). Cannabinoid receptor 1 blockade ameliorates albuminuria in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes*, 59(4), 1046–1054. doi:10.2337/db09-1336.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5428), 727–729. doi:10.1126/science.285.5428.727.
- Benito, C., Tolón, R. M., Pazos, M. R., Núñez, E., Castillo, A. I., & Romero, J. (2008). Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *British journal of pharmacology*, 153(2), 277–285. doi:10.1038/sj.bjp.0707505.
- Benyó, Z., Ruisanchez, É., Leszl-Ishiguro, M., Sándor, P., and Pacher, P. (2016). Endocannabinoids in cerebrovascular regulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310, H785–H801. doi: 10.1152/ajpheart.00571.2015.
- Bisogno, T., Ligresti, A., & Di Marzo, V. (2005). The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 81(2), 224–238. doi:10.1016/j.pbb.2005.01.027.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J.* 1995.312 (Pt 2):637-41. doi: 10.1042/bj3120637.

- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999.
- Broekaart, D.W. M., Anink, J. J., Baayen, J. C., Idema, S., de Vries, H. E., Aronica, E., et al. (2018). Activation of the innate immune system is evident throughout epileptogenesis and is associated with blood-brain barrier dysfunction and seizure progression. *Epilepsia* 59, 1931–1944. doi: 10.1111/epi.14550.
- Cacheaux, L. P., Ivens, S., David, Y., Lakhter, A. J., Bar-Klein, G., Shapira, M., Heinemann, U., Friedman, A., & Kaufer, D. (2009). Transcriptome profiling reveals TGF-beta signaling involvement in epileptogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(28), 8927–8935. doi:10.1523/JNEUROSCI.0430-09.2009.
- Caffarel, M. M., Andradas, C., Pérez-Gómez, E., Guzmán, M., & Sánchez, C. (2012). Cannabinoids: a new hope for breast cancer therapy?. *Cancer treatment reviews*, 38(7), 911–918. doi:10.1016/j.ctrv.2012.06.005.
- Castañeda-Cabral, J. L., Colunga-Durán, A., Ureña-Guerrero, M. E., Beas-Zárate, C., Nuñez-Lumbreras, M. L. A., Orozco-Suárez, S., et al. (2020a). Expression of VEGF- and tight junction-related proteins in the neocortical microvasculature of patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy. *Microvasc. Res.* 132:104059. doi: 10.1016/j.mvr.2020.104059.
- Castañeda-Cabral, J. L., Ureña-Guerrero, M. E., Beas-Zárate, C., et al. (2020b). Increased expression of proinflammatory cytokines and iNOS in the neocortical microvasculature of patients with temporal lobe epilepsy. *Immunol. Res.* 68, 169–176. doi: 10.1007/s12026-020-09139-3.
- Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J. L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A. S., Kreyborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., Bouthillier, A., Becher, B., Arbour, N., David, S., Stanimirovic, D., & Prat, A. (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nature immunology*, 9(2), 137–145. doi:10.1038/ni1551.
- Chagnac-Amitai, Y., & Connors, B. W. (1989). Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *Journal of neurophysiology*, 61(4), 747–758. doi:10.1152/jn.1989.61.4.747.

- Chervin, R. D., Pierce, P. A., & Connors, B. W. (1988). Periodicity and directionality in the propagation of epileptiform discharges across neocortex. *Journal of neurophysiology*, 60(5), 1695–1713. doi:10.1152/jn.1988.60.5.1695
- Childers, S. R., Pacheco, M. A., Bennett, B. A., Edwards, T. A., Hampson, R. E., Mu, J., & Deadwyler, S. A. (1993). Cannabinoid receptors: G-protein-mediated signal transduction mechanisms. *Biochemical Society symposium*, 59, 27–50.
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., & Gilula, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384(6604), 83–87. doi:10.1038/384083a0.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. (2010). *Nature*. 25. 468 (7323): 562-6. doi: 10.1038/nature09513.
- Daneman R. (2012). The blood-brain barrier in health and disease. *Annals of neurology*, 72(5), 648–672. doi.org/10.1002/ana.23648
- de Lanerolle N, Lee TS. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. (2005). *Epilepsy Behav.*7(2):190-203. doi: 10.1016/j.yebeh.2005.06.003.
- DeFelipe Oroquieta, J., Arellano, J. I., Alonso, L., & Muñoz, A. (2002). Neuropatología de la epilepsia del lóbulo temporal. Alteraciones primarias y secundarias de los circuitos corticales y epileptogenicidad [The neuropathology of temporal lobe epilepsy: primary and secondary changes in the cortical circuits and epileptogenicity]. *Revista de neurologia*, 34(5), 401–408.
- DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L., & Arellano, J. I. (2002). Microstructure of the neocortex: comparative aspects. *Journal of neurocytology*, 31(3-5), 299–316. Doi:10.1023/a:1024130211265.
- Di Marzo V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(5), 438–455. doi:10.1038/nrd2553.
- Di Marzo, V., & De Petrocellis, L. (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand?. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1607), 3216–3228. doi:10.1098/rstb.2011.0382.
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., & De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in neurosciences*, 21(12), 521–528. doi:0.1016/s0166-2236(98)01283-1.

- DiMarzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 438–455. doi: 10.1038/nrd2553.
- Engel J., Jr (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*, 26(1), 141–150. doi:10.1016/s0920-1211(96)0004.
- Engel, J., Jr, & International League Against Epilepsy (ILAE) (2001). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42(6), 796–803. doi:10.1046/j.1528-1157.2001.10401.x.
- Engel, J., Jr, McDermott, M. P., Wiebe, S., Langfitt, J. T., Stern, J. M., Dewar, S., Sperling, M. R., Gardiner, I., Erba, G., Fried, I., Jacobs, M., Vinters, H. V., Mintzer, S., Kieburtz, K., & Early Randomized Surgical Epilepsy Trial (ERSET) Study Group (2012). Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. *JAMA*, 307(9), 922–930. doi:10.1001/jama.2012.220.
- Falenski, K. W., Carter, D. S., Harrison, A. J., Martin, B. R., Blair, R. E., & DeLorenzo, R. J. (2009). Temporal characterization of changes in hippocampal cannabinoid CB(1) receptor expression following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain research*, 1262, 64–72. doi:10.1016/j.brainres.2009.01.036
- Fisher, R. (2015). Redefining epilepsy. *Curr. Opin. Neurol.* 28, 130–135. doi: 10.1097/WCO.0000000000000174
- Fowler, C. J., Rojo, M. L., and Rodriguez-Gaztelumendi, A. (2010). Modulation of the endocannabinoid system: neuroprotection or neurotoxicity? *Exp. Neurol.* 224, 37–47. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.03.021
- Friedman, A., Kaufer, D., & Heinemann, U. (2009). Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. *Epilepsy research*, 85(2-3), 142–149. doi:10.1016/j.eplepsyres.2009.03.005.
- Golech, S. A., McCarron, R. M., Chen, Y., Bembry, J., Lenz, F., Mechoulam, R., Shohami, E., & Spatz, M. (2004). Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain research. Molecular brain research*, 132(1), 87–92. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.08.025.
- González, H., Elgueta, D., Montoya, A., & Pacheco, R. (2014). Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and

- neurodegenerative diseases. *Journal of neuroimmunology*, 274(1-2), 1–13. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.07.012.
- González-Mariscal, L., Raya-Sandino, A., González-González, L., & Hernández-Guzmán, C. (2018). Relationship between G proteins coupled receptors and tight junctions. *Tissue barriers*, 6(1), e1414015. doi:10.1080/21688370.2017.1414015.
- Gorter, J. A., Aronica, E., & van Vliet, E. A. (2019). The Roof is Leaking and a Storm is Raging: Repairing the Blood-Brain Barrier in the Fight Against Epilepsy. *Epilepsy currents*, 19(3), 177–181. doi:10.1177/1535759719844750.
- Gorter, J. A., van Vliet, E. A., & Aronica, E. (2015). Status epilepticus, blood-brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. *Epilepsy & behavior : E&B*, 49, 13–16. doi:10.1016/j.yebeh.2015.04.047.
- Guabiraba, R., Russo, R. C., Coelho, A. M., Ferreira, M. A., Lopes, G. A., Gomes, A. K., et al. (2013). Blockade of cannabinoid receptors reduces inflammation, leukocyte accumulation, and neovascularization in a model of sponge-induced inflammatory angiogenesis. *Inflamm. Res.* 62, 811–821. doi: 10.1007/s00011-013-0638-8.
- Gürses, C., Orhan, N., Ahishali, B., Yilmaz, C. U., Kemikler, G., Elmas, I., Cevik, A., Kucuk, M., Arican, N., & Kaya, M. (2013). Topiramate reduces blood-brain barrier disruption and inhibits seizure activity in hyperthermia-induced seizures in rats with cortical dysplasia. *Brain research*, 1494, 91–100. doi:10.1016/j.brainres.2012.11.039.
- Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., & Kano, M. (2007). Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 13(2), 127–137. doi:10.1177/1073858406296716.
- Hawkins, B. T., and Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 57, 173–185. doi: 10.1124/pr.57.2.4.
- Herranz, J. L., & Argumosa, A. (2000). Pronóstico de las epilepsias y supresión del tratamiento: supresión de medicación en la infancia y adolescencia [Prognosis of epilepsy and withdrawal of treatment: withdrawal of treatment in childhood and adolescents]. *Revista de neurologia*, 30(4), 351–355.

- Hirsch, E. C., Jenner, P., & Przedborski, S. (2013). Pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 28(1), 24–30. doi: 10.1002/mds.25032.
- Hofmann, M. E., & Frazier, C. J. (2013). Marijuana, endocannabinoids, and epilepsy: potential and challenges for improved therapeutic intervention. *Experimental neurology*, 244, 43–50. doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.047.
- Howlett AC. The cannabinoid receptors. (2002). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:619-31. doi: 10.1016/s0090-6980(02)00060-6.
- Howlett, A.C., & Abood, M. E. (2017). CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.), 80, 169–206. doi:10.1016/bs.apha.2017.03.007.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. (1999). *J Cell Biol.* 13, 147(6):1351-63. doi: 10.1083/jcb.147.6.1351.
- Ivens S, Gabriel S, Greenberg G, Friedman A, Shelef I. Blood-brain barrier breakdown as a novel mechanism underlying cerebral hyperperfusion syndrome. *J Neurol.* 2010 Apr;257(4):615-20. Epub 2009 Nov 22. PMID: 20361293; PMCID: PMC3625729. doi: 10.1007/s00415-009-5384-z.
- Izzo, A. A., & Sharkey, K. A. (2010). Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacology & therapeutics*, 126(1), 21–38. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.12.005.
- Janigro D. Are you in or out? Leukocyte, ion, and neurotransmitter permeability across the epileptic blood-brain barrier. (2012). *Epilepsia.* 2012 Jun;53 Suppl 1:26-34. *Arch Med Res.* 2014; 45(8):677-86. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03472.x.
- Kofuji, P., & Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4), 1045–1056. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.008.
- Kook, S. Y., Hong, H. S., Moon, M., Ha, C. M., Chang, S., and Mook-Jung, I. (2012). Ab1–42-RAGE interaction disrupts tight junctions of the bloodbrain barrier via Ca²⁺-calcineurin signaling. *J. Neurosci.* 32, 8845–8854. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6102-11.2012.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. (2008). *Biochim Biophys Acta.* 1778(3):631-45.

- Kwan, P., Li, H. M., Al-Jufairi, E., Abdulla, R., Gonzales, M., Kaye, A. H., Szoeké, C., Ng, H. K., Wong, K. S., & O'Brien, T. J. (2010). Association between temporal lobe P-glycoprotein expression and seizure recurrence after surgery for pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease*, 39(2), 192–197. doi:10.1016/j.nbd.2010.04.006.
- Lamas M, González-Mariscal L, Gutiérrez R. Presence of claudins mRNA in the brain. Selective modulation of expression by kindling epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002;104(2):250-254. doi:10.1016/s0169-328x(02)00328-5.
- Lee, Y. K., Uchida, H., Smith, H., Ito, A., & Sanchez, T. (2019). The isolation and molecular characterization of cerebral microvessels. *Nature protocols*, 14(11), 3059–3081. doi:0.1038/s41596-019-0212-0.
- Librizzi, L., Noè, F., Vezzani, A., de Curtis, M., & Ravizza, T. (2012). Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence and blood-brain barrier damage. *Annals of neurology*, 72(1), 82–90. doi:10.1002/ana.23567.
- Lu, T. S., Avraham, H. K., Seng, S., Tachado, S. D., Koziel, H., Makriyannis, A., & Avraham, S. (2008). Cannabinoids inhibit HIV-1 Gp120-mediated insults in brain microvascular endothelial cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 181(9), 6406–6416. doi:10.4049/jimmunol.181.9.6406.
- Ludányi, A., Eross, L., Czirják, S., Vajda, J., Halász, P., Watanabe, M., Palkovits, M., Maglóczy, Z., Freund, T. F., & Katona, I. (2008). Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(12), 2976–2990. doi:10.1523/JNEUROSCI.4465-07.2008.
- Mai, P., Tian, L., Yang, L., Wang, L., Yang, L., & Li, L. (2015). Cannabinoid receptor 1 but not 2 mediates macrophage phagocytosis by G α i/o /RhoA/ROCK signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, 230(7), 1640–1650. doi.org/10.1002/jcp.24911
- Maione, S., De Petrocellis, L., de Novellis, V., Moriello, A. S., Petrosino, S., Palazzo, E., Rossi, F. S., Woodward, D. F., & Di Marzo, V. (2007). Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *British journal of pharmacology*, 150(6), 766–781. doi:10.1038/sj.bjp.0707145.

- Marchi, N., and Lerner-Natoli, M. (2013). Cerebrovascular remodeling and epilepsy. *Neuroscientist* 19, 304–312. doi: 10.1177/1073858412462747
- Marchi, N., Angelov, L., Masaryk, T., Fazio, V., Granata, T., Hernandez, N., Hallene, K., Diglaw, T., Franic, L., Najm, I., & Janigro, D. (2007). Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia*, 48(4), 732–742. doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.00988.x.
- Marchi, N., Granata, T., Ghosh, C., & Janigro, D. (2012). Blood-brain barrier dysfunction and epilepsy: pathophysiologic role and therapeutic approaches. *Epilepsia*, 53(11), 1877–1886. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03637.x
- Marchi, N., Tierney, W., Alexopoulos, A. V., Puvenna, V., Granata, T., & Janigro, D. (2011). The etiological role of blood-brain barrier dysfunction in seizure disorders. *Cardiovascular psychiatry and neurology*, 2011, 482415. doi:10.1155/2011/482415.
- Martìn-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., & Dejana, E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *The Journal of cell biology*, 142(1), 117–127. doi:10.1083/jcb.142.1.117.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., and Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346, 561–564. doi: 10.1038/346561a0.
- Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1965). A total synthesis of dl-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 87, 3273–3275. doi:10.1021/ja01092a065.
- Michalak, Z., Sano, T., Engel, T., Miller-Delaney, S. F., Lerner-Natoli, M., & Henshall, D. C. (2013). Spatio-temporally restricted blood-brain barrier disruption after intra-amygdala kainic acid-induced status epilepticus in mice. *Epilepsy research*, 103(2-3), 167–179. doi:10.1016/j.eplepsyres.2012.10.006.
- Miller, A. M., and Stella, N. (2008). CB2 receptor-mediated migration of immune cells: it can go either way. *Br. J. Pharmacol.* 153, 299–308. doi: 10.1038/sj.bjp.0707523.
- Molina-Holgado, F., Molina-Holgado, E., Guaza, C., & Rothwell, N. J. (2002). Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in

- astrocyte cultures. *Journal of neuroscience research*, 67(6), 829–836. <https://doi.org/10.1002/jnr.10165>
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 511–516. doi:10.1073/pnas.96.2.511.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Bátkai, S., Patel, V., Harvey-White, J., Mukhopadhyay, B., et al. (2010). CB1 cannabinoid receptors promote oxidative stress and cell death in murine models of doxorubicin-induced cardiomyopathy and in human cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 85, 773–784. doi: 10.1093/cvr/cvp369.
- Munikoti, V. V., Hoang-Minh, L. B., & Ormerod, B. K. (2012). Enzymatic digestion improves the purity of harvested cerebral microvessels. *Journal of neuroscience methods*, 207(1), 80–85. doi:10.1016/j.jneumeth.2012.03.011.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. (1993). *Nature*. 1993. 365, 61-65. doi: 10.1038/365061a0.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 12, 161(3):653-60. doi: 10.1083/jcb.200302070.
- Ng, I., Yap, E., Tan, W. L., & Kong, N. Y. (2003). Blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: roles of tight junction proteins. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 32(5 Suppl), S63–S66.
- Ohtsuki S, Yamaguchi H, Katsukura Y, Asashima T, Terasaki T. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting (2008). *J Neurochem.* 104(1):147-54. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05008.x.
- Pacher, P., & Mechoulam, R. (2011). Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system?. *Progress in lipid research*, 50(2), 193–211. doi:10.1016/j.plipres.2011.01.001.
- Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. (2006). *FASEB J.* 20 (13):2405-7. doi: 10.1096/fj.06-6164fje.

- Palmer JC, Kehoe PG, Love S. Endothelin-converting enzyme-1 in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010; 36(6):487-97. doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01084.x.
- Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J., and Kanmogne, G. D. (2006). Bloodbrain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1, 223–236. doi: 10.1007/s11481-006-9025-3.
- Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P., Di Marzo, V., Elphick, M. R., Greasley, P. J., Hansen, H. S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., & Ross, R. A. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacological reviews*, 62(4), 588–631. doi:10.1124/pr.110.003004.
- Piomelli D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(11), 873–884. doi:10.1038/nrn1247.
- Ramirez, S. H., Haskó, J., Skuba, A., Fan, S., Dykstra, H., McCormick, R., Reichenbach, N., Krizbai, I., Mahadevan, A., Zhang, M., Tuma, R., Son, Y. J., & Persidsky, Y. (2012). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(12), 4004–4016. doi:10.1523/JNEUROSCI.4628-11.2012.
- Ramirez, S. H., Haskó, J., Skuba, A., Fan, S., Dykstra, H., McCormick, R., Reichenbach, N., Krizbai, I., Mahadevan, A., Zhang, M., Tuma, R., Son, Y. J., & Persidsky, Y. (2012). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(12), 4004–4016. doi:10.1523/JNEUROSCI.4628-11.2012.
- Rigau, V., Morin, M., Rousset, M. C., de Bock, F., Lebrun, A., Coubes, P., Picot, M. C., Baldy-Moulinier, M., Bockaert, J., Crespel, A., & Lerner-Natoli, M. (2007). Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain : a journal of neurology*, 130(Pt 7), 1942–1956. doi:10.1093/brain/awm118.
- Rocha, L., Cinar, R., Guevara-Guzmán, R., Alonso-Vanegas, M., San-Juan, D., Martínez-Juárez, I., et al. (2020). Endocannabinoid system and cannabinoid 1 receptors in patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy and comorbid mood disorders. *Front. Behav. Neurosci.* 14, 1–10. doi: 10.3389/fnbeh.2020.00052.

- Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A., & Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 40(1), 2–14. doi:10.1093/alcalc/agh110.
- Rom, S., & Persidsky, Y. (2013). Cannabinoid receptor 2: potential role in immunomodulation and neuroinflammation. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 8(3), 608–620. doi:10.1007/s11481-013-9445-9.
- Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. (1999). *Annu Rev Neurosci.* 22:11-28. doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.11.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N. O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., & Greasley, P. J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British journal of pharmacology*, 152(7), 1092–1101. doi:10.1038/sj.bjp.0707460.
- Rzezak, P., Valente, K. D., & Duchowny, M. S. (2014). Temporal lobe epilepsy in children: executive and mnestic impairments. *Epilepsy & behavior : E&B*, 31, 117–122. doi:10.1016/j.yebeh.2013.12.005.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. (2000). *Mol Biol Cell*.11(12):4131-42. doi: 10.1091/mbc.11.12.4131.
- Schley, M., Ständer, S., Kerner, J., Vajkoczy, P., Schüpfer, G., Dusch, M., et al. (2009). Predominant CB2 receptor expression in endothelial cells of glioblastoma in humans. *Brain Res. Bull.* 79, 333–337. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.01.011.
- Seiffert, E., Dreier, J. P., Ivens, S., Bechmann, I., Tomkins, O., Heinemann, U., & Friedman, A. (2004). Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(36), 7829–7836. doi:10.1523/JNEUROSCI.1751-04.2004.
- Sloviter R. S. (1994). On the relationship between neuropathology and pathophysiology in the epileptic hippocampus of humans and experimental animals. *Hippocampus*, 4(3), 250–253. doi:10.1002/hipo.450040304.
- Solinas, M., Massi, P., Cantelmo, A. R., Cattaneo, M. G., Cammarota, R., Bartolini, D., Cincina, V., Valenti, M., Vicentini, L. M., Noonan, D. M., Albini, A., & Parolaro, D. (2012). Cannabidiol inhibits angiogenesis by

- multiple mechanisms. *British journal of pharmacology*, 167(6), 1218–1231. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02050.x
- Stanimirovic, D., and Friedman, A. (2012). Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1207–1221. doi: 10.1038/jcbfm.2012.25.
- Szallasi, A., & Di Marzo, V. (2000). New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends in neurosciences*, 23(10), 491–497. doi:10.1016/s0166-2236(00)01630-1
- Takeda, S., Sato, N., & Morishita, R. (2014). Systemic inflammation, blood-brain barrier vulnerability and cognitive/non-cognitive symptoms in Alzheimer disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 171. doi: 10.3389/fnagi.2014.00171.
- Tatum W. O., 4th (2012). Mesial temporal lobe epilepsy. *Journal of clinical neurophysiology: official publication of the American Electroencephalographic Society*, 29(5), 356–365. doi:10.1097/WNP.0b013e31826b3ab7.
- Ueno M. (2007). Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. *Current medicinal chemistry*, 14(11), 1199–1206. doi:10.2174/092986707780597943.
- van Vliet, E. A., Aronica, E., and Gorter, J. A. (2014). Role of bloodbrain barrier in temporal lobe epilepsy and pharmacoresistance. *Neuroscience* 277, 455–473. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.030.
- Vazana, U., Veksler, R., Pell, G. S., Prager, O., Fassler, M., Chassidim, Y., Roth, Y., Shahar, H., Zangen, A., Raccach, R., Onesti, E., Ceccanti, M., Colonnese, C., Santoro, A., Salvati, M., D'Elia, A., Nucciarelli, V., Inghilleri, M., & Friedman, A. (2016). Glutamate-Mediated Blood-Brain Barrier Opening: Implications for Neuroprotection and Drug Delivery. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(29), 7727–7739. doi:10.1523/JNEUROSCI.0587-16.2016.
- Vendel, E., and de Lange, E. C. (2014). Functions of the CB1 and CB2 receptors in neuroprotection at the level of the blood-brain barrier. *NeuromolecularMed.* 16, 620–642. doi: 10.1007/s12017-014-8314-x.
- Veszelka, S., Pásztói, M., Farkas, A. E., Krizbai, I., Ngo, T. K., Niwa, M., et al. (2007). Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem. Int.* 50, 219–228. doi: 10.1016/j.neuint.2006.08.006.

- Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. (2002). *Vascul Pharmacol.* 38(6):323-37. doi: 10.1016/s1537-1891(02)00200-8.
- Wolburg, H., & Paulus, W. (2010). Choroid plexus: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 75–88. doi:10.1007/s00401-009-0627-8
- Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. (1997). *J Cell Biol.* 27, 136(2):399-409. doi: 10.1083/jcb.136.2.399.
- Wu, Z., Hofman, F. M., & Zlokovic, B. V. (2003). A simple method for isolation and characterization of mouse brain microvascular endothelial cells. *Journal of neuroscience methods*, 130(1), 53–63. doi:10.1016/s0165-0270(03)00206-1.
- Yan, B. C., Xu, P., Gao, M., Wang, J., Jiang, D., Zhu, X., Won, M. H., & Su, P. Q. (2018). Changes in the Blood-Brain Barrier Function Are Associated With Hippocampal Neuron Death in a Kainic Acid Mouse Model of Epilepsy. *Frontiers in neurology*, 9, 775. doi:10.3389/fneur.2018.00775.
- Zhang, H., Hilton, D.A., Hanemann, C.O., and Zajicek, J. (2011). Cannabinoid receptor and N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D—evidence for altered expression in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 21, 544–557. doi: 10.1111/j.1750-3639.2011.00477.x.
- Zong, Y., Zhou, X., Cheng, J., Yu, J., Wu, J., & Jiang, C. (2017). Cannabinoids Regulate the Diameter of Pericyte-Containing Retinal Capillaries in Rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 43(5), 2088–2101. doi:10.1159/000484193.