



# **UNIVERSIDAD DE VALLADOLID Y CSIC**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología**

## **El Uniportador de Calcio Mitocondrial en Cultivos de Neuronas de Hipocampo de Rata**

Memoria para optar al Título de Máster en Investigación Biomédica presentada por:

**PALOMA GARCÍA CASAS**

Directores:

Dra. Lucía Núñez

Dr. Carlos Villalobos

Valladolid, Julio 2015

# ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1. HOMEOSTASIS DE CALCIO INTRACELULAR EN NEURONAS.....	3
1.1 Mecanismos de regulación de la homeostasis de calcio intracelular .....	3
1.1.1 Transporte de Calcio en Membrana Plasmática.....	3
1.1.2 Transporte de Calcio en Retículo Endoplásmico.....	5
1.1.3 Transporte de calcio en la mitocondria .....	5
2. HOMEOSTASIS DE CALCIO MITOCONDRIAL .....	6
2.1 Uniportador de calcio mitocondrial.....	7
2.2 Papel fisiológico de la homeostasis de calcio mitocondrial .....	8
3. HOMEOSTASIS DE CALCIO Y ENVEJECIMIENTO.....	9
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
1. MATERIALES .....	13
2. TAMPONES Y SOLUCIONES.....	14
3. MÉTODOS EXPERIMENTALES .....	15
3.1 Cultivo primario de neuronas de hipocampo .....	15
3.2 Inmunocitoquímica.....	17
3.2.1 Inmunocitoquímica frente a $\beta$ -tubulina vs GFAP .....	17
3.2.2 Inmunocitoquímica frente a MCU .....	18
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
1. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE HIPOCAMPO.....	19
2. VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL MCU EN UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO NEURONAL.....	20
3. VALORACIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DEL MCU EN DOS MODELOS DE CULTIVO PRIMARIO DE HIPOCAMPO .....	22
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>25</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>27</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>28</b>

# ABREVIATURAS

---

- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub>**: concentración de calcio libre citosólica
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mit</sub>**: concentración de calcio libre mitocondrial
- AMPA**: Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
- ATP**: Adenosín trifosfato
- BSA**: Albúmina de suero bovino
- CICR**: “Calcium Induced Calcium Release”. Liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por Ca<sup>2+</sup>
- DAPI**: 4' - 6 - diamino - 2 - fenilindol
- FBS**: Suero fetal bovino
- GFAP**: Proteína fibrilar ácida de la glía
- GS**: Suero de cabra
- HEPES**: Ácido N-(2-hidroximetil) piperazina -N'-(2-etanosulfónico)
- InsP<sub>3</sub>**: receptor de inositol trifosfato
- IMM**: membrana mitocondrial interna
- Inmunocitoquímica**: ICC
- MCU**: uniportador de calcio mitocondrial
- MP**: membrana plasmática
- NCX**: intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>
- NCX<sub>mito</sub>**: intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> mitocondrial
- NMDA**: N-metil-D-aspartato
- O/N**: Over-night
- PBS**: Tampón fosfato salino
- PFA**: paraformaldehído
- PKA**: proteína quinasa dependiente de cAMP
- PMCA**: ATPasa de calcio de la membrana plasmática
- mPTP**: poro de transición de permeabilidad mitocondrial
- RE**: retículo endoplásmico
- ROCs**: canales de calcio operados por receptor
- RT**: temperatura ambiente
- RyR**: receptor de rianodina
- SERCA**: ATPasa de calcio del retículo endoplásmico
- SNC**: Sistema nervioso central
- SOCs**: canales de calcio operados por depósitos
- SOMCs**: canales de calcio operados por segundos mensajeros
- TCA**: Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
- VOCCs**: canales de calcio operados por voltaje

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. HOMEOSTASIS DE CALCIO INTRACELULAR EN NEURONAS

La señalización por calcio es un mecanismo universal que permite el control de la actividad de diferentes células en respuesta a diferentes mensajeros extracelulares. Las células que reciben dichos estímulos son capaces de interpretar las señales y generar respuestas que abarcan desde la proliferación hasta la muerte celular (Berridge, M., 1993; Clapham, D.E., 1995).

La versatilidad del calcio como mensajero intracelular se debe, principalmente, a la diferencia de concentración basal de calcio en los espacios extracelular e intracelular; mientras que en el espacio extracelular el valor de la concentración de calcio es de alrededor de 1 mM, la concentración de calcio intracelular,  $[Ca^{2+}]_{cit}$ , alcanza valores cercanos a 100 nM. A esta diferencia de concentración (10000:1), se suma el potencial de membrana en reposo, lo que provoca que la entrada de calcio a la célula a favor de gradiente electroquímico se vea muy favorecida. Todo ello, permite que las respuestas celulares mediadas por calcio se caractericen por ser rápidas y muy efectivas (Bootman, M., et al., 1995).

Debido a que son numerosos los procesos controlados por cambios en la  $[Ca^{2+}]_{cit}$ , las células eucariotas han desarrollado una compleja maquinaria que permite mantener la homeostasis del calcio (Fig. 1). Entre los diferentes elementos encargados de controlar la concentración de calcio intracelular encontramos canales de  $Ca^{2+}$  de membrana plasmática y orgánulos subcelulares, proteínas que unen calcio y sistemas de extrusión y secuestro de  $Ca^{2+}$ . Dentro de los orgánulos subcelulares que presentan mecanismos de captura y liberación de calcio, destacan el retículo endoplásmico y la mitocondria (Pietrobon, D., et al., 1990).

Como se ha descrito, la regulación del calcio es esencial para cualquier célula, pero cobra si cabe, más importancia en las células excitables debido a que la conexión entre los gradientes electroquímicos iónicos y las vías de señalización intracelulares son de especial importancia en este grupo celular (Gleichmann, M et Mattson, MP, 2011). Por ejemplo, en las neuronas, el  $Ca^{2+}$  está implicado en numerosos procesos entre los que se encuentran la excitabilidad neuronal, la integración de señales eléctricas, la plasticidad sináptica, la expresión génica, el metabolismo, y la muerte celular programada. Como consecuencia de la amplia variedad de funciones desarrolladas por el  $Ca^{2+}$  en las neuronas, éstas han desarrollado mecanismos de control fino de la homeostasis del calcio, ya que su disregulación está vinculada a procesos como la neurodegeneración y el envejecimiento (Tavernarakis, N et Nikolettou, V, 2012).

### 1.1 Mecanismos de regulación de la homeostasis de calcio intracelular

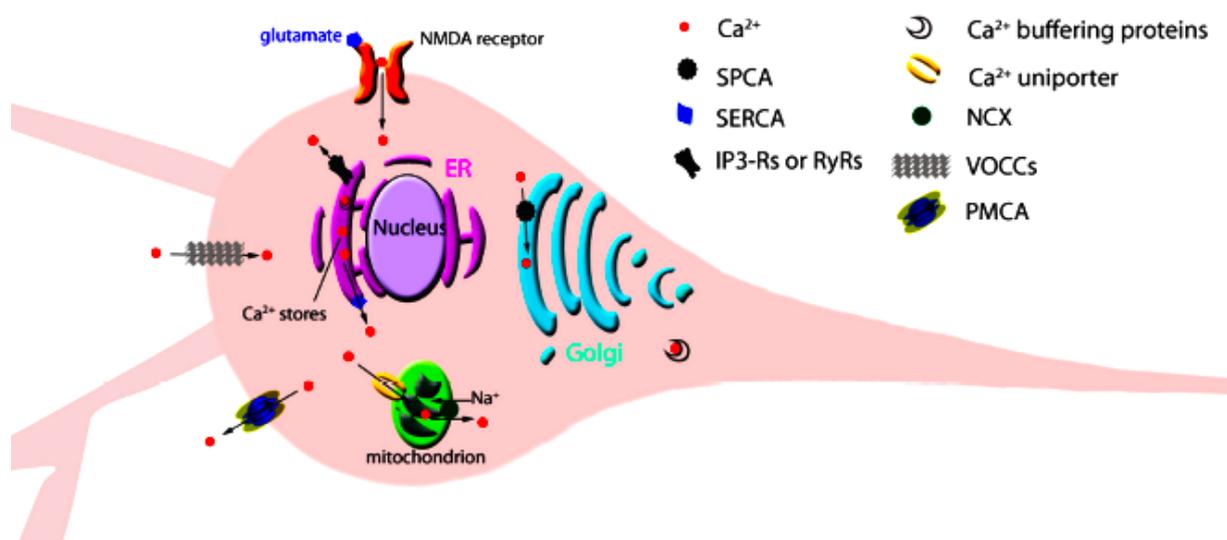
#### 1.1.1 Transporte de Calcio en Membrana Plasmática

En la membrana plasmática (MP) podemos encontrar tanto canales de  $Ca^{2+}$  que permiten el transporte pasivo del ion a favor de su gradiente electroquímico al interior celular, como mecanismos de transporte activo llevados a cabo por bombas e intercambiadores que permiten la restauración de la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  basal (Tavernarakis, N et Nikolettou, V, 2012).

Los canales iónicos se pueden clasificar según su mecanismo de activación en dos familias: canales de calcio operados por voltaje (VOCCs), y canales de calcio no operados por voltaje, en la que se incluyen canales de calcio operados por receptor (ROCs), por segundos mensajeros (SOMCs) o por depósitos (SOCs); estos últimos generalmente son predominantes en células no excitables aunque también están presentes en células excitables (Kirichok et al., 2004). En neuronas, los canales de calcio predominantes son los VOCCs y los ROCs.

Los canales de calcio operados por voltaje se caracterizan por estar regulados por el potencial de membrana, necesitando que ésta se despolarice para activarse. Se conocen seis tipos funcionales de VOCCs: T, L, N, P, Q y R (Zhang et al., 1993). Estos canales, a su vez, pueden ser canales de bajo umbral de activación, canales tipo T, y canales de alto umbral de activación: L, N, P, Q y R. En las neuronas de hipocampo los canales mayoritarios son los canales P/Q, seguidos de los tipo L. También encontramos los canales de tipo N y R pero de forma minoritaria (Tavernarakis, N et Nikolettou, V, 2012).

Por otro lado, en la membrana también encontramos los canales operados por receptor (ROCs), cuya apertura depende de la presencia de un ligando específico. El ligando excitatorio predominante en el Sistema Nervioso Central (SNC), es el L-glutamato, pudiendo actuar sobre dos tipos de ROCs: ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos son canales iónicos que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Na}^{+}$  a favor de gradiente electroquímico en presencia de su ligando. Se han descrito tres tipos de receptores ionotrópicos de glutamato en el SNC: el receptor de kainato, el receptor AMPA y el receptor NMDA, siendo este último el más relevante en procesos de memoria y aprendizaje. Esta relevancia se debe a su alta conductancia para  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , y a su función como detector de coincidencia; estos receptores necesitan tanto la presencia de glutamato como la despolarización de la membrana para ser activados, ya que a potenciales de membrana en reposo, el receptor se encuentra inhibido por  $\text{Mg}^{2+}$ . Esta inhibición es revertida cuando se produce una despolarización de membrana, probablemente producida por la apertura de los canales Kainato y AMPA en presencia de glutamato (Kawamoto, E et al., 2012; Tavernarakis, N et Nikolettou, V, 2012).



**Figura 1: Representación esquemática de los principales componentes de la maquinaria homeostática de calcio en neuronas.** En la imagen se representan diferentes canales, bombas e intercambiadores de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las flechas indican la dirección en la que se produce el flujo de calcio en cada uno de los componentes. ER: retículo endoplásmico;  $\text{IP}_3\text{R}$ : receptor inositol 3-fosfato; NCX: intercambiador  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ ; NMDA: N-metil-D-aspartato; PMCA: ATPasa de calcio de membrana plasmática; SPCA: ATPasa de calcio de la vía secretora; VOCC: canal de calcio operado por voltaje.

Los sistemas de extrusión de calcio presentes en la membrana plasmática permiten la restauración de los valores de  $[Ca^{2+}]_{cit}$  basal tras un estímulo. Entre los mecanismos principales encargados de este proceso encontramos la ATPasa de calcio de membrana plasmática (PMCA), y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX). La PMCA constituye un mecanismo de transporte activo primario capaz de extruir calcio al espacio extracelular mediante el consumo de ATP, mientras que el NCX se encarga de llevar a cabo un transporte activo secundario utilizando como energía para el transporte de calcio, el transporte a favor de gradiente electroquímico de  $Na^+$ .

Aunque el papel de cada una de estas proteínas de membrana en el restablecimiento de la concentración de calcio intracelular en diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas en neuronas no está claro, ha quedado demostrado que éstas exhiben patrones de localización subcelular diferentes. Mientras que la PMCA tiende a localizarse en regiones cercanas a la zona de liberación de neurotransmisores de las terminales presinápticas, el NCX no aparece en dichos sitios distribuyéndose de manera más dispersa por el resto de la célula (Tavernarakis, N et Nikolettou, V, 2012).

### 1.1.2 Transporte de Calcio en Retículo Endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es un complejo sistema de endomembranas presente en todas las neuronas que se extiende desde el núcleo al soma, dendritas y espinas dendríticas, así como al axón y a las terminales presinápticas. Una de las funciones más relevantes del RE en el contexto de la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , es su comportamiento como depósito de  $Ca^{2+}$  intracelular. Esto le permite captar o liberar calcio al citosol en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos. Debido a que el RE es capaz de responder a diferentes señales celulares, éste contiene en su membrana una variedad de canales y sensores dedicados al mantenimiento de la concentración de calcio intracelular (Kawamoto, E et al., 2012).

El calcio es capaz de fluir del RE al citosol a través de varios canales iónicos entre los que se incluyen los receptores de inositol 3-fosfato (InsP3), y los receptores de Ryanodina (RyRs), siendo los principales canales de liberación de calcio presentes en neuronas. La propagación de ondas de  $Ca^{2+}$  es una de las principales funciones de la liberación de  $Ca^{2+}$  al citosol por el RE habiendo desarrollado las células el fenómeno conocido como "Calcium Induced Calcium Release" (CICR) por el que una elevación de la concentración de calcio intracelular provoca una mayor liberación de  $Ca^{2+}$  desde el RE.

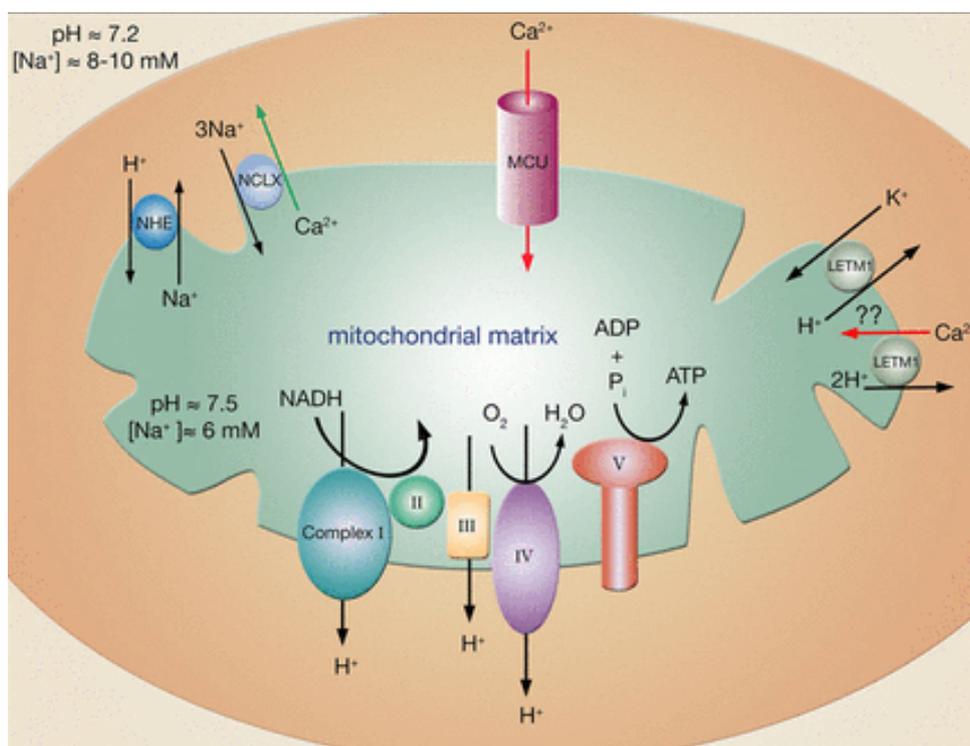
Por último, en el RE también encontramos la ATPasa de Calcio del Retículo Sarco-Endoplásmico (SERCA), una bomba que permite la entrada de  $Ca^{2+}$  al RE desde el citosol. Esta bomba varía su velocidad de transporte en función de la elevación de la concentración de calcio citosólico, lo que permite ajustar dicha concentración hasta alcanzar la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  basal (Kirichok et al., 2004).

### 1.1.3 Transporte de calcio en la mitocondria

Por último, podemos encontrar canales de calcio en la mitocondria, así como diferentes intercambiadores que influyen en la homeostasis del calcio intracelular al permitir que la mitocondria funcione como regulador de la concentración intracelular de calcio. Los mecanismos implicados en la homeostasis de calcio mitocondrial son explicados con profundidad en el siguiente apartado.

## 2. HOMEOSTASIS DE CALCIO MITOCONDRIAL

La homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Fig. 2) participa en numerosos procesos fisiológicos, ya que señales de calcio celulares implicadas en la secreción, contracción o excitabilidad, están acopladas invariablemente a la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria. Esta captura de  $\text{Ca}^{2+}$ , a su vez modula la actividad bioenergética de la mitocondria, la concentración citosólica de calcio, y la regulación de vías implicadas en apoptosis y necrosis celular (Sheridan, E et al., 2013).



**Figura 2: Mecanismos de transporte iónico mitocondrial implicados en la entrada y salida de  $\text{Ca}^{2+}$ :** Los flujos de entrada de calcio están marcados en rojo, mientras que los flujos de salida se indican en verde. La entrada de calcio a la mitocondria se produce fundamentalmente mediante el Uniportador de Calcio Mitocondrial (MCU). Además de esta vía de entrada, parecen existir mecanismos adicionales como LETM1. La salida de calcio de la mitocondria se produce principalmente a través del intercambiador NCLX, utilizando el transporte a favor de gradiente de  $\text{Na}^+$  para transportar el  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extramitocondrial. La concentración de  $\text{Na}^+$  se mantiene por debajo de las  $[\text{Na}^+]_{\text{cit}}$  mediante la acción del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , NHE, que utiliza el gradiente de protones generado como consecuencia de la cadena transportadora mitocondrial, para extruir sodio de la mitocondria (Finkel, T, et al., 2015).

Como consecuencia del bombeo de protones durante el Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (TCA), se genera un potencial de membrana mitocondrial muy negativo en el interior ( $\Delta\Psi = -180 \text{ mV}$ ), que provoca que la entrada de calcio a la mitocondria se vea muy favorecida por su gradiente electroquímico. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria está altamente regulada a nivel de la membrana mitocondrial interna (IMM), ya que la membrana mitocondrial externa es muy permeable a  $\text{Ca}^{2+}$  como consecuencia de la presencia de los canales no específicos VDAC, mientras que la IMM presenta baja permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ . La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria se produce a través del denominado Uniportador de Calcio Mitocondrial (MCU), cuya conductancia depende fundamentalmente de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  y la demanda de energía. Debido a que el mecanismo de restauración de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  mediante la acción tamponadora de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria es más eficiente, desde el punto de vista energético, que la salida de éste al espacio extracelular por la PMCA o la entrada al RE

mediante la SERCA, este proceso es de vital importancia para las neuronas en situaciones de alta demanda de ATP y oxígeno.

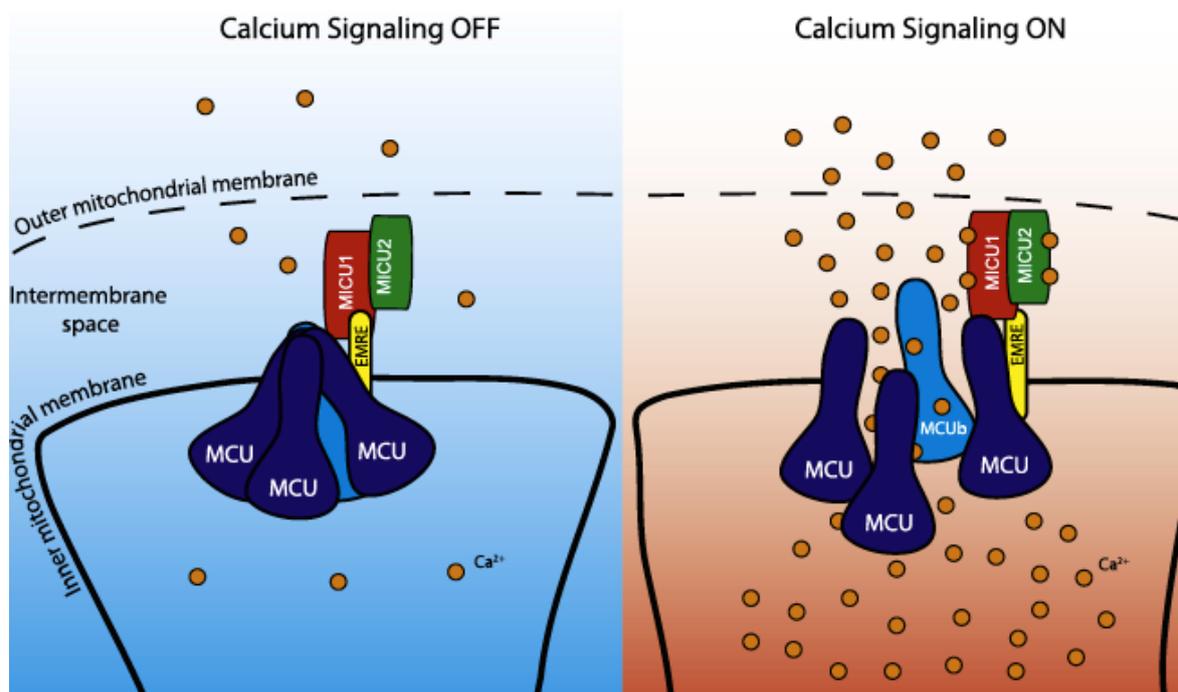
A su vez, del mismo modo que existe el MCU para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, encontramos en la membrana mitocondrial mecanismos que permiten la salida del ion de este orgánulo intracelular. En neuronas y otras células excitables, el intercambiador NCX mitocondrial ( $\text{NCX}_{\text{mito}}$ ) es el principal sistema de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la matriz extracelular, aunque como se puede observar en la figura 2 existen más mecanismos.

Al contrario de lo que se podría pensar, observando el gran gradiente electroquímico para  $\text{Ca}^{2+}$  observado en la mitocondria, la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  alcanza valores en estado de reposo de alrededor de 100 nM, una concentración 6 veces menor que la predicha por el equilibrio de Nernst para el ion (Kevin Foskett. J, Philipson, B, 2015). Este hecho se debe principalmente a la baja afinidad que presenta el MCU por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Mediante el estudio de las propiedades del MCU se observó que incluso a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  de alrededor de  $10^{-6}$  M, alcanzadas durante un estímulo, el uniportador no alcanzaba su conductancia máxima, siendo necesaria una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  incluso mayor, sobre  $5 \cdot 10^{-6}$  M, para que el MCU realmente capte calcio de manera eficiente. Debido a que en condiciones fisiológicas se puede observar captura de calcio por parte de la mitocondria, se ha formulado la hipótesis de los *microdominios de calcio*. Esta hipótesis postula que una subpoblación de mitocondrias celulares se encuentra en las proximidades de los sitios de liberación de calcio del RE y los sitios de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana, donde se alcanzan  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  mayores que las observadas al considerar los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos totales (Alonso M.T, et al., 2006).

## 2.1 Uniportador de calcio mitocondrial

La identidad molecular del Uniportador de Calcio Mitocondrial ha sido descubierta recientemente permitiendo descifrar que éste es un canal iónico formado por un complejo macromolecular que consiste en un conjunto de proteínas reguladoras asociadas a la subunidad formadora del poro (Fig. 3). Las subunidades conocidas por el momento son:

- **MCU**: subunidad formadora del poro del uniportador. Esta subunidad es bloqueada por  $\text{Gd}^{3+}$  y rojo de rutenio (RuR) y activada mediante fuerte voltajes hiperpolarizantes.
- **MCUb**: proteína homóloga a MCU capaz de oligomerizar con éste, actuando como regulador dominante negativo del canal.
- **Proteínas reguladoras**: dentro de las proteínas reguladoras del MCU encontramos una familia de proteínas solubles denominada MICU. Esta familia de proteínas se caracteriza por presentar dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  -EF hands- permitiéndoles actuar como sensores de calcio. En concreto MICU1 y MICU2 forman un heterodímero esencial para la regulación del MCU. A bajas concentraciones citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , prevalece el efecto inhibitorio de MICU2 asegurando una baja acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  incluso en presencia del gran gradiente electroquímico para el ion. Cuando se produce un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  extramitocondrial MICU2 se inactiva al unirse a dos iones  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que MICU1 se activa, también como consecuencia de su unión a  $\text{Ca}^{2+}$ .
- **EMRE**: aunque todavía no se sabe con claridad la función específica de esta proteína, se sabe que ésta es necesaria para la formación de un canal funcional.



**Figura 3: Representación esquemática del Uniportador de Calcio Mitochondrial (MCU):** en condiciones de reposo (imagen de la izquierda) la captura de calcio mitocondrial está controlada por un complejo multiproteico compuesto por dos subunidades formadoras del poro, MCU y MCUb, unidas a otras subunidades: EMRE, MICU1, y MICU2. Bajo estas condiciones, el heterodímero formado por MICU1/MICU2 actúa como regulador negativo de la apertura del uniportador debido a el efecto predominante de MICU2, previniendo de esta manera la entrada masiva de calcio a la mitocondria y la disregulación del metabolismo energético. En el momento en que se produce un aumento de la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  (imagen de la derecha), éste induce un cambio conformacional del MCU, concretamente en el heterodímero que provoca la inhibición del efecto regulador negativo de MICU2 y desencadena el efecto regulador positivo de MICU1 aumentando la actividad del canal MCU (D. De Stefani, et al., 2015) .

## 2.2 Papel fisiológico de la homeostasis de calcio mitocondrial

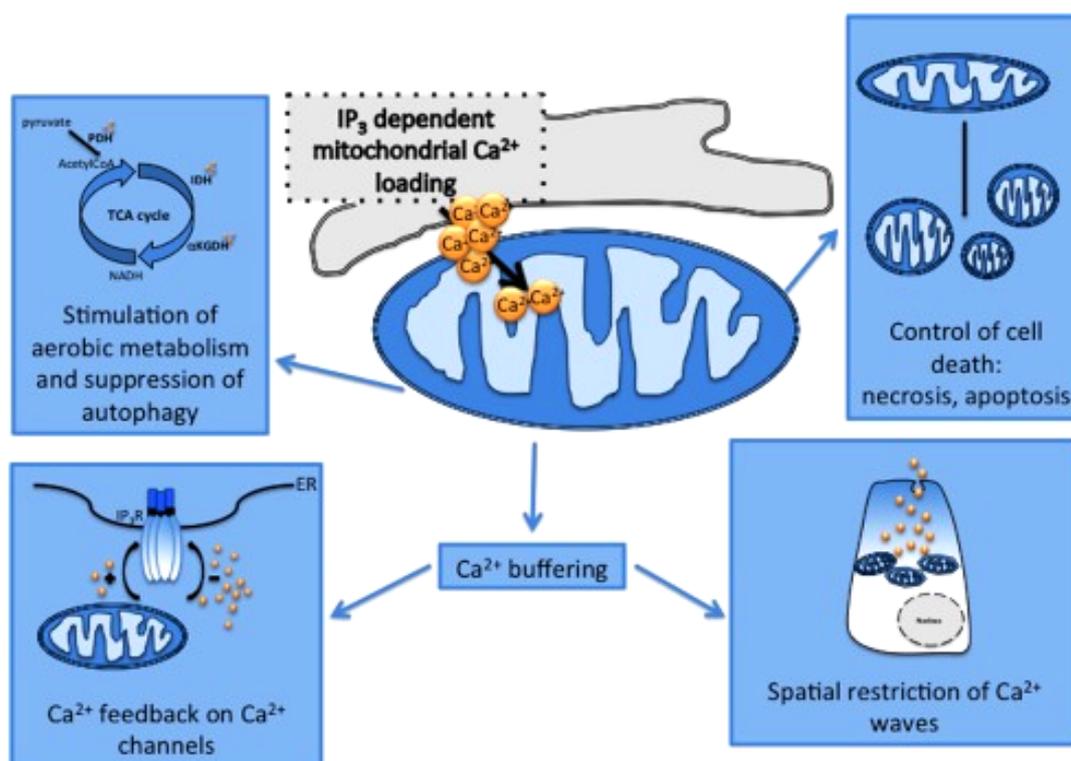
La demostración de que la mitocondria puede acumular rápidamente  $Ca^{2+}$  como respuesta a las elevaciones citosólicas de éste, provocó la intensa investigación del papel de este orgánulo intracelular en la homeostasis del calcio tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Fig. 4).

En un primer momento, se investigó la implicación del  $Ca^{2+}$  mitocondrial en el control del metabolismo aerobio, encontrando que el  $Ca^{2+}$  actúa como activador de tres enzimas deshidrogenasas presentes en la matriz mitocondrial; mientras que la activación de la piruvato deshidrogenasa depende de una fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$ , la  $\alpha$ -ketoglutarato y la isocitrato deshidrogenasas son reguladas directamente por el ion. Esta regulación por calcio del TCA incrementa la disponibilidad de NADH, y por tanto, un aumento de la actividad de la cadena transportadora de electrones; este hecho permite que los incrementos de calcio mitocondriales actúen como reguladores de la síntesis de ATP (Rizzuto, R et al., 2013).

Otra de las funciones esenciales de la homeostasis del calcio mitocondrial, es su implicación en el control de la muerte celular. Existen numerosos estudios que demuestran que la sobrecarga de calcio mitocondrial induce muerte celular. Esto es debido a que un aumento desmesurado de la  $[Ca^{2+}]_{mit}$  induce la apertura del Poro de Transición de

Permeabilidad (mPTP) provocando la despolarización de la IMM; esto conduce a la inhibición del transporte electrónico y producción de ATP mitocondrial (Pan et al., 2013). Además, la apertura del mPTP permite la salida desde la mitocondria al citosol de factores proapoptóticos, destacando el citocromo c, induciendo la muerte celular (Contreras, L et al., 2010). Recientemente, se han asociado las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial con los procesos de autofagia debido a que la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  ejerce un efecto inhibitorio sobre la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). Este descubrimiento ha llevado a concluir que los procesos de apoptosis y autofagia, presentan como mecanismo de regulación la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  mientras que altas concentraciones de calcio en la mitocondria actúan como señales apoptóticas, las bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  propician el rescate celular mediante autofagia (Patron, M et al., 2013).

Finalmente, no debemos olvidar la función fisiológica de la mitocondria como “buffer” intracelular de calcio. Esto permite que este orgánulo actúe como regulador de la amplitud de los incrementos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  provocados por la apertura de canales de membrana o por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE. Dentro de este contexto, podemos decir, que la mitocondria actúa restringiendo la distribución espacial de las ondas de calcio y como regulador de la actividad de ciertos canales dependientes de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  (Alvarez, J., et al., 1999). Específicamente, la acción buffer de la mitocondria es clave en la entrada capacitativa de calcio, esencial para las células no excitables. Ya que, al captar el calcio que entra a la célula, evita la inactivación de los canales SOC responsables de la entrada capacitativa de calcio (Muñoz, E., et al., 2011).



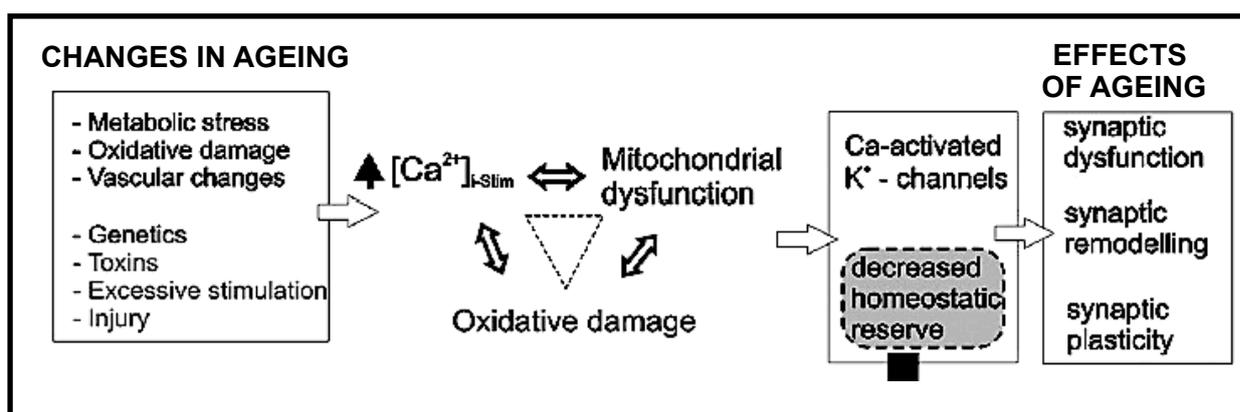
**Figura 4: Efectos pleiotrópicos de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial** : PDH: piruvato deshidrogenasa; IDH: isocitrato deshidrogenasa; KGDH:  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. (Patron, M et al. 2013)

### 3. HOMEOSTASIS DE CALCIO Y ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso complejo y multifactorial en el que influyen numerosos aspectos fisiológicos y ambientales, destacando el papel de algunos sistemas

homeostáticos. Dentro de estos sistemas implicados en el envejecimiento encontramos la homeostasis del calcio, lo que ha llevado a proponer la Hipótesis del Calcio en el Envejecimiento (Fig. 5), (Gibson and Peterson, 1987; Landfield, 1987; Khachaturian, 1989). Esta hipótesis sostiene que los mecanismos de homeostasis celular de calcio, que regulan la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  en neuronas, se ven modificados con la edad, y que estos cambios contribuyen al déficit cognitivo relacionado con el envejecimiento (Oh et al., 2013).

La plasticidad del sistema nervioso depende del balance entre los procesos degenerativos y regenerativos. Debido a que el calcio es un mecanismo de señalización fundamental implicado en la mayoría de las funciones celulares fisiológicas, alteraciones sutiles de su homeostasis provocan profundos cambios funcionales. La pérdida cognitiva que se produce durante el envejecimiento no está asociada con una pérdida significativa neuronal, sino que se produce como resultado de cambios en la conectividad sináptica (Kawamoto et al., 2012).



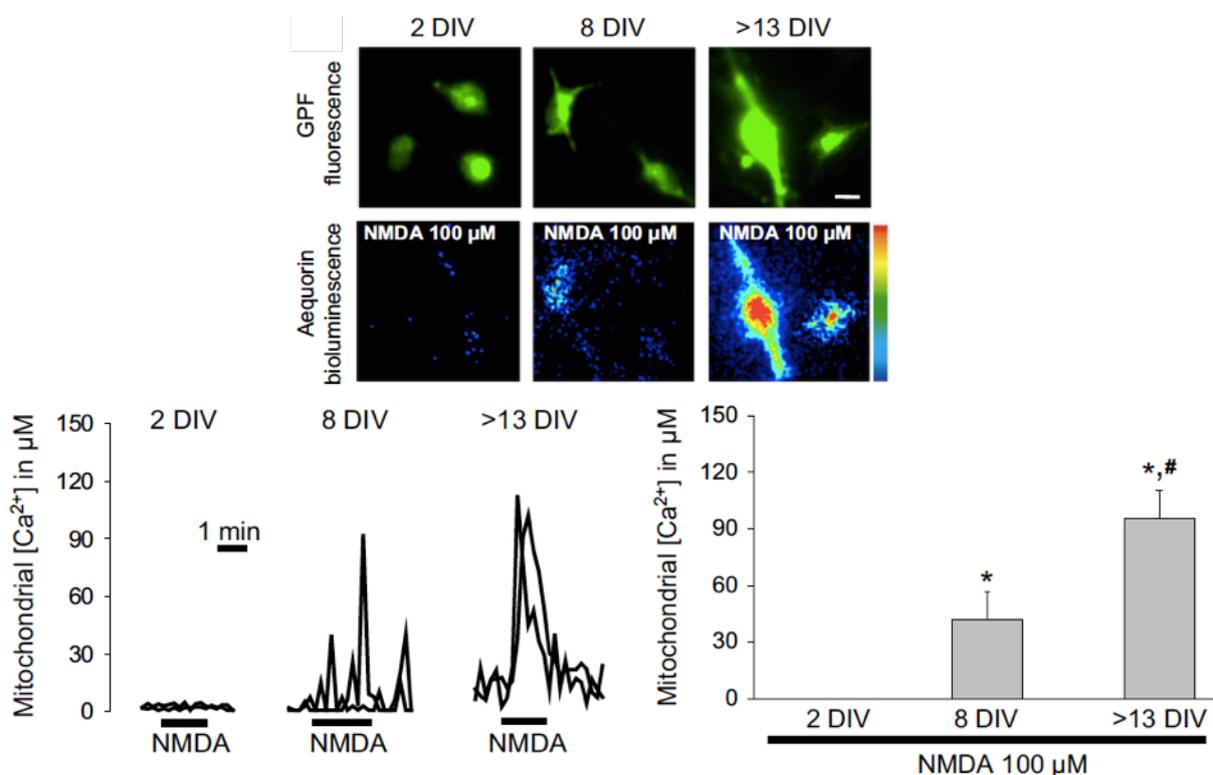
**Figura 5: Hipótesis del calcio del envejecimiento neuronal.** El envejecimiento neuronal no está asociado a la pérdida neuronal. En cambio, cambios a nivel sináptico, tanto morfológicos como estructurales, conducen a una expresión más sutil y variable del fenotipo del envejecimiento. La base de esta perturbación funcional es la disregulación de la tríada:  $Ca^{2+}$ - función mitocondrial- producción de radicales libres, que provoca una disminución de la reserva homeostática. Esta reducción, es también la base de que el envejecimiento represente uno de los mayores factores de riesgo para padecer enfermedades neurodegenerativas. Modificado de Toescu, EC et Vreugdenhil, M, 2010.

Los primeros estudios relacionados con el calcio y el envejecimiento se concentraron en las principales vías de transporte de  $Ca^{2+}$ , concluyendo que al menos en algunos tipos neuronales, como el grupo neuronal principal de la región CA1 del hipocampo, las neuronas envejecidas presentan un aumento de la entrada de calcio al citosol como consecuencia del incremento de la actividad de los canales de calcio operados por voltaje de la membrana plasmática. A su vez, también mostraron que la extrusión de  $Ca^{2+}$  de la célula a través de la PMCA se encuentra disminuida en dichas neuronas (Toescu, EC et Vreugdenhil, M, 2010).

Recientemente, se ha prestado más atención a los orgánulos intracelulares implicados en la homeostasis del calcio. En las neuronas envejecidas se observa un incremento en la liberación de  $Ca^{2+}$  por parte del RE a través de los receptores de  $IP_3$  y los receptores de ryanodina aumentando la respuesta CICR. Esto ha llevado a proponer que la liberación de calcio por parte del RE podría ser usada como biomarcador del envejecimiento funcional. Además se han observado más cambios en la homeostasis de calcio en el RE como la disminución de su capacidad tamponadora como consecuencia de la disregulación de la SERCA.

Se han descrito múltiples cambios relacionados con la mitocondria durante el envejecimiento. Concretamente estudios previos realizados en nuestro laboratorio, mostraron que la captura de calcio por parte de la mitocondria de neuronas de hipocampo,

en respuesta a un estímulo con NMDA, aumenta cuando las neuronas son cultivadas largos periodos de tiempo (neuronas que expresan marcadores de envejecimiento). Mientras que en neuronas jóvenes, 2 días *in vitro* (DIV), no se produce entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a NMDA; en neuronas maduras y envejecidas, 8 y 15 DIV respectivamente, el estímulo provoca un gran aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ , observando un incremento de la concentración de calcio mayor en las neuronas envejecidas (Fig. 6), (Calvo, M., et al., 2015).



**Figura 6: Cambios en la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en respuesta a un estímulo de NMDA en neuronas jóvenes, maduras y envejecidas (Calvo, M., et al., 2015).** Las neuronas de hipocampo fueron transfectadas con un plásmido que expresa GFP-Aequorina dirigida a la mitocondria. Mediante estudios de bioluminiscencia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en respuesta a NMDA, se comprobó que únicamente se produce entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria en neuronas maduras (8 DIV) y envejecidas (15 DIV), siendo la entrada de calcio en las neuronas envejecidas mucho mayor que la observada en neuronas maduras. El diagrama de barras representa las medias de 8-14 células estudiadas al menos, en tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a 2 DIV; # $p < 0,05$  respecto a 8 DIV.

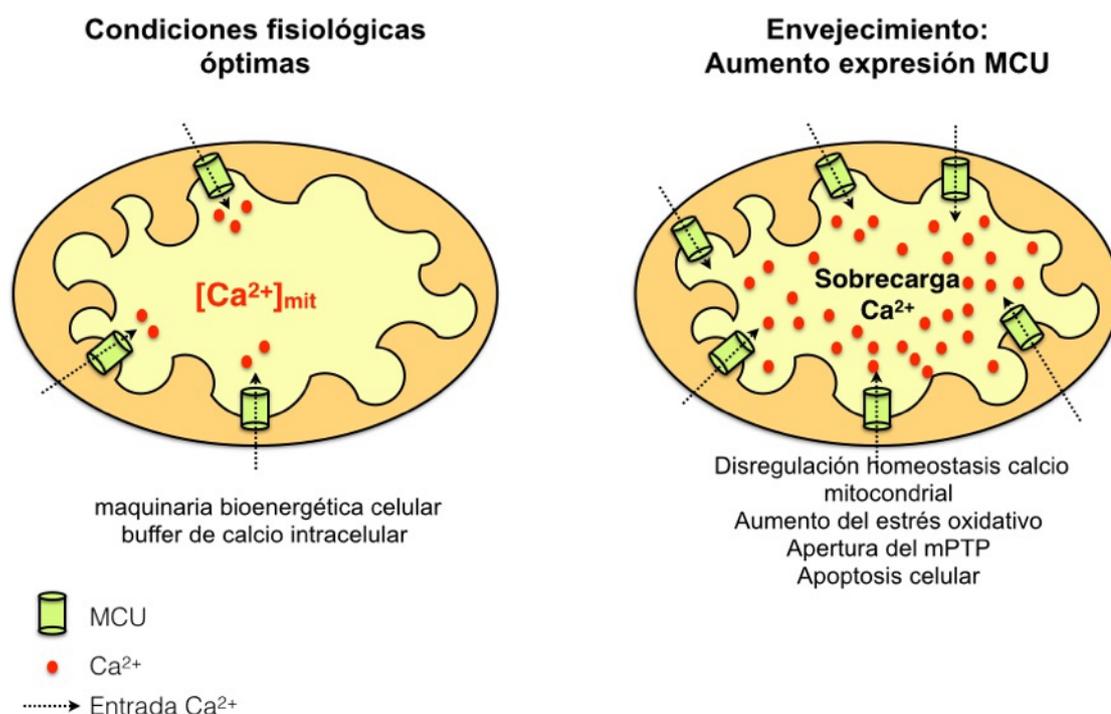
Por otro lado, las mitocondrias en neuronas envejecidas se encuentran más despolarizadas, afectando al balance energético celular y a la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el MCU. Todos estos cambios dan como resultado final un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  basal que provoca una disminución de la capacidad excitatoria neuronal, un aumento de la frecuencia umbral necesaria para inducir potenciación a largo plazo (LTP), un aumento en la susceptibilidad de inducción de LTD, y en última instancia afección de la memoria y el aprendizaje.

El envejecimiento es el mayor factor de riesgo para padecer enfermedades neurodegenerativas, un grupo heterogéneo de patologías caracterizadas por la pérdida gradual y progresiva de determinados sistemas neuronales relacionados tanto anatómicamente como fisiológicamente. Aunque, como se ha mencionado anteriormente, la alteración de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  no provoca pérdida neuronal, sí que aumenta la vulnerabilidad de las neuronas tanto al estrés metabólico como funcional contribuyendo a la iniciación o progresión de los procesos neurodegenerativos. A pesar de que la diversidad de enfermedades neurodegenerativas es muy amplia, la disregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  y la homeostasis mitocondrial, han emergido como mecanismos moleculares comunes en la pérdida neuronal (Kawamoto et al., 2012).

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La captura de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de la mitocondria se debe principalmente a la apertura del Uniportador de Calcio Mitocondrial. La hipótesis del envejecimiento neuronal postula que durante el envejecimiento se produce una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial que promueve la apoptosis celular (Fig. 7). Además, estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la entrada de calcio a la mitocondria en neuronas jóvenes, maduras y envejecidas varía en respuesta a un estímulo con NMDA. Todos estos antecedentes nos han llevado a estudiar si existen cambios en la expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial en las neuronas con el envejecimiento. Para ello se han tomado cultivos a diferentes días de incubación, 2, 8, y 15 considerando este último un cultivo envejecido. Puesto que el cultivo de hipocampo es un cultivo mixto cuyas poblaciones dependen de la presencia de suero también se ha querido estudiar si la ausencia de suero provoca cambios en la expresión del MCU. Nuestra hipótesis es que la expresión del MCU aumenta con el envejecimiento de las neuronas en cultivo, lo que ayuda a que se produzca una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial que en última instancia favorece la muerte celular por apoptosis. Para valorar nuestra hipótesis se han planteado los siguientes objetivos:

1. Caracterizar los tipos celulares presentes en los cultivos primarios de hipocampo de rata.
2. Estudiar la expresión del uniportador de calcio mitocondrial en neuronas envejecidas en un cultivo primario a largo plazo.
3. Valorar si existen diferencias en la expresión del uniportador de calcio mitocondrial en neuronas cultivadas en un medio sin suero respecto a neuronas cultivadas en un medio con suero, especialmente en neuronas envejecidas.



**Figura 7: representación esquemática de la hipótesis de trabajo.** En nuestra hipótesis planteamos que durante el envejecimiento neuronal se produce un aumento de la expresión del MCU, lo que podría colaborar en la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  observada durante dicho proceso. Esta sobrecarga de calcio mitocondrial provoca un aumento del estrés oxidativo, y la apertura del mPTP, lo que conduce a la apoptosis celular.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. MATERIALES

- **BD (Madrid, España):**
  - Poli-D-Lisina
- **Covance (Princeton, NJ, EEUU):**
  - Anticuerpo primario monoclonal de ratón anti  $\beta$ -tubulina III
- **Gibco:**
  - Medio HBSS
  - Medio Neurobasal
  - Suplemento B27
  - Suero bovino fetal (FBS)
  - Suero de caballo (HS)
  - Gentamicina
  - L-Glutamina
  - Solución de tampón fosfato (PBS)
  - Medio MEM
- **Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EEUU):**
  - Lipofectamina® 2000
- **Molecular Probes (Eugene, OR, EEUU):**
  - Anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado Alexa Fluor 488
  - Anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594
- **Lonza (Barcelona, España):**
  - Medio DMEM con glucosa 4500 mg/ml
  - Suero fetal bovino (FBS)
- **Merck (Madrid, España):**
  - CaCl<sub>2</sub>
  - MgCl<sub>2</sub>
  - KCl
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - Etanol absoluto
  - Triton X-100
- **Millipore Corp (Bedford, MA, EEUU):**
  - Filtros estériles de 0,22  $\mu$ m
- **Nunc Labclinics (Barcelona, España):**
  - Placas de cultivo de 4 pocillos
  - Placas *petri*
- **Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España):**
  - 4' - 6 - diamino - 2 - fenilindol (DAPI)
  - Anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con FITC
  - Anticuerpo primario policlonal de conejo anti-GFAP
  - Anticuerpo primario policlonal de conejo anti-MCU
  - Albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA)
  - ADNasa I
  - HEPES

- Paraformaldehído (PFA)
- **Worthington (Lakewood, NJ, EEUU):**
  - Papaína 37,1 u/mgP

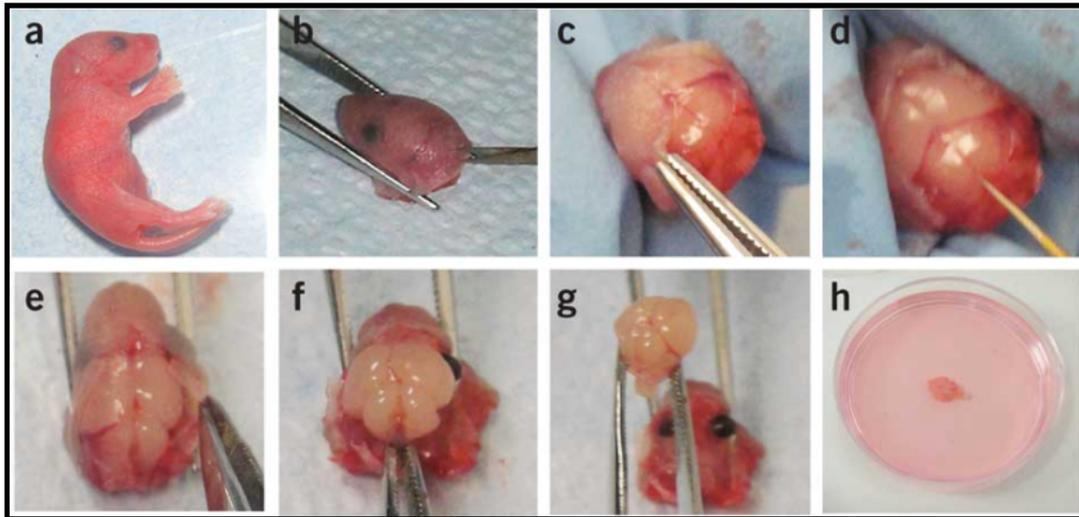
## 2. TAMPONES Y SOLUCIONES

- Tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4
  - NaCl 136 mM
  - KCl 2,7 mM
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM
- Medio Nutriente F12 HAM pH 7.4
  - DMEM en polvo 4500 mg/L glucosa
  - 25 mM HEPES
  - 4 mM NaHCO<sub>3</sub>
- Medio Externo Completo (MEC) pH 7.42
  - NaCl 145 mM
  - KCl 5 mM
  - MgCl<sub>2</sub> 1 mM
  - HEPES 10 mM
  - Glucosa 10 mM
  - CaCl<sub>2</sub> 1 mM
- Medio Neurobasal
  - Neurobasal
  - Gentamicina 1 µg/ml
  - L-glutamina 2mM
  - 2% B27
  - 10% FBS
- Medio HANK'S BSA 0,6%
  - HBSS
  - 0,6% BSA

### 3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

#### 3.1 Cultivo primario de neuronas de hipocampo

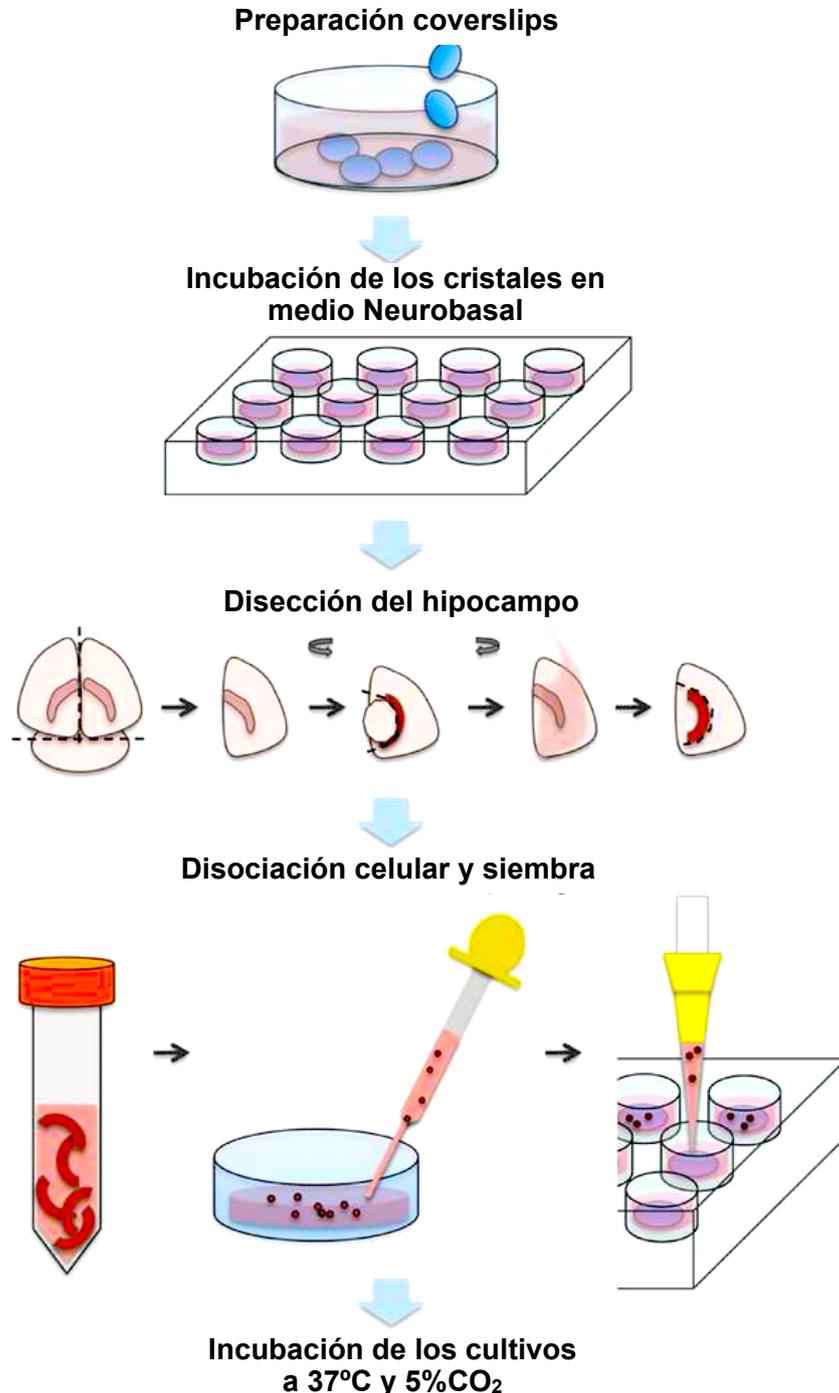
Los cultivos neuronales se obtienen mediante la extracción del hipocampo de ratas Wistar (0-1 días). Las ratas se sacrifican mediante decapitación siguiendo el protocolo de Brewer (Brewer et al., 1993) y las modificaciones de éste realizadas por Pérez-Otaño (Pérez-Otaño et al., 2006). Una vez decapitadas, las cabezas se lavan en MEC y se pasan a una placa *petri* con HAM'S F12 donde se procede a la extracción del cerebro (Fig. 8).



**Figura 8: Ilustración del método de extracción de cerebro en ratas P0.** (a,b) Decapitar las ratas y lavar las cabezas en MECs. (c) Realizar una incisión en la piel con tijeras finas en la línea media en sentido rostral. (d) realizar una incisión en el cráneo en sentido rostral con tijeras finas siguiendo la línea media. Posteriormente realizar dos incisiones laterales desde el punto de inicio de la incisión. (e) Retirar el cráneo con pinzas. (f, g) extraer el cerebro con una espátula. (h) reservar el cráneo en medio HAM'S F12 (Beaudoin III, G.M.J, 2012).

Tras la extracción, se realizan dos cortes diagonales con un bisturí, uno por hemisferio, entre la corteza y el mesencéfalo depositando los cortes obtenidos en HAMS F12. El siguiente paso es pasar los cortes a la lupa, donde se retiran las meninges que se encuentran rodeando el hipocampo y se separa este último de la corteza; se elimina la porción del giro dentado, y se pasa el hipocampo a HANK'S BSA 0,6%. Se trocea el tejido y se pasa al medio con la papaína filtrada (20 u/ml), donde se incuba durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasados 15 minutos de la incubación, se añade DNasa I (50µg/ml). Tras la incubación, se retira el medio con papaína y se lava el tejido con medio Neurobasal tres veces. Tras el lavado, se disocian las células mediante resuspensión con una pipeta de 5 ml, recogiendo la suspensión celular resultante. Posteriormente, ésta se centrifuga a 160g durante 5 minutos. Tras la centrifugación se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 100 µl de HS. Seguidamente, se añaden 900 µl de medio Neurobasal y se vuelve a resuspender. Finalmente, se recoge una muestra para conteo mediante cámara de Neubauer y se siembran las células a una densidad de 30-50 x 10<sup>3</sup> células/ml en cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro previamente tratados con poli-D-lisina durante 24h. Los cristales se encuentran en placas de 4 pocillos con 500 µl de medio Neurobasal suplementado con L-Glutamina 2mM, 2% B27, 10% FBS y gentamicina 1µg/ml. Tras sembrar las células, se dejan incubando a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, sin realizar ningún cambio de medio durante todo el tiempo de incubación. Los cultivos se dejarán incubando para ser utilizados a 2, 8 y 15 días *in vitro*, lo que permite obtener un modelo de envejecimiento neuronal (Fig. 9).

En algún experimento, se ha comprobado el efecto de la retirada del suero durante el cultivo de las neuronas. Para ello, se cambió el medio de los cultivos tras 24h a medio sin suero. El medio sin suero está compuesto por medio Neurobasal suplementado con L-Glutamina 2mM y 2% B27.



**Figura 9: Representación esquemática de la realización del cultivo primario de hipocampo de rata.** Los coverslips son tratados con poli-D-lisina durante 24h. Tras el lavado posterior son incubados en medio Neurobasal. Posteriormente se obtiene el tejido de hipocampo; el tejido es digerido químicamente con papaína, tras lo cual se disocia obteniendo una suspensión celular. Por último se siembran las células a la densidad deseada y se mantienen incubando los cristales a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> hasta su utilización. Basado en Beaudoin III, G.M.J, 2012.

### 3.2 Inmunocitoquímica

La técnica de inmunocitoquímica se utiliza para detectar antígenos celulares específicos mediante la reacción específica antígeno-anticuerpo. Los métodos inmunocitoquímicos son muy utilizados en cultivos celulares ya que permiten diferenciar una estirpe celular de otra, localizar una proteína, un receptor de membrana, una subunidad de un receptor, etc.

La visualización de la reacción antígeno-anticuerpo requiere un marcador o trazador que no debe afectar a la unión específica entre ambos. El método de detección empleado en este caso es un método indirecto en el que el anticuerpo primario no va marcado, pero a él se acopla una inmunoglobulina que lleva asociado un fluorocromo. Este tipo de técnica inmunocitoquímica permite que la reacción antígeno-anticuerpo sea estable y altamente específica (Gil-Loyzaga, P., 2011).

#### 3.2.1 *Inmunocitoquímica frente a $\beta$ -tubulina vs GFAP*

Los cultivos primarios de hipocampo contienen dos tipos celulares: neuronas y células gliales. Para poder caracterizar las células presentes en los cultivos se ha utilizado una técnica inmunocitoquímica doble que permite diferenciar las células de la glía y las neuronas. Para poder realizar la técnica, lo primero se fijaron las células. Para ello se retira el medio de incubación de los cultivos que se van a fijar, se lavan con PBS y se incuban en paraformaldehído al 4% (PFA 4%) durante 10 min. Tras realizar la incubación con PFA, se lavan las células con PBS y se guardan a 4°C en PBS hasta su utilización.

Para realizar la inmunocitoquímica, el primer paso fue permeabilizar las células, lo que permitió la unión del anticuerpo a su diana específica. Para permeabilizarlas se incubaron en Tritón X-100 al 0,1% durante 10 minutos, tras los cuales se realizó un lavado con PBS. A continuación se incubó el cultivo con Suero de cabra (GS) al 20% (20% GS en PBS), lo que permite evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario que puedan interferir con la detección de la proteína deseada. Tras la incubación con GS 20%, se incubaron las células con el anticuerpo primario. En el caso de la doble inmunocitoquímica se utilizaron dos anticuerpos primarios dirigidos a dos proteínas: por un lado se utilizó un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina III de ratón, que es capaz de unirse a una proteína específica del citoesqueleto neuronal y por otro, se utilizó el anticuerpo primario de conejo dirigido a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). Los anticuerpos se prepararon a una concentración 1:300 en GS 10% (10% GS en PBS) y se aplicaron al cultivo durante 1 hora. Pasado el tiempo de incubación, se lavaron las células con PBS y se incubaron durante 45 minutos con los anticuerpos secundarios a una concentración 1:300 en oscuridad. En este caso, el anticuerpo secundario utilizado para la  $\beta$ -tubulina es  $\alpha$ -FITC de ratón que permite observar fluorescencia verde en presencia de la proteína. El anticuerpo secundario correspondiente a la glía es un anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594 que permite detectar fluorescencia roja en presencia de GFAP. Por último se sometió a las células a tinción por DAPI (1:5000) durante 3 minutos para observar los núcleos en azul (Tabla 1). Tras esta última incubación se lavaron las células primero en PBS y posteriormente en agua desionizada. Por último, las células se montaron en un portaobjetos previamente limpiado con alcohol sobre una gota de alrededor de 3 $\mu$ l de medio de montaje (50% glicerol en PBS), se sellaron con esmalte y se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta el momento de observarlas en el microscopio.

Para la captura de imágenes en el microscopio de epifluorescencia se utilizó el programa NIS Elements. Este programa nos permitió analizar los resultados de la ICC utilizando luces excitadoras de diferentes longitudes de onda. Para el fluorocromo FITC se utilizó una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 494 nm, para Alexa Fluor 594 se utilizó una  $\lambda$  de 540 nm y para el DAPI una  $\lambda$  de alrededor de 359 nm. Una vez tomadas las imágenes, se analiza la

densidad óptica de cada una de ellas con ayuda del programa ImageJ, y se analizan los datos en el programa Origin 7.0.

Anticuerpo primario	Dilución	Tiempo de incubación	Anticuerpo Secundario	Dilución	Tiempo de incubación
Anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\beta$ -tubulina III	1:300	1 h (RT)	Anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con FITC	1:300	45 min (RT)
Anticuerpo policlonal de conejo anti-GFAP	1:300	1 h (RT)	Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594	1:300	45 min (RT)
DAPI	1:5000	3 min (RT)	-	-	-

**Tabla 1: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados durante la doble inmunocitoquímica para la caracterización de los cultivos primarios de hipocampo de rata.**

### 3.2.2 *Inmunocitoquímica frente a MCU*

El protocolo seguido para realizar la tinción del Uniportador de Calcio Mitocondrial es el mismo que el indicado para la inmunocitoquímica para  $\beta$ -tubulina y GFAP. Únicamente se producen variaciones en los anticuerpos empleados y en sus diluciones, así como en el tiempo de incubación. Los cambios se muestran en la tabla 2.

Para la valoración de la fluorescencia es necesario tomar imágenes de diferentes campos de los cultivos. Para ello se ha utilizado un microscopio de epifluorescencia. Una vez tomadas las imágenes, se analiza la densidad óptica de cada una de ellas con ayuda del programa ImageJ, y se analizan los datos en el programa Origin 7.0.

Anticuerpo primario	Dilución	Tiempo de incubación	Anticuerpo Secundario	Dilución	Tiempo de incubación
Anticuerpo policlonal de conejo anti-MCU	1:200	O/N 4°C	Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488	1:300	1h (RT)
DAPI	1:5000	3 min (RT)	-	-	

**Tabla 2: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados durante la inmunocitoquímica para la valoración de la expresión del MCU en cultivos de hipocampo de rata.**

# RESULTADOS

---

## 1. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE HIPOCAMPO

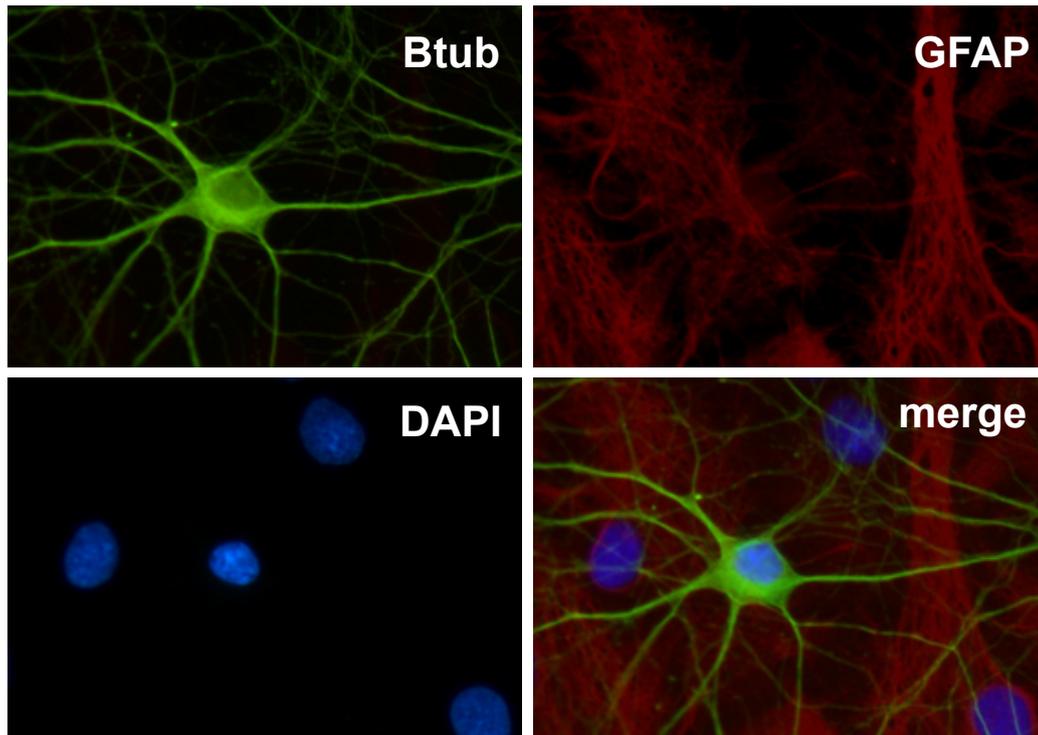
Los cultivos primarios de hipocampo, constan de dos tipos celulares: neuronas y células gliales. Debido a que nuestro estudio se ha centrado en la expresión del MCU en neuronas, el primer objetivo ha sido caracterizar el cultivo mediante técnicas inmunocitoquímicas, que permiten diferenciar las neuronas de las glías.

El citoesqueleto es el determinante intrínseco de la forma de una neurona y es responsable de la distribución asimétrica de los orgánulos en el citoplasma. Contiene tres estructuras filamentosas principales: los microtúbulos, los neurofilamentos y los microfilamentos de actina. Los microtúbulos forman largas estructuras que se extienden por toda la longitud de la neurona y desempeñan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de las dendritas y los axones. En general están constituidos por 13 protofilamentos organizados en forma tubular. Cada protofilamento consisten en varios pares de subunidades alfa y beta de tubulina colocadas linealmente. Las tubulinas son codificadas por una familia de multigenes (Bustamante Zutela, E., 2004). Esta familia de genes, codifica diferentes isotipos de  $\beta$ -tubulina, siendo la  $\beta$ -tubulina III exclusiva de neuronas. Debido a que esta proteína se expresa de manera ubicua y exclusiva en las neuronas, se ha utilizado un anticuerpo anti  $\beta$ -tubulina III para la identificación de las neuronas.

La proteína fibrilar ácida de la glía, o proteína gliofibrilar ácida (GFAP), es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células gliales como los astrocitos y las células de Schwann. Su función principal es proteger la rígida organización tridimensional interna de los astrocitos del cerebro otorgándoles sin embargo, flexibilidad. Debido a que la GFAP solo se expresa en células de la glía, un anticuerpo anti GFAP permite identificar esta estirpe celular.

Por tanto, la utilización de los anticuerpos dirigidos a la  $\beta$ -tubulina III y a la GFAP de manera simultánea, nos ha permitido realizar una doble inmunocitoquímica que permite diferenciar las neuronas de las glías. Como podemos observar en la Fig. 10, el resultado de la doble inmunocitoquímica confirma que los cultivos primarios de hipocampo están compuestos tanto por neuronas, mostradas en verde, como por células gliales, mostradas en rojo.

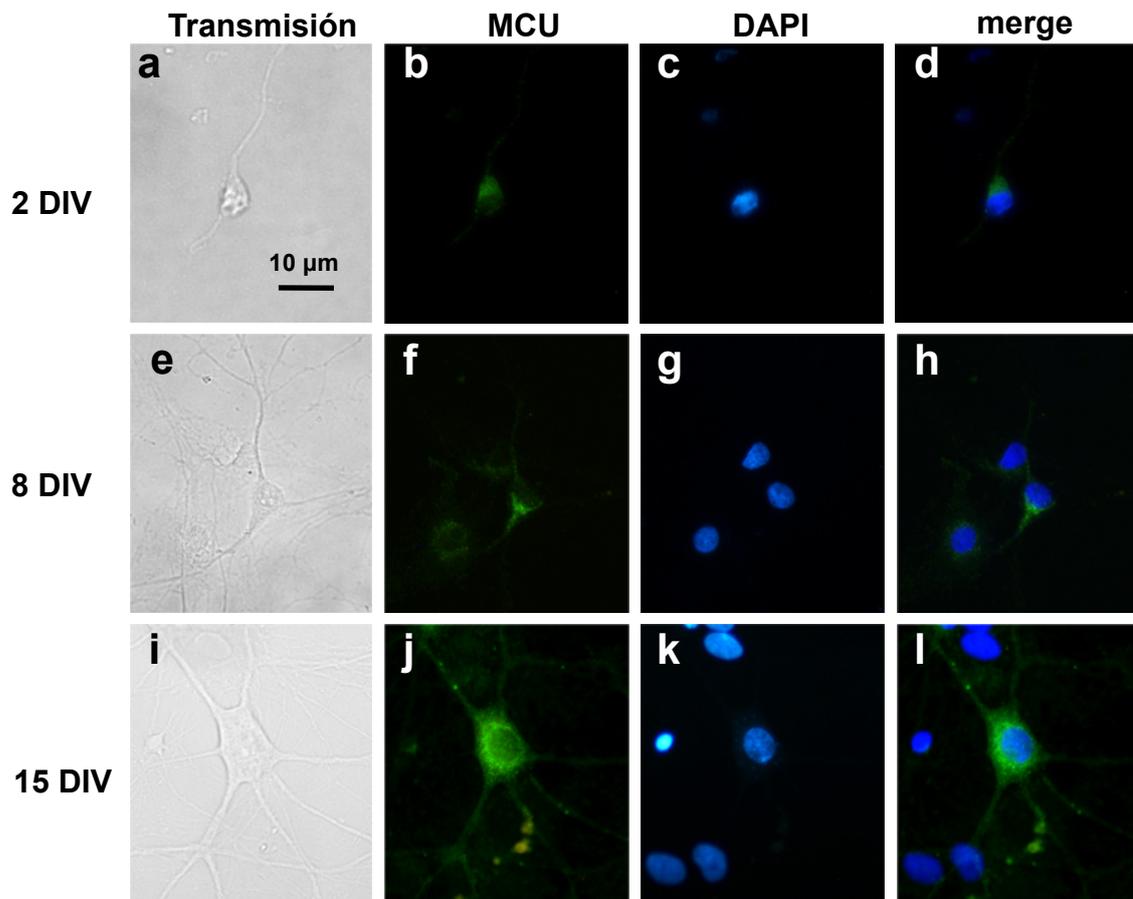
Estos resultados nos han permitido comprobar que una vez estudiados los cultivos y reconocidas las neuronas mediante técnicas inmunocitoquímicas, es posible reconocer las neuronas sin tener que aplicar la técnica de ICC en todos los cultivos. Esta es la razón de que en los siguientes experimentos realizados, para el estudio de la expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial, la identificación de las neuronas no se haya realizado mediante ICC.



**Figura 10: Imágenes correspondientes a la doble inmunocitoquímica para  $\beta$ -tubulina vs GFAP.** Btub:  $\beta$ -tubulina III; GFAP: proteína fibrilar ácida glial; DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia observada tras la doble ICC. En verde se muestran las neuronas; en rojo las células gliales y en azul los núcleos celulares. La última foto es una composición de las tres anteriores.

## 2. VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL MCU EN UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO NEURONAL

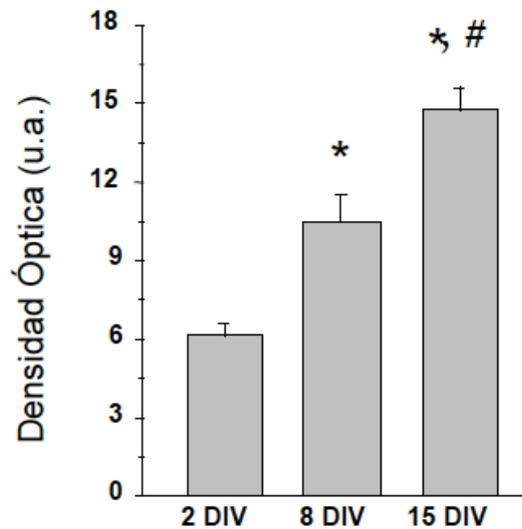
El Uniportador de Calcio Mitocondrial (MCU) es el principal sistema de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la matriz mitocondrial. Durante el envejecimiento, se produce una sobrecarga de calcio mitocondrial, lo que lleva a la pérdida de la capacidad tamponadora de calcio de la mitocondria. Es por ello, que nos hemos planteado realizar la valoración de la expresión del MCU en un modelo de envejecimiento neuronal. Para ello, se han realizado cultivos primarios neuronales en un medio con suero, que se han fijado a diferentes días de cultivo: 2, 8 y 15, considerando las células de los cultivos a día 15 neuronas envejecidas (Calvo, M., et al., 2015). Para valorar si se producen cambios en la expresión del MCU a lo largo del tiempo, se ha utilizado una técnica inmunocitoquímica cuantitativa, utilizando un anticuerpo primario anti-MCU de conejo y un secundario anti IgG de conejo con fluorescencia verde. Una vez realizada la tinción, se realizaron fotos de diferentes campos mediante microscopio de epifluorescencia (Fig. 11).



**Figura 11: Inmunocitoquímica anti MCU que permite valorar su expresión en neuronas envejecidas y no envejecidas en un modelo de cultivo primario en presencia de suero. (a,b,c,d): DIV2; (e,f,g,h): DIV8; (i,j,k,l): DIV15. Las imágenes de transmisión permiten la identificación de las neuronas (a, e, i). En verde se muestra el MCU (b, f, j); en azul aparecen los núcleos neuronales (c, g, k). Las imágenes d, h, y l representan la composición de las imágenes correspondientes a la ICC con Alexa Fluor 488 y DAPI. La expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial aumenta a medida que aumenta el tiempo en cultivo de las neuronas. Las neuronas envejecidas, 15 DIV, muestran un aumento de la fluorescencia verde correspondiente al MCU respecto a las neuronas maduras, 8 DIV y jóvenes, 2 DIV.**

Como se puede observar en la Fig. 11, se produce un aumento de la fluorescencia verde, correspondiente al MCU, a medida que aumentan los días en cultivo de las células. Para poder hacer una estimación de dicho aumento, y comprobar si existen diferencias reales en la expresión del MCU entre los diferentes días de cultivo, se ha medido la densidad óptica de áreas similares en cada una de las neuronas.

A continuación, se analizaron las diferencias de densidad óptica para cada uno de los días en cultivo mediante un T-test. Esta prueba puso de manifiesto que sí existen diferencias significativas en la densidad óptica de las imágenes entre neuronas envejecidas y no envejecidas, y que dicho parámetro aumenta a medida que aumentan los días que se mantienen las células en cultivo, incluso considerando únicamente las neuronas no envejecidas (Fig. 12).

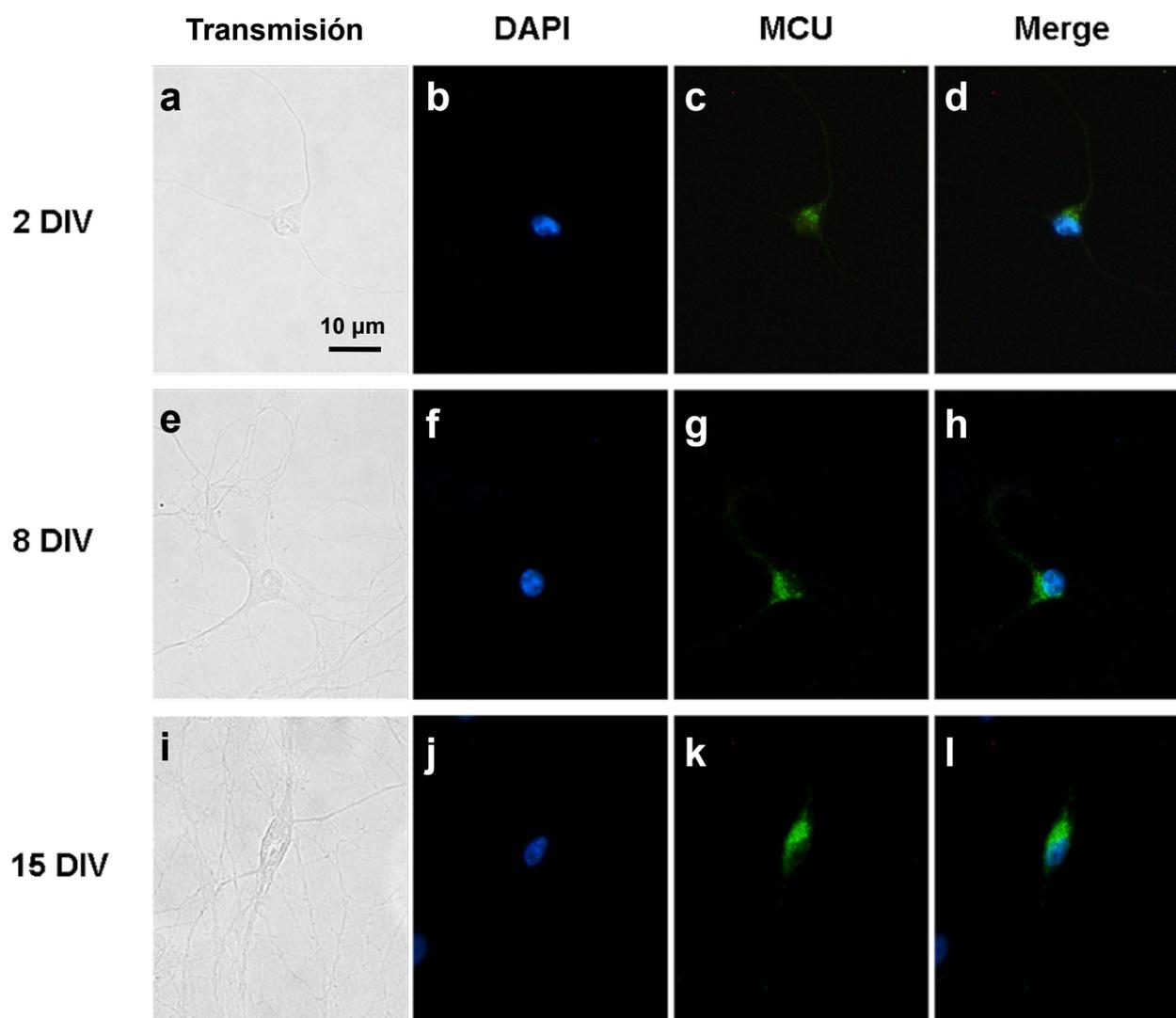


**Figura 12: Densidad óptica media obtenida en neuronas envejecidas y no envejecidas cultivadas con suero.** La representación de las medias muestra que a medida que aumentan los días en cultivo de las neuronas, existe un aumento de la densidad óptica, por tanto un aumento de la expresión del MCU. células estudiadas: n=9 para 2 DIV; n=11 para 8 DIV; n=11 para 15 DIV. \* $p < 0,05$  respecto a 2 DIV; # $p < 0,05$  respecto a 8 DIV.

### 3. VALORACIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DEL MCU EN DOS MODELOS DE CULTIVO PRIMARIO DE HIPOCAMPO

En gran parte de la literatura sobre cultivos de neuronas de hipocampo, las neuronas se cultivan en un medio sin suero, limitando el crecimiento de las células de la glía. De esta manera las neuronas se estudian más fácilmente sin contaminación glial. Sin embargo, dichas neuronas cultivadas sin células de la glía no están en su entorno fisiológico. De modo, que existe una gran controversia sobre si la realización de los cultivos primarios de hipocampo debe ser con o sin suero (Calvo, M., et al., 2015). Esto nos ha llevado a querer comprobar si la expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial se ve afectada al cultivar las neuronas en presencia y en ausencia de suero. Para ello, se retiró el medio con suero de los cultivos tras 24h, y se sustituyó por un medio sin suero.

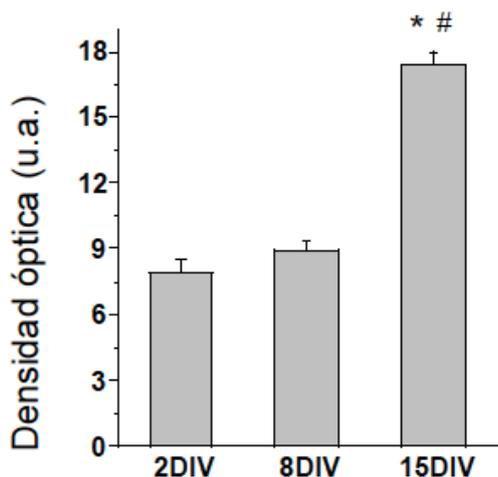
Para poder comparar los niveles de expresión del MCU entre los dos modelos de cultivo primario de hipocampo se realizó la misma técnica ICC empleada en los cultivos con suero, utilizando un anticuerpo primario anti-MCU de conejo y un secundario anti IgG de conejo con fluorescencia verde. Una vez realizada la inmunocitoquímica, se realizaron fotos de diferentes campos mediante microscopio de epifluorescencia (Fig. 13).



**Figura 13: Inmunocitoquímica anti MCU que permite valorar su expresión en neuronas envejecidas y no envejecidas en un modelo de cultivo primario sin suero. (a,b,c,d): DIV2; (e,f,g,h): DIV8; (i,j,k,l): DIV15. Las imágenes de transmisión permiten la identificación de las neuronas (a, e, i). En verde se muestra el MCU (b, f, j); en azul aparecen los núcleos neuronales (c, g, k). Las imágenes d, h, y l representan la composición de las imágenes correspondientes a la ICC con Alexa Fluor 488 y DAPI. Aunque no se pueden apreciar diferencias en la expresión del MCU entre las neuronas jóvenes y maduras, las neuronas envejecidas, 15 DIV, muestran un aumento de la fluorescencia verde correspondiente al MCU respecto a las neuronas maduras, 8 DIV y jóvenes, 2 DIV.**

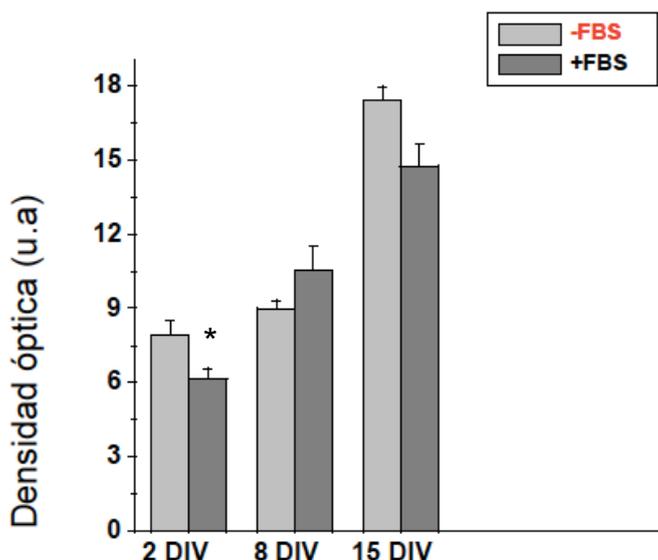
Como se puede observar en la Fig. 13, se produce un aumento de la fluorescencia verde, correspondiente al MCU, en las neuronas envejecidas (15 DIV). Para poder hacer una estimación de dicho aumento, y si existen diferencias reales en la expresión del MCU entre los diferentes días de cultivo, se ha medido la densidad óptica de áreas similares en cada una de las neuronas.

A continuación, se analizaron las diferencias de densidad óptica para cada uno de los días en cultivo mediante un T-test. Esta prueba puso de manifiesto que sí existen diferencias en la densidad óptica de las imágenes entre neuronas cultivadas 15 DIV (envejecidas) y las neuronas jóvenes (2 DIV) y maduras (8 DIV); pero no había diferencias entre las cultivadas 2 DIV y 8 DIV como se observó en las células cultivadas con suero (Fig. 14).



**Figura 14: Densidad óptica media obtenida en neuronas envejecidas y no envejecidas en un modelo de cultivo primario de hipocampo sin suero.** La representación de las medias de densidad óptica muestra que la expresión del MCU se ve aumentada en las neuronas envejecidas. Células estudiadas: n=10 para 2 DIV; n=14 para 8 DIV; n=15 para 15 DIV. \* $p < 0,05$  respecto a 2 DIV; # $p < 0,05$  respecto a 8 DIV.

Por último, se valoró si existen diferencias en la expresión del MCU entre los modelos de cultivo primario de hipocampo en presencia y ausencia de suero. Para ello se compararon los valores de las medias de densidad óptica de ambos cultivos obtenidas para las neuronas jóvenes (2 DIV), maduras (8 DIV) y envejecidas (15 DIV) respectivamente mediante un T-test. La Fig. 15 muestra que la expresión del MCU solo varía en las neuronas jóvenes, mientras que en las neuronas maduras y envejecidas no se produce un cambio en la expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial en presencia y ausencia de suero en el medio de cultivo.



**Figura 15: Comparativa de las medias de densidad óptica obtenidas para cada población neuronal en los dos modelos de cultivo primario de hipocampo.** La comparación de las medias muestra que únicamente existen diferencias debidas a la ausencia de suero en la expresión del MCU en neuronas jóvenes (2 DIV). Sin embargo, en las neuronas maduras (8 DIV) y envejecidas (15 DIV) no se observan dichas diferencias. \* $p < 0,05$  respecto a los cultivos sin suero.

# DISCUSIÓN

---

La homeostasis del calcio intracelular es un mecanismo implicado en numerosos procesos fisiológicos que incluyen la proliferación y la muerte celular. Debido a la importancia de los sucesos controlados por calcio, la célula ha desarrollado una maquinaria compleja que permite el mantenimiento de la homeostasis de calcio celular. Dicha maquinaria se encuentra presente en la membrana plasmática y en orgánulos intracelulares, destacando el retículo endoplásmico y la mitocondria. Ambos orgánulos actúan como reservorios de calcio intracelulares, uno permanente y otro transitorio, lo que les otorga un papel regulador esencial en los procesos de señalización por calcio. En las neuronas, el mantenimiento de las concentraciones de calcio intracelulares está implicado en numerosos procesos entre los que se encuentran la excitabilidad neuronal, la integración de señales eléctricas, la plasticidad sináptica, la expresión génica, el metabolismo, y la muerte celular programada.

La mitocondria es esencial para el mantenimiento del balance energético celular. Sin embargo, existen otras funciones fisiológicas importantes del orgánulo entre las que se encuentran la regulación de las vías de señalización apoptóticas y necróticas y la modulación de la señalización por calcio intracelular al actuar como un tampón de calcio citosólico. El calcio está implicado en la regulación de todas las funciones mitocondriales descritas anteriormente, por lo que no es extraño que la mitocondria presente mecanismos de entrada y extrusión de calcio en sus membranas. El principal mecanismo de entrada de calcio a la mitocondria es el Uniportador de Calcio Mitocondrial (MCU), un canal iónico presente en la membrana mitocondrial interna que se caracteriza por presentar baja afinidad por calcio y alta conductancia.

Se ha descrito ampliamente que la disregulación de la homeostasis del calcio está implicada tanto en el envejecimiento como en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Esta implicación, ha llevado a postular la Hipótesis del Calcio del Envejecimiento Neuronal, en la que se destaca la disfunción mitocondrial.

Debido a que la disfunción mitocondrial está asociada a una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  que restringe la actuación como tampón de la mitocondria, este trabajo se ha centrado en el estudio de la expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial en neuronas en un modelo de envejecimiento neuronal en dos tipos diferentes de cultivos: cultivos con suero y sin suero. Para ello, se han obtenido cultivos primarios de hipocampo de rata, y se han dejado incubar durante diferentes periodos de tiempo, considerando las células incubadas durante 15 días, neuronas envejecidas (Calvo, M., et al., 2015). Es necesario resaltar que los cultivos obtenidos son mixtos, es decir, están compuestos por más de un tipo celular, pudiendo identificar mediante la técnica de doble inmunocitoquímica tanto neuronas como células gliales, aunque en los cultivos sin suero la presencia de células de la glía está muy reducida.

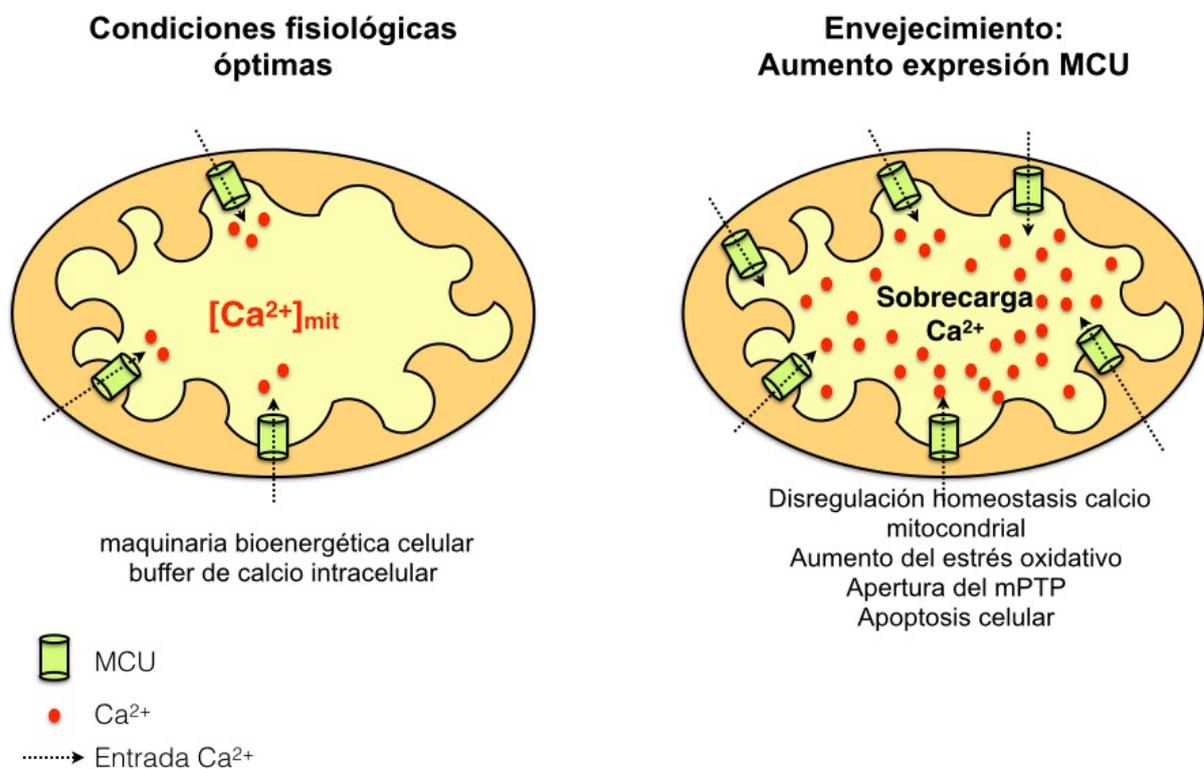
Una vez obtenidos los cultivos, se ha procedido a valorar la expresión del MCU en neuronas jóvenes (2 DIV), maduras (8 DIV) y envejecidas (15 DIV), ya que en estudios previos se ha mencionado que el silenciamiento del MCU podría tener efectos neuroprotectores (Qiu, J., et al., 2013), por lo que estábamos interesados en estudiar si la expresión del MCU aumenta en neuronas envejecidas. Mediante la observación por microscopía de fluorescencia de las neuronas utilizando un anticuerpo primario anti MCU y su posterior análisis cuantitativo, se pone de manifiesto que la expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial va aumentando a medida que aumentan los días de incubación celular en el caso de los cultivos con suero, mientras que en los cultivos sin suero no existen diferencias entre las neuronas jóvenes y maduras observando únicamente un aumento de la expresión del MCU en las neuronas envejecidas. Es decir, tanto en neuronas envejecidas cultivadas con suero como en ausencia de éste se produce un aumento de la expresión del MCU.

El aumento de la expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial podría contribuir a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial observada durante el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, con el estudio realizado no podríamos afirmar que éste sea el caso, por lo que sería muy interesante realizar nuevos estudios que permitan conocer más en profundidad los efectos del aumento de la expresión del MCU en relación con el envejecimiento. Nosotros proponemos como vía a seguir, el estudio de las consecuencias del silenciamiento del MCU en neuronas, valorando si existen cambios en la muerte celular por apoptosis en ausencia del Uniportador de Calcio Mitocondrial.

El aumento de la expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial también podría tener un significado fisiológico. Se ha descrito que la transferencia continua de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a la mitocondria permite mantener una actividad basal del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos. En su ausencia, la caída de ATP promueve la activación de la AMPK, que a su vez favorece la autofagia en un intento de aportar en energía a la célula (Cárdenas, C., et al., 2010). El déficit en la producción de ATP asociado al envejecimiento podría ser compensado por una sobreexpresión del MCU y la consiguiente entrada mayor de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria. Esto podría favorecer la supervivencia metabólica de la célula a expensas de un mayor riesgo de muerte neuronal asociada a la excitotoxicidad o a procesos neurdegenerativos.

# CONCLUSIONES

1. Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo son cultivos mixtos en los que podemos identificar tanto células gliales como neuronas.
2. Las neuronas de hipocampo de rata expresan el Uniportador de Calcio Mitocondrial.
3. La expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial se encuentra aumentada en neuronas envejecidas.
4. La expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial en neuronas envejecidas no se modifica al cultivar las neuronas en un medio sin suero.



**Figura 16:** el envejecimiento neuronal se caracteriza por aumento de la expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial.

# BIBLIOGRAFÍA

---

- Alonso, M.T., Villalobos, C., Chamero, P., Alvarez, J., García-Sancho, J., 2006. Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium* 40, 513-525
- Alvarez, J., Montero, M., García-Sancho, J., 1999. Subcellular Ca<sup>2+</sup> Dynamics. *News Physiol. Sci.* Vol 14. 161-168.
- Beaudoin III, G.M.J, Seung-Hye L, Dipika S, Yang Y, Yu-Gie Ng, Reichardt L.F, Arikath J, 2012. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature protocols* 7, 1741-1754.
- Berridge, M.J., 1993. Inositol triphosphate and Calcium Signalling. *Nature*, 361. 315-325.
- Berridge, M.J., 2012. Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem. Soc. Trans* 40, 297-309.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J., 1995. The Elemental Principles of Calcium Signalling. *Cell.* Vol 83. 675-678.
- Brewer G.J., Torricelli J.R., Evege E.K. and Price P.J. Optimized survival of hippocampal neurons in B-27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35, 567-576.
- Bustamante Zutela, E., 2004. El Sistema Nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano. Editorial Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia.
- Calvo, M., Sanz-Blasco, S., Caballero, E., Villalobos, C., and Núñez, L., 2015. Susceptibility to excitotoxicity in aged hippocampal cultures and neuroprotection by non-steroidal anti-inflammatory drugs: role of mitochondrial calcium. *J. Neurochem.*
- Cárdenas, C., Miller, R.A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K.H., Yang, J., Parjer, I., Thompson, C.B., Birnbaum, M.J., Hallowa, K.R., Foskett, J.K., 2010. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca<sup>2+</sup> transfer to mitochondria. *Cell*, 142(2). 270-283.
- Clapham, D.E., 1995. Calcium Signalling. *Cell*, 80. 259-268.
- Contreras L., Drago I., Zampese E., Pozzan T., 2010. Mitochondria: The calcium connection. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 607-618
- D. De Stefani, et al., Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex, *Biochim. Biophys. Acta*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.008>, 2015.
- Finkel T., Menazza S., Holmström K.M., Parks R.J., Liu J., Sun J., Liu J., Pan X., Murphy E., 2015. The Ins and Outs of Mitochondrial Calcium. *Circ Res.* 2015; 116: 1810-1819
- Finkel, T et al., 2013. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter (MCU), *Nat. Cell. Biol.* 15(12); 10.1038/ncb2868.
- Foskett JK., et Philipson B., 2014. The mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uniporter Complex. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78, 3-8.
- Giacomello M., Drago I., Bortolozzi M., Scorzeto M., Gianelle A., Pizzo P., Pozzan, T et al., 2010. Ca<sup>2+</sup> Hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca<sup>2+</sup> mobilization from stores, but not by activation of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol. Cell* 38, 280-290.
- Gibson GE, Peterson C. Calcium and the aging nervous system. *Neurobiol. Aging*, 2987; 8:329-343.
- Gleichmann, M et Mattson, MP, 2011., Neuronal Calcium Homeostasis and Dysregulation. Antioxidants and Redox Signaling, Volume 14, Number 7, 10.1089/ars.2010.3386
- Halestrap, AP., 2009. Mitochondrial calcium in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 1289-1290.

- Kachaturian ZS. Calcium, membranes aging and Alzheimer's disease. Introduction and overview. *Ann N Y Acad Sci.* 1989; 568:1-4.
- Kawamoto E.M., Vivar Carmen., Camandola S., 2012. Physiology and pathology of calcium signalling in the brain. *Front. Pharmacol.*, volume 3, 10.3389/fphar.2012.00061.
- Kirichok y, Krapivinsky G, Clapham DE, (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427 (6972):360-364.
- Kirichok, Y et al., 2012. Activity of the mitochondrial calcium uniporter varies greatly between tissues. *Nat. Commun*; 3; 10.1038/ncomms2325
- Landfield PW. "Increased calcium-current" hypothesis of brain aging. *Neurobiol. Aging*, 1987; 8:346-347.
- Lederer, WJ, et al., 2013. Mitochondrial calcium uptake. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Vol. 110, no.26, 10479-10486
- Mattson M.P., 2007. Calcium and neurodegeneration. *Aging cell* 6, 337-350.
- Muñoz, E., Valero, R., Quintana, A., Hoth, M., Núñez, L., Villalobos, C., 2011. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Inhibit Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Enabling the Ca<sup>2+</sup>-dependent Inactivation of Calcium Release-activated Calcium/Orai Channels Normally Prevented by Mitochondria. *J. Biol. Chem.* Vol.286. No 18. 16186-16196.
- Nikoletopoulou, V et Tavernarakis, N, 2012., Calcium homeostasis in aging neurons. *Frontiers in Genetics*, Volumen 3, 10.3389/fgene.2012.00200
- Oh M.M., Oliveira F.A., Waters J., Disterhoft J.F., 2013. Altered calcium metabolism in aging CA1 hippocampal pyramidal neurons. *J. Neuroscience*, 33(18): 7905-7911
- Patron M., Raffaello A., Granatiero V., Tosatto A., Merli G., De Stefani D., Wright L., Pallafacchina G., Terrin A., Mammucari C., Rizzuto R., 2013. The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): Molecular Identity and Physiological Roles. *J. Biol. Chem.* Vol 288, No 15. 10750-10758.
- Pérez-Otaño I., Luján R., Tavalin S.J., Plomann M., Modregger J., Liu X.B., Jones E.G., Heinemann S.F., Lo D.C. and Ehlers M.D (2006). Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nat. Neurosci.* 9, 611-621.
- Pietrobon, D., et al., 1990. Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* 193. 599-622.
- Qiu, J., Yan-Wei Tan, Hagenston, Anna M., Martel, Marc-Andre., Kneisel, Niclas., Skehel Paul A., Wyllie David J.A., Bading, David J.A., Giles E. Hardingham. Mitochondrial calcium uniporter Mcu controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals. *Nat. Comm*, 4: 2034.
- Rizzuto, R et al., 2013. The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): Molecular Identity and Physiological Roles. *J. Biol. Chem.* Vol. 288, no. 15, 10750-10758.
- Sheridan, E et al., 2014. Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium. *Nature genetics*, Vol 46, No 2, 188-196.
- Sammels E., Parys J.B., Missiaen L., Humbert De Smedt., Bultynck G., 2010. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in health and disease: A dynamic equilibrium. *Cell calcium* 47, 237-314.
- Toescu E.C., Vreugdenhil M., 2010. Calcium and brain ageing. *Cell Calcium* 47, 158-164.
- Zhang, J.T., 1993. Altered calcium homeostasis in brain aging and senile dementia, new approach to treat Alzheimer's disease. *Yao Xue Xue Bao* 28(9): 641-646.
- Zündorf G et Reiser G., 2011. Calcium Dysregulation and Homeostasis of Neural Calcium in the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Provide Multiple Targets for Neuroprotection. *Antioxidants and Redox Signalling*, Vol 14, No 7 1275-1288.