



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**Dpto. de BIOQUÍMICA y BIOLOGÍA MOLECULAR y FISIOLÓGIA
INSTITUTO de BIOLOGÍA y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)**

TESIS DOCTORAL

**Remodelado del Calcio Intracelular y
Susceptibilidad a la Muerte Neuronal en el
Envejecimiento y en la Enfermedad de Alzheimer**

**Presentada por MARÍA CALVO RODRÍGUEZ para optar al
grado de Doctor por la Universidad de Valladolid**

Dirigida por

**Dra. Lucía Núñez Llorente
Dr. Carlos Villalobos Jorge**

Valladolid, 2015



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

IBGM



CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Biología y Genética Molecular

C/ Sanz y Forés, s/n
47003 Valladolid (Spain)
Telf: 983-184801 Fax: 983-184800
<http://www.ibgm.med.uva.es/>

Dña. Lucía Núñez Llorente, Profesora Titular del departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid,

y D. Carlos Villalobos Jorge, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid,

CERTIFICAN: que **Dña. María Calvo Rodríguez** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado **“Remodelado del Calcio Intracelular y Susceptibilidad a la Muerte Neuronal en el Envejecimiento y en la Enfermedad de Alzheimer”** como Tesis para alcanzar el grado de Doctor, realizado en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

Y para que conste donde proceda, firman la presente certificación en Valladolid a 22 de Mayo de 2015.

Lucía Núñez Llorente

Carlos Villalobos Jorge

*A mis padres,
por apoyarme siempre en hacer de un sueño,
una realidad.*

Parte de los resultados mostrados en esta tesis han sido descritos en las siguientes publicaciones científicas:

1. **Calvo M**, Sanz-Blasco S, Caballero E, Villalobos C, Núñez L. (2015) Susceptibility to excitotoxicity in aged hippocampal cultures and neuroprotection by non-steroidal anti-inflammatory drugs: role of mitochondrial calcium. *Journal of Neurochemistry*. 132(4):403-17.
2. **Calvo M**, Villalobos C, Núñez L. (2015) Calcium imaging in neuron cell death. *Methods in Molecular Biology*. 1254:73-85.
3. **Calvo-Rodríguez M**, Villalobos C and Núñez L (2015) Fluorescence and bioluminescence imaging of subcellular Ca^{2+} in long-term cultures of rat hippocampal neurons to assess Ca^{2+} remodeling in aging. *Journal of Visualized Experiments* (en prensa).
4. **Calvo-Rodríguez M**, Núñez L and Villalobos C (2015) Excitotoxicity and neuroprotection by NSAIDs in a model of long-term cultured hippocampal neurons. *Neural Regeneration Research* (enviado).
5. Caballero E, **Calvo-Rodríguez M**, Gonzalo-Ruiz A, Villalobos C and Núñez L. (2015) A novel procedure for amyloid Beta 1-42 oligomers preparation bolsters a role for enhanced Ca^{2+} entry and mitochondrial Ca^{2+} overload in neuron cell death in Alzheimer's Disease. *PlosOne* (enviado).

O se han presentado en forma de comunicación a los siguientes congresos científicos:

1. **María Calvo-Rodríguez**, Paloma García-Casas, Carlos Villalobos and Lucía Núñez. Intracellular Ca^{2+} remodelling and susceptibility to cell death in aged hippocampal neurons in long-term culture. *European Calcium Society Workshop 2015*. 21-24 Junio 2015. Seillac. Francia. Póster.
2. **María Calvo**, Carlos Villalobos and Lucía Núñez. NMDA-induced cell death in hippocampal neurons is prevented by NSAIDs acting on mitochondrial Ca^{2+} uptake. *Red Española de Canales Iónicos*. 12-13 Febrero 2013. Cuenca, España. Póster.
3. **María Calvo**, Carlos Villalobos and Lucía Núñez. Non-steroidal anti-inflammatory drugs protect against excitotoxicity in hippocampal cells acting on mitochondrial Ca^{2+} handling. *FEPS Spanish Physiological Society Scientific Congress*. 8-11 Septiembre 2012. Santiago de Compostela, España. Póster.
4. Erica Caballero, **María Calvo**, Carlos Villalobos and Lucía Núñez. Role of NMDA receptors in Ca^{2+} entry and neuron cell death induced by oligomers of amyloid β peptide in Alzheimer's Disease. *International symposium on ionotropic glutamate receptors*. 10-17 Febrero 2012. Valencia, España. Póster.

Agradecimientos

Dicen que todo pasa... que todo llega... y ahora que estoy en el final entiendo el significado de estas frases. Nadie dijo que fuera fácil, dicen otros... y cuánta razón llevan. Porque este camino habría sido mucho más difícil de recorrer sin la ayuda de muchos. Por ello, no puedo llegar al final del camino sin agradecer a todos los que por él pasasteis.

A Carlos y a Lucía, un ejemplo de directores de tesis, por darme la oportunidad de realizar este sueño en su laboratorio, por abrirme sus puertas como a una más. Por vuestra paciencia, y por toda la experiencia y apoyo que me habéis transmitido, gracias.

A Asunción Barbero, y su laboratorio, donde di mis primeros pasos en el mundo de la investigación; y a Enrique Samper, por dar esa gran oportunidad a una química en el mundo de la biomedicina. Gracias a vosotros, que aparecisteis en mi camino y me llevasteis a donde estoy ahora.

A todos los que en algún momento formasteis parte del D4, David (gracias por ir a pedir ratis día sí y día también), Diego, Héctor, Carmen (¡suerte con tu tesis londinense!), las nuevas incorporaciones Lucía, Dani, Mónica, Paloma (¡ánimo chicos!), pero en especial a aquellas que empezaron siendo compañeras y que ahora son grandes amigas. A Evica, compañera de laboratorio ¡y de piso! Gracias por tu tiempo, por enseñarme aquello que sabías y por las tardes de Nestea o noches cenando delante de un plato de pasta. A Erica, tú me iniciaste en el mundo de las neuronas, fuiste un gran ejemplo de lo que era realizar un buen trabajo y de superación continua. Gracias por esa ayuda que nunca me negaste y que aún hoy me das con tan sólo una llamada. Y en especial a ti, preciosa Miriam, una postdoc imparable, por todas las horas dedicadas, por enseñarme lo que es la pasión por la ciencia, la lucha por lo que uno desea y el no rendirse nunca, pero también por tus ánimos y sobre todo por los momentos compartidos, dentro y fuera de laboratorio. Sabes que allí donde vayamos nos juntaremos y ¡bailaremos!

A los chicos de "la tercera", que no les importó que fuera de "la segunda" y me aceptaron con ellos. ¡Qué habría sido de mí sin vosotros chicos! Cómo olvidar ese viaje a Ibiza exprés en el que volvimos en bikini y toalla (¡¿Eh Lucía?!). A todos los que seguís ahí arriba, Clara, Gema, Julio, Carlos, Sara, Vir, Bea y Clau, como los que ya os fuisteis, Etzel, Rubén, Lucía, Esther... (¡Seguro que me dejo alguno que sois muchos!) ¡Gracias! Por los cafés, por los jueves de pincho-cañas y por los grandes momentos de risa que siempre supisteis darme. Pero no puedo acabar este párrafo sin agradecerte especialmente a ti, querida Tamara. Sabes que, como ya decimos ambas, "esta andadura jamás habría sido lo mismo sin ti". Porque juntas empezamos el camino... y juntas llegamos a la meta. No sólo has sido una perfecta compañera de trayecto, también eres una gran amiga.

A Soraya y Vicky, las chicas de la sala blanca, por las horas de comida juntas, en las que siempre aprendía un poquito más de la vida.

A mis compañeros de carrera y ahora amigos, que aún hoy me siguen mirando con el gesto torcido cada vez que les hablo del calcio. Pero en especial a Lidia y Sete, porque da igual los años que pasen, que vosotras seguís ahí.

A la gente del gimnasio, por sacarme una sonrisa al final de cada día, pero en especial vosotras, Paula y Ana, no sólo compañeras, sino también amigas.

A esos amigos "de la mano", que sin importar lo lejos que estén, han sabido estar al otro lado del teléfono interminables horas dándome ánimos. Miguel, Tere, Begoña, Miki, Elodie... Gracias por no dejarme sola en esta aventura y preocuparos siempre por mí. (Elodie, ça c'est compliqué à lire pour toi, je sais!).

A mi familia, en especial a mi primo Joel, que sin ti a saber cómo habría quedado la portada de esta tesis. ¡Gracias!

Y a los más importantes en este camino, a mis padres, por haber hecho de mí la persona que soy hoy, porque sin vosotros no habría llegado hasta donde estoy ahora, porque parte de este trabajo es también vuestro. A ti mamá, no sé si es la casualidad que te lleva a abrir un periódico o tu insistencia en que continúe, en que no

desista, al final he llegado a la meta. Gracias por ir ayudándome a saltar las piedras en este camino, por la paciencia que has tenido, porque sin ti no lo habría conseguido. Y a ti papá, por tu apoyo incondicional, por animarme siempre, por entender lo que esto significaba para mí, porque daba igual que fuera un día de tormenta como soleado, tú siempre estabas cuando te he necesitado. A vosotros os lo debo todo. Gracias.

Y gracias a todos los que, aparezcáis en estas páginas o no, habéis recorrido junto a mí parte del camino.

Viviré para siempre, o moriré intentándolo.

Anónimo

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
------------------------------------	----------

RESUMEN	V
----------------------	----------

I. INTRODUCCIÓN	1
------------------------------	----------

1. Envejecimiento en el Sistema Nervioso Central y Enfermedades Neurodegenerativas....	3
1.1. El Envejecimiento Fisiológico Cerebral.....	3
1.2. Enfermedades Neurodegenerativas Asociadas al Envejecimiento	6
2. La Enfermedad de Alzheimer (EA).....	8
2.1. Hipótesis sobre el Origen de la Enfermedad de Alzheimer	13
2.1.1. Hipótesis de la Cascada Amilode	14
2.1.2. Hipótesis de la Proteína Tau.....	19
2.1.3. Hipótesis Colinérgica	21
3. Homeostasis del Calcio Intracelular en la Neurona	23
3.1. Entrada de Ca ²⁺ a través de la Membrana Plasmática.....	25
3.1.1. Canales de Calcio Operados por Voltaje (VOCs).....	26
3.1.2. Canales de Calcio Operados por Receptor (ROCs)	27
3.1.3. Canales de Calcio Operados por el Vaciamiento de los Depósitos (SOCs).....	34
3.1.4. Superfamilia de Canales TRP	36
3.2. Sistemas de Extrusión de Calcio a través de la Membrana Plasmática	36
3.2.1. ATPasa de la Membrana Plasmática (PMCA).....	37
3.2.2. Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ de la Membrana Plasmática (NCX)	38
3.3. Proteínas que Unen Calcio en el Citosol	38
3.4. El Retículo Endoplásmico	39
3.4.1. Liberación de Calcio desde el Retículo Endoplásmico	40
3.4.2. Captación de Calcio por el Retículo Endoplásmico	44
3.5. La Mitocondria	46
3.5.1. Entrada de Calcio a la Mitocondria	49
3.5.2. Sistemas de Extrusión del Calcio Mitocondrial	51

3.5.3.	Mitocondria y su Papel en la Muerte Neuronal	52
4.	Homeostasis del Calcio Intracelular en el Envejecimiento Neuronal y en la Neurodegeneración.....	56
4.1.	Homeostasis del Ca ²⁺ Intracelular en el Envejecimiento Neuronal	57
4.1.1.	Efecto del Envejecimiento en los Compartimentos Intracelulares de Ca ²⁺	62
4.2.	Modelos para el Estudio del Envejecimiento Fisiológico <i>In Vitro</i>	64
4.3.	Calcio Intracelular y la Enfermedad de Alzheimer	65
4.3.1.	Acumulación Amiloide y Entrada de Ca ²⁺	67
4.3.2.	Procesamiento Amiloide y Liberación de Ca ²⁺ de los Depósitos	70
4.3.3.	Enfermedad de Alzheimer y Mitocondria	70
5.	Excitotoxicidad y Enfermedades Neurodegenerativas.....	72
6.	Neuroprotección en la Excitotoxicidad y en las Enfermedades Neurodegenerativas	78
6.1.	Anti-inflamatorios No Esteroides.....	79
6.1.1.	AINEs y Excitotoxicidad	81
6.1.2.	AINEs y la Enfermedad de Alzheimer.....	82

II. OBJETIVOS85

III. MATERIAL Y MÉTODOS89

A.	MÉTODOS EXPERIMENTALES:.....	91
1.	Cultivos Celulares	91
1.1.	Obtención de Neuronas de Hipocampo.....	91
2.	Técnicas Inmunocitoquímicas	93
3.	Medida de la Autofluorescencia	96
4.	Medida de la Concentración de Calcio.....	97
4.1.	Medida de la Concentración de Calcio Citosólico mediante Imagen de Fluorescencia	97
4.2.	Medida de la Concentración de Calcio Mitocondrial mediante Imagen de Bioluminiscencia con Aequorinas Recombinantes	102
4.2.1.	Amplificación del Plásmido y Transfecciones Transitorias	108
5.	Estudio del Potencial Mitocondrial	109

6.	Medida de la Apoptosis Celular.....	110
6.1.	Medida de la Apoptosis por Tinción con Anexina V	110
6.2.	Medida de la Apoptosis por Liberación del Cit C	112
7.	Estudio de la Apertura del Poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial (PTPm) 113	
8.	Preparación de los Oligómeros del Péptido Amiloide A β ₁₋₄₂	114
9.	Análisis Estadístico de los Datos	116
B. TAMPONES Y SOLUCIONES:.....		117
1.	Medios para Cultivos Celulares y Disgregación de Tejidos	117
2.	Medios Microscopio.....	118
3.	Medios para la Medida de la Apoptosis	119
C. MATERIALES Y REACTIVOS:.....		120
D. PLÁSMIDOS y ANIMALES:.....		123

IV. RESULTADOS125

1.	Cultivo a Largo Plazo de Neuronas Hipocampales como Modelo de Envejecimiento ...	127
2.	Remodelado de los Depósitos Intracelulares de Calcio de las Neuronas de Hipocampo en Cultivo durante el Envejecimiento.....	132
2.1.	El Contenido de los Depósitos Varía con la Edad de las Neuronas en Cultivo ...	132
2.1.1.	El Contenido de los Depósitos Intracelulares de Ca ²⁺ es Mayor en las Neuronas de Hipocampo Envejecidas que en las Jóvenes.....	133
2.1.2.	La Entrada de Calcio Operada por Depósitos Disminuye en las Neuronas de Hipocampo Envejecidas.....	135
2.2.	Depósitos de Calcio Sensibles a Cafeína en Neuronas de Hipocampo	137
2.3.	Depósitos de Calcio Sensibles a ACh en Neuronas de Hipocampo.....	139
2.4.	El Ca ²⁺ de los Depósitos Movilizado por ACh Es Captado por la Mitocondria en las Neuronas Envejecidas.....	143
2.5.	La Expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial Cambia con la Edad del Cultivo	147

3.	Efecto del Tratamiento Crónico con A β ₁₋₄₂ sobre los Depósitos Intracelulares de Calcio en Neuronas de Hipocampo Jóvenes y Envejecidas	150
3.1.	El Tratamiento Crónico de las Neuronas de Hipocampo Envejecidas con los Oligómeros de A β ₁₋₄₂ Aumenta el Nivel de Ca ²⁺ Basal y las Oscilaciones de Ca ²⁺	150
3.2.	El Contenido de los Depósitos Intracelulares de Ca ²⁺ Aumenta en las Neuronas de Hipocampo Envejecidas Expuestas a los Oligómeros de A β ₁₋₄₂	153
3.3.	El Ca ²⁺ de los Depósitos Movilizado por ACh Aumenta en las Neuronas Envejecidas de Hipocampo Expuestas a los Oligómeros de A β ₁₋₄₂	155
3.4.	El Ca ²⁺ de los Depósitos Movilizado por Cafeína Aumenta en las Neuronas Envejecidas de Hipocampo Expuestas a los Oligómeros de A β ₁₋₄₂	158
3.5.	Los Oligómeros de A β ₁₋₄₂ Inducen Apoptosis en las Neuronas Envejecidas de Hipocampo. La ACh Protege frente a la Neurotoxicidad de los Oligómeros	160
4.	Susceptibilidad a la Excitotoxicidad en el Envejecimiento	164
4.1.	Efecto del NMDA sobre la Apoptosis Neuronal	164
4.2.	Efecto del NMDA sobre la Señal de Ca ²⁺ Citosólico	167
4.2.1.	El Incremento de Ca ²⁺ Citosólico Inducido por NMDA es Mayor en las Neuronas Envejecidas que en las Jóvenes	167
4.2.2.	Cambios en la Concentración de Ca ²⁺ Inducidos por NMDA se Correlacionan con la Susceptibilidad a la Apoptosis en las Mismas Células.	172
4.2.3.	Susceptibilidad a la Excitotoxicidad en Neuronas de Hipocampo Cultivadas en Ausencia de Suero	173
4.3.	La Expresión de las Diferentes Subunidades del Receptor de NMDA varía con la Edad del Cultivo.....	176
4.4.	El Incremento de Ca ²⁺ Inducido por Despolarización de la Membrana Plasmática es Mayor para las Neuronas Envejecidas	179
4.5.	Efecto del NMDA sobre la Señal de Ca ²⁺ Mitocondrial.....	180
4.5.1.	El NMDA Induce Sobrecarga de Ca ²⁺ en la Mitocondria de Neuronas Envejecidas	180
4.5.2.	La Sobrecarga de Ca ²⁺ Mitocondrial Contribuye a la Apoptosis Celular Producida por el NMDA en Neuronas de Hipocampo Envejecidas	182
4.6.	Efecto de los Anti-Inflamatorios No Esteroides sobre la Apoptosis Celular Inducida por el NMDA.....	188

4.6.1.	Los AINEs Despolarizan la Mitocondria e Inhiben la Sobrecarga de Ca ²⁺ Mitocondrial	188
4.6.2.	Los AINEs Previenen la Apoptosis Celular Inducida por el NMDA en Neuronas Envejecidas	195
5.	Neurotoxicidad Causada por Oligómeros de Aβ ₁₋₄₂ en Agudo en el Envejecimiento	198
5.1.	Efecto Agudo de los Oligómeros de Aβ ₁₋₄₂ sobre la Señal de Ca ²⁺	198
5.1.1.	La Respuesta de Ca ²⁺ Citosólico a Aβ ₁₋₄₂ Aumenta en las Neuronas Envejecidas	198
5.1.2.	Los Oligómeros de Aβ ₁₋₄₂ Inducen Sobrecarga de Ca ²⁺ en la Mitocondria de Neuronas Envejecidas	200
5.2.	Efecto de los Oligómeros de Aβ ₁₋₄₂ sobre la Apoptosis Neuronal	202
5.2.1.	Los Oligómeros de Aβ ₁₋₄₂ Inducen Apoptosis en Neuronas de Hipocampo Envejecidas	202
5.2.2.	La Sobrecarga de Ca ²⁺ Mitocondrial Contribuye a la Apoptosis Celular Producida por Aβ ₁₋₄₂ en Neuronas de Hipocampo Envejecidas	204
5.3.	Efecto de los AINEs sobre la Neurotoxicidad Inducida por los Oligómeros de Aβ ₁₋₄₂	207
5.3.1.	Los AINEs Inhiben la Sobrecarga de Ca ²⁺ Mitocondrial	207
5.3.2.	Los AINEs Previenen la Apoptosis Celular Inducida por los Oligómeros de Aβ ₁₋₄₂ en Agudo en Neuronas Envejecidas	211

V. DISCUSIÓN215

1.	El Remodelado del Ca ²⁺ Intracelular Promueve un Mayor Acoplamiento entre el RE y la Mitocondria en el Envejecimiento Neuronal en Cultivo	218
2.	La Exposición Crónica a los Oligómeros de Aβ ₁₋₄₂ Intensifica el Remodelado de Ca ²⁺ Intracelular en el Envejecimiento	222
3.	Las Neuronas de Hipocampo Presentan una Mayor Susceptibilidad a la Excitotoxicidad con el Envejecimiento	226
4.	El Tratamiento Agudo con los Oligómeros del Péptido Amiloide Aβ ₁₋₄₂ Induce Toxicidad en las Neuronas de Hipocampo Envejecidas al Producir Sobrecarga de Ca ²⁺ Mitocondrial ..	230
5.	Los AINEs Protegen frente a la Apoptosis en las Neuronas Envejecidas Inducida por Agentes Neurotóxicos Actuando sobre el Ca ²⁺ Mitocondrial	233

VI. CONCLUSIONES237

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS241

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi$	Diferencia de potencial de membrana mitocondrial
A β	Péptido β Amiloide
abc	Área bajo la curva
ADP	Adenosín difosfato
ACh	Acetilcolina
AEQ	Aequorina
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
AMPA	Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloide
ATP	Adenosín trifosfato
Caf	Cafeína
[Ca ²⁺] _{cit}	Concentración de calcio libre citosólico
[Ca ²⁺] _{mit}	Concentración de calcio libre mitocondrial
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺
COX	Ciclooxigenasa
CsA	Ciclosporina A
DAG	Diacilglicerol
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EA	Enfermedad de Alzheimer
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
EEM	Error estándar de la media
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EP	Enfermedad de Parkinson
FBS	Suero fetal bovino
FCCP	Carbonil cianida para-(trifluorometoxi)fenilhidrazona
GFP	Proteína fluorescente verde

GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
H-EDTA	Ácido hidroxietilendiaminotriacético
HFIP	Ácido hexafluoroisopropanoico
HS	Suero de caballo
IO	Índice de oscilaciones
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP₃R	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato
LTP	Potenciación a largo plazo
mAChR	Receptor Muscarínico de Acetilcolina
MCU	Uniportador de Calcio Mitocondrial
MEC	Medio externo completo
MIC	Medio interno celular
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
nAChR	Receptor Nicotínico de Acetilcolina
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NFTs	Ovillos neurofibrilares
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintasa
PBS	Solución de tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PLC	Fosfolipasa C
PS	Fosfatidilserina
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
PTPm	Poro de transición de permeabilidad mitocondrial
RE	Retículo endoplásmico
ROC	Canal de Ca ²⁺ operado por receptor

ROS	Especies reactivas de oxígeno
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ /ATPasa de retículo sarcoplásmico y endoplásmico.
SNC	Sistema Nervioso Central
SOC	Canal de Ca ²⁺ operado por depósitos
SOCE	Entrada de Ca ²⁺ operada por depósitos
Tg	Tapsigargina
TMRM	Éster metílico de tetrametilrodamina
TTX	Tetrodotoxina
u.a.	Unidades arbitrarias
VOC	Canal de Ca ²⁺ operado por voltaje

RESUMEN:

La presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la dishomeostasis del Ca^{2+} intracelular en el envejecimiento y en la Enfermedad de Alzheimer como base para el desarrollo de nuevas estrategias eficaces en la prevención y/o el tratamiento de esta enfermedad.

La susceptibilidad al daño tras el ictus isquémico o la neurodegeneración aumenta de forma dramática en el envejecimiento, pero los mecanismos involucrados en este proceso apenas se conocen. La excitotoxicidad, provocada por la sobreactivación de receptores de glutamato, principalmente el receptor tipo NMDA, puede contribuir al daño y muerte neuronal de enfermedades neurológicas, como la isquemia o la Enfermedad de Alzheimer. Ésta última está asociada al exceso de péptido β amiloide. El exceso de este péptido o la formación de diferentes agregados (oligómeros) resulta tóxico para las neuronas. La muerte neuronal que sucede tras la excitotoxicidad y en la Enfermedad de Alzheimer se ha relacionado con la dishomeostasis del Ca^{2+} intracelular. Una desregulación del Ca^{2+} intracelular puede conllevar a la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, pudiendo desencadenar señales de apoptosis y muerte neuronal. Una pequeña despolarización mitocondrial, como la ejercida por protonóforos como el FCCP, es suficiente para prevenir ampliamente la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial.

El principal objetivo de esta tesis es conocer si la homeostasis del Ca^{2+} intracelular se ve remodelada con el envejecimiento, y si este hecho se ve modificado en patologías como la excitotoxicidad y en la Enfermedad de Alzheimer. Para llevar a cabo este estudio, se han empleado cultivos a largo plazo de neuronas de hipocampo extraídas de ratas recién nacidas, que como se ha descrito previamente, presentan muchos de los cambios que suceden durante el envejecimiento *in vivo*.

Una de las causas que recientemente se ha contemplado en la Enfermedad de Alzheimer es la alteración de la señalización por Ca^{2+} del retículo endoplásmico. El análisis de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular mostró un remodelado con el envejecimiento *in vitro*, especialmente en las neuronas expuestas a los oligómeros del péptido β amiloide, en el contenido de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , la entrada capacitativa, la cantidad de Ca^{2+} liberada desde ellos mediante agonistas fisiológicos, y de forma particular en el acoplamiento retículo-mitocondria. Además, se encontró que el agonista del receptor de glutamato NMDA y los oligómeros del péptido β amiloide indujeron apoptosis en las neuronas cultivadas a largo plazo o envejecidas, pero no en las neuronas cultivadas a corto plazo o jóvenes. De forma similar, el

NMDA y los oligómeros del péptido β amiloide aumentaron la entrada de Ca^{2+} al citosol, tanto más cuanto más envejecidas estaban las neuronas en cultivo, estudiado mediante imagen de fluorescencia de Ca^{2+} en neuronas cargadas con fura-2. Esta mayor entrada se correlacionó con una diferente expresión de las subunidades de receptor de NMDA, observado por estudios de inmunofluorescencia, de forma consistente con el envejecimiento *in vivo*. Es más, la estimulación de neuronas transfectadas con aequorina dirigida a mitocondria mostró que el NMDA y los oligómeros del péptido β amiloide indujeron aumento de la concentración de Ca^{2+} mitocondrial, pero sólo en aquellas neuronas envejecidas en cultivo. En relación con ello, la expresión del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial, encargado de introducir el Ca^{2+} a la mitocondria, también apareció aumentada con el envejecimiento.

Se ha mostrado que los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs), de estructura similar a los desacoplantes mitocondriales, son capaces de proteger frente a la excitotoxicidad, la Enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento. De forma consistente, se encontró que ciertos AINEs, entre los que se incluyen el salicilato, sulfuro de sulindac, indometacina, ibuprofeno y en enantiómero carente de actividad anti-inflamatoria R-flurbiprofeno, despolarizaron la mitocondria a concentraciones mucho más bajas que las requeridas para ejercer la actividad anti-inflamatoria. En consecuencia, los AINEs, empleados a bajas concentraciones, previnieron la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y protegieron frente a la muerte celular inducida por el NMDA y los oligómeros del péptido β amiloide, sin afectar a la entrada de Ca^{2+} al citosol.

Estos resultados sugieren que el remodelado del Ca^{2+} intracelular, y particularmente la mayor captación de Ca^{2+} por la mitocondria, contribuyen a la mayor susceptibilidad a la muerte celular que aparece en las neuronas de hipocampo asociada a la excitotoxicidad y a la Enfermedad de Alzheimer. Compuestos que prevengan el aumento de Ca^{2+} mitocondrial podrán proteger frente a la muerte celular asociada al envejecimiento.

I. INTRODUCCIÓN

1. Envejecimiento en el Sistema Nervioso Central y Enfermedades Neurodegenerativas

1.1. El Envejecimiento Fisiológico Cerebral

El envejecimiento se define como un proceso continuo, universal e irreversible, que comprende al conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen como consecuencia de la acción del tiempo sobre los seres vivos. Se caracteriza por una disminución progresiva de la función así como de la capacidad de respuesta a agentes nocivos, conllevando finalmente a la muerte. El envejecimiento es un fenómeno multifactorial, que afecta todos los niveles de organización biológica, desde las moléculas a los sistemas fisiológicos. Las células de todos los seres vivos envejecen, aunque con un ritmo y unas características distintas para cada especie y para cada individuo de la misma especie. Se han llegado a postular hasta 200 teorías del envejecimiento, que incluyen desde complejos procesos moleculares hasta explicaciones metafísicas. Es un proceso que involucra distintos tipos de células, interacciones celulares y factores internos y externos al organismo.

La vejez no es una enfermedad y la mayor parte de las personas ancianas gozan de buena salud pero, lo que sí es cierto es que determinado número de ancianos desarrolla enfermedades crónicas que se aceleran en el envejecimiento, dado que el organismo es más frágil. A medida que envejecemos ocurren dos fenómenos paralelos, un decline fisiológico normal y un aumento en la prevalencia de ciertas enfermedades. Algunos de los cambios fisiológicos que ocurren durante el envejecimiento humano aparecen reflejados en la **Figura 1**.

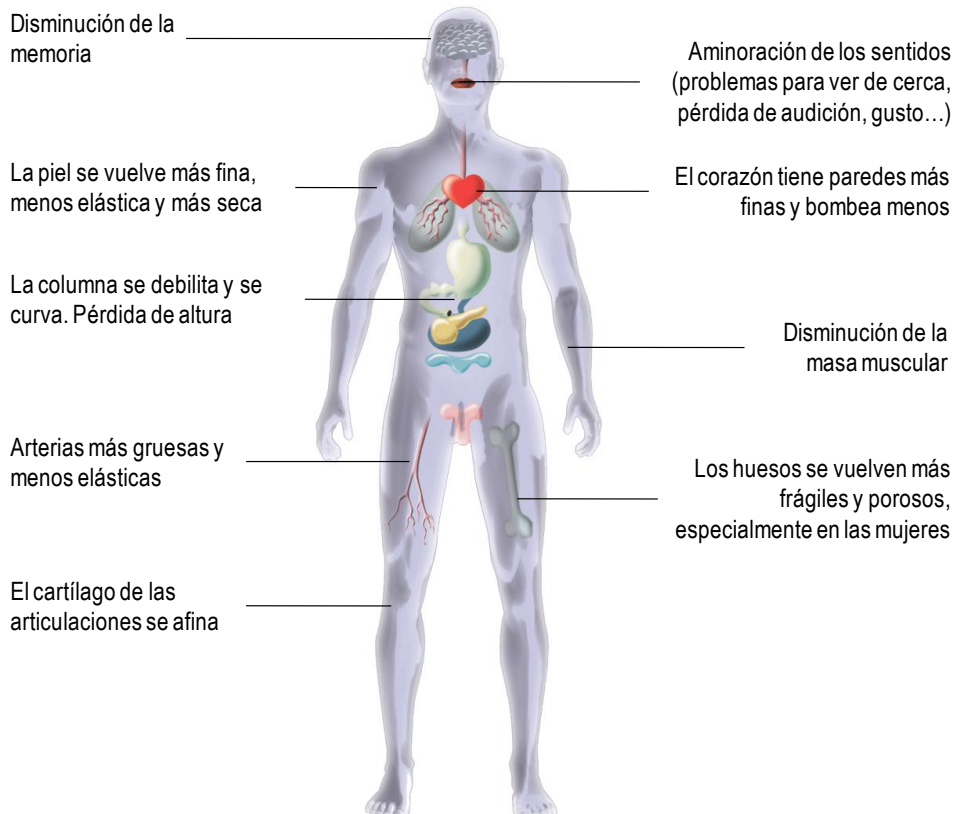


Figura 1. Modificaciones que pueden producirse en personas de edad avanzada. Basado en Universidad Maimónides, Licenciatura en gerontología, *clarin.com*. Imagen tomada de <http://quitcigar.blogspot.com.es/2008/12/whats-in-cigarette.html>.

- Aminoración de los sentidos, entre los que se incluyen pérdida progresiva de la capacidad visual, que conduce a situaciones como presbicia, miopía, cataratas; pérdida paulatina de audición (hipoacusia); pérdida gradual del sentido del gusto.
- Pérdida de la elasticidad y de la fuerza muscular.
- Distensión creciente de los tejidos que actúan como sostén muscular, debido al efecto de la gravedad terrestre.
- Disminución del colágeno de la piel y de la absorción de proteínas. Aparición de arrugas.
- Degeneración de las estructuras óseas, por la pérdida de calcio y otros minerales, especialmente en las mujeres tras la menopausia. Aparición de

deformaciones debido a osteoporosis, artritis reumatoides. La columna vertebral se debilita y se curva, pudiendo haber una pérdida de altura de hasta unos 8 cm.

- Aumento de la hipertensión arterial. Arterias más gruesas y menos elásticas.
- Pérdida de la capacidad de respuesta frente a agentes contagiosos.
- Pérdida de células nerviosas, lo que se traduce en una disminución de la eficiencia de la transmisión nerviosa, afectando a la coordinación y al tiempo de respuesta. Estos cambios también pueden llevar a la alteración del sueño.
- Aparición de demencias seniles.
- A nivel molecular aparece un acortamiento de los telómeros, alteración en la reparación del ADN y pérdida de la capacidad regenerativa.

El proceso de envejecimiento provoca que la función de muchos órganos del cuerpo se vea disminuida, incluyendo el cerebro. El envejecimiento fisiológico del cerebro se manifiesta en el ser humano por un **deterioro cognitivo** lento y progresivo, asociado a la pérdida de la capacidad para procesar nueva información. Sin embargo, este proceso no se atribuye a una pérdida significativa de neuronas, sino a alteraciones en las sinapsis y en la plasticidad sináptica (Gallagher, Landfield et al. 1996). Además del deterioro cognitivo, puede existir un proceso patológico asociado al envejecimiento del cerebro (**neurodegeneración**) y que sí conlleva pérdida neuronal. Patologías como la Enfermedad de Alzheimer o la Enfermedad de Parkinson son mucho más frecuentes en la vejez, y pese a que antes se pensaba que eran propias del envejecimiento, en la actualidad se sabe que son enfermedades.

A nivel celular, a medida que envejecemos, las neuronas presentan mayor estrés oxidativo. Se ha visto que los niveles de proteínas, ADN y lípidos dañados por oxidación aumentan en la edad avanzada en muchas regiones cerebrales de humanos y roedores (Floyd y Carney 1992). Además, algunos estudios han mostrado un elevado nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) en tejidos de cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la Enfermedad de Alzheimer (EA), Enfermedad de Parkinson (EP) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (Andersen 2004). Por otra parte, durante el

envejecimiento existe un declive progresivo de la función mitocondrial, de forma que el metabolismo energético se ve alterado (Toescu, Myronova et al. 2000). De este modo, los niveles de ATP o de NADH, principales sustratos energéticos de las neuronas, se ven reducidos tanto en el deterioro cognitivo leve como en las enfermedades neurodegenerativas. Estos sustratos energéticos son particularmente críticos para la función y supervivencia de las neuronas, puesto que estas células necesitan consumir grandes cantidades de energía para restaurar rápidamente los gradientes iónicos tras la activación sináptica y la generación del potencial de acción. Es por ello que la función de las proteínas que controlan la excitabilidad de la membrana y la dinámica de la homeostasis de los iones intracelulares se ve comprometida.

1.2. Enfermedades Neurodegenerativas Asociadas al Envejecimiento

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen hoy en día un importante problema de salud. Uno de los factores responsables de la alta frecuencia de este tipo de demencias en la actualidad es el aumento de la longevidad de las sociedades avanzadas. Por ello, podemos decir que el principal factor de riesgo para este tipo de enfermedades es el envejecimiento. El envejecimiento no sólo hace que los pacientes sean más propensos a padecer enfermedades neurodegenerativas, sino que además perjudica a su propia capacidad de autorreparación. Ciertos factores genéticos o del medio ambiente pueden alterar los mecanismos del envejecimiento normal, contribuyendo a la patología de las enfermedades neurodegenerativas, aunque la etiología de estas enfermedades es en gran parte desconocida. Es importante distinguir entre el proceso de envejecimiento y las enfermedades asociadas al envejecimiento, porque si bien todas las personas envejecen, no todos los individuos padecen enfermedades asociadas a la edad. Sin embargo, el envejecimiento proporciona un entorno favorable para estas enfermedades (**Figura 2**).

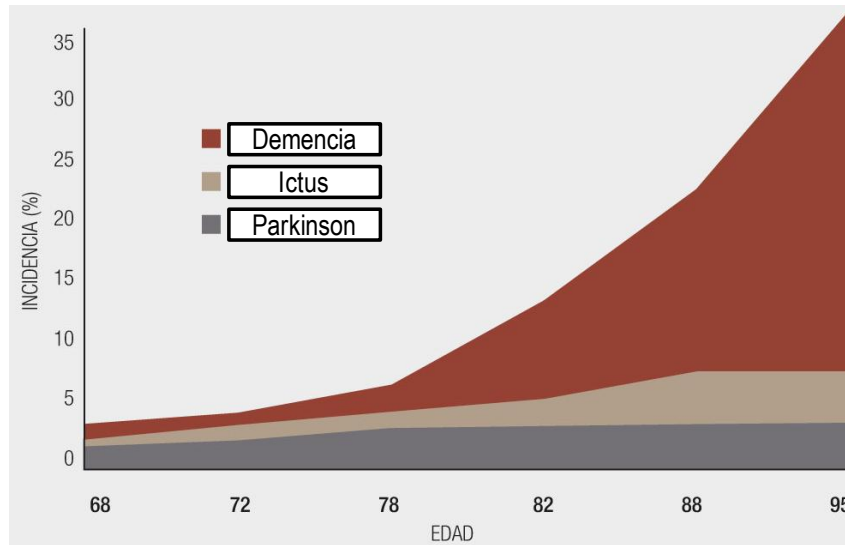


Figura 2. Incidencia de enfermedades neurodegenerativas con el envejecimiento. Tomado de Jesús Ávila, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM). *“El envejecimiento y la neurodegeneración”* (2010).

El concepto de neurodegeneración implica defectos en la neurona que pueden conducir a su muerte. Una de las características que distinguen a una neurona del resto de las células de un mamífero es su alto consumo energético. Es por ello que, como comentábamos anteriormente, el daño en la mitocondria, encargada de suministrar energía a la célula, puede promover enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, muchas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la acumulación de proteínas mal plegadas en el sistema nervioso central (SNC), que dan lugar al daño oxidativo e inflamatorio que concluye con la muerte neuronal. Esto incluye agregados del péptido β -amiloide (placas) y la proteína fosforilada tau (ovillos) en la EA, α -sinucleína (cuerpos de Lewy) en la Enfermedad de Parkinson (EP), superóxido dismutasa en la ELA o huntingtina mutante en la Enfermedad de Huntington (EH). Sin embargo, esta visión simplista de que un agregado proteico por sí sólo de lugar a una enfermedad determinada está aún bajo debate.

Las enfermedades neurodegenerativas son muy heterogéneas en cuanto a sus síntomas y sus características anatomopatológicas. Cabe decir que no todas las neuronas son iguales. Esto implica una diferente sensibilidad a los distintos tipos de daño que pueden aparecer en cada una de las enfermedades neurodegenerativas. Así, en la EP, regiones como la sustancia negra o el cuerpo estriado son particularmente sensibles a la neurodegeneración. El estriado también degenera en la EH, mientras que en la EA las regiones sensibles al daño son el hipocampo o la corteza. En parte de este trabajo nos hemos centrado la EA como una de las principales enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, por lo que a continuación se describen sus características principales.

2. La Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA es el desorden neurodegenerativo más comúnmente relacionado con la edad. Se trata de una demencia progresiva e irreversible. Los síntomas clínicos que presenta son un deterioro progresivo de las habilidades cognitivas, especialmente aquellas relacionadas con la memoria y el aprendizaje, trastorno del lenguaje y alteraciones del comportamiento. Inicialmente aparecen pequeñas perturbaciones en la memoria autobiográfica y desorientaciones espaciales. Con el transcurso de la enfermedad, se van sumando deficiencias en la atención, el lenguaje, la orientación visuo-espacial, el pensamiento abstracto y el juicio. Puede extenderse por aproximadamente diez años. Finalmente, la muerte se da por patologías asociadas y no por la propia enfermedad.

Esta enfermedad constituye aproximadamente el 70% de los casos de demencia. La EA afecta actualmente a 30 millones de personas en todo el mundo, y en países industrializados alcanza hasta a un 2% de la población. El riesgo de padecer la EA aumenta dramáticamente con la edad, especialmente en individuos de

más de 70 años. Se prevé que la incidencia de la EA se triplique en los próximos 50 años debido al aumento de la esperanza de vida.

La EA fue descrita por primera vez en 1907, cuando Alois Alzheimer comunicó dos alteraciones patológicas *post-mortem* en el cerebro de una mujer que sufría demencia. Describió una sustancia "peculiar" que aparecía como depósitos extracelulares en zonas específicas del cerebro, conocidos actualmente como placas amiloides (**Figura 3 A**). Desde 1980 se sabe que estas placas consisten principalmente en agregados de un pequeño péptido llamado amiloide β ($A\beta$). La segunda lesión descrita por Alzheimer fueron los ovillos neurofibrilares, que aparecen en zonas intraneuronales (**Figura 3 B**). A finales de los 80, se esclareció que los ovillos están compuestos por agregados de la proteína tau, que aparece anormalmente hiperfosforilada. Ambas alteraciones también se encuentran en el envejecimiento normal, aunque en menor cantidad y con otra distribución en el cerebro.

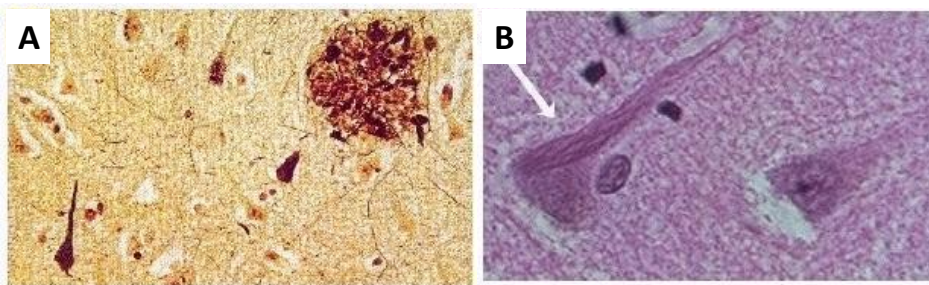


Figura 3. Estructuras anómalas de la Enfermedad de Alzheimer. A. Placa amiloide en el hipocampo de un paciente con Alzheimer. Las placas contienen proteína amiloide (anormal) y acetilcolinesterasa. Las estructuras oscuras y triangulares son neuronas en degeneración, que presentan ovillos neurofibrilares. **B.** Ovillos neurofibrilares en el interior de una neurona. Se aprecian como una acumulación de filamentos en el citoplasma. Tomado de *Daniel Rodríguez-Ithurralde y Silvia Olivera; Enfermedad de Alzheimer: preocupación de todos, 2000; <http://iibce.edu.uy/neuromol/AlzheiPosdata.html>*.

Sin embargo, éstos no son los únicos signos patológicos que aparecen en el cerebro de pacientes con EA, sino que otras alteraciones estructurales y funcionales

son evidentes, como es la presencia de procesos inflamatorios y el estrés oxidativo. La combinación de estos cambios patológicos junto con los efectos de A β y tau, conlleva disfunción sináptica y pérdida neuronal, hasta el punto que *post mortem*, el cerebro de una persona con EA puede pesar un tercio menos que el cerebro de un individuo de similares características (**Figura 4**).

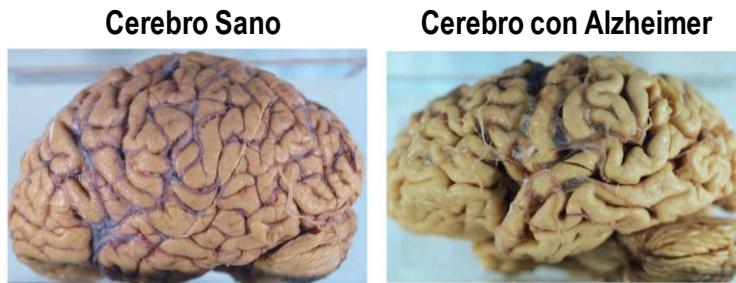


Figura 4. Comparación de dos cerebros humanos, procedentes de un individuo control y un individuo que padeció la Enfermedad de Alzheimer. La imagen muestra un cerebro humano sano (izquierda) y el cerebro de una persona con EA (derecha). Foto obtenida de *Foundation For Biomedical Research*.

Placas y ovillos están presentes en regiones del cerebro implicadas en procesos de aprendizaje y memoria y en el comportamiento emocional, como son la corteza entorrinal, hipocampo, corteza frontal, encéfalo basal y amígdala (Mattson y Chan 2003). Aquellas zonas del cerebro con placas amiloides presentan un número reducido de sinapsis, y las neuritas asociadas a estas placas están dañadas, lo que sugiere que el A β daña las sinapsis y las neuritas. Así mismo, se ha visto que las neuronas que emplean glutamato o acetilcolina como neurotransmisor están particularmente afectadas.

Factores de riesgo en la EA

Existen dos formas diferentes de EA, iniciadas por diferentes causas, aunque ambas presentan placas amiloides y ovillos neurofibrilares:

Enfermedad De Alzheimer Esporádica: es la que ocurre en la mayoría de los casos (90%), y requiere avanzada edad. Se caracteriza por una disminución severa y progresiva de las capacidades cognitivas, y un aumento de la muerte neuronal. El origen de la acumulación de A β en la EA esporádica no se conoce aún, aunque ciertas hipótesis proponen una alteración del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP, del inglés *amyloid precursor protein*), una desactivación anormal de α -secretasa y activación de β -secretasa, una modulación anormal de γ -secretasa, o una actividad reducida de las enzimas degradadoras de A β , lo que causaría un aumento de la producción de A β_{1-42} (Hardy y Selkoe 2002, Nathalie y Jean-Noel 2008). Es más, las causas que llevan al procesamiento alterado de APP en la EA esporádica no están claras, aunque se cree que ciertos cambios en la dinámica del Ca²⁺ intracelular podrían estar implicados (Green, Smith et al. 2007).

Enfermedad De Alzheimer Familiar: este tipo de EA se desarrolla mucho más rápido que la esporádica y se considera hereditaria o de origen familiar. En este caso, los síntomas aparecen antes de la sexta década de vida. La EA familiar está causada por mutaciones raras en los componentes de la vía amiloidogénica, como son APP, ApoE4 o las presenilinas 1 ó 2 (PS1 y PS2), que forman parte del complejo de la γ -secretasa. Diversos estudios sugieren la existencia de genes que no transmiten la enfermedad, pero podrían influenciar la susceptibilidad de padecer EA. Éste es el caso de la apolipoproteína E (ApoE), que aumenta la degradación del A β , protegiendo así a las neuronas de la toxicidad que éste causa. El gen *APOE* codifica para tres isoformas (E2 - 4) que modulan la producción de A β y su recaptación celular. Se ha visto que el riesgo de padecer EA aumenta en los individuos que heredan la isoforma E4. El mecanismo por el que E4 aumenta la susceptibilidad a la EA no ha sido aún elucidado, pero parece que E4 aumenta la capacidad de agregación de A β y reduce su eliminación (Roses 1997). Otros genes asociados a la EA son *SORL1*, que codifica para un receptor de ApoE (Rogaeva, Meng et al. 2007); o *CALHM1*, un gen que codifica para una proteína transmembrana que afecta a los niveles de Ca²⁺ y a la producción de A β (Dreses-Werringloer, Lambert et al. 2008). La edad y la presencia de ciertos polimorfismos genéticos son los factores de riesgo más

importantes. Sin embargo, como en otras enfermedades asociadas al envejecimiento, se han descrito factores adicionales que se han relacionado con la probabilidad de padecer EA. Entre ellos encontramos un bajo nivel de educación, haber padecido un traumatismo craneal, consumir una dieta hipercalórica o alta en grasa o incluso llevar un estilo de vida sedentario (Mayeux 2003).

Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

Todos los fármacos aprobados actualmente están dirigidos a los síntomas y a mejorar la calidad de vida, pero ninguno modifica la progresión de la enfermedad. Hasta la fecha, la FDA (*Food and Drug Administration de los EEUU*) sólo ha aprobado cinco medicamentos para el tratamiento de la EA (**Tabla 1**), incluyendo inhibidores de la acetilcolinesterasa (donepezil) y antagonistas del receptor NMDA (memantina). Éstos amortiguan la pérdida de la función cognitiva al aumentar los niveles de acetilcolina (inhiben su degradación) o al bloquear con baja afinidad el receptor glutamatérgico tipo NMDA respectivamente. Los primeros son suministrados en estadios tempranos o medios de la enfermedad, y los segundos en estados más avanzados.

MEDICAMENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER			
Tipo de fármaco	Medicamento	Uso	Observaciones
Inhibidores de la acetilcolinesterasa	Tacrina	Leve - moderado	Retirado del mercado
	Donepezil	Leve - moderado	También para uso severo desde 2006
	Galantamina	Leve - moderado	
	Rivastigmina	Leve - moderado	
Moduladores de receptores glutamatérgicos	Memantina	Moderado - severo	

Tabla 1. Medicamentos aprobados para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer.

Muchos de los fármacos en desarrollo tienen como diana sitios específicos de la cascada neurodegenerativa. Ejemplo de ello son el desarrollo de fármacos que bloquean las β - y γ - secretasas (Schmidt, Baumann et al. 2006), que impiden la producción de formas neurotóxicas de A β a partir de su proteína precursora APP; o inhibidores de la fosforilación de la proteína tau. Una aproximación alternativa es la creación de agentes quelantes de hierro y cobre, dado que la agregación de A β depende de ambos (Ritchie, Bush et al. 2003). Otras vías de investigación incluyen fármacos anti-inflamatorios, como los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) (Hoozemans, Veerhuis et al. 2003) (Ver apartado 6.1.2), o el uso de estatinas, debido a la relación establecida recientemente entre la EA y los niveles de colesterol (Li, Larson et al. 2007). Finalmente, la inmunoterapia anti-amiloide, consistente en el uso de anticuerpos específicos frente a A β para el tratamiento de esta enfermedad, ha despertado un gran interés, tras conocerse que éstos son capaces de disolver agregados de A β y prevenir su formación *in vitro* (Solomon, Koppel et al. 1996). Aún así, el estudio clínico más avanzado para tratar la EA mediante vacunación pasiva, concretamente con el anticuerpo bapineuzumab, se detuvo en el año 2012 cuando se encontraba en su última fase, debido a los efectos adversos que producía. Se cree que esta toxicidad fue debida al empleo de anticuerpos completos, que activaron la inflamación en el cerebro, por lo que actualmente se está evaluando la administración de fragmentos de anticuerpos, que se espera que sea mucho más segura.

2.1. Hipótesis sobre el Origen de la Enfermedad de Alzheimer

La causa directa por la que se produce la EA es aún desconocida. En los últimos años, se han descrito algunos cambios a nivel molecular que se producen en la EA, por lo que se han postulado varias hipótesis que intentan explicar el origen de la enfermedad. Estas hipótesis proponen que el origen de la Enfermedad de Alzheimer se debe bien a la neurotoxicidad y acumulación que produce el péptido β amiloide, conocida como la Hipótesis de la Cascada Amiloide, que es la más

aceptada en la actualidad; bien a alteraciones en la proteína tau o bien a la deficiencia del neurotransmisor acetilcolina.

2.1.1. Hipótesis de la Cascada Amiloide

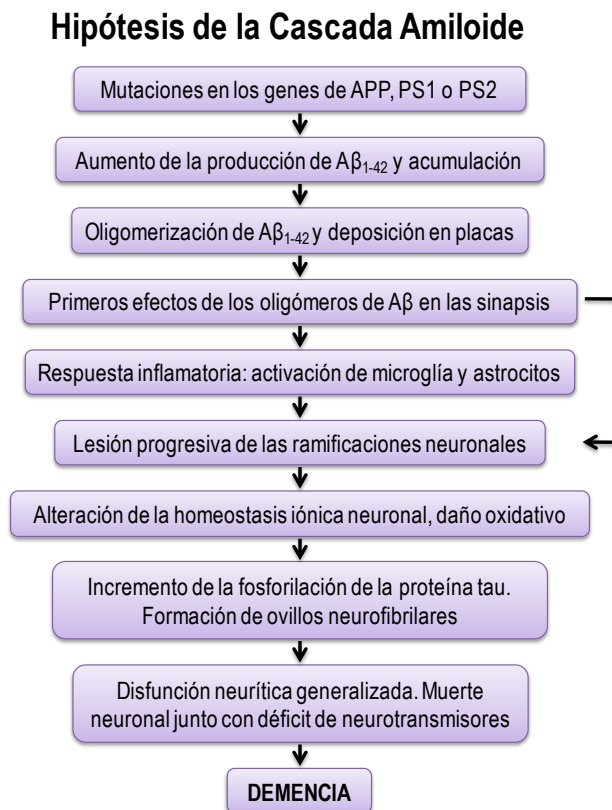


Figura 5. Hipótesis de la cascada amiloide en la EA. En la EA, diferentes mutaciones de los genes que participan en la vía amiloide inducen la producción y acumulación excesiva de $A\beta_{1-42}$ en el cerebro. Esto conlleva una serie de alteraciones como inflamación, dishomeostasis iónica, daño oxidativo, aumento de tau y, en último término, neurodegeneración y demencia. Basado en *Hardy y Selkoe 2002*.

La Hipótesis de la Cascada Amiloide (**Figura 5**) considera que la EA está causada por un procesamiento anormal del $A\beta$ (Hardy y Selkoe 2002), debido a una reducción de su aclaramiento o a un aumento de su producción. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que mutaciones en algunos componentes de la vía amiloide

(como APP, ApoE4, PS1 y PS2, y SORL1) provocan la EA familiar, lo que proporciona por tanto una gran evidencia de que la EA se debe a la formación y acúmulo de A β .

a) Procesamiento de APP y Formación de A β

El péptido amiloide deriva de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP), codificada en el cromosoma 21. Se trata de una proteína transmembrana constituida por unos 695-770 aminoácidos. El dominio de A β se localiza en la superficie exterior celular, con parte del péptido incrustado en la membrana. Posee las características de un receptor de superficie celular y se expresa en muchos tejidos, especialmente en las sinapsis. Aunque su función principal no está del todo clara, se cree que está implicada en la regulación de la supervivencia neuronal, crecimiento de neuritas, el tráfico de proteínas a lo largo del axón, plasticidad sináptica y adhesión celular (Zhang, Thompson et al. 2011). La APP se transporta por los axones hacia las terminales presinápticas de las neuronas, donde se acumula en altos niveles, pudiendo dar lugar a la deposición de A β en las sinapsis (Lazarov, Lee et al. 2002).

En su procesamiento, APP sufre cortes realizados por diferentes complejos enzimáticos llamados alfa (α -), beta (β -) o gamma (γ -) secretasas, enzimas proteolíticas encargadas de fragmentar APP en su región transmembrana. APP puede ser procesado por dos vías principales (**Figura 6**):

Vía No Amiloidogénica: La mayor parte de APP es procesada por esta vía. La primera escisión de APP está mediada por la α -secretasa. El corte por esta enzima sucede en el dominio de A β , por lo que se evita la generación y liberación del péptido. Este corte da lugar a dos fragmentos, (1) un gran ectodominio N-terminal (sAPP α), que es secretado al medio extracelular y (2) un pequeño fragmento carboxiterminal (C83), que se mantiene retenido en la membrana. C83 puede sufrir otra escisión por la γ -secretasa, generando el fragmento p3. La γ -secretasa es un complejo enzimático

formado por presenilinas PS1 o PS2 junto con nicastrina, Aph-1 y Pen-2 (Aisen, Schafer et al. 2003), proteínas en su mayoría asociadas con el retículo endoplásmico. APP también puede asociarse a ciertos receptores, como SORL1, y ser internalizada de nuevo para ser reciclada y volver a la membrana (Rogaeva, Meng et al. 2007).

El procesamiento de APP por la α -secretasa se considera una vía protectora en la EA, dado que las enzimas cortan en la secuencia del A β , evitando su producción. Además, sAPP α parece aumentar la resistencia de las neuronas al daño metabólico y oxidativo (Mattson 1997).

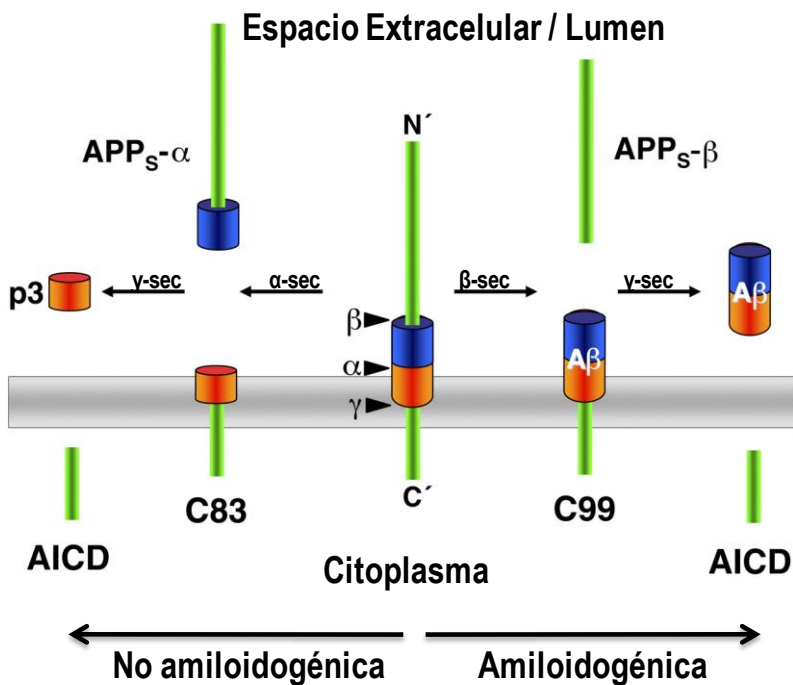


Figura 6. Vías de Procesamiento de APP. En la vía No Amiloidogénica, la escisión de APP se produce por la α -secretasa en el dominio de A β , produciendo el fragmento sAPP α , que es secretado, evitando así la amiloidogénesis. El posterior corte del fragmento C83 por la γ -secretasa produce el péptido P3, considerado no amiloidogénico. Si por el contrario es la β -secretasa quien realiza el corte, siguiendo la vía Amiloidogénica, se libera un fragmento menor (sAPP β). El fragmento que queda anclado a la membrana, C99, es escindido a continuación por la γ -secretasa, produciendo el péptido A β de 40 ó 42 aminoácidos. El corte por la γ -secretasa libera además el dominio intracelular de APP (AICD, APP intracellular domain), que puede participar en la señalización nuclear. Modificado de Kaether y Haass (Kaether y Haass 2004).

Vía Amiloidogénica: Las moléculas de APP que no son procesadas por la vía no amiloidogénica siguen esta ruta, que es la que conlleva a la generación del péptido A β . La proteólisis inicial es llevada a cabo por la β -secretasa, también conocida como BACE1 (*β -site APP-cleaving enzyme 1*), de forma que se libera un ectodominio al espacio extracelular, conocido como sAPP β . El corte se realiza a 99 aminoácidos de la posición C-terminal, por lo que el fragmento restante, conocido como C99, queda retenido en la membrana. El primer aminoácido de C99 es el primer aminoácido de A β . C99 es posteriormente escindido 38-43 aminoácidos desde el extremo N-terminal por la γ -secretasa, liberando así A β . Este corte puede producir varios péptidos de A β de diferente tamaño, desde A β_{1-38} hasta A β_{1-43} . La forma predominante es A β_{1-40} , mientras que A β_{1-42} representa sólo un 10%. Sin embargo, A β_{1-42} es más hidrofóbico y muestra mayor tendencia a formar agregados que A β_{1-40} , por lo que es esta isoforma la predominante en las placas amiloides (Younkin 1998). A β_{1-42} es considerado el fragmento más neurotóxico. El fragmento restante de C99 se conoce como AICD (*APP Intracellular Domain*), y puede actuar como factor de transcripción.

b) Estados de Agregación de A β_{1-42}

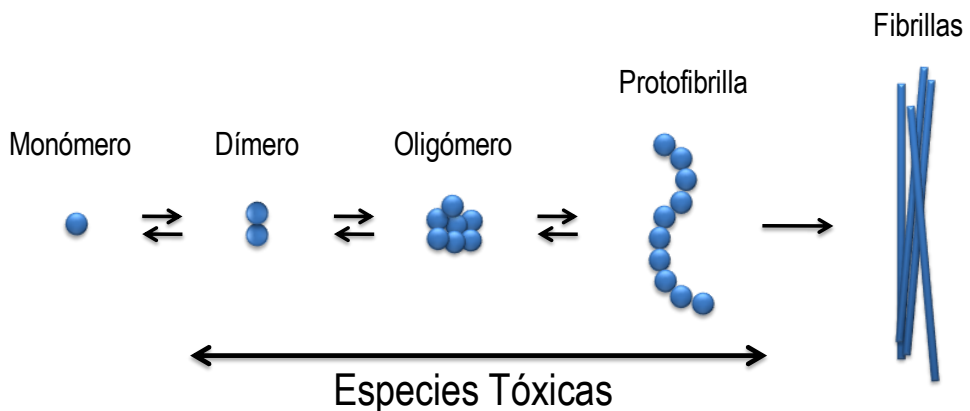


Figura 7. Esquema de agregación del péptido β -amiloides. El esquema muestra el proceso de agregación del $A\beta_{1-42}$ desde el estado monomérico hasta una fibrilla madura, pasando por estados intermedios oligoméricos tóxicos. Modificado de Kumar S et al. 2011 (Kumar, Rezaei-Ghaleh et al. 2011).

Se cree que el péptido o proteína β -amiloide posee importantes funciones en procesos fisiológicos como la supervivencia neuronal y actividad sináptica, además de estar presente en el cerebro y fluido cerebro espinal de los humanos a lo largo de su vida (Walsh, Tseng et al. 2000). Por ello, la presencia de $A\beta$ no causa neurodegeneración, sino que ésta parece ser el resultado de un desequilibrio entre su producción y su degradación (Pearson y Peers 2006); además de tener importancia la cantidad de $A\beta_{1-42}$ formado, puesto que esta forma es más propensa a oligomerizar y formar fibrillas amiloides que el $A\beta_{1-40}$ (Burdick, Soreghan et al. 1992).

El mecanismo exacto por el que el $A\beta_{1-42}$ resulta tóxico aún no ha sido esclarecido. Los primeros estudios sobre el péptido amiloide no se centraron en la configuración exacta del péptido $A\beta_{1-42}$, es decir, si era un monómero, si formaba oligómeros de distinto tamaño o fibrillas. Pero estudios más recientes han demostrado que ésta es una importante distinción, ya que gran parte de la controversia sobre los mecanismos de neurotoxicidad se debe al hecho de que la toxicidad inducida por el $A\beta_{1-42}$ depende de su estado de agregación (Klein, Stine et al. 2004). Parece que los depósitos extracelulares de $A\beta_{1-42}$ son más bien una consecuencia de la patología, en la que el péptido $A\beta_{1-42}$ participa activamente de su fibrillogénesis y formación. De hecho, se ha propuesto que los oligómeros solubles son la toxina neuronal más probable en la EA (Kayed, Head et al. 2003). Así, oligómeros y protofibrillas se acumulan en las sinapsis neuronales, actuando como potentes bloqueadores de la potenciación a largo plazo (LTP, *long-term potentiation*), una forma de plasticidad sináptica (Walsh, Klyubin et al. 2002).

Se sabe que, una vez liberado en forma de monómero, el $A\beta_{1-42}$ sufre cambios conformacionales, pudiendo agregarse de múltiples formas, desde dímeros y trímeros u oligómeros (hasta 24 unidades), hasta cortas protofibrillas flexibles y largas fibrillas rígidas, que son las que conforman las placas amiloides (**Figura 7**). En estado monomérico, el $A\beta_{1-42}$ no es neurotóxico. Por el contrario, $A\beta_{1-42}$ resulta más tóxico cuando se encuentra en estados tempranos de agregación, es decir, en forma de oligómeros solubles (Kayed, Head et al. 2003). Las condiciones que favorecen la formación de una u otra forma no se conocen, pero sí se sabe que ciertos factores

podrían favorecer la formación de oligómeros solubles, como una alta concentración del péptido, pH ácido (Burdick, Soreghan et al. 1992), la presencia de iones metálicos como hierro, zinc y aluminio (Mantyh, Ghilardi et al. 1993) y el estrés oxidativo (Walsh, Tseng et al. 2000).

c) Mecanismos de Toxicidad del Péptido Amiloide

Mientras que los mecanismos bioquímicos responsables de la acumulación de A β se conocen bastante bien, aún no está claro cómo esto conlleva a la neurodegeneración y muerte celular que caracteriza la EA. La hipótesis del Ca²⁺ en la EA parece ser un mecanismo importante que une el metabolismo amiloide con la disfunción neuronal y la degeneración (ver sección 4.2). Además, se ha visto que las células de pacientes con EA presentan cantidades elevadas de proteínas, lípidos y ADN modificados por mecanismos oxidativos, de forma que el daño mediado por radicales destaca en las neuronas que contienen placas u ovillos neurofibrilares. Esto sugiere un papel del A β en el estrés oxidativo que sufren las neuronas (Butterfield, Drake et al. 2001).

Por otra parte, las células de la microglía, similares a los macrófagos, juegan un papel importante en la respuesta del cerebro al daño e infección. En la EA, la microglía activada se agrupa alrededor de las placas amiloides y neuronas en proceso degenerativo, produciendo toxinas y citoquinas inflamatorias que contribuyen al proceso neurodegenerativo (McGeer y McGeer 2002).

2.1.2. Hipótesis de la Proteína Tau

Los ovillos neurofibrilares (NFT, del inglés *Neurofibrillary Tangles*) son la principal anomalía del citoesqueleto en la EA. Los NFTs consisten en agregados fibrilares de la proteína tau, que aparece anormalmente hiperfosforilada, en el interior de las células. En condiciones normales, tau se localiza en los axones, donde se

encarga de estabilizar los microtúbulos en un estado polimerizado, gracias a la interacción con la tubulina. Pero en la EA, tau se fosforila en múltiples sitios, se disocia de los microtúbulos provocando su despolimerización y se acumula en los cuerpos celulares, formando los NFTs (**Figura 8**). La pérdida de la función normal de tau, en combinación con el aumento de su toxicidad, compromete al transporte axonal y contribuye a la degeneración sináptica.

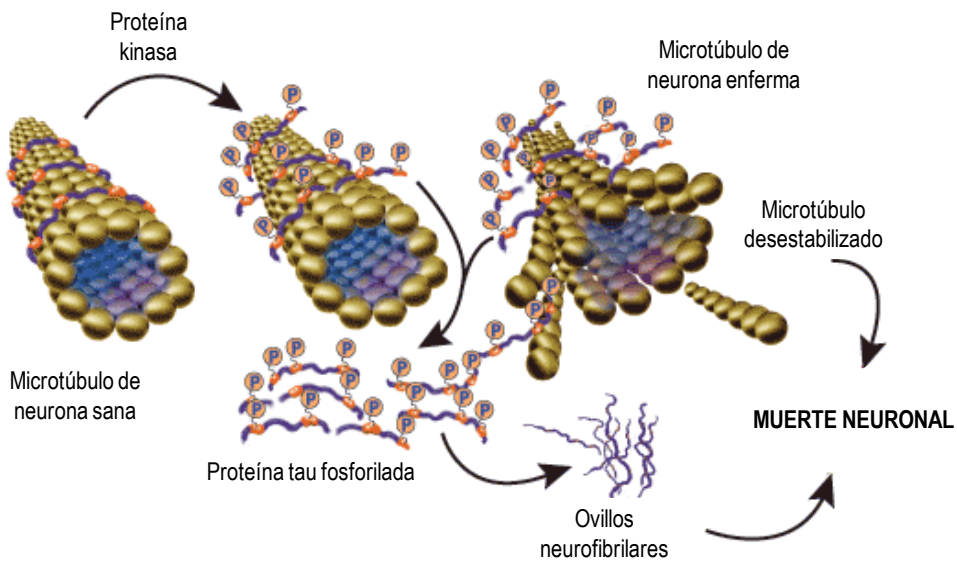


Figura 8. Esquema de la patología de la proteína tau en la Enfermedad de Alzheimer. Modificado de http://www.nottingham.ac.uk/~mbzmail/ntm3/tess_alzheimers/tangles.html.

El desarrollo de una taupatía o acumulación de formas insolubles e hiperfosforiladas de la proteína tau y su posible relación con EA fue descrito inicialmente por Braak (Braak y Braak 1991). La Hipótesis de la Proteína Tau está basada en que los NFTs parecen formarse antes que la placa amiloide, correlacionándose éstos de una forma más estrecha que las placas amiloides con la progresión de la enfermedad.

2.1.3. Hipótesis Colinérgica

En 1974, Drachman y Leavitt sugirieron que la memoria estaba relacionada con el sistema colinérgico de una forma dependiente de la edad (Drachman y Leavitt 1974), propiedad que todavía se considera cierta en la actualidad. En la misma época, dos grupos británicos demostraron de forma independiente que la patología de la EA estaba asociada a una pérdida severa de las neuronas centrales colinérgicas. Concretamente, propusieron que el nivel de gravedad de la EA se correlacionaba con el volumen de pérdida de neuronas colinérgicas en los núcleos basales de Meynert (Bowen, Smith et al. 1976, Davies y Maloney 1976). Por tanto, la EA se consideró entonces como una enfermedad colinérgica.

En condiciones fisiológicas, la acetilcolina (ACh), implicada en la actividad cortical, es sintetizada en el interior de la neurona a partir de colina por la acción de la enzima colina acetiltransferasa. Una vez sintetizada, la ACh se almacena en vesículas en el interior de la neurona presináptica. Cuando se produce el impulso nervioso, la ACh es liberada al espacio intersináptico, donde interacciona con receptores colinérgicos de la neurona postsináptica. En el espacio intersináptico se encuentra la acetilcolinesterasa, una enzima que degrada la ACh y por tanto contribuye a regular los niveles del neurotransmisor (**Figura 9**). En muestras patológicas de corteza e hipocampo de pacientes de EA, se observó que la actividad de la colina acetiltransferasa implicada en la síntesis de la ACh estaba disminuida notablemente, por lo que la concentración de ACh decrecía en estas regiones.

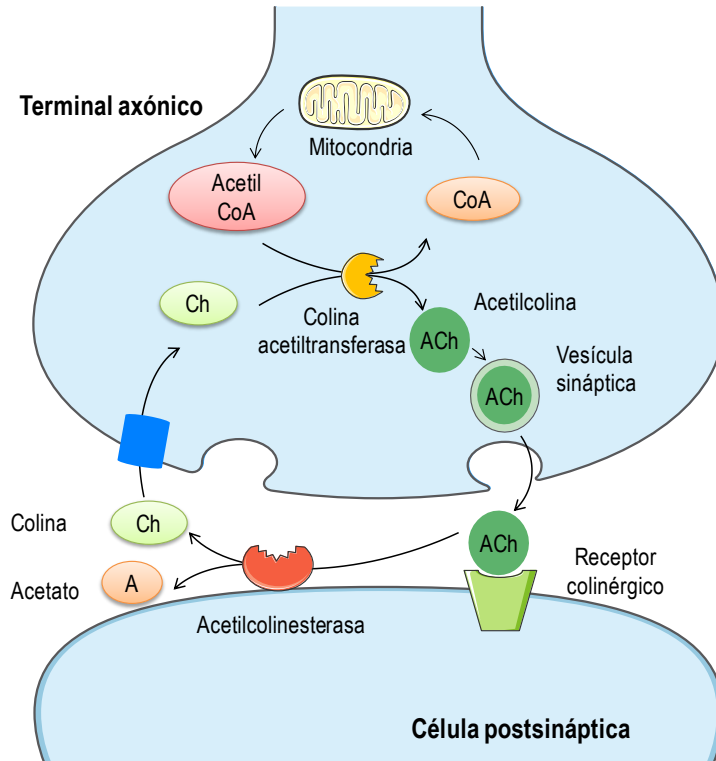


Figura 9. Esquema de la síntesis y degradación de la ACh. La acetilcolina se sintetiza a partir de colina y acetilCoA. Tras un impulso nervioso la acetilcolina se libera al espacio sináptico, donde puede actuar sobre receptores, o puede ser hidrolizada por la acetilcolinesterasa convirtiéndose en colina. La colina puede ser transportada de nuevo al terminal axónico y ser empleado para formar más acetilcolina. Imagen basada en *La vida es ciencia, "querida abuela, ¿me recuerdas?"*; <https://yoli711993.wordpress.com/>.

La Hipótesis Colinérgica de la EA plantea que la degeneración de las neuronas colinérgicas en el encéfalo basal, y la pérdida de la transmisión colinérgica en la corteza cerebral y otras áreas contribuye significativamente al deterioro de la función cognitiva apreciada en los pacientes de EA. Sin embargo, aún es tema de debate si la pérdida y degeneración de las terminales colinérgicas son eventos primarios o secundarios a la patología del β amiloide. Se ha propuesto que la neurotransmisión colinérgica es una diana específica del $A\beta$, dado que se ha mostrado que la presencia de $A\beta$ reduce la captación de ACh así como su liberación *in vitro* (Auld, Kar et al. 1998).

3. Homeostasis del Calcio Intracelular en la Neurona

Las neuronas son células excitables que transfieren señales electroquímicas de una forma espacio-temporal altamente rápida y controlada. El principal mensajero intracelular que participa en muchas de las respuestas fisiológicas a la estimulación química y eléctrica de las neuronas es el catión Ca^{2+} (Mattson 2007), un segundo mensajero que no se crea ni se destruye en el interior celular, sino que se transporta a través de canales y otros sistemas de transporte específicos. Así el estudio del Ca^{2+} intracelular es el estudio de sus sistemas de transporte.. La versatilidad y efectividad de las señales de Ca^{2+} , producidas a gran velocidad, es posible gracias a la diferencia (de hasta 20.000 veces) del gradiente existente entre las bajas concentraciones de Ca^{2+} libre intracelular (50 - 100 nM) y la alta concentración de Ca^{2+} extracelular en el estado de reposo (orden de mM). Este gradiente se mantiene gracias a los sistemas de transporte de Ca^{2+} de la membrana capaces de retirar el Ca^{2+} del citosol hacia el medio extracelular, así como a las proteínas que tamponan Ca^{2+} en el interior celular. A pesar de este gradiente, la membrana plasmática es prácticamente impermeable a Ca^{2+} . La entrada se produce a través de diferentes tipos de canales localizados en ella, y aunque estos canales permanecen abiertos durante periodos de tiempo muy breves, la cantidad de Ca^{2+} que entra a través de ellos es suficiente como para provocar cambios significativos en la concentración de Ca^{2+} citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$), especialmente en las bocas de los canales, donde se producen microdominios de alta $[\text{Ca}^{2+}]$ (Rizzuto y Pozzan 2006).

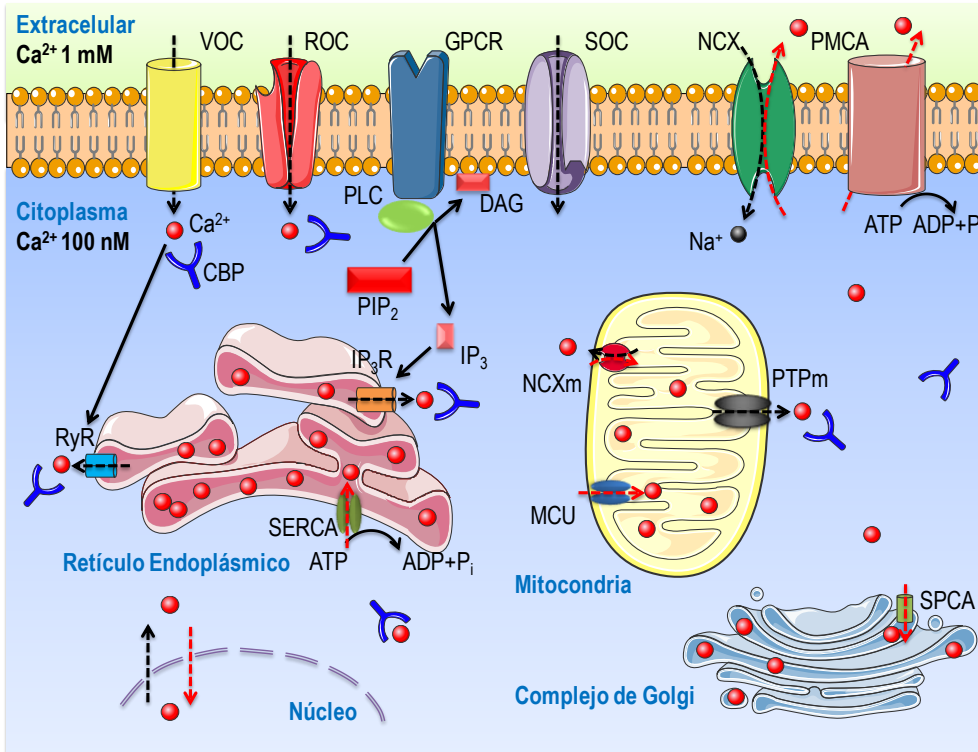


Figura 10. Esquema general de la homeostasis del Ca²⁺ en una neurona. Modelo que representa diferentes fuentes de Ca²⁺, mecanismos de extrusión y tamponadores en una neurona en condiciones fisiológicas. Se indican los canales de Ca²⁺ operados por voltaje (VOCs), canales de Ca²⁺ operados por receptor (ROC), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y canales de Ca²⁺ operados por depósitos (SOCs) que participan en la entrada de Ca²⁺ (bolitas rojas) al citosol (flechas punteadas negras). La liberación de Ca²⁺ al citosol también ocurre desde los depósitos intracelulares de Ca²⁺, a través de los receptores de ionoltrifosfato (IP₃R) y los receptores de rianodina (RyR). Los orgánulos, incluyendo el retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria, actúan como tampones de Ca²⁺, liberando y secuestrando Ca²⁺. En el modelo también aparecen los sistemas de extrusión de Ca²⁺ (flechas rojas punteadas), que incluyen el intercambiador de Na⁺/Ca²⁺ (NCX) y la ATPasa de Ca²⁺ de la membrana plasmática (PMCA), la ATPasa de Ca²⁺ del RE (SERCA), y proteínas que unen Ca²⁺ (CBP). El uniportador de Ca²⁺ mitocondrial (MCU), el poro de transición mitocondrial (PTPm) y el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial (NCXm) también contribuyen a la homeostasis del Ca²⁺. Basado en *Kumar et al 2009* (Kumar, Bodhinathan et al. 2009).

La actividad neuronal está regulada por aumentos de la $[Ca^{2+}]_{cit}$, producido por la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática o por la liberación de éste desde los depósitos intracelulares. La señal de Ca^{2+} neuronal incluye un complejo intercambio de este ión a través de canales de Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática, como los canales dependientes de voltaje o canales operados por ligando, así como la liberación de Ca^{2+} desde almacenes o depósitos intracelulares. Además de los canales, existen otros sistemas de transporte que retiran el Ca^{2+} del citosol, bien al exterior celular o bien al interior de orgánulos, para mantener los gradientes de Ca^{2+} . En la **Figura 10** se pueden apreciar los principales mecanismos que participan en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} .

La señal de Ca^{2+} neuronal se produce en respuesta a diferentes estímulos, como pueden ser la despolarización de la membrana, agentes nocivos, agonistas extracelulares, mensajeros intracelulares o el vaciamiento de depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Las neuronas emplean el influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y entre los compartimentos intracelulares para una gran variedad de funciones, como pueden ser liberación de neurotransmisores, excitabilidad neuronal, plasticidad sináptica, expresión de genes o muerte celular programada entre otros (Berridge, Bootman et al. 2003). Debido a que el Ca^{2+} tiene un papel fundamental en importantes procesos para la naturaleza excitatoria de las neuronas, la homeostasis del Ca^{2+} está altamente regulada en estas células.

3.1. Entrada de Ca^{2+} a través de la Membrana Plasmática

La entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de la membrana plasmática está mediada por diversos tipos de canales de Ca^{2+} , que se describen brevemente a continuación:

3.1.1. Canales de Calcio Operados por Voltaje (VOCs)

La familia de canales VOCs (del inglés *Voltage Operated Calcium Channels*) transduce cambios en el potencial de membrana en aumentos de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ locales, puesto que se abren bruscamente cuando ésta es despolarizada, permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular al citosol. Esta entrada suele ser muy rápida debido al enorme gradiente electroquímico para este ión. La repolarización de la membrana produce el cierre de estos canales, y todos los VOCs presentan una inactivación dependiente del tiempo.

Estos canales están presentes en muchos tipos de células excitables, entre ellos las neuronas, puesto que desempeñan un papel importante en la generación y propagación del impulso nervioso, y participan en diversos procesos fisiológicos que requieren flujos rápidos de Ca^{2+} , como la secreción de neurotransmisores en las terminales sinápticas.

Los canales operados por voltaje están formados por un complejo de varias subunidades, en el que la subunidad α_1 forma el poro, y el resto de subunidades (α_2 , β_{1-4} , δ y γ) participan en su regulación. La combinación de las diferentes variantes de las subunidades da lugar a una gran diversidad de canales. Estos canales se dividen en tres subfamilias, Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 , según las propiedades de la subunidad α_1 .

La subfamilia **Ca_v1** conduce corrientes de Ca^{2+} tipo L. Están expresados entre otros tipos celulares en neuronas, donde regulan multitud de procesos como la secreción de neurotransmisores, la expresión de genes, la supervivencia celular, etc. Son canales de alto umbral, pues necesitan un alto voltaje para activarse, y poseen una inactivación lenta, de ahí su denominación L (del inglés "*long lasting*"). Los canales tipo L se bloquean selectivamente con algunas dihidropiridinas y otros antagonistas orgánicos como el verapamil y el diltiazem, pero no son sensibles ni a las conotoxinas ni a las agatoxinas (Olivera, Miljanich et al. 1994, Teramoto, Niidome et al. 1995).

La subfamilia **Ca_v2** conduce corrientes de Ca^{2+} tipo N, P/Q o R, y son también considerados canales de alto umbral. Se encuentran principalmente en el

sistema nervioso, y su función principal es participar en la transmisión sináptica. Los canales $Ca_v2.1$ conducen corrientes tipo P/Q. Parecen ser los VOCs más ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central de mamíferos. Se localizan preferentemente en los botones sinápticos. Los canales tipo P (llamados así por su descripción original en células de Purkinje), se inhiben por ω -agatoxina, pero son insensibles a dihidropiridinas y a las conotoxinas. Por su parte, los canales tipo Q están relacionados con la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central, y se inhiben por ω -agatoxina (Mintz, Adams et al. 1992). Los canales $Ca_v2.2$ conducen corrientes tipo N (por su origen neuronal), y son inhibidos mediante conotoxinas, pero no por agatoxinas (Teramoto, Niidome et al. 1995). Finalmente, los canales $Ca_v2.3$ conducen corrientes tipo R, denominados así por su carácter residual, sólo son sensibles a algunas conotoxinas y resistentes al resto de bloqueantes (Catterall 2000).

La subfamilia **Ca_v3** conduce corrientes de tipo T (transitorios), considerados de bajo umbral, pues se activan por pequeños cambios de voltaje y se inactivan rápidamente de forma dependiente de voltaje. Estos canales son insensibles a dihidropiridinas, a los antagonistas de Ca^{2+} orgánicos y a la mayoría de los inorgánicos. Por su baja conductancia y corto periodo de apertura, su función probablemente está relacionada más con el inicio del potencial de acción que con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

Todos los tipos de VOCs son muy selectivos para el Ca^{2+} respecto al Na^+ o al K^+ , e insensibles a los bloqueantes tradicionales de canales de Na^+ , como la tetrodotoxina. Los VOCs también pueden ser modulados por segundos mensajeros químicos, generalmente a través de procesos de fosforilación (Catterall 2000).

3.1.2. Canales de Calcio Operados por Receptor (ROCs)

Los canales de Ca^{2+} operados por receptor, ROCs (de sus siglas en inglés *Receptor Operated Calcium Channels*), se abren en respuesta a la unión de una

molécula específica (ligando) que se une a su dominio extracelular. La unión del ligando, como por ejemplo hormonas o neurotransmisores, provoca un cambio conformacional en la estructura del canal, causando la apertura de éste y la subsiguiente entrada de iones a través de la membrana plasmática. Estos canales pueden llevar a cabo la señalización mediante dos vías: (1) generando una despolarización de la membrana plasmática al ser permeables a iones Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{2+} , o (2) por la entrada de Ca^{2+} directamente a través del canal, que actúa en sí mismo como segundo mensajero.

El glutamato es uno de los neurotransmisores más abundantes e importantes del SNC. Realiza su acción excitadora actuando sobre receptores específicos localizados en la membrana plasmáticas neuronal. Hasta el momento se han identificado dos clases generales de receptores para el glutamato (**Figura 11**): los canales iónicos regulados por ligando, o receptores ionotrópicos, donde la unión del neurotransmisor con el receptor provoca la apertura del canal con el consiguiente paso de los iones; y los receptores metabotrópicos (mGluR), acoplados a proteínas G.

Se han caracterizado tres formas de receptores ionotrópicos de glutamato, que se denominan de acuerdo a la molécula agonista que los activa: los receptores NMDA, por el N-metil-D-aspartato, los receptores de tipo AMPA, por amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato y los receptores de tipo kainato, por el ácido kainico. Estos tres tipos de receptores forman canales catiónicos no selectivos, permeables tanto para el Na^+ como para el Ca^{2+} . La unión del glutamato sobre cualquiera de ellos provoca una despolarización de la membrana postsináptica, que puede activar los VOCs, además de la entrada de Ca^{2+} a través de este propio canal.

La unión de glutamato a los mGluR activa la fosfolipasa C (PLC), generando una cascada de segundos mensajeros que, o bien abren canales, o induce otras señales celulares implicadas en la LTP, base de la memoria y el aprendizaje. No son un canal iónico en sí, aunque también se les considera reguladores de la homeostasis del Ca^{2+} por la capacidad de movilizar Ca^{2+} de los depósitos intracelulares.

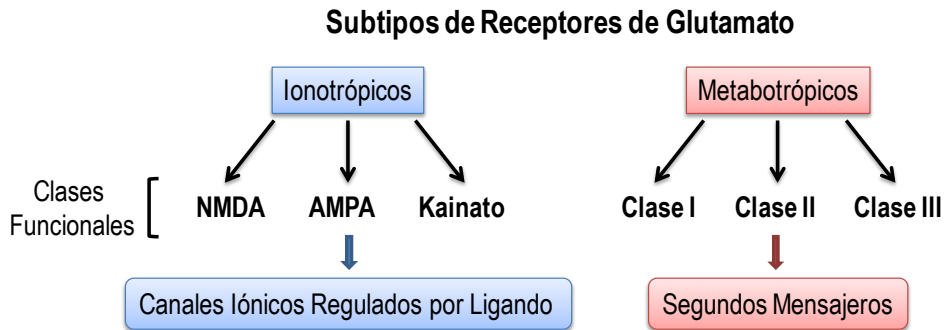


Figura 11. Clasificación de los receptores de glutamato.

a) El Receptor de NMDA

Los receptores de NMDA (NMDARs) poseen una alta permeabilidad a Na^+ y Ca^{2+} (MacDermott, Mayer et al. 1986), al contrario que los receptores de AMPA y kainato, principalmente permeables a Na^+ y K^+ .

El NMDAR es un complejo multiproteico muy regulado, cuya actividad es modificada por múltiples ligandos (**Figura 12 B**). Los NMDARs comparten las características funcionales de canales regulados por ligando y de canales sensibles al voltaje. Esta propiedad se debe al bloqueo del canal por el ión Mg^{2+} cuando el potencial de membrana está cercano al valor de reposo, que es eliminado de forma transitoria cuando la membrana se despolariza. Por tanto, la activación de los NMDARs requiere, además de la unión del ligando glutamato, la despolarización de la membrana (eliminar el bloqueo del Mg^{2+} del canal) y la unión de un coagonista, la glicina o la D-serina. Ciertas poliaminas, al igual que la glicina, modulan positivamente el canal, mientras que el zinc y un exceso de protones lo modulan negativamente (antagonistas).

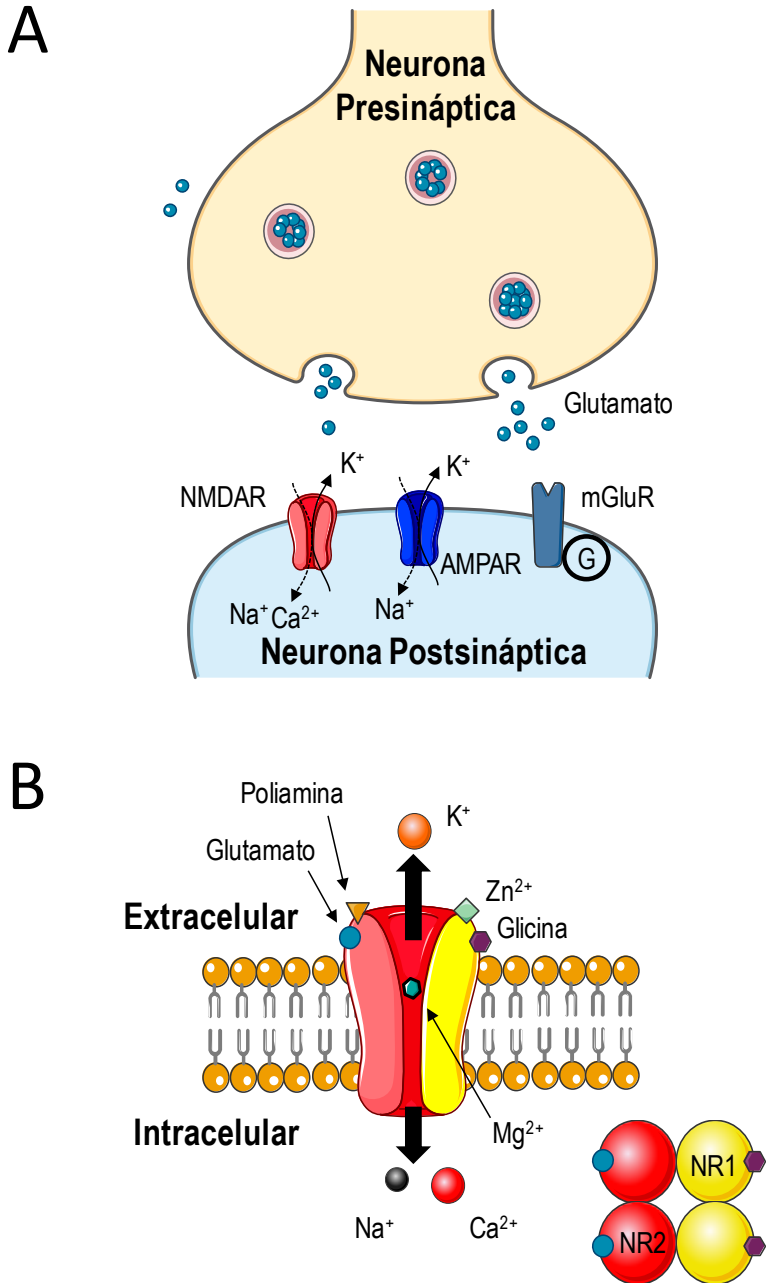


Figura 12. Esquema de los tipos de receptor de glutamato descritos y representación esquemática de un receptor NMDA. A. Receptores ionotrópicos (mostrados NMDA y AMPA) y los receptores metabotrópicos. Basado en Peter Clapp et al., in *How Adaptation of the Brain to Alcohol Leads to Dependence, A Pharmacological Perspective*. **B.** Esquema de los diferentes sitios de unión a los agonistas (Glutamato y NMDA) del receptor de NMDA, sus co-agonistas (Glicina) y antagonistas (Zn²⁺), así como un inhibidor del canal (Mg²⁺). Basado en *Anaesthesia UK* (<http://www.frca.co.uk/article>).

La combinación de diferentes subunidades forman los NMDARs: La subunidad NR1, ubicua y esencial, que puede estar presente en ocho isoformas diferentes, la subunidad reguladora NR2 (NR2A - NR2D), y una tercera subunidad NR3 (NR3A - NR3B) (Sun, Margolis et al. 1998). Para que el receptor de NMDA sea funcional, necesita la unión de dos subunidades NR1 junto con otras dos NR2 o con la combinación de una subunidad NR2 y una NR3 (Monyer, Sprengel et al. 1992). Las subunidades NR1 y NR3 proporcionan los sitios de unión a glicina, mientras que la subunidad NR2 forma el sitio de unión a glutamato (Furukawa, Singh et al. 2005). La diferente combinación de la subunidad fundamental NR1 con las otras subunidades le conferirá propiedades funcionales diversas, como diferente susceptibilidad al bloqueo por Mg^{2+} , sensibilidad a glicina, afinidad a glutamato o conductancia del canal. Así mismo, cada subunidad interacciona con diferentes moléculas intracelulares asociadas a la densidad postsináptica.

El receptor de NMDA participa en la neurotransmisión y en la LTP, base de los procesos de memoria y aprendizaje; y puede además promover la supervivencia neuronal y resistencia al trauma. Sin embargo, si se acumula una excesiva cantidad de glutamato, se producirá una sobreactivación del NMDAR, un proceso conocido como **excitotoxicidad** (Olney 1969) (ver sección 5). La muerte celular por excitotoxicidad posee un papel importante en ciertos desórdenes del SNC, como isquemia cerebral, y en ciertas enfermedades neurodegenerativas como la EA (Sattler y Tymianski 2001).

Sin embargo, no es sólo un gran flujo de Ca^{2+} a través del NMDAR lo que determina la supervivencia neuronal, sino también la localización subcelular de los receptores, que puede ser sináptica (alrededor de la sinapsis) o extrasináptica (localizados fuera del botón sináptico), o las subunidades que lo conforman. Así, se ha descrito que la activación de NMDARs sinápticos está asociado de forma preferente con una respuesta de supervivencia en las neuronas, mientras que la activación de los receptores de NMDA extrasinápticos desencadenaría una respuesta preferentemente perjudicial (Hardingham y Bading 2010). Por otro lado, parece que, en líneas generales, los receptores NMDA que contienen las subunidades NR2A y NR3

promueven la supervivencia neuronal, mientras que los que contienen las NR2B median señales de muerte (Liu, Wong et al. 2007). Esto parece deberse a que la subunidad NR2B interacciona por su dominio intracelular con proteínas como PSD-95 (proteína de la densidad post-sináptica 95), asociada con la producción de óxido nítrico. Se ha demostrado además que los receptores de NMDA que contienen la subunidad NR2A se localizan principalmente en la sinapsis, mientras que aquellos que contienen la subunidad NR2B se localizan predominantemente en la zona extrasináptica de las neuronas (Petralia, Wang et al. 2010). Pese a los numerosos estudios realizados tanto en cultivos neuronales como en cultivos no neuronales y en ratones mutantes, los resultados son aún muy dispares y el papel de cada subunidad en la muerte celular no está aún bien definido.

Otros canales que se incluyen en este grupo y que cabe destacar son:

b) El Receptor de Acetilcolina

Al igual que para el receptor de glutamato, los receptores de ACh pueden dividirse en dos grandes tipos: receptores ionotrópicos, que permiten la apertura del canal iónico al unirse el neurotransmisor; y los receptores metabotrópicos, asociados a proteínas G (**Figura 13**).

- **Receptor Nicotínico de Acetilcolina (nAChR)**

El receptor ionotrópico de ACh, conocido como receptor nicotínico de ACh (nAChR), es activado principalmente por ACh, aunque la nicotina puede mimetizar su efecto activándolos de igual modo, de ahí su nombre. Los nAChRs regulan diversos procesos, como la liberación de neurotransmisores o la excitabilidad celular. Están formados por pentámeros, con diferente número de subunidades dependiendo de dónde se estén expresando. Hasta la fecha se han identificado nueve subunidades α (α_2 - α_{10}) y tres β (β_2 - β_4) (Conti-Tronconi, Hunkapiller et al. 1982). Las subunidades

más abundantes en el cerebro son α_4 , β_4 y α_7 . Los nAChRs neuronales pueden ser homoméricos, formados sólo por la combinación de subunidades α (α_7 - α_{10}), o heteroméricos, los cuales presentan diferentes combinaciones de subunidades α y β . El subtipo α_7 nAChR se expresa especialmente en regiones del cerebro que participan en procesos de aprendizaje y memoria, como el hipocampo o la corteza (Seguela, Wadiche et al. 1993). Este subtipo tiene una alta permeabilidad a Ca^{2+} , intensifica la neurotransmisión por glutamato y modula la plasticidad neuronal afectando al crecimiento de los axones (Broide y Leslie 1999).

- **Receptor Muscarínico de Acetilcolina (mAChR)**

Los receptores metabotrópicos activados por ACh, conocidos como receptores muscarínicos de ACh (mAChR), pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G, caracterizándose por sus respuestas lentas. No son un canal en sí mismos, pero participan en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} al inducir la liberación de Ca^{2+} de los depósitos. Los mAChRs del SNC participan en muchas funciones, como en la regulación de la temperatura, regulación cardiovascular y memoria. Existen cinco subtipos del receptor muscarínico de ACh (M1 - M5), siendo M1 el que está principalmente expresado en el hipocampo. Además, M1 parece ser el mayor subtipo involucrado en la señalización por fosfoinosítido en esta región (Porter, Bymaster et al. 2002). M1 está localizado especialmente en la zona postsináptica, y participa principalmente en el control de las funciones cognitivas. Su estimulación resulta en la hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), mediante la acción de la enzima fosfolipasa C (PLC), produciendo inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), moléculas que actúan como segundos mensajeros, y conllevando a la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares.

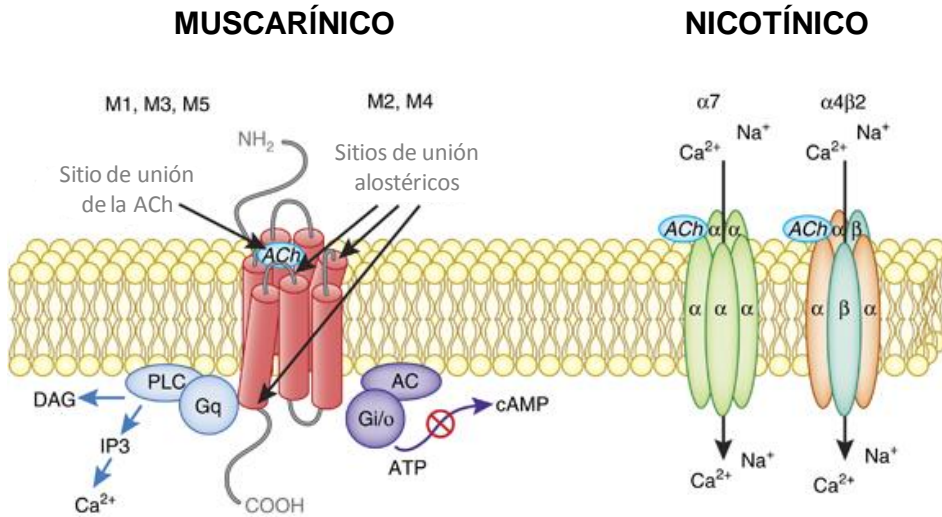


Figura 13. Estructura y vías de señalización de mAChRs y nAChRs. Cada subtipo mAChR es una proteína con siete dominios transmembrana. Pueden acoplarse a la generación de IP₃ y DAG o activar proteínas G_o. Los nAChR son canales iónicos pentaméricos activados por ligando. Pueden acoplarse a los VOCs o a CICR, resultando en patrones diferentes de la señalización por Ca²⁺. Modificado de *Jones et al* (Jones, Byun et al. 2012).

3.1.3. Canales de Calcio Operados por el Vaciamiento de los Depósitos (SOCs)

Los canales de Ca²⁺ operados por depósitos, SOCs, del inglés *Store-Operated Ca²⁺-Channels*, se activan en respuesta al vaciamiento de Ca²⁺ del retículo endoplásmico (RE) tras su liberación, sea por mensajeros fisiológicos capaces de movilizar Ca²⁺ o por agentes farmacológicos (Parekh y Putney 2005).

El influjo de Ca²⁺ extracelular a través de los SOCs de la membrana plasmática se conoce como entrada de Ca²⁺ operada por depósitos (SOCE, del inglés *Store-Operated Ca²⁺-Entry*), aunque originariamente se denominó Entrada Capacitativa de Ca²⁺ (CCE, *Capacitative Calcium Entry*) (Putney 1986). SOCE es la principal vía de entrada de Ca²⁺ de células no excitables, aunque también está presente en las neuronas. La entrada de Ca²⁺ a través de SOCE regula muchas funciones celulares, y guarda una importante relación funcional con orgánulos

subcelulares que participan en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular como son el RE y la mitocondria.

Así, el nivel de Ca^{2+} de los depósitos es percibido por la molécula del RE STIM (de *Stromal Interaction Molecule*) a través de un dominio *EF-hand* localizado en el lumen del RE. Cuando disminuye su unión a Ca^{2+} , STIM oligomeriza y transloca por la membrana del RE, interaccionando con los SOCs, como son Orai y/o TRP, situados en la membrana plasmática. Tras ello, Orai y/o TRP se agregan formando un poro, y su unión a STIM abre el canal, permitiendo la entrada de Ca^{2+} al interior celular (Feske, Gwack et al. 2006) (**Figura 14**). Todo este proceso es reversible y el ensamblaje de todos los componentes suele ser lento en la mayoría de las células. En las células no excitables, SOCE están controlado por STIM1; sin embargo, en las neuronas, la activación de los SOCs parece estar regulada por la isoforma STIM2 (Berna-Erro, Braun et al. 2009).

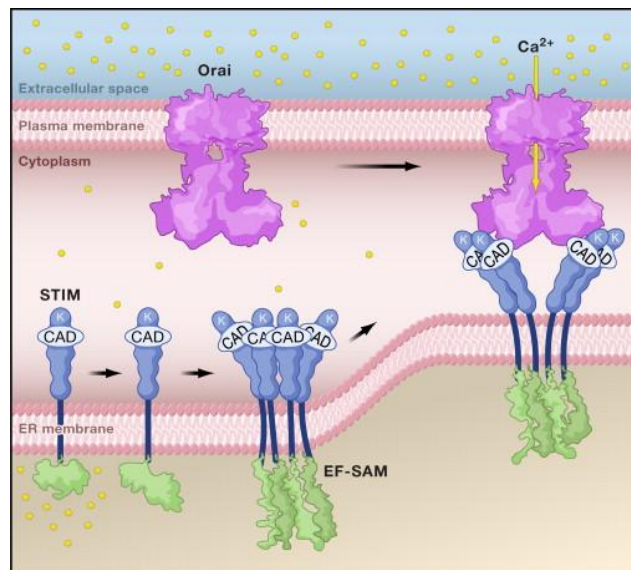


Figura 14. Entrada de Ca^{2+} operada por depósitos y el complejo STIM/Orai. STIM se extiende por la membrana del RE, dejando el dominio *EF-hand* en el lumen del RE. Cuando el Ca^{2+} es liberado del RE, STIM se agrega formando complejos, que se acumulan cercanos a la membrana plasmática. Orai se agrega formando un poro, y la unión con STIM abre el canal, permitiendo la entrada de Ca^{2+} al interior celular. Figura tomada de David E. Clapham, modificada de Stathopoulos et al (Stathopoulos, Zheng et al. 2008).

Hasta hace unos años no estaba muy claro el papel de SOCE en las neuronas. Mientras que solía pensarse que era una mera estrategia para rellenar los depósitos, actualmente se sabe que SOCE participa en ciertas funciones neuronales, como en la señalización por factores de transcripción, crecimiento guiado del axón o en la plasticidad sináptica (Majewski y Kuznicki 2015).

3.1.4. Superfamilia de Canales TRP

La superfamilia de los canales TRPs (del inglés *Transient Receptor Potential*) constituye otra de las posibles vías de entrada de Ca^{2+} al interior celular. Los TRPs están ampliamente expresados en el SNC, donde contribuyen a cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ al proporcionar una vía de entrada de Ca^{2+} , modulando la fuerza conductora de la entrada de éste, y probablemente también al proporcionar vías para la liberación de Ca^{2+} de orgánulos intracelulares. Los TRPs se ensamblan formando homo o heterotetrámeros, dando lugar a canales selectivos para cationes mono o divalentes. Esta superfamilia se divide en siete familias: TRPC, TRPM, TRPV, TRPA, TRPP, TRPML y TRPN. Los TRPs son activados por un amplio rango de estímulos, incluyendo mensajeros intra y extracelulares, estímulos químicos, mecánicos u osmóticos o el llenado de los depósitos intracelulares (Clapham 2003). En el SNC, los TRPs participan en el crecimiento de neuritas, en la señalización por receptores y en la muerte celular por excitotoxicidad tras la anoxia (Moran, Xu et al. 2004).

3.2. Sistemas de Extrusión de Calcio a través de la Membrana Plasmática

Durante el proceso de estimulación celular, los mecanismos responsables de la entrada de Ca^{2+} al citosol y, consecuentemente, de la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, son los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. Al finalizar el estímulo, la célula

necesita recuperar los niveles de Ca^{2+} basales para poder responder ante nuevos estímulos. Para ello, la célula transportará Ca^{2+} hacia el medio extracelular y reciclará parte del Ca^{2+} liberado desde los depósitos intracelulares, asegurándose de que éstos se mantengan siempre llenos. En la mayoría de los casos, del aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelulares se encargan los sistemas tamponadores de Ca^{2+} (proteínas que unen Ca^{2+}), además de ser extruido al espacio celular gracias a las bombas de Ca^{2+} o los intercambiadores. Además, el Ca^{2+} puede ser bombeado al RE o capturado por la mitocondria.

Los dos mecanismos principales de extrusión del Ca^{2+} a través de la membrana plasmática son las bombas de Ca^{2+} , dependientes de la hidrólisis de ATP, y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

3.2.1. ATPasa de la Membrana Plasmática (PMCA)

Las bombas de Ca^{2+} de la membrana plasmática se denominan PMCA (del inglés *Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase*), y están presentes en todas las células eucariotas. Pertenecen a la familia de las ATPasas de tipo P, ya que originan un intermedio fosforilado en su ciclo de funcionamiento. Son activadas rápidamente por un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, siendo su principal regulador Ca^{2+} /Calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$), pues en ausencia de ésta se encuentran autoinhibidas (Werth, Usachev et al. 1996). Las PMCA bombean los iones en contra de un alto gradiente electroquímico, por lo que son impulsadas gracias a la hidrólisis de ATP; y un ión Ca^{2+} es eliminado por cada molécula de ATP que se hidroliza. Poseen una alta afinidad por Ca^{2+} ($K_d = 100$ nM), pero baja capacidad para transportarlo. Son por ello capaces de operar en un rango de bajas concentraciones de Ca^{2+} , donde el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es relativamente ineficiente. Existen cuatro genes independientes que codifican para las principales isoformas de PMCA (PMCA 1 - 4), siendo PMCA2 y PMCA3 las más abundantes en el cerebro (Brini y Carafoli 2009).

3.2.2. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la Membrana Plasmática (NCX)

En condiciones basales, la actividad de la PMCA es suficiente para mantener el equilibrio iónico pero, tras una estimulación, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ alcanza altos niveles, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX, *Sodium-Calcium Exchanger*) es requerido. NCX es un sistema de baja afinidad por Ca^{2+} ($K_d = 1000 \text{ nM}$) y alta capacidad situado en la membrana plasmática, principalmente de células excitables, que se activa cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta. Se trata de una proteína capaz de actuar de forma bidireccional, acoplando la salida de Ca^{2+} a la entrada de Na^+ (elimina un ión Ca^{2+} por cada dos ó tres iones Na^+ que introduce) o la entrada de Ca^{2+} a la salida de Na^+ si actúa en modo reverso. En condiciones fisiológicas, su función principal es la extrusión de Ca^{2+} (Ruknudin y Lakatta 2007). En este caso, la energía es suministrada por el gradiente electroquímico a través de la membrana que resulta de la actividad de la bomba de sodio-potasio.

3.3. Proteínas que Unen Calcio en el Citosol

Otra forma de control de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular viene dada por las proteínas que unen Ca^{2+} , de las que existe un amplio número en el SNC. Su afinidad por Ca^{2+} , su localización en relación a la señal de Ca^{2+} , así como su interacción con otras proteínas, determinarán su función específica. Funcionalmente, se pueden diferenciar en dos grupos: (1) quelantes, que actúan como tampones de Ca^{2+} , de manera que modifican las corrientes de Ca^{2+} de forma espaciotemporal y (2) sensores de Ca^{2+} , con alta afinidad y baja capacidad por Ca^{2+} , que transducen los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en cascadas de señalización.

Una gran familia dentro de las proteínas que unen Ca^{2+} es la de aquellas que contienen dominios de unión a Ca^{2+} *EF-hand*. Estos dominios consisten en dos hélices- α de unos 10-12 residuos de longitud, orientados perpendicularmente uno

respecto al otro y separados por una región *loop* de 12 residuos. Los dominios *EF-hand* normalmente se presentan como pares múltiples (Kretsinger 1980). El ejemplo mejor estudiado dentro de los sensores de Ca^{2+} es la calmodulina (CaM). Otro grupo relevante de proteínas que unen Ca^{2+} con dominios *EF-hand* y que actúan como tampones de Ca^{2+} son calretinina, calbindina D28 y parvalbúmina.

3.4. El Retículo Endoplásmico

Además del transporte de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, los depósitos intracelulares poseen también una importante función en la regulación de las señales de Ca^{2+} . Orgánulos subcelulares como el RE, la mitocondria o los lisosomas actúan como sistemas tamponadores de Ca^{2+} . Existen dos mecanismos posibles por el que los depósitos intracelulares regulan la homeostasis del Ca^{2+} , (1) liberación del Ca^{2+} de los depósitos para intensificar la señal de Ca^{2+} y (2) eliminación del Ca^{2+} del citosol tras un aumento de este ión. El RE actúa como depósito de Ca^{2+} , y la estimulación celular conduce frecuentemente a la liberación del Ca^{2+} almacenado. En condiciones normales, el RE presenta una concentración de Ca^{2+} libre similar a la del líquido extracelular. El núcleo y las mitocondrias también pueden capturar Ca^{2+} tras la estimulación celular pero sólo de modo transitorio, ya que en condiciones basales presentan una concentración de Ca^{2+} libre similar al citosol (Montero, Alonso et al. 2000, Chamero, Villalobos et al. 2002).

El RE es un complejo sistema de endomembranas, presente en todas las neuronas, que se extiende desde el núcleo hasta el soma, dendritas y espinas dendríticas, y a lo largo de todo el axón hasta las terminales presinápticas. Para las neuronas, es de gran importancia que el RE sea capaz de actuar como un depósito dinámico de Ca^{2+} , capaz de acumular Ca^{2+} de forma activa y de liberarlo en respuesta a un estímulo fisiológico.

El RE participa en la regulación de una amplia variedad de funciones dependientes de Ca^{2+} . Por su parte, el Ca^{2+} regula muchos de los procesos que tienen lugar en el lumen del RE, como la síntesis de proteínas, el *trafficking*, o las respuestas celulares al estrés. Es por ello que la perturbación de la homeostasis del Ca^{2+} del RE podría contribuir al desarrollo de situaciones patológicas.

3.4.1. Liberación de Calcio desde el Retículo Endoplásmico

Se cree que en las neuronas existe un RE ininterrumpido, que proporciona un sistema continuo necesario para la sincronización a lo largo de los diferentes compartimentos espaciales y funcionales de la neurona. Por ejemplo, en las dendritas, la liberación de Ca^{2+} de los depósitos participa en la modulación de las respuestas postsinápticas, así como en la plasticidad sináptica; en los terminales axónicos, interviene en la fusión de vesículas y en la liberación de neurotransmisores; en el soma está acoplado a la activación de vías de señalización sensibles a Ca^{2+} como actividades quinasa y fosfatasa; y en el espacio perinuclear parece desencadenar la transcripción de genes. Así mismo, variaciones locales en la morfología del RE están asociadas con la densidad y maduración de las espinas dendríticas, lo que relaciona la morfología del RE con cambios en la organización sináptica y en la función (Stutzmann y Mattson 2011).

En las neuronas existen dos vías principales para la salida del Ca^{2+} del RE: la vía del IP_3 , activado por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, *Calcium-Induced Calcium Released*), en la que están involucrados los receptores de rianodina. Además, el Ca^{2+} puede ser liberado de forma pasiva a través de los canales "leak".

a) Receptores de Inositoltrifosfato (IP₃Rs)

Como hemos comentado anteriormente, la unión de neurotransmisores a receptores específicos de la membrana plasmática (incluyendo los receptores metabotrópicos de glutamato, receptores muscarínicos de ACh o receptores de ATP P2Y) lleva a la activación de la PLC, que cataliza la hidrólisis de PIP₂ produciendo los mensajeros intracelulares IP₃ y DAG. IP₃ posee gran movilidad por el citoplasma y es capaz de difundir al interior celular, donde se encuentra con receptores específicos (IP₃Rs) en el RE. La unión de IP₃ cambia la conformación de los IP₃Rs, abriendo el canal y permitiendo así la salida del Ca²⁺ que se encontraba almacenado en grandes concentraciones dentro del RE hacia el citoplasma (**Figura 15**).

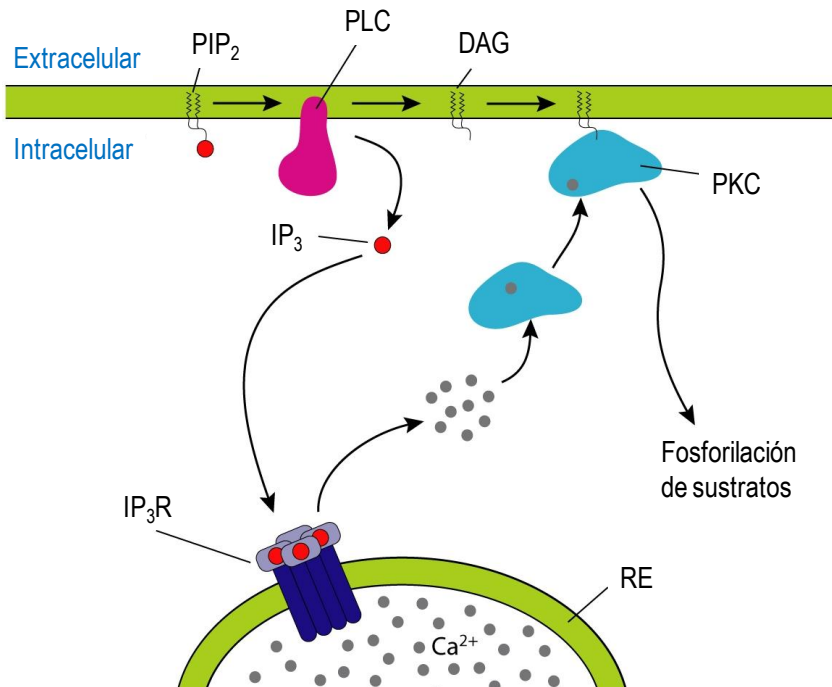


Figura 15. Ruta del inositol. La escisión del PIP₂ llevada a cabo por la PLC forma IP₃ y DAG, iniciando la liberación de Ca²⁺ intracelular y la activación de la PKC. Modificado de <http://es.wikipedia.org/wiki/Inositol>.

Los IP₃Rs son canales de Ca²⁺ intracelulares activados por ligando, formados por cuatro subunidades, de los que se han encontrado tres genes diferentes que codifican para tres isoformas diferentes (IP₃R1 - IP₃R3). Los diferentes IP₃Rs están presentes de forma ubicua en todas los tejidos de animales, pero es la isoforma IP₃R1 la expresada principalmente en neuronas. Los receptores de IP₃ participan en diferentes procesos fisiológicos, como la transcripción de genes o procesos de aprendizaje y memoria (Foskett, White et al. 2007).

Aunque los IP₃Rs necesitan IP₃ para su apertura, éste no es su único regulador, pues el Ca²⁺ en sí mismo actúa como un modulador alostérico. De hecho, la probabilidad de apertura de los IP₃Rs aumenta cuando se producen pequeños incrementos en la concentración de Ca²⁺ (<300 nM). Sin embargo, altas concentraciones de Ca²⁺ (>1 µM) inhiben su apertura (Foskett, White et al. 2007). Esta dependencia de la actividad de los IP₃Rs con la [Ca²⁺]_{cit} es crítica para la generación de señales de Ca²⁺ complejas en muchas células. Además, en la regulación de estos canales también participan otras proteínas como calmodulina, proteína quinasa dependiente de calmodulina o proteína quinasa C.

b) Receptores de Rianodina (RyRs)

Los RyRs son canales iónicos estructural y funcionalmente análogos a los IP₃Rs, aunque presentan una mayor conductancia y mayor peso molecular. A diferencia de los IP₃Rs, ubicuos en todas las células, los RyRs están presentes en gran medida en las células excitables, como las células musculares o las neuronas.

Los RyRs reciben este nombre debido a su alta afinidad por el alcaloide vegetal rianodina, aunque también pueden ser activados por concentraciones milimolares de cafeína. Esto es debido al aumento de la sensibilidad a Ca²⁺ en presencia de cafeína, de forma que bajas concentraciones de Ca²⁺ los activan. No obstante, el principal activador de los RyRs es el propio Ca²⁺, generando así el proceso conocido como CICR. Se trata de un proceso de amplificación de la señal de

Ca^{2+} , iniciada por el influjo de este ión a través de los canales de la membrana plasmática, o por la liberación de Ca^{2+} de los depósitos a través de los IP_3Rs , donde se libera Ca^{2+} adicional procedente del RE al citosol. Es importante decir que aunque otros compuestos pueden facilitar o modular la liberación de Ca^{2+} por los RyRs, la unión de Ca^{2+} es un requisito fundamental para la activación del canal.

Existen al menos tres isoformas diferentes de RyR (RyR1 - RyR3). Todas se expresan en el cerebro, aunque RyR2 es la isoforma predominante neuronal (Lanner 2012). RyR3 se localiza principalmente en el hipocampo (Hertle y Yeckel 2007).

c) Canales *leak*

Existe una salida continua de Ca^{2+} desde el RE al citosol, que se ve compensada por el bombeo, también continuo, de Ca^{2+} hacia el interior del RE. La presencia de estos canales *leak* se deduce de la liberación pasiva de Ca^{2+} desde el RE tras bloquear las bombas SERCA (explicadas a continuación), con compuestos como la tapsigargina o el ácido ciclopiazónico, dando como resultado la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .

Aunque los canales *leak* no han sido aún identificados, se han propuesto diferentes mecanismos para este canal. Ciertos estudios sugieren que en su formación participa el translocón (Camello, Lomax et al. 2002). Por otro lado, se ha propuesto que las presenilinas 1 y 2, además de formar las proteasas en el complejo de la γ -secretasa, que participa en el procesamiento de APP, funcionan también como canales *leak* en el RE, a través de ellos mismos o indirectamente aumentando la actividad de los IP_3Rs o los RyRs. Esta función se cree que es independiente de su actividad como parte de la γ -secretasa durante la formación del péptido amiloide (Tu, Nelson et al. 2006). Se ha visto que mutaciones en las presenilinas están relacionadas con la Enfermedad de Alzheimer (EA) familiar, pues los datos sugieren que estas mutaciones perjudican la liberación de Ca^{2+} a través de estos canales *leak*, resultando en un aumento de los niveles de Ca^{2+} del RE y aumentando la vulnerabilidad a la degeneración (Nelson, Tu et al. 2007) (ver sección 4.3.2).

3.4.2. Captación de Calcio por el Retículo Endoplásmico

El mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} neuronal requiere además estabilizar este importante reservorio de Ca^{2+} , el cual alcanza concentraciones estimadas de hasta 5 mM, es decir, de 4 a 5 órdenes de magnitud mayores que las alcanzadas en el citosol.

a) ATPasa de Retículo Sarcoplásmico-Endoplásmico (SERCA)

La recaptación de Ca^{2+} al lumen del RE sucede gracias a las bombas de Ca^{2+} del RE (SERCA, del inglés *Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*), que transfieren Ca^{2+} desde el citosol al RE gracias a la hidrólisis de ATP. En este caso, el número de iones de Ca^{2+} transportados por cada molécula de ATP hidrolizada es dos. Al igual que PMCA, la SERCA pertenece al grupo de las ATPasas de tipo P, operando en contra de un enorme gradiente electroquímico. Poseen una alta afinidad por el Ca^{2+} , siendo su K_{50} de 0,1 μM . Las ATPasas de Ca^{2+} presentes en la membrana del RE poseen una actividad doble, pues son capaces de mantener el gradiente de Ca^{2+} a niveles basales (contrarrestando la salida de Ca^{2+} por los canales *leak*) y de rellenar los depósitos tras su vaciamiento consumiendo energía de la hidrólisis de ATP.

Esta familia incluye tres miembros (SERCA1 - 3), y por *splicing* alternativo existen un total de once isoformas diferentes conocidas (Brini y Carafoli 2009). En cuanto a su distribución, SERCA1 se expresa en las fibras musculares de contracción rápida. SERCA2a se expresa en el músculo cardíaco y en fibras musculares de contracción lenta, mientras que SERCA2b se expresa de forma ubicua en tejidos no musculares, particularmente en cerebro. SERCA3 se expresa en tejidos no musculares (Carafoli y Brini 2000).

La inhibición de las bombas SERCA resulta en un vaciamiento lento de los depósitos intracelulares del RE. El ácido ciclopiazónico (CPA) y la 2,5-di(terbutil)-1,4-

benzohidroquinona (tBHQ), así como la tapsigargina (Tg) son inhibidores específicos de la SERCA, siendo éste último el de mayor popularidad. CPA y tBHQ poseen menor afinidad por la bomba que la Tg; y mientras que la inhibición por CPA y tBHQ es reversible y desaparece tras eliminarlos del medio, la inhibición por Tg es irreversible.

b) Ca^{2+} /ATPasas de la Vía Secretora (SPCAs)

La bomba de Ca^{2+} de la vía secretora, SPCA (del inglés *Secretory Pathway Ca^{2+} ATPase*) es la ATPasa de transporte de Ca^{2+} que se ha descubierto más recientemente. Posee una singular propiedad, y es que además de Ca^{2+} , transportan Mn^{2+} de forma eficiente (Van Baelen, Vanoevelen et al. 2001). Este transporte de Mn^{2+} es importante para la regulación de la concentración de este ión en el citosol.

También existen SPCAs en las membranas del Golgi, donde su función principal es el transporte de Mn^{2+} , el cual es cofactor de numerosas enzimas en el lumen de este orgánulo.

c) Proteínas Tamponadoras del RE

El tamponamiento de Ca^{2+} en el lumen del RE se lleva a cabo por proteínas específicas de unión a Ca^{2+} . En las neuronas, las principales son calreticulina y calsecuestrina. La principal diferencia con las proteínas tamponadoras del citosol es que las del RE presentan baja afinidad por Ca^{2+} y alta capacidad de unión, de forma que tamponan grandes cantidades de Ca^{2+} , que puede ser liberado rápidamente al citosol. Muchas de estas proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} del RE actúan como chaperonas, responsables del correcto plegamiento de las proteínas y su transporte a través del RE (Michalak, Groenendyk et al. 2009).

3.5. La Mitocondria

La mitocondria no sólo actúa como tampón de Ca^{2+} , sino que también participa de forma activa en la regulación de la homeostasis de este ión y por tanto en muchos procesos celulares. Una de las principales funciones de la mitocondria es la producción de ATP. Se cree que en las zonas neuronales ricas en mitocondrias (como las sinapsis o zonas próximas a la SERCA) se forman grandes cantidades de ATP, requeridas para procesos como la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Mattson 2007).

Las mitocondrias son muy móviles en todas las células, especialmente en las neuronas (Hollenbeck y Saxton 2005); y además cambian su morfología mediante procesos de fusión y fisión en respuesta a las diferentes condiciones celulares y procesos de diferenciación. Dos membranas conforman la mitocondria, la membrana mitocondrial externa y la membrana mitocondrial interna (MME y MMI respectivamente). Es importante destacar que la mayoría de los sistemas de transporte se encuentran en la MMI, puesto que la MME es permeable a iones y proteínas pequeñas (<10 kDa), y por tanto a Ca^{2+} . La permeabilidad de la MME se atribuye a la abundante expresión de grandes canales en su superficie, conocidos como porinas o canales aniónicos dependientes de voltaje (VDACs, *Voltage-Dependent Anion Channels*). Por su parte, la MMI es una membrana impermeable a iones, con una extensión mucho mayor que la MME, que presenta plegamientos en el espacio interno. En el espacio intermembrana se encuentran enzimas de alta importancia, como la creatina quinasa y el citocromo C.

La energía liberada por los complejos de la cadena respiratoria, localizada en la MMI, es empleada para el bombeo de H^+ desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana. El retorno de los H^+ hacia el interior de la matriz mitocondrial se lleva a cabo a favor de gradiente gracias a la ATPsintasa, transporte que será aprovechado por ésta para generar ATP. Por otro lado, este bombeo produce un gradiente de H^+ , y como consecuencia una distribución desigual de cargas a ambos

lados de la membrana interna, generando un gradiente químico y eléctrico (gradiente electroquímico), cuyo principal componente es la diferencia de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$), de unos -150 a -180 mV, negativo en el interior de la mitocondria. Esta enorme diferencia de potencial es la fuerza conductora por la que el Ca^{2+} , siguiendo su gradiente electroquímico, es atraído hacia la matriz mitocondrial, donde puede alcanzar grandes concentraciones, al menos de forma transitoria.

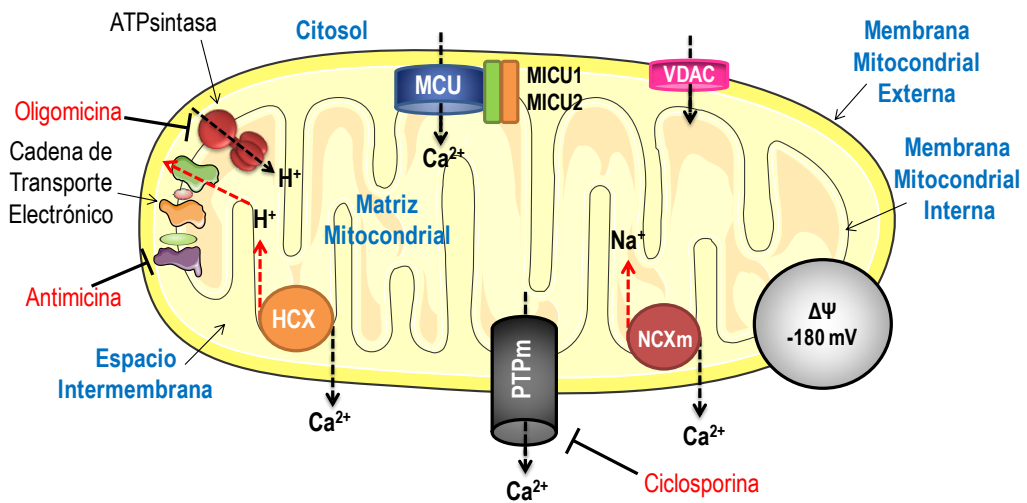


Figura 16. Homeostasis del calcio mitocondrial. Diagrama de la mitocondria y de los principales transportadores implicados en los flujos de Ca^{2+} mitocondriales. La vía fisiológica de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria es el uniportador de calcio mitocondrial (MCU). Las dos vías de salida de Ca^{2+} de la mitocondria son los intercambiadores $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) permite la salida de factores proapoptóticos y se inhibe con ciclosporina A. La cadena de transporte electrónico extruye H^+ de la matriz y genera el alto gradiente eléctrico de la mitocondria ($\Delta\Psi = -180$ mV). La ATPsintasa utiliza el gradiente eléctrico generado para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato.

En la mitocondria, el Ca^{2+} regula tres deshidrogenasas del ciclo del ácido cítrico (piruvato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa), todas sensibles a Ca^{2+} , de forma que controla la síntesis de ATP. La mitocondria es capaz de acumular fosfatos inorgánicos junto con el Ca^{2+} , que precipitan en la matriz en forma de hidroxipatita, pudiendo de esta manera

almacenarse Ca^{2+} en su matriz. Sin embargo, cuando la mitocondria acumula una cantidad de Ca^{2+} excesiva, se produce un ciclo vicioso que aumentará la sobrecarga de Ca^{2+} celular, pudiendo desencadenar un mecanismo apoptogénico. En la **Figura 16** se puede apreciar un esquema de la mitocondria y de los principales sistemas que participan en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial.

Las mitocondrias situadas en la cara citoplasmática de los canales del RE (IP_3Rs y RyRs), así como cercanas a diferentes canales de la membrana plasmática (SOCs, receptores de glutamato ionotrópicos, etc.), quedan expuestas a concentraciones de Ca^{2+} muy por encima de las obtenidas en el citosol. Estas regiones concretas y microscópicas que presentan alta concentración de Ca^{2+} se conocen como microdominios de Ca^{2+} (Rizzuto, Brini et al. 1993) (**Figura 17**). Estos dominios de alto Ca^{2+} poseen una importancia vital en ciertos procesos celulares, como la secreción de neurotransmisores o la contracción muscular. Que la mitocondria se posicione cercana a las señales de Ca^{2+} (del RE o de la membrana plasmática) ofrece dos funciones, (1) asegurar que la ATPasa de Ca^{2+} del RE tenga un suministro favorecido de ATP que asegure la acumulación y almacenamiento de Ca^{2+} y (2) tamponar el Ca^{2+} liberado desde el RE o que entra por los SOCs, modulando la señal (Rizzuto y Pozzan 2006). Cabe destacar la estrecha relación estructural y funcional existente entre el RE y las mitocondrias, dominios denominados MAMs (*mitochondria-associated membranes*), donde RE y mitocondria presentan una gran cercanía (Rizzuto, Pinton et al. 1998). Estos dominios facilitan la sincronización de funciones entre ambos orgánulos, como son la biosíntesis de lípidos, transporte de metabolitos o la señalización a través de Ca^{2+} (Rowland y Voeltz 2012). Uno de los componentes que participa en la formación de los MAMs es la mitofusina 2, que forma parte de la maquinaria de fusión y fisión de la mitocondria (de Brito y Scorrano 2008).

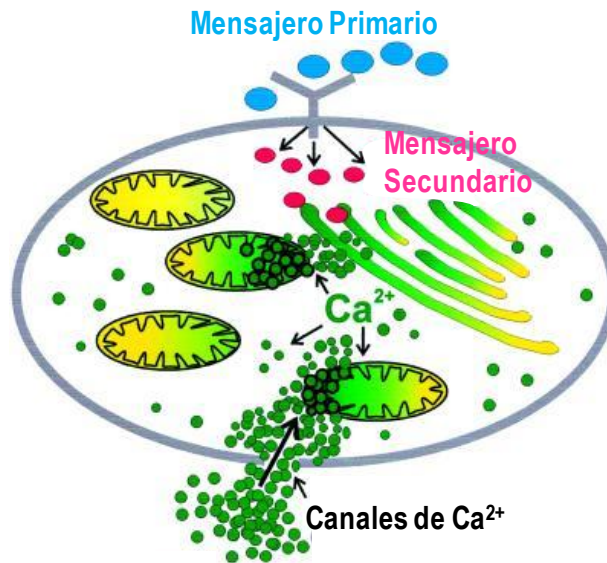


Figura 17. Concepto de microdominio para el transporte de Ca^{2+} mitocondrial. El Ca^{2+} que entra desde la zona extracelular o que se libera desde el RE genera microdominios restringidos de altas concentraciones de Ca^{2+} , de forma que activa la entrada de Ca^{2+} en las mitocondrias vecinas. Tomado de *Carafoli 2002* (Carafoli 2002).

3.5.1. Entrada de Calcio a la Mitocondria

Además del papel principal de la mitocondria de producir ATP y NADH, está aceptado que la mitocondria actúa también como un tampón de Ca^{2+} . Para entrar en la matriz mitocondrial, el Ca^{2+} debe atravesar la MME, que atraviesa de forma pasiva, y la MMI. La gran diferencia de potencial (negativa con respecto al citosol) que se crea en la MMI debido al transporte de H^+ desde la matriz al espacio intermembrana permite la acumulación de Ca^{2+} en el interior mitocondrial a favor de gradiente. De hecho, la pérdida del potencial mitocondrial inducida por bloqueantes de la cadena respiratoria como Antimicina A o mediante el empleo de protonóforos, como la carbonil cianida para-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP), anula la captación de Ca^{2+} mitocondrial (Nuñez, Valero et al. 2006).

a) Uniportador de Calcio Mitocondrial (MCU)

El influjo de Ca^{2+} hacia el interior de la mitocondria se produce principalmente a través del Uniportador de Ca^{2+} Mitocondrial (MCU, *Mitochondrial Calcium Uniporter*), localizado en la MMI (Baughman, Perocchi et al. 2011, De Stefani, Raffaello et al. 2011). El uniportador transporta Ca^{2+} gracias al gradiente electroquímico mantenido en esta membrana, sin ser necesario el acoplamiento a la hidrólisis de ATP o al transporte de otros iones. Debido a que el tamponamiento de Ca^{2+} por la mitocondria consume menos energía que su extrusión a través de la membrana plasmática o hacia el RE, este mecanismo es muy importante para las neuronas en situaciones en que la demanda de ATP y oxígeno es elevada, como en el caso de potenciales de acción rítmicos (Contreras, Drago et al. 2010).

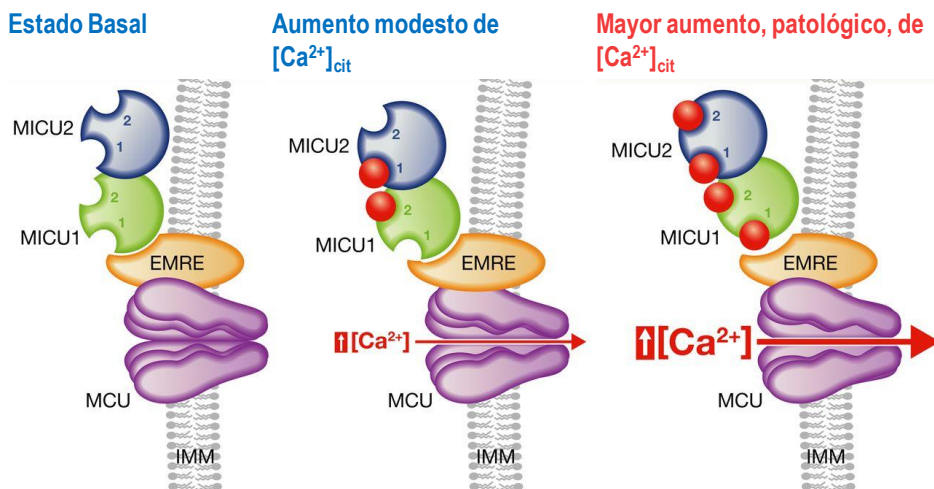


Figura 18. Complejo del uniportador mitocondrial. El complejo del uniportador está formado por el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU), y las subunidades reguladoras MICU1 y MICU2, conectados por el regulador esencial del MCU (EMRE). En estado de reposo, EMRE recluta a MICU1 y MICU2 hacia el MCU para mantener a MCU en el estado cerrado. Un modesto aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ por encima del umbral de MCU resulta en la unión de Ca^{2+} al segundo dominio *EF-hand* de MICU1 y al primer dominio de *EF-hand* de MICU2 para aumentar la probabilidad de apertura del MCU sin desestabilizar el complejo. Un aumento superior en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ provoca que todas las *EF-hands* unan Ca^{2+} , activando completamente el MCU y bloqueándolo en el estado abierto, resultando en una gran acumulación de Ca^{2+} mitocondrial. La unión de Ca^{2+} en todas las *EF-hands* puede provocar la disociación parcial del complejo MCU, liberando MICU1 y MICU2. Modificado de Ahuja y Muallem 2014.

La corriente de Ca^{2+} a través del MCU puede ser inhibida por rojo de rutenio y gadolinio. Por el contrario, MCU puede ser activado por fosfato inorgánico, facilitando el transporte de Ca^{2+} . Esto es así porque el fosfato disminuye la cantidad de Ca^{2+} libre en la matriz mitocondrial, precipitando Ca^{2+} , y favoreciendo la captación del ión. Además, MCU interacciona con elementos que lo regulan, como el MICU1 (*mitochondrial Ca^{2+} uptake 1 protein*) (Perocchi, Gohil et al. 2010), MICU2 (Plovanich, Bogorad et al. 2013) y el regulador esencial de MCU (EMRE), recientemente identificado (Sancak, Markhard et al. 2013). Tanto MICU1 como MICU2 contienen dominios *EF-hand*, y aunque regulan MCU, no participan directamente en la formación del poro. MICU1 y MICU2 funcionan como los guardianes del MCU, y la unión de Ca^{2+} a sus dominios *EF-hand* regula su mecanismo. Así, MICU2 interacciona con MICU1, y ambos son reclutados hacia el MCU por EMRE (**Figura 18**). En condiciones basales de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, MICU1 y MICU2, ambos libres de Ca^{2+} , inhiben la función de MCU. Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ aumenta justo por encima del umbral de MCU, la segunda *EF-hand* de MICU1 y la primera *EF-hand* de MICU2 unen Ca^{2+} , resultando en una conformación de los MICUs que provocan la activación fisiológica de MCU y la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. Si el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ es muy elevado y sostenido, todas las *EF-hands* unen Ca^{2+} para activar completamente el MCU, posiblemente por la disociación de los MICUs del complejo MCU, ya que el *knockout* de los MICUs no impide la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria (Ahuja y Muallem 2014).

3.5.2. Sistemas de Extrusión del Calcio Mitocondrial

El Ca^{2+} que ha acumulado la mitocondria es eliminado de la matriz mitocondrial hacia el citosol principalmente por el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (NCX_m) (Palty, Silverman et al. 2010), que introduce 3 Na^+ por cada Ca^{2+} que elimina, o a través del intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (2 ó más H^+ por cada Ca^{2+} que elimina), ambos localizados en la MMI. Los dos intercambiadores utilizan el gradiente electroquímico de cationes monovalentes para evitar que se llegue al equilibrio eléctrico. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial se expresa principalmente

en células excitables, mientras que el intercambiador H^+/Ca^{2+} mitocondrial lo hace en células no excitables.

Experimentos con mitocondrias aisladas, sometidas a condiciones patológicas o con sobrecarga de Ca^{2+} sugieren una ruta adicional de eliminación del Ca^{2+} de mayor conductancia, a través del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm), del que hablaremos a continuación.

3.5.3. Mitocondria y su Papel en la Muerte Neuronal

Los mecanismos por los que la mitocondria participa en la muerte neuronal involucran la activación de enzimas degradadoras, como son las cisteínproteasas, fosfolipasas, o enzimas que generen ROS, capaces de modificar las proteínas y lípidos de la mitocondria por oxidación; además de implicar la activación del proceso llamado transición de permeabilidad mitocondrial, donde un poro no selectivo de gran tamaño se abre, resultando en el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, hinchamiento de la mitocondria, liberación de metabolitos procedentes de la matriz e incluso la ruptura de la MME.

Las mitocondrias representan la principal fuente de ROS de las células. Una de las consecuencias de la fosforilación oxidativa es la generación de electrones desapareados. La interacción de estos e^- con el oxígeno molecular resulta en la generación del anión radical superóxido $O_2^{\bullet-}$. Este radical es muy reactivo y posee un tiempo de vida muy corto, pues es capaz de dismutar espontáneamente o con la ayuda de la superóxido dismutasa en otros ROS, como H_2O_2 y los subsecuentes radicales hidroxilo OH^{\bullet} . Éstos son los más dañinos, pues pueden reaccionar con casi todas las macromoléculas, incluyendo ADN, proteínas y lípidos de membrana. Esto provoca la peroxidación lipídica de la membrana (PLM), alterando su permeabilidad y las funciones asociadas. Otro radical, el peroxinitrito ($ONOO^-$), puede igualmente ocasionar daño directo a las proteínas y al ADN, y también constituye un potente

inductor de la PLM que puede llegar a destruir a las neuronas, especialmente sensibles a este proceso.

La producción desequilibrada de ROS se conoce como estrés oxidativo. Este proceso está implicado en la neurotoxicidad asociada a muchas enfermedades neurológicas. La estimulación excesiva de receptores de aminoácidos excitatorios (como el glutamato) en estos trastornos conlleva a la producción de radicales libres. En particular, la neurotoxicidad asociada a la sobreestimulación del NMDAR, mediado por una excesiva entrada de Ca^{2+} , desencadena una serie de efectos neurotóxicos, como la activación de la óxido nítrico sintasa, y la subsecuente producción del NO^{\bullet} , o la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, que lleva a la generación del anión $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Como mencionábamos anteriormente, las mitocondrias poseen un límite en la cantidad de Ca^{2+} que pueden captar. Así, mientras que la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria tiene un papel neuroprotector, cuando este sistema se satura y la carga de Ca^{2+} en la mitocondria sobrepasa la capacidad tampón de la matriz mitocondrial, la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ aumenta abruptamente (sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial), llevando a un hinchamiento irreversible de la mitocondria, desacoplamiento y pérdida del contenido soluble mitocondrial, un proceso llamado transición de permeabilidad mitocondrial, explicado principalmente por la apertura de un gran poro no selectivo que involucra las dos membranas mitocondriales, conocido como apertura del PTPm (**Figura 19**). Se trata de un canal de gran conductancia y permeable a solutos de gran peso molecular. La apertura de este canal es activada por un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$, mientras que ATP, ADP, Mg^{2+} y Ciclosporina A (CsA) lo inhiben (He y Lemasters 2002). Además, la probabilidad de apertura del PTPm aumenta en la presencia de ROS.

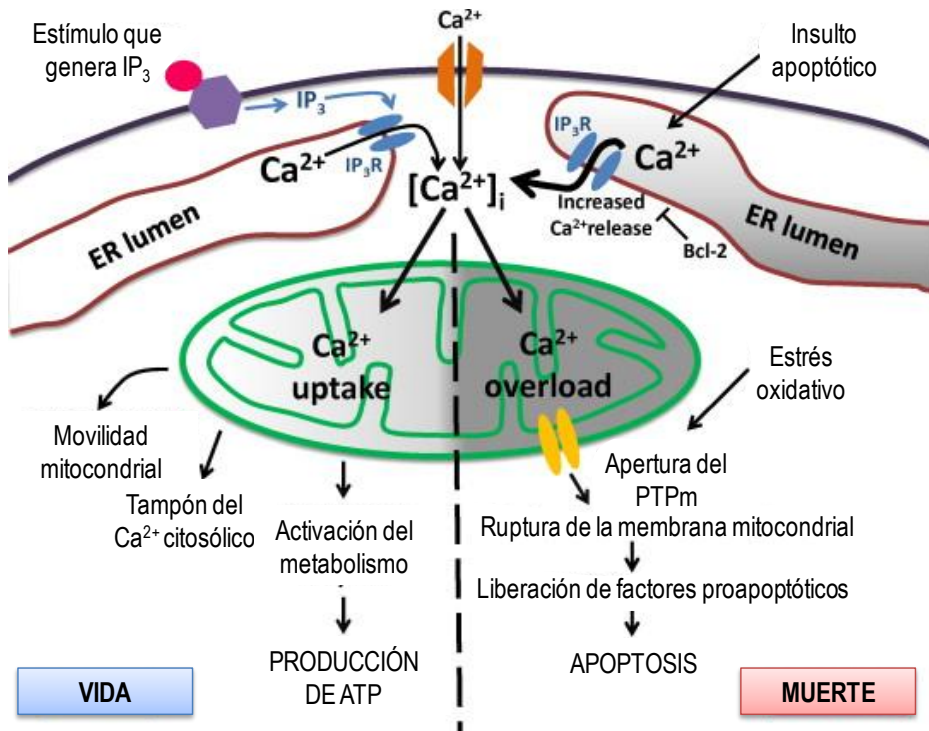


Figura 19. La sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial provoca apoptosis. A la izquierda en condiciones fisiológicas, la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular o la salida de Ca^{2+} desde el RE provoca un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Rápidamente la mitocondria capta Ca^{2+} del citosol, mecanismo crucial para procesos como la homeostasis de Ca^{2+} y el metabolismo. A la derecha, cuando en la mitocondria se produce una sobrecarga de Ca^{2+} , se abre el PTPm liberando factores proapoptóticos al citosol, e induciendo apoptosis. Tomado *Hung et al. 2010* (Hung, Ho et al. 2010).

La mitocondria posee un papel esencial en la vía intrínseca de la apoptosis (**Figura 20**). La apoptosis es un tipo de muerte celular activo, que regula tanto procesos fisiológicos, que participan en el mantenimiento y desarrollo de las células, como patológicos cuando se desregula, como en la isquemia o en enfermedades neurodegenerativas. La apoptosis puede ocurrir por la vía extrínseca, originada por la unión de moléculas de muerte a sus receptores, o por la vía intrínseca, activada por diferentes agentes celulares, entre los que se incluye el Ca^{2+} (Orrenius, Zhivotovsky et al. 2003). La vía intrínseca de la apoptosis es iniciada precisamente en la mitocondria por la apertura del PTPm, que lleva irremediablemente a la muerte celular (Rasola y

Bernardi 2011). Aunque los mecanismos de apertura del PTPm no se conocen con exactitud, se sabe que factores como el aumento del estrés oxidativo, la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial o el estrés metabólico (déficit de ATP) promueven la apertura del PTPm (Duchen 2000). El PTPm permite el flujo de proteínas proapoptóticas, como el citocromo c, que recluta una serie de proteasas llamadas caspasas que conducen a la muerte celular. Así, una vez que el citocromo c ha sido liberado a la célula, ésta está condenada a morir sin posibilidad de retorno (Adrain y Martin 2001, Mayer y Oberbauer 2003).

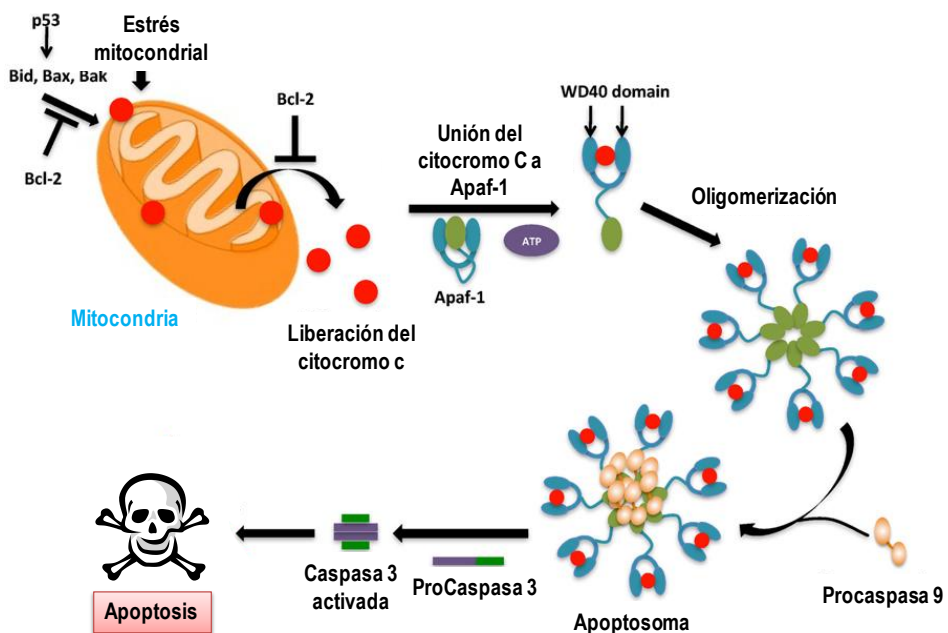


Figura 20. Vía intrínseca de la apoptosis. Cuando la vía intrínseca es estimulada, se activan proteínas proapoptóticas, que provocan la apertura del PTPm y la liberación del citocromo C al citoplasma. Éste se asocia a Apaf-1 para formar el apoptosoma. El apoptosoma provoca la transformación de la procaspasa 9 inactivada en caspasa 9 activada. A su vez, ésta activa la caspasa 3 y la subsecuente cascada de las caspasas, que deriva en apoptosis. Modificado de *Raina y Ibba 2014* (Raina y Ibba 2014).

Se ha demostrado que en las neuronas, la inhibición de la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial es capaz de proteger de la muerte inducida por excitotoxicidad (exceso de glutamato), puesto que esta inhibición prevendría la apertura del PTPm. Así, evitar la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria en el momento en el que se produce el daño podría proteger a las neuronas de esta excitotoxicidad (Deshpande, Siesjo et al. 1987, Zaidan y Sims 1994, Korde, Pettigrew et al. 2005).

Otra diana importante de esta vía es la proteína antiapoptótica Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*), que se une a proteínas proapoptóticas como Bax. Bcl-2 reduce el estado de llenado de los depósitos intracelulares, reduciendo así la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial tras el estímulo, y protegiendo a las células de la muerte por apoptosis (Pinton, Ferrari et al. 2001). Por el contrario, Bax aumenta el llenado de los depósitos.

4. Homeostasis del Calcio Intracelular en el Envejecimiento Neuronal y en la Neurodegeneración

Como hemos comentado anteriormente, el influjo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y entre los compartimentos intracelulares, cuando es controlado de forma adecuada, desempeña una función fundamental en las neuronas, incluyendo la regulación del crecimiento de neuritas y sinaptogénesis (formación de nuevas sinapsis), transmisión y plasticidad sináptica, y supervivencia celular. Durante el envejecimiento, y particularmente en las enfermedades neurodegenerativas, los sistemas que regulan la homeostasis del Ca^{2+} se pueden ver afectados, provocando disfunción sináptica, deterioro de la plasticidad y degeneración neuronal. Además, el estrés oxidativo, la alteración del metabolismo energético en la mitocondria y la agregación de proteínas relacionadas con enfermedades (péptido β amiloide, α -

sinucleína, huntingtina, etc.) afectan negativamente a la homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

4.1. Homeostasis del Ca^{2+} Intracelular en el Envejecimiento Neuronal

La **Hipótesis del Ca^{2+} en el Envejecimiento** fue inicialmente propuesta por Khachaturian en los años 80 (Khachaturian 1987), y apoyada por otros autores (Gibson y Peterson 1987, Disterhoft, Moyer et al. 1994). Esta hipótesis postula que los mecanismos celulares que participan en la homeostasis del Ca^{2+} también desempeñan un papel importante en el proceso de envejecimiento y en la neurodegeneración, de forma que el bajo rendimiento de estos sistemas en el envejecimiento causa un aumento crónico de la $[\text{Ca}^{2+}]$, aumentando la vulnerabilidad a ciertas enfermedades neurodegenerativas, y provocando, a la larga, la muerte neuronal.

Las principales alteraciones en la señalización de Ca^{2+} propuestas relacionadas con la edad y la neurodegeneración, detalladas a continuación, incluyen: elevados niveles de Ca^{2+} intracelular, aumento del influjo de Ca^{2+} a través de VOCs, deterioro de la capacidad de la mitocondria para actuar como tampón de Ca^{2+} , o perturbación de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} sensibles a rianodina o a IP_3 (**Figura 21**).

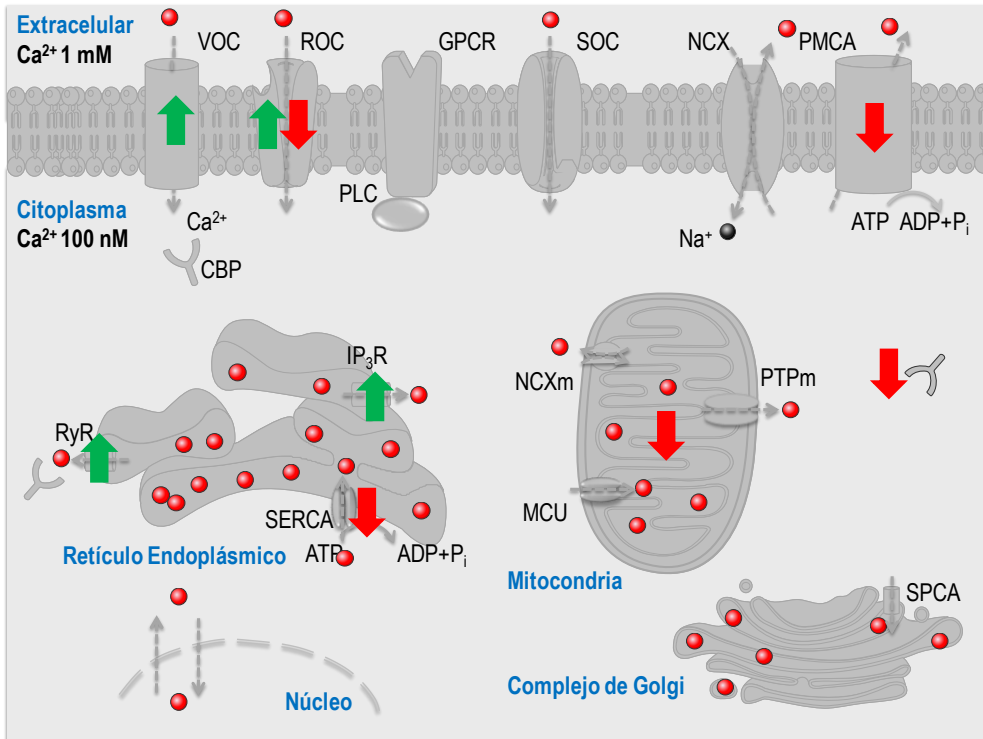


Figura 21. Componentes que participan en la homeostasis del Ca^{2+} y su alteración con el envejecimiento. Las flechas verdes indican un aumento de su función, mientras que las flechas rojas indican una disminución. Muchos de estos sistemas aún no han sido estudiados.

La alteración de la homeostasis del Ca^{2+} puede ser responsable directo de la muerte neuronal. Así, el Ca^{2+} puede contribuir a la muerte celular al estimular la producción de ROS en la mitocondria o al provocar sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial. Es más, la disfunción mitocondrial y particularmente la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial aumentan la producción de ROS (Petrosillo, Ruggiero et al. 2004).

Estudios recientes indican que los cambios en la homeostasis del Ca^{2+} asociados con la edad son locales, sutiles, graduales y además suceden durante un amplio periodo de tiempo (Toescu y Verkhratsky 2007). En función del tipo neuronal los cambios son diferentes, así como la sensibilidad a la alteración, siendo las neuronas hipocampales y corticales las más vulnerables (Foster 2007). En general, los mecanismos que participan en la homeostasis del Ca^{2+} tienden a mostrar

disfunción; sin embargo, existen diferentes interpretaciones debido a la variabilidad experimental, a la variedad de preparaciones celulares y a la heterogeneidad de las composiciones celulares.

- Uno de los principales cambios fisiológicos relacionado con la edad es la alteración de la plasticidad sináptica. La forma más conocida de plasticidad sináptica es la potenciación a largo plazo, conocida como LTP (*long-term potentiation*). La LTP representa un incremento de la transmisión sináptica (**Figura 22**). Se define como un incremento mantenido en la fuerza sináptica, en la que participa una compleja interacción de procesos pre- y postsinápticos, que a la larga dan lugar a cambios en la densidad sináptica de tipos específicos de receptores de glutamato (Bliss y Collingridge 1993). Estudios realizados principalmente en hipocampo han relacionado el papel del Ca^{2+} con la plasticidad sináptica. Parece crítico que para que se produzca la LTP se necesita la entrada de iones Ca^{2+} en la membrana postsináptica. Así, un aumento de la concentración de Ca^{2+} en la zona postsináptica es suficiente y necesario para inducir la LTP (Bliss y Collingridge 1993). Con el envejecimiento, la concentración de Ca^{2+} basal se ve aumentada (Khachaturian 1989). Esto hace que la excitabilidad neuronal se vea afectada, puesto que el aumento de la concentración de Ca^{2+} aumenta el umbral necesario para que se produzca la LTP. Es decir, sólo una fuerte estimulación induce la LTP en el sistema nervioso envejecido, mientras que una baja amplitud de estimulación, capaz de originar la LTP en los animales jóvenes, es ineficaz en los envejecidos (Foster 2007). Por el contrario, en las ratas envejecidas aumenta la susceptibilidad a la depresión a largo plazo (LTD, *long-term depression*), al disminuir el umbral necesario para que ésta se produzca, lo que en última instancia explica los déficits de aprendizaje y memoria asociados a la edad.

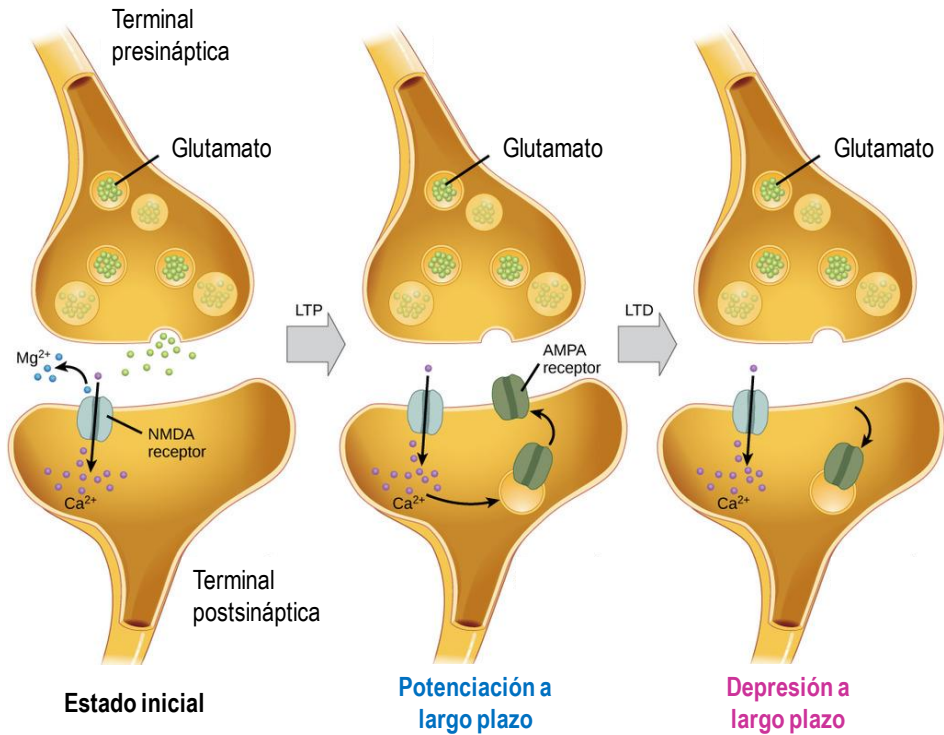


Figura 22. Potenciación y depresión a largo plazo. La entrada de Ca²⁺ a través de los receptores NMDA postsinápticos puede iniciar dos formas diferentes de plasticidad sináptica: potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD). La LTP surge cuando la sinapsis es estimulada repetidamente. Esta estimulación provoca una cascada celular de Ca²⁺ que se traduce en la inserción de más receptores de AMPA en la membrana postsináptica. La siguiente vez que el glutamato sea liberado desde la célula presináptica, se unirá a los receptores de NMDA y AMPA, por lo que la despolarización de la membrana será más eficiente. La LTD se produce cuando pocas moléculas de glutamato se unen a receptores de NMDA en una sinapsis. El Ca²⁺ que entra a través de los receptores de NMDA inicia una cascada de proteínas, resultando en la endocitosis de los receptores de AMPA. Esto hace que la neurona postsináptica sea menos sensible al glutamato liberado desde la neurona presináptica. Modificado de <https://www.boundless.com/biology/textbook>

- Una de las principales vías de entrada de Ca²⁺ al interior celular durante la excitación neuronal son los NMDARs. Éstos están involucrados en dos funciones que se ven afectadas en el envejecimiento: (1) en la plasticidad sináptica y la memoria, especialmente del hipocampo, y (2) en la excitotoxicidad en el SNC. Los estudios que han evaluado la función del NMDAR durante el envejecimiento, tanto *in vivo* como en rodajas o *in vitro*, han sido contradictorios. Muchos de ellos convergen en un

descenso de la efectividad a través de la señalización por NMDA. Este efecto parece estar relacionado con una disminución del número de NMDAR con la edad o en una disminución de su actividad (Magnusson 1998, Leihohla, Kellaway et al. 2008, Bodhinathan, Kumar et al. 2010). Por el contrario, otros autores proponen un aumento de la corriente del NMDAR con los días *in vitro* en cultivos primarios de neuronas corticales o de hipocampo (Ozawa, Nakamura et al. 1988, Murphy y Baraban 1990, Ujihara y Albuquerque 1992, Brewer, Thibault et al. 2007); o en experimentos realizados empleando cultivos celulares a corto plazo obtenidos de ratas envejecidas al compararlos con ratas de mediana edad (Cady, Evans et al. 2001). Esta disparidad en los resultados obtenidos podría deberse a la diferente aproximación utilizada o al diferente tipo celular empleado para el estudio.

- La otra vía de entrada de Ca^{2+} durante la activación neuronal son los VOCs. En el hipocampo, la mayoría de los estudios realizados indican que con la edad se produce un aumento en la entrada de Ca^{2+} a través de los canales VOCs, tal vez debido a un incremento del número de canales de tipo L (Thibault y Landfield 1996). Sin embargo, este cambio no sucede en todos los tipos neuronales, ni para cada tipo de VOC, lo cual indica que el envejecimiento afecta de forma diferente a cada región del cerebro. Ejemplo de ello es la vulnerabilidad específica de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del SNC, que se ven afectadas en la Enfermedad de Parkinson. Estas neuronas parecen depender de forma particular de los canales VOCs tipo L, dependencia que se ve aumentada con la edad (Chan, Guzman et al. 2007). Así, los canales tipo L en las neuronas envejecidas permanecen abiertos durante un tiempo mayor, causando sobrecarga de Ca^{2+} y conllevando a la pérdida neuronal que sucede en esta enfermedad.

- Los sistemas de extrusión de Ca^{2+} también se ven afectados en las neuronas envejecidas, pues el tiempo que necesitan neuronas para recuperarse de una estimulación normal se ve aumentado. Cierta número de estudios parecen indicar que tanto la actividad como la expresión de los niveles de la PMCA se ven significativamente reducidos durante en envejecimiento (Zaidi, Gao et al. 1998). La

disminución de esta actividad podría ser explicada por el efecto inhibitorio de los ROS sobre la PMCA, como un efecto directo en la actividad de la bomba (Zaidi y Michaelis 1999) o sobre la calmodulina, su principal regulador (Michaelis, Bigelow et al. 1996).

- Como sabemos, parte del Ca^{2+} que entra en las neuronas es tamponado rápidamente por varias proteínas que unen Ca^{2+} , como calbindina, calmodulina o parvalbúmina. En general, se aprecia una disminución con la edad en la expresión de estas proteínas en el SNC, aunque este hecho no sucede en todos los tipos neuronales, sino que es específico de cada tipo neuronal (Kishimoto, Tsuchiya et al. 1998).

El envejecimiento del sistema nervioso afecta tanto a los sistemas de extrusión como a los sistemas tamponadores de Ca^{2+} , de forma que su rendimiento disminuye con el envejecimiento. Esto supone que las neuronas envejecidas están expuestas a un mayor nivel de la concentración de Ca^{2+} citosólico, aun incluso si la entrada de Ca^{2+} no estuviera aumentada con el envejecimiento. Si además la entrada de Ca^{2+} se ve afectada, la disminución de la capacidad tamponadora multiplicará los efectos del aumento esta entrada, exponiendo a las neuronas envejecidas a una mayor magnitud del aumento de la concentración de Ca^{2+} .

4.1.1. Efecto del Envejecimiento en los Compartimentos Intracelulares de Ca^{2+}

- Poco se sabe de la homeostasis del Ca^{2+} del RE en el envejecimiento. Ciertos estudios mostraron que en las neuronas de hipocampo se produce un aumento de la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3R así como de los RyRs (Thibault, Gant et al. 2007). Sin embargo, este hecho no se produce en todos los tipos neuronales (Kirischuk y Verkhratsky 1996). Por otro lado, se ha mostrado una reducción de la actividad de la SERCA (Pottorf, Duckles et al. 2000). Actualmente, la atención se está centrando principalmente en la alteración de la homeostasis del RE en los procesos neurodegenerativos (ver apartado 4.3.2).

- Como ya hemos explicado, la mitocondria es el principal lugar de producción de energía de la célula, además de la principal fuente de liberación de ROS. Por eso, una alteración de la función mitocondrial durante el envejecimiento puede tener un efecto dramático en la señal de Ca^{2+} . Hasta la fecha existe poca o ninguna información en las propiedades de los transportadores de Ca^{2+} mitocondriales en el envejecimiento; pero sí se conoce que existe un cambio en el potencial de membrana mitocondrial, pues en ciertas preparaciones se ha observado que parte de las mitocondrias aparecen despolarizadas en el envejecimiento (Hagen, Yowe et al. 1997). Este hecho conlleva un aumento del nivel umbral de Ca^{2+} necesario para iniciar la captación mitocondrial (Xiong, Camello et al. 2004) y por tanto un descenso de la capacidad de la mitocondria de captar el exceso de Ca^{2+} en las neuronas envejecidas. Se ha propuesto que este cambio, que puede considerarse una desventaja a nivel metabólico, sea por el contrario una respuesta adaptativa, pues de esta forma se impide la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial (Toescu y Verkhratsky 2007).

Además, se sabe que las neuronas consumen grandes cantidades de energía para mantener los gradientes iónicos a través de las membranas. Durante el envejecimiento normal del SNC, existe una disminución en la eficiencia de la mitocondria para generar ATP (Navarro 2004). Cuando los niveles celulares energéticos se ven reducidos, como ocurre durante el accidente cerebrovascular isquémico (ictus), o en el envejecimiento y en ciertas enfermedades neurodegenerativas, los niveles de Ca^{2+} intracelulares permanecen elevados por la combinación de la entrada mantenida de Ca^{2+} a través de los receptores de glutamato o de los VOCs y la actividad dañada de las ATPasas (Nicholls 2008).

El resultado general de estos efectos es un aumento en la carga de Ca^{2+} que perjudica negativamente a la excitabilidad neuronal.

4.2. Modelos para el Estudio del Envejecimiento Fisiológico *In Vitro*

Para el estudio del envejecimiento fisiológico del cerebro pueden emplearse una amplia variedad de modelos, desde cultivos *in vitro* hasta animales *in vivo* o rodajas de cerebro. Los modelos animales o las rodajas de cerebros se destinan para el estudio del desarrollo neuronal o la degeneración, sin embargo, comprender los mecanismos a nivel celular o molecular en estos modelos resulta complicado, debido a la complejidad del tejido del sistema nervioso. Los sistemas *in vitro*, aunque carecen de las características de un tejido intacto, son menos complejos que el tejido neuronal, por lo que son ideales para estudiar la localización subcelular de proteínas neuronales o la homeostasis de ciertos iones. Las líneas celulares continuas no suelen emplearse, pues estas células al dividirse no envejecen de forma similar a las neuronas en condiciones reales. Por ello, la mayoría de los investigadores trabajan con cultivos primarios. El cultivo de células obtenidas de tejido procedente de un cerebro viejo supone una alta complejidad para el cultivo celular, tanto en su obtención como en su mantenimiento, por lo que los cultivos de neuronas se preparan normalmente a partir de embriones en los últimos estadios del desarrollo o de ratas recién nacidas. Está descrito que las neuronas primarias mantenidas durante largo tiempo en cultivo manifiestan muchos de los cambios que suceden en el envejecimiento *in vivo*. Así, muchos autores han mostrado que el empleo de neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo a largo plazo, obtenidas de embriones o de ratas neonatas, puede considerarse, al menos parcialmente, como un modelo para el estudio de diferentes aspectos del envejecimiento neuronal (Porter, Thibault et al. 1997, Brewer, Thibault et al. 2007, Sodero, Weissmann et al. 2011, Stanika, Villanueva et al. 2012). Por ejemplo, el aumento progresivo de la vulnerabilidad a la excitotoxicidad que sucede a medida que los cultivos envejecen se correlaciona con ciertos estudios *in vivo* (Liu, Stafstrom et al. 1996). Sodero y col. (Sodero, Weissmann et al. 2011) describieron que tras pocas semanas *in vitro*, las neuronas de hipocampo presentan muchas de las características típicas que acompañan al envejecimiento

neuronal *in vivo*, como son la acumulación de ROS, presencia de gránulos de lipofuscina, activación de la proteína quinasa N-terminal Jun (pJNK) y de las vías p53/p21, así como una pérdida gradual de colesterol.

La lipofuscina es un pigmento de color pardo-amarillento con fluorescencia propia, procedente de la degradación lisosomal incompleta de las mitocondrias dañadas. Este desecho celular se encuentra unido a la membrana plasmática, de forma que no puede ser degradado ni expulsado de la célula, sino que sólo se puede diluir a través de la división celular y el crecimiento posterior. De esta forma, la lipofuscina se acumula como un "pigmento de envejecimiento" (Gray y Woulfe 2005), característica que también se observa en las neuronas que han sido envejecidas en cultivo (Sodero, Weissmann et al. 2011).

A medida que envejecen, las neuronas de hipocampo en cultivo muestran un aumento del tamaño de los cuerpos celulares, así como la formación de una extensa red de neuritas (Banker y Cowan 1977). Esta fase de crecimiento en cultivo se caracteriza además por la sinaptogénesis, que les confiere unas características electrofisiológicas similares a las que presentan *in situ* o en rodajas (Basarsky, Parpura et al. 1994, Kuroda, Kobayashi et al. 1995).

A nivel mitocondrial, existe un cambio en el potencial de membrana mitocondrial, pues en ciertas preparaciones se ha observado que con el envejecimiento parte de las mitocondrias aparecen despolarizadas (Hagen, Yowe et al. 1997).

4.3. Calcio Intracelular y la Enfermedad de Alzheimer

Como hemos comentado anteriormente, el Ca^{2+} desempeña un papel fundamental en procesos de aprendizaje y memoria, y además participa en la supervivencia y muerte neuronal. A pesar de las grandes diferencias en la etiología de cada enfermedad neurodegenerativa, la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} ha

emergido como un mecanismo común en la muerte neuronal que sucede en la EA, en la Enfermedad de Parkinson, en la ELA y en otros desórdenes neurodegenerativos (Mattson 2007, Bezprozvanny 2009).

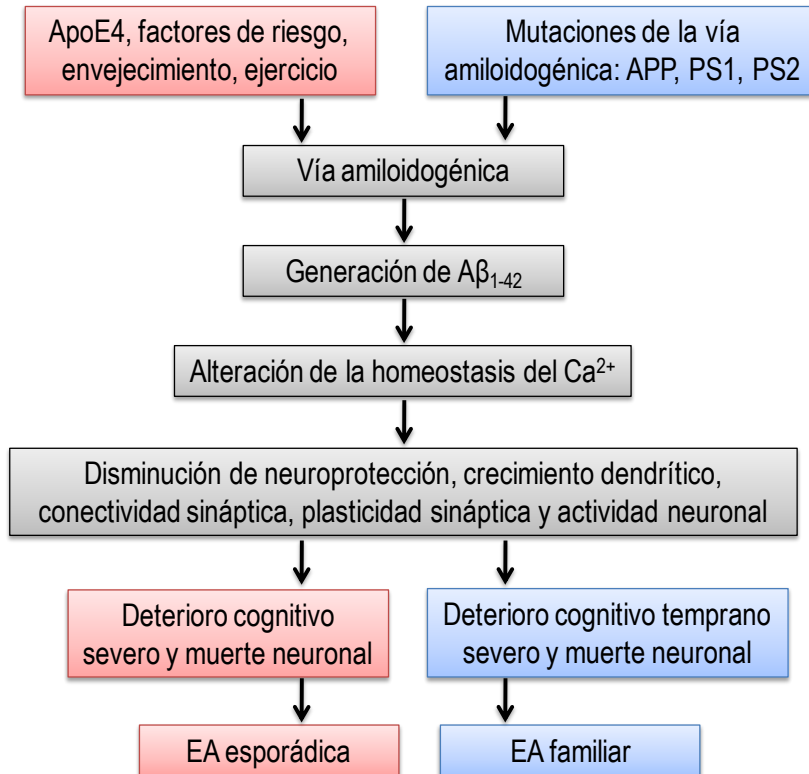


Figura 23. Hipótesis del Ca²⁺ en la Enfermedad de Alzheimer. Según esta hipótesis, factores de riesgo como el gen *APOE4*, la edad, la nutrición o el ejercicio, o mutaciones en la proteína precursora amiloide (APP) y en las presenilinas (PS1 y PS2) llevan a la generación de las formas tóxicas del péptido amiloide Aβ. Aβ provoca la alteración de la homeostasis del Ca²⁺, lo que puede resultar en el deterioro de la neuroprotección, así como del crecimiento dendrítico, conectividad sináptica, plasticidad sináptica y actividad neuronal. Finalmente esto lleva al deterioro cognitivo severo y a la muerte neuronal que suceden en la EA. Modificado de *Berridge 2010* (Berridge 2010).

La Hipótesis Del Calcio en la Enfermedad de Alzheimer (Khachaturian 1989, Mattson, Rydel et al. 1993) trata de explicar cómo la formación y acumulación

amiloide está implicada en la progresiva pérdida de memoria y en el aumento de la apoptosis neuronal. Esta hipótesis postula que la activación de la vía amiloidogénica provoca una remodelación de la vía de señalización de Ca^{2+} neuronal, alterando la homeostasis del Ca^{2+} y por tanto los mecanismos responsables del aprendizaje y memoria (**Figura 23**).

Es bien conocido que una gran variedad de funciones neuronales dependen de la señalización por Ca^{2+} intracelular. Por tanto, no es extraño suponer que una alteración del Ca^{2+} intracelular pueda estar en el origen del daño y la disfunción neuronal que se producen en la EA. Debido a que un aumento de Ca^{2+} elevado y sostenido, especialmente en la mitocondria, induce la producción de radicales libres (por alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial y la activación de las oxigenasas), parece que la perturbación de la homeostasis del Ca^{2+} contribuye a un mayor estrés oxidativo en las neuronas en la EA, resultando en una amplificación de la formación de radicales libres y procesos degenerativos mediados por Ca^{2+} . La alteración de la señalización por Ca^{2+} incluye tanto la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular como la liberación de este ión de los depósitos intracelulares.

4.3.1. Acumulación Amiloide y Entrada de Ca^{2+}

Mattson y colaboradores, describieron originalmente que la incubación con $\text{A}\beta$ durante varias horas producía un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, reflejando una disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Mattson, Cheng et al. 1992). Además, nuestro propio grupo de investigación ha propuesto que la interacción de $\text{A}\beta_{1-42}$ con la membrana plasmática resulta en un incremento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , y en un aumento de la vulnerabilidad de las neuronas a la toxicidad (Sanz-Blasco, Valero et al. 2008). Sin embargo, existe una gran controversia sobre cuál es el mecanismo por el que una alteración del Ca^{2+} intracelular inducida por el $\text{A}\beta$ promueve la muerte neuronal. Se ha planteado que el

A β puede aumentar la permeabilidad de la membrana al Ca²⁺ de forma no selectiva, formar nuevos poros de Ca²⁺, o regular canales de Ca²⁺ ya existentes (**Figura 24**).

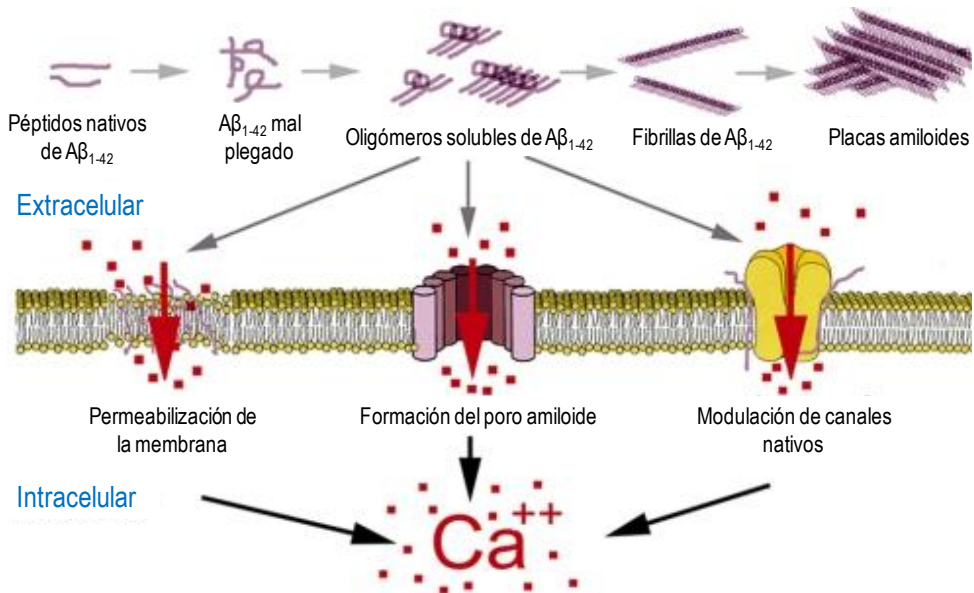


Figura 24. Esquema de la agregación del péptido amiloide y de los posibles mecanismos de toxicidad de los oligómeros solubles. Los agregados solubles de A β_{1-42} son considerados la forma más tóxica. El mecanismo de entrada de Ca²⁺ inducido por los oligómeros del péptido amiloide puede ser por un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, formación de un canal o poro amiloide, o modulación de canales ya existentes. Figura modificada de *Demuro et al., 2010*. (Demuro, Parker et al. 2010).

En los años 90, Arispe y col. plantearon un posible nexo entre el β -amiloide y la hipótesis del Ca²⁺ (Arispe, Rojas et al. 1993). Al exponer membranas artificiales al péptido amiloide, comprobaron que éste permitía el flujo de cationes al insertarse en la membrana plasmática y formar poros capaces de conducir iones, posibilitando la entrada de Ca²⁺ al interior celular. Así, el A β podría formar estructuras tipo canal catión-selectivas permeables a Ca²⁺ (conocidas como canal amiloide) en preparaciones de bicapas lipídicas y en una variedad de tipos neuronales, incluyendo líneas celulares (Zhu, Lin et al. 2000) y cultivos primarios de hipocampo (Simakova y Arispe 2006).

Años después, Demuro y colaboradores (Demuro, Mina et al. 2005) propusieron que el péptido amiloide aumentaba la permeabilidad de las membranas celulares, mediante un proceso independiente de la formación de canales iónicos. Por el contrario, atribuyeron este mecanismo a efectos inespecíficos que aumentaban los movimientos de los iones positivos y negativos a través de la membrana. De esta forma, el β amiloide disminuiría el grosor de las membranas neuronales, dificultando el mantenimiento de las concentraciones iónicas internas de las neuronas. Así, al aumentar la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} , se produciría un flujo de este ión desde el medio extracelular hacia el citosol, acompañado de una liberación de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .

Por otro lado, otros autores proponen que la capacidad del $\text{A}\beta$ de aumentar la vulnerabilidad de las neuronas a la excitotoxicidad parece estar mediado por el receptor NMDA (Mattson 2004), pues los oligómeros de $\text{A}\beta$ provocan un aumento en la actividad de este receptor. Según estos autores, el péptido amiloide aumentaría el flujo de Ca^{2+} cuando el neurotransmisor glutamato activa el receptor NMDA. Además, se ha descrito que este efecto sería inhibido por la Memantina, un antagonista de baja afinidad y no competitivo de este receptor (De Felice, Velasco et al. 2007). Recientemente se ha propuesto la existencia de un receptor de $\text{A}\beta$, la proteína priónica celular (PrP^c , *Cellular Prion Protein*), anclada a la zona externa de la membrana, que en asociación con el $\text{A}\beta$ puede aumentar la entrada de Ca^{2+} por receptores como el NMDAR (Lauren, Gimbel et al. 2009).

Otro mecanismo diferente por el que $\text{A}\beta$ perturba la homeostasis del Ca^{2+} neuronal es al inducir la peroxidación de los lípidos de membrana. La formación del péptido amiloide genera peróxido de hidrógeno (Hensley, Carney et al. 1994), un proceso que se ve facilitado por la presencia de Fe^{2+} y Cu^+ en el medio. H_2O_2 es seguidamente transformado en radicales hidroxilo que inician la peroxidación lipídica, generando lípidos tóxicos que alteran la función de las ATPasas y de los transportadores de glutamato y glucosa (Mark, Pang et al. 1997). Esto resulta en una sobrecarga de Ca^{2+} , disminución de los niveles de ATP celulares, disfunción sináptica, degeneración neuronal y finalmente deterioro cognitivo.

4.3.2. Procesamiento Amiloide y Liberación de Ca^{2+} de los Depósitos

Las presenilinas son proteínas integrales de membrana localizadas en el RE. Se expresan en muchos tipos de tejidos celulares; en el cerebro, las neuronas contienen principalmente PS1 y PS2. Muchas de las mutaciones en las presenilinas, causantes de la EA familiar, aumentan la producción de la forma $\text{A}\beta_{1-42}$ o reducen la producción de $\text{A}\beta_{1-40}$, de manera que las presenilinas perturban la homeostasis del Ca^{2+} activando los mecanismos mediados por $\text{A}\beta_{1-42}$ descritos anteriormente.

Además, se ha visto que en neuronas en cultivo que expresan mutaciones en la PS1, la cantidad de Ca^{2+} liberada desde el RE aumenta cuando éstas son expuestas a ligandos que estimulan la producción de IP_3 o la activación de RyRs (Guo, Furukawa et al. 1996). Una de las razones que pueden explicar este aumento de Ca^{2+} es que las mutaciones en las presenilinas alteren la función normal de proteínas reguladoras de Ca^{2+} (como la SERCA (Green, Demuro et al. 2008) o los IP_3R (Cai, Lin et al. 2006)). Sin embargo, estudios recientes sugieren que las presenilinas actúan como los canales *leak* del RE, independientemente de su función como γ -secretasas. De esta forma, las mutaciones en las presenilinas, que se dan en la EA familiar, tienen como resultado una pérdida de función de la actividad del canal *leak* de Ca^{2+} , provocando que este ión se acumule de forma excesiva en el RE (Nelson, Tu et al. 2007).

4.3.3. Enfermedad de Alzheimer y Mitocondria

Como resultado del aumento de la sensibilidad a la señalización por Ca^{2+} , la mitocondria puede activar la vía de apoptosis intrínseca inducida por Ca^{2+} . Como ya hemos explicado anteriormente, existe una comunicación RE - mitocondria que modula la señal de Ca^{2+} . Se ha postulado que cuando el Ca^{2+} acumulado en el RE es liberado al citoplasma a través de los IP_3Rs , una parte es captada por la mitocondria, de forma que ésta actúa como tampón de Ca^{2+} . En la EA, este flujo normal está

alterado, de forma que la cantidad de Ca^{2+} que capta la mitocondria puede verse aumentado. Si existe una captación excesiva de Ca^{2+} por la mitocondria, puede producirse la apertura del PTPm, colapso del potencial de membrana y liberación de factores como el cit C, que activarán la vía de las caspasas responsable de la apoptosis. Del mismo modo, el exceso de Ca^{2+} puede aumentar la producción de ROS, que a su vez contribuirá a la activación del PTPm (Berridge 2010) (**Figura 25**).

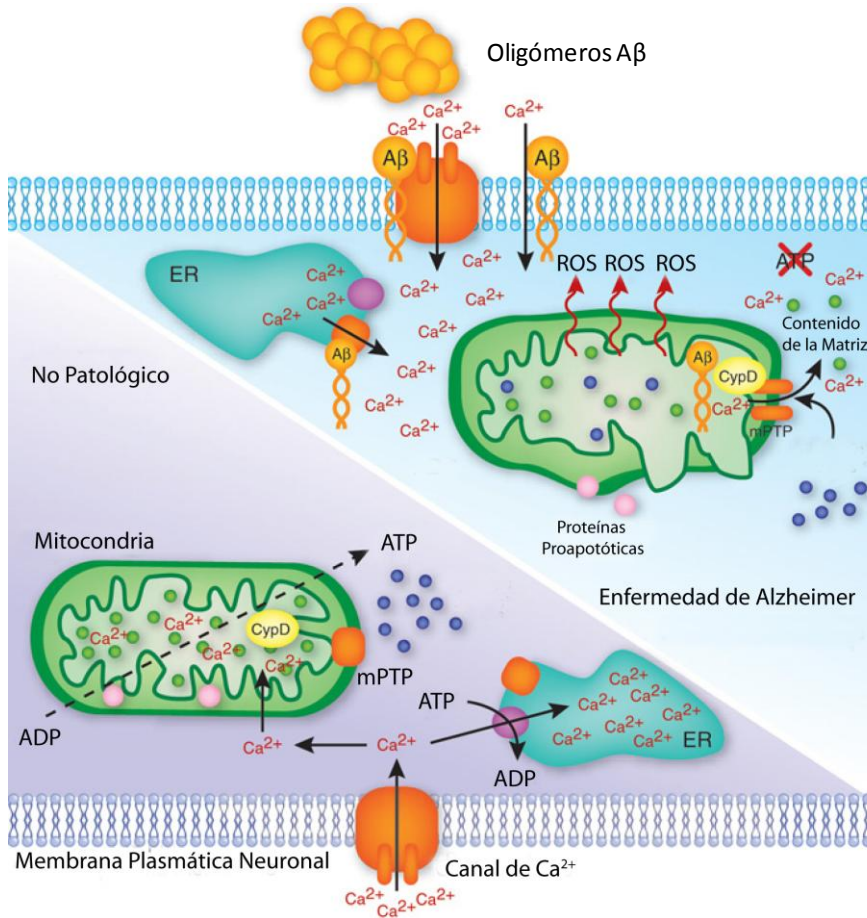


Figura 25. Modelo de la alteración mitocondrial inducida por péptido amiloide. En las neuronas sanas, el PTPm se encuentra cerrado, y la mitocondria produce ATP para mantener diferentes funciones. En neuronas afectadas por la EA, una acumulación de agregados de Aβ aumenta los niveles de Ca^{2+} citosólico a través de distintos canales en el RE y en la membrana plasmática. Una acumulación de Aβ o de Ca^{2+} en el interior de la mitocondria puede promover la apertura del PTPm, inhibiendo la producción de ATP y liberando proteínas proapoptóticas, llevando a la degeneración neuronal. Modificado de Starkov y Beal 2008 (Starkov y Beal 2008).

Además, nuestro grupo de investigación ha propuesto recientemente que los oligómeros de A β ₁₋₄₂, pero no las fibrillas, inducen entrada de Ca²⁺ al interior celular, lo que puede causar sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial, provocando una entrada masiva de Ca²⁺ y muerte celular por apoptosis en neuronas (Sanz-Blasco, Valero et al. 2008). Este efecto era esencial para la toxicidad causada por el péptido amiloide, pues la inhibición de la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial, gracias al empleo de desacoplantes mitocondriales, mostró proteger, al menos parcialmente, frente a la muerte neuronal asociada.

Por último, también se ha propuesto que el A β puede localizarse en las membranas mitocondriales (Caspersen, Wang et al. 2005), provocando cambios estructurales en éstas y desencadenando un aumento de la fragmentación mitocondrial, disminución de la fusión mitocondrial, disfunción mitocondrial y daño sináptico.

5. Excitotoxicidad y Enfermedades Neurodegenerativas

La excitotoxicidad es uno de los mecanismos que contribuye a la neurodegeneración en daños como isquemia, glaucoma, trauma y en ciertas enfermedades neurodegenerativas. Se define como la muerte celular que resulta por la acción tóxica de aminoácidos excitatorios o la sobreestimulación de receptores de estos aminoácidos.

La capacidad del sistema nervioso para transmitir información sensorial y órdenes motoras desde una zona del cuerpo a otra, y de establecer pensamientos y memoria, depende en gran medida de un único neurotransmisor excitatorio de gran potencia, el glutamato. Existen otros neurotransmisores excitatorios en el cerebro, pero el glutamato es el más común y el que se encuentra más ampliamente distribuido. La mayoría de las neuronas (y también las glías) contienen grandes

cantidades de glutamato (Lipton y Rosenberg 1994). Tras ser captado en vesículas sinápticas, el glutamato se libera durante cortos periodos de tiempo (milisegundos) para comunicarse con otras neuronas a través de las terminales sinápticas. Sin embargo, dado que el glutamato es tan potente, su presencia en altas concentraciones o durante periodos de tiempo muy largos puede sobreexcitar las células hasta llegar a producir su muerte.

La **Hipótesis de la Excitotoxicidad** fue propuesta inicialmente por Olney (Olney 1969), según la cual una estimulación excesiva de los receptores de glutamato lleva a hiperactivación y daño neuronal. Esta sobreestimulación puede ser debida a un aumento desmesurado de la concentración de glutamato, o a una activación prolongada de los receptores con un aumento moderado en la concentración de los aminoácidos excitatorios. Este hecho fue documentado por primera vez en los años 50, cuando Lucas y Newhouse observaron que el glutamato, inyectado subcutáneamente, dañaba selectivamente la capa interna de la retina, causando neurotoxicidad en las células ganglionarias (Lucas y Newhouse 1957). Posteriormente, Choi describió que la excitotoxicidad mediada por glutamato era debida al influjo de Ca^{2+} que se producía (Choi 1985). Para identificar los mecanismos que controlan esta excitotoxicidad mediada por Ca^{2+} , frecuentemente se emplean cultivos celulares. En muchas de estas preparaciones, se puede observar que a medida que las neuronas maduran en el cultivo, su vulnerabilidad al estímulo excitotóxico aumenta (Choi, Maulucci-Gedde et al. 1987).

Se sabe que la excitotoxicidad neuronal provocada por el glutamato está causada principalmente por el receptor ionotrópico de NMDA, probablemente debido a su alta permeabilidad a Ca^{2+} (Choi, Koh et al. 1988). En condiciones normales de transmisión sináptica, el NMDAR está bloqueado por Mg^{2+} localizado en el canal, y es activado únicamente durante cortos periodos de tiempo. Sin embargo, en condiciones patológicas, la sobreactivación del receptor provoca una entrada excesiva de Ca^{2+} a través del canal, que junto con la liberación de Ca^{2+} de los depósitos, aumenta la concentración de Ca^{2+} citosólico libre hasta niveles que exceden la capacidad de los mecanismos intracelulares reguladores de Ca^{2+} . Esto provoca la alteración del

metabolismo, dando lugar a ciertos procesos que desencadenan la muerte neuronal. Estos procesos incluyen la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, que provoca la formación de ROS, la activación de caspasas y liberación del factor inductor de la apoptosis (AIF); la activación de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) dependiente de Ca^{2+} , que lleva al aumento de la producción de NO y la subsecuente formación de ONOO^{\bullet} ; y la estimulación de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (MAPK p38), la cual activa factores de transcripción que pueden ir al núcleo y provocar apoptosis (Lipton 2005) (**Figura 26**).

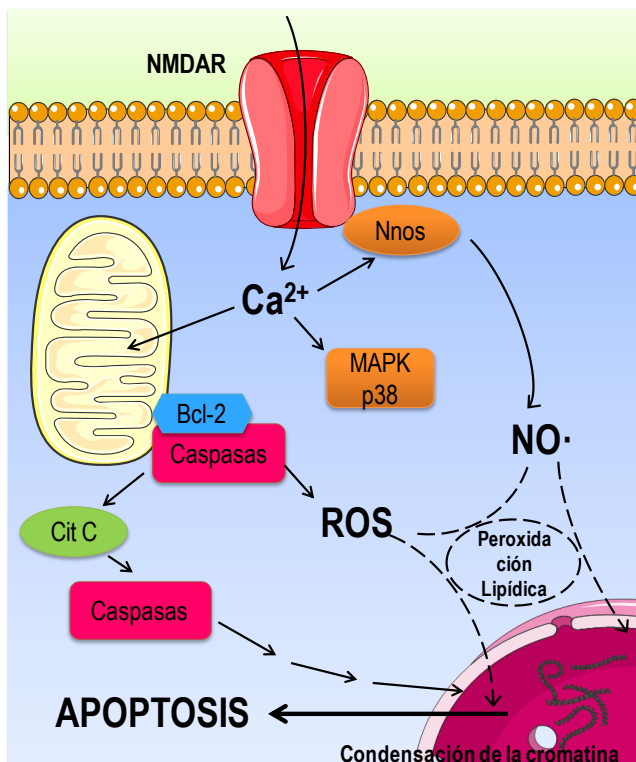


Figura 26. Esquema de las vías apoptóticas que conlleva la sobreactivación del receptor de NMDA. La cascada que lleva a la muerte neuronal incluye hiperactivación del NMDAR, activación de la MAPK p38, producción de radicales libres tóxicos como el óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS), y activación de enzimas que inducen apoptosis como las caspasas y el factor inductor de la apoptosis. nNOS, óxido nítrico sintasa neuronal, Cit C, citocromo C. Basado en Kaul y Lipton 2000 *NeuroAids Vol. 3, Issue 6 The NMDA Receptor - Its Role In Neuronal Apoptosis and HIV-Associated Dementia*.

Los receptores de glutamato tipo AMPA también participan en la excitotoxicidad, pues ciertos subtipos de este receptor (aquellos que no contienen la subunidad GluR2) son altamente permeables a Ca^{2+} y contribuyen al proceso de muerte en desórdenes como la isquemia (Turetsky, Canzoniero et al. 1994). Además, se sabe que la activación de los receptores AMPA despolariza la membrana debido a la entrada de Na^+ a través de ellos, lo que conlleva a la eliminación de la inhibición por Mg^{2+} dependiente de voltaje de los NMDARs.

Existe una amplia variedad de causas por las que se puede liberar glutamato de forma excesiva en el sistema nervioso, y producir excitotoxicidad. Cuando el sistema nervioso sufre un daño mecánico, como en el traumatismo craneoencefálico, desde las células dañadas se liberan grandes cantidades de glutamato. Estos niveles tan altos de glutamato pueden alcanzar a las células vecinas que han sobrevivido al trauma original, provocando su despolarización, hinchamiento, lisis y muerte por necrosis. Estas células pueden a su vez liberar más glutamato, de forma que se produce una cascada de sucesos autodestructivos y una progresiva muerte celular, que puede continuar durante horas o incluso días tras el daño inicial (**Figura 27**). Esto es lo que sucede en el ictus o accidente cerebro vascular. Así, durante el episodio isquémico, se produce una disminución del flujo sanguíneo, lo que lleva a una disminución del suministro de oxígeno, y por tanto del ATP necesario para la obtención de energía. Es por ello que las neuronas no obtienen la energía que necesitan para mantener la homeostasis iónica, de forma que éstas se despolarizan, lisan y mueren, y propagan el mismo tipo de eventos autodestructivos, que se aprecian en las lesiones traumáticas (Lipton 1993). Uno de los procesos más dañinos que tienen lugar en la isquemia cerebral es la producción de radicales libres y de otras especies oxidantes. Unos y otros provocan alteraciones de lípidos, ADN y proteínas, y contribuyen a la rotura de la barrera hematoencefálica y a la propagación del edema cerebral.

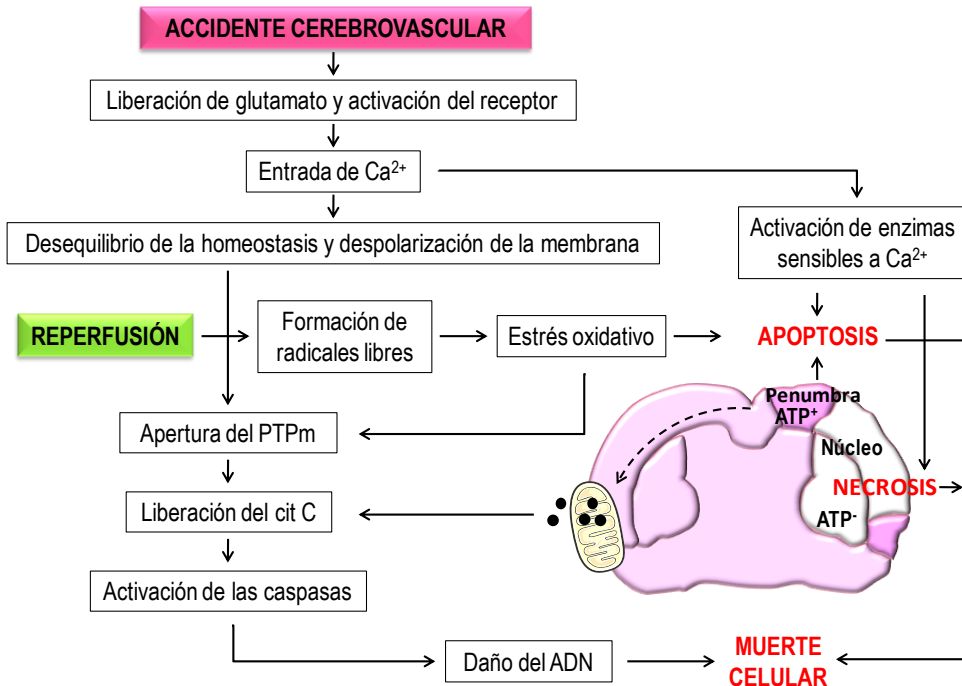


Figura 27. Esquema de los mecanismos del accidente cerebrovascular isquémico. La activación de los receptores de glutamato tras el accidente cerebrovascular isquémico conduce a la excitotoxicidad y la entrada de Ca^{2+} . Esto altera la homeostasis neuronal, que conduce a la activación de varias vías dependientes de Ca^{2+} , que incluyen proteasas y nucleasas. La reperfusion agrava el daño neuronal mediante la formación de radicales libres que dañan las membranas, proteínas y ADN. Además, la apertura del PTPm libera moléculas pro-apoptóticas, incluyendo el citocromo C, que activan la muerte celular por apoptosis. La muerte neuronal tras la isquemia será el resultado de mecanismos necróticos, apoptóticos y necroptóticos dependiendo de la gravedad de insulto. Basado en http://hexusacademicpublishers.com/table_contents_detail.

Otra forma más lenta y leve de excitotoxicidad es la que está implicada en algunos procesos degenerativos, como son la Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson, la Enfermedad de Huntington, Esclerosis Múltiple, Esclerosis Lateral Amiotrófica o glaucoma (**Figura 28**). En ellos, la exposición crónica a niveles moderados (aunque elevados) de glutamato o la hiperactividad de los receptores de glutamato durante periodos de tiempo más largos que los que suceden

de forma normal durante la neurotransmisión, provoca, a la larga, la muerte neuronal por apoptosis (Bonfoco, Krainc et al. 1995).

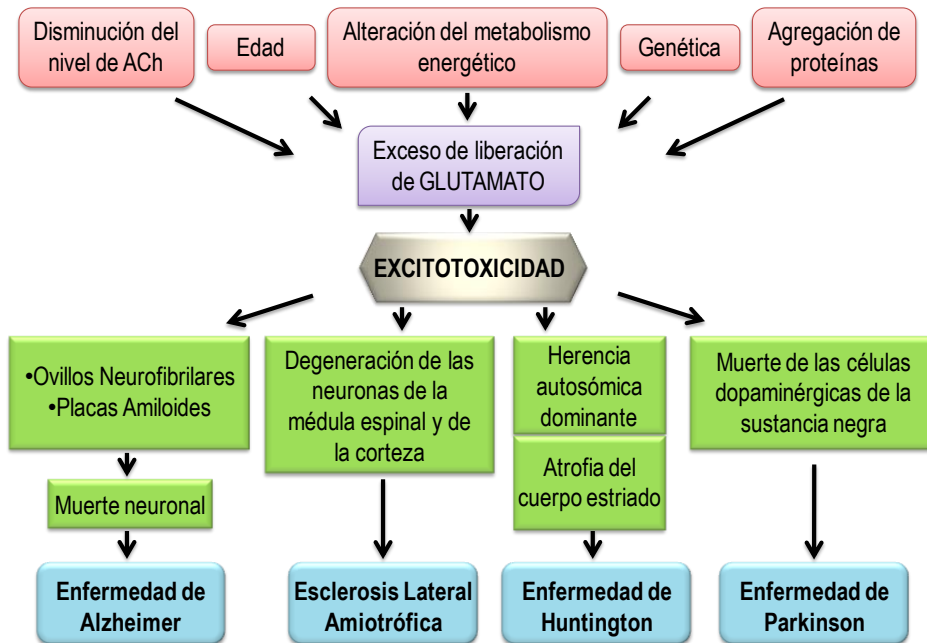


Figura 28. Factores del origen de las enfermedades neurodegenerativas. Ciertos factores como la alteración del nivel de los neurotransmisores en el cerebro, alteración del metabolismo energético, desarrollo de cuerpos de lewy junto con la edad y otros factores genéticos resulta en la sobreactivación de glutamato, el aminoácido excitatorio que cuando aparece en exceso desencadena respuestas excitotóxicas que provocan la muerte neuronal. Basado en *Mehta et al 2013* (Mehta, Prabhakar et al. 2013).

En la Enfermedad de Alzheimer, Greenamyre ya sugirió que el glutamato podía estar implicado en los mecanismos patológicos de esta enfermedad (Greenamyre, Maragos et al. 1988). Así, se ha visto que ciertos transportadores de glutamato se ven disminuidos en el cerebro de personas con EA (Li, Mallory et al. 1997). Además, el péptido β -amiloide parece aumentar la toxicidad del glutamato (Allen, Eldadah et al. 1999) así como la transmisión mediada por el receptor NMDA

(Wu, Anwyl et al. 1995). Finalmente, parece que una actividad excesiva del receptor NMDA aumenta la hiperfosforilación de la proteína tau, contribuyendo a la formación de los ovillos neurofibrilares (Couratier, Lesort et al. 1996).

Otros ejemplos son la excitotoxicidad que parece producirse en la Enfermedad de Huntington, un desorden neurodegenerativo que afecta a las funciones cognitivas y motoras, donde aparentemente la huntingtina mutante que se produce aumenta la actividad de los NMDARs, alterando la señalización por Ca^{2+} (Zhang, Li et al. 2008); o en la Enfermedad de Parkinson, donde se ha mostrado que ciertos antagonistas del NMDAR protegen contra el daño causado en las neuronas dopaminérgicas de estos pacientes (Sonsalla, Riordan et al. 1991).

6. Neuroprotección en la Excitotoxicidad y en las Enfermedades Neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas están caracterizadas por una progresiva disfunción neuronal y/o la pérdida de las neuronas más vulnerables. El objetivo de las estrategias neuroprotectoras es interferir con las cascadas que llevan a esta disfunción neuronal o muerte celular. Como ya hemos comentado a lo largo de esta introducción, los mecanismos más importantes que llevan a la muerte neuronal incluyen la acumulación de proteínas agregadas, disfunción mitocondrial, generación de ROS, excitotoxicidad, activación de MAPK, inmunogenicidad y apoptosis. La neuroprotección frente a la excitotoxicidad puede llevarse a cabo por (1) el bloqueo de receptores de glutamato, activados en condiciones patológicas, (2) bloqueo del aumento de la concentración de Ca^{2+} , (3) bloqueo del daño mitocondrial, (4) bloqueo de ciertas vías de señalización, como la ruta de las MAPK, o (5) inhibición de enzimas que producen sustancias nocivas, como la óxido nítrico sintasa, o de enzimas que participan en la muerte celular, como las caspasas.

Como hemos explicado en el apartado anterior, se cree que la excitotoxicidad contribuye al daño neuronal y a la muerte celular que sucede en ciertos desórdenes neurodegenerativos agudos y crónicos. Es por ello que la excitotoxicidad es una importante diana para la neuroprotección. Sin embargo, no está resultando una tarea fácil para los investigadores, pues el mismo proceso que, en exceso, conlleva a la excitotoxicidad y muerte celular, en niveles más bajos es completamente necesario para la función normal de las neuronas.

Para ser aceptada clínicamente, la terapia contra la excitotoxicidad producida en estos desórdenes degenerativos debe bloquear la activación excesiva del NMDAR, dejando su funcionamiento normal intacto para evitar efectos secundarios. Es por ello que, antagonistas que compitan directamente con el glutamato o la glicina en los sitios de unión al agonista (como el MK-801), bloquearán la función normal del receptor. Esto les ha llevado a fallar en los ensayos clínicos realizados debido a los efectos secundarios (como somnolencia, alucinaciones o incluso coma) (Palmer 2001). Es por ello que los últimos estudios parecen centrarse en las señales de muerte que se activan tras la activación del NMDAR, en lugar de en el bloqueo del propio receptor.

6.1. Anti-inflamatorios No Esteroideos

Los medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) poseen efecto anti-inflamatorio, analgésico y antipirético, por lo que se emplean para alivio del dolor, fiebre, e inflamación asociados con la artritis reumatoide, lesiones deportivas, y el dolor temporal. Sin embargo, el tratamiento con AINE puede ir acompañado de efectos adversos como el daño gastrointestinal o disfunción plaquetaria.

La acción mejor caracterizada de los AINEs es su capacidad para inhibir la ciclooxigenasa (COX), y así la formación de prostaglandinas, conocidas por desempeñar un papel importante en la respuesta anti-inflamatoria. La COX es una

enzima reguladora de la vía biosintética de los eicosanoides, encargados de producir una amplia gama de mediadores proinflamatorios, entre los que se encuentran las prostaglandinas. Parece que la inhibición de la COX por los AINEs limita la producción de eicosanoides proinflamatorios en la zona dañada.

Existen al menos dos isoformas de COX, COX-1 y COX-2, y la capacidad para inhibir cada una de ellas depende el AINE empleado. COX-1 se expresa constitutivamente en muchos tipos celulares; sin embargo COX-2 es inducible, es decir, su actividad se ve inducida por estímulos proinflamatorios, lo que resulta en una mayor formación de prostaglandinas durante la inflamación, tanto aguda como crónica. Es por esta razón que la COX-2 ha despertado un mayor interés en cuanto al desarrollo de fármacos, al tener menos efectos secundarios, especialmente en las úlceras de estómago. Además, COX-2 se expresa de forma selectiva en la corteza e hipocampo de cerebros carentes de patologías (Yasojima, Schwab et al. 1999).

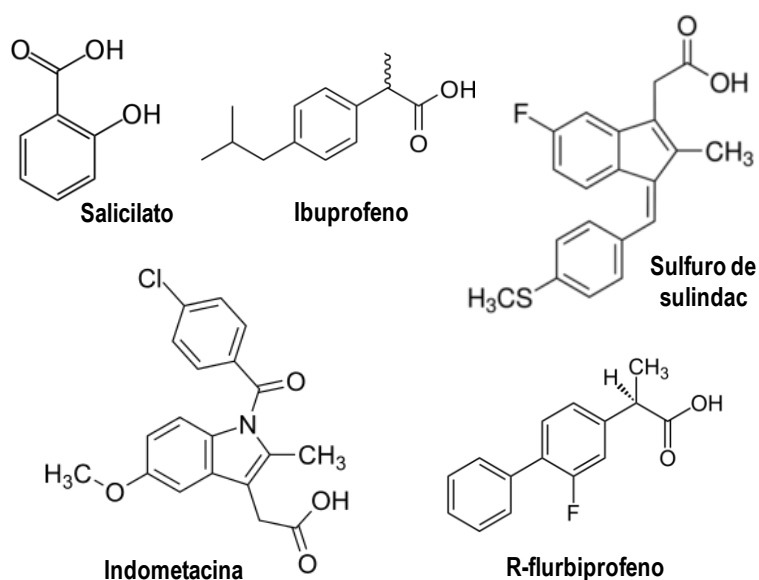


Figura 29. Estructura química de los AINEs empleados en este trabajo. Todos pertenecen al grupo de inhibidores no selectivos de la COX.

Existen dos tipos de AINEs, los inhibidores no selectivos de la COX y los inhibidores selectivos de la COX-2. Los primeros inhiben la COX-1 y poseen actividades diferentes frente a la COX-2. Como ejemplos encontramos la aspirina, ibuprofeno, naproxeno, indometacina o sulindac (**Figura 29**). Ejemplos de inhibidores selectivos de la COX-2 son celecoxib y rofecoxib. Es importante resaltar además que, debido a su estructura, algunos AINEs contienen un carbono quiral, dando lugar a dos enantiómeros diferentes, S- y R-, con diferentes acciones biológicas, siendo la forma S- la que inhibe la COX. Sin embargo, muchas de sus acciones parecen ser independientes de su efecto sobre la COX.

6.1.1. AINEs y Excitotoxicidad

Tras el accidente cerebrovascular, como el ictus u otras lesiones en el cerebro, los niveles de glutamato aumentan, provocando ciertas reacciones químicas que incluyen un aumento de la COX-2 y la subsecuente producción de prostaglandinas. El aumento de la actividad de la COX-2 parece estar relacionado con la excitotoxicidad provocada por el receptor de NMDA (Tian, Kim et al. 2008). La aspirina (ácido acetilsalicílico) es un medicamento recetado comúnmente, con un amplio espectro farmacológico. A concentraciones compatibles con las cantidades encontradas en plasma durante la terapia anti-inflamatoria crónica, el ácido acetilsalicílico y su metabolito, el salicilato, resultaron protectores frente a la toxicidad generada por el glutamato en cultivos neuronales y rodajas de hipocampo (Grilli, Pizzi et al. 1996). El sitio de acción de estos fármacos parece involucrar la inhibición específica de la inducción del factor nuclear kappa B (NF- κ B) mediada por glutamato. También se ha propuesto el empleo de otros AINEs, como piroxicam, inhibidor no selectivo de la COX, o celecoxib, inhibidor de la COX-2, para proteger frente a la excitotoxicidad causada por sobreestimulación del receptor de NMDA (Lin, Lu et al. 2014, Mazumder y Borah 2014).

6.1.2. AINEs y la Enfermedad de Alzheimer

Muchos de los estudios realizados durante los últimos años, aunque no todos, sugieren que el uso continuado de AINEs está asociado a la disminución del riesgo de padecer EA, retrasar su progreso y disminuir el grado de demencia (Etminan, Gill et al. 2003).

En el cerebro con EA, las neuronas en proceso de degeneración, los depósitos del péptido amiloide agregado y los ovillos neurofibrilares son zonas de inflamación. Determinados estudios parecen indicar que los procesos inflamatorios que se dan en el cerebro de estos pacientes son destructivos. Las observaciones preliminares llevadas a cabo por Vane en 1971 (Vane 1971) indicaban que los AINEs eran capaces de disminuir esta inflamación gracias a su capacidad de inhibir la COX. En relación con esto, posteriores estudios sugirieron que los efectos beneficiosos ejercidos por los AINEs estaban mediados por la inhibición de la COX-2, basándose en la observación de que la COX-2 neuronal está aumentada en estados tempranos de la EA (Ho, Purohit et al. 2001), además de expresarse en el cerebro normal en las regiones afectadas principalmente en la EA temprana (Braak y Braak 1991). Sin embargo, ciertos ensayos clínicos que han empleado AINEs inhibidores selectivos de la COX-2 en pacientes con EA, como celecoxib, han tenido resultados negativos (Aisen, Schmeidler et al. 2002, Aisen, Schafer et al. 2003), por lo que parece que la inhibición de COX-2 no es la responsable de los efectos protectores de los AINEs en la EA.

Por ello, se han estudiado otros posibles mecanismos que pudieran estar implicados en la acción anti-inflamatoria de los AINEs en la EA, como son su capacidad para inhibir de la síntesis del radical NO (Di Girolamo, Farina et al. 2003); la inhibición de ciertos factores de transcripción relacionados con la inflamación y citoquinas inflamatorias, como el NF- κ B, que parece estar elevado en el cerebro de pacientes con EA (Sung, Yang et al. 2004); o su capacidad para estimular la actividad del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ), un receptor nuclear que inhibe la expresión de genes proinflamatorios y cuyos niveles parecen estar

disminuidos en la EA, inhibiendo de esta forma la respuesta inflamatoria (Sastre, Dewachter et al. 2003).

Otras hipótesis propuestas para explicar el efecto beneficioso de los AINEs en la EA independientemente de su efecto sobre la COX son su actividad en el procesamiento de APP, y en la producción o agregación del péptido amiloide. De esta forma, ciertos estudios sugieren que algunos AINEs, como ibuprofeno o indometacina, disminuyen la producción de $A\beta_{1-42}$ *in vitro* y en modelos de ratón con EA (Weggen, Eriksen et al. 2001), además de estimular la vía no-amiloidogénica (Avramovich, Amit et al. 2002).

Sin embargo, debido al fracaso de los ensayos clínicos llevados a cabo recientemente, la capacidad de los AINEs para tratar la EA está aún sometida a debate. Este fracaso puede ser debido a diversos factores, como por ejemplo que los pacientes en los que se centraron los estudios tuvieran ya EA leve o moderado, las características farmacológicas de los AINEs o la dosis suministrada. Este es el caso de Flurizan™ (también conocido como tarenflurbil), que fracasó en la Fase 3 de ensayo clínico hace unos años. Flurizan™ es el enantiómero R- del flurbiprofeno, un AINE estructuralmente y farmacológicamente relacionado con el ibuprofeno, empleado para el tratamiento de algunas condiciones inflamatorias. Debido a su conformación R-, el R-flurbiprofeno carece de actividad anti-inflamatoria. Flurizan™ fue probado para el tratamiento de pacientes con Enfermedad de Alzheimer leve a moderada, ya que disminuyen la producción de $A\beta_{1-42}$ (Weggen, Eriksen et al. 2001), pero no mostró diferencias entre el grupo placebo y el grupo de tratamiento (Green, Schneider et al. 2009). El uso de dosis inapropiadas, la carencia de potencia o la necesidad de aplicar estos tratamientos en estadios más tempranos de la enfermedad podría explicar el fallo de estos ensayos.

Nuestro grupo, entre otros, ha propuesto y publicado recientemente la capacidad de los AINEs de actuar como agentes neuroprotectores empleados a bajas concentraciones. Así, una batería de AINEs, como el sulfuro de sulindac, indometacina, ibuprofeno y R-flurbiprofeno, que carece de actividad anti-inflamatoria,

todos a bajas concentraciones (1 μM), protegieron de la muerte celular inducida por oligómeros del péptido amiloide al despolarizar parcialmente la mitocondria, inhibiendo así la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y evitando la liberación del citocromo C en cultivos de granos de cerebelo (Sanz-Blasco, Valero et al. 2008).

II. OBJETIVOS

Con los antecedentes descritos en la introducción, planteamos la siguiente **hipótesis** de trabajo:

El envejecimiento neuronal y ciertas enfermedades neurodegenerativas, en concreto la EA, están asociados con un aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ y la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} de los orgánulos subcelulares, entre los que se incluye el RE y la mitocondria. El **objetivo general** de esta tesis es, por tanto, estudiar la posible alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular con el envejecimiento, y su implicación en la susceptibilidad a la muerte que ocurre en patologías como la excitotoxicidad y en la Enfermedad de Alzheimer.

Los **objetivos específicos** planteados para este trabajo fueron los siguientes:

1. Estudiar el remodelado del Ca^{2+} intracelular en neuronas de hipocampo de rata en cultivo primario a tiempos cortos de cultivo (neuronas consideradas jóvenes) y a tiempos largos de cultivo (neuronas envejecidas en cultivo), con especial énfasis en la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y en la captación mitocondrial de Ca^{2+} .
2. Estudiar el efecto del tratamiento crónico con oligómeros del péptido amiloide sobre el remodelado del Ca^{2+} intracelular en neuronas de hipocampo consideradas jóvenes y envejecidas en cultivo primario.
3. Estudiar la vulnerabilidad de las neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas a distintos estímulos excitotóxicos (NMDA) o neurodegenerativos (oligómeros del péptido amiloide), así como el papel del remodelado del Ca^{2+} intracelular en la vulnerabilidad y las bases moleculares del mismo.
4. Determinar el posible efecto neuroprotector de diversos AINEs en la muerte neuronal inducida por el envejecimiento y agentes excitotóxicos y neurodegenerativos, así como el papel del Ca^{2+} intracelular en la posible neuroprotección.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A. MÉTODOS EXPERIMENTALES:

1. Cultivos Celulares

1.1. Obtención de Neuronas de Hipocampo

Las neuronas de hipocampo fueron extraídas de ratas Wistar neonatas (0 - 1 días tras el nacimiento), siguiendo el protocolo de Brewer *et al.* (Brewer, Torricelli *et al.* 1993) y con las modificaciones introducidas por Perez-Otano *et al.* (Perez-Otano, Lujan *et al.* 2006) en condiciones estériles. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, se abrió el cráneo y se extrajo el cerebro cuidadosamente con la ayuda de una espátula. Tras realizar un corte diagonal con el bisturí en cada hemisferio, las partes seccionadas se transfirieron a una placa de petri con medio HAM'S F12. Bajo la lupa se eliminaron las meninges y se separó el hipocampo de la corteza, con la ayuda de unas tijeras oculares. El tejido hipocampal se cortó en pequeños fragmentos (alrededor de 2 x 2 mm) y se transfirió a un tubo eppendorf conteniendo 1,8 ml de una solución de papaína previamente filtrada (concentración final 20u./ml), donde se dejó incubando durante 30 min a 37 °C para permitir la acción de la enzima, con ligera agitación ocasional. A los 15 min de incubación, se añadió ADNasa I (concentración final 50 µl/ml). Pasados los 30 min, los pedazos del tejido se llevaron a un tubo de 11 ml, donde se lavaron 3 veces con medio Neurobasal. Posteriormente se disociaron con una pipeta de plástico de 5 ml para obtener una suspensión celular consistente en una mezcla de neuronas y glías. Las células se centrifugaron a 160 g durante 5 min, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió suavemente en 900 µl de medio Neurobasal suplementado con 100 µl de suero de caballo. Las células se sembraron a una densidad de 30×10^3 células/pocillo sobre cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro, previamente esterilizados en EtOH y tratados durante 24 h con poli-D-lisina (1 mg/ml), localizados en placas de 4 pocillos conteniendo 500 µl de

Neurobasal por pocillo. Se cultivaron en medio Neurobasal suplementado con L-glutamina (2 mM), gentamicina (1 µg/ml), 2% B27 y 10% FBS; y se mantuvieron en el cultivo de 2 a 21 días antes de realizar los experimentos, sin cambios posteriores de medio, en un incubador humidificado a 37° C y 5% CO₂. La **Figura 30** muestra la anatomía del cerebro humano y de rata respectivamente. La **Figura 31** muestra de forma esquematizada la obtención del cultivo.

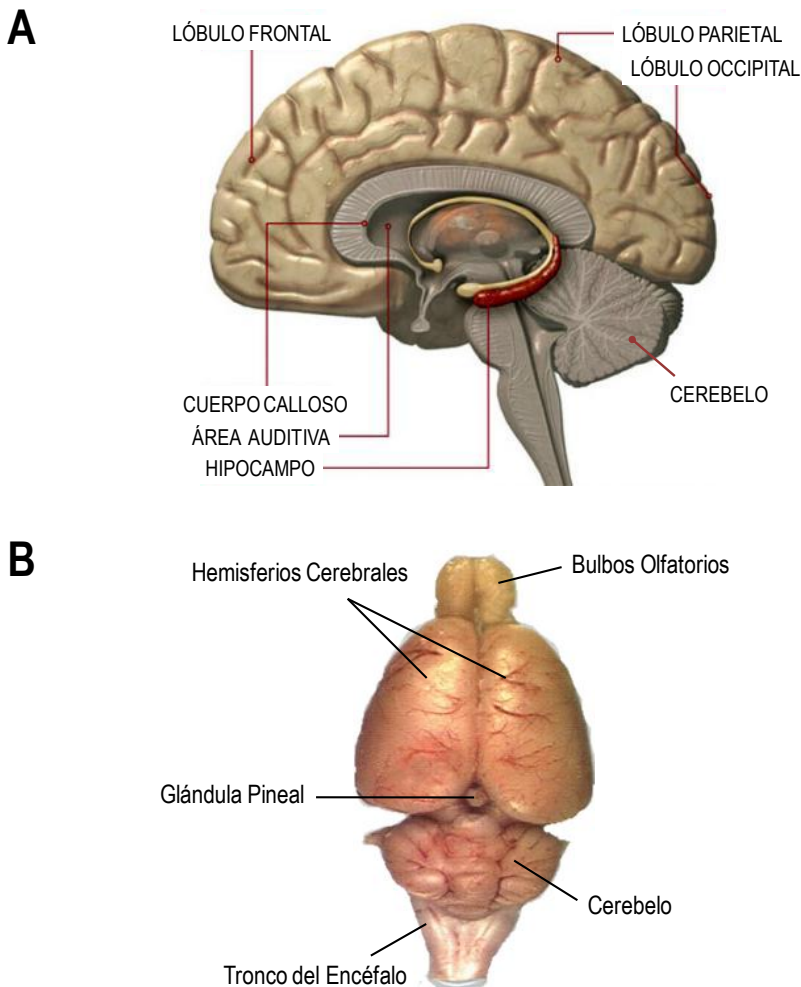


Figura 30. Anatomía de los cerebros humano y de rata. A. Corte longitudinal del cerebro humano, donde se muestran algunas de las principales zonas de éste, incluyendo el hipocampo entre otros. Modificado de <http://www.shockmd.com/2009/06/02/hippocampus-and-depression/>. **B.** Vista dorsal del cerebro de rata, cuya anatomía es similar al cerebro humano. Imagen tomada de Synapseweb, Kristen M. Harris.

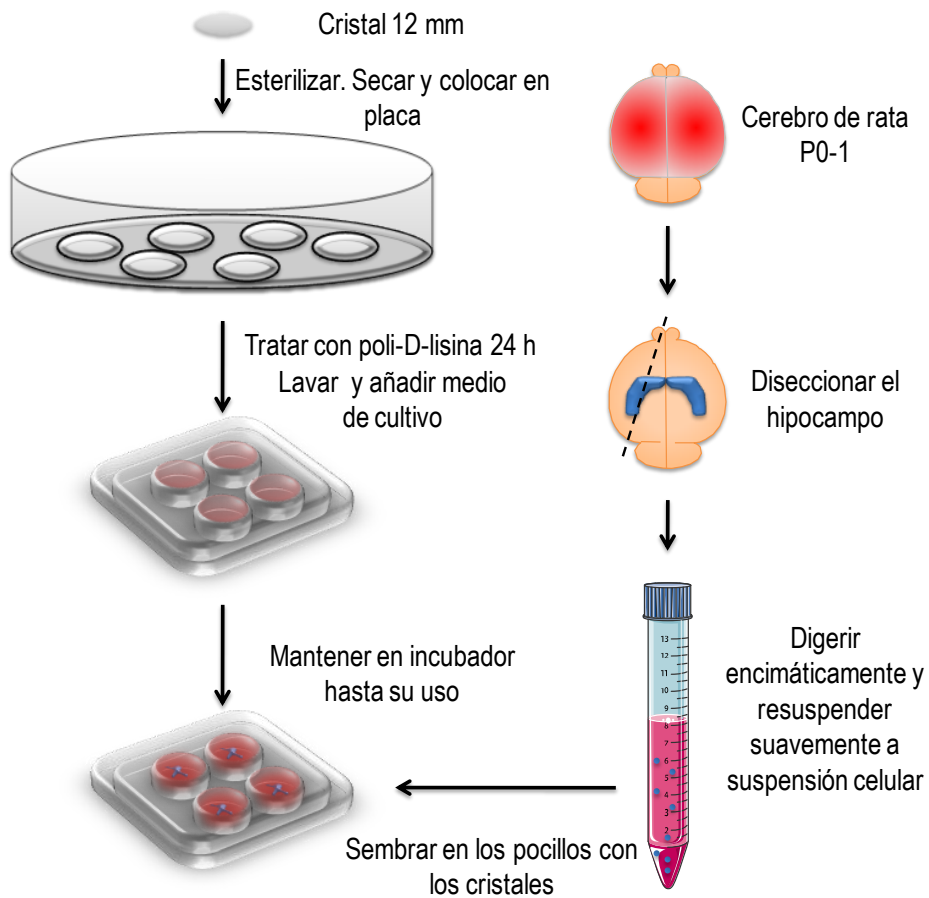


Figura 31. Preparación del cultivo de neuronas de hipocampo. Basado en *Kaech y Banker 2006* (Kaech y Banker 2006).

2. Técnicas Inmunocitoquímicas

Los cultivos primarios de hipocampo utilizados en este trabajo están compuestos por dos tipos celulares: neuronas y glías. Para poder realizar estudios de señal de Ca^{2+} o de viabilidad celular a nivel de célula única, es necesario diferenciar en el cultivo las neuronas de las glías, y estudiar así los efectos sobre las neuronas de forma independiente. Empleando técnicas de inmunocitoquímica, podremos correlacionar el comportamiento de cada célula individual con su naturaleza fenotípica

(Nuñez, Sanchez et al. 1996). La inmunocitoquímica es una técnica de inmunotinción empleada para la localización de moléculas presentes en las células mediante el empleo de anticuerpos. Está basada en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente al correspondiente antígeno. Estos anticuerpos han sido previamente conjugados con sustancias que hacen posible su detección posterior, como las sustancias fluorescentes, ferritina, peroxidasa o partículas de oro. Finalmente, las muestras marcadas por inmunofluorescencia son examinadas bajo un microscopio de fluorescencia (como es nuestro caso) o un microscopio confocal.

Para identificar los dos tipos celulares se realizó una doble inmunocitoquímica (**Figura 32**). Las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% en una solución de tampón fosfato (PBS) durante 20 minutos. Tras lavar las células fijadas con PBS, se trataron con Tritón x-100 al 0,1% durante 10 minutos. Después de otro lavado con PBS, las células fueron incubadas con suero de cabra al 20% durante 10 minutos, para suprimir uniones inespecíficas del anticuerpo. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios (**Tabla 2**) preparados en medio PBS con 10% de suero de cabra y una dilución 1:300 durante 1 hora. Para identificar las neuronas se utilizó como anticuerpo primario anti- β -tubulina III de ratón (anti-IgG β -tubulina III), que se une a la proteína β -tubulina III específica del citoesqueleto de neuronas. Para la identificación de las glías se empleó un anticuerpo de conejo anti-proteína fibrilar ácida (anti-IgG GFAP), proteína que no se expresa en neuronas. Una vez acabada la incubación con los anticuerpos primarios, los cubreobjetos se lavaron de nuevo con PBS, y posteriormente se incubaron durante 45 minutos y en oscuridad con los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugado con FITC, que emite fluorescencia verde y anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594, que emite fluorescencia roja. Estos también fueron preparados en medio PBS con 10% de suero de cabra, a una dilución 1:300. Los núcleos fueron marcados con DAPI, preparado 1:5000 en PBS con suero de cabra al 10% e incubado durante 5 minutos. Por último, los cubreobjetos se colocaron sobre un portaobjetos con medio de montaje (50% glicerol en PBS) y se procedió a la captura de imágenes en el microscopio de fluorescencia.

Célula	Anticuerpo Primario	Dilución Primario	Anticuerpo Secundario	Dilución Secundario
Neurona	anti-IgG β -tubulina III	1:300	anti-IgG ratón conjugado con FITC	1:300
Glía	anti-IgG GFAP	1:300	anti-IgG conejo conjugado con Alexa Flúor 594	1:300

Tabla 2. Anticuerpos y diluciones empleados en la doble inmunocitoquímica.

La **Figura 32** muestra un campo representativo de doble inmunocitoquímica realizada en un cultivo primario mixto de neuronas y glías de hipocampo a 11 días de cultivo.

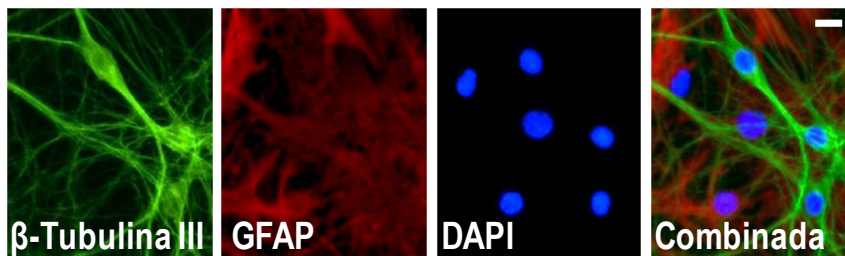


Figura 32. Doble inmunocitoquímica. Imagen de una doble inmunocitoquímica realizada de un cultivo primario mixto de hipocampo, donde se aprecian las neuronas, marcadas con β -tubulina III (verde), las glías, marcadas con GFAP (rojo), y los núcleos teñidos con DAPI (azul). La barra representa 10 μ m.

También hemos empleado técnicas de inmunofluorescencia en la detección de las diferentes subunidades del NMDAR y para la detección del uniportador de calcio mitocondrial (MCU). Para ello, las neuronas de hipocampo cultivadas durante diferentes periodos (2, 8, 15 y 21 DIV) fueron fijadas en PFA al 4% en PBS e incubadas con el correspondiente anticuerpo primario (detallados en la **Tabla 3**) toda la noche a 4 °C. Como anticuerpo secundario se empleó Alexa Flúor 488, con el que se incubó 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. En todos los casos se realizó

un experimento control, en ausencia de anticuerpo primario, para descartar la posible tinción por inespecificidad del anticuerpo secundario. La densidad óptica promedio fue medida en cada neurona de forma individual utilizando el software Image J.

Subunidad	Anticuerpo Primario	Dilución Primario	Anticuerpo Secundario	Dilución Secundario
NR1	anti-IgG NR1	1:100	anti-IgG conejo (Alexa Flúor 488)	1:300
NR2A	anti-IgG NR2A	1:100	anti-IgG conejo (Alexa Flúor 488)	1:300
NR2B	anti-IgG NR2B	1:100	anti-IgG conejo (Alexa Flúor 488)	1:300
MCU	anti-IgG MCU	1:200	anti-IgG conejo (Alexa Flúor 488)	1:300

Tabla 3. Anticuerpos y diluciones empleados en la detección de las subunidades del NMDAR y del uniportador de calcio mitocondrial.

3. Medida de la Autofluorescencia

La lipofuscina, conocida como el "pigmento de envejecimiento" es considerada como un biomarcador válido para la edad de las células tales como las neuronas. (Gray y Woulfe 2005). Para detectar la autofluorescencia emitida por los gránulos de lipofuscina, de color pardo-amarillento, las células se lavaron en PBS y la autofluorescencia emitida se captó en el canal rojo (650 nm) gracias a un microscopio de fluorescencia (Martin, Trovo et al. 2011). La **Figura 33** muestra la autofluorescencia tomada con el canal rojo de una neurona marcada con anti-IgG β -tubulina III conjugado con FITC.

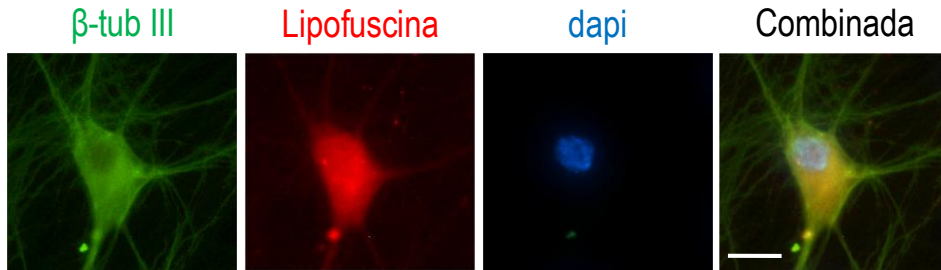


Figura 33. Imagen representativa de inmunofluorescencia en neuronas fijadas. La imagen muestra la tinción con anti-IgG β -tubulina III conjugado con FITC, autofluorescencia de lipofuscina en rojo, dapi en azul y la imagen combinada de las tres. La barra blanca representa 10 μ m.

4. Medida de la Concentración de Calcio

4.1. Medida de la Concentración de Calcio Citosólico mediante Imagen de Fluorescencia

La medida de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ a nivel de célula única se realizó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el colorante fura-2/AM. Se trata de un indicador fluorescente para el estudio de la señal de Ca^{2+} intracelular, procedente de la molécula de fura-2. Fue desarrollado por el grupo de Tsien a mediados de los años 80 (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985), y es a su vez un derivado del quelante de Ca^{2+} EGTA, cuyos restos aromáticos le proporcionan las propiedades fluorescentes. El fura-2 es una molécula muy polar, por lo que es incluido en las células en forma de su derivado acetoximetil éster (fura-2/AM), capaz de difundir pasivamente a través de las membranas celulares gracias a su hidrofobicidad. Una vez en el interior de las células es hidrolizado por esterasas liberando la molécula de fura-2 ácido, quedando así retenido el fluoróforo en el interior (**Figura 34**).

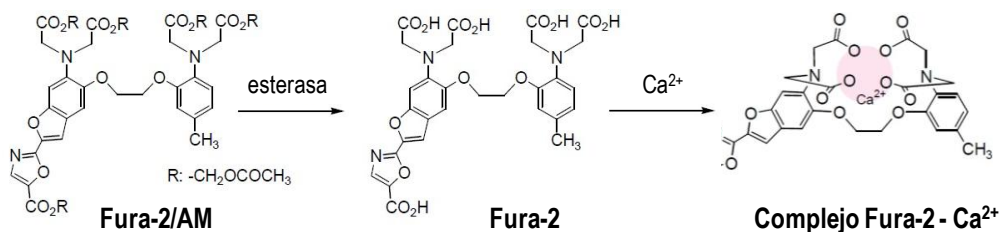


Figura 34. Estructura química del fura-2/am, fura-2 ácido y el complejo fura-2- Ca^{2+} .

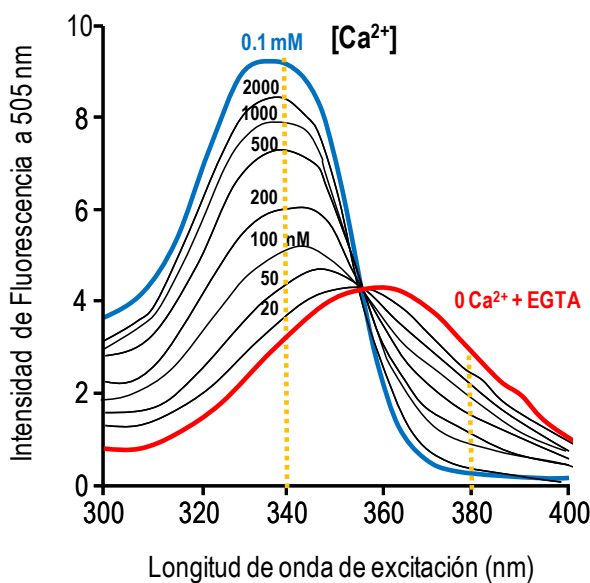


Figura 35. Espectro de excitación del fura-2. La gráfica muestra la emisión de fluorescencia de la molécula de fura-2 a 505 nm cuando es excitado con longitudes de onda entre 300 y 400 nm. Medidas realizadas con Ca^{2+} libre a concentraciones entre 20 nM y 0,1 mM, a 20 °C. Se observa cómo el máximo de emisión del complejo fura-2- Ca^{2+} sucede a 340 nm, y el mínimo a 380 nm. Al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ aumentará la fluorescencia a 340 nm y disminuirá a 380 nm. Modificado de *Grynkiewicz et al., (1985)* (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985).

La **Figura 35** muestra el espectro de excitación del fura-2 para diferentes concentraciones de Ca^{2+} (nM). Se representa la intensidad de fluorescencia emitida por el colorante a 510 nm tras la excitación con distintas longitudes de onda, de forma

que se puede apreciar cómo varía la intensidad con la concentración de Ca^{2+} libre. La fluorescencia emitida por el fura-2 aumenta con concentraciones crecientes de Ca^{2+} al excitar el fluoróforo a 340 nm, pero sin embargo disminuye cuando es excitado a 380 nm. Como consecuencia, el registro de emisión de fluorescencia a dos longitudes de onda de excitación nos permite obtener la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, estimada a partir de la relación entre las intensidades detectadas al excitar con 340 y 380 nm (cociente o ratio F340/F380), que es independiente de la cantidad de colorante acumulado dentro de la célula, del espesor de ésta y de la intensidad de la luz de excitación. Otros factores como la distribución desigual del colorante o el "*photobleaching*" también son minimizados, puesto que afectan a ambas longitudes de onda de la misma forma (Tsien 1988). Gracias a que el fura-2 presenta una considerable intensidad de fluorescencia por molécula, es posible utilizarlo en pequeñas concentraciones, evitando problemas de tamponamiento de Ca^{2+} como ocurre con otros indicadores. El registro obtenido de fluorescencia emitida en tiempo real permite la monitorización de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en las células vivas (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985).

En ciertos experimentos en que el fura-2 pudiera estar saturado, se utilizó su derivado de menor afinidad, el fura-4F, en su forma de acetoximetiléster (AM) para ser permeable a la membrana.

Para las medidas de Ca^{2+} citosólico, las células sembradas en cubreobjetos a una densidad de 30×10^3 células/pocillo se cargaron con fura-2/AM o fura-4F/AM 4 μM durante 1 h a temperatura ambiente y oscuridad. La incubación se realizó en MEC, compuesto por (en mM): NaCl 145, KCl 5, MgCl_2 1, CaCl_2 1, Glucosa 10; Hepes/NaOH 10, pH 7.42. Después de la incubación, los cubreobjetos con las células se colocaron en la cámara de un microscopio invertido (Zeiss Axiovert S100 TV). Las células fueron constantemente perfundidas con un sistema de perfusión (Warner Instruments) termostaticado a 37 °C y epi-iluminadas alternativamente con luz monocromática de excitación a 340 y 380 nm gracias a una lámpara halógena (Zeiss X-Cite Series 120) y una rueda de filtros de excitación sincronizada (Warner Instruments). La fluorescencia emitida a longitudes de onda superiores a 520 nm fue

recogida a través de un objetivo 40x (Zeiss 40/1.30 oil), y una cámara digital Hamamatsu Orca-ER (Hamamatsu Photonics France) (**Figura 36**).

Como se mencionaba anteriormente, se trata de un cultivo mixto, donde están presentes neuronas y células de la glía. Por tanto, es necesario identificar ambos tipos para estudiar su respuesta de forma independiente. Las neuronas son fácilmente diferenciables de la glía por transmisión en el microscopio: aparecen en fase brillante, presentan procesos (axones y dendritas) y soma redondeado, y se encuentran en un plano focal diferente de la capa glial.

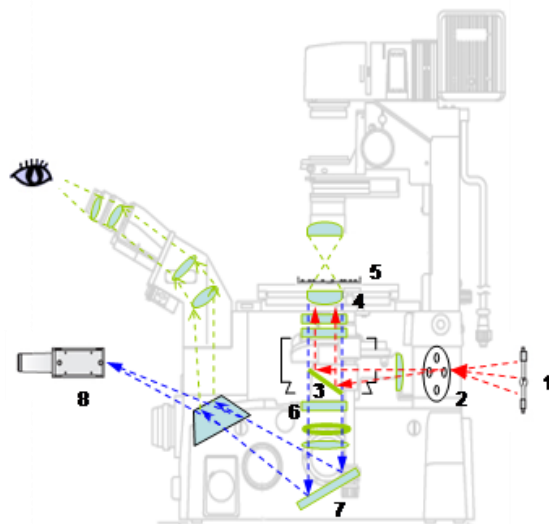


Figura 36. Representación del equipo de imagen de fluorescencia empleado para los experimentos de determinación de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. (1) Lámpara de fluorescencia de excitación (línea roja) que atraviesa la rueda de filtros monocromados de excitación (2). El espejo dicróico, inclinado 45° respecto del haz incidente (3) desvía la luz hacia la cámara termostatzada con células (5). Las imágenes de fluorescencia emitidas (línea azul) se recogen a través de un objetivo de inmersión 40x (4) (Nikon, fluor 40/1.30 oil), pasan a través de un espejo dicróico (6), son filtradas por un filtro de emisión ($\lambda = 520$ nm) (7) y son capturadas por una cámara de alta sensibilidad de adquisición de imágenes (8). Finalmente las imágenes son procesadas en un ordenador.

Los valores de fluorescencia se analizaron utilizando un procesador de imágenes de Hamamatsu y se analizaron con el programa de análisis AquaCosmos

2.0 de Hamamatsu. Las imágenes consecutivas obtenidas de las fluorescencias emitidas a 340 y 380 nm de excitación (**Figura 37**) se dividieron píxel a píxel, y los valores de todos los píxeles en cada región de interés (ROI) fueron promediados.

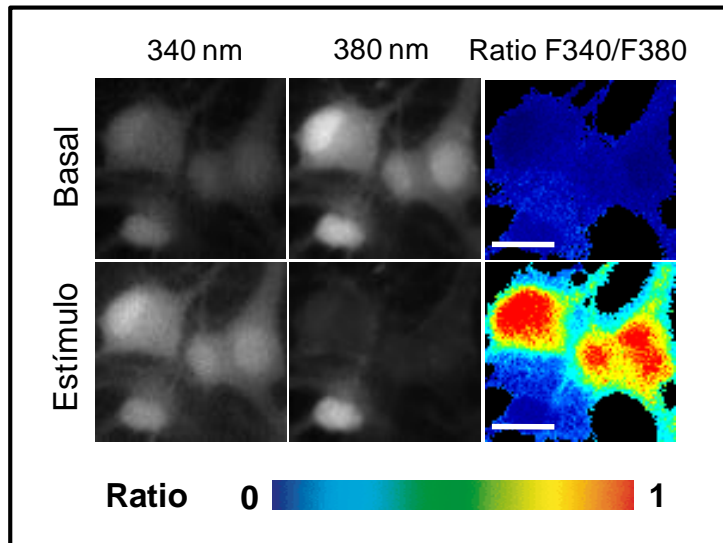


Figura 37. Imagen de Ca^{2+} citosólico mediante microscopía de fluorescencia. Imágenes típicas de fluorescencia de neuronas cargadas con fura-2/AM y excitadas a 340 y 380 nm, así como el valor del cociente de las F340/F380 codificado en pseudocolor en situación de reposo (basal) y tras la estimulación (estímulo). La escala de pseudocolor bajo las imágenes muestra el código de colores para el ratio de las fluorescencias de 0 (azul) a 1 (rojo). Obsérvese que la estimulación aumenta la fluorescencia excitada a 340 nm y disminuye la emisión de fluorescencia excitada a 380 nm. Las barras blancas representan 10 μm .

En los registros de medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se muestra en el eje de ordenadas el cociente de fluorescencias (Ratio F340/F380), que es directamente proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Para el análisis cuantitativo de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se calculó el incremento del Ratio F340/F380 (representado como ΔRatio) o el área bajo la curva (representado con las siglas abc), ambos mediante el software OriginLab. Las curvas fueron definidas como el periodo entre el que se aprecia un aumento significativo del ratio de fluorescencia y su vuelta al nivel basal tras un estímulo. En aquellos experimentos en que no todas las células respondieron al estímulo, se calculó además el porcentaje de respuesta. Para mostrar las diferencias globales entre poblaciones, se calculó un nuevo

parámetro de entrada de Ca^{2+} que comprendiera el área bajo la curva de las células que presentaban un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, y la fracción de células que respondieron (Fracción que responde), para lo que multiplicamos ambos valores (representado como $\text{Ca}^{2+} \times \text{Fracción}$).

4.2. Medida de la Concentración de Calcio Mitocondrial mediante Imagen de Bioluminiscencia con Aequorinas Recombinantes

La monitorización de los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en orgánulos intracelulares requiere sondas de Ca^{2+} basadas en proteínas susceptibles de ser dirigidas específicamente al orgánulo a estudiar, en este caso la mitocondria. Para ello, hemos utilizado la proteína aequorina (AEQ) dirigida a la mitocondria.

La AEQ es una fotoproteína procedente de la medusa *Aequorea victoria*, que emite luz azul en presencia de Ca^{2+} sin necesidad de ser iluminada, propiedad conocida como *Bioluminiscencia*. Por su alta sensibilidad a Ca^{2+} y sus propiedades biológicas, la AEQ ha sido utilizada durante décadas como indicador de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en células intactas. Tras el aislamiento y purificación de la AEQ (Shimomura, Johnson et al. 1962) y su microinyección en células vivas como indicador de las señales de Ca^{2+} intracelulares (Ridgway y Ashley 1967, Blinks, Rudel et al. 1978, Cobbold 1980), las técnicas de ingeniería genética han posibilitado construir vectores que permiten su direccionamiento hacia diferentes compartimentos subcelulares, incluyendo la mitocondria (Rizzuto, Simpson et al. 1992), núcleo (Brini, Murgia et al. 1993), retículo endoplásmico (Montero, Brini et al. 1995, Badminton, Campbell et al. 1996) y citosol (Badminton, Campbell et al. 1996), para monitorizar la homeostasis del Ca^{2+} en ellos.

La AEQ es un complejo formado por apoaequorina, celenterazina y oxígeno molecular. La luz emitida por la AEQ tiene lugar una vez reconstituida la proteína a su forma activa. Durante la reconstitución, la apoaequorina, expresada en las células, se

une a su cofactor, la celenterazina. Ésta es una molécula muy lipofílica, por lo que es capaz de atravesar las membranas celulares con facilidad (Blinks, Prendergast et al. 1976). La AEQ presenta tres dominios de unión a Ca^{2+} (Shimomura, Johnson et al. 1962, Shimomura 1995), de forma que cuando el Ca^{2+} se une, el oxígeno molecular es liberado, y la celenterazina es oxidada a celenteramida, lo cual resulta en la emisión de luz azul (465 nm) (Figura 38). Una vez oxidada la celenterazina a celenteramida, la unión de la apoaecorina a una nueva molécula de celenterazina es muy lenta, por lo que el proceso puede considerarse esencialmente irreversible.

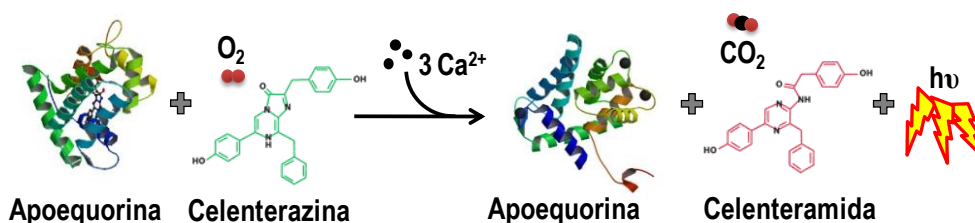


Figura 38. Proceso de bioluminiscencia de la aequorina. La aequorina es un complejo formado por una apoproteína de 21,4 kDa, oxígeno molecular y celenterazina (luciferina que actúa de grupo prostético). Cuando la aequorina es activada por el Ca^{2+} sufre un cambio conformacional, y la celenterazina es oxidada a celenteramida. La aequorina libera entonces la celenteramida, la cual se encuentra en un estado excitado. Ésta retorna al estado basal emitiendo luz azul a 465 nm.

Es por ello que la cantidad de proteína disponible para la medida de Ca^{2+} disminuye progresivamente a lo largo de cada experimento, siendo la velocidad de consumo relativa proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el entorno, en nuestro caso, en la mitocondria.

Con la AEQ nativa se miden concentraciones de Ca^{2+} comprendidas entre 0,1 y 10 μM (Blinks, Rudel et al. 1978). Pero en entornos con altas concentraciones de Ca^{2+} , la velocidad de consumo de la AEQ nativa es tan alta que ésta se agotaría en pocos segundos, por lo que su uso en estos dominios sería poco práctica. Para poder medir los niveles de Ca^{2+} del orden de cientos de μM esperados en las

mitocondrias (Montero, Alonso et al. 2000) es necesario reducir la afinidad por Ca^{2+} de la AEQ al menos dos órdenes de magnitud. Para ello, se utiliza una AEQ mutante de baja afinidad por el Ca^{2+} (mutAEQ) en la que el residuo aspártico en posición 119 está sustituido por alanina (Asp119-Ala). La mutación modifica uno de los dominios de unión a Ca^{2+} de la proteína, reduciendo la afinidad un orden de magnitud (Kendall, Sala-Newby et al. 1992). Es decir, con esta mutAEQ se puede ampliar el rango de medida hasta $100 \mu\text{M}$ de $[\text{Ca}^{2+}]$ (Montero, Brini et al. 1995). En segundo lugar, se emplea la celenterazina *n*, un derivado semi-sintético que sustituye a la celenterazina nativa (wt), reduciendo así la velocidad de emisión de luminiscencia (Shimomura, Kishi et al. 1993), y ampliando el rango de medida al nivel del mM (Alvarez y Montero 2002). Debido a que cada molécula de AEQ emite un único fotón cuando se une el Ca^{2+} , la bioluminiscencia observada puede que no tenga la suficiente intensidad para ser detectada. El desarrollo de cámaras ultrasensibles para la monitorización de Ca^{2+} subcelular ha permitido la monitorización a nivel de célula única, eliminando este obstáculo.

En los experimentos de medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ donde el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ es mucho menor (liberación de Ca^{2+} de los depósitos), se empleó la celenterazina *h*, de alta afinidad por Ca^{2+} , cuya intensidad relativa puede ser 10 ó 20 veces la de la apoaequorina reconstituida con celenterazina *wt*, y pudiendo así medir pequeños cambios en la concentración de Ca^{2+} (Shimomura, Musicki et al. 1993).

Para transformar los datos de luminiscencia en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$, es necesario conocer la cantidad total de luminiscencia emitida por la AEQ en cada experimento. Por ello, al final de cada experimento las células fueron perfundidas con digitonina $100 \mu\text{M}$, detergente que permeabiliza la membrana plasmática, en presencia de una solución con exceso de Ca^{2+} (Ca^{2+} 10 mM), lo cual permite liberar toda la luminiscencia residual de la AEQ. Posteriormente, un programa informático substraer el fondo de los valores de luminiscencia en cada punto. El método empleado, descrito por Brini y col. en 1995 (Brini, Marsault et al. 1995) está basado en la relación existente entre la $[\text{Ca}^{2+}]$ y la proporción de luz (L) medida en cuentas por segundo (cps) registradas en un momento dado del experimento menos el fondo, frente a las

que se registrarían si toda la AEQ de la célula se expusiera de repente a una $[Ca^{2+}]$ saturante ($L_{m\acute{a}x}$). Para transformar los valores del cociente $L/L_{m\acute{a}x}$ en valores de $[Ca^{2+}]$ se utilizó el siguiente algoritmo matemático:

$$[Ca^{2+}] (M) = [(L/L_{m\acute{a}x} \lambda)^{1/n} + (L/L_{m\acute{a}x} \lambda)^{1/n} K_{TR}-1] / [K_R - (L/L_{m\acute{a}x} \lambda)^{1/n} K_R];$$

donde,

- λ , es la constante de velocidad de consumo de AEQ a la $[Ca^{2+}]$ saturante.
- K_{TR} , es la proporción de sitios en estado T frente al estado R. Cada uno de los sitios de unión al Ca^{2+} de la AEQ puede encontrarse en estados T o R. La emisión de bioluminiscencia se produce cuando todos los sitios de unión se hallan en estado R, al cual se une el Ca^{2+} .
- K_R , es la constante de asociación a Ca^{2+} .
- n , es el número de sitios de unión a Ca^{2+} .

Tanto este algoritmo como los parámetros (K_{TR} , K_R , n y λ) derivan de un modelo matemático propuesto originalmente para explicar, desde un punto de vista molecular, la dependencia de la luminiscencia de la AEQ respecto de la $[Ca^{2+}]$, aunque se puede utilizar como una simple transformación matemática independiente del modelo (Allen, Blinks et al. 1977).

Para los experimentos de imagen de bioluminiscencia, las neuronas de hipocampo fueron transfectadas con el plásmido que contiene la AEQ nativa o la mutada de baja afinidad por Ca^{2+} . Ésta lleva unida la proteína fluorescente verde GFP (del inglés *green fluorescent protein*) (mutGAmitt) (Rogers, Stinnakre et al. 2005) obtenida también de la *Aequorea victoria*. Gracias a ésta, las células transfectadas con la sonda son identificadas en el microscopio por fluorescencia, permitiéndonos elegir un campo adecuado en el que realizar el experimento. Además, el plásmido con la GFP unido a la aequorina le proporciona una mayor estabilidad y facilita la imagen de bioluminiscencia al aumentar la cantidad de fotones emitidos.

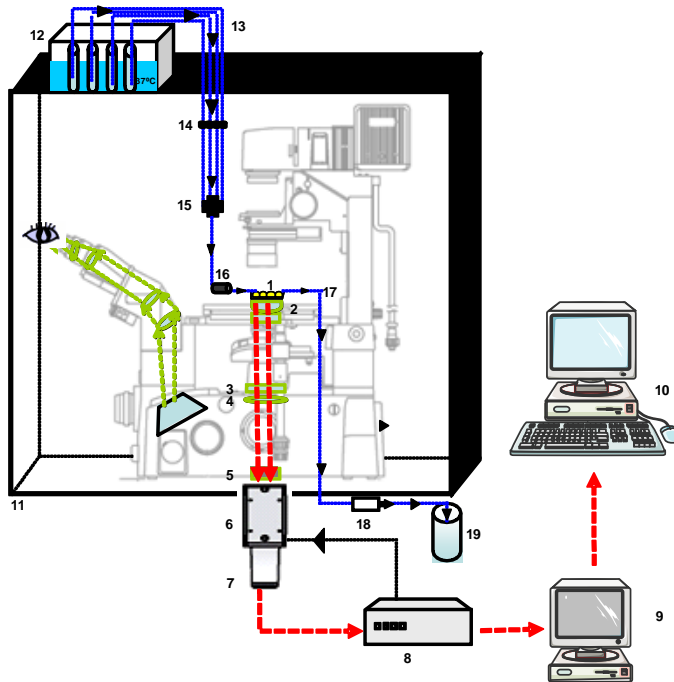


Figura 39. Esquema del equipo de imagen de bioluminiscencia para monitorizar Ca^{2+} subcelular (mitocondrial). El sistema consiste en un microscopio invertido al que se acopla una plataforma termostaticada para las células (1), equipado con un objetivo de inmersión en aceite Zeiss 40x/1.30 oil (2). La luz proveniente de las células transfectadas con AEQ pasa a través de distintos elementos ópticos: un analizador (3) y una lente de tubo (4). La luz pasa directamente a través de un puerto trasero por un adaptador sin lente (5) y un intensificador (6). Una vez que ha sido amplificada la luz es capturada en una cámara de video (7). La señal va entonces a través del procesador de imagen (8) y de un monitor RGB (9), para ser procesada finalmente en un ordenador (10). El microscopio debe estar bien aislado de la luz por una caja opaca (11). Las soluciones están en un baño a 37 °C (12), y pasan a través de tubos de silicona (13), controlados por un sistema de válvulas de Warner (14). Todos los tubos convergen en un colector (15) a un único tubo de silicona que pasa a través de un intercambiador de calor lineal de Warner a 37 °C (16) antes de alcanzar la cámara termostaticada (1). El medio es absorbido por otro tubo (17) unido a la plataforma y adaptado a una bomba de vacío (18) acoplada a una botella de desechos (19). El sistema puede estar equipado por una fuente de excitación y una rueda de filtros para capturar imagen de fluorescencia.

Las células transfectadas fueron incubadas durante 2 h en medio estándar MEC suplementado con celenterazina nativa, *h o n* 4 μM , en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez reconstituida la fotoproteína, los cubreobjetos con las células se colocaron en la cámara termostaticada a 37 °C de un microscopio invertido

(Zeiss Axiovert S100 TV). Utilizamos dos modelos celulares diferentes, células intactas o permeabilizadas con digitonina. En el primero, las células fueron perfundidas de forma continua con medio estándar MEC precalentado a 37 °C (Warner Instruments) en presencia de los estímulos correspondientes. La velocidad de flujo de las soluciones de perfusión fue aproximadamente de 4 ml/min, siendo el tiempo necesario para el recambio del medio en la cámara de perfusión unos pocos segundos.

En los experimentos con células permeabilizadas, la perfusión se realizó en un medio cuya composición simula a la intracelular (MIC), aplicando primero digitonina 50 μM para la permeabilización de la membrana mitocondrial durante 1 min. A continuación, las células se perfundieron con este mismo medio conteniendo 200 nM Ca^{2+} , en ausencia o presencia de AINEs durante 5 - 7 minutos. Seguidamente se perfundió con 10 μM Ca^{2+} libre en MIC, en ausencia o presencia del correspondiente AINE. Los medios con bajas concentraciones en Ca^{2+} se prepararon con distintas concentraciones de CaCl_2 y los tampones de Ca^{2+} H-EDTA y tris-EGTA de acuerdo al programa informático MaxQuelator (Chris Patton, Universidad de Stanford).

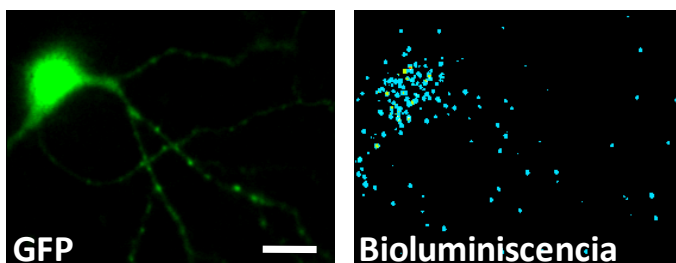


Figura 40. Medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ por imagen de bioluminiscencia. Célula transfectada con mitGAmut (imagen de fluorescencia) (izquierda) y fotones emitidos como consecuencia de la unión del Ca^{2+} a la AEQ (imagen de bioluminiscencia) (derecha).

Todos los experimentos finalizaron con la perfusión de digitonina 100 μM en MEC con 10 mM de Ca^{2+} con el fin de consumir la AEQ restante y liberar los fotones

remanentes. Las imágenes de bioluminiscencia se capturaron con una cámara contadora de fotones Hamamatsu VIM acoplada a un procesador de imagen Argus-20, y se integraron en periodos de 10 segundos. Los fotones emitidos por cada célula en cada imagen fueron cuantificados utilizando el software Aquacosmos 2.6 de Hamamatsu (**Figura 39**). Los datos se cuantificaron como porcentaje de emisión de fotoluminiscencia entre las cps y se dividieron por el periodo de integración (L/L_{TOTAL} en s^{-1}). Las emisiones fotónicas se convirtieron en valores de $[Ca^{2+}]_{mit}$ de la forma descrita anteriormente (Montero, Alonso et al. 2000, Villalobos, Caballero et al. 2012). Una imagen de fluorescencia fue tomada antes de cada experimento (**Figura 40**). Otros detalles han sido descritos previamente (Villalobos, Nadal et al. 2005, Nuñez, Senovilla et al. 2007).

4.2.1. Amplificación del Plásmido y Transfecciones Transitorias

Los plásmidos mitGA y mitGAmut se amplificaron mediante la transformación de bacterias competentes de *E. coli*. Este plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina, que permite seleccionar únicamente las bacterias transformadas gracias a la adición de ampicilina al medio de cultivo. Tras la amplificación, se procedió a la extracción y purificación de ADN plasmídico empleando un sistema de columnas de intercambio iónico (kit comercial MaxiPrep de Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las neuronas de hipocampo fueron transfectadas mediante liposomas, gracias al reactivo Lipofectamine® 2000, de forma que el ADN plasmídico complejo a lípidos se expresó en las células. La lipotransfección se realizó tratando las neuronas, sembradas en cubreobjetos a una densidad de 30×10^3 células/pocillo, con 2,5 μ l de lipofectamina y 4 μ g de ADN por cada pocillo, en medio Neurobasal sin suero ni aditivos durante 30 minutos. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron con medio Neurobasal fresco y se devolvieron al medio Neurobasal original. Los experimentos se realizaron a las 24 h de la transfección.

5. Estudio del Potencial Mitocondrial

El potencial mitocondrial en células intactas fue monitorizado por imagen de fluorescencia en células cargadas con la sonda fluorescente TMRM (éster metílico de la tetrametilrodamina). Esta sonda posee carga positiva y su solubilidad lipofílica le permite acumularse en las mitocondrias gracias al potencial negativo de éstas con respecto al citosol (Nuñez, Valero et al. 2006, Valero, Senovilla et al. 2008). Cuando se produce una despolarización mitocondrial se produce la salida del colorante de las mitocondrias y, por tanto, la disminución de la fluorescencia de la sonda acumulada en ellas.

Para las medidas, las células se incubaron con TMRM (10 nM) durante 30 min a temperatura ambiente, tras los cuales el cubreobjetos con las células se colocó en la cámara de perfusión de un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100 TV. Las neuronas fueron perfundidas continuamente con MEC precalentado a 37 °C. Las imágenes de fluorescencia se capturaron a intervalos de 10 s con una videocámara Hamamatsu Orca-ER. Los experimentos finalizaron con la adición del desacoplante mitocondrial FCCP (10 μ M), concentración que lleva al colapso del $\Delta\Psi$ (Valero, Senovilla et al. 2008), midiendo así la fluorescencia restante tras el colapso total del potencial mitocondrial. Este valor fue sustraído de los valores de fluorescencia, y éstos expresados como porcentaje de fluorescencia respecto a la emitida antes de la adición de la solución test.

6. Medida de la Apoptosis Celular

6.1. Medida de la Apoptosis por Tinción con Anexina V

La apoptosis es una forma de muerte celular activa, por la cual en la célula se activan cascadas de señalización que finalmente llevan a la muerte. Una forma de detectar la apoptosis celular es por los cambios en la distribución de las proteínas de membrana, glicoproteínas y fosfolípidos durante ésta. Un cambio particular es la distribución de la fosfatidilserina (PS). En células viables, la capa interna de la membrana plasmática contiene fosfolípidos aniónicos, y la externa lípidos neutros. La distribución de PS es asimétrica, y se encuentra principalmente en la cara interna. Sin embargo, durante la apoptosis, la distribución de lípidos aniónicos varía y la PS se localiza principalmente en la cara externa de la membrana. La anexina V es una proteína que se une a fosfolípidos de una forma dependiente de Ca^{2+} , con alta afinidad por la PS y que por tanto puede ser útil para detectar la PS externalizada y por consiguiente las células que han entrado en apoptosis. La anexina V se utiliza conjugada con fluorocromos, como por ejemplo fluoresceína (Figura 41).

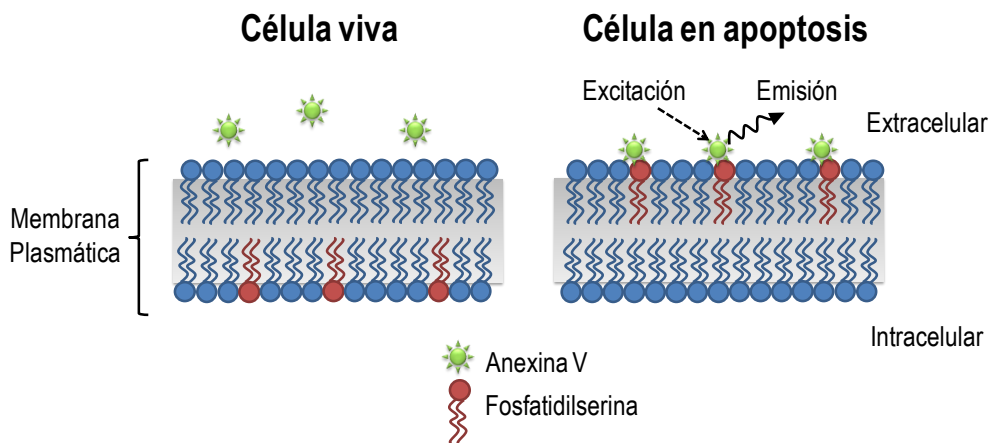


Figura 41. Esquema del método anexina V para monitorizar la apoptosis. La anexina V (bolitas de color verde), que se utiliza conjugada a fluorocromos, es una proteína dependiente de Ca^{2+} con alta afinidad por la fosfatidilserina, fosfolípido que se externaliza en la membrana de las células apoptóticas.

Para las medidas de apoptosis, las neuronas de hipocampo, sembradas en cristales de 12 mm de diámetro a una densidad de 30×10^3 células/cristal, se incubaron a 37°C y al 5 % CO_2 durante los días de cultivo correspondientes. Una vez llegado el día de cultivo deseado, los cristales con las neuronas sembradas se pasaron a una placa Nunc nueva con medio MEC o medio libre de Mg^{2+} (Mg0), según correspondiera. Una vez lavados, se incubaron con el tratamiento oportuno (NMDA, $\text{A}\beta_{1-42}$, etc.) durante 1 h. Posteriormente los cristales fueron devueltos al medio Neurobasal original y se mantuvieron en el incubador durante 24 horas a 37°C y 5 % CO_2 . En otros casos, el tratamiento se añadió directamente al Neurobasal original, donde se dejó 24 h. Pasadas las 24 h, las células se lavaron tres veces con tampón Hepes para eliminar los restos de medio Neurobasal y se incubaron con la solución de anexina V en medio tampón Hepes (1:20) durante 10 minutos en oscuridad. Finalmente se capturaron imágenes de transmisión y fluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse TS100. Para calcular el porcentaje de células en apoptosis se contó el número de células positivas a anexina V (células marcadas en verde), se dividió por el número de células totales en el campo y se multiplicó por 100. Por cada cristal se contaron un mínimo de cuatro campos tomados al azar; utilizando un mínimo de tres cubreobjetos por cada condición, de forma que se analizaron entre 500 y 2000 células por cada tratamiento.

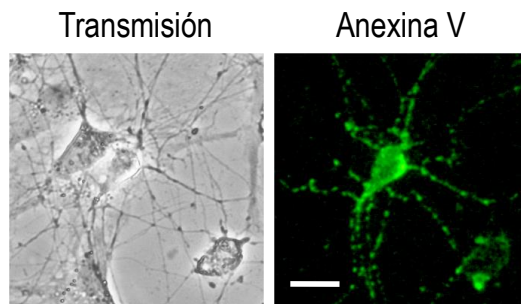


Figura 42. Medida de la apoptosis mediante tinción por anexina V. Microfotografías representativas de las neuronas del hipocampo en transmisión y en apoptosis detectada por fluorescencia de anexina V-FITC. La barra representa $10\ \mu\text{m}$.

6.2. Medida de la Apoptosis por Liberación del Cit C

Cuando se activa la apoptosis, se puede producir la apertura del PTPm, de forma que desde la mitocondria se liberan al citosol proteínas proapoptóticas, como el citocromo C, por lo que estudiar la liberación del citocromo C será una forma de comprobar si las células han entrado en apoptosis. Para analizar la liberación del cit C, se realizó una inmunocitoquímica frente a esta molécula. Neuronas de hipocampo mantenidas durante diferentes días en cultivo fueron tratadas durante 1 h con el medio control (medio libre de magnesio) o con NMDA 100 μ M. A las 24 h del tratamiento, las células se fijaron con PFA 4% y la localización del citocromo C se evaluó por inmunofluorescencia. El anticuerpo primario anti-citocromo C (ratón) (1:300) se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado con Alexa Flúor 488 (1:300) se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último se marcaron las células con DAPI (1:5000) y las muestras se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia.

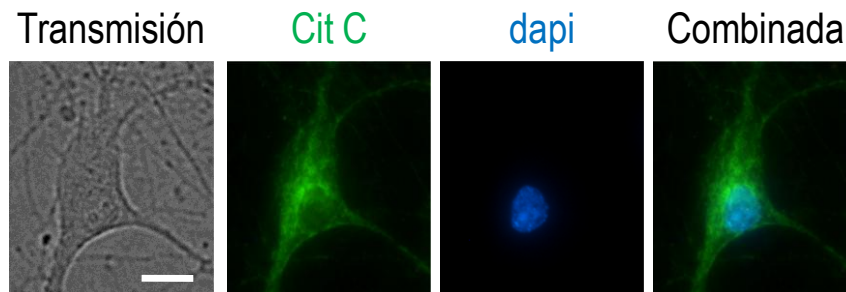


Figura 43. Medida de la apoptosis mediante inmunocitoquímica frente al citocromo C. Fotografías representativas de neuronas del hipocampo en transmisión y en apoptosis detectada por inmunofluorescencia frente al citocromo C. En azul se representa el núcleo, marcado con dapi. La barra blanca representa 10 μ m.

7. Estudio de la Apertura del Poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial (PTPm)

La apertura del PTPm se estudió con el método de la calceína/cobalto (Petronilli, Miotto et al. 1998), mediante la medida de la fluorescencia emitida por células previamente incubadas con calceína en su forma éster (calceína/AM). La calceína/AM es un compuesto lipofílico que difunde pasivamente a las células y se acumula en los compartimentos citosólicos, incluyendo la mitocondria. Una vez dentro de las células, las esterasas intracelulares actúan sobre los ésteres de acetoximetilo, permitiendo la liberación de calceína, agente fluorescente de elevada polaridad, incapaz de atravesar las membranas citoplasmáticas o mitocondriales. Si se añade CoCl_2 , que sí atraviesa la membrana plasmática pero no la MMI, la fluorescencia que emite la calceína en el citosol es apagada, mientras que la fluorescencia emitida en la mitocondria se mantiene. Cuando se activa el PTPm, la calceína de las mitocondrias sale al exterior, produciéndose la pérdida de la fluorescencia emitida por la calceína acumulada en la mitocondria. De este modo, es posible monitorizar la apertura del PTPm mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 44**).

Para su medida, las células se cargaron con calceína/AM $1 \mu\text{M}$ y CoCl_2 1 mM durante 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Tras ello, se monitorizó la emisión de fluorescencia utilizando el juego de filtros de fluoresceína del microscopio mientras las células fueron perfundidas con MEC a 37°C o con el correspondiente estímulo. La fluorescencia en las regiones sin células (fondo) fue restada y los registros de las células individuales fueron normalizados respecto a su valor antes de la adición del estímulo.

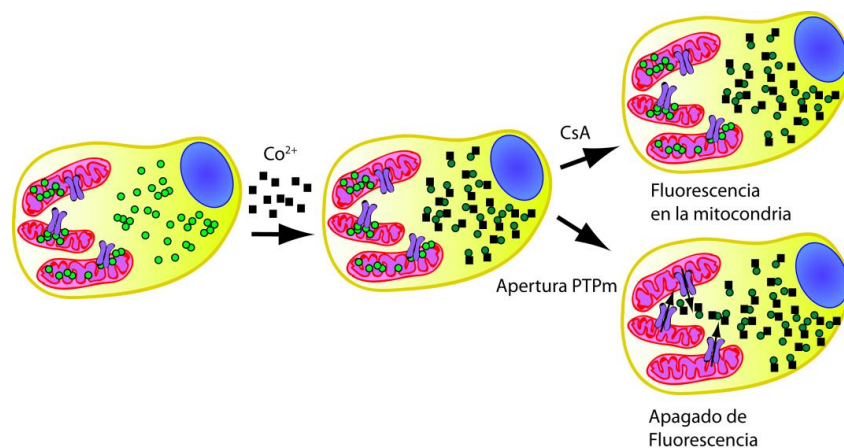


Figura 44. Esquema del método calceína/cobalto para medir la apertura PTPm. La calceína (bolas de color verde) difunde a las células y se acumula en el citosol y las mitocondrias. Si se añade Co^{2+} (cuadrados negros) la fluorescencia que la calceína emite en el citosol queda apagada, mientras que la fluorescencia emitida por la calceína mitocondrial se mantiene, ya que el Co^{2+} no es capaz de atravesar la membrana mitocondrial. Si el PTPm se abre se producirá una disminución de la fluorescencia asociada a las mitocondrias. En presencia de bloqueantes de la apertura del PTPm como CsA se mantendrá la fluorescencia en la mitocondria.

8. Preparación de los Oligómeros del Péptido Amiloide $\text{A}\beta_{1-42}$

La preparación del péptido amiloide requiere un protocolo complejo y específico. En este trabajo, los oligómeros se prepararon utilizando un nuevo método puesto a punto anteriormente en nuestro laboratorio (Caballero, Calvo-Rodríguez et al. enviado), basado en los protocolos previamente descritos por Klein (Klein 2002), Fa, Orozco *et al.* (Fa, Orozco et al. 2010), Itkin, Dupres et al. (Itkin, Dupres et al. 2011) y Wisniewski, Hwang *et al.* (Wisniewski, Hwang et al. 2011).

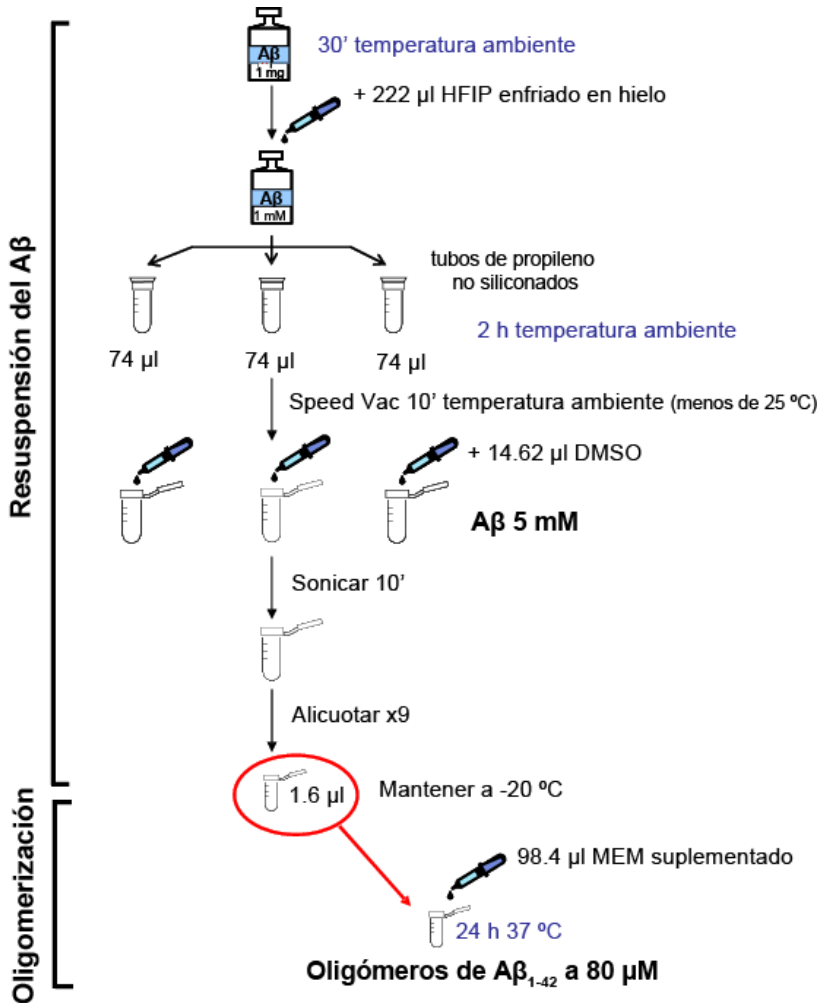


Figura 45. Protocolo de resuspensión y oligomerización del péptido amiloide A β ₁₋₄₂.

El A β ₁₋₄₂ liofilizado comercial (1 mg), almacenado a -20 °C, se mantuvo 30 min a temperatura ambiente, tras lo que se disolvió a una concentración de 1 mM en ácido hexafluoroisopropanoico (HFIP), para lo que se añadieron 222 μ l de HFIP al tubo original, arrastrando cuidadosamente por las paredes para recoger todo el A β ₁₋₄₂ liofilizado. Esta suspensión se repartió en tres tubos de microcentrifuga no siliconados, añadiendo 74 μ l por vial. Seguidamente, se dejó el tubo cerrado y sellado con parafilm durante 2 horas para permitir la completa solución del péptido A β ₁₋₄₂.

Para conseguir la evaporación del ácido, pasadas las 2 h el tubo se llevó a una centrífuga de vacío (SpeedVac SPD111V), donde se dejó 15 minutos, hasta ver una película transparente en el fondo del vial. Posteriormente, el péptido se resuspendió en DMSO seco a una concentración de 5 mM (14,62 μ l de DMSO por tubo) y la solución se llevó a un baño de ultrasonidos durante 10 min. La solución 5 mM se alicuotó en nuevos viales no siliconados en 1,6 μ l, que se almacenaron a -20 °C. El día antes de su uso, se procedió a su oligomerización. Para ello, el péptido disuelto en DMSO se diluyó en 98,4 μ l de medio MEM (suplementado con Fe²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ empleados a 0,5; 0,5 y 0,0013 mg/l concentración final respectivamente) para obtener una concentración 80 μ M. De nuevo, la solución se trató en el ultrasonidos durante 10 minutos y se incubó durante 24 h a 37°C. Los oligómeros se emplearon a una concentración teórica de 1 - 2 μ M. Sin embargo, por estudios previos realizados en nuestro laboratorio se estimó que la concentración real de los oligómeros de A β ₁₋₄₂ empleada es del orden de alrededor de cuatro veces menor (Sanz-Blasco, Valero et al. 2008).

9. Análisis Estadístico de los Datos

Todos los datos mostrados proceden de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se muestran como la media \pm error estándar de la media (EEM). Cuando se han comparado dos medias se ha utilizado la *t de Student* para muestras pareadas o no pareadas, según correspondiese. Para la comparación de datos incluidos en dos o más grupos se ha empleado el análisis de la varianza ANOVA de dos vías. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

B. TAMPONES Y SOLUCIONES:

1. Medios para Cultivos Celulares y Disgregación de Tejidos

Medio HANK'S:

HBSS

0,6% BSA

Medio Nutriente HAM'S DMEM F-12 (pH 7,42):

Dulbecco's Modified Eagle's Medium en polvo 4500 mg/l de glucosa

25 mM HEPES

4 mM NaHCO₃

Medio Neurobasal:

Neurobasal

Gentamicina 1 µg/ml

L-glutamina 2 mM

2% B27

10% FBS

Tampón Fosfato Salino (PBS) (pH 7,4):

NaCl 136 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 8 mM

KH₂PO₄ 1,5 mM

2. Medios Microscopio

Medio Externo Completo (MEC) (pH 7,42):

NaCl 145 mM
KCl 5 mM
MgCl₂ 1 mM
HEPES 10 mM
CaCl₂ 1 mM
Glucosa 10 mM

Medio Interno Celular (MIC) (pH 7,2):

KCl 130 mM
NaCl 5 mM
MgCl₂ 2 mM
KH₂PO₄ 2 mM
Succinato sódico 5 mM
HEPES/KOH 20 mM
ATP 1 mM
EGTA 1 mM

Medio Sin Magnesio (Mg 0) (pH 7,42):

NaCl 146 mM
KCl 5 mM
HEPES 10 mM
Glucosa 10 mM
CaCl₂ 1 mM

Medio Alto K⁺ (145 mM) (pH 7,42):

KCl 145 mM
MgCl₂ 1 mM

HEPES 10 mM

CaCl₂ 1 mM

Glucosa 10 mM

Medio Libre de Calcio (0 Ca) (pH 7,42):

NaCl 145 mM

KCl 5 mM

MgCl₂ 1 mM

HEPES 10 mM

EGTA 0,5 mM

Glucosa 10 mM

Medio Calcio Nominal (pH 7,42):

NaCl 145 mM

KCl 5 mM

MgCl₂ 1 mM

HEPES 10 mM

Glucosa 10 mM

3. Medios para la Medida de la Apoptosis

Tampón Hepes de Unión de la Anexina V (pH 7,42):

NaCl 140 mM

HEPES 10 mM

CaCl₂ 2,5 mM

C. MATERIALES Y REACTIVOS:

Bachem AG (Bubendorf, Suiza):

- Péptido A β ₁₋₄₂

Biotium (Hayward, CA, EEUU):

- Coelenterazina *n*

BD (Madrid, España):

- Anexina V
- Poly-D-lisina

Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, EEUU):

- Ibuprofeno
- Indometacina
- R-Flurbiprofeno
- Salicilato
- Sulfuro de Sulindac

Covance (Princeton, NJ, EEUU):

- Anticuerpo primario monoclonal de ratón anti β -tubulina III

Gibco (Barcelona, España):

- Gentamicina
- Medio HBSS
- Medio MEM
- Medio Neurobasal
- L-Glutamina
- Suero de caballo (HS)
- Suplemento B27

Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EEUU):

- Calceína/AM
- Coelenterazina *h y wt*
- Fura-2/AM
- Fura-4F/AM
- Lipofectamina® 2000
- TMRM

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):

- Suero fetal bovino (FBS)

Merk (Madrid, España):

- Ácido hidroxietilendiaminotriacético (H-EDTA)
- Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetileter)-N,N',N'-tetra-acético (EGTA)
- CaCl₂
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- KCl
- KH₂PO₄
- HCl
- Metanol
- MgCl₂
- NaCl
- NaOH

- Tris HCl
- Triton X-100

Millipore Corp. (Bedford, MA, EEUU):

- Anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-NR1
- Anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-NR2A
- Anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-NR2B
- Filtros estériles PVDF de 0,22 μm

Nunc Labclinics (Barcelona, España):

- Placas cultivo 4 pocillos
- Placas Petri

Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España):

- 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)
- Acetilcolina
- Anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con FITC
- Anticuerpo primario policlonal de conejo anti-GFAP
- Anticuerpo primario policlonal de conejo anti-MCU
- ADNasa I
- Albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA)
- Cafeína
- carbonil cianida para-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP)
- CoCl_2
- Digitonina
- Glicina
- HEPES
- MK-801
- N-metil-D-aspartato (NMDA)
- Paraformaldehído (PFA)

- Succinato Sódico

Worthington (Lakewood, NJ, EEUU):

- Papaína 37,1 u/mgP

D. PLÁSMIDOS y ANIMALES:

Los plásmidos que codifican para la aequorina salvaje (GFP-mitAEQ) y la aequorina de baja afinidad por Ca^{2+} (GFP-mitAEQmut) fueron amablemente donados por el Dr. Philip Brulet (Instituto Pasteur, Gif-sur-Yvette, París).

Las ratas Wistar procedían del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

IV. RESULTADOS

1. Cultivo a Largo Plazo de Neuronas Hipocampales como Modelo de Envejecimiento

En muchas de las enfermedades neurodegenerativas conocidas en la actualidad, el envejecimiento supone uno de los principales factores de riesgo. Por su parte, el hipocampo es una región anatómica crítica para ciertos tipos de aprendizaje y memoria vulnerables a los efectos del envejecimiento normal. Aun siendo conscientes de que un modelo *in vitro* puede no ajustarse adecuadamente a un envejecimiento *in vivo*, diversos autores han mostrado anteriormente que el cultivo a largo plazo de neuronas de hipocampo extraídas de ratas neonatas puede ser considerado, al menos parcialmente, como un modelo para estudiar diferentes aspectos relacionados con el envejecimiento neuronal. Por ello decidimos emplear en nuestro trabajo neuronas de hipocampo tomadas de ratas neonatas que hemos dejado envejecer en el cultivo.

Anteriormente ya se ha descrito que las neuronas primarias en cultivo sufren cambios morfológicos a medida que envejecen *in vitro* (Banker y Cowan 1977). La **Figura 46** muestra imágenes de transmisión de campos representativas de neuronas de hipocampo a medida que aumenta el tiempo de cultivo. Se puede observar cómo al aumentar los días *in vitro* (DIV) los cuerpos neuronales se agrandan y las neuritas acaban formando extensas redes.

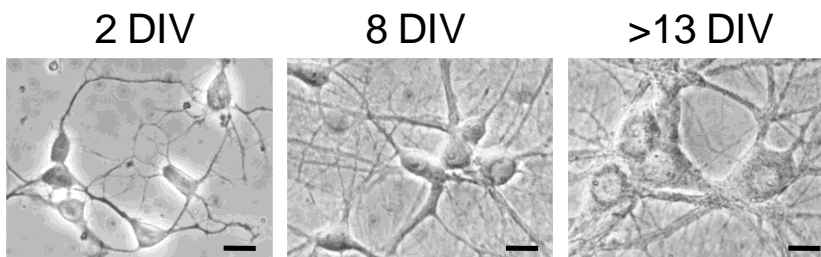


Figura 46. Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata. Miniaturas representativas de neuronas a medida que crecen y se desarrollan en cultivo. Las barras representan 10 μm .

Para confirmar que las neuronas de hipocampo extraídas de ratas neonatas muestran signos de envejecimiento en cultivo, decidimos evaluar la autofluorescencia debida a los depósitos de lipofuscina (conocida como el "pigmento de la edad") (Gray y Woulfe 2005) en las neuronas a diferentes DIV, dado que, como sabemos, estos cúmulos aparecen con el envejecimiento. La **Figura 47** muestra cómo estos gránulos auto-fluorescentes sólo se observaron en las neuronas de mayor DIV, considerándolas por tanto como envejecidas (>13 DIV).

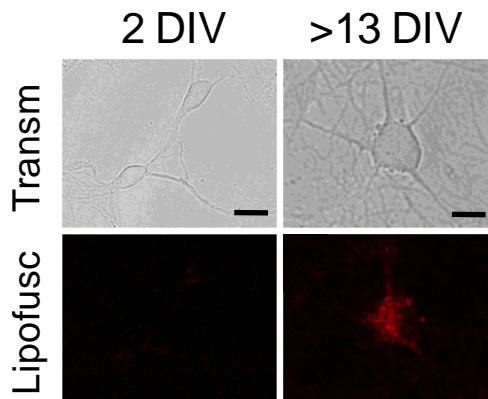


Figura 47. Los gránulos de lipofuscina sólo aparecen en las neuronas envejecidas. Campos representativos de transmisión (arriba) y auto-fluorescencia (gránulos fluorescentes de lipofuscina (abajo)) en neuronas de hipocampo a diferentes DIV. Los depósitos auto-fluorescentes de lipofuscina sólo se observan en las neuronas envejecidas (>13 DIV). Las barras representan 10 μm .

Otro de los parámetros que cambia a medida que las neuronas envejecen es el valor de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en reposo (Hajjeva, Kuhlmann et al. 2009). El nivel de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ fue medido por imagen de fluorescencia utilizando la sonda de Ca^{2+} fura-2/AM, y se expresó como valor del Ratio F340/F380. Tomando el valor más bajo del Ratio F340/F380 en el registro de Ca^{2+} de cada célula a diferentes DIV, se observó cómo la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ basal en las neuronas de hipocampo aumentó de forma continuada a medida que éstas envejecían (**Figura 48**). En la **Figura 49 A** se muestran registros representativos.

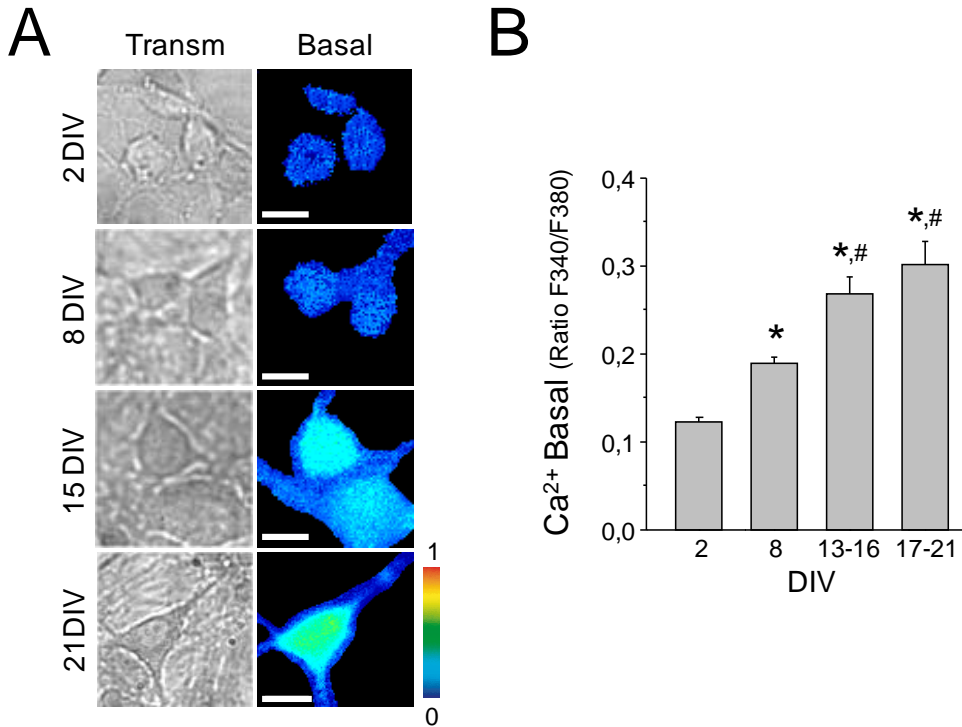


Figura 48. El Ca^{2+} basal aumenta a medida que las neuronas envejecen en cultivo. A. Imágenes representativas de transmisión (izquierda) y el cociente de fluorescencia en reposo (derecha) de neuronas de hipocampo de diferentes DIV. La escala de pseudocolor se muestra a la derecha (valores de Ratio de 0 (azul) - 1(rojo)). Las barras blancas representan 10 μ m. **B.** Las barras representan los valores basales de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Ratio F340/F380) en reposo para las neuronas a diferentes DIV (media \pm EEM, n=53, 39, 30 y 21 células de 3, 3, 6 y 5 experimentos independientes; *p<0,05 comparado con 2 DIV; #p<0,05 comparado con 8 DIV).

Otra de las propiedades que apreciamos que varía con el envejecimiento de los cultivos es la aparición de oscilaciones sincrónicas y espontáneas de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. Éstas tienen un importante papel en diferentes procesos, tanto fisiológicos como patológicos (Traub y Wong 1982) y son resultado de la sincronización de la actividad sináptica de un circuito neuronal formado *in vitro* (Leinekugel, Medina et al. 1997). Las oscilaciones sincrónicas no aparecen de forma aleatoria, sino que a 2 DIV son inexistentes, se manifiestan alrededor de 8 DIV y su ocurrencia disminuye progresivamente con el envejecimiento del cultivo (**Figura 49**). Para cuantificar estas oscilaciones se ha utilizado un parámetro denominado Índice de Oscilaciones (IO), el

cual es simplemente una medida de la longitud del trazado por unidad de tiempo, y recoge tanto la frecuencia como la amplitud de las oscilaciones (Nuñez, Sanchez et al. 1996). La **Figura 49 A** muestra ejemplos representativos.

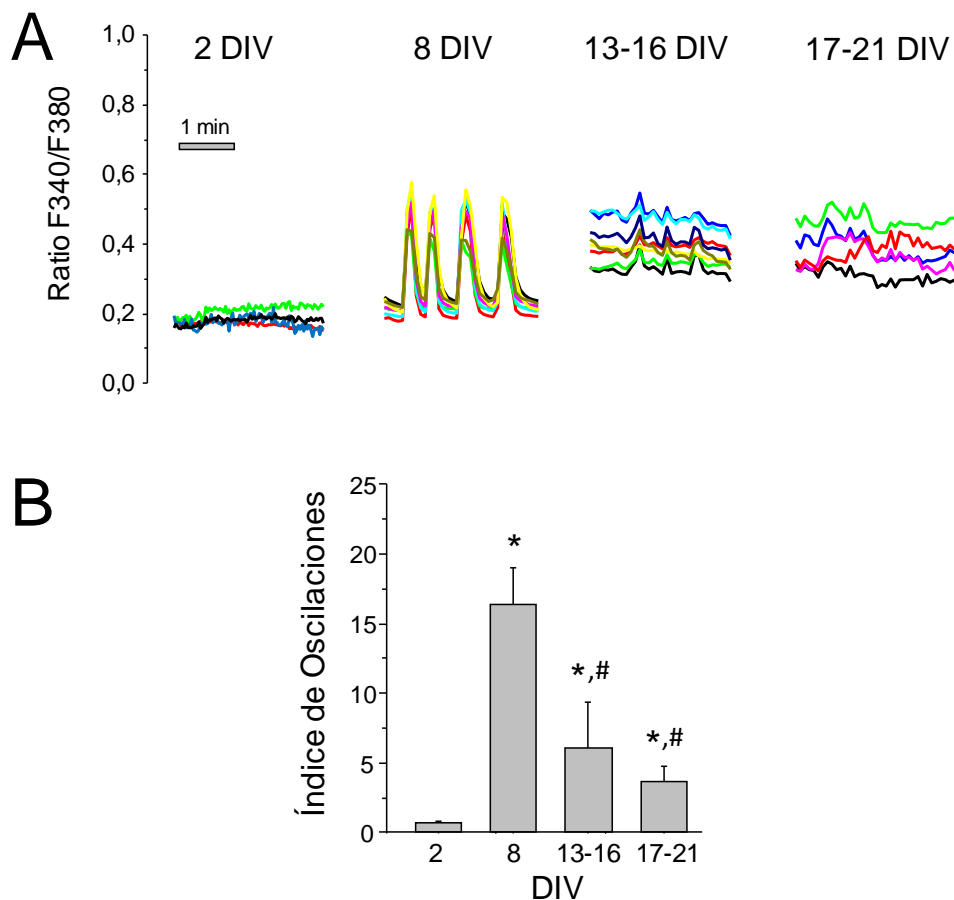


Figura 49. Índice de Oscilaciones en neuronas de hipocampo cultivadas durante diferentes días. El índice de oscilaciones fue calculado sobre los registros de $[Ca^{2+}]_{cit}$ de neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8, 13 - 16 y 17 - 21 DIV previo a cualquier estimulación. Se aprecia cómo el IO alcanza su máximo a 8 DIV. **A.** Los trazos muestran ejemplos representativos en células individuales de registros de Ca^{2+} en células a diferentes DIV. **B.** Las barras representan el valor medio (media \pm EEM) del índice de oscilaciones calculado de 24 - 115 neuronas individuales procedentes de 4 - 12 experimentos independientes. * $p < 0,05$ comparado con 2 DIV; # $p < 0,05$ comparado con 8 DIV.

Como se ha descrito en la introducción, el potencial de membrana de la mitocondria ($\Delta\Psi$) disminuye con el envejecimiento. Para medir el $\Delta\Psi$ en nuestros cultivos, se utilizó la sonda mitocondrial fluorescente TMRM, un colorante catiónico que se acumula en la mitocondria en función del $\Delta\Psi$. Una disminución en la fluorescencia emitida indica una pérdida de $\Delta\Psi$ (ver Material y Métodos). El TMRM es considerado en la actualidad como el marcador más sensible al $\Delta\Psi$ (Voronina, Barrow et al. 2004). El potencial mitocondrial en reposo fue estimado a partir de la fluorescencia promedio emitida por el TMRM en las neuronas de hipocampo cultivadas a diferentes DIV.

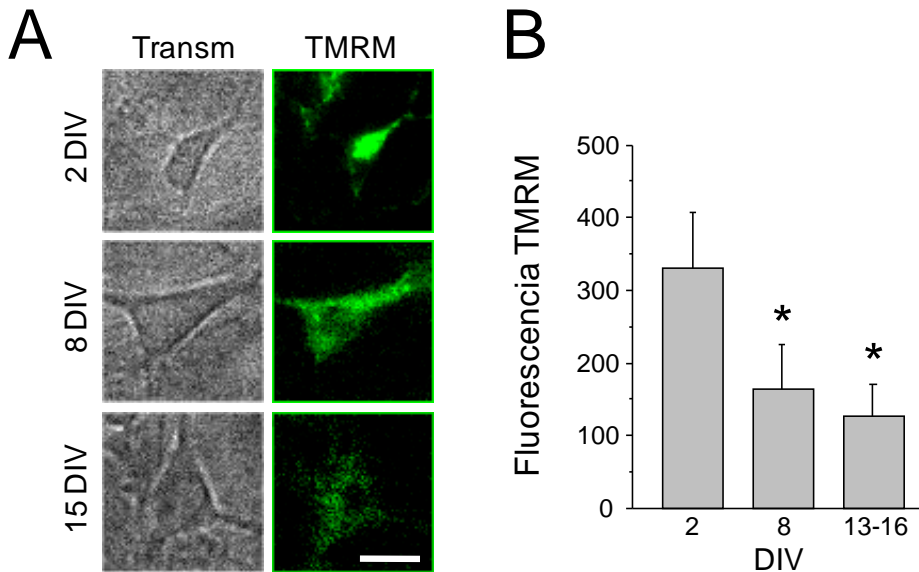


Figura 50. El potencial de membrana mitocondrial disminuye con el envejecimiento de los cultivos. El potencial de membrana mitocondrial en reposo fue evaluado en células de diferentes DIV incubadas con TMRM (10 nM, 30 min) mediante imagen de fluorescencia. **A.** Imágenes representativas de transmisión (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de TMRM en neuronas a 2, 8 y 15 DIV. La barra blanca representa 10 μm . **B.** Las barras muestran la fluorescencia media \pm EEM de neuronas de hipocampo a diferentes DIV. * $p < 0,05$ comparado con 2 DIV, $n=106$, 114 y 77 células procedentes de 3, 4 y 3 experimentos independientes.

2. Remodelado de los Depósitos Intracelulares de Calcio de las Neuronas de Hipocampo en Cultivo durante el Envejecimiento

En la mayor parte de las células excitables, la principal vía de entrada de Ca^{2+} hacia el citoplasma son los canales localizados en la membrana plasmática. Sin embargo, los depósitos intracelulares, incluyendo el RE, también poseen un importante papel en la propagación de la señal. La alteración de la homeostasis del retículo provocada por un variado abanico de factores y agentes tóxicos puede resultar en estrés de retículo, caracterizado por la acumulación de proteínas mal plegadas y por la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} . Inicialmente, el estrés de retículo induce la activación de ciertos mecanismos de defensa, como es la respuesta a proteínas mal plegadas pero, si el estrés es severo y duradero, se puede activar la muerte por apoptosis (Mattson y Chan 2003). Se ha propuesto que el daño del RE y el deterioro de sus funciones participa en el envejecimiento (Yoshida 2007). Por ello, decidimos estudiar si los depósitos intracelulares de Ca^{2+} se ven alterados en el envejecimiento. Para ello utilizamos nuestro modelo de neuronas de hipocampo cultivadas a largo plazo, considerando como neuronas jóvenes aquellas comprendidas entre 4 - 8 DIV y como envejecidas a las englobadas entre 15 - 21 DIV.

2.1. El Contenido de los Depósitos Varía con la Edad de las Neuronas en Cultivo

En primer lugar, decidimos estudiar las propiedades de RE como depósito de Ca^{2+} en las neuronas de hipocampo, y comprobar si el llenado de éste variaba con la edad del cultivo.

2.1.1. El Contenido de los Depósitos Intracelulares de Ca^{2+} es Mayor en las Neuronas de Hipocampo Envejecidas que en las Jóvenes

El contenido de los depósitos de Ca^{2+} en las neuronas jóvenes y envejecidas de hipocampo fue evaluado midiendo la liberación de Ca^{2+} del RE, para lo que se utilizó ionomicina, un ionóforo que aumenta la permeabilidad de las membranas a Ca^{2+} (Beeler, Jona et al. 1979). Cuando las células son tratadas con ionomicina a bajas concentraciones ($<1 \mu\text{M}$), se produce liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares de forma selectiva, sin aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+} extracelular (Bird, DeHaven et al. 2008). El contenido de Ca^{2+} de los depósitos aparece como un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tras la estimulación con ionomicina a bajas concentraciones en medio externo libre de Ca^{2+} . El Ca^{2+} se retiró 30 segundos antes de la aplicación de la ionomicina, ya que si se retira tras un tiempo demasiado largo, los depósitos pueden vaciarse de forma espontánea (**Figura 51 B**).

Las neuronas de hipocampo cultivadas durante 4 - 8 DIV (jóvenes) y 15 - 21 DIV (envejecidas) fueron incubadas con fura-2 durante 1 h y sometidas a imagen de fluorescencia. Posteriormente fueron estimuladas con ionomicina (400 nM) en medio externo libre de Ca^{2+} (0 Ca). La ionomicina produjo un pequeño aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (**Figura 51**), lo cual resultó ser consistente con estudios previos, que proponían un bajo contenido de los depósitos del RE en estado de reposo en las neuronas de hipocampo (Irving y Collingridge 1998). Sin embargo, este aumento fue significativamente mayor para las neuronas envejecidas (15 - 21 DIV) que para las jóvenes (4 - 8 DIV), reflejado tanto en el valor del área bajo la curva (abc) como en el pico de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (ΔRatio) (**Figura 51 C y D** respectivamente).

Estos resultados sugieren que se produce un aumento del contenido de Ca^{2+} de los depósitos de las neuronas en estado de reposo a medida que éstas envejecen en cultivo.

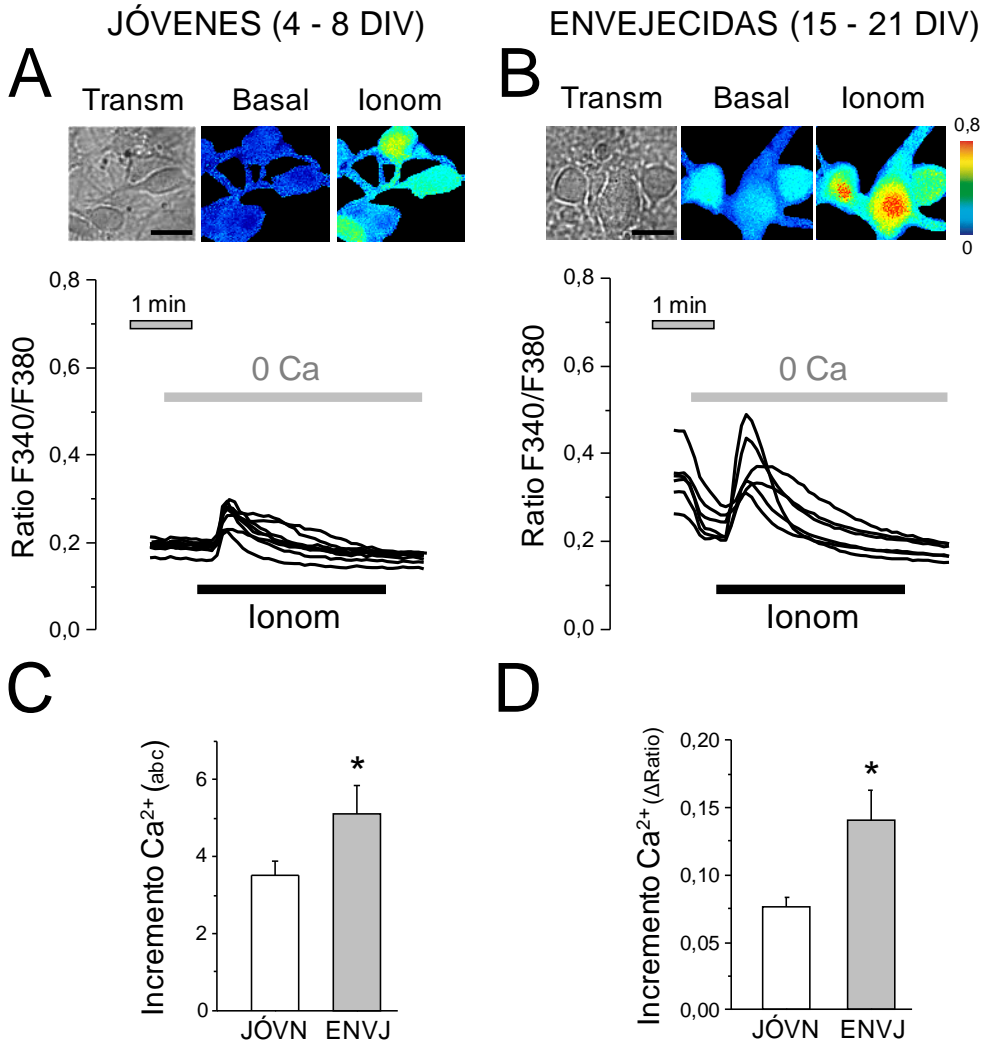


Figura 51. El contenido de los depósitos es mayor en las neuronas de hipocampo envejecidas en cultivo. Neuronas de hipocampo cargadas con fura-2 fueron sometidas a imagen de fluorescencia. **A, B.** Imágenes representativas de neuronas de hipocampo jóvenes (**A**) y envejecidas (**B**) en transmisión (transm), en reposo (basal) y con ionomicina (400 nM) en 0 Ca^{2+} (Ionom). La barra de pseudocolor se muestra a la derecha (valores de Ratio de 0 (azul) - 0,8 (rojo)). Las barras representan 10 μ m. Los registros muestran la liberación de Ca^{2+} inducida por ionomicina (400 nM) en medio externo libre de Ca^{2+} (0 Ca) en células individuales sometidas a imagen de fluorescencia. **C, D.** Las barras representan la media en el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en respuesta a ionomicina medido como área bajo la curva (abc) (**C**) o como incremento del pico de Ca^{2+} (Δ Ratio) (**D**) (media \pm EEM, n=46 y 53 células individuales procedentes de 4 cultivos independientes respectivamente; *p<0,05 al comparar con jóvenes).

2.1.2. La Entrada de Calcio Operada por Depósitos Disminuye en las Neuronas de Hipocampo Envejecidas

La liberación de Ca^{2+} de los depósitos posee un importante papel en la señalización por Ca^{2+} y en la fisiología celular. Dado que la capacidad de almacenamiento del RE es limitada, la liberación de Ca^{2+} de los depósitos debe estar seguida de un rellenado de éstos. Por ello, consideramos importante caracterizar el mecanismo por el que las neuronas rellenan estos depósitos. Como se ha explicado en la introducción, cuando el RE es vaciado de Ca^{2+} , su rellenado se produce gracias a la entrada capacitativa o entrada operada por depósitos (SOCE).

Para vaciar los depósitos de Ca^{2+} se utilizó tapsigargina (Tg), un compuesto que inhibe la ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA), impidiendo la captación de Ca^{2+} tras su vaciamiento espontáneo (Verkhatsky y Petersen 1998). La entrada de Ca^{2+} operada por depósitos fue evaluada por imagen de fluorescencia. Las neuronas de hipocampo, mantenidas en cultivo durante diferentes días, fueron tratadas con Tg (1 μM) en medio libre de Ca^{2+} durante 15 min. Tras ello se colocaron en el microscopio y fueron perfundidas con medio externo conteniendo 5 mM de Ca^{2+} , en presencia de tetrodotoxina (TTX) 500 nM, un antagonista de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, eliminando así la posible activación de circuitos neuronales y la activación de los VOCs. La readición de Ca^{2+} al medio externo aumentó la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en todas las neuronas de hipocampo tratadas con Tg, indicando la activación de SOCE. La **Figura 52** refleja que la entrada capacitativa de Ca^{2+} fue significativamente menor en las neuronas envejecidas en cultivo (derecha, trazo rojo). Esta entrada fue bloqueada por lantano (La^{3+} 100 μM , flecha negra vertical), un catión capaz de inhibir SOCE (Vaca y Kunze 1994). Las células que no fueron tratadas con Tg apenas presentaron cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tras la aplicación de Ca^{2+} en el medio extracelular (trazos negros).

Estos resultados indican que el vaciamiento de los depósitos puede activar la entrada capacitativa en las neuronas de hipocampo en cultivo, siendo ésta menor en las neuronas envejecidas, además de demostrar la existencia de esta corriente en las células excitables.

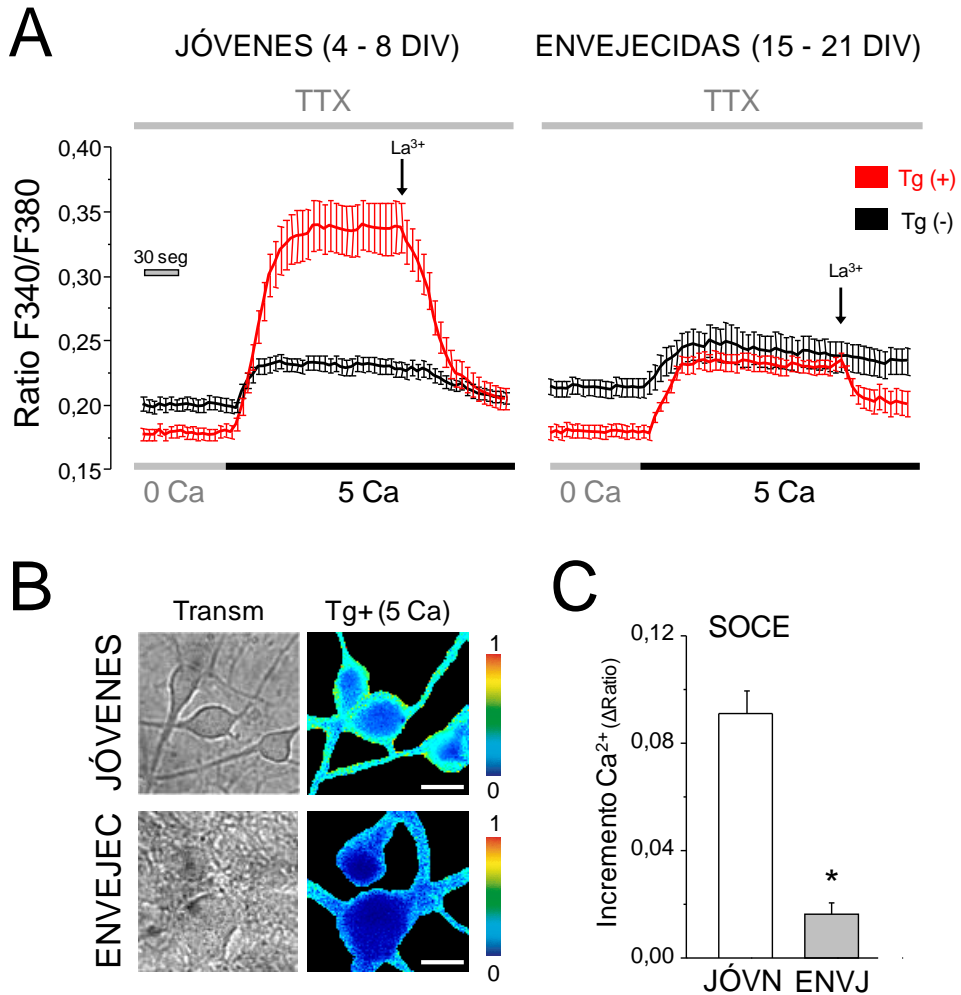


Figura 52. La entrada de Ca²⁺ operada por depósitos disminuye en las neuronas envejecidas de hipocampo. SOCE fue monitorizada por imagen de fluorescencia de Ca²⁺ en neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas incubadas con fura-2, tratadas con Tg (1 μM) en medio 0 Ca²⁺ (15 min). La adición de Ca²⁺ 5 mM al medio (barra negra) en presencia de TTX (500 nM) aumentó la [Ca²⁺]_{cit}. **A.** Trazos representativos de la media ± EEM de 4 - 5 células en células control (Tg-, trazo negro) o tratadas con tapsigargina (Tg+, trazo rojo) al añadir Ca²⁺ 5 mM al medio externo. También se muestra el efecto de la adición de La³⁺ 100 μM (flecha vertical) sobre la SOCE. **B.** Imágenes típicas de imagen de fluorescencia de Ca²⁺ codificadas en pseudocolor. Se muestra la transmisión (transm), y las células tras la readición de Ca²⁺ (Tg+, 5 Ca) en células preincubadas con Tg en medio libre de Ca²⁺ en neuronas jóvenes (fila superior) y envejecidas (fila inferior). Las barras representan 10 μm. **C.** Valores medios de SOCE en neuronas jóvenes y envejecidas. Las barras muestran la media ± EEM del incremento de Ca²⁺ (ΔRatio) (n=49 y 37 células procedentes de 3 y 4 cultivos independientes respectivamente; *p<0,05).

2.2. Depósitos de Calcio Sensibles a Cafeína en Neuronas de Hipocampo

Como se ha explicado con anterioridad, la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares es un mecanismo esencial en la señalización celular. Esta movilización puede producirse gracias a la activación de los receptores de rianodina o de los receptores de IP_3 .

En primer lugar, se analizó la liberación de Ca^{2+} de los depósitos a través de receptores de rianodina, para lo que se empleó cafeína (Caf) (20 mM). La Caf es un agonista de los receptores de rianodina, que son sensibles a procesos de *CICR*. En este caso se utilizó Ca^{2+} nominal como medio celular externo en lugar de medio 1 mM Ca^{2+} , para poder activar *CICR*, a la vez que se minimiza el efecto de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Para evitar una variación osmótica elevada al aplicar la Caf en concentración 20 mM, previo a la adición de la ésta se añadió al medio extracelular 20 mM de glucosa, que fue sustituido posteriormente por la Caf 20 mM.

La **Figura 53** muestra la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de neuronas jóvenes y envejecidas estimuladas con Caf (20 mM). Las neuronas mostraron picos transitorios, que no fueron sincrónicos entre las células. El incremento de Ca^{2+} (estudiado como área bajo la curva, abc) no fue significativamente diferente entre neuronas jóvenes y envejecidas, aunque puede apreciarse un mayor aumento para las últimas (**Figura 53 C**). Sólo una parte de las neuronas jóvenes respondió al estímulo ($52 \pm 8\%$), mientras que un mayor porcentaje de las envejecidas lo hizo ($70 \pm 9\%$) (**Figura 53 D**).

Para comparar estadísticamente la respuesta entre neuronas jóvenes y envejecidas, se calculó una medida de entrada de Ca^{2+} global ($\text{Ca}^{2+} \times \text{Fracción}$) que comprendiera los dos valores, para lo que se multiplicó el área bajo la curva de las células que presentaban un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ por el tanto por uno de células que respondieron (Fracción). El resultado muestra las diferencias globales de liberación de Ca^{2+} entre ambas poblaciones (**Figura 53 E**). Los resultados indican que

la Caf en medio Ca^{2+} nominal provocó un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ significativamente mayor en las neuronas envejecidas de hipocampo que en las jóvenes.

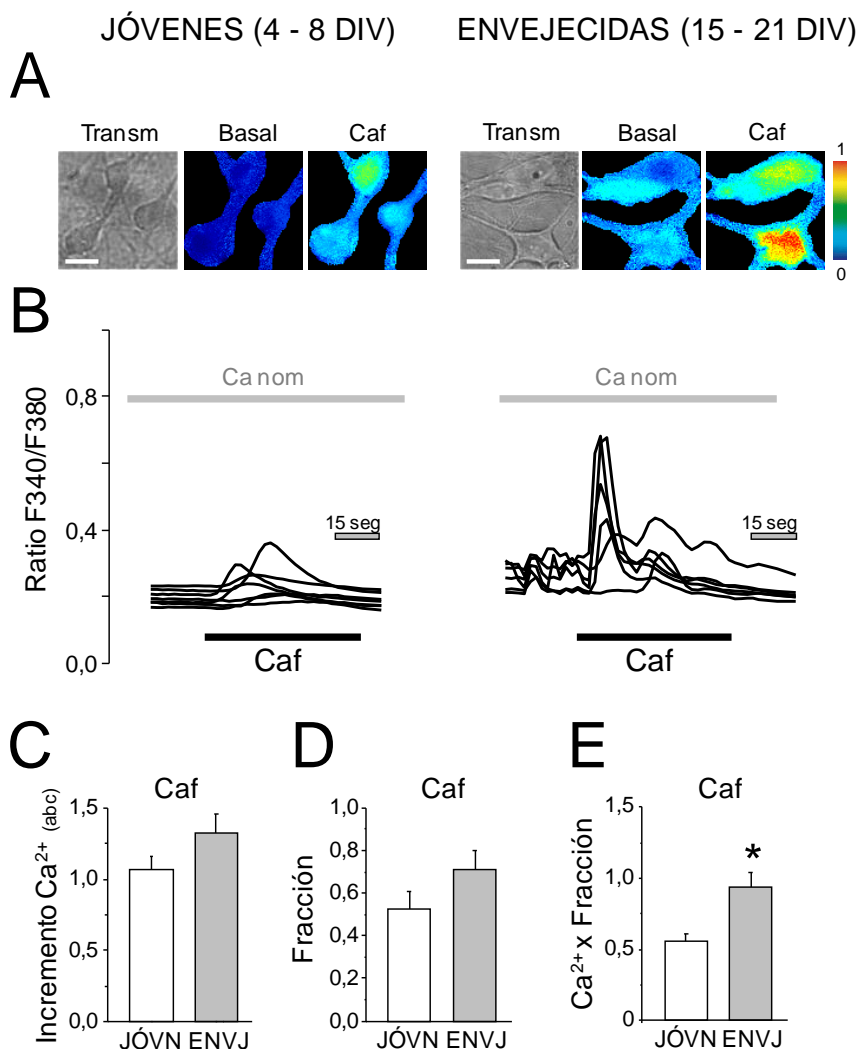


Figura 53. Respuesta a la estimulación con Caf en Ca^{2+} nominal en neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas. **A.** Imágenes típicas de imagen de fluorescencia de Ca^{2+} codificadas en pseudocolor. Se muestra la transmisión, las células en reposo en medio con 1 mM Ca^{2+} (basal) y tras la estimulación con Caf en neuronas jóvenes y envejecidas. La escala de pseudocolor se muestra a la derecha. **B.** Registros típicos en célula única de la respuesta a Caf (20 mM) en neuronas cargadas con fura-2 en medio Ca^{2+} nominal. **C.** Las barras muestran la media \pm EEM del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (abc) en respuesta a Caf en medio Ca^{2+} nominal en neuronas jóvenes y envejecidas. Sólo las células que respondieron están incluidas en el análisis de abc. **D.** Tanto por 1 de células que respondieron. **E.** La medida $\text{Ca}^{2+} \times \text{Fracción}$ muestra la respuesta global a Caf (n=101 y 55 células procedentes de 4 experimentos independientes respectivamente; *p<0,05).

2.3. Depósitos de Calcio Sensibles a ACh en Neuronas de Hipocampo

A continuación, nos planteamos estudiar la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), acoplados a la activación de fosfolipasa C y síntesis de IP_3 . Para llevar a cabo esta movilización del Ca^{2+} de forma fisiológica, se empleó el neurotransmisor acetilcolina (ACh). La ACh es capaz de promover la entrada de Ca^{2+} a través de receptores nicotínicos, además de inducir la liberación de Ca^{2+} de los depósitos a través de receptores muscarínicos.

Cuando las neuronas de hipocampo fueron estimuladas con ACh (100 μM) en medio extracelular conteniendo 1 mM de Ca^{2+} (1 Ca) se observó un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en parte de las neuronas, como se observa en la **Figura 54**. Las neuronas exhibieron respuestas oscilatorias (2 ó más picos) que no fueron sincrónicas entre las células (**Figura 54 B**). Los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ basal no mostraron diferencias aparentes entre las células que respondieron y las que no. El valor de $[\text{Ca}^{2+}]$ basal se mantuvo más elevado en las neuronas envejecidas. El área bajo la curva del pico de respuesta a ACh no fue significativamente diferente entre ambas poblaciones (**Figura 54 C**). Sólo una parte de las neuronas jóvenes respondió al estímulo ($64 \pm 12\%$), porcentaje que fue mucho mayor en las envejecidas ($95 \pm 4\%$) (**Figura 54 D**).

Para comparar estadísticamente la respuesta entre neuronas jóvenes y envejecidas se multiplicó el área bajo la curva de las células que presentaban un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ por la fracción (tanto por uno) de células que respondieron, calculando así la medida de entrada de Ca^{2+} global ($\text{Ca}^{2+} \times \text{Fracción}$). Los resultados indican que la ACh en medio 1 mM de Ca^{2+} provoca un mayor incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en las neuronas envejecidas (**Figura 54 E**).

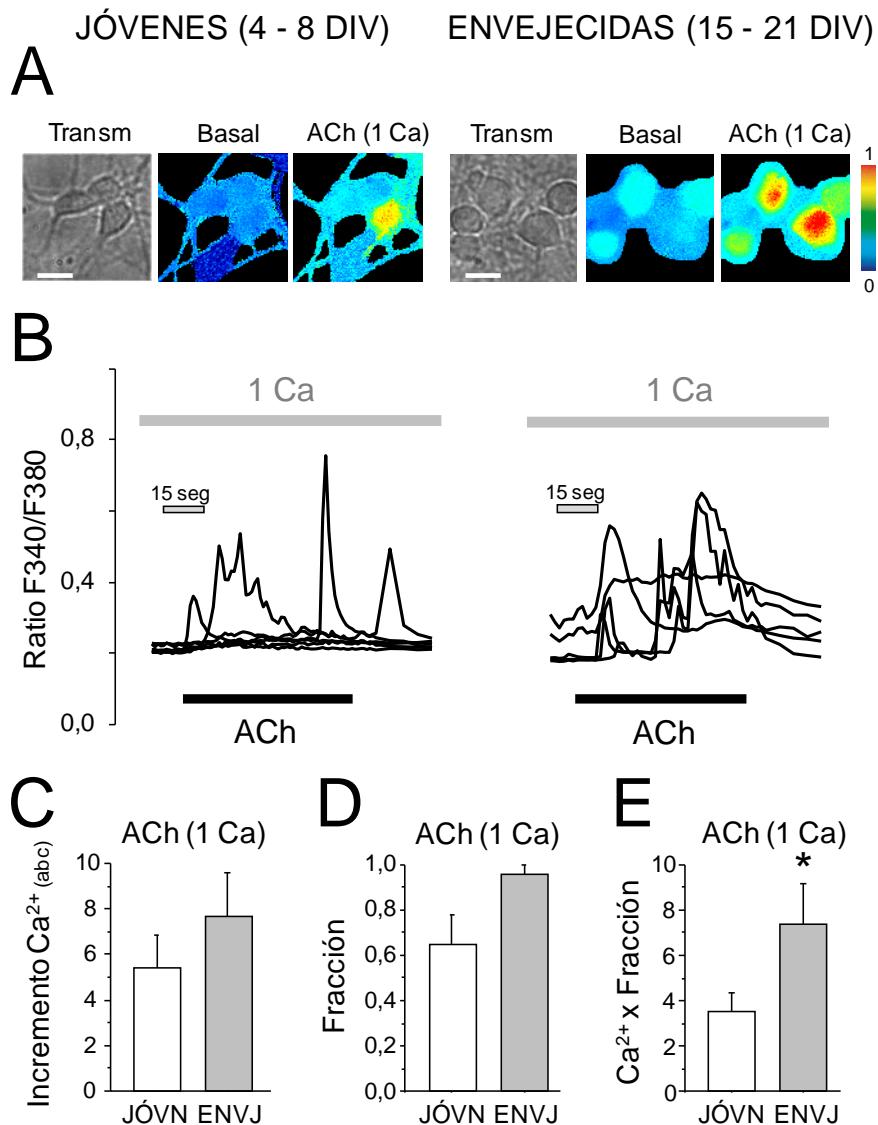


Figura 54. Respuesta a la estimulación con ACh en presencia de Ca²⁺ extracelular en neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas. A. Imágenes típicas de Ca²⁺ codificadas en pseudocolor. Se muestra la imagen de transmisión (transm), y de Ca²⁺ de las células en reposo en medio con Ca²⁺ (basal) y tras la estimulación con ACh (ACh, 1 Ca) en neuronas jóvenes y envejecidas. La escala de pseudocolor se muestra a la derecha. Las barras representan 10 μm. **B.** Registros típicos en célula única de respuesta a ACh (100 μM) aplicada durante 1 min en neuronas cargadas con fura-2 en presencia de Ca²⁺ extracelular 1 mM. **C.** Las barras muestran la media ± EEM del incremento de la [Ca²⁺]_{cit} (abc) en respuesta a ACh en medio 1 mM Ca en neuronas jóvenes y envejecidas. Sólo las células que respondieron están incluidas en el análisis de abc. **D.** Se muestra la fracción de células que respondieron. **E.** La medida Ca²⁺ x Fracción se calculó como el producto del incremento de Ca²⁺ por la fracción de células que respondieron. (n=25 y 22 células procedentes de 3 experimentos independientes respectivamente; *p<0,05).

Para determinar si la respuesta a ACh involucraba la movilización de Ca^{2+} de los depósitos, las neuronas se estimularon con ACh ($100 \mu\text{M}$) en medio extracelular libre de Ca^{2+} . Bajo estas condiciones, el agonista ACh elevó la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de forma transitoria. La amplitud de la respuesta (evaluada como área bajo la curva) fue menor que para las condiciones de 1 Ca y las respuestas no fueron oscilatorias. Cabe decir que los picos de respuesta a ACh en 0 Ca son muy rápidos y transitorios, pues para poder observar el pico hubo que tomar las imágenes con mayor frecuencia de captura (una imagen por segundo ó 1 Hz).

La **Figura 55** muestra la respuesta a ACh en medio libre de Ca^{2+} en las neuronas jóvenes y en las envejecidas. Las barras representan el valor medio de incremento de $\text{Ca}^{2+} \pm \text{EEM}$ de la respuesta de Ca^{2+} . La cantidad de Ca^{2+} de los depósitos que es movilizado por ACh parece similar en las neuronas jóvenes y en las envejecidas (**Figura 55 C**). Sin embargo, el porcentaje de respuesta se vio alterado. Sólo el $35 \pm 8\%$ de células jóvenes respondió a ACh en medio libre de Ca^{2+} , mientras que el $75 \pm 6\%$ de células envejecidas respondió a ACh (**Figura 55 D**). La multiplicación del incremento de Ca^{2+} por el número de células que respondieron ($\text{Ca}^{2+} \times \text{Fracción}$) mostrado en la **Figura 55 E** indica que hay diferencias globales de liberación de Ca^{2+} de los depósitos entre ambas poblaciones.

Los resultados anteriores muestran que la liberación global de Ca^{2+} inducida por ACh en medio libre de Ca^{2+} es mayor para las células envejecidas en cultivo; pese a que no existen diferencias significativas relacionadas con la edad en la amplitud máxima de liberación.

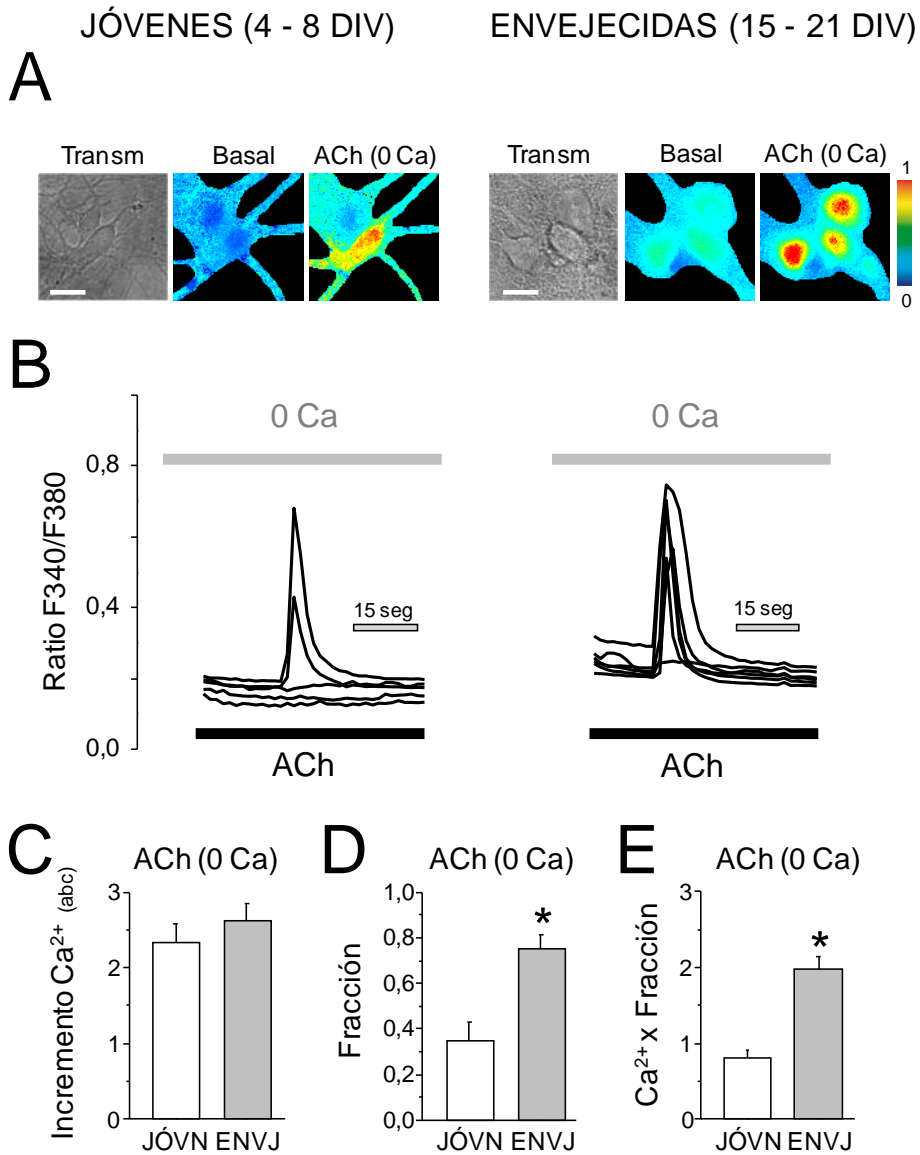


Figura 55. El incremento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ en respuesta a ACh en medio libre de Ca^{2+} no varía con la edad en las neuronas de hipocampo, pero sí aumenta el número de células que responden. A. Imágenes típicas de imagen de fluorescencia de Ca^{2+} codificadas en pseudocolor. Se muestra la transmisión (transm), las células en reposo en medio con Ca^{2+} (basal) y tras la estimulación con ACh en medio 0 Ca^{2+} en neuronas jóvenes y envejecidas. Las barras representan 10 μm . **B.** Registros típicos en célula única de la respuesta a ACh. La estimulación con ACh (100 μM , 1 min) en medio libre de Ca^{2+} (0 Ca) provocó una respuesta similar en neuronas jóvenes y envejecidas de hipocampo. **C.** Las barras muestran la media \pm EEM del aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en respuesta a ACh en medio 0 Ca en neuronas jóvenes y envejecidas. Sólo las células que respondieron están incluidas en el análisis de abc. **D.** Tanto por 1 de células que respondieron. **E.** La medida $Ca^{2+} \times$ Fracción muestra que la respuesta a ACh es significativamente mayor en las células envejecidas ($n=101$ y 109 células procedentes de 6 y 8 cultivos independientes respectivamente; $*p<0,05$).

2.4. El Ca^{2+} de los Depósitos Movilizado por ACh Es Captado por la Mitocondria en las Neuronas Envejecidas

En el apartado anterior comprobamos que aun existiendo diferencias con la edad en cultivo en la liberación global de Ca^{2+} inducida por ACh en medio libre de Ca^{2+} , no las hay en la liberación máxima de Ca^{2+} (Incremento de Ca^{2+} (abc)). Por el contrario, sabemos que sí existe una diferencia en el contenido de los depósitos en reposo (diferente respuesta a ionomicina, apartado 2.1.1). Por ello, nos planteamos comprobar si la mitocondria podría estar implicada en este resultado paradójico.

Para investigar la participación de la mitocondria en la respuesta a ACh, se empleó el desacoplante mitocondrial FCCP, que al inhibir el gradiente de protones mitocondrial abole el potencial de membrana mitocondrial requerido para la captación de Ca^{2+} (Gunter y Gunter 1994).

Las neuronas fueron expuestas a FCCP un minuto antes de la aplicación de ACh en ausencia de Ca^{2+} extracelular. En las neuronas jóvenes de hipocampo, la aplicación de ACh (100 μM) en presencia de FCCP provocó un incremento de Ca^{2+} (estudiado como área bajo la curva) similar al producido en las células control (ACh 100 μM , medio libre de Ca^{2+} y ausencia de FCCP) (**Figura 56**). Por el contrario, en las neuronas envejecidas de hipocampo, la respuesta a ACh en presencia de FCCP y medio libre de Ca^{2+} resultó mucho mayor al compararla con el aumento producido en las condiciones control (**Figura 57**). Por tanto, el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria hace que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ debido al vaciamiento de los depósitos inducido por ACh sea mayor; sugiriendo que en, condiciones normales, gran parte del Ca^{2+} liberado es captado por las mitocondrias de las neuronas envejecidas, hecho que no sucede en las neuronas más jóvenes.

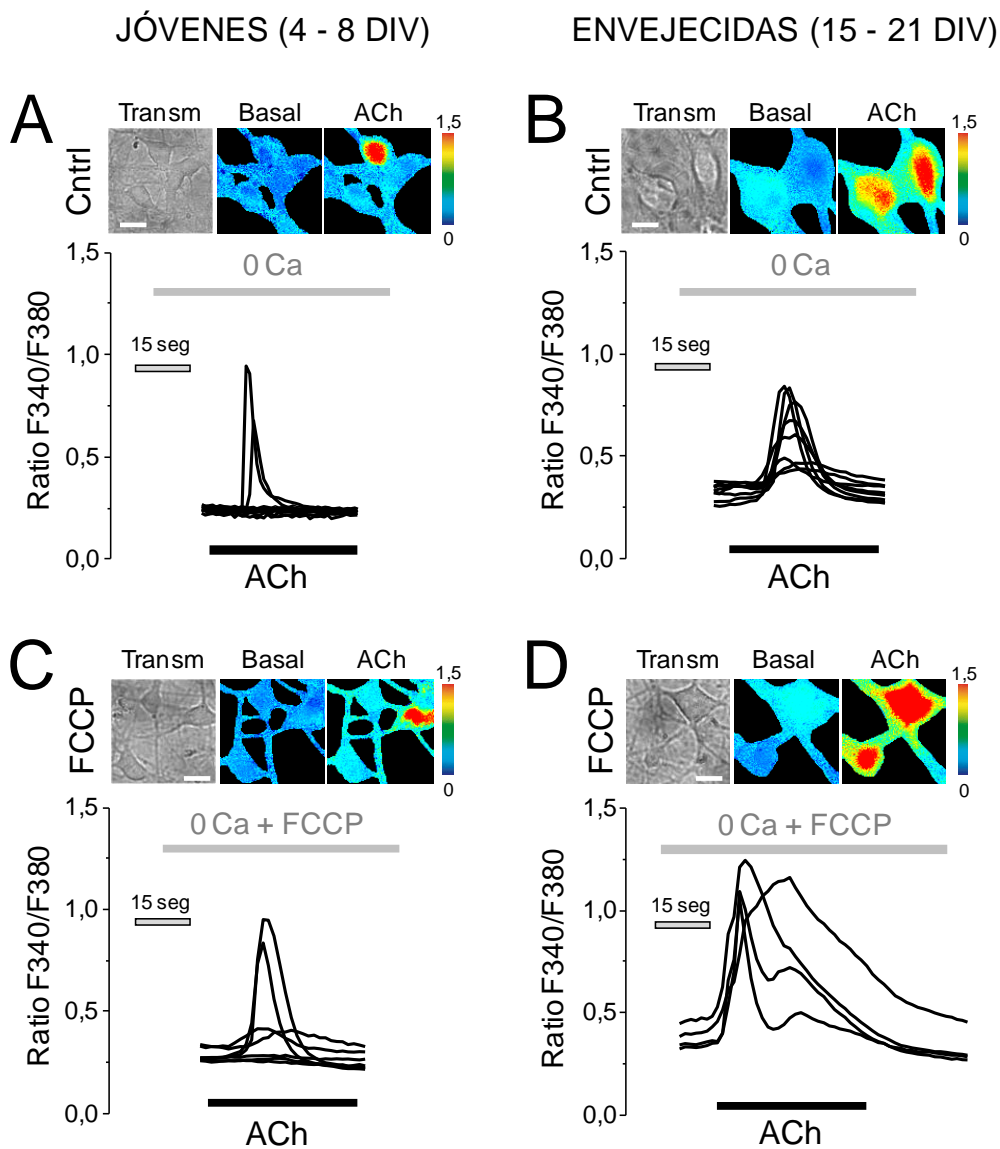


Figura 56. Imagen de fluorescencia de neuronas de hipocampo al inducir liberación de Ca^{2+} con ACh en ausencia o presencia de FCCP. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 4 - 8 (jóvenes) y 15 - 21 DIV (envejecidas) fueron cargadas con fura-2 y sometidas a imagen de fluorescencia. Se muestran imágenes de la transmisión (transm) y de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Ratio F340/F380) codificadas en pseudocolor de las células en reposo en medio con Ca^{2+} (basal) y tras la estimulación con ACh en medio libre de Ca^{2+} , en ausencia (Cntrl) (A, B) o presencia de FCCP (1 μM) (C, D), en neuronas jóvenes (A, C) y envejecidas (B, D). En la parte inferior se muestran registros en célula única de imagen de fluorescencia. Las barras representan 10 μm .

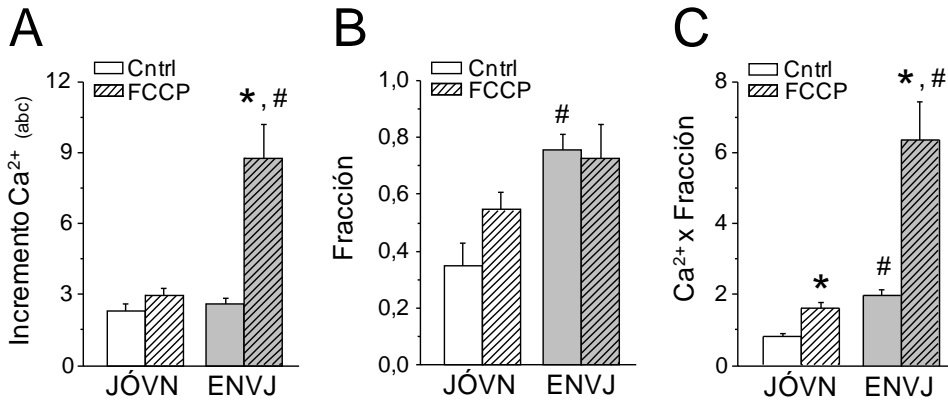


Figura 57. La mitocondria capta gran parte del Ca²⁺ liberado por ACh en neuronas envejecidas pero no en las jóvenes. **A.** La gráfica de barras muestra el incremento de Ca²⁺ ± EEM inducido por ACh (100 μM) en medio 0 Ca y presencia de FCCP en comparación con el control (0 Ca, ausencia de FCCP) en neuronas jóvenes y envejecidas de hipocampo. Se aprecia un aumento significativo en el incremento de la [Ca²⁺]_{cit} en las neuronas envejecidas en presencia del desacoplante mitocondrial. **B.** La fracción de células que respondieron no fue significativamente diferente entre la situación control y en presencia de FCCP. **C.** La medida Ca²⁺ x Fracción muestra que la respuesta global a ACh es significativamente mayor en presencia de FCCP (n=101, 84, 109 y 34 células analizadas procedentes de 4 - 8 cultivos independientes; *p<0,05 respecto al control; #p<0,05 respecto a jóvenes).

Tras mostrar que la mitocondria podría capturar el Ca²⁺ de los depósitos, decidimos medir directamente si la liberación de Ca²⁺ de los depósitos por ACh induce incremento de Ca²⁺ mitocondrial. La [Ca²⁺]_{mit} se evaluó mediante imagen de bioluminiscencia, para lo que las neuronas de hipocampo fueron transfectadas con aequorina *wt* dirigida a mitocondria (mitGA) y reconstituidas con celenterazina *h* (ver material y métodos). La **Figura 58** y **Figura 59** muestran cómo la estimulación con ACh (100 μM) en medio libre de Ca²⁺ induce un incremento de la [Ca²⁺]_{mit} principalmente en las neuronas envejecidas. Por el contrario, este incremento no aparece o es mucho menor en las neuronas jóvenes. Además, se aprecia que sólo un pequeño porcentaje de neuronas jóvenes presentaron un aumento de la [Ca²⁺]_{mit} al estimular con ACh (17 ± 9%), mientras que en las envejecidas el porcentaje fue significativamente mayor (70 ± 12%). También se muestra la multiplicación global de ambos factores. Estos datos sugieren que las mitocondrias de las células envejecidas

son mucho más susceptibles de captar el Ca^{2+} liberado de los depósitos que aquéllas de las neuronas jóvenes de hipocampo.

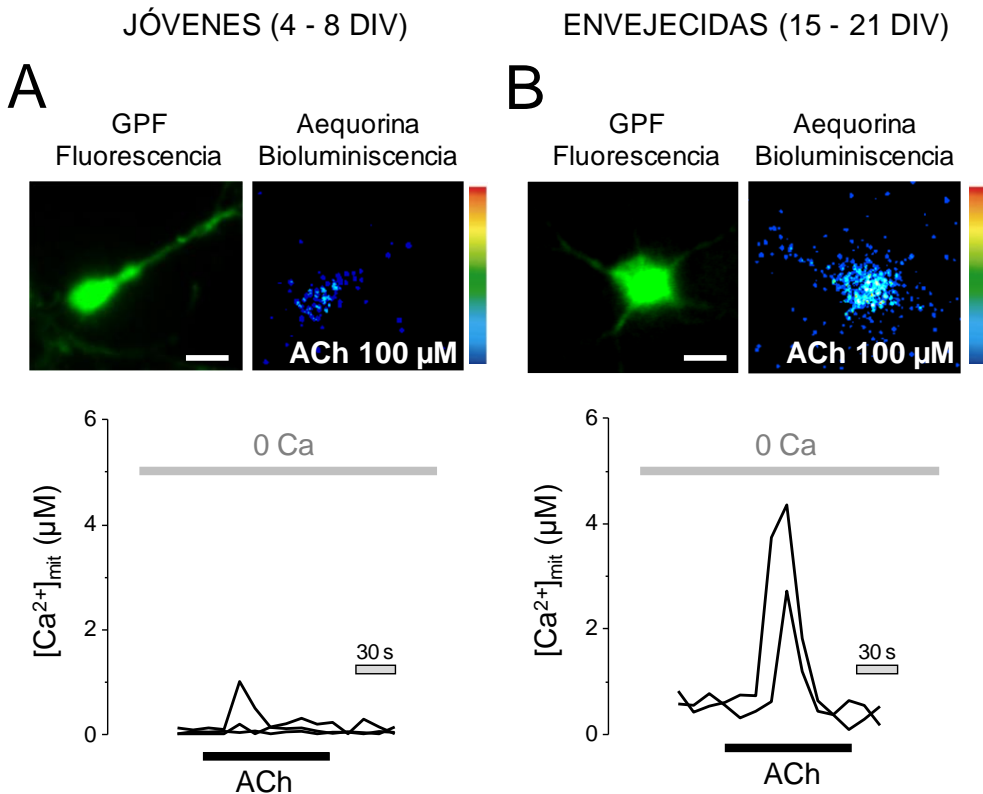


Figura 58. Imagen de bioluminiscencia correspondiente a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ de neuronas de hipocampo al inducir liberación de Ca^{2+} con ACh. Las neuronas de hipocampo cultivadas durante 4 - 8 (jóvenes) y 15 - 21 días (envejecidas) fueron transfectadas con AEQ dirigida a la mitocondria (mitGA), reconstituidas con celenterazina *h* y sometidas a imagen de bioluminiscencia para medir la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en célula única. Las células fueron perfundidas con el agonista ACh en medio libre de Ca^{2+} , y los fotones emitidos reflejo de la captación de Ca^{2+} por la mitocondria fueron registrados. **A, B.** Las fotos superiores muestran imágenes típicas de fluorescencia de células transfectadas (izquierda) y de fotones acumulados (derecha) durante la captación de Ca^{2+} en neuronas jóvenes (**A**) y envejecidas (**B**) de hipocampo. La escala de pseudocolor se muestra a la derecha. Las barras representan 10 μm. Las gráficas son registros característicos en célula única y representan el valor de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en células individuales al estimular con ACh (100 μM) en medio libre de Ca^{2+} . Registros representativos de 13 y 15 células procedentes de 4 experimentos independientes respectivamente.

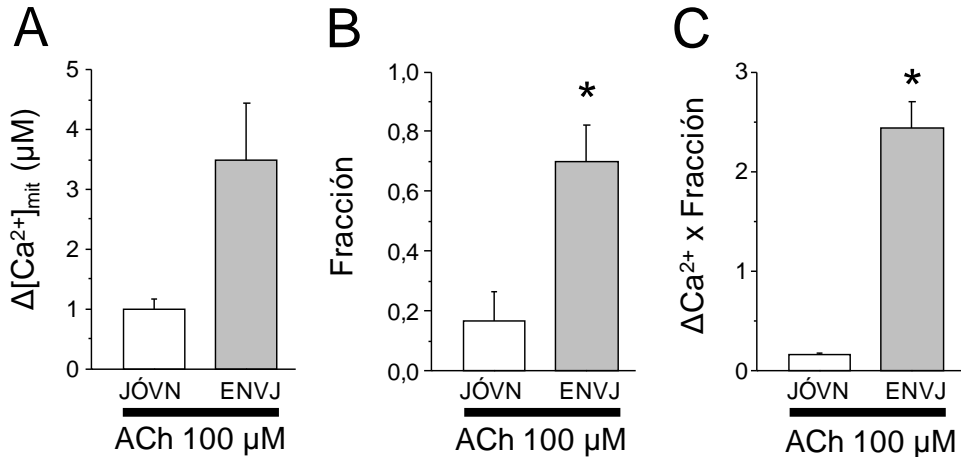


Figura 59. La captación mitocondrial de Ca^{2+} promovida por la liberación de Ca^{2+} inducida por ACh es mucho mayor en las neuronas envejecidas de hipocampo. **A.** Valores medios (media \pm EEM) del incremento en la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducido por la ACh. **B.** Fracción de respuesta (media \pm EEM), que fue significativamente diferente entre las neuronas jóvenes y las envejecidas. **C.** La medida $\Delta Ca^{2+} \times Fracción$ muestra que la respuesta global a ACh es significativamente mayor en las neuronas envejecidas. Datos derivados de 13 y 15 células procedentes de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a las jóvenes.

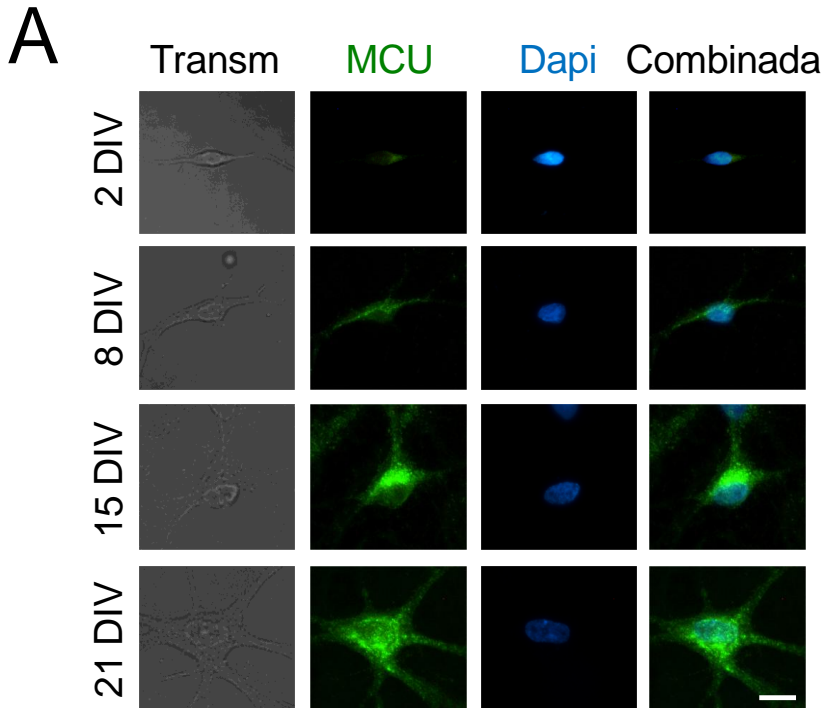
Estos resultados, junto con los anteriores, sugieren que en las neuronas envejecidas la mitocondria capta rápidamente el Ca^{2+} liberado por la ACh desde el RE, limitando la amplitud del pico de la $[Ca^{2+}]_{cit}$, y demuestran la importancia de la interacción entre los mecanismos celulares tamponadores de Ca^{2+} .

2.5. La Expresión del Uniportador de Calcio Mitocondrial Cambia con la Edad del Cultivo

Como se explicaba en la introducción, la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria se produce gracias al uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU), un canal localizado en la membrana interna de la mitocondria que permite el paso de Ca^{2+} a favor de gradiente (Baughman, Perocchi et al. 2011, De Stefani, Raffaello et al. 2011).

Una vez comprobado que las mitocondrias de las neuronas envejecidas en cultivo captan una mayor cantidad del Ca^{2+} que es liberado desde el RE tras la estimulación con ACh en medio externo libre de Ca^{2+} , decidimos estudiar si cambios en la expresión del MCU con el envejecimiento podrían estar implicados en las diferencias encontradas. Para ello, decidimos estudiar la expresión del MCU mediante ensayos de inmunofluorescencia en las neuronas de hipocampo a medida que envejecen en el cultivo.

La **Figura 60 A** muestra imágenes de inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo a diferentes DIV, marcadas con anticuerpos específicos frente al MCU. La **Figura 60 B** muestra que la densidad óptica promedio para el MCU aumenta de forma significativa a medida que las neuronas envejecen en cultivo. Este hecho podría explicar una mayor entrada de Ca^{2+} al interior de la mitocondria tras la estimulación con ACh y consecuente liberación de Ca^{2+} desde el RE, y explicar por tanto el mayor acoplamiento RE-mitocondria con el envejecimiento.



B

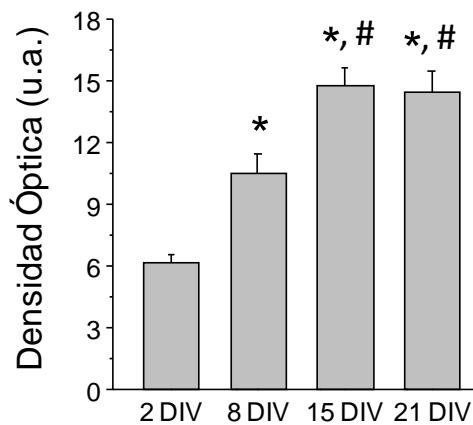


Figura 60. Detección por inmunofluorescencia de cambios en la expresión del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial con el envejecimiento. A. Imágenes de fluorescencia representativas de la detección del MCU en neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8, 15 y 21 DIV. La barra representa $10\ \mu\text{m}$ y aplica a todas las imágenes. **B.** Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia (densidad óptica, unidades arbitrarias) para el MCU. Las barras representan media \pm EEM ($n = 57, 51, 45$ y 19 células procedentes de 3 cultivos independientes. * $p < 0,05$ comparado con 2 DIV; # $p < 0,05$ comparado con 8 DIV).

3. Efecto del Tratamiento Crónico con $A\beta_{1-42}$ sobre los Depósitos Intracelulares de Calcio en Neuronas de Hipocampo Jóvenes y Envejecidas

Varios estudios han demostrado que la perturbación de la homeostasis del Ca^{2+} está asociada con la neurotoxicidad que sucede en la Enfermedad de Alzheimer (EA), como es por ejemplo la pérdida de neuronas por apoptosis en células que han sido previamente tratadas con oligómeros del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ (Huang, Ou et al. 2000). Estudios recientes parecen mostrar además que la alteración de la función de orgánulos intracelulares como el RE puede tener un papel relevante en la regulación del Ca^{2+} durante el envejecimiento o la EA (Toescu y Verkhratsky 2003). En base a esto, decidimos estudiar si el péptido tóxico implicado en la EA, $A\beta_{1-42}$, produce cambios en el contenido y liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares.

Para ello evaluamos, mediante imagen de fluorescencia de Ca^{2+} , el contenido de Ca^{2+} de los depósitos, así como su vaciamiento inducido por diferentes agonistas fisiológicos, en neuronas de hipocampo cultivadas *in vitro* y tratadas con los oligómeros del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$. Para alcanzar este objetivo se emplearon neuronas jóvenes (4 - 8 DIV) y envejecidas en cultivo (15 - 21 DIV) de hipocampo.

3.1. El Tratamiento Crónico de las Neuronas de Hipocampo Envejecidas con los Oligómeros de $A\beta_{1-42}$ Aumenta el Nivel de Ca^{2+} Basal y las Oscilaciones de Ca^{2+}

En primer lugar, decidimos investigar los efectos del tratamiento crónico con oligómeros de $A\beta_{1-42}$. Para ello se estudió su efecto tanto sobre los niveles basales de Ca^{2+} como sobre las oscilaciones sincrónicas y espontáneas de Ca^{2+} , dos

características que sabemos que varían a medida que las neuronas envejecen en el cultivo. Ambos factores fueron analizados mediante imagen de fluorescencia de Ca^{2+} .

En general, en la literatura, para estudiar los efectos crónicos de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ sobre la actividad neuronal, se emplean concentraciones entre 0,1 - 10 μM de éste, y el tratamiento permanece de 8 a 72 h, en función de la concentración empleada (Nicholson y Ferreira 2009, Arora, Alfulaj et al. 2013) (REFFF!!). En este trabajo, hemos estudiado los efectos de la exposición crónica (24 h) a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ a una concentración de 1 μM , ya que a esta concentración provoca menos toxicidad y permite estudiar efectos a largo plazo, como se expondrá más adelante.

Las neuronas se trataron 24 h con $A\beta_{1-42}$ (1 μM) o sólo con MEM, que es el vehículo en el que los oligómeros fueron disueltos. Estas últimas condiciones fueron tomadas como grupo control. La **Figura 61** muestra cómo las neuronas de hipocampo envejecidas tratadas con $A\beta_{1-42}$ (1 μM , 24 h) mostraron un incremento significativo del nivel de Ca^{2+} basal (en reposo) al compararlo con el grupo de neuronas control. Así mismo, detectamos que la incubación con $A\beta_{1-42}$ aumentó de forma significativa las oscilaciones sincrónicas y espontáneas de Ca^{2+} en las neuronas de hipocampo envejecidas en comparación con el grupo control, tanto en la frecuencia como en la amplitud, medidas como índice de oscilaciones IO (**Figura 61 C**). Por el contrario, la exposición de las neuronas jóvenes a oligómeros de $A\beta_{1-42}$ tuvo pequeño efecto tanto en el nivel de Ca^{2+} basal como en las oscilaciones sincrónicas y espontáneas de Ca^{2+} .

Estos resultados sugieren que la exposición prolongada de las neuronas de hipocampo a los oligómeros del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ aumenta la excitabilidad del circuito neuronal, a nivel de Ca^{2+} basal como de las oscilaciones espontáneas, preferentemente en las neuronas envejecidas, no ejerciendo el mismo efecto en las jóvenes.

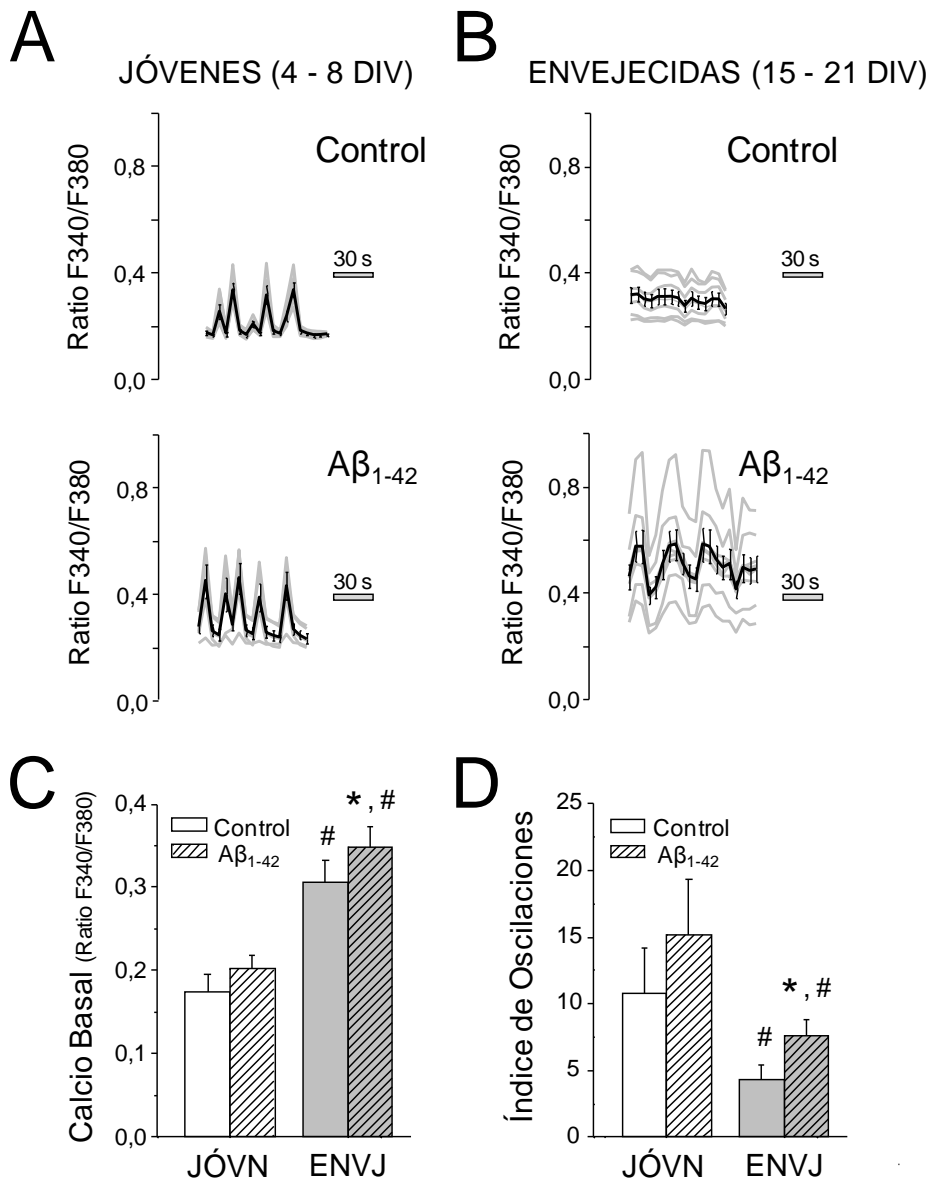


Figura 61. Efectos de la exposición crónica de las neuronas de hipocampo a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ sobre el Ca^{2+} basal y las oscilaciones sincrónicas y espontáneas de Ca^{2+} . Neuronas de hipocampo cultivadas durante diferentes días *in vitro* fueron tratadas con los oligómeros del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 24 h); y la $[Ca^{2+}]_{cit}$ fue monitorizada mediante imagen de fluorescencia. **A, B.** Los trazos muestran registros individuales (trazos en gris) y la media \pm EEM (trazos en negro) del aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ previo a cualquier estímulo en neuronas jóvenes (**A**) y envejecidas (**B**). **C, D.** Las barras representan la media \pm EEM del valor de Ca^{2+} basal (Ratio F340/F380) (**C**) y del índice de oscilaciones (**D**) para neuronas jóvenes y envejecidas, tratadas en ausencia (control) o presencia de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (barras rayadas). Valores correspondientes a 113, 97, 131 y 169 neuronas procedentes de 4 y 6 experimentos independientes respectivamente. * $p < 0,05$ respecto al grupo control; # $p < 0,05$ respecto a las jóvenes.

3.2. El Contenido de los Depósitos Intracelulares de Ca^{2+} Aumenta en las Neuronas de Hipocampo Envejecidas Expuestas a los Oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$

A continuación, estudiamos el contenido de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares tras el tratamiento continuo con $\text{A}\beta_{1-42}$. Para ello, se evaluó el nivel de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, empleando ionomicina. Esto fue monitorizado mediante imagen de fluorescencia de Ca^{2+} en neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas, tratadas con los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (1 μM , 24 h) y comparándolas con las control (tratadas sólo con el medio en el que se disolvieron los oligómeros). Los experimentos fueron realizados siempre en medio extracelular libre de Ca^{2+} , para eliminar la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo.

La estimulación de las neuronas de hipocampo con ionomicina (400 nM) en medio libre de Ca^{2+} produjo un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en todas las neuronas estudiadas, como se muestra en la **Figura 62**. La exposición a los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (1 μM , 24 h) no modificó el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por ionomicina en las neuronas jóvenes (**Figura 62 A, C**). Por el contrario, en las células envejecidas en cultivo, el tratamiento crónico con $\text{A}\beta_{1-42}$ aumentó de forma significativa el contenido de los depósitos, representado por el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por ionomicina en medio libre de Ca^{2+} (**Figura 62 B, D**).

Estos resultados sugieren que el tratamiento continuo de neuronas de hipocampo con oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (1 μM) aumenta el contenido de los depósitos de Ca^{2+} intracelular exclusivamente en neuronas envejecidas, un efecto que podría estar relacionado con el aumento de los niveles basales de Ca^{2+} apreciado en las neuronas envejecidas tratadas con los oligómeros, pero que no ocurre en las neuronas consideradas jóvenes (**Figura 63**).

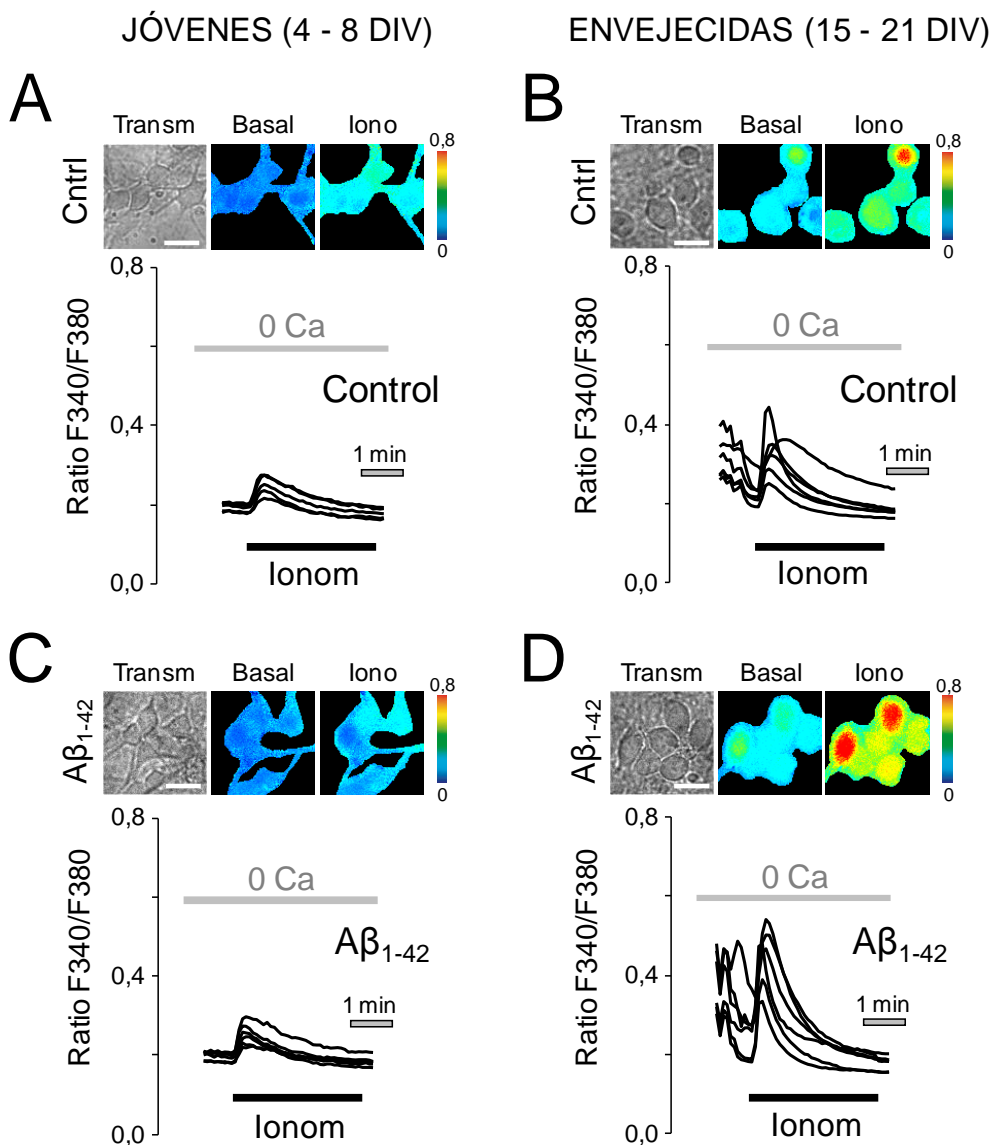


Figura 62. Imagen de fluorescencia de neuronas de hipocampo sin tratar o tratadas con oligómeros de Aβ₁₋₄₂ al estimular con ionomicina. Neuronas de hipocampo sin tratar o tratadas con Aβ₁₋₄₂ (1 μM, 24 h) y cargadas con fura-2 fueron estimuladas con ionomicina (400 nM) en medio libre de Ca²⁺ y sometidas a imagen de fluorescencia para estimar el contenido de Ca²⁺ de los depósitos. **A, B.** Imágenes representativas de neuronas de hipocampo jóvenes (**A**) y envejecidas (**B**) en transmisión (transm), en reposo (basal) y estimuladas con ionomicina en 0 Ca. La barra de pseudocolor se muestra a la derecha (valores de ratio de 0 (azul) - 0,8 (rojo)). Los registros muestran la liberación de Ca²⁺ inducida por ionomicina (400 nM) en medio 0 Ca en células individuales sometidas a imagen de fluorescencia. Las barras representan 10 μm.

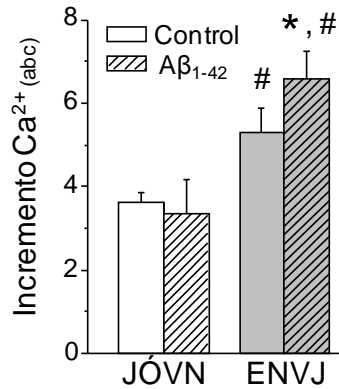


Figura 63. El tratamiento de neuronas de hipocampo con oligómeros de Aβ₁₋₄₂ (24 h) aumenta los niveles de Ca²⁺ de los depósitos en las neuronas envejecidas. Las barras representan la media en el aumento de la [Ca²⁺]_{cit} en respuesta a ionomicina (medido como área bajo la curva) (media ± EEM, n = 55, 42, 81 y 114 células individuales procedentes de 3 y 6 cultivos independientes respectivamente; *p<0,05 al comparar con el grupo control; #p<0,05 al comparar con las jóvenes).

3.3. El Ca²⁺ de los Depósitos Movilizado por ACh Aumenta en las Neuronas Envejecidas de Hipocampo Expuestas a los Oligómeros de Aβ₁₋₄₂

Para determinar algunas de las consecuencias funcionales del aumento de los niveles de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares, decidimos analizar la liberación de Ca²⁺ de los depósitos movilizado por diferentes agonistas. En primer lugar estudiamos la liberación de Ca²⁺ mediado por el receptor de IP₃, para lo que empleamos el neurotransmisor ACh. Para eliminar la contribución de la entrada de Ca²⁺ y estudiar sólo la liberación de los depósitos, los experimentos fueron realizados en ausencia de Ca²⁺ en el medio extracelular.

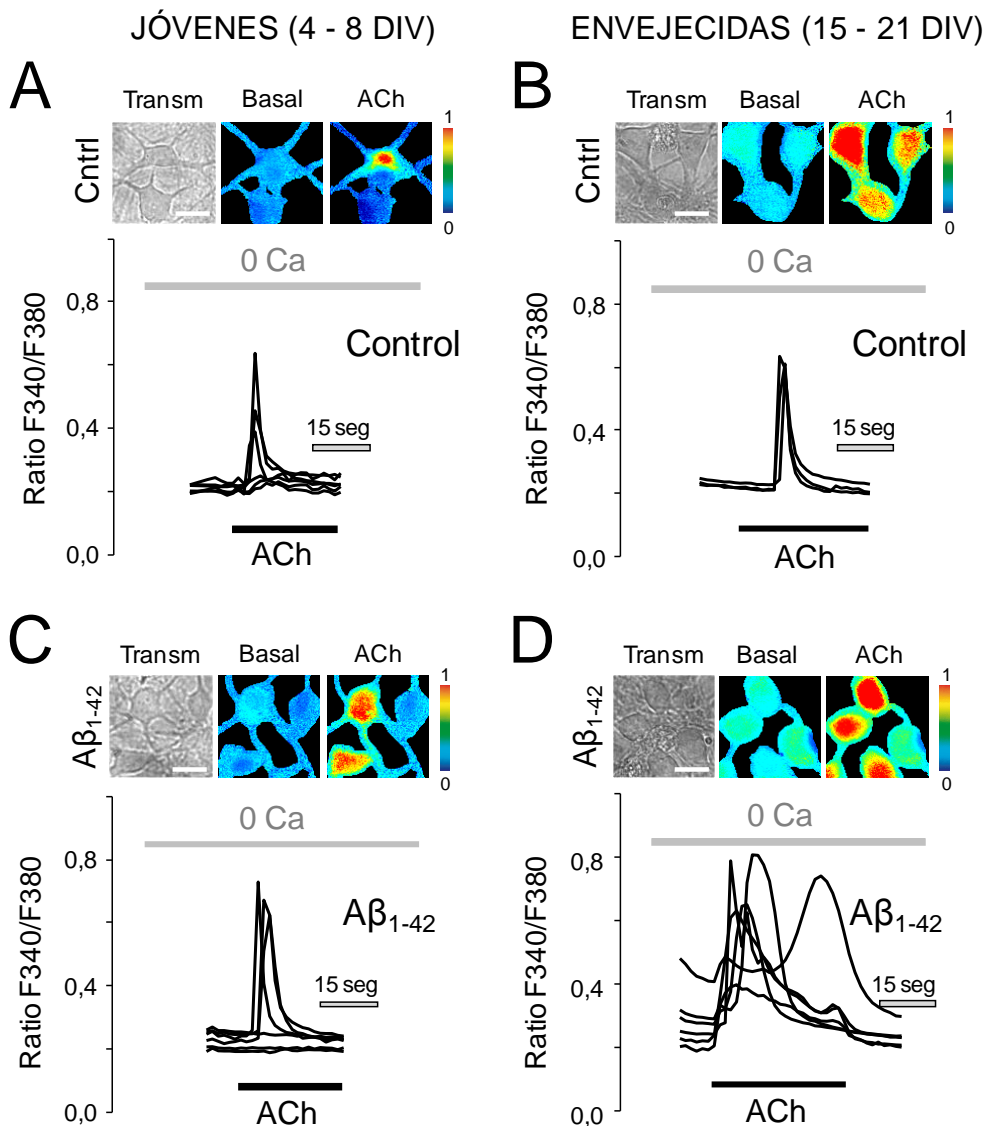


Figura 64. Imagen de fluorescencia de neuronas de hipocampo sin tratar o tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ al estimular con ACh. Neuronas de hipocampo incubadas con $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 24 h) y cargadas con fura-2 fueron sometidas a imagen de fluorescencia para monitorizar la $[Ca^{2+}]$ liberado de los depósitos por estimulación con ACh. **A - D.** Imágenes en pseudocolor de neuronas de hipocampo jóvenes (**A, C**) y envejecidas (**B, D**) en transmisión (transm), en reposo (basal) y estimuladas con ACh en 0 Ca. La barra de pseudocolor se muestra a la derecha (valores de ratio de 0 (azul) - 1 (rojo)). En la parte inferior se muestran registros significativos de imagen de fluorescencia de Ca^{2+} en célula única de la liberación de Ca^{2+} inducido por ACh (100 μ M) en medio 0 Ca. Las barras representan 10 μ m.

Como ya hemos visto en el apartado 2.2, cuando aplicamos ACh (100 μM) a neuronas de hipocampo en medio externo libre de Ca^{2+} , se produce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Las respuestas a ACh en ausencia Ca^{2+} de neuronas jóvenes y envejecidas previamente incubadas con los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ estudiadas mediante imagen de fluorescencia se muestran en la **Figura 64**. A continuación, la **Figura 65** refleja la cuantificación de estos aumentos. Las barras representan el valor medio del incremento de Ca^{2+} (área bajo la curva \pm EEM) de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Se puede observar que el tratamiento crónico con los oligómeros no modifica el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por ACh en medio libre de Ca^{2+} en las neuronas jóvenes de hipocampo. Sin embargo, en las neuronas envejecidas, el tratamiento crónico promueve una mayor respuesta a ACh en medio libre de Ca^{2+} al compararlo con las células control (**Figura 65 A**). También se muestra la fracción de las células que responden, que se mantuvo mayor para las neuronas envejecidas (**Figura 65 B**). La **Figura 65 C**, muestra las diferencias globales de liberación de Ca^{2+} de los depósitos entre las cuatro poblaciones.

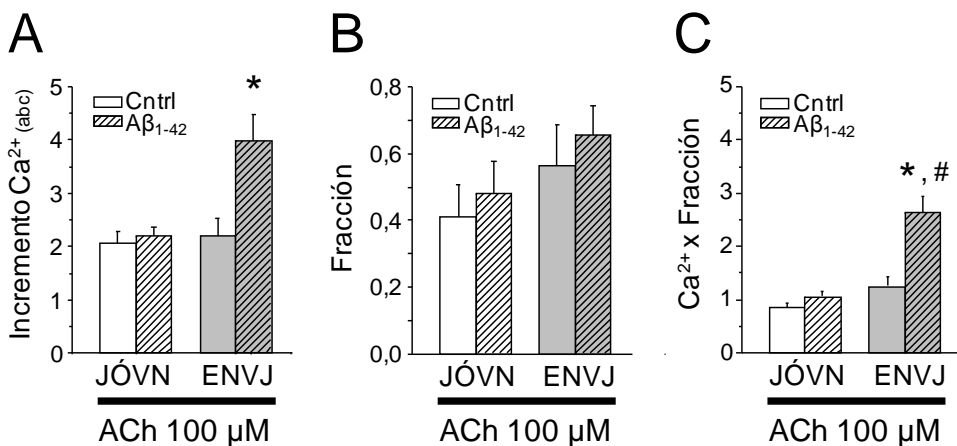


Figura 65. La cantidad de Ca^{2+} movilizado al estimular con ACh aumentó significativamente para las neuronas de hipocampo envejecidas en cultivo tratadas con los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (24 h). **A.** Las barras representan los resultados resumen para 102, 94, 39 y 59 células procedentes de 4 y 4 cultivos independientes respectivamente (media \pm EEM, área bajo la curva). **B.** Se muestra la fracción de células que respondió (media \pm EEM). **C.** La medida Ca^{2+} x Fracción muestra que la respuesta global a ACh es significativamente mayor en las neuronas envejecidas que han sido tratadas con los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (* $p < 0,05$ al comparar con el grupo control; # $p < 0,05$ al comparar con las jóvenes).

3.4. El Ca^{2+} de los Depósitos Movilizado por Cafeína Aumenta en las Neuronas Envejecidas de Hipocampo Expuestas a los Oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$

A continuación, se analizó la liberación de Ca^{2+} de los depósitos a través de receptores de rianodina, para lo que se empleó cafeína (20 mM), un agonista de los receptores de rianodina. Al igual que anteriormente, se empleó Ca^{2+} nominal en el medio celular externo en lugar de medio libre de Ca^{2+} ; y previo a la adición de la cafeína se añadió al medio extracelular 20 mM de glucosa, que fue sustituido posteriormente por la cafeína 20 mM, evitando así una variación osmótica elevada al aplicar cafeína a una concentración 20 mM.

Cuando las neuronas de hipocampo fueron estimuladas con cafeína (20 mM) en medio extracelular con Ca^{2+} nominal, se observó un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ rápido y transitorio, como puede observarse en la **Figura 66**. Las barras mostradas en la **Figura 67 A** representan el valor medio \pm EEM del incremento de Ca^{2+} (área bajo la curva) de la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. El Ca^{2+} de los depósitos movilizado por cafeína fue similar en las neuronas jóvenes (tratadas o no con los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$) y en las envejecidas sin tratar. Sin embargo, para las neuronas envejecidas que previamente habían sido tratadas con $\text{A}\beta_{1-42}$ (1 μM , 24 h), el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ fue significativamente mayor que para el grupo control. La **Figura 67 C** muestra el incremento de Ca^{2+} global que produce la cafeína en estas condiciones (Ca^{2+} x Fracción).

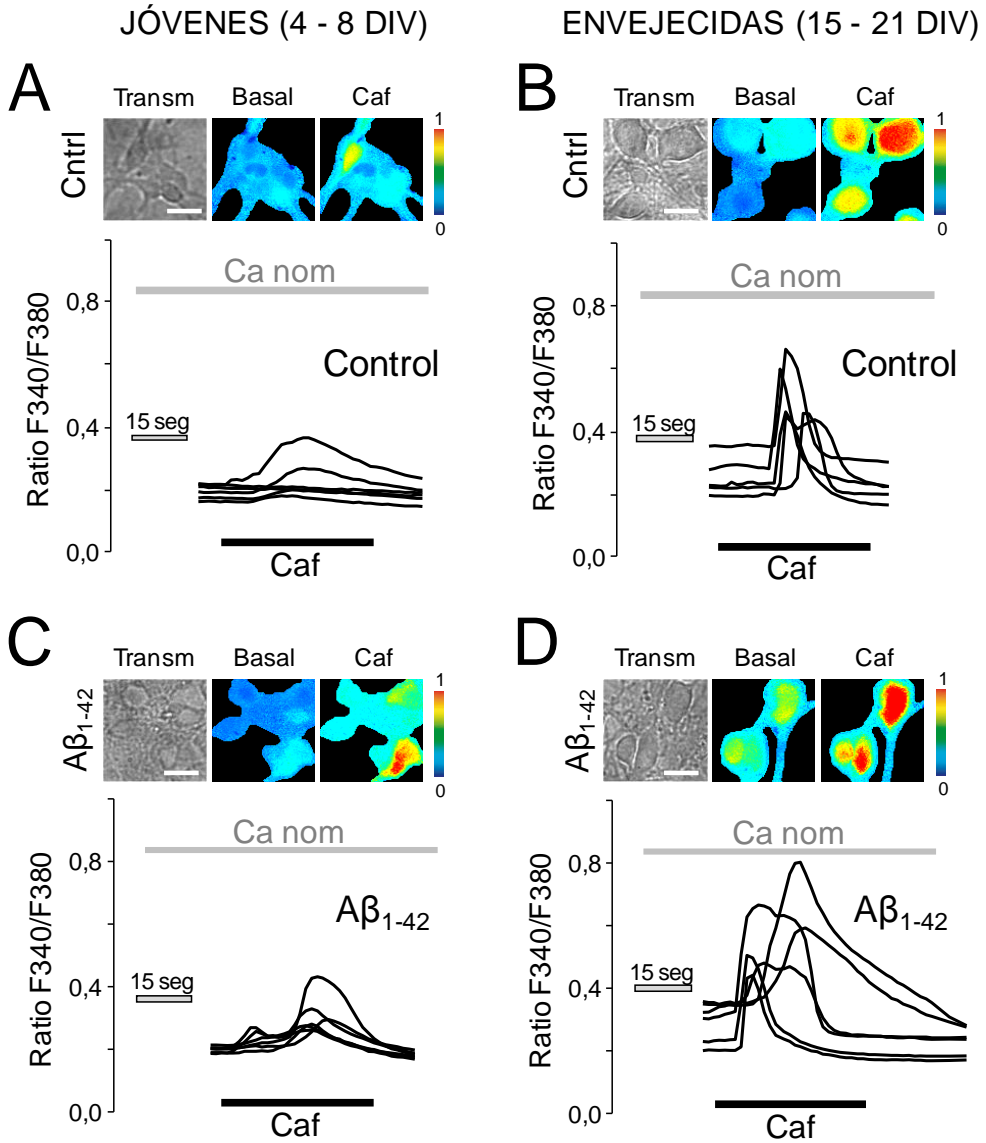


Figura 66. Imagen de fluorescencia de neuronas de hipocampo sin tratar o tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ al estimular con cafeína. A, B. Imágenes representativas codificadas en pseudocolor de la respuesta máxima de Ca^{2+} a cafeína en células jóvenes (A, C) y envejecidas (B, D) de hipocampo previamente tratadas (C, D) o no (control) (A, B) con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 24 h). En la parte inferior se muestran registros representativos de imagen de fluorescencia en células individuales de neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas expuestas o no (control) a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 24 h) y estimuladas con cafeína 20 mM en presencia de Ca^{2+} nominal. Las barras representan 10 μ m.

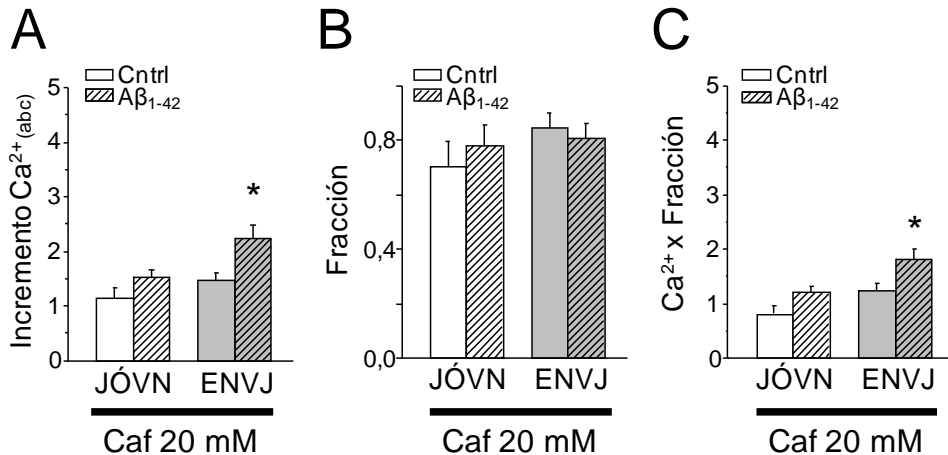


Figura 67. La liberación de Ca^{2+} de los depósitos al estimular con cafeína aumentó significativamente en las neuronas de hipocampo envejecidas en cultivo y expuestas a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (24 h). **A.** Las barras representan el incremento de Ca^{2+} (área bajo la curva) medio \pm EEM de la respuesta de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ al estimular con cafeína de 56, 78, 94 y 105 células procedentes de 3 y 5 cultivos independientes respectivamente. **B.** Se muestra la fracción de células que respondió (media \pm EEM). **C.** Las barras muestran el resultado global de la multiplicación de ambos factores.

3.5. Los Oligómeros de $A\beta_{1-42}$ Inducen Apoptosis en las Neuronas Envejecidas de Hipocampo. La ACh Protege frente a la Neurotoxicidad de los Oligómeros

Finalmente, decidimos evaluar si la neurotoxicidad causada por $A\beta_{1-42}$ se ve afectada por la presencia de uno de estos neurotransmisores, la ACh que, como hemos mostrado anteriormente, aumenta la cantidad de Ca^{2+} movilizado de los depósitos en las neuronas envejecidas cuando éstas han sido tratadas con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. Para ello, las neuronas de hipocampo de ambas poblaciones (jóvenes y envejecidas) fueron expuestas a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en ausencia o presencia de ACh. La muerte por apoptosis fue analizada por el método de anexina V.

La exposición de las neuronas de hipocampo jóvenes a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 24 h) no produjo un aumento en el porcentaje de células apoptóticas al compararlas con aquellas tratadas sólo con el medio (el porcentaje de células

apoptóticas fue $2,86 \pm 0,51$ vs $2,50 \pm 0,24$ el control) (**Figura 68 A**). Sin embargo, cuando las neuronas envejecidas fueron tratadas con $A\beta_{1-42}$ en las mismas condiciones, el porcentaje de células apoptóticas sí aumentó de forma significativa al compararlas con el grupo control (el porcentaje de células apoptóticas fue $18,13 \pm 1,10$ vs $5,19 \pm 1,45$ el control) (**Figura 68 B**). La incubación de las neuronas con ACh ($100 \mu\text{M}$, 24 h) no resultó tóxico en ninguno de los casos ($2,00 \pm 1,16$ en las jóvenes y $4,47 \pm 0,78$ en las envejecidas). Cuando las neuronas envejecidas de hipocampo fueron expuestas a la combinación de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y ACh el porcentaje de muerte por apoptosis no aumentó sino que se vio reducido en un $56,04 \pm 5,12\%$.

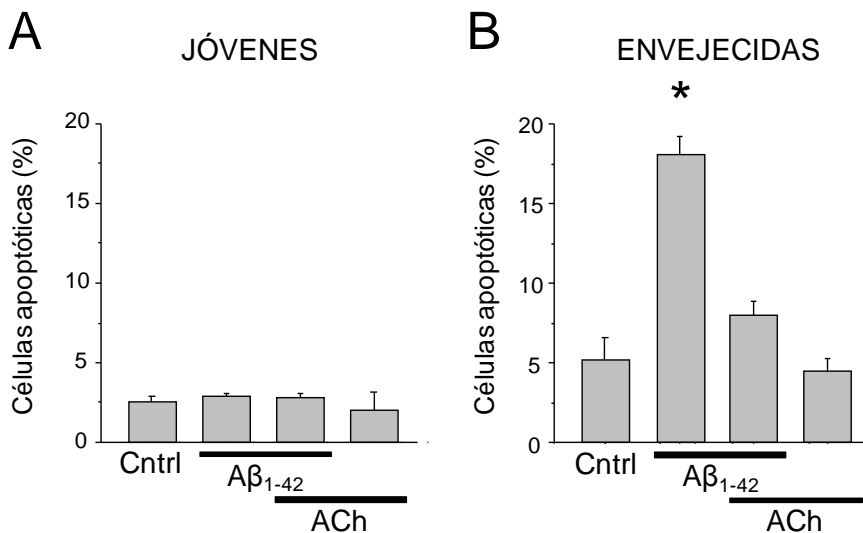


Figura 68. Los oligómeros del péptido amiloide inducen muerte neuronal sólo en neuronas envejecidas y ACh protege frente a la neurotoxicidad de éstos. Los cultivos de hipocampo de neuronas jóvenes (**A**) y envejecidas (**B**) fueron expuestos durante 24 h a ACh ($100 \mu\text{M}$), a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ ($1 \mu\text{M}$), o a la combinación de ambos. El porcentaje de neuronas apoptóticas fue evaluado mediante incubación con anexina V. Las barras representan la media \pm EEM del porcentaje de células en apoptosis por condición ($n=3$ y 4 experimentos independientes respectivamente; $*p<0,05$ comparado con el grupo control).

Estos resultados nos llevaron a pensar que el tratamiento con ACh podría estar influyendo no sólo al receptor muscarínico de ACh, sino también al nicotínico, pues la incubación con ACh se realiza en medio de cultivo Neurobasal (al contrario que los experimentos de fluorescencia, realizados en medio libre de Ca^{2+}). Por esta razón, decidimos utilizar carbacol (CCh) en lugar de ACh, un compuesto que afecta únicamente al receptor muscarínico de ACh, y estudiar así su efecto directo sobre éste.

La **Figura 69** muestra cómo la exposición de neuronas de hipocampo envejecidas a la combinación de los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (1 μM , 24 h) y CCh (100 μM , 24 h) no rescató de la muerte que producía la incubación de las neuronas únicamente con los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$, aunque tampoco aumentó el porcentaje de células apoptóticas. Por el contrario, la exposición a CCh 100 μM sí aumentó el número de células apoptóticas con respecto al grupo control.

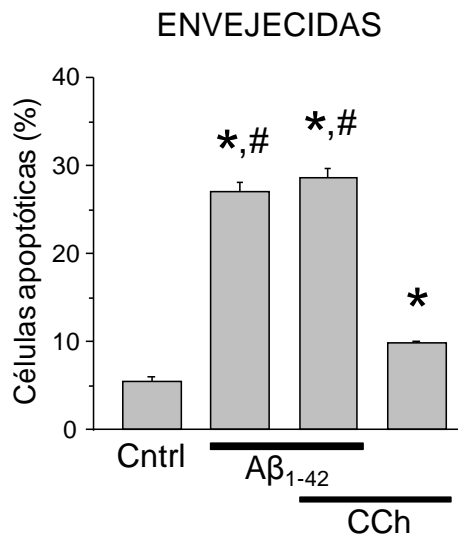


Figura 69. La neurotoxicidad producida en las neuronas envejecidas por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ no se ve afectada al tratar con CCh. Cultivos de hipocampo de neuronas envejecidas fueron expuestos durante 24 h a CCh (100 μM), a los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (1 μM), o a la combinación de ambos. El porcentaje de neuronas apoptóticas fue evaluado mediante incubación con anexina V. Las barras representan la media \pm EEM del porcentaje de células en apoptosis por condición (n=3 experimentos independientes respectivamente; * $p < 0,05$ comparado con el grupo control; # $p < 0,05$ comparado con el grupo tratado con CCh sólo).

Tras estudiar la implicación de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} en el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas como la EA, decidimos estudiar otra de las características que se ha visto involucrada en éstos. Nos referimos a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, en condiciones en que esta entrada se ve afectada patológicamente, como es en el proceso de excitotoxicidad.

4. Susceptibilidad a la Excitotoxicidad en el Envejecimiento

Como se ha mencionado en la introducción, la excitotoxicidad está implicada en ciertos desórdenes degenerativos, como en la isquemia y en ciertas enfermedades neurodegenerativas, siendo el envejecimiento uno de los principales factores de riesgo. Durante el proceso isquémico, se produce una disminución del flujo sanguíneo, lo que lleva a una disminución del suministro de oxígeno y por tanto del ATP tan necesario para la célula para obtener energía. Es por ello que las bombas dependientes de ATP fallan, lo que conlleva a la despolarización de las membranas celulares. Cuando esto sucede, aumenta el flujo de iones al interior celular, entre ellos el Ca^{2+} . Este aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólica activa de forma excesiva los receptores de NMDA, lo que puede llevar al proceso conocido como excitotoxicidad. Este proceso conlleva la generación de ROS y la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, por lo que ésta puede liberar factores proapoptóticos, llevando a la muerte celular por el mecanismo de apoptosis (Lipton 2005). Con estos antecedentes, nuestro siguiente paso fue estudiar los mecanismos implicados en la susceptibilidad a la muerte neuronal debido a la excitotoxicidad en el envejecimiento.

4.1. Efecto del NMDA sobre la Apoptosis Neuronal

Es sabido que la exposición de neuronas de hipocampo en cultivo a concentraciones micromolares de NMDA aumenta el número de células apoptóticas (Choi, Maulucci-Gedde et al. 1987). Por ello, lo primero que nos propusimos fue conocer el efecto del NMDA sobre la apoptosis en nuestro modelo de neuronas de hipocampo cultivadas durante diferentes DIV.

La excitotoxicidad se indujo tratando las neuronas de hipocampo de diferentes DIV durante 1 h y a temperatura ambiente con NMDA 100 μM , preparado

en un medio libre de magnesio y junto con el coagonista glicina $10 \mu\text{M}$, previo lavado de las células. Después de la hora, los cristales que contenían las células fueron devueltos a su medio de cultivo Neurobasal original, y se mantuvieron 24 h en el incubador. Entonces se cuantificó la apoptosis marcando la fosfatidilserina que se expone en la cara externa de las membranas de las células apoptóticas con anexina V. La **Figura 70 A** muestra imágenes representativas de la transmisión y la anexina V de neuronas control o tratadas con NMDA, a diferentes DIV. Los resultados revelaron que el NMDA no indujo apoptosis en los cultivos de neuronas jóvenes (2 DIV), al comparar el grupo tratado con NMDA con el grupo control; sin embargo, sí aumentó de forma significativa el número de células apoptóticas en neuronas maduras (8 DIV), efecto que fue aún mayor para las neuronas envejecidas (13 - 16 DIV y 17 - 21 DIV) (**Figura 70 B**).

Además, el efecto apoptótico inducido por el NMDA en los cultivos envejecidos es dosis-dependiente, pues cuando neuronas envejecidas (16 DIV) fueron expuestas a concentraciones crecientes de NMDA, las concentraciones más altas indujeron un mayor número de células apoptóticas. Este efecto fue completamente inhibido por el antagonista de NMDA MK-801 ($10 \mu\text{M}$) (**Figura 70 C**).

Estos resultados indican que, de acuerdo con estudios anteriores (Choi, Maulucci-Gedde et al. 1987), a medida que las neuronas de hipocampo maduran en el cultivo, aumenta su susceptibilidad al estímulo excitotóxico, en nuestro caso, el NMDA.

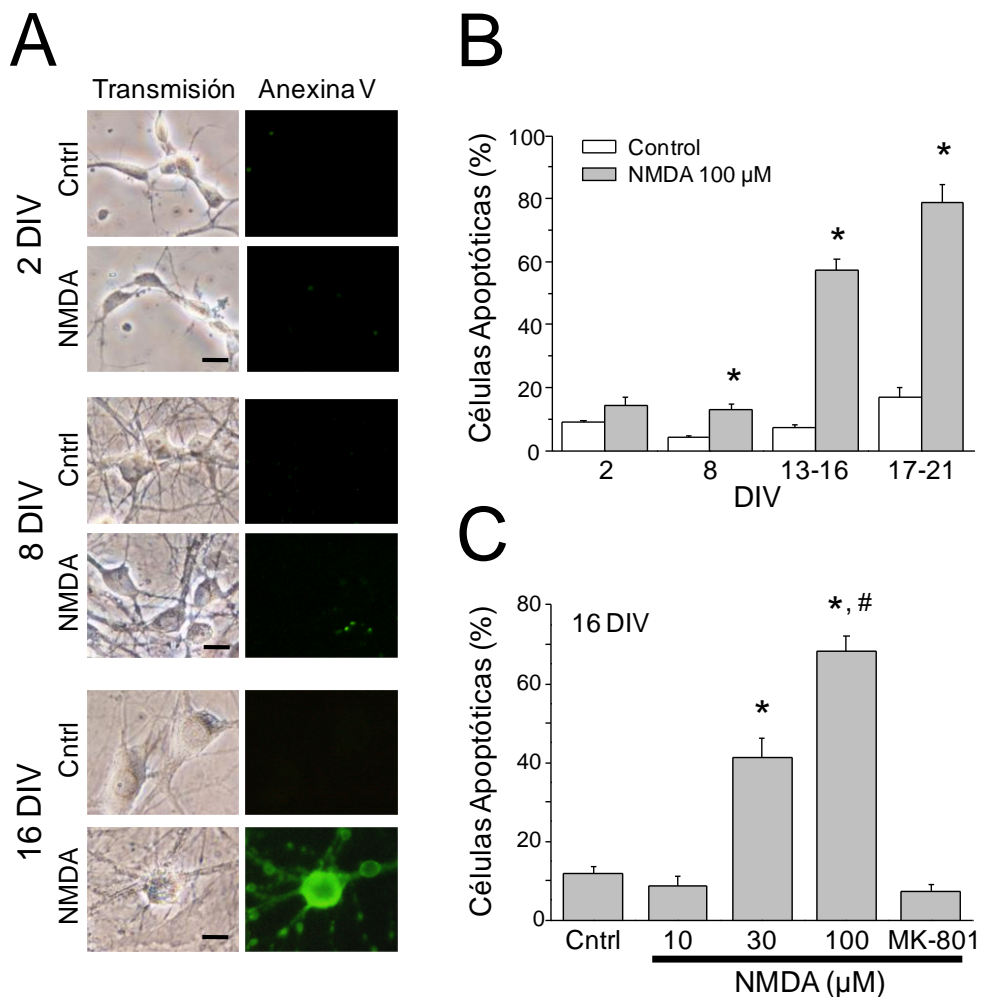


Figura 70. NMDA induce apoptosis en neuronas maduras y envejecidas de hipocampo.

Neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo durante 2, 8, 13 - 16 y 17 - 21 DIV se trataron durante 1 h en ausencia (control) o presencia de NMDA (100 μ M). La apoptosis se evaluó 24 h después con anexina V. **A.** Imágenes representativas del campo claro (transm) y de la inmunofluorescencia de la anexina V de neuronas en cultivo tratadas o no con NMDA. Las barras representan 10 μ m. **B.** Porcentaje de células apoptóticas en condiciones control o tratadas con NMDA. Las barras representan los valores medios \pm EEM de al menos tres experimentos procedentes de cultivos independientes. * p <0,05 al comparar con el grupo control. **C.** Efecto de diferentes concentraciones de NMDA (10, 30 y 100 μ M) sobre neuronas de hipocampo envejecidas (16 DIV) evaluado con anexina V (n=3 experimentos independientes; * p <0,05 vs control. # p <0,05 vs 30 μ M). Se muestra también el efecto de MK-801 10 μ M al tratar junto con NMDA 100 μ M.

4.2. Efecto del NMDA sobre la Señal de Ca^{2+} Citosólico

4.2.1. El Incremento de Ca^{2+} Citosólico Inducido por NMDA es Mayor en las Neuronas Envejecidas que en las Jóvenes

Debido a que las neuronas envejecidas presentaban mayor vulnerabilidad al NMDA, decidimos estudiar si este efecto se correlacionaba con un aumento del influjo de Ca^{2+} inducido por el NMDA. Para ello investigamos el efecto del NMDA sobre la concentración de Ca^{2+} en neuronas jóvenes y envejecidas.

Como hemos mencionado en la sección de material y métodos, los cultivos celulares empleados para este trabajo son cultivos mixtos, es decir, no son cultivos puros en los que sólo está presente un único tipo celular, sino que están presentes tanto neuronas como células de la glía. Por tanto, es necesario identificar ambos tipos para poder estudiar de forma separada sus respuestas. Las neuronas se diferencian fácilmente de la glía en el microscopio: aparecen en fase brillante cuando se visualizan en transmisión, poseen diferente morfología, pues presentan procesos (axones y dendritas) y soma redondeado, y se encuentran en un plano focal diferente de la capa glial. Además, el NMDA provoca aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en todas las neuronas presentes en el campo del microscopio pero no en las células de la glía (**Figura 71**).

Para estudiar el efecto del NMDA sobre la concentración de Ca^{2+} citosólico, las neuronas fueron estimuladas con NMDA ($100 \mu\text{M}$) para activar los NMDARs o con medio alto en K^+ (145 mM) para activar los VOCs. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ fue medido por imagen de fluorescencia utilizando la sonda de Ca^{2+} fura-2/AM. La **Figura 72** muestra imágenes representativas codificadas en escala de pseudocolor de neuronas de hipocampo a 2, 8 ó $>13 \text{ DIV}$ antes o tras estimular con NMDA $100 \mu\text{M}$ o con K^+ 145 mM .

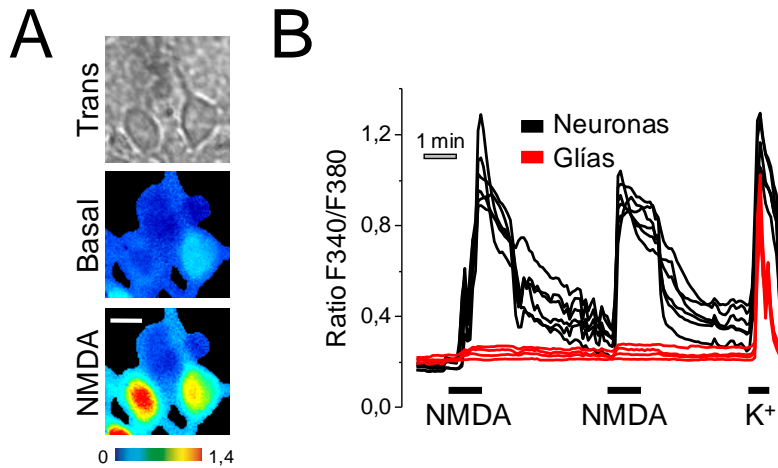


Figura 71. El NMDA sólo indujo incremento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en las neuronas presentes en el campo, pero no en las glías. Cultivos de neuronas y glías de hipocampo fueron cargadas con fura-2 y sometidas a imagen de fluorescencia de Ca^{2+} . **A.** Se muestran imágenes en transmisión y de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Ratio F340/F380) codificadas en pseudocolor de neuronas en estado de reposo (basal) y tras la estimulación con NMDA 100 μ M (NMDA). **B.** Registros representativos de células individuales de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ tras el estímulo con NMDA (100 μ M) en neuronas y en células gliales de hipocampo. Las barras representan 10 μ m.

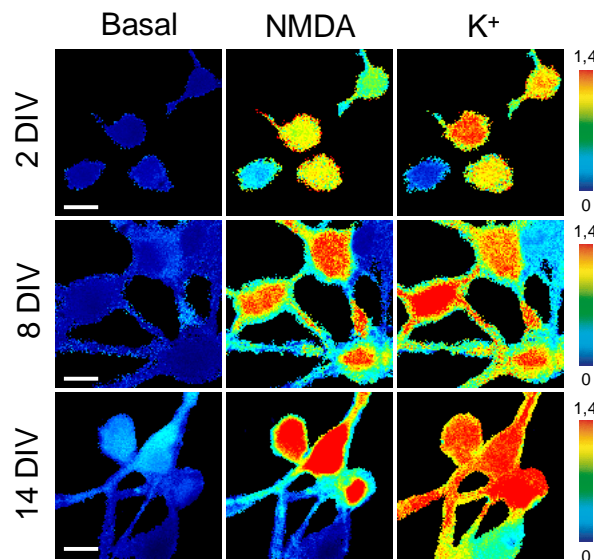


Figura 72. Imágenes en pseudocolor representativas de neuronas de hipocampo sometidas a imagen de fluorescencia. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8 y 14 DIV fueron cargadas con fura-2 y sometidas a imagen de fluorescencia de Ca^{2+} . Se muestran imágenes de $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Ratio F340/F380) codificadas en pseudocolor de neuronas en estado de reposo (basal), tras perfusión con NMDA 100 μ M (NMDA) y tras perfusión con K^+ 145 mM (K^+). La escala de pseudocolor se muestra a la derecha (valores de Ratio de 0 (azul) - 1,4 (rojo)). Las barras representan 10 μ m.

Los resultados reflejaron que el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por el NMDA (cuantificado como el incremento del Ratio F340/F380 (Δ Ratio)) era dependiente de la edad de los cultivos. La **Figura 73 A** muestra registros típicos de aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por NMDA (100 μ M) en células individuales a diferentes DIV. Una segunda estimulación llevada a cabo en las mismas condiciones tras un lavado de 4 minutos produjo un aumento similar en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (**Figura 74**). Se puede observar que el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ fue mayor en las neuronas maduras (8 DIV) que en las neuronas jóvenes (2 DIV), efecto que aumentó significativamente en las envejecidas (13 - 16 DIV y 17 - 21 DIV). Además, la $[Ca^{2+}]_{cit}$ se mantuvo elevada en las neuronas envejecidas durante tiempos más largos. En la **Figura 73 B** se comparan las respuestas medias del aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ de neuronas a 2, 8, 13 - 16 y 17 - 21 DIV inducido por NMDA. Este aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ fue inhibido completamente por MK-801 (10 μ M) en todos los días de cultivo estudiados (**Figura 74**).

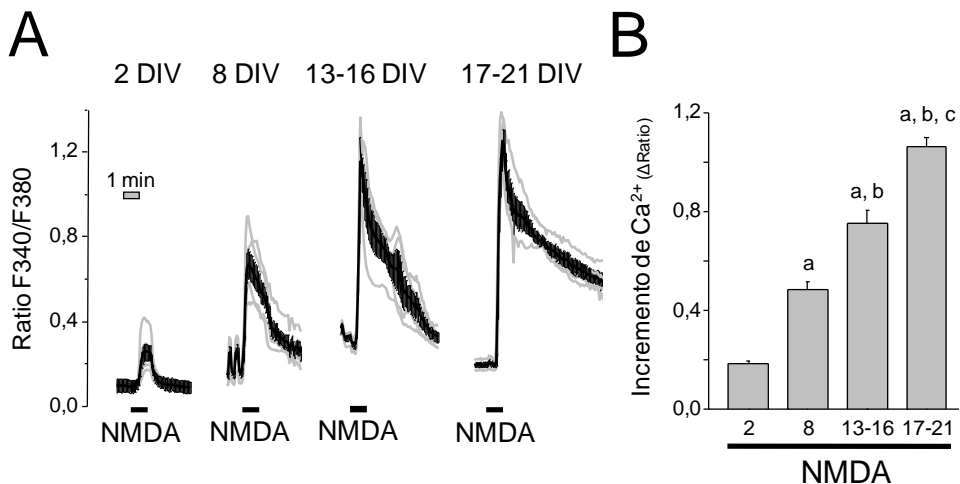


Figura 73. La respuesta a NMDA aumenta con el tiempo de cultivo. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8, 13 - 16 y 17 - 21 DIV fueron cargadas con fura-2 y sometidas a imagen de fluorescencia de Ca^{2+} . **A.** Trazos representativos de células individuales (trazos grises) y media \pm EEM (trazo negro) de la respuesta de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ al estimular con NMDA 100 μ M en neuronas de hipocampo a diferentes DIV. **B.** Media en el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en respuesta al NMDA (Δ Ratio) (media \pm EEM, n=32 - 66 células individuales procedentes de 3 - 6 experimentos independientes; ^ap<0,05 al comparar con 2 DIV; ^bp<0,05 al comparar con 8 DIV; ^cp<0,05 al comparar con 13 - 16 DIV).

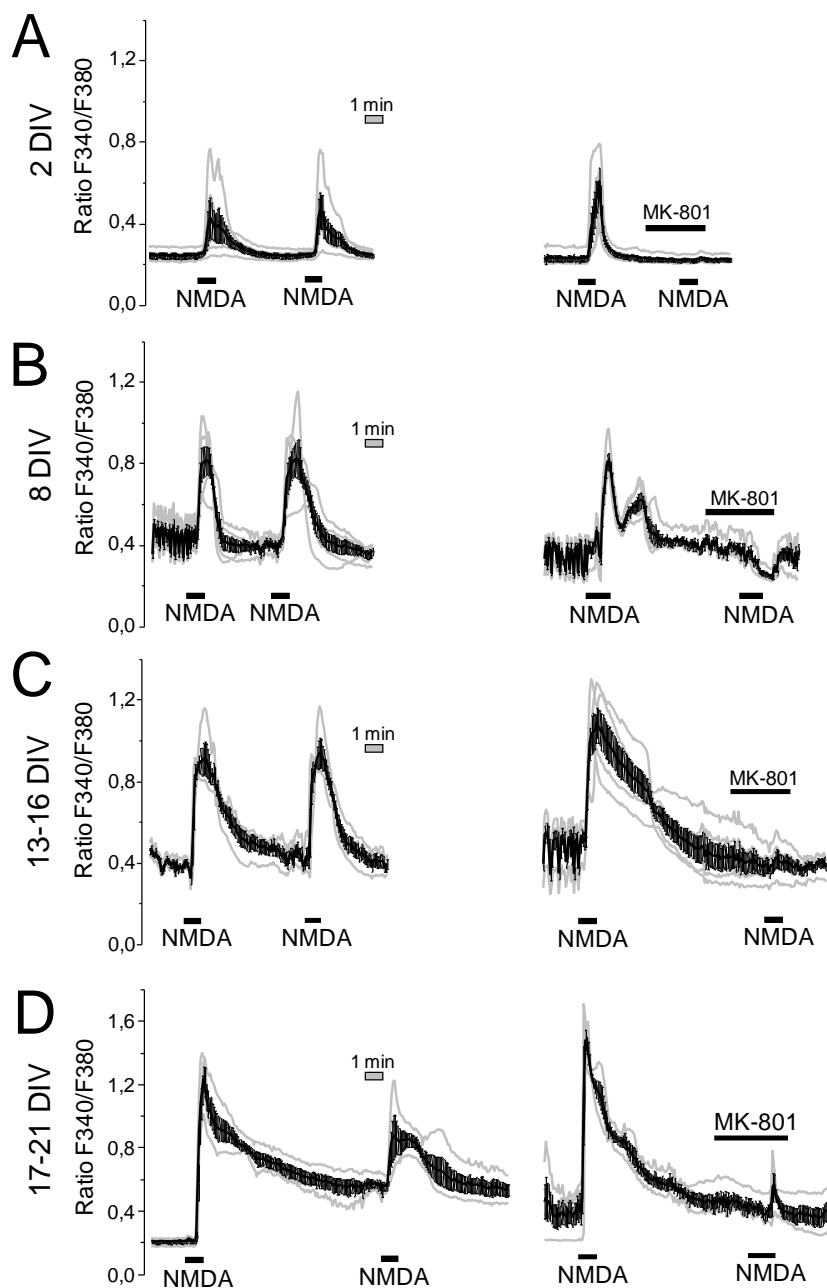


Figura 74. MK-801 inhibe el aumento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por NMDA en cultivos jóvenes y envejecidos. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8, 13 - 16 y 17 - 21 DIV fueron cargadas con fura-2 y sometidas a imagen de fluorescencia de Ca^{2+} . **A - D.** Trazos representativos de células individuales (trazos grises) y la $[Ca^{2+}]_{cit}$ media \pm EEM (trazo negro) de la respuesta a dos estimulaciones con NMDA 100 μ M en ausencia o presencia de MK-801 (10 μ M) en neuronas cultivadas durante 2 DIV (**A**), 8 DIV (**B**), 13 - 16 DIV (**C**) Y 17 - 21 DIV (**D**). Los datos son representativos de 25 - 48 células procedentes de al menos 3 experimentos independientes.

En algunos experimentos, el NMDA indujo incrementos muy elevados de la $[Ca^{2+}]_{cit}$, pudiendo limitar la capacidad de la sonda de alta afinidad fura-2 para revelar diferencias en el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. Para solventar esta limitación, decidimos repetir algunos experimentos utilizando fura-4F, una sonda de menor afinidad por Ca^{2+} , y por tanto idónea para el registro de grandes incrementos de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. Los resultados muestran que, de forma consistente a lo obtenido para fura-2, el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por NMDA (100 μ M) en las neuronas de hipocampo era pequeño a 2 DIV, y aumentaba a mayores días de cultivo (**Figura 75**).

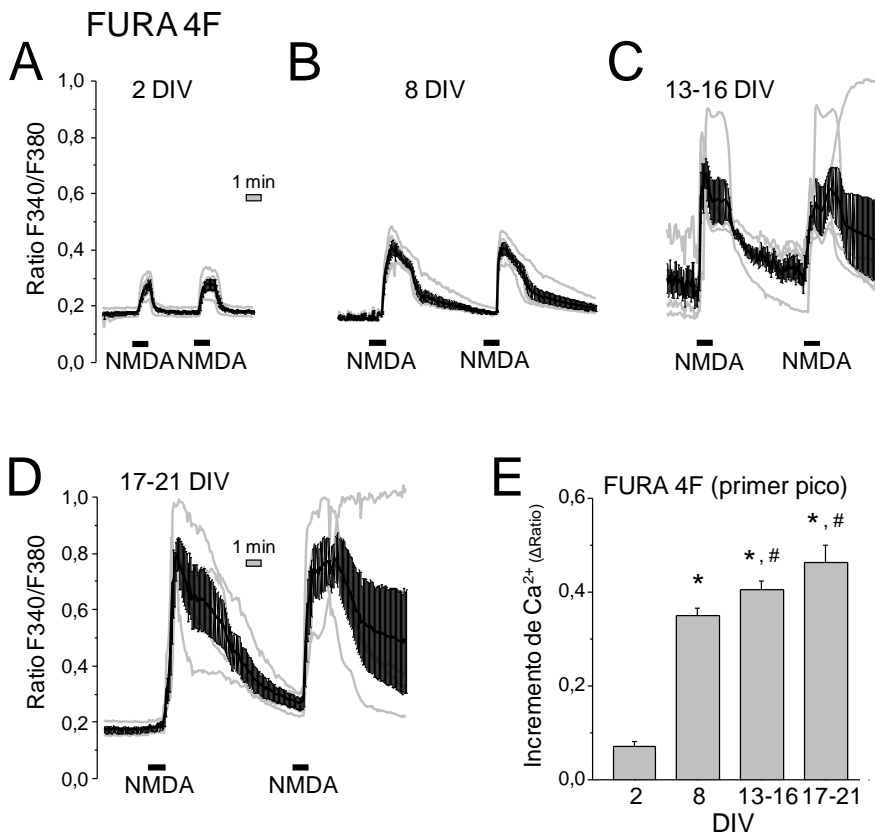


Figura 75. Aumento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por NMDA y medido con la sonda de baja afinidad fura-4F. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8, 13 - 16 y 17 - 21 DIV fueron cargadas con fura-2 y sometidas a imagen de fluorescencia Ca^{2+} . **A - D.** Los trazos muestran registros individuales (trazos en gris) y la media \pm EEM (trazos en negro) del aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en respuesta a NMDA 100 μ M en neuronas cultivadas durante 2 (**A**), 8 (**B**), 13 - 16 (**C**) y 17 - 21 (**D**) DIV. **E.** Media en el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en respuesta a NMDA medido con fura-4F (Δ Ratio) (media \pm EEM, n=24 - 66 células individuales procedentes de 3 - 4 experimentos independientes; *p<0,05 al comparar con 2 DIV; #p<0,05 al comparar con 8 DIV).

4.2.2. Cambios en la Concentración de Ca^{2+} Inducidos por NMDA se Correlacionan con la Susceptibilidad a la Apoptosis en las Mismas Células.

A continuación decidimos comprobar si las neuronas de hipocampo envejecidas en las que el NMDA inducía aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ eran susceptibles de sufrir apoptosis, lo que nos llevó a estudiar ambas características de forma simultánea en las mismas células.

Para ello, las neuronas de hipocampo fueron sometidas a un estímulo de NMDA 100 μM , y el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ fue analizado por imagen de fluorescencia. Las neuronas permanecieron expuestas a NMDA durante 1 h, tras lo que fueron lavadas con medio celular externo. 5 h después, se evaluó la apoptosis en las mismas células empleando el método de anexina V. La **Figura 76** muestra un ejemplo de la evaluación simultánea en las mismas células del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y la apoptosis por anexina V.

Del número total de células en las que se evaluó conjuntamente la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y la apoptosis, un $82 \pm 9\%$ de las células presentaron apoptosis tras producirse un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ debido a la estimulación con NMDA 100 μM .

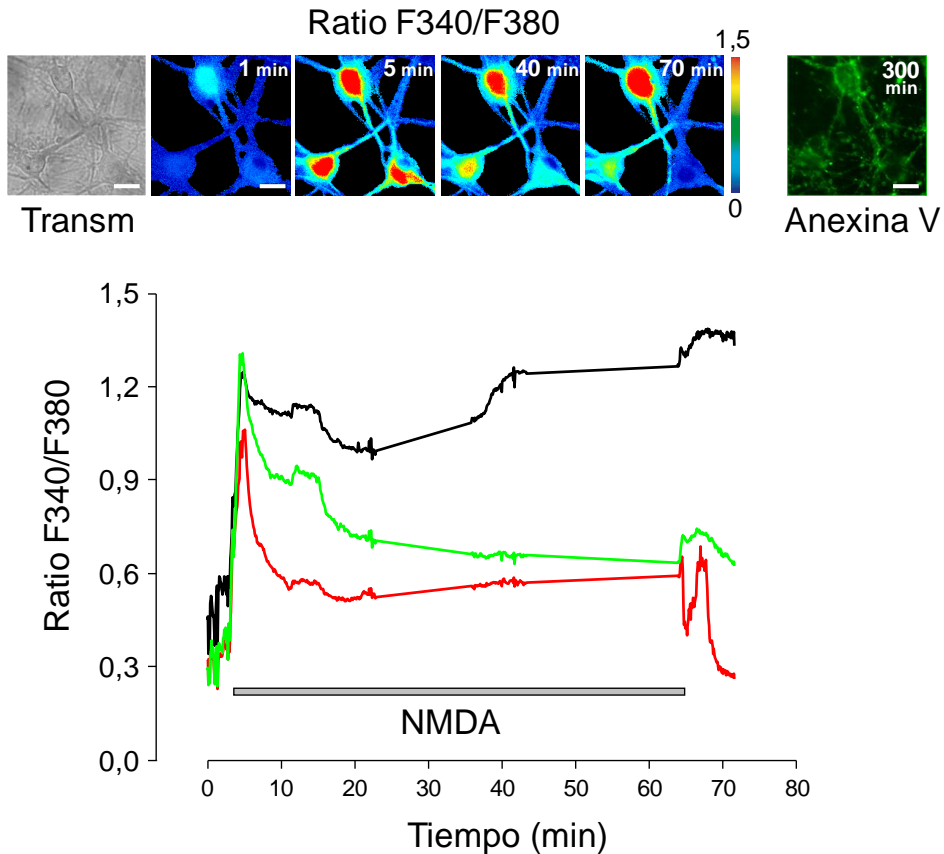


Figura 76. Imagen simultánea del aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ y de la apoptosis inducida por NMDA en las mismas neuronas (15 DIV). Las imágenes muestran la transmisión (izquierda), imágenes en pseudocolor (Ratio F340/F380) antes (basal) y a tiempos diferentes tras la estimulación con NMDA 100 μ M, y la tinción de las mismas células con anexina V tras varias horas de tratamiento con el NMDA a la derecha. Las barras representan 10 μ m. El registro muestra el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Ratio F340/F380). La perfusión de las células con NMDA 100 μ M durante 60 min aumentó la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en las tres neuronas, e indujo la apoptosis en ellas. Durante el registro, la luz de excitación se detuvo por periodos de 10 min (líneas rectas en el registro) para limitar el daño debido a la luz UV. Experimento representativo de 5 realizados, 21 células analizadas.

4.2.3. Susceptibilidad a la Excitotoxicidad en Neuronas de Hipocampo Cultivadas en Ausencia de Suero

Muchos de los autores que realizan sus estudios sobre neuronas de hipocampo en cultivo, para obtener unos cultivo con un alto porcentaje de neuronas

de hipocampo y la menor contaminación de células de la glía, realizan los cultivos con medio de cultivo carente de suero (Yang, Cong et al. 2010). Por ello, algunos de los experimentos de imagen de Ca^{2+} así como de muerte por excitotoxicidad se llevaron a cabo en neuronas que habían sido cultivadas en ausencia de FBS (sólo medio Neurobasal y suplemento B27). En estas condiciones, el cultivo obtenido apenas contenía células gliales, siendo las neuronas de hipocampo el tipo celular predominante. De esta forma estudiamos el efecto tóxico del NMDA en un sistema desprovisto de glías.

Como se observa en la **Figura 77**, la respuesta de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ a 100 μ M NMDA fue similar en neuronas crecidas en presencia de suero (+ FBS) que en aquellas cultivadas en ausencia de éste (- FBS), resultado que se repitió para todos los DIV estudiados. Algunos DIV (8 y 17 - 21 DIV) presentan diferencias significativas con respecto al control (neuronas cultivadas en presencia de FBS), pero se mantiene el hecho de que la respuesta al NMDA aumenta con el envejecimiento en cultivo (**Figura 77 C**).

Sin embargo, en este ambiente carente de células gliales, al evaluar la muerte inducida por 100 μ M NMDA, se puede observar que en aquellas células cultivadas en ausencia de suero (- FBS), el NMDA indujo apoptosis en el 100% de las células maduras (8 DIV) y envejecidas de hipocampo (13 - 16 y 17 - 21 DIV) (**Figura 78**).

Estos resultados nos indican que la presencia de glías en el medio, y por tanto cultivar las células en un medio con suero, no sólo no es dañino para las neuronas, sino que las glías de alguna forma protegen a las neuronas del estímulo excitotóxico (NMDA en este caso). De hecho, este es el entorno más fisiológico, ya que las neuronas en el hipocampo están rodeadas de células de la glía.

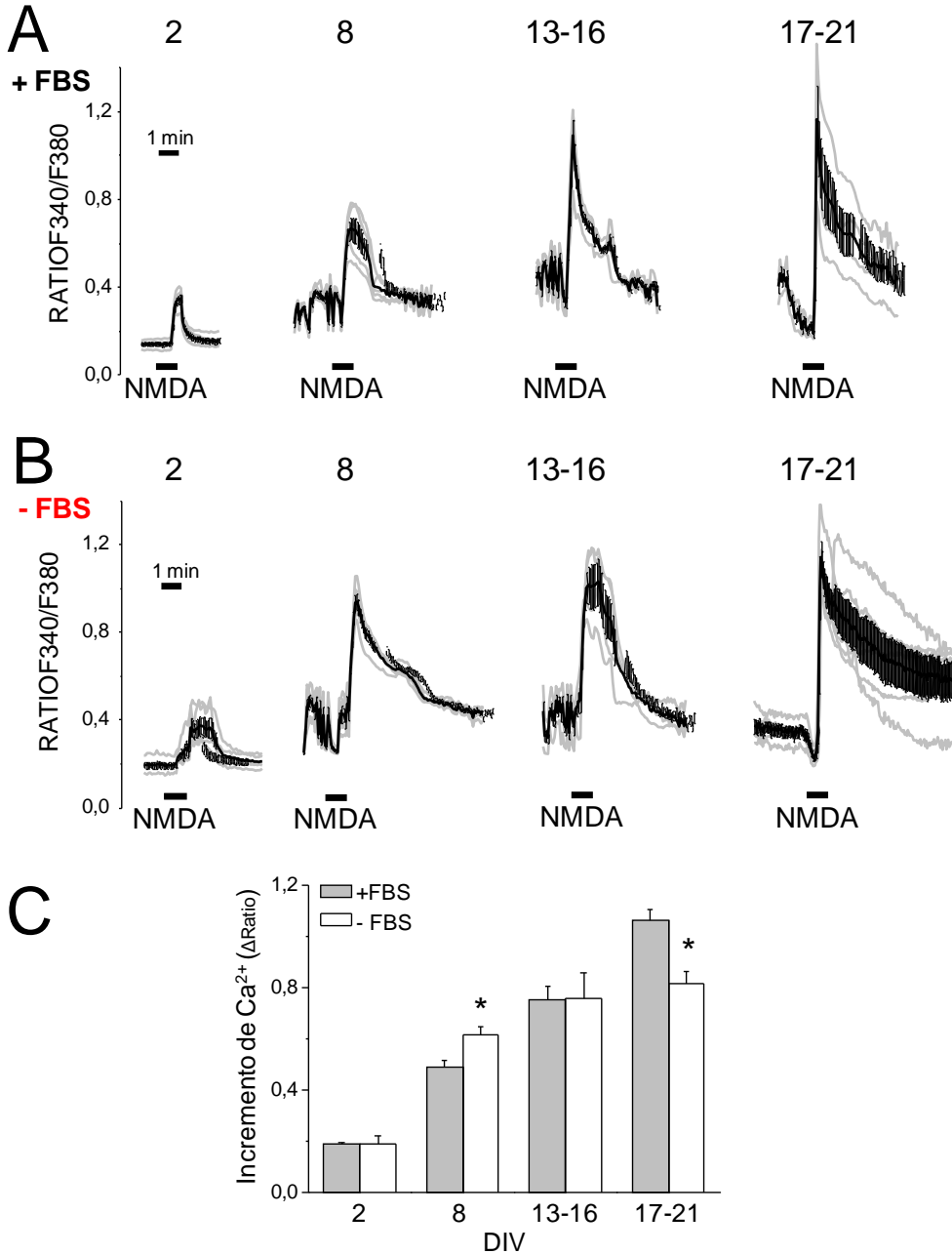


Figura 77. NMDA induce aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en neuronas de hipocampo cultivadas en presencia y ausencia de suero. A, B. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8, 13 - 16 y 17 - 21 DIV en presencia (A) o ausencia (B) de suero fueron cargadas con fura-2 y sometidas a imagen de fluorescencia de Ca^{2+} . Los trazos muestran células individuales representativas (gris) y la media \pm EEM (negro) de la respuesta de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. **C.** Valores medios \pm EEM del incremento de Ca^{2+} citosólico (Δ Ratio) inducido por NMDA 100 μ M. Las barras representan la media de 15 - 76 células individuales estudiadas en 2 - 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ comparado con el grupo de células cultivadas en presencia de FBS.

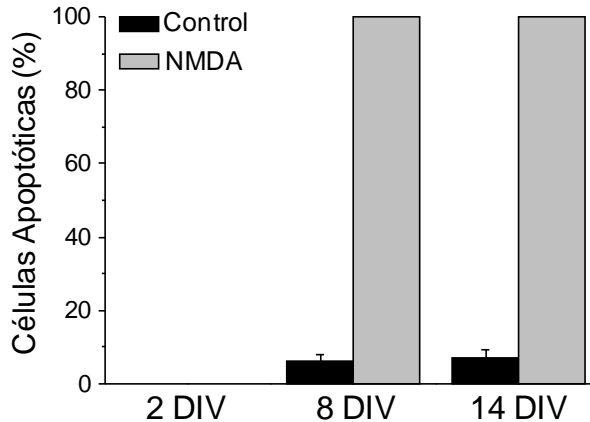


Figura 78. NMDA induce apoptosis en neuronas de hipocampo cultivadas en ausencia de suero. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8 y 14 DIV, en ausencia de suero, fueron tratadas durante 1 h con el solvente (control) o con 100 μ M NMDA, y la apoptosis fue evaluada 24 h después por tinción con anexina V. Se muestra el porcentaje de células apoptóticas. Las barras representan la media \pm EEM. Experimento representativo de 3 estudiados. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

4.3. La Expresión de las Diferentes Subunidades del Receptor de NMDA varía con la Edad del Cultivo

Para comprobar si cambios en la expresión de las subunidades del receptor de NMDA durante el envejecimiento en cultivo estaban implicados en las diferencias mostradas en el aumento de la respuesta de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ al NMDA, decidimos realizar ensayos de inmunofluorescencia de la expresión de las diferentes subunidades del receptor en células a diferentes DIV.

La **Figura 79 A** muestra imágenes de inmunofluorescencia de neuronas de hipocampo marcadas con anticuerpos específicos frente a tres subunidades del receptor NMDA (NR1 (superior), NR2A (medio), NR2B (inferior)) a diferentes periodos de cultivo. Analizamos la intensidad de fluorescencia media, tomando el valor de fluorescencia píxel a píxel de las regiones de interés y promediándolo, para evitar el posible efecto del aumento del tamaño de las neuronas. La **Figura 79 B** muestra que la densidad óptica para las subunidades NR1 y NR2A aumenta de forma significativa

con la edad del cultivo. Por el contrario, la densidad óptica para la subunidad NR2B disminuye significativamente a medida que las neuronas envejecen en cultivo. Estos datos reflejan que las tres subunidades del receptor ya se expresan a 2 DIV y que su abundancia relativa va cambiando durante el envejecimiento en cultivo.

Teniendo en cuenta que la subunidad NR1 es necesaria para formar el canal de Ca^{2+} de este receptor, y que su expresión aumenta a medida que las neuronas envejecen, estos resultados sugieren que la mayor presencia de la subunidad NR1 del receptor NMDA, junto con la subunidad NR2A, están implicadas en el aumento de la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]$ al NMDA de las neuronas envejecidas.

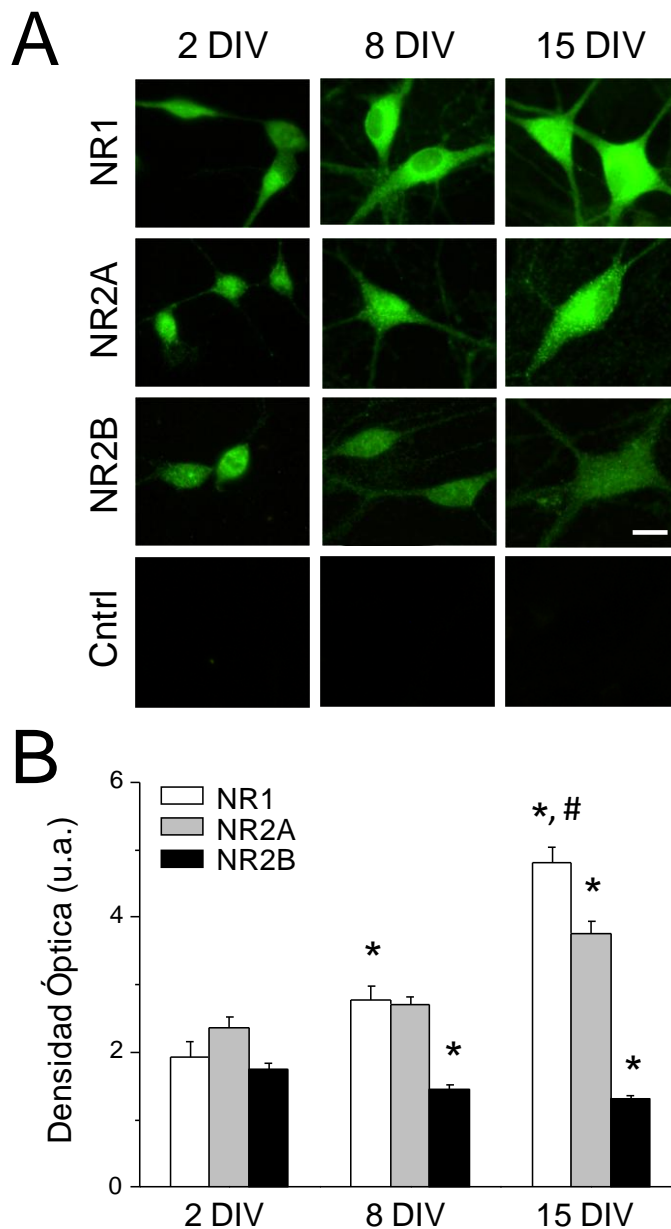


Figura 79. Detección por inmunofluorescencia de cambios en la expresión de las subunidades del receptor de NMDA con el envejecimiento. A. Imágenes de fluorescencia representativas de las subunidades del receptor NMDA en neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8 y 15 DIV. La fila control inferior hace referencia a la ausencia de anticuerpo primario. La barra representa 10 μm y aplica a todas las imágenes. **B.** Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia (densidad óptica, unidades arbitrarias) para las subunidades NR1, NR2A y NR2B. Las barras representan media \pm EEM (n=12 - 27 células de 2 cultivos independientes. * $p < 0,05$ comparado con 2 DIV; # $p < 0,05$ comparado con 8 DIV).

4.4. El Incremento de Ca^{2+} Inducido por Despolarización de la Membrana Plasmática es Mayor para las Neuronas Envejecidas

De la misma forma evaluamos el efecto de la despolarización de la membrana plasmática en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, para lo que se estimularon las neuronas con un medio con una elevada concentración de K^+ (145 mM, añadido en lugar del Na^+). Los resultados mostraron que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por alta concentración de K^+ es pequeña a 2 DIV, aumentando ligeramente pero de forma significativa en las neuronas maduras y envejecidas (Figura 80).

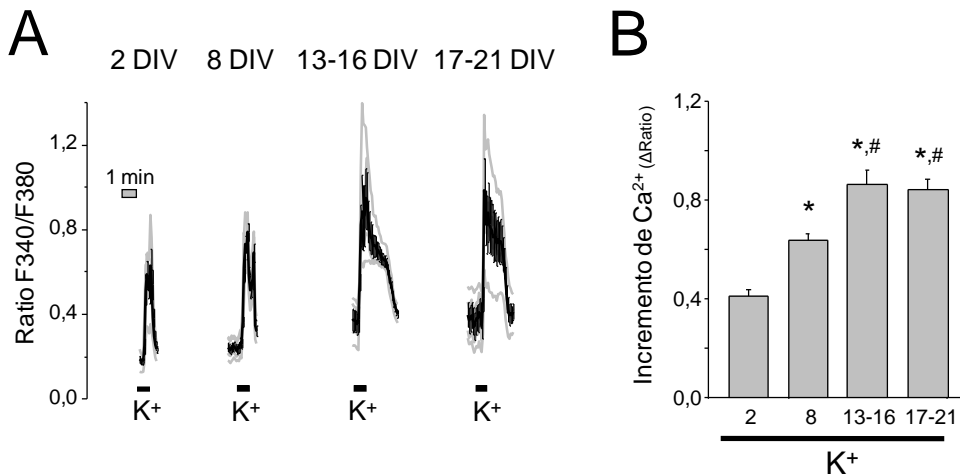


Figura 80. La respuesta a K^+ aumenta con el tiempo de cultivo. Neuronas de hipocampo cultivadas a diferentes DIV fueron cargadas con fura-2 y sometidas a imagen de fluorescencia de Ca^{2+} . **A.** Trazos de células individuales representativos (trazos grises) y media \pm EEM (trazo negro) de la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ al estimular con K^+ 145 mM en neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8, 13 - 16 y 17 - 21 DIV. **B.** Media del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en respuesta al K^+ (ΔRatio) (media \pm EEM, $n=27 - 53$ células individuales; * $p < 0,05$ al comparar con 2 DIV; # $p < 0,05$ al comparar con 8 DIV).

4.5. Efecto del NMDA sobre la Señal de Ca^{2+} Mitocondrial

4.5.1. El NMDA Induce Sobrecarga de Ca^{2+} en la Mitocondria de Neuronas Envejecidas

Como sabemos, una de las vías por las que se produce la muerte por apoptosis requiere la participación de la mitocondria. Por ello, una vez comprobado que el NMDA induce incremento de Ca^{2+} en el citosol en el modelo neuronal estudiado, decidimos estudiar los efectos del NMDA sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en las neuronas a diferentes DIV.

Para monitorizar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ llevamos a cabo experimentos de imagen de bioluminiscencia de neuronas transfectadas con el plásmido que expresa AEQ dirigida a mitocondria. Previamente se había demostrado que la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ puede aumentar de forma considerable, y que la mayor parte de las medidas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ habían sido infravaloradas debido a la utilización de sondas de alta afinidad por el Ca^{2+} (Montero, Alonso et al. 2000, Villalobos, Nuñez et al. 2001, Villalobos, Nuñez et al. 2002). Por esta razón, decidimos utilizar la sonda AEQ de baja afinidad dirigida a mitocondria (mitGAmut) y desarrollada previamente para monitorizar las altas $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro del retículo endoplásmico (Montero, Alonso et al. 2000). Esta sonda también contiene GFP para ayudarnos seleccionar las neuronas transfectadas en el campo (ver Material y Métodos).

La **Figura 81 A** muestra la fluorescencia debida al GFP (GFP, arriba) y la bioluminiscencia debida a la AEQ (aequorina, abajo) en neuronas de hipocampo transfectadas con la sonda mitGAmut y estimuladas con NMDA 100 μM . La **Figura 81 B** refleja el efecto del NMDA 100 μM sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ en las neuronas a diferentes DIV. En las neuronas jóvenes (2 DIV), el NMDA no produjo ningún aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$; sin embargo, el agonista sí produjo un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ tanto en neuronas de hipocampo maduras (8 DIV) como en las envejecidas (>13 DIV), en las que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ fue incluso significativamente mayor (**Figura 81 C**).

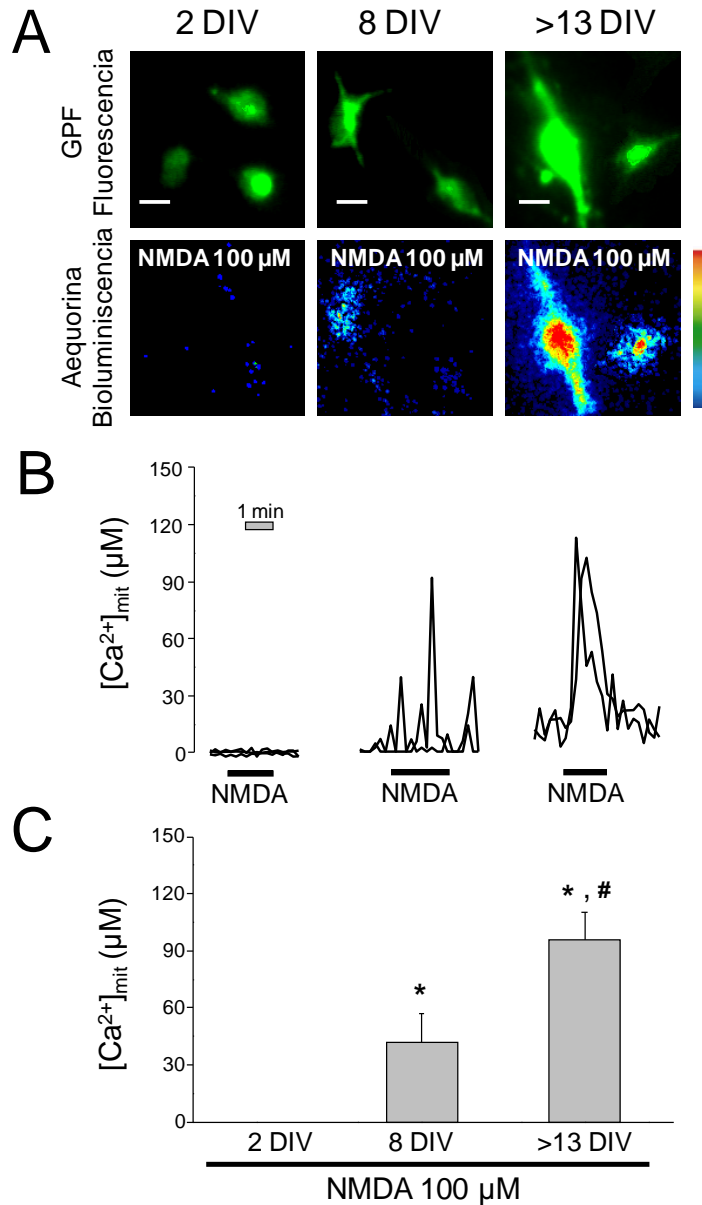


Figura 81. NMDA induce sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial en neuronas maduras y envejecidas de hipocampo. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8 y >13 DIV fueron transfectadas con AEQ de baja afinidad dirigida a mitocondria y fusionada a GFP (mitGAmut), incubadas con celenterazina wt y estimuladas con NMDA, para monitorizar la [Ca²⁺]_{mit} mediante imagen de bioluminiscencia. **A.** Las imágenes muestran la fluorescencia debida al GFP (superior) y los fotones acumulados debido a la AEQ (inferior) de neuronas de hipocampo a diferentes DIV. La barra representa 10 μm. **B.** Registros representativos de respuestas a NMDA 100 μM de Ca²⁺ mitocondrial en célula única a 2, 8 y >13 DIV. **C.** Valores medios (media ± EEM) del incremento en la [Ca²⁺]_{mit} inducido por el NMDA. Los datos son representativos de 8 - 14 células estudiadas en al menos 3 experimentos independientes. *p<0,05 vs 2 DIV; #p<0,05 vs 8 DIV.

4.5.2. La Sobrecarga de Ca^{2+} Mitocondrial Contribuye a la Apoptosis Celular Producida por el NMDA en Neuronas de Hipocampo Envejecidas

Dado que el mayor porcentaje de muerte celular se producía en los cultivos de neuronas envejecidas, coincidiendo con el momento en que se producía el mayor aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$, decidimos estudiar si la inhibición de éste era capaz de proteger de la apoptosis en este grupo neuronal.

La entrada de Ca^{2+} en la mitocondria depende de su potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$). Nuestro grupo ha demostrado recientemente que una pequeña despolarización en la mitocondria es suficiente para prevenir la entrada de Ca^{2+} a la misma (Nuñez, Valero et al. 2006, Valero, Senovilla et al. 2008). De acuerdo con esto, estudiamos los efectos de una pequeña despolarización mitocondrial sobre la muerte neuronal inducida por NMDA utilizando bajas concentraciones de FCCP, un fuerte desacoplante mitocondrial, capaz de inhibir la acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria al inducir la pérdida del $\Delta\Psi$. Para medir los efectos del FCCP sobre el $\Delta\Psi$ se utilizó la sonda mitocondrial TMRM, que se acumula en la mitocondria en función del $\Delta\Psi$.

La **Figura 82** muestra cómo el desacoplante FCCP disminuyó la fluorescencia del TMRM en las neuronas de hipocampo envejecidas de una forma dosis dependiente, lo que es consistente con una creciente despolarización mitocondrial. A 100 nM, el FCCP disminuyó la fluorescencia del TMRM un 25% aproximadamente, relativo a la pérdida total de fluorescencia que se produciría con FCCP 10 μM . Nuestro grupo ha estimado anteriormente que la disminución de la fluorescencia del TMRM inducida por 100 nM FCCP corresponde con una pérdida de $\Delta\Psi$ de unos 10 - 20 mV, mientras que el FCCP 10 μM apaga totalmente la fluorescencia del TMRM, correspondiendo con el colapso de $\Delta\Psi$ (Valero, Senovilla et al. 2008).

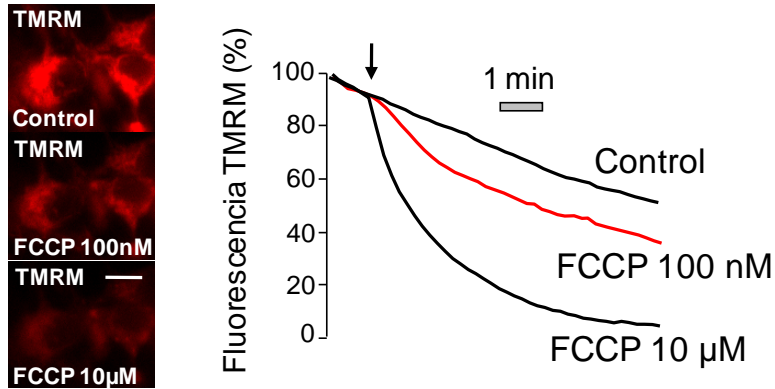


Figura 82. Efecto del FCCP sobre potencial mitocondrial. Neuronas de hipocampo envejecidas (>13 DIV) fueron marcadas con TMRM 10 nM para estudiar los efectos del FCCP sobre el potencial mitocondrial. Las fotos muestran imágenes de fluorescencia de TMRM (excitación a 573 nm) en neuronas de hipocampo tratadas 5 min con el vehículo (control), 100 nM de FCCP o 10 μ M de FCCP. La barra representa 10 μ m. Los trazos muestran registros de fluorescencia en las neuronas de hipocampo. Los valores de fluorescencia de las células individuales fueron normalizados respecto al valor antes de la adición (flecha) tanto del vehículo como del FCCP. Cada trazo corresponde a la media de 45 - 67 células y representa al menos 3 experimentos independientes.

A continuación, estudiamos el efecto que esta pequeña despolarización inducida por el FCCP ejerce sobre la captación de Ca^{2+} mitocondrial. La **Figura 83 A** muestra un registro típico de una neurona individual estimulada con NMDA 100 μ M en presencia del desacoplante. A bajas concentraciones (100 nM), el FCCP previno el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ inducido por el NMDA, concretamente, inhibió el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ un $45 \pm 7\%$ (**Figura 83 B**). La inhibición de FCCP sobre la captación de Ca^{2+} mitocondrial podría ser un efecto secundario a una posible inhibición de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Para descartar esta posibilidad estudiamos el efecto del FCCP sobre el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por NMDA. Las **Figura 83 C y D** muestran que el FCCP no inhibió el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. De hecho, FCCP parece retrasar el aclaramiento del Ca^{2+} . Este resultado es consistente con el hecho de que la mitocondria participa en la captación de Ca^{2+} cuando se produce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$.

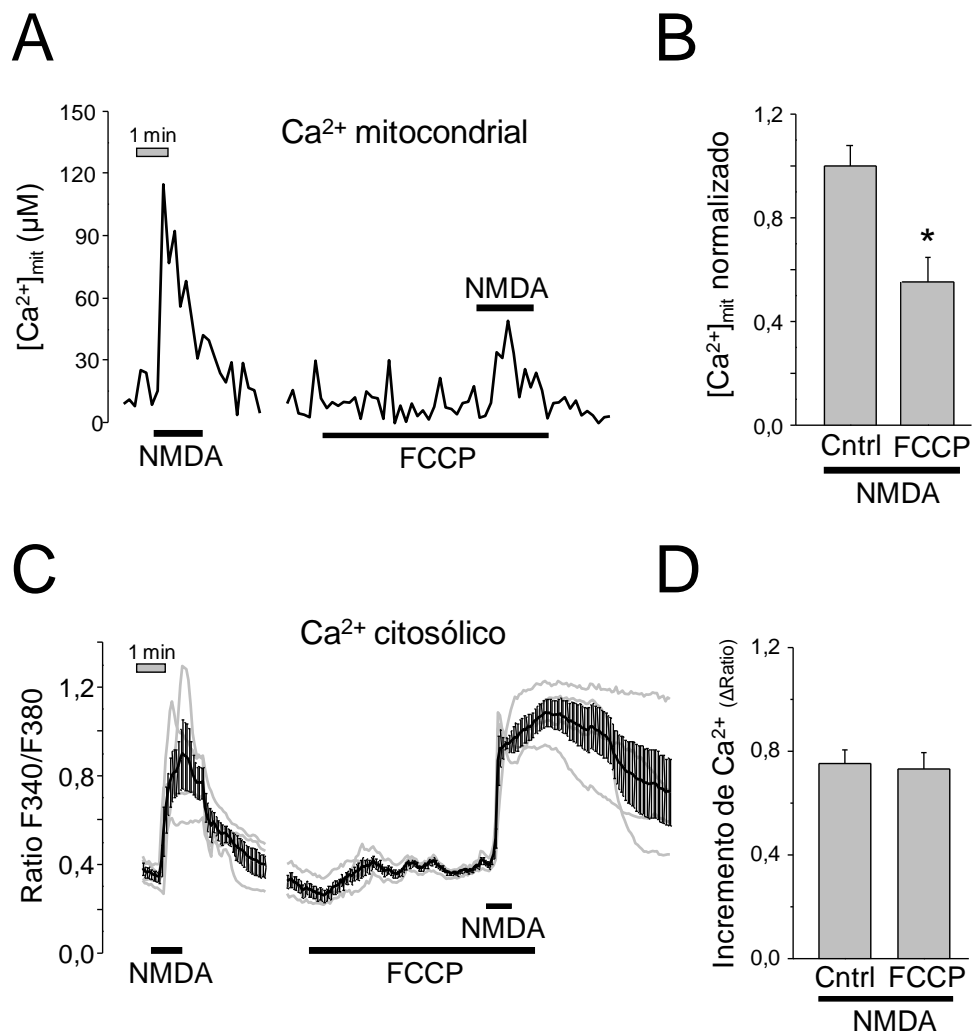


Figura 83. FCCP 100 nM inhibe la sobrecarga de [Ca²⁺]_{mit} inducida por NMDA, sin inhibir el incremento de la [Ca²⁺]_{cit}. El efecto del FCCP sobre el incremento de la [Ca²⁺]_{mit} y [Ca²⁺]_{cit} inducido por NMDA en neuronas envejecidas (>13 DIV) fue estudiado mediante imagen de bioluminiscencia y fluorescencia respectivamente. Para ello, neuronas transfectadas con el plásmido mitGAmut o cargadas con fura-2 fueron estimuladas con NMDA 100 μM en presencia o ausencia del FCCP 100 nM. **A.** Registros representativos de Ca²⁺ mitocondrial en célula única. FCCP inhibió el incremento de la [Ca²⁺]_{mit} inducido por NMDA 100 μM. **B.** Las barras corresponden a la media ± EEM de 24 y 6 células procedentes de al menos tres cultivos independientes. *p<0,05 comparado con NMDA. **C.** Trazos representativos de células individuales (trazos grises) y la [Ca²⁺]_{cit} media ± EEM (trazo negro) de la respuesta a la estimulación con NMDA 100 μM en ausencia o presencia de FCCP (100 nM) en neuronas de hipocampo. FCCP 100 nM no inhibió el aumento en la [Ca²⁺]_{cit} inducido por NMDA. **D.** Las barras muestran el incremento de Ca²⁺ ± EEM (ΔRatio) de 32 y 33 células procedentes de 6 y 3 cultivos independientes respectivamente.

Una vez establecidas las condiciones para inhibir específicamente la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria, decidimos estudiar si la disminución de la entrada de Ca^{2+} en ésta podría proteger frente a la muerte neuronal que se producía en las neuronas envejecidas. Para ello, estudiamos el efecto que bajas concentraciones de FCCP ejercían sobre la muerte neuronal inducida por NMDA 100 μM en las neuronas de hipocampo envejecidas (>13 DIV). Las neuronas de hipocampo envejecidas fueron previamente tratadas (10 min) con FCCP (10 nM), tras lo cual se trataron durante 1 h y a temperatura ambiente con NMDA 100 μM . Tras la hora, las neuronas se mantuvieron en FCCP durante 10 minutos adicionales. Posteriormente los cristales fueron devueltos al medio Neurobasal original, y se mantuvieron 24 h en el incubador. Tras las 24 h, se midió la apoptosis con anexina V.

Los resultados obtenidos muestran que el FCCP inhibió de forma significativa la apoptosis celular inducida por el NMDA en neuronas de hipocampo envejecidas (>13 DIV) (**Figura 84**). Concretamente, el FCCP protegió un $37 \pm 8 \%$ de la apoptosis producida cuando las células son tratadas únicamente por NMDA 100 μM .

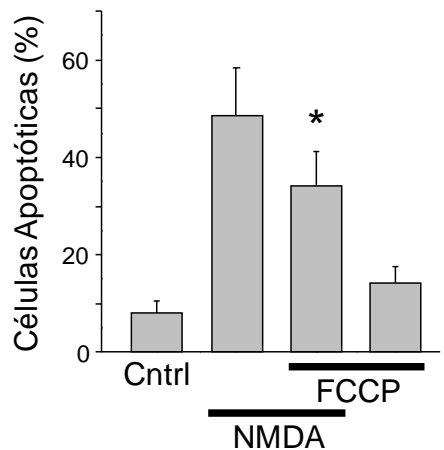


Figura 84. FCCP a bajas concentraciones previene la apoptosis celular inducida por el NMDA. El efecto del FCCP sobre la apoptosis inducida por NMDA fue estudiado en neuronas de hipocampo envejecidas (>13 DIV). Las barras muestran el porcentaje de células apoptóticas (media \pm EEM, n=6 cultivos independientes; *p<0,05 comparado con el grupo tratado únicamente con NMDA).

Estos resultados indican que la inhibición de la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria mediante una despolarización parcial de la misma protege frente a la toxicidad inducida por el NMDA.

Tras ello, decidimos analizar la contribución de la mitocondria a la muerte celular inducida por el NMDA. Como se explicó en la introducción, la mitocondria participa en la vía intrínseca de la apoptosis, donde se produce la apertura de PTPm, a través del cual se liberan proteínas proapoptóticas como el citocromo C, liberado al citosol. Para estudiar la liberación del citocromo C, neuronas a diferentes DIV fueron tratadas con NMDA (100 μM) durante 1 h y devueltas al medio Neurobasal original, donde se mantuvieron 24 h adicionales. Posteriormente, la liberación del citocromo C fue evaluada con un anticuerpo anti-cit C mediante inmunofluorescencia.

La **Figura 85** muestra la liberación del citocromo C inducida por NMDA sólo en los cultivos envejecidos (15 DIV), en los que aparece una deslocalización de la fluorescencia, pero no en los cultivos jóvenes o maduros (2 DIV y 8 DIV).

Estos resultados reflejan la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial en la apoptosis inducida por NMDA en las neuronas envejecidas de hipocampo (>13 DIV).

Por lo tanto, el siguiente paso fue evaluar si el NMDA era capaz de desencadenar la apertura del PTPm. Para ello, neuronas envejecidas fueron cargadas con calceína y Co^{2+} (ver material y métodos). Los resultados muestran que el NMDA provoca la disminución de la fluorescencia de la calceína, debido a una apertura del PTPm (**Figura 86 A**). Además, la apoptosis inducida por el NMDA en las neuronas envejecidas fue inhibida por ciclosporina A (1 μM), un bloqueante del PTPm (**Figura 86 B**).

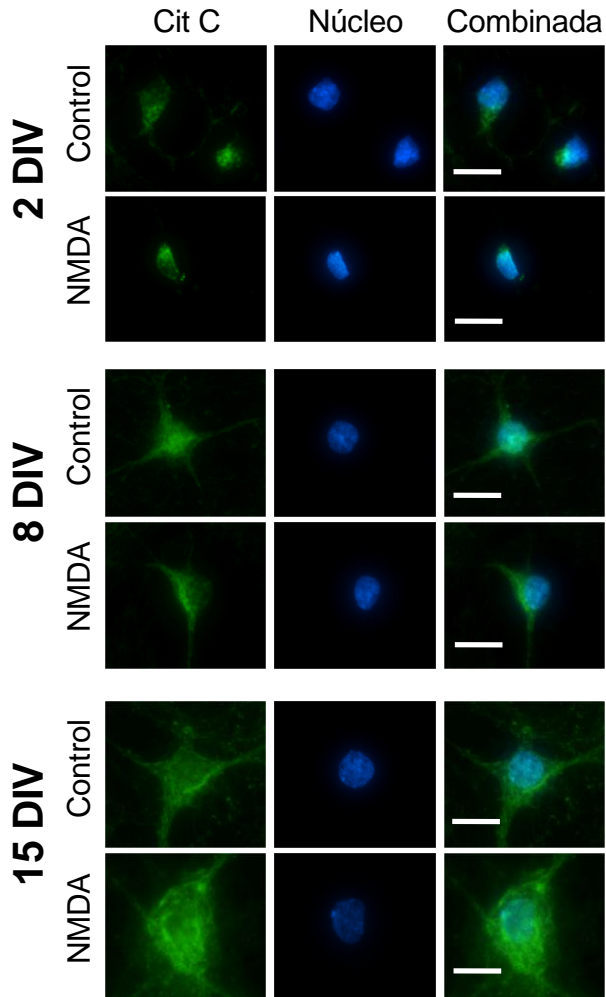


Figura 85. NMDA induce la liberación del citocromo C en las neuronas envejecidas de hipocampo. Se muestra la inmunofluorescencia contra el citocromo C en neuronas de hipocampo a 2, 8 y 15 DIV, tratadas en ausencia (Control) o presencia de NMDA 100 μ M durante 1 h. También se muestran los núcleos teñidos con dapi y la mezcla de las dos imágenes (combinada). Las barras representan 10 μ m. Experimento representativo de 10, 14, 5, 8, 11 y 10 células procedentes de 3 experimentos independientes respectivamente.

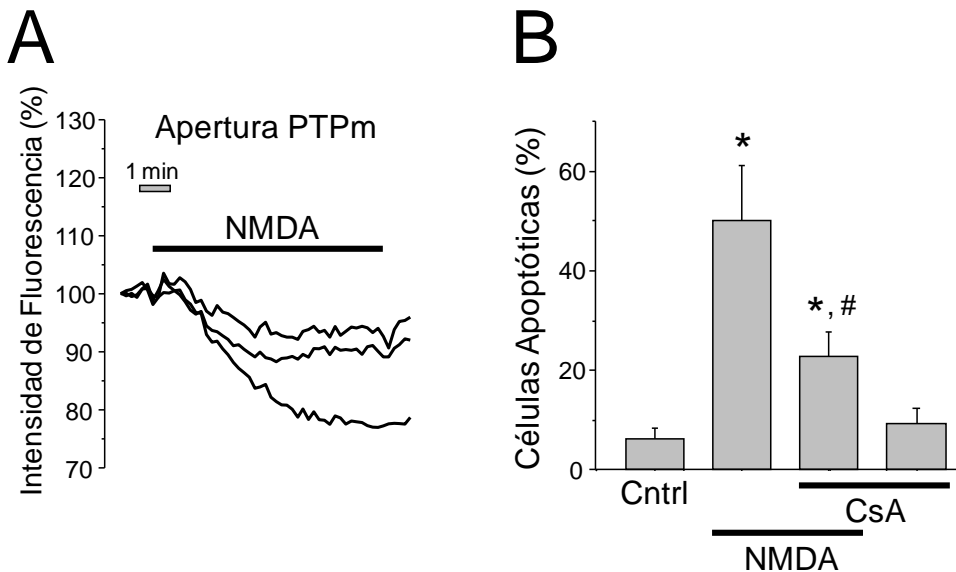


Figura 86. El NMDA induce muerte celular mediada por la mitocondria en los cultivos envejecidos de hipocampo. **A.** Neuronas envejecidas en cultivo (15 DIV) fueron incubadas con calceína/Co²⁺ y tratadas con NMDA 100 μM para medir la disminución de la fluorescencia debido a la apertura del PTPm. Los trazos muestran registros de células individuales de la intensidad de fluorescencia de células estimuladas con NMDA (100 μM). Experimento representativo de 4 independientes, 15 células estudiadas. **B.** Efecto de la ciclosporina (1 μM) sobre la apoptosis inducida por el NMDA (100 μM, 1 h) en neuronas de hipocampo de 15 DIV, evaluado tras 24 h con anexina V (n=3 experimentos independientes; *p<0,05 vs Control; #p<0,05 vs NMDA).

4.6. Efecto de los Anti-Inflamatorios No Esteroides sobre la Apoptosis Celular Inducida por el NMDA

4.6.1. Los AINEs Despolarizan la Mitocondria e Inhiben la Sobrecarga de Ca²⁺ Mitocondrial

Los resultados anteriores nos hicieron plantearnos si compuestos con capacidad de despolarizar parcialmente la mitocondria serían capaces de inhibir la sobrecarga de la [Ca²⁺]_{mit}, protegiendo de la excitotoxicidad neuronal producida por el NMDA. Esto nos llevó a pensar en los AINEs, ácidos lipofílicos de estructura similar a

los desacoplantes mitocondriales, formados por un ácido carboxílico débil unido a un anillo aromático. Recientemente, nuestro grupo ha mostrado que el salicilato, principal metabolito de la aspirina, y otros AINEs, empleados a baja concentración, despolarizan la mitocondria e inhiben la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial en células de carcinoma humano (Nuñez, Valero et al. 2006) y en cultivos primarios de neuronas de cerebelo (Sanz-Blasco, Valero et al. 2008), aparte de su capacidad para inhibir la COX. Además, ciertos estudios han mostrado que algunos AINEs pueden proteger a las neuronas frente a la excitotoxicidad *in vitro* (Asanuma, Nishibayashi-Asanuma et al. 2001) e *in vivo* (Madathil, Karuppagounder et al. 2013).

El primer paso fue estudiar el efecto que ciertos AINEs ejercían sobre el potencial mitocondrial. La **Figura 87** muestra cómo una batería de AINEs, incluyendo salicilato, sulfuro de sulindac, indometacina, ibuprofeno y R-flurbiprofeno, el enantiómero carente de actividad anti-inflamatoria (**Figura 87 A - E** respectivamente), disminuyeron la fluorescencia del TMRM en neuronas de hipocampo, consistente con una despolarización parcial de la mitocondria. También se muestran los efectos de FCCP a 10 μM (trazos inferiores en cada panel), una concentración que colapsa completamente el potencial mitocondrial. En esta figura se observa que el salicilato, a una concentración de 100 μM , y los demás AINEs a concentraciones muy bajas (1 μM), incluyendo el R-flurbiprofeno, produjeron una despolarización mitocondrial similar a la producida por FCCP a 100 nM. La **Figura 87 F** muestra que los AINEs (salicilato) no disminuyen la fluorescencia en células tratadas con Calceína/cobalto, lo cual sugiere que no promueven la apertura del PTPm a estas bajas concentraciones empleadas.

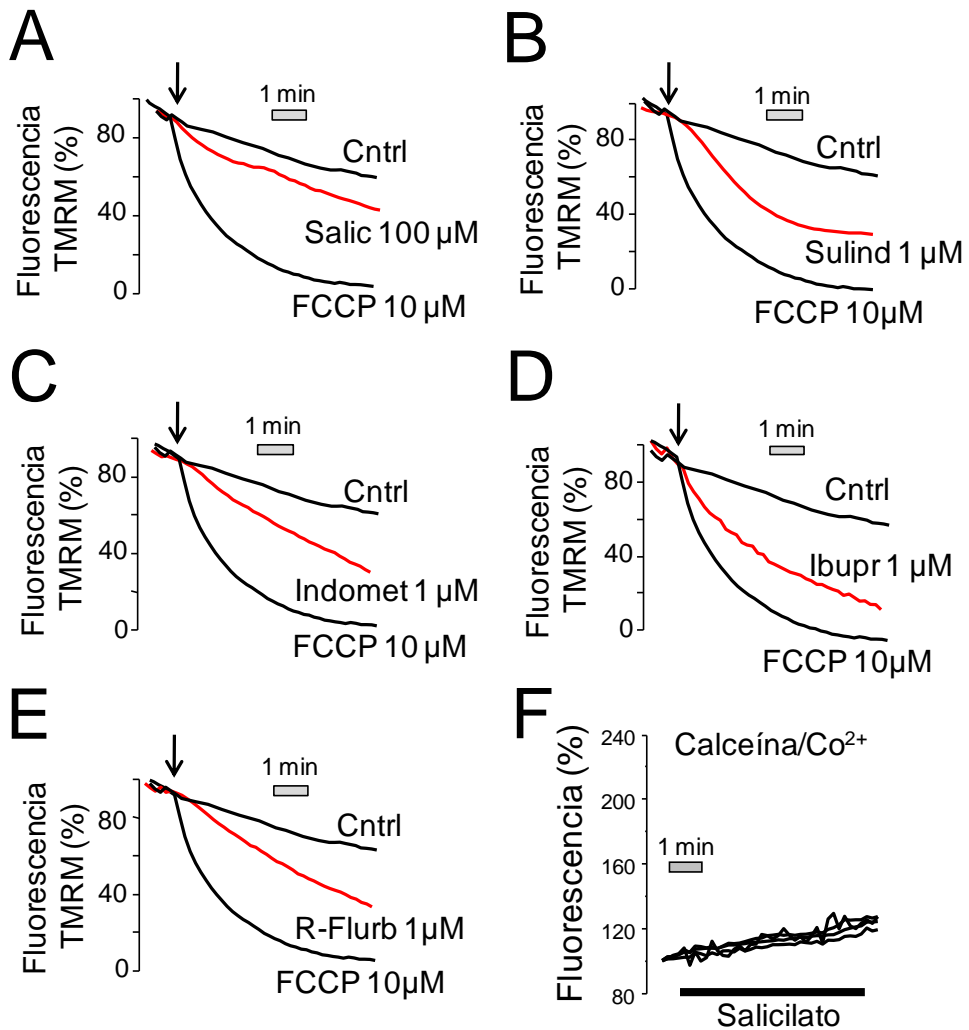


Figura 87. Los AINEs despolarizan la mitocondria en neuronas de hipocampo. A - E. Efecto de diferentes AINEs sobre el potencial mitocondrial medido con TMRM. Cada trazo corresponde a la media normalizada de los valores de fluorescencia de 34 - 42 células tratadas (flecha) con el vehiculo (control) o con salicilato (A, 100 μM), sulfuro de sulindac (B, 1 μM), indometacina (C, 1 μM), ibuprofeno (D, 1 μM) y R-flurbiprofeno (E, 1 μM) (trazos en rojo). Se perfundió también FCCP a 10 μM para comparar con condiciones en las que el potencial mitocondrial se colapsa completamente. Cada gráfica es representativa de al menos 3 experimentos independientes. F. Los trazos muestran registros de células individuales de la intensidad de fluorescencia de la calceína/Co²⁺ de células estimuladas con salicilato (100 μM). Experimento representativo de 3 independientes, 13 células estudiadas.

Tras confirmar que los AINEs eran capaces de despolarizar la mitocondria, estudiamos su efecto sobre el aumento de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducido por el NMDA. Para ello, neuronas de hipocampo transfectadas con el plásmido que expresa la AEQ mutada dirigida a mitocondria y asociada a GFP (mutGAMit) fueron sometidas a imagen de bioluminiscencia. Los AINEs fueron utilizados en la misma concentración empleada para la despolarización mitocondrial (ensayos de TMRM), sabiendo que producen una despolarización cuantitativamente similar a la inducida por FCCP 100 nM.

La capacidad de los AINEs para inhibir la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial se muestra en la **Figura 88**, donde aparecen registros típicos en célula única del aumento en la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducido por el NMDA en ausencia o presencia de varios AINEs. Concretamente, salicilato (100 μ M) inhibió un $45 \pm 13\%$ la entrada masiva de Ca^{2+} a la mitocondria inducida por el NMDA. Sulindac, indometacina, ibuprofeno y R-flurbiprofeno, utilizados a una concentración 1 μ M, disminuyeron un $44 \pm 8\%$, $33 \pm 6\%$, $44 \pm 9\%$ y $44 \pm 5\%$ respectivamente el aumento de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducido por el NMDA en neuronas envejecidas de hipocampo (>13 DIV) (**Figura 88 E**). Estos resultados indican que los AINEs, a bajas concentraciones, inhiben la entrada masiva de Ca^{2+} en la mitocondria inducida por el NMDA en neuronas envejecidas de hipocampo.

Este efecto es probablemente debido a la despolarización mitocondrial, y no a la inhibición de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Para confirmar este hecho, estudiamos el efecto de los AINEs sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por el NMDA. La **Figura 89** muestra que ninguno de los AINEs probados, incluyendo salicilato, sulfuro de sulindac, indometacina (no mostrado), ibuprofeno (no mostrado) y R-flurbiprofeno, inhibieron el incremento de $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por el NMDA. Es más, no sólo no disminuyeron el aumento de $[Ca^{2+}]_{cit}$, sino que lo aumentaron ligeramente (**Figura 90**).

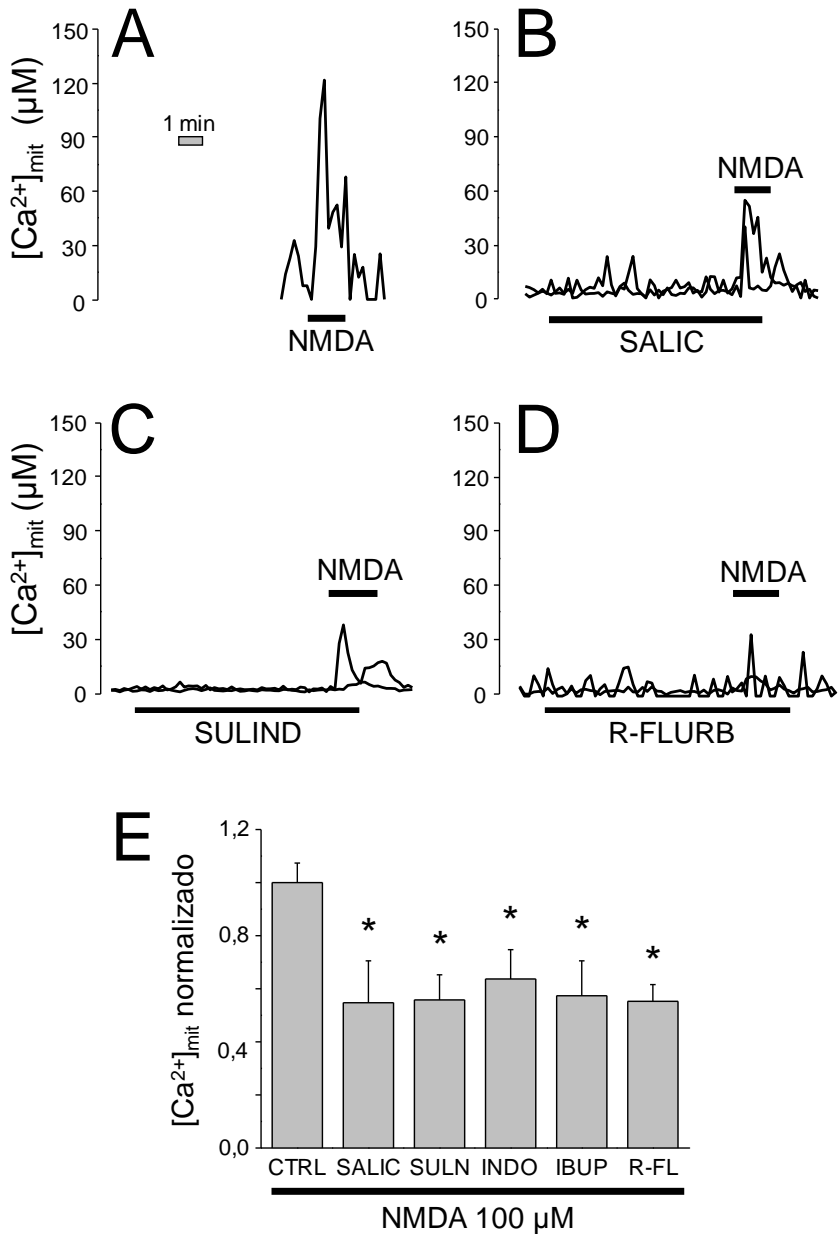


Figura 88. Los AINEs inhiben la sobrecarga de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducida por NMDA en neuronas envejecidas de hipocampo. Neuronas transfectadas con el plásmido mitGAMut fueron estimuladas con NMDA 100 μM en ausencia o presencia de diferentes AINEs. **A - D.** Registros representativos de neuronas individuales del efecto de algunos AINEs sobre el aumento de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducido por el NMDA en neuronas envejecidas. Salicilato 100 μM , sulindac 1 μM y R-flurbiprofeno 1 μM inhibieron el incremento de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducido por NMDA 100 μM . Indometacina 1 μM e ibuprofeno 1 μM produjeron resultados similares (registros no mostrados). **E.** Las barras corresponden a la media \pm EEM de 24, 6, 13, 7, 7 y 7 células procedentes de 13, 4, 5, 3, 3 y 3 cultivos independientes ($[Ca^{2+}]_{mit}$ normalizado respecto al control). * $p < 0,05$ comparado con NMDA.

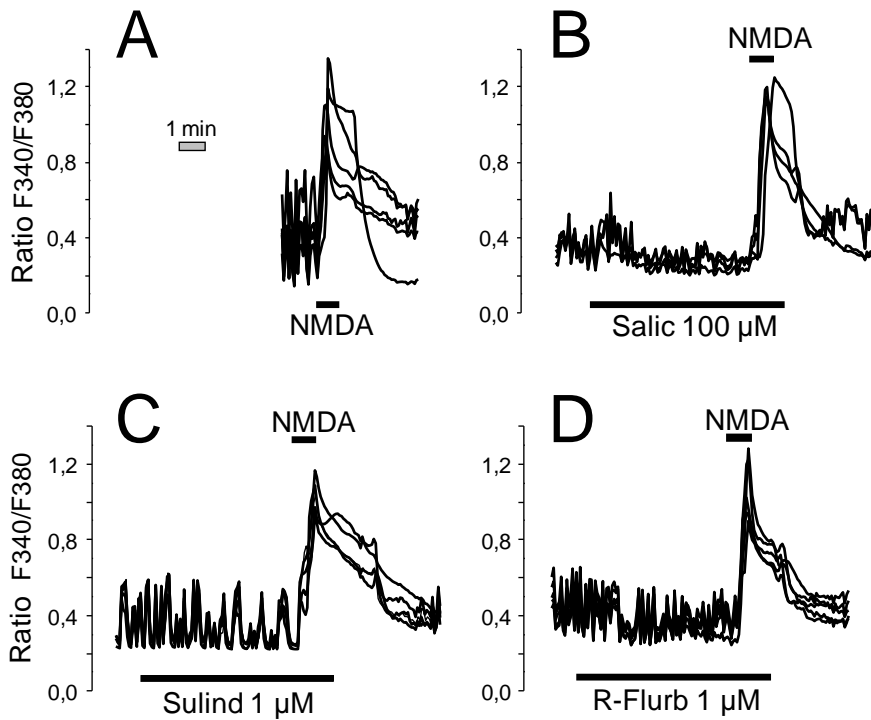


Figura 89. Registros de imagen de fluorescencia de neuronas de hipocampo estimuladas con NMDA en presencia de AINEs. El efecto de diferentes AINEs sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por NMDA en neuronas envejecidas (>13 DIV) fue monitorizado mediante imagen fluorescencia. Para ello, las neuronas fueron cargadas con fura-2 y estimuladas con NMDA 100 μ M en presencia o ausencia del correspondiente AINE. **A - D.** Salicilato (100 μ M), sulfuro de sulindac (1 μ M), R-flurbiprofeno (1 μ M) no inhibieron el incremento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por NMDA. Indometacina 1 μ M e ibuprofeno 1 μ M produjeron resultados similares (registros no mostrados). Se muestran registros de 4 ó 5 células individuales representativas de 40, 38, 33 y 32 células estudiadas en al menos 3 experimentos independientes, respectivamente.

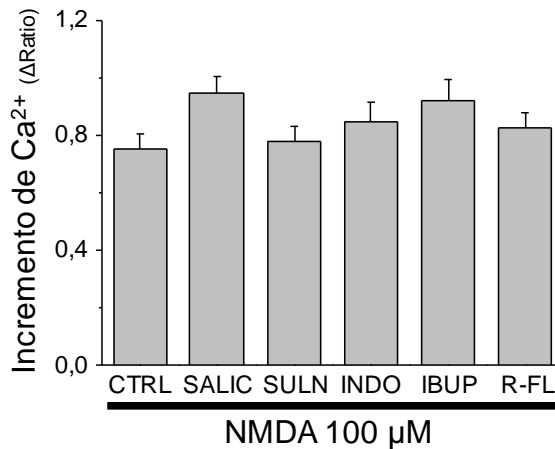


Figura 90. Los AINEs no inhiben el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por el NMDA. Las barras muestran la media del incremento de $Ca^{2+} \pm EEM$ ($\Delta Ratio$) de 40, 38, 33, 25, 30 y 32 células procedentes de 6, 5, 3, 3, 3 y 3 cultivos independientes.

Debido a que el fura-2 es una sonda de alta afinidad, y a que el NMDA produce grandes aumentos de Ca^{2+} en las neuronas envejecidas, podría pensarse que el efecto inhibitorio de los AINEs sobre la $[Ca^{2+}]_{cit}$ se pierde al saturarse la sonda. Para evitar esta limitación, decidimos repetir alguno de estos experimentos empleando la sonda de baja afinidad para Ca^{2+} fura-4F. Encontramos que los AINEs (salicilato) no tuvieron ningún efecto sobre el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ que el NMDA (100 μM) producía en neuronas de hipocampo cargadas con fura-4F (**Figura 91 A**). Los datos promedio se muestran en la **Figura 91 B**.

Estos resultados, junto con los anteriores, sugieren que los AINEs, utilizados a bajas concentraciones, inhiben de forma específica la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial inducida por el NMDA debido a una despolarización parcial de ésta, sin afectar al influjo de Ca^{2+} citosólico a través de la membrana plasmática.

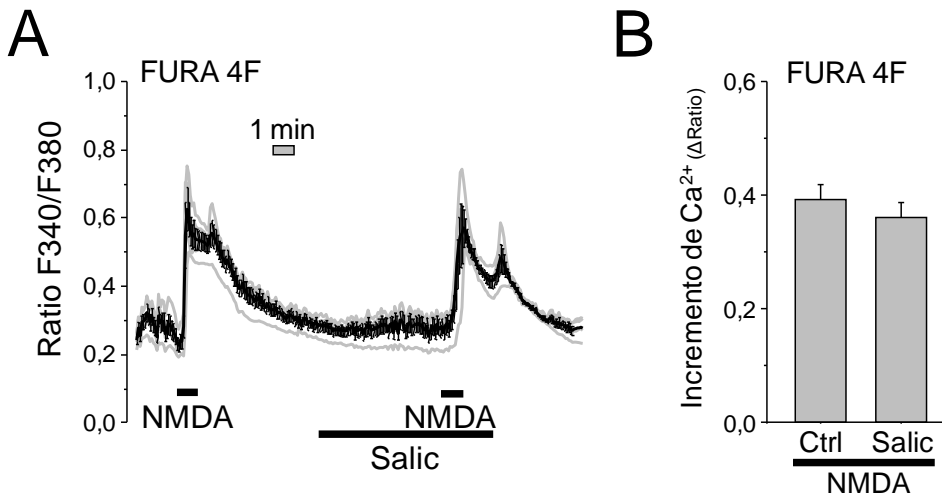


Figura 91. Los AINEs no inhiben el aumento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por NMDA medido con la sonda de baja afinidad fura-4F. Neuronas envejecidas de hipocampo (>13 DIV) fueron cargadas con fura-4F, estimuladas con NMDA (100 μ M) en ausencia o presencia de AINE (salicilato) y sometidas a imagen de fluorescencia de Ca^{2+} . **A.** Los trazos muestran registros individuales (trazos en gris) y la media \pm EEM (trazo en negro) del aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en respuesta a 100 μ M NMDA en presencia de salicilato empleando fura-4F. **B.** Las barras representan la media \pm EEM del aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Δ Ratio) en respuesta al NMDA en ausencia o presencia de salicilato evaluado con fura-4F (n=24 y 26 neuronas individuales procedentes de 4 experimentos independientes).

4.6.2. Los AINEs Previenen la Apoptosis Celular Inducida por el NMDA en Neuronas Envejecidas

Como hemos visto anteriormente, la sobrecarga de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ contribuye a la muerte neuronal inducida por el NMDA. Por ello, nos planteamos si los AINEs, que inhiben la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, eran capaces de prevenir la muerte celular inducida por el NMDA en las neuronas envejecidas. Para responder esta pregunta, estudiamos el efecto de diferentes AINEs sobre la apoptosis celular inducida por el NMDA.

La concentración empleada de éstos fue similar a la usada para producir la despolarización mitocondrial. Los AINEs fueron añadidos 30 minutos antes, durante y 30 minutos después al tratamiento de una hora con el NMDA 100 μ M. Posteriormente las células se devolvieron a su medio Neurobasal original. La apoptosis se evaluó 24

h después con anexina V. La **Figura 92** muestra imágenes representativas de células apoptóticas tratadas con NMDA 100 μM durante 1 h en ausencia o presencia de salicilato. También se muestra el porcentaje de células apoptóticas. Así, salicilato 100 μM inhibió la apoptosis celular inducida por NMDA en neuronas de hipocampo, dado que el porcentaje de neuronas apoptóticas disminuyó en comparación con el de neuronas tratadas únicamente con NMDA. Concretamente, salicilato 100 μM previno de la apoptosis neuronal un $72 \pm 9\%$. Además, sulfuro de sulindac 0,5 μM , indometacina 1 μM , ibuprofeno 1 μM y R-flurbiprofeno 0,5 μM , también protegieron de la muerte celular inducida por el NMDA (**Figura 92**). En concreto, la protección fue de $46 \pm 6\%$ para sulindac 0,5 μM ; $55 \pm 8\%$ para indometacina 1 μM ; $66 \pm 7\%$ para ibuprofeno 1 μM ; y $65 \pm 8\%$ para R-flurbiprofeno 0,5 μM . Ninguno de los AINEs probados resultó tóxico para las neuronas de hipocampo a esa concentración.

Estos resultados sugieren que los AINEs, empleados a bajas concentraciones, son capaces de proteger a las neuronas de hipocampo envejecidas frente a la muerte inducida por el NMDA y por tanto frente a la excitotoxicidad que éste produce, actuando probablemente sobre la captación de Ca^{2+} mitocondrial.

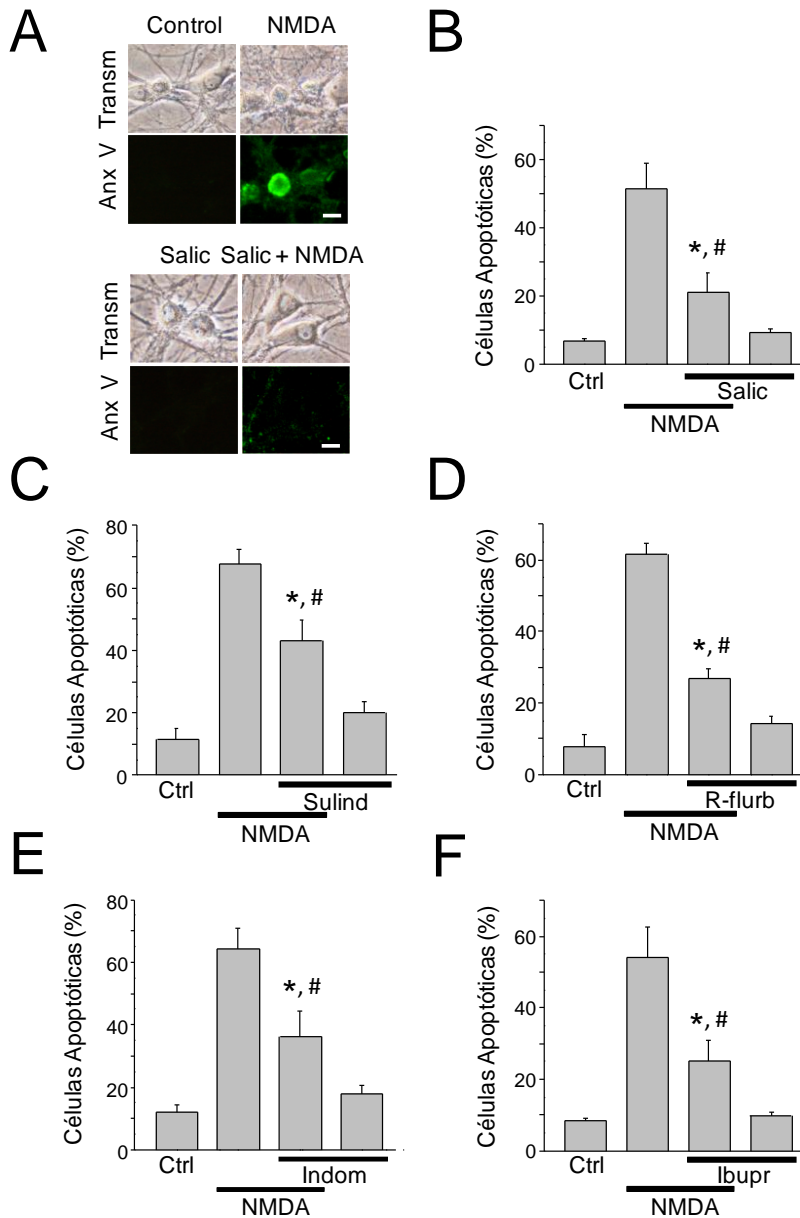


Figura 92. Los AINEs previenen la apoptosis celular inducida por NMDA en neuronas de hipocampo envejecidas. Neuronas de hipocampo cultivadas durante >13 DIV fueron tratadas durante 1 h con NMDA 100 μM en ausencia o presencia de AINE, y la apoptosis fue evaluada 24 h después por incubación con anexina V. **A**, Imágenes representativas de transmisión (Transm) e inmunofluorescencia (Anx V) de neuronas envejecidas tratadas con NMDA en ausencia o presencia de salicilato. Las barras representan 10 μm. **B - F**, Las barras muestran el porcentaje de células apoptóticas en condiciones control, 100 μM NMDA, 100 μM NMDA + AINE y AINE sólo. Los datos corresponden al efecto del salicilato 100 μM (**B**), sulindac 0,5 μM (**C**), indometacina 1 μM (**D**), ibuprofeno 1 μM (**E**) y R-flurbiprofeno 0,5 μM (**F**). n = 5, 7, 4, 3 y 5 réplicas procedentes de cultivos independientes para cada tratamiento (media ± EEM). *p<0,05 vs. NMDA sólo; #p<0,05 vs. control.

5. Neurotoxicidad Causada por Oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en Agudo en el Envejecimiento

Como hemos explicado anteriormente, el envejecimiento resulta un factor clave en el efecto tóxico que produce el péptido amiloide $A\beta$. El mecanismo por el que el $A\beta$ produce neurotoxicidad no está claro hasta la fecha, pero muchos estudios señalan a la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} como un agente crucial para la degeneración que éste provoca (Mattson, Cheng et al. 1992). Por ello, decidimos estudiar el efecto de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en la homeostasis del Ca^{2+} y en la toxicidad que producen sobre las neuronas en nuestro modelo de envejecimiento a largo plazo. Resultados previos de nuestro grupo (Sanz-Blasco, Valero et al. 2008) muestran que en granos de cerebelo, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ promovían la entrada de Ca^{2+} y la apoptosis, por lo que decidimos extender el estudio al cultivo de neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas.

5.1. Efecto Agudo de los Oligómeros de $A\beta_{1-42}$ sobre la Señal de Ca^{2+}

5.1.1. La Respuesta de Ca^{2+} Citosólico a $A\beta_{1-42}$ Aumenta en las Neuronas Envejecidas

Lo primero que estudiamos fue el efecto agudo de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ sobre la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en neuronas jóvenes y envejecidas mediante imagen de fluorescencia, para conocer si la respuesta provocada por éstos era diferente. Las neuronas, cargadas con fura-2, fueron estimuladas con $A\beta_{1-42}$ (2 μ M), y se monitorizó su efecto inmediato sobre la $[Ca^{2+}]_{cit}$ mediante imagen de fluorescencia. La **Figura 93** muestra cómo los oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$ produjeron incrementos en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en las neuronas de hipocampo, que aumentaron significativamente a medida que las neuronas envejecían en cultivo (**Figura 94**). A 2 DIV, aproximadamente, sólo el 40%

de las células presentes en el campo respondieron a $A\beta_{1-42}$ con un aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$.

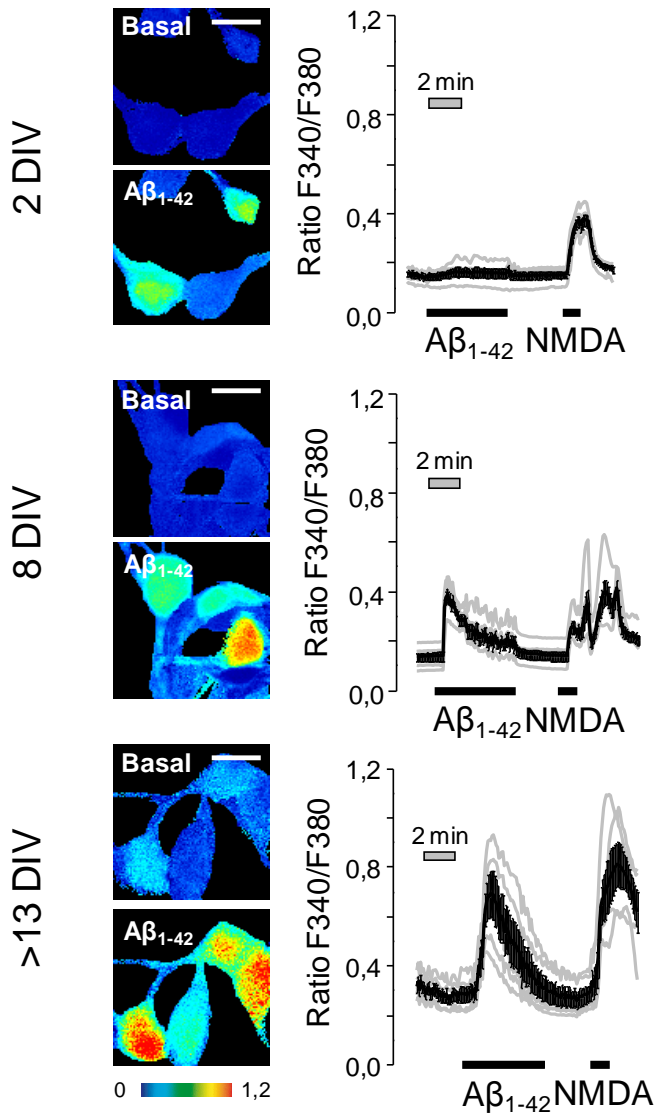


Figura 93. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en agudo inducen incremento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en neuronas de hipocampo en cultivo. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8 y >13 DIV fueron cargadas con fura-2 y sometidas a imagen de fluorescencia de Ca^{2+} . Se muestran imágenes en pseudocolor la imagen de fluorescencia de Ca^{2+} de neuronas antes (basal) y tras perfundir los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ ($A\beta_{1-42}$). La escala de pseudocolor se muestra a la abajo (valores de Ratio de 0 (azul) - 1,2 (rojo)). Las barras representan 10 μm . Los trazos en gris muestran registros en células individuales representativas de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en respuesta a $A\beta_{1-42}$ (2 μM) y NMDA (100 μM) en neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8 y >13 DIV. Los trazos en negrita representan la media \pm EEM del aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$.

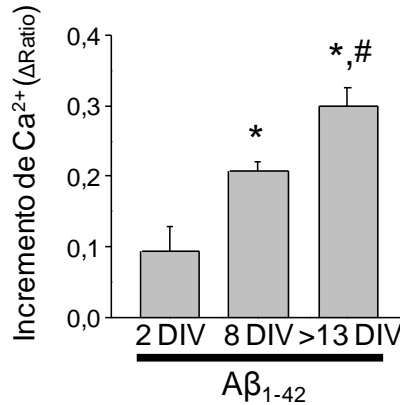


Figura 94. El incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en neuronas de hipocampo inducido por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ aumenta con el envejecimiento en cultivo. Las barras representan el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Δ Ratio) en respuesta a $A\beta_{1-42}$ de neuronas cultivadas durante diferentes DIV (media \pm EEM; $n=10 - 59$ células de 2 - 9 cultivos independientes). * $p<0,05$ comparado con 2 DIV; # $p<0,05$ comparado con 8 DIV.

5.1.2. Los Oligómeros de $A\beta_{1-42}$ Inducen Sobrecarga de Ca^{2+} en la Mitochondria de Neuronas Envejecidas

Tras evaluar el efecto de los oligómeros del péptido amiloide en agudo sobre la $[Ca^{2+}]_{cit}$, nos propusimos estudiar el efecto de éstos sobre el Ca^{2+} mitocondrial, y observar las posibles diferencias en cuanto a la captación de Ca^{2+} mitocondrial en función de los DIV de las neuronas. Para ello, las neuronas a los correspondientes DIV fueron transfectadas con AEQ de baja afinidad dirigida a mitocondria (mitGAmut) y reconstituidas con celenterazina n durante 2 h. Finalmente la $[Ca^{2+}]_{mit}$ fue medida por imagen de bioluminiscencia. La **Figura 95 A** muestra la fluorescencia de neuronas a diferentes DIV transfectadas con mitGAmut (GFP) y la bioluminiscencia emitida (aequorina) por éstas tras haber sido estimuladas con los oligómeros $A\beta_{1-42}$ 2 μ M. Se puede observar que $A\beta_{1-42}$ no produjo incremento de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ en las neuronas jóvenes (2 DIV), pero sí en las neuronas maduras (8 DIV) y en las envejecidas (>13 DIV) (**Figura 95 B**). El incremento de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ producido aumentó de forma significativa a medida que los cultivos envejecían (**Figura 95 C**).

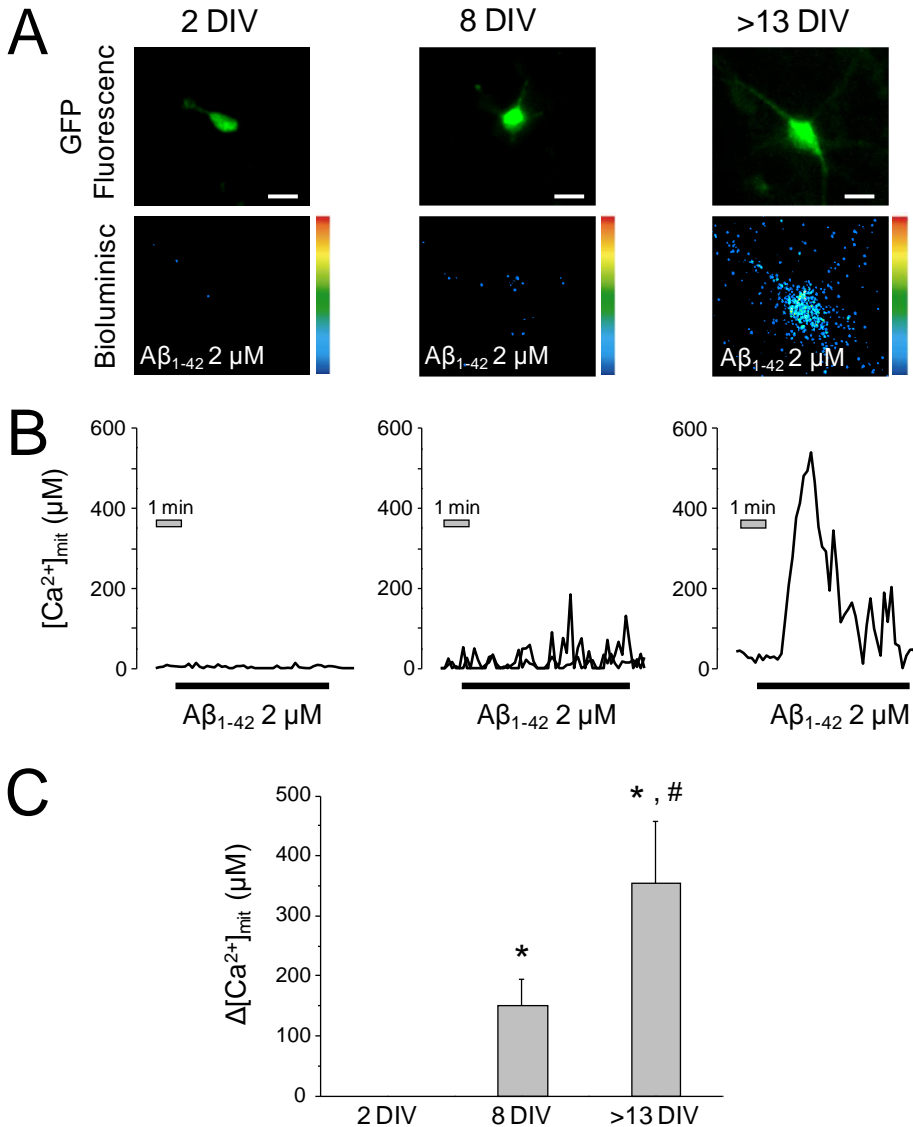


Figura 95. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducen aumento de Ca^{2+} mitocondrial en neuronas de hipocampo, siendo el efecto mayor en las neuronas envejecidas. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 2, 8 y >13 DIV fueron transfectadas con el plásmido de mitGAMut dirigido a mitocondria y sometidas a imagen de bioluminiscencia para monitorizar la $[Ca^{2+}]_{mit}$. **A.** Las fotos muestran imágenes representativas de la fluorescencia emitida por GFP (superior) y la emisión de fotones acumulados (bioluminiscencia, inferior) de neuronas de hipocampo cultivadas a diferentes DIV. La escala de pseudocolor se muestra a la derecha de cada imagen. Las barras blancas representan 10 μ m. **B.** Los trazos muestran registros representativos de célula única de la respuesta de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ a $A\beta_{1-42}$ 2 μ M a 2, 8 y >13 DIV. **C.** Valores medios (media \pm EEM) del incremento de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducido por $A\beta_{1-42}$. Datos representativos de 5 - 7 células estudiadas en al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs 2 DIV. # $p < 0,05$ vs 8 DIV.

5.2. Efecto de los Oligómeros de A β ₁₋₄₂ sobre la Apoptosis Neuronal

Tras observar que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ causaban un efecto diferente sobre el Ca²⁺ citosólico y mitocondrial en función del grado de madurez de las neuronas, nos planteamos estudiar si la exposición de los cultivos de hipocampo a los oligómeros de A β ₁₋₄₂ desencadenaba diferente grado de neurotoxicidad en función de los DIV.

5.2.1. Los Oligómeros de A β ₁₋₄₂ Inducen Apoptosis en Neuronas de Hipocampo Envejecidas

Con este propósito, investigamos el efecto de los oligómeros de A β ₁₋₄₂ sobre la apoptosis producida en las neuronas de hipocampo cultivadas durante diferentes DIV. Para ello, neuronas mantenidas en cultivo durante 2, 8 ó >13 DIV fueron incubadas con oligómeros de A β ₁₋₄₂ 2 μ M durante 1h, tras lo que se devolvieron al pocillo con su medio Neurobasal original, donde se mantuvieron 24 h adicionales. Pasado este tiempo, la apoptosis se evaluó por tinción con anexina V mediante fluorescencia. Como grupo control se consideró el tratamiento con MEM, que es el solvente en el que los oligómeros fueron disueltos. En la **Figura 96 A** se muestran campos representativos de neuronas en transmisión (Transm) y la fluorescencia del mismo tras la incubación con anexina V (Anx V). El porcentaje de neuronas apoptóticas en los cultivos celulares a diferentes DIV aparece reflejado en la **Figura 96 B**. A β ₁₋₄₂ no indujo apoptosis en las neuronas jóvenes (2 DIV) ($4,8 \pm 1,8$ control vs. $5,8 \pm 1,1$ A β ₁₋₄₂). Sin embargo, sí provocó apoptosis en neuronas maduras (8 DIV) ($4,2 \pm 1,0$ control vs. $10,3 \pm 1,9$ A β ₁₋₄₂) de forma significativa, efecto que aumentó de forma dramática para las neuronas envejecidas (>13 DIV) ($8,6 \pm 0,8$ control vs. $35,7 \pm 3,6$ A β ₁₋₄₂).

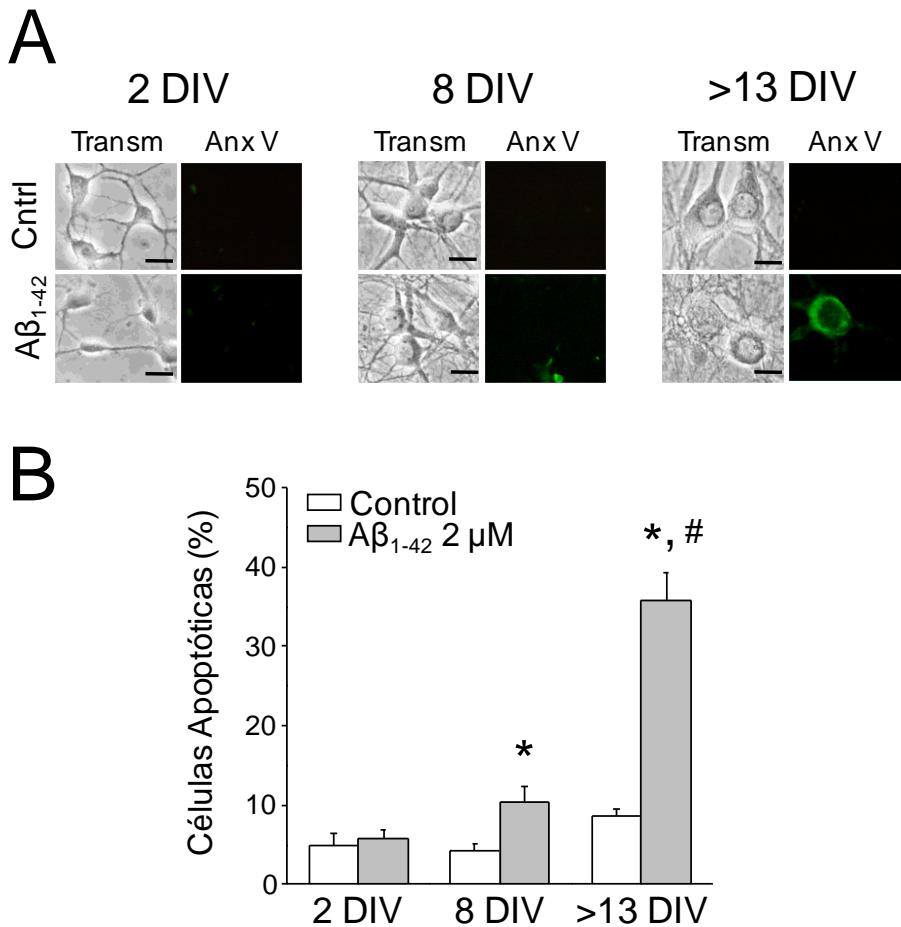


Figura 96. Las neuronas de hipocampo maduras y envejecidas son más susceptibles a la toxicidad por A β_{1-42} que las jóvenes. Neuronas primarias de hipocampo cultivadas durante 2, 8 y >13 DIV fueron tratadas durante 1 h en ausencia (control) o presencia de A β_{1-42} 2 μ M. La apoptosis fue evaluada 24 h después por incubación con anexina V. **A.** Microfotografías representativas de transmisión (Transm) y de la inmunofluorescencia de la anexina V (Anx V) de las neuronas en cultivo. Las barras representan 10 μ m. **B.** Cuantificación de células apoptóticas de los grupos control y tratadas con los oligómeros de A β_{1-42} 2 μ M. Los valores están representados como la media \pm EEM (en %) de 5, 6 y 10 experimentos procedentes de cultivos independientes respectivamente. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control; # $p < 0,05$ comparado con 2 y 8 DIV.

Estos resultados de muerte neuronal, junto con los obtenidos por imagen de fluorescencia y bioluminiscencia, indican que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ inducen entrada de Ca²⁺ al citosol a través de la membrana plasmática, seguida por una sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial, especialmente en las neuronas maduras y envejecidas de hipocampo. Así mismo, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ provocan muerte por apoptosis, efecto que aumenta a medida que las neuronas envejecen en el cultivo.

5.2.2. La Sobrecarga de Ca²⁺ Mitocondrial Contribuye a la Apoptosis Celular Producida por A β ₁₋₄₂ en Neuronas de Hipocampo Envejecidas

Como sabemos, el proceso de apoptosis puede implicar la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial. Por ello, una vez determinado que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ inducían sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial y muerte neuronal, decidimos estudiar si la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial era un factor clave en la muerte celular provocada por los oligómeros en las neuronas maduras y envejecidas. Para ello estudiamos el efecto de la inhibición de la captación mitocondrial de Ca²⁺ sobre la toxicidad inducida por A β ₁₋₄₂.

Como ya se ha comentado anteriormente, la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria depende exponencialmente del potencial mitocondrial, $\Delta\Psi$, y una pequeña despolarización de ésta es suficiente para prevenir la entrada de Ca²⁺ en la misma. Empleamos el desacoplante mitocondrial FCCP a bajas concentraciones (100 nM), para bloquear la captación de Ca²⁺ mitocondrial, en neuronas permeabilizadas (ver material y métodos). Para ello, las células fueron perfundidas con medio celular interno, previa aplicación de digitonina 50 μ M durante 1 min para permeabilizar la membrana mitocondrial. Posteriormente, las neuronas se perfundieron con el mismo medio interno conteniendo 200 nM de Ca²⁺, en ausencia o presencia del FCCP. Tras 5 min de incubación, se aplicó Ca²⁺ 10 μ M en el mismo medio interno en presencia o ausencia de FCCP. Los resultados muestran que a esta baja concentración, el FCCP previno el aumento de la [Ca²⁺]_{mit} inducido por Ca²⁺ 10 μ M (**Figura 97 A, B**).

Para comprobar si este efecto era específico de la mitocondria, se estudió el efecto del FCCP 100 nM sobre la entrada de Ca^{2+} al citosol. Los resultados apuntan a que este efecto es ciertamente específico de la mitocondria, pues el mismo tratamiento con FCCP no afectó al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por $\text{A}\beta_{1-42}$ (**Figura 97 C, D**).

A continuación estudiamos si evitando esta sobrecarga de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ la apoptosis celular se ve reducida. Para comprobarlo evaluamos el efecto del tratamiento conjunto de FCCP y los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$. Para ello, neuronas envejecidas en cultivo fueron tratadas con los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ 2 μM durante 1 h en medio celular externo, tras lo que fueron lavadas una vez y devueltas al medio Neurobasal original, donde permanecieron 24 h adicionales. Como control, se empleó MEM, que es el solvente donde se disuelven los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$. Tras las 24 h, la apoptosis fue evaluada mediante fluorescencia gracias a la incubación con anexina V.

La **Figura 98** muestra cómo el FCCP inhibió de forma significativa la apoptosis celular inducida por el $\text{A}\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo envejecidas (>13 DIV). Concretamente, el FCCP a una concentración de 10 nM protegió un $48 \pm 7\%$ de la apoptosis producida en las células cuando éstas son tratadas únicamente por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ 2 μM .

Estos resultados sugieren que la inhibición de la sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria mediante una despolarización parcial de la misma protege frente a la neurotoxicidad inducida por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ en las neuronas envejecidas.

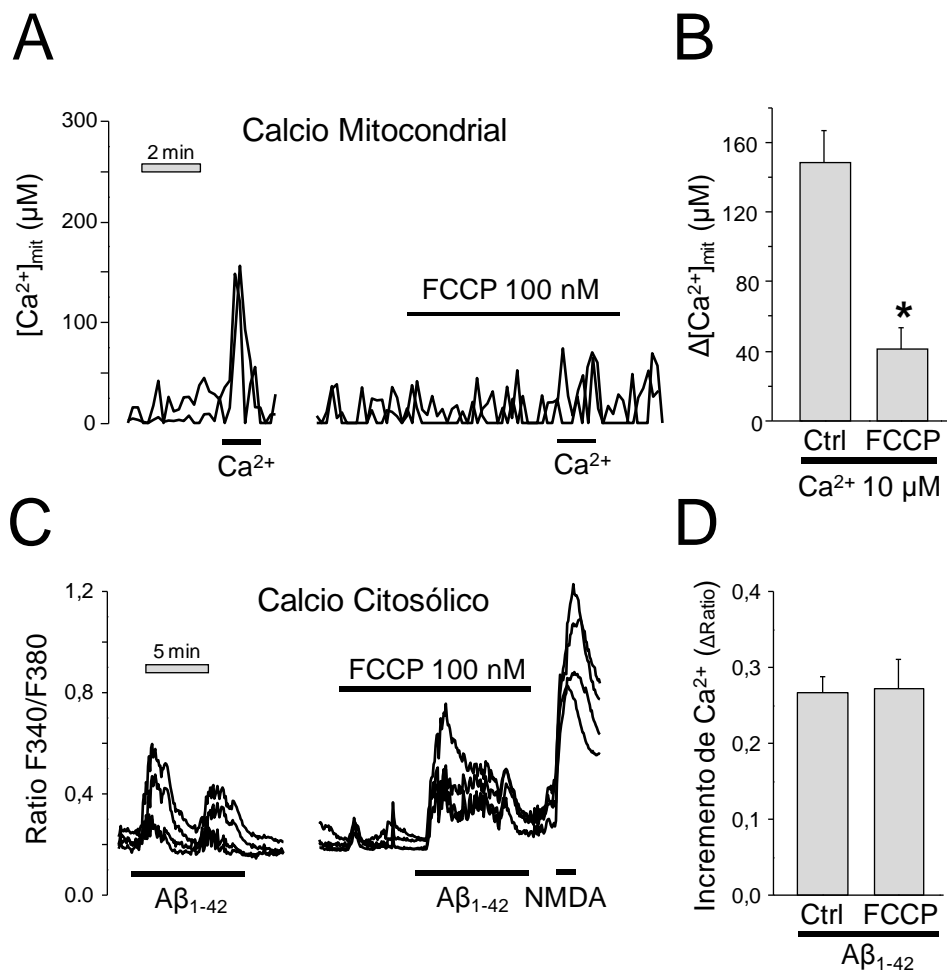


Figura 97. La sobrecarga de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ contribuye a la neurotoxicidad inducida por $A\beta_{1-42}$ en neuronas envejecidas. **A.** Estudio del efecto del desacoplante mitocondrial FCCP sobre la captación de Ca^{2+} . Neuronas de hipocampo de 8 - 12 DIV fueron transfectadas con AEQ de baja afinidad dirigida a mitocondria y sometidas a imagen de bioluminiscencia. Las neuronas fueron posteriormente permeabilizadas en medio intracelular conteniendo 200 nM de Ca^{2+} (ver métodos) y tratadas con FCCP 100 nM. Seguidamente fueron perfundidas con el mismo medio intracelular conteniendo Ca^{2+} 10 μM para estimular la captación de Ca^{2+} mitocondrial. Los trazos muestran registros representativos de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ de células individuales antes y después de la estimulación con Ca^{2+} 10 μM en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de FCCP. **B.** Las barras representan el valor medio \pm EEM de 7 y 6 células respectivamente, procedentes de al menos 3 cultivos independientes. * $p < 0,05$ comparando con Ca^{2+} 10 μM solo. **C.** El efecto del FCCP sobre el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por $A\beta_{1-42}$ fue estudiado en neuronas de hipocampo envejecidas. Los trazos muestran registros representativos de la respuesta a $A\beta_{1-42}$ (2 μM) de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en célula única, antes y después de perfundir FCCP. **D.** Las barras presentan el valor medio del incremento de $[Ca^{2+}]_{cit} \pm$ EEM ($\Delta Ratio$) de 59 y 23 neuronas individuales procedentes de 9 y 3 cultivos respectivamente.

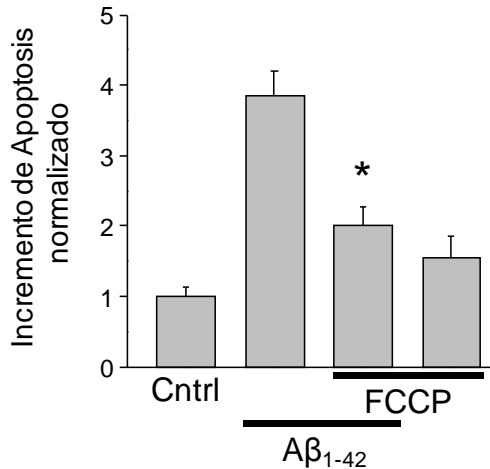


Figura 98. El FCCP reduce la apoptosis celular inducida por los oligómeros del péptido Aβ₁₋₄₂. El efecto del FCCP sobre la apoptosis inducida por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ fue estudiado en neuronas envejecidas de hipocampo (>13 DIV). Las neuronas fueron expuestas a los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ (2 μM, 1 h) en ausencia o presencia de FCCP 10 nM. La apoptosis fue evaluada a las 24 h mediante el método de anexina V. Las barras muestran el incremento de la apoptosis normalizado con respecto al control (media ± EEM, n=7 experimentos independientes. *p<0,05 comparado con el grupo tratado exclusivamente con Aβ₁₋₄₂).

5.3. Efecto de los AINEs sobre la Neurotoxicidad Inducida por los Oligómeros de Aβ₁₋₄₂

5.3.1. Los AINEs Inhiben la Sobrecarga de Ca²⁺ Mitocondrial

A continuación, nos preguntamos si los AINEs, de estructura similar a los desacoplantes mitocondriales, serían capaces de disminuir la neurotoxicidad producida por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ al reducir la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial que éste produce.

En base a ello, estudiamos el efecto que los AINEs tenían sobre la captación de Ca²⁺ mitocondrial, empleando neuronas hipocampales transfectadas con AEQ de baja afinidad (mitGAmut), permeabilizadas y estimuladas con 10 μM de Ca²⁺, y sometidas a imagen de bioluminiscencia. La **Figura 99** muestra registros típicos del

aumento de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ en célula única producido al estimular con $10 \mu M$ de Ca^{2+} , en ausencia (**Figura 99 A**) o presencia de los AINEs (**Figura 99 B - F**).

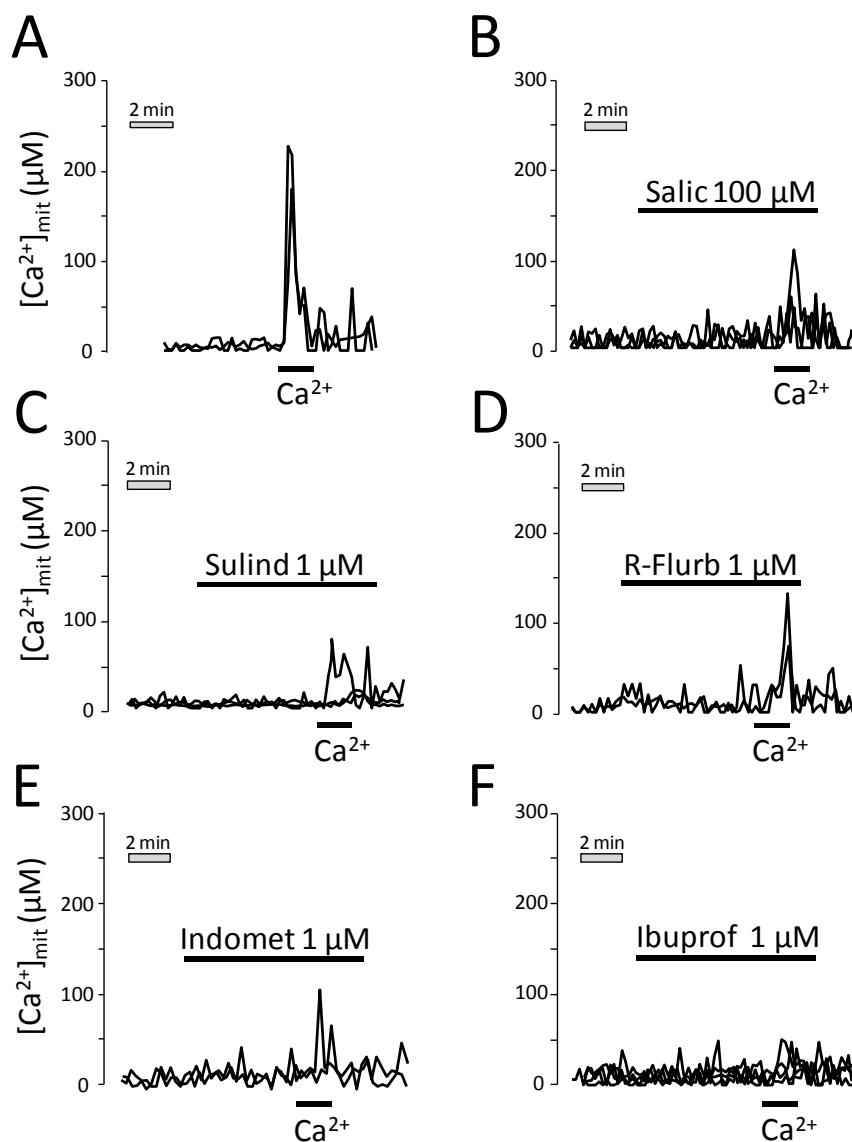


Figura 99. Los AINEs inhiben la sobrecarga de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducido por Ca^{2+} $10 \mu M$ en neuronas de hipocampo permeabilizadas. Los trazos muestran registros representativos del efecto de los AINEs sobre el aumento de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ inducido por Ca^{2+} $10 \mu M$ en neuronas individuales. Neuronas de hipocampo de 8 - 12 DIV fueron transfectadas con el plásmido mitGAmut y sometidas a imagen de bioluminiscencia para monitorizar la $[Ca^{2+}]_{mit}$. Las neuronas fueron permeabilizadas en medio interno, incubadas con salicilato $100 \mu M$ (**B**) o sulindac (**C**), R-flurbiprofeno (**D**), indometacina (**E**) e ibuprofeno (**F**) $1 \mu M$ y estimuladas con Ca^{2+} $10 \mu M$. Representativo de 4 - 7 células procedentes de al menos 3 experimentos independientes.

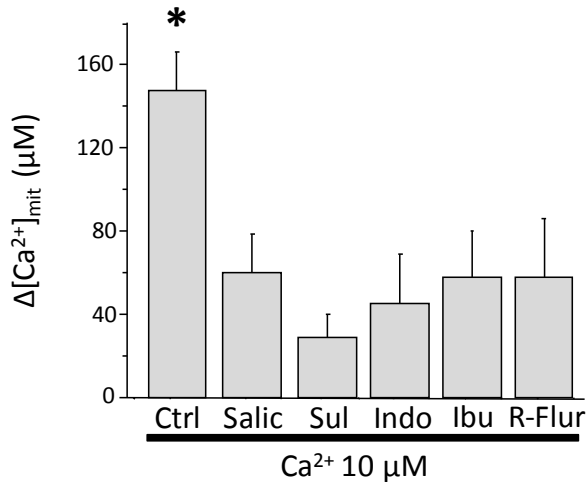


Figura 100. Inhibición de la sobrecarga de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ inducido por Ca^{2+} 10 μM . Las barras representan la inhibición de los AINEs de la sobrecarga de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ inducido por Ca^{2+} 10 μM en neuronas de hipocampo de 8 - 12 DIV. Las barras reflejan la media \pm EEM de 3 - 7 células estudiadas en al menos 3 experimentos independientes por cada condición. * $p < 0,05$ comparado con los AINEs.

Todos los AINEs estudiados inhibieron la captación de Ca^{2+} mitocondrial al estimular con Ca^{2+} 10 μM (**Figura 100**). Este efecto es específico de la mitocondria, puesto que ninguno de los AINEs empleados evitó el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducida por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (**Figura 101 A - D**). La gráfica de barras mostrada en la **Figura 101 E** representa los valores medios \pm EEM del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducida por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ en presencia del correspondiente AINE.

Estos resultados, junto con los anteriores, indican que los AINEs, a bajas concentraciones, inhiben de forma específica la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial inducida por 10 μM de Ca^{2+} en neuronas permeabilizadas, debido a una despolarización parcial de la mitocondria, sin afectar al flujo de Ca^{2+} citosólico que se produce a través de la membrana plasmática.

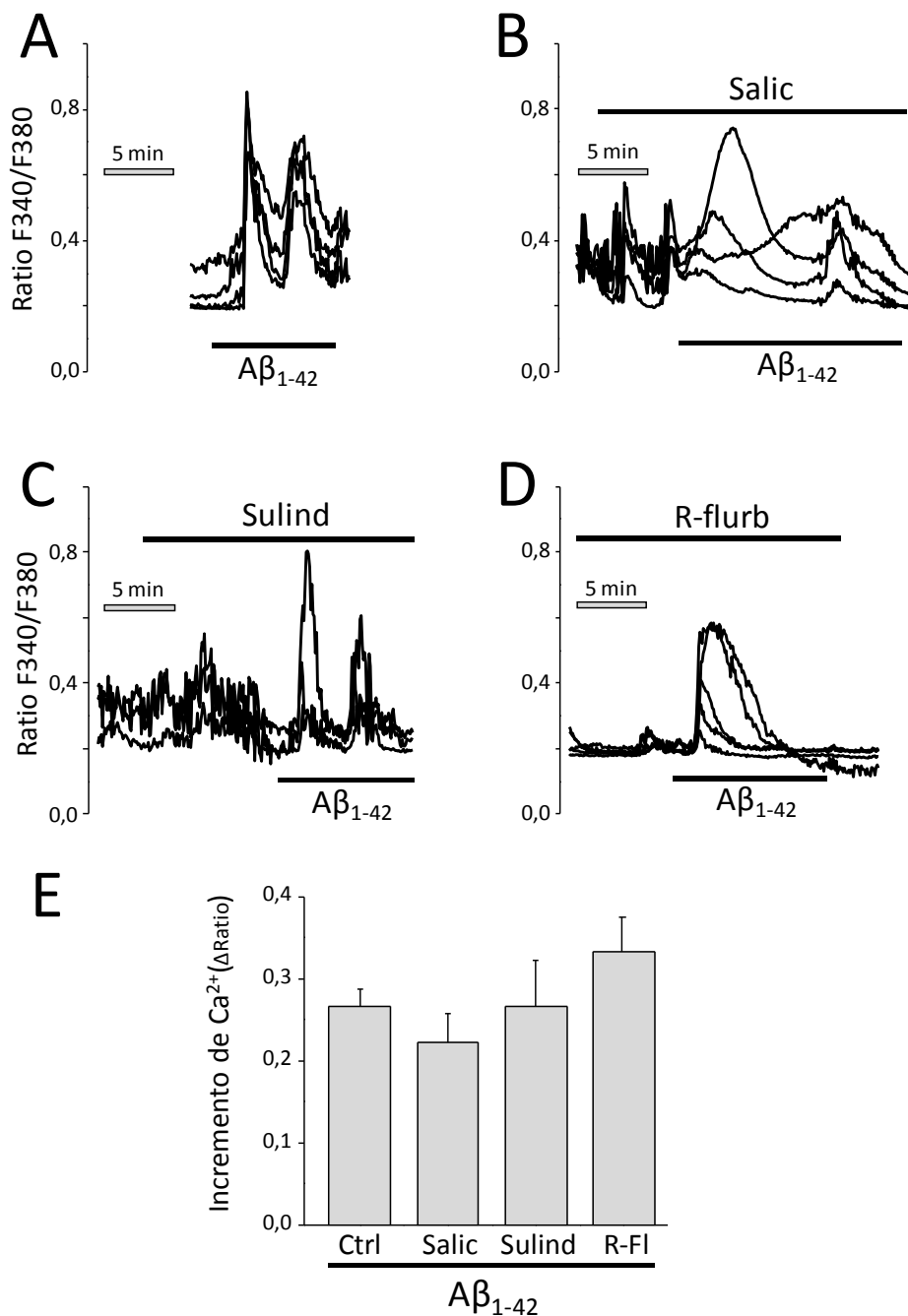


Figura 101. Los AINEs no previenen el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por $A\beta_{1-42}$. A - D. Registros representativos en células individuales del efecto de varios AINEs sobre la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por $A\beta_{1-42}$ en neuronas envejecidas de hipocampo (>13 DIV). E. Valores medios (media \pm EEM) de los aumentos de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ (Δ Ratio) inducido por $A\beta_{1-42}$ en ausencia o presencia de salicilato 100 μ M, sulindac 1 μ M o R-flurbiprofeno 1 μ M (datos procedentes de 18 - 60 células estudiadas en 3 - 9 experimentos independientes).

5.3.2. Los AINEs Previenen la Apoptosis Celular Inducida por los Oligómeros de A β ₁₋₄₂ en Agudo en Neuronas Envejecidas

Puesto que la sobrecarga de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ contribuye a la muerte neuronal inducida por A β ₁₋₄₂, nos planteamos si los AINEs, inhibidores de la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria, eran capaces de aminorar la apoptosis inducida por los oligómeros de A β ₁₋₄₂. Para ello, estudiamos el efecto de los AINEs sobre la viabilidad de las neuronas de hipocampo envejecidas tratadas con A β ₁₋₄₂ en agudo.

La **Figura 102 A** muestra imágenes representativas de células apoptóticas de cultivos de hipocampo tratados con A β ₁₋₄₂ 2 μ M, en presencia o ausencia de salicilato 100 μ M. Los AINEs fueron añadidos 30 minutos previos a la exposición a los oligómeros, durante la hora de tratamiento con los oligómeros y 30 minutos después de éste, en medio extracelular y a temperatura ambiente. Posteriormente, los cristales se lavaron con el mismo medio extracelular y se devolvieron al medio Neurobasal original, donde se dejaron en cultivo 24 h adicionales. Todos los AINEs estudiados, incluyendo salicilato 100 μ M, sulfuro de sulindac 0,5 μ M y el enantiómero R-flurbiprofeno 0,5 μ M (**Figura 102 B, C y D** respectivamente), atenuaron la apoptosis neuronal inducida por el A β ₁₋₄₂. Concretamente, el salicilato previno la apoptosis neuronal un $63 \pm 4\%$, sulfuro de sulindac un $50 \pm 12\%$ y R-flurbiprofeno un $49 \pm 12\%$.

Ninguno de los AINEs probados resultó tóxico para las neuronas de hipocampo. Sin embargo, cuando las neuronas fueron tratadas con concentraciones elevadas de ciertos AINEs, como es el caso del sulindac o el R-flurbiprofeno, el porcentaje de células apoptóticas aumentó dramáticamente, como se aprecia en la **Figura 103** para el enantiómero carente de actividad anti-inflamatoria R-flurbiprofeno, en el que neuronas envejecidas de hipocampo se trataron con concentraciones crecientes de este AINE. Se puede observar cómo altas concentraciones de éste (10 μ M) resultaron tóxicas para las neuronas envejecidas de hipocampo.

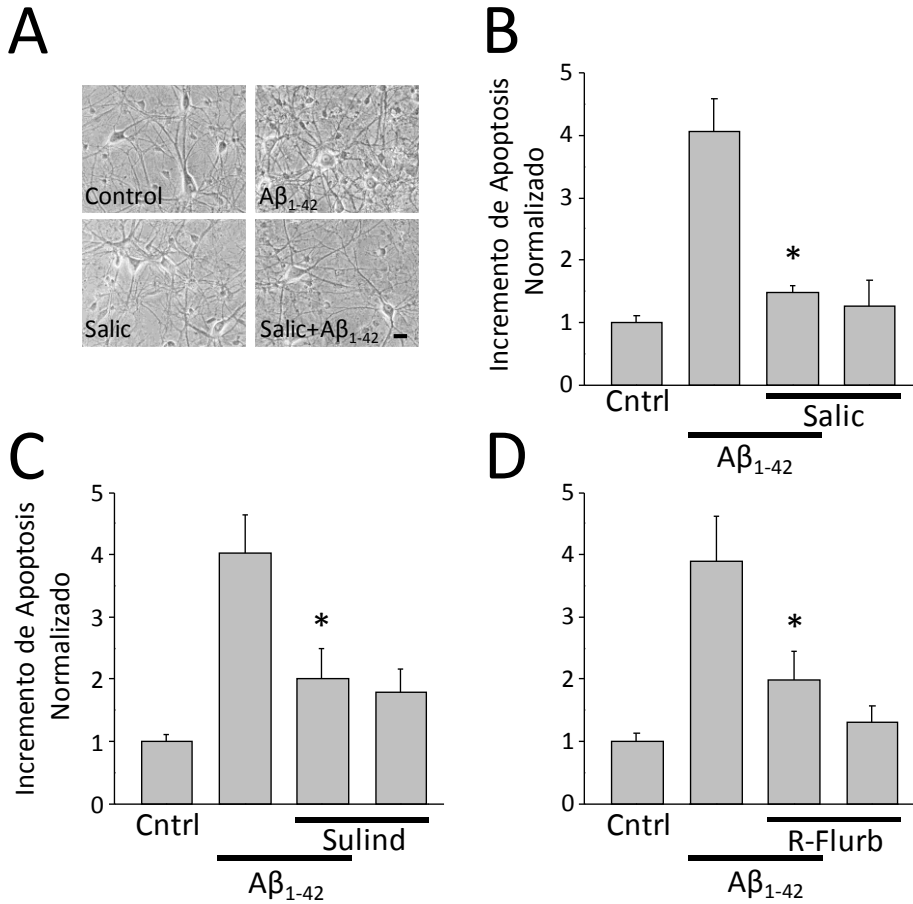


Figura 102. Los AINEs protegen las neuronas de hipocampo envejecidas frente a la neurotoxicidad inducida por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂. Neuronas de hipocampo de >13 DIV fueron tratadas 1 h con Aβ₁₋₄₂ (2 μM) en ausencia o presencia de AINE, y la apoptosis fue evaluada 24 h después con anexina V. **A.** Imágenes representativas de neuronas envejecidas tratadas con Aβ₁₋₄₂ en ausencia o presencia de salicilato. La barra negra representa 20 μm y aplica a las cuatro imágenes. **B - D.** Las barras reflejan el aumento de la apoptosis normalizada respecto al control en condiciones control (solvente) o tratadas con Aβ₁₋₄₂ 2 μM en ausencia o presencia de AINE. Los datos corresponden al efecto de salicilato 100 μM (**B**), sulindac 0,5 μM (**C**) y R-flurbiprofeno 0,5 μM (**D**). Las barras representan el valor medio ± EEM de la apoptosis de 4 - 6 réplicas procedentes de cultivos independientes para cada grupo. *p<0,05 comparado con el tratamiento exclusivo con Aβ₁₋₄₂.

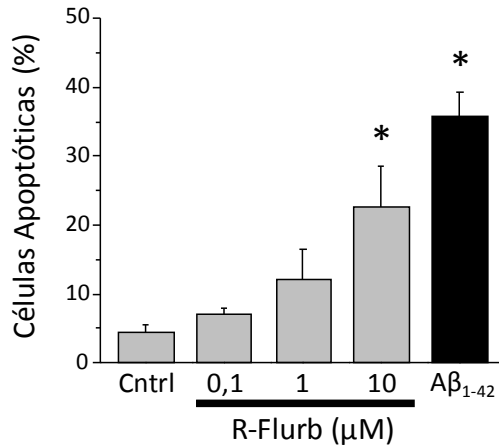


Figura 103. Efecto de concentraciones crecientes de R-flurbiprofeno sobre la viabilidad de neuronas de hipocampo envejecidas. Neuronas envejecidas de hipocampo (15 DIV) fueron tratadas con R-flurbiprofeno o con los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ y comparadas con el grupo sin tratar. Las barras representan el porcentaje de células apoptóticas en las células control y en las tratadas con concentraciones crecientes de R-flurbiprofeno. Los valores representan la media \pm EEM. En negro se muestra el porcentaje de células apoptóticas inducido por $\text{A}\beta_{1-42}$ 2 μM . Altas concentraciones de R-flurbiprofeno resultaron tóxicas para las neuronas envejecidas. Gráfica representativa de 4 experimentos procedentes de cultivos independientes. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

V. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo de tesis ha sido estudiar la posible alteración (remodelado) de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular asociada al envejecimiento neuronal, y su implicación en la susceptibilidad a la muerte que ocurre en la excitotoxicidad y en la Enfermedad de Alzheimer. Para alcanzar este objetivo, hemos empleado un modelo de envejecimiento *in vitro*, a partir de neuronas de hipocampo procedentes de ratas recién nacidas, que hemos dejado "envejecer" en cultivo. Diferentes autores han mostrado anteriormente evidencias de que el cultivo primario de neuronas de hipocampo a largo plazo (>15 DIV) imita, al menos en parte, al envejecimiento neuronal *in vivo* (Porter, Thibault et al. 1997, Brewer, Thibault et al. 2007, Sodero, Weissmann et al. 2011, Stanika, Villanueva et al. 2012). Así, Sodero y col. describieron (Sodero, Weissmann et al. 2011) que tras pocas semanas *in vitro*, las neuronas de hipocampo presentaban muchas de las características típicas que suceden en el envejecimiento neuronal *in vivo*, como son la acumulación de ROS, la presencia de gránulos de lipofusina, activación de la proteína kinasa N-terminal Jun (pJNK) y de las vías p53/p21, así como una pérdida gradual de colesterol. Además, se ha mostrado que los cultivos a largo plazo de ratas recién nacidas presentan cambios en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular similares a los presentes en preparaciones de rodajas de cerebro procedentes de animales envejecidos (Toescu y Verkhratsky 2000). Por ello, el estudio en neuronas de hipocampo cultivadas a largo plazo puede aportar información importante sobre los mecanismos implicados en la degeneración neuronal y en la susceptibilidad al daño celular asociadas a procesos relacionados con la edad, como el accidente cerebrovascular y la Enfermedad de Alzheimer.

1. El Remodelado del Ca^{2+} Intracelular Promueve un Mayor Acoplamiento entre el RE y la Mitocondria en el Envejecimiento Neuronal en Cultivo

Los iones Ca^{2+} son esenciales para un extenso número de funciones del SNC, como la regulación de la expresión génica, proliferación, excitabilidad, liberación de neurotransmisores, plasticidad sináptica o muerte celular. El RE es tanto una fuente de Ca^{2+} como un sistema tamponador del mismo, y la movilización del Ca^{2+} almacenado desempeña un papel importante en el proceso de señalización. La alteración del correcto funcionamiento del RE en el envejecimiento ha sido recientemente descrita (Yoshida 2007). Nuestros resultados concuerdan con alteraciones importantes en la homeostasis del Ca^{2+} del RE de las neuronas de hipocampo a medida que los cultivos envejecen. Así, los resultados muestran que, en condiciones de reposo, existe un bajo nivel de llenado de los depósitos del RE en las neuronas de hipocampo jóvenes, cuantificado como el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por ionomicina en medio extracelular libre de Ca^{2+} . Sin embargo, el nivel de llenado de los depósitos aumenta significativamente durante el envejecimiento neuronal en cultivo. Además, con el envejecimiento en cultivo, la entrada capacitativa de Ca^{2+} , una vía de entrada de Ca^{2+} ubicua y extremadamente importante en otros tipos celulares, se ve notablemente reducida. Esta vía de entrada se activa tras la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} gracias al empleo de, por ejemplo, inhibidores de la bomba de Ca^{2+} tipo SERCA como la tapsigargina.

Los resultados anteriores nos plantean las siguientes cuestiones. ¿Cuáles son los mecanismos implicados en el proceso de remodelado? y ¿Cuáles son las consecuencias funcionales de éste? Las bases moleculares de los cambios descritos en el nivel de llenado de los depósitos y la entrada capacitativa de Ca^{2+} no han sido abordadas en este trabajo. Es posible que los cambios sean debidos a diferencias en la expresión de proteínas de transporte, canales y bombas implicadas en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, incluyendo canales de la familia Orai, bombas tipo SERCA y los sensores de Ca^{2+} del RE Stim 1 y sobre todo Stim 2, por ser la isoforma

más abundante en el SNC. Otros candidatos posiblemente implicados son los canales de Ca^{2+} del RE, los receptores de IP_3 y rianodina.

Respecto a las consecuencias funcionales hay que hacer dos consideraciones. En primer lugar, en relación con la entrada capacitativa de Ca^{2+} o SOCE, no se conoce la función fisiológica de este proceso en neuronas, aunque recientemente se le ha atribuido un posible papel en la plasticidad sináptica (Baba, Yasui et al. 2003). En este caso, la disminución significativa de SOCE durante el envejecimiento neuronal en cultivo podría contribuir a la disminución de la plasticidad sináptica asociada al envejecimiento. En segundo lugar, se ha asociado un mayor nivel de llenado de los depósitos a una mayor susceptibilidad a la muerte celular. Cabe recordar, por ejemplo, los resultados en modelos animales de Alzheimer familiar, donde se ha encontrado un mayor nivel de llenado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} en aquellos ratones portadores de mutaciones en APP, PS1 y PS2 (Nelson, Tu et al. 2007). Otro ejemplo son las células epiteliales de colon en las que se ha mostrado que cambios en el nivel de llenado de los depósitos cursa con modificaciones en la resistencia a la muerte celular (Sobradillo, Hernandez-Morales et al. 2014), o lo que es lo mismo, el aumento de la susceptibilidad a la muerte neuronal. Los resultados obtenidos son consistentes con esta posibilidad. De hecho, tanto la muerte neuronal basal, como la inducida por los agentes neurotóxicos como el NMDA o los oligómeros del péptido amiloide, resultó ser mucho mayor en las neuronas envejecidas en cultivo.

¿De qué modo podría el cambio en el nivel de llenado de los depósitos contribuir a la susceptibilidad a la muerte neuronal? Una posibilidad es que la transferencia de Ca^{2+} del RE a la mitocondria descrita promueva la muerte celular en general y neuronal en particular. Nuestros resultados son acordes con esta posibilidad. Hemos demostrado que, durante el envejecimiento en cultivo, las neuronas de hipocampo liberan mayores cantidades de Ca^{2+} de los depósitos cuando son estimuladas con agonistas fisiológicos o farmacológicos, que estimulan los receptores de IP_3 y rianodina. Este efecto podría deberse, al menos en parte, a un mayor nivel del llenado de los depósitos en las células envejecidas, pero también

podrían participar otros mecanismos, particularmente los cambios en la expresión y/o actividad de los receptores implicados. El otro actor del acoplamiento es, evidentemente, la mitocondria. Nuestros resultados muestran claramente que la mitocondria en las neuronas envejecidas en cultivo capta mucho más Ca^{2+} cuando éste es liberado de RE que en las neuronas consideradas jóvenes.

El mayor acoplamiento funcional entre el RE y la mitocondria puede deberse a diversos factores. La captación mitocondrial de Ca^{2+} depende, en primer lugar, del potencial mitocondrial, o fuerza electromotriz necesaria para la captación de Ca^{2+} a favor de gradiente electroquímico. En segundo lugar, depende de la activación suficiente del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial, un canal de Ca^{2+} de la membrana mitocondrial interna que prácticamente no conduce a bajas $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, pero que se activa dramáticamente cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ en su entorno sube por encima de un cierto nivel, de forma consistente con la formación de microdominios de Ca^{2+} . Nuestros resultados indican que el mayor acoplamiento funcional entre el RE y la mitocondria no puede deberse a cambios en el potencial mitocondrial ya que, de hecho, el potencial mitocondrial disminuye en las neuronas envejecidas en cultivo, de acuerdo a los cambios descritos *in vivo*. Sin embargo, nuestros resultado sugieren que cambios en la expresión del uniportador y en la formación de microdominios podrían contribuir al aumento del acoplamiento ER mitocondria. Así, la inmunocitoquímica cuantitativa empleada reveló que la expresión del MCU aumenta durante el envejecimiento en cultivo. Además, el mayor nivel de llenado de los depósitos y la mayor liberación de Ca^{2+} inducida por ACh o cafeína en medio libre de Ca^{2+} en las células envejecidas es consistente con esta posibilidad.

Otra evidencia más directa procede de los experimentos en los que se ensaya la liberación de Ca^{2+} del RE en presencia de un desacoplante mitocondrial para evitar la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria. En neuronas jóvenes, la despolarización de la mitocondria no influye en absoluto en el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por liberación. En cambio, en las neuronas envejecidas en cultivo, la presencia de FCCP aumenta dramáticamente el pico de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por ACh. Nótese que el tamaño del pico de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por ACh es similar en neuronas

consideradas jóvenes y neuronas envejecidas en cultivo (no así el número de células que responden a ACh). Así, en las neuronas jóvenes, las mitocondrias no están sintiendo el Ca^{2+} liberado de los depósitos mientras que, en las neuronas envejecidas en cultivo, las mitocondrias retiran ávidamente el Ca^{2+} liberado. Estos datos son de nuevo coherentes con un mayor acoplamiento funcional entre el RE y la mitocondria en el envejecimiento. Las medidas de captación de Ca^{2+} mitocondrial mediante el uso de aequorina de baja afinidad dirigida a mitocondria confirman que la captación mitocondrial de Ca^{2+} ocurre exclusivamente en las neuronas envejecidas en cultivo pero no en aquellas neuronas consideradas jóvenes. Por tanto todos los resultados indican que el envejecimiento en cultivo promueve un mayor acoplamiento funcional entre el RE y la mitocondria (**Figura 104**).

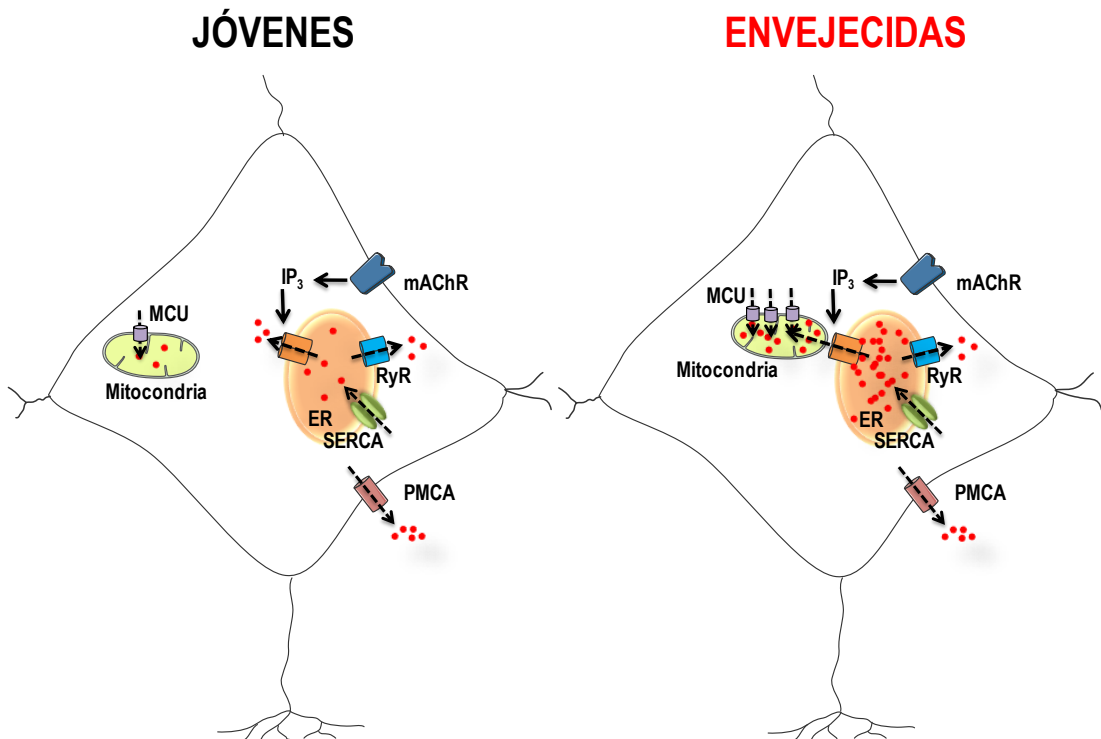


Figura 104. Modelo de neurona joven y envejecida y Ca^{2+} subcelular. Las neuronas jóvenes presentan un bajo contenido de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares. Sin embargo, las neuronas envejecidas presentan un contenido mayor. Además, en las células envejecidas las mitocondrias aparecen acopladas funcionalmente al RE, de forma que captan parte del Ca^{2+} que es liberado desde éste a través de los receptores de IP_3 . El mayor acoplamiento funcional está representado como una mayor cercanía entre el RE y la mitocondria, aunque no conocemos si esto ocurre físicamente.

Este mayor acoplamiento podría tener dos consecuencias funcionales. En primer lugar podría permitir una mayor transferencia “basal” de Ca^{2+} del RE a la mitocondria, que podría ser necesario para solventar posibles limitaciones en la síntesis de ATP debidas al envejecimiento. En este sentido se ha descrito que el déficit en la transferencia de Ca^{2+} del RE a la mitocondria limita la síntesis de equivalentes de reducción para alimentar la cadena de transporte de electrones originando una caída del cociente ATP/ADP lo que conduce a la activación de la AMPK y la inducción de autofagia (Cardenas, Miller et al. 2010). Es más, la acentuación de este mecanismo con la edad puede estar relacionado con la compensación de la disminución del $\Delta\Psi$ que ocurren en aquellas neuronas envejecidas en cultivo. La segunda consecuencia es una mayor susceptibilidad a la muerte celular inducida por liberación masiva del Ca^{2+} del ER a la mitocondria.

2. La Exposición Crónica a los Oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ Intensifica el Remodelado de Ca^{2+} Intracelular en el Envejecimiento

El envejecimiento fisiológico está relacionado con ciertos cambios en la homeostasis del Ca^{2+} . En las neuronas envejecidas, un aumento del Ca^{2+} liberado desde el RE o la capacidad disminuida para tamponar el Ca^{2+} parece estar asociado a la excitotoxicidad y al aumento de la vulnerabilidad a la apoptosis. Debido a ello, en la edad avanzada aparecen diferentes daños en sistema nervioso, que pueden llevar a desórdenes neurológicos, como es la EA.

Como muestran nuestros resultados, la exposición crónica a los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ contribuye a la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} , pues provocan un aumento del Ca^{2+} basal en el citoplasma, así como un incremento en las oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} . Esto es consistente con resultados encontrados *in vivo*, en los que cerebros de pacientes con EA muestran un aumento en los niveles de Ca^{2+}

(Murray, Landsberg et al. 1992). Estudios recientes de imagen de Ca^{2+} llevados a cabo *in vivo* en el ratón transgénico de APP han mostrado que los niveles de Ca^{2+} basales son significativamente elevados en aproximadamente el 35% de las neuritas localizadas en las zonas próximas a las placas amiloides (Kuchibhotla, Goldman et al. 2008). Una posible explicación a este aumento de los niveles basales es la capacidad de los oligómeros de $\text{A}\beta$ para generar ROS, de forma que éstos perturban la función de las ATPasas de membrana, lo que lleva al aumento de los niveles basales de Ca^{2+} (Mark, Hensley et al. 1995).

Estudios previos han mostrado que el aumento del Ca^{2+} intracelular basal está relacionado con el aumento de la excitabilidad neuronal y por tanto con la conectividad del circuito (Catterall y Few 2008), por lo que podría conjeturarse que el tratamiento crónico con los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ aumenta la excitabilidad del circuito. Curiosamente, el riesgo de actividad epiléptica es particularmente alto en los pacientes con EA con demencia de inicio temprano y durante las primeras etapas de la enfermedad, con una incidencia de las crisis mucho mayor en comparación con una población de referencia de la misma edad (Amatniek, Hauser et al. 2006).

Por otro lado, las PS1 y PS2 son proteínas que se localizan en la membrana del RE, y que se cree que forman canales de baja conductividad, participando principalmente en la formación de los canales *leak* del RE, que liberan Ca^{2+} de forma pasiva desde el RE al citoplasma (Tu, Nelson et al. 2006). Hasta la fecha, el trabajo con ratones transgénicos ha mostrado que mutaciones en estas proteínas, que tienen lugar en la EA familiar, resultan en una pérdida de función de la actividad del canal *leak*, provocando un aumento del nivel de llenado de los depósitos de Ca^{2+} (Nelson, Tu et al. 2007). Nuestros resultados muestran que el tratamiento crónico de neuronas *in vitro* con los oligómeros de la especie más tóxica $\text{A}\beta_{1-42}$ causa un aumento de los niveles de Ca^{2+} de los depósitos, demostrando así que el tratamiento crónico con $\text{A}\beta_{1-42}$ produce un efecto similar. Este hecho podría explicar uno de los factores que acontecen en la EA esporádica (ver modelo **Figura 105**).

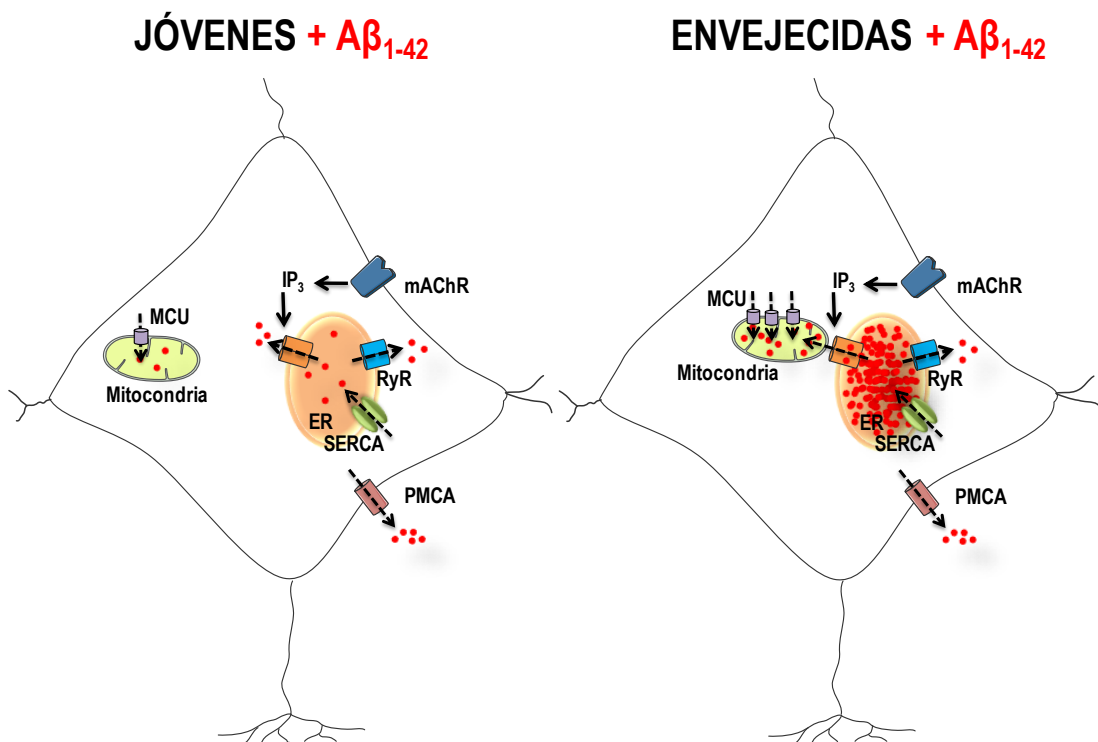


Figura 105. Modelo del efecto del tratamiento crónico de una neurona joven y envejecida con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y Ca^{2+} subcelular. Las neuronas de hipocampo jóvenes tratadas de forma crónica con oligómeros del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ presentan un bajo contenido de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares. Sin embargo, las neuronas envejecidas tratadas de forma crónica con oligómeros del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$ presentan un contenido aún mayor que aquellas envejecidas que no han sido expuestas a los oligómeros del péptido amiloide $A\beta_{1-42}$.

De la misma forma, el tratamiento con los oligómeros incrementa notablemente el pico de $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido tanto por ACh como por Caf. De forma consistente, estudios preliminares en fibroblastos de pacientes con EA (Gibson, Zhang et al. 1996) o en células que contenían la PS1 humana mutada (Stutzmann 2005), mostraron una liberación de Ca^{2+} anormal a través de los IP_3Rs (Leissring, Paul et al. 1999). Además, también se han descrito aumentos de Ca^{2+} anormales mediados por IP_3 en fibroblastos de miembros asintomáticos de familias con EA (Etcheberrigaray, Hirashima et al. 1998). Otros estudios también han implicado los

RyRs como responsables de este aumento de la liberación de Ca^{2+} intracelular en los animales con la PS1 mutada (Chan, Mayne et al. 2000).

Como se explica anteriormente, nuestros resultados sugieren un aumento del nivel de llenado de los depósitos de Ca^{2+} en las neuronas envejecidas en cultivo. Sin embargo, los cambios que suceden con el envejecimiento en cultivo son bastante leves si se comparan con las alteraciones inducidas por el tratamiento crónico con los oligómeros de A β . Esto podría reflejar la diferencia fundamental entre el proceso fisiológico del envejecimiento cerebral y el patológico asociado a la neurodegeneración. Además se sabe que cambios en la homeostasis del Ca^{2+} del RE ocurren mucho antes que ciertos síntomas histopatológicos y funcionales de la EA (LaFerla 2002). Es notorio que las neuronas jóvenes son resistentes al efecto de los oligómeros, mientras que las envejecidas son permisivas y los oligómeros intensifican tanto el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ basal como el aumento del nivel de llenado de los depósitos, ambos asociados al envejecimiento. Por tanto, el envejecimiento parece una condición necesaria para que los oligómeros del péptido amiloide puedan actuar.

Los resultados anteriores sugieren que el mayor nivel de llenado de los depósitos podría ser responsable, en parte, de la susceptibilidad a la muerte de las neuronas envejecidas y, especialmente, de las neuronas envejecidas con Enfermedad de Alzheimer. Consistentemente, nuestros datos muestran que los oligómeros del péptido amiloide inducen muerte neuronal solamente en las neuronas envejecidas en cultivo pero no en las neuronas consideradas jóvenes.

No conocemos la forma en la que el mayor contenido y/o liberación de Ca^{2+} del RE promueve la susceptibilidad a la muerte neuronal, aunque como se discute anteriormente, el acoplamiento ER-mitocondria y la captación de Ca^{2+} mitocondrial deben ser mediadores necesarios. Sin embargo, encontramos que ACh, un agonista que activa receptores nicotínicos ionotrópicos y muscarínicos metabotrópicos acoplados a la liberación de Ca^{2+} del RE no promueve muerte neuronal. Al contrario, el tratamiento crónico con ACh protege frente a la muerte neuronal inducida por los oligómeros de A β_{1-42} . Este efecto parece mediado exclusivamente por los receptores

ionotrópicos nicotínicos, dado que el agonista del receptor muscarínico Carbacol no previno la muerte neuronal inducida por los oligómeros. Se requieren experimentos adicionales para determinar el mecanismo neuroprotector de los receptores nicotínicos de acetilcolina. Es importante recordar en este punto que los inhibidores de la acetilcolinesterasa que degrada la ACh, y que por tanto aumentan los niveles de ACh, son utilizados como fármacos en la Enfermedad de Alzheimer.

3. Las Neuronas de Hipocampo Presentan una Mayor Susceptibilidad a la Excitotoxicidad con el Envejecimiento

Como se ha mencionado en la introducción, el envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para el daño neuronal asociado a la excitotoxicidad. Nuestros resultados muestran que los cultivos de hipocampo jóvenes (2 DIV) son resistentes a la excitotoxicidad. Sin embargo, el NMDA indujo apoptosis en las neuronas a 8 DIV, efecto que aumentó dramáticamente para los cultivos envejecidos (13-16, 17-21 DIV). Estos resultados son consistentes con estudios anteriores, que proponían un aumento de la vulnerabilidad al estímulo excitotóxico a medida que las neuronas maduraban en cultivo, tanto para neuronas de hipocampo como para otros tipos neuronales (Choi, Maulucci-Gedde et al. 1987, Peterson, Neal et al. 1989, Barish y Mansdorf 1991).

De forma consistente, se encontró que el incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido por NMDA era pequeño en las neuronas jóvenes (2 DIV), y aumentaba de forma exponencial para los cultivos envejecidos. Por el contrario, el aumento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducido al estimular con alto K^+ (145 mM) era pequeño para las neuronas jóvenes (2 DIV), y aumentaba de forma modesta para los cultivos envejecidos. Estos resultados son consistentes con estudios previos, que sugerían que el aumento de la susceptibilidad a la excitotoxicidad es debido a cambios en la respuesta al NMDA

(Porter, Thibault et al. 1997, Brewer, Thibault et al. 2007). La entrada de Ca^{2+} inducida por el NMDA se debe principalmente a la activación de canales activados por ligando permeables a Ca^{2+} , y en menor medida, a la entrada secundaria de Ca^{2+} a través de los VOCs (Miyakawa, Ross et al. 1992, Jaffe, Ross et al. 1994). Dado que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducido por alto K^+ resultó ser modesto y no cambió en exceso con el envejecimiento, los resultados sugieren que el aumento de la vulnerabilidad a la excitotoxicidad puede deberse a cambios en la expresión de las diferentes subunidades del NMDAR, al igual que había sido sugerido anteriormente (Brewer, Thibault et al. 2007). Así, los ensayos de inmunofluorescencia frente a las diferentes subunidades del NMDAR, realizados a 2, 8 y 15 DIV, son consistentes con esta posibilidad. Nuestros resultados mostraron un aumento de la expresión de las subunidades NR1 y NR2A con el tiempo en cultivo, mientras que la expresión de la subunidad NR2B disminuyó durante el mismo periodo de tiempo. Este resultado es acorde con estudios anteriores realizados *in vivo*, que sugerían un aumento del ratio de las subunidades NR2A:NR2B con el envejecimiento de cerebros de ratones y ratas (Cui, Feng et al. 2013).

Parece claro que el periodo en el que se aprecia el mayor incremento de la excitotoxicidad es después de 13 DIV, lo que se correlaciona con un aumento en la expresión del NR2A y NR1, al menos en los cultivos de hipocampo. Otros trabajos son consistentes con este punto de vista en el que la subunidad NR2A tiene el principal papel en el aumento de la excitotoxicidad. Así, los ratones deficientes en la subunidad NR2A muestran una reducción en el daño cerebral (Morikawa, Mori et al. 1998). Además, recientemente se ha mostrado que las subunidades NR2A también se localizan de forma extrasináptica en las neuronas de hipocampo en cultivo (Thomas, Miller et al. 2006), una situación que se ha sugerido está relacionada con la excitotoxicidad (Hardingham, Fukunaga et al. 2002).

Por otra parte, también se pudo observar que en nuestro modelo, los valores de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en reposo (previo a cualquier estímulo) eran bajos en los cultivos jóvenes, y aumentaban de forma significativa con el envejecimiento en cultivo. Estas diferencias en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ basales pueden también contribuir al aumento de la

susceptibilidad a la excitotoxicidad. Los mecanismos que participan en la diferente $[Ca^{2+}]_{cit}$ basal pueden incluir cambios en la disponibilidad de los tampones de Ca^{2+} intracelulares, como la calbindina D28K (Riascos, de Leon et al. 2011), o cambios en los mecanismos de extrusión del Ca^{2+} , aunque los experimentos para definirlo no han sido realizados en este trabajo.

Estos resultados nos llevaron a plantearnos lo siguiente, ¿cómo el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ basal y de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ inducidos por NMDA promueven la apoptosis en los cultivos envejecidos pero no en los jóvenes? Anteriormente se ha propuesto que la muerte neuronal inducida por glutamato requiere la captación de Ca^{2+} mitocondrial (Stout, Raphael et al. 1998). De esta forma, la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial promueve la apertura del PTPm y con ello la liberación del cit C, el punto de no retorno que irremediablemente lleva a la apoptosis (Baines, Kaiser et al. 2005, Shalbuyeva, Brustovetsky et al. 2006). Diferentes estudios parecen sugerir que la entrada excesiva de Ca^{2+} a través de los NMDARs en las neuronas, y no a través de los receptores de kainato o de los VOCs, provoca sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, produciendo señales de muerte (Tymianski, Charlton et al. 1993, Peng y Greenamyre 1998, Arundine y Tymianski 2003). Esta observación sugiere un acceso privilegiado del Ca^{2+} a la mitocondria cuando entra a través el NMDA, tal vez porque la mitocondria se encuentra más próxima a los NMDARs que a otras vías de entrada de Ca^{2+} (Peng y Greenamyre 1998). Los resultados muestran que la estimulación con NMDA no produjo entrada de Ca^{2+} mitocondrial en las neuronas jóvenes (2 DIV), a pesar de inducir aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en las mismas células y de que los ensayos de inmunofluorescencia mostraban la existencia de receptores de NMDA funcionales a 2 DIV. Por el contrario, la estimulación con NMDA sí produjo un aumento de la $[Ca^{2+}]_{mit}$ en las neuronas a 8 DIV, efecto que aumentó para los cultivos envejecidos (>13 DIV). Estos resultados sugieren que la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial contribuye al aumento de la susceptibilidad a la excitotoxicidad con el envejecimiento (Ver modelo propuesto en la **Figura 106**). Apoyando este hecho, encontramos que el NMDA indujo la liberación del cit C en los cultivos envejecidos, pero no en los jóvenes. Además, el NMDA indujo

disminución de la fluorescencia asociada a la calceína/ Co^{2+} en los cultivos envejecidos, indicando una apertura del PTPm. Esta visión se confirma por la neuroprotección proporcionada por el desacoplante mitocondrial FCCP, que empleado a bajas concentraciones inhibió la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial. Esta neuroprotección también se apreció cuando los cultivos fueron tratados con CsA, compuesto que bloquea la apertura del PTPm.

La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria sucede a través del MCU (Baughman, Perocchi et al. 2011, De Stefani, Raffaello et al. 2011). Los ensayos de inmunofluorescencia muestran que la expresión del MCU aumenta con el envejecimiento en cultivo de las neuronas de hipocampo. Recientemente, Qiu et al. han descrito que el *knockdown* de la expresión de MCU reduce el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ inducida por NMDA, de forma que estas células presentan resistencia a la apoptosis (Qiu, Tan et al. 2013). De acuerdo a ello, la explicación más simple a por qué la mitocondria de las neuronas envejecidas capta más Ca^{2+} que las jóvenes parece ser debido a que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en respuesta al NMDA es mucho mayor en las neuronas envejecidas, que junto con el aumento de la expresión de MCU favorecen la captación mitocondrial. Otro factor que puede contribuir al aumento de la captación de Ca^{2+} por la mitocondria es un posible cambio en la disposición de la mitocondria, situándose cercanas al NMDAR para favorecer la detección de los dominios de Ca^{2+} , aunque ensayos que corroboren este hecho están fuera de este estudio.

Cabe decir que la mitocondria juega un papel importante en el proceso de envejecimiento (Bereiter-Hahn 2014). Se ha descrito que con el envejecimiento aparece una disminución en la función de mitocondrial y un aumento de su tamaño y número (Guevara, Gianotti et al. 2011), hecho que es imitado en los cultivos neuronales a largo plazo (Dong, Cheng et al. 2011). Junto a ello, encontramos que el potencial mitocondrial disminuye de forma progresiva con el tiempo en cultivo. Estos resultados parecen sugerir que la mitocondria muestra mecanismos de autoprotección frente a la sobrecarga de Ca^{2+} que sucede con el envejecimiento. Por otro lado, se ha propuesto también que la mitocondria de las neuronas envejecidas esté

despolarizada les hace menos eficientes en el manejo de la sobrecarga de Ca^{2+} (Toescu y Verkhratsky 2007), pudiendo aumentar así su vulnerabilidad a la toxicidad.

En relación con los depósitos intracelulares, se sabe que la anoxia que se produce durante el proceso isquémico reduce la actividad de la SERCA en las neuronas (Goldberg y Choi 1993, Henrich y Buckler 2008), y que además está involucrada en la liberación de Ca^{2+} desde los receptores de IP_3 y los RyR, pues el bloqueo de estos receptores protege a las neuronas del daño excitotóxico (Frandsen y Schousboe 1991, Mattson, Zhu et al. 2000). Así, la reducción de la actividad de la SERCA junto con el aumento de la liberación de Ca^{2+} desde el RE conlleva a la acumulación de Ca^{2+} en el citosol y al vaciamiento de los depósitos, que además puede provocar la carga de Ca^{2+} en el citosol si se activa SOCE. SOCE puede además desencadenar la entrada de Ca^{2+} al provocar la liberación de glutamato y la posterior activación de los receptores ionotrópicos de glutamato (Arundine y Tymianski 2004). La combinación de SOCE y de la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores ionotrópicos puede llevar al citosol (y por tanto a la mitocondria) a concentraciones de Ca^{2+} altamente peligrosas.

4. El Tratamiento Agudo con los Oligómeros del Péptido Amiloide $\text{A}\beta_{1-42}$ Induce Toxicidad en las Neuronas de Hipocampo Envejecidas al Producir Sobrecarga de Ca^{2+} Mitocondrial

El péptido amiloide ($\text{A}\beta$) es el principal componente de las placas amiloides encontradas en la EA, y su papel patológico está aceptado casi universalmente como principal en esta enfermedad. En este trabajo hemos estudiado dos aspectos de los posibles efectos de los oligómeros del péptido amiloide. En primer lugar se han estudiado los efectos del tratamiento crónico con oligómeros sobre el remodelado del Ca^{2+} intracelular y los efectos diferenciales de este tratamiento en neuronas jóvenes y

envejecidas, discutidos anteriormente. En segundo lugar, se han investigado los efectos agudos de los oligómeros sobre el Ca^{2+} intracelular también en neuronas jóvenes y envejecidas. Se ha observado que los oligómeros inducen un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ mucho mayor en las neuronas envejecidas de hipocampo de rata en cultivo que en las neuronas consideradas jóvenes. Además, nuestros resultados indican una mayor susceptibilidad a la toxicidad inducida por estos oligómeros en los cultivos a largo plazo que en aquellos a corto plazo.

La entrada masiva de Ca^{2+} desde el exterior celular inducida por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ indujo sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial principalmente en las células envejecidas en cultivo, como pudimos observar directamente por imagen de bioluminiscencia en las neuronas que expresaban la aequorina de baja afinidad dirigida a mitocondria. Una entrada excesiva de Ca^{2+} a la mitocondria aumenta la producción de ROS, inhibe la síntesis de ATP y además provoca la apertura de PTPm, llevando a la apoptosis celular (Dubinsky y Levi 1998, Kruman y Mattson 1999).

Estudios clínicos y experimentales han propuesto que la disfunción mitocondrial desempeña un papel importante en la patogénesis de la EA. Se ha encontrado disfunción mitocondrial en cerebros de pacientes con EA *post-mortem* (Smith, Perry et al. 1996, Gibson, Sheu et al. 1998), en ratones transgénicos con EA (Lustbader, Cirilli et al. 2004, Eckert, Hauptmann et al. 2008) y en líneas celulares tratadas con $\text{A}\beta$ (Matsumoto, Akao et al. 2006). El mecanismo exacto no está claro, pero ejemplo de esta disfunción son la disminución de las enzimas mitocondriales, aumento de la producción de radicales libres, peroxidación lipídica, daño oxidativo del ADN y de las proteínas y disminución en la producción de ATP en los cerebros de pacientes con EA en comparación con individuos control de la misma edad (Smith, Perry et al. 1996, Gibson, Sheu et al. 1998, Devi, Prabhu et al. 2006). Nuestros resultados indican que en las células envejecidas, la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial contribuye a la apoptosis celular que inducen los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (Ver modelo propuesto en la **Figura 106**). Esta visión es apoyada por el hecho de que la inhibición de la captación de Ca^{2+} mitocondrial inducida por bajas concentraciones de FCCP

inhibe la muerte celular sin afectar a la entrada de Ca^{2+} citosólico que inducen los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$. Este hecho es similar al mecanismo de excitotoxicidad producido por el glutamato (o el NMDA como se mostró en el apartado anterior).

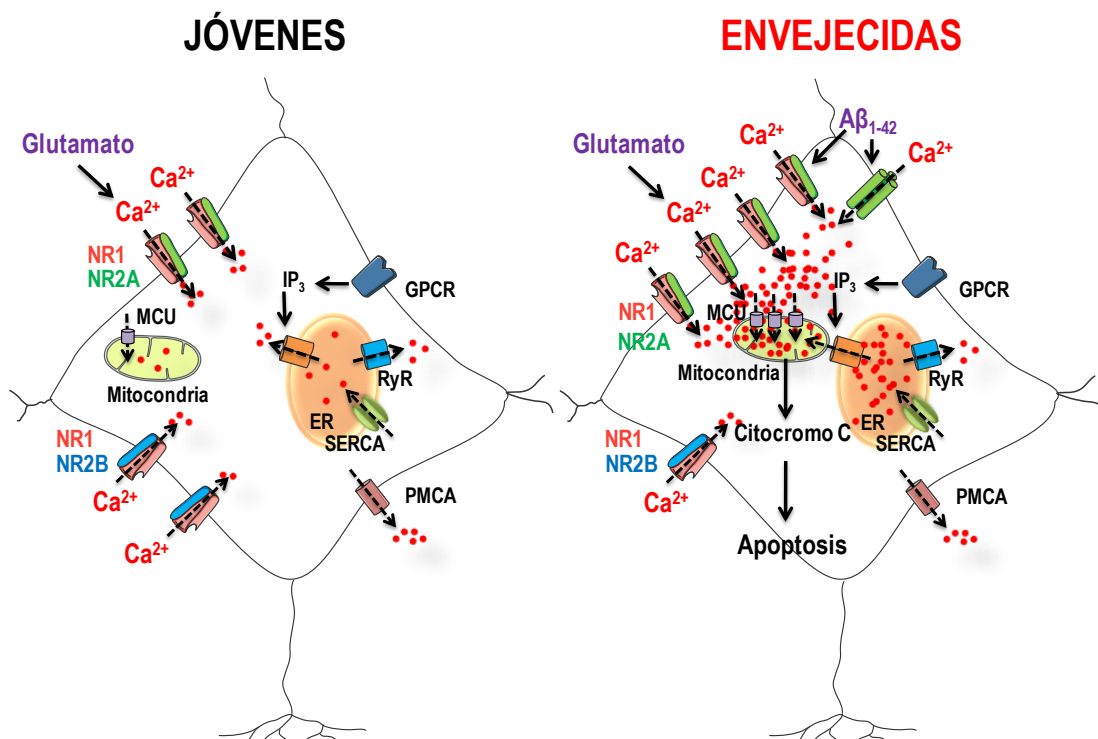


Figura 106. Modelo de neurotoxicidad inducida por una excesiva entrada de Ca^{2+} inducida por NMDA o por los oligómeros del péptido amiloide $\text{A}\beta_{1-42}$ en las neuronas envejecidas. Las neuronas jóvenes de hipocampo presentan una expresión similar de receptores NR1/NR2A y NR1/NR2B. Sin embargo, en las neuronas envejecidas aparece un aumento en la expresión de receptores NR1/NR2A. Además, las neuronas envejecidas son más susceptibles a la entrada de Ca^{2+} inducida por $\text{A}\beta$. A través de estos receptores entra una mayor cantidad de Ca^{2+} que en las neuronas jóvenes, que junto con la mayor cantidad de Ca^{2+} liberado de los depósitos puede provocar la sobrecarga del Ca^{2+} mitocondrial, liberar el citocromo C y producir apoptosis.

Por otro lado, parece que el $\text{A}\beta$ puede acceder directamente a la mitocondria e interactuar específicamente con dianas intramitocondriales, lo que lleva a la disfunción directa de este orgánulo (Caspersen, Wang et al. 2005). Estudios recientes

han mostrado que la interacción entre el A β y la ciclofilina D, que parece participar en la formación del PTPm (Tanveer, Virji et al. 1996), hace a las mitocondrias más susceptibles a la apertura del PTPm, provocando daño neuronal y una disminución en las funciones cognitivas en modelos de animales con EA (Du, Guo et al. 2008).

Existe por tanto evidencia de que la homeostasis del Ca²⁺ mitocondrial está afectada en la EA y puede incluso contribuir al deterioro cognitivo que se aprecia en esta enfermedad. Esto lleva a la hipótesis de si modular el nivel del Ca²⁺ mitocondrial puede ser beneficioso para los pacientes con EA.

5. Los AINEs Protegen frente a la Apoptosis en las Neuronas Envejecidas Inducida por Agentes Neurotóxicos Actuando sobre el Ca²⁺ Mitocondrial

Los AINEs son compuestos de estructura molecular similar a los desacoplantes mitocondriales, formados por grupos carboxílicos unidos a restos aromáticos. En este trabajo se ha empleado una batería de AINEs, incluyendo salicilato, sulindac, indometacina, ibuprofeno y el enantiómero sin actividad anti-inflamatoria R-flurbiprofeno, todos a bajas concentraciones. Estos compuestos son capaces de despolarizar parcialmente la mitocondria e inhibir la captación de Ca²⁺ mitocondrial inducida por NMDA o por la aplicación de Ca²⁺ directamente en el caso de los experimentos en células permeabilizadas. Este efecto sucede sin afectar al incremento en la [Ca²⁺]_{cit}. Estos compuestos, utilizados a las mismas bajas concentraciones, también protegieron frente a la apoptosis inducida por el NMDA y los oligómeros del péptido amiloide A β ₁₋₄₂. Estos resultados sugieren por tanto que los AINEs protegen frente a la excitotoxicidad y la muerte neuronal que produce el péptido amiloide actuando sobre la captación de Ca²⁺ mitocondrial. Este mecanismo puede explicar la neuroprotección proporcionada por los AINEs *in vitro* e *in vivo*,

incluyendo prevención frente a la pérdida cognitiva que sucede en el envejecimiento (Kern, Skoog et al. 2012) o incluso frente a la EA (Etminan, Gill et al. 2003).

Como ya hacíamos referencia en la introducción, se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el efecto neuroprotector de los AINEs, incluyendo su actividad anti-inflamatoria o su capacidad depuradora. Sin embargo, los AINEs fueron empleados a concentraciones muy bajas (0,5 - 1 μM excepto para el salicilato). A estas concentraciones, los AINEs carecen de estas actividades. Además, el R-flurbiprofeno, el enantiómero carente de capacidad anti-inflamatoria pero con capacidad para despolarizar la mitocondria, también resultó ser neuroprotector, incluso a bajas concentraciones, evitando la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial sin afectar a la entrada de Ca^{2+} al citosol, y protegiendo frente a la toxicidad inducida por el NMDA o por los oligómeros del péptido amiloide.

Sin embargo, cuando los cultivos fueron tratados con altas concentraciones de AINE, como se muestra para el R-flurbiprofeno, estas concentraciones resultaron tóxicas. Este hecho podría explicar porqué el R-flurbiprofeno no fue positivo en el ensayo clínico en Fase III del Tarenflurbil (Wilcock et al 2009), que ya incluso en Fase II no proporcionó ningún efecto si se empleaba a bajas concentraciones (Wilcock, Black et al. 2008). Tal vez la concentración de R-flurbiprofeno empleada era aún alta, de forma que el posible efecto neuroprotector fuera contrarrestado por el efecto neurotóxico relacionado con la despolarización de la mitocondria. Por otro lado, es posible que el empleo de concentraciones bajas no tuvieran ningún efecto.

Es conveniente comentar que la despolarización mitocondrial puede inducir la apertura del PTPm (Bernardi y von Stockum 2012). Si esto sucediera, el PTPm actuaría como un canal en la mitocondria despolarizada, a través del cual se liberaría Ca^{2+} , afectando al flujo neto de Ca^{2+} entre la matriz mitocondrial y el citoplasma. Sin embargo, descartamos esta posibilidad puesto que las concentraciones de AINE utilizadas fueron extremadamente bajas, produciendo sólo una despolarización mitocondrial leve, de unas pocas decenas de milivoltios (Valero, Senovilla et al. 2008). Además, los AINEs empleados a bajas concentraciones no indujeron disminución de

la fluorescencia de calceína por Co^{2+} , sugiriendo que no inducen apertura del PTPm, al menos a las concentraciones empleadas en este trabajo.

ENVEJECIDAS + AINEs

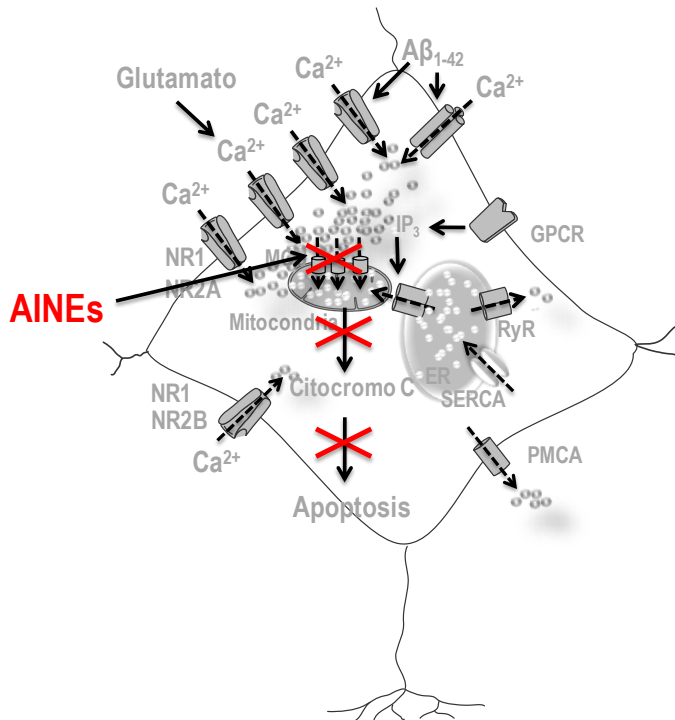


Figura 107. Modelo de neuroprotección por AINEs basado en la inhibición de la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial. Los AINEs empleados a bajas concentraciones despolarizan parcialmente la mitocondria e inhiben la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, previniendo la liberación del citocromo C y evitando la apoptosis inducida por un exceso en la entrada de Ca^{2+} a través de receptores de glutamato o inducida por el péptido amiloide.

En resumen, estos resultados proponen que ciertos AINEs son capaces de proteger frente a la excitotoxicidad asociada a la isquemia y otras enfermedades neurodegenerativas propias del envejecimiento, y a la muerte neuronal que caracteriza la EA, actuando directamente sobre la captación de Ca^{2+} mitocondrial e

independientemente de su actividad anti-inflamatoria (Ver modelo propuesto en la **Figura 107**).

Es importante decir que los cambios que llevan a la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} en el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas aún no están claros. Además, aunque el envejecimiento no es iniciado por la desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} y su señalización, estos sí parecen ser un componente crítico en este proceso. La alteración de la homeostasis del Ca^{2+} aumenta la vulnerabilidad del organismo al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad, las cuales además se desarrollan bajo circunstancias desfavorables, como la presencia de otros factores de riesgo. La homeostasis del Ca^{2+} parece estar alterada especialmente en las células que más energía consumen, en las neuronas y en el músculo estriado y cardíaco de los humanos en avanzada edad, que son las zonas que sufren la mayoría de las enfermedades relacionadas con la edad, demencia y enfermedades cardiovasculares. Visiblemente, la presencia de estas dolencias puede acortar la duración de la vida del individuo al que afectan.

VI. CONCLUSIONES

Del presente trabajo se obtienen las siguientes conclusiones:

1. Las neuronas de hipocampo de rata neonatal envejecidas en cultivo muestran un mayor nivel de Ca^{2+} citosólico basal, menor entrada capacitativa de Ca^{2+} , mayor contenido de Ca^{2+} en los depósitos y mayor liberación de Ca^{2+} inducida por ACh y cafeína que las neuronas de hipocampo cultivadas pocos días *in vitro* (DIV) y consideradas jóvenes.
2. En las neuronas envejecidas, pero no en las jóvenes, se produce un acoplamiento funcional entre el RE y las mitocondrias, que permite a éstas captar parte del Ca^{2+} liberado a través del receptor de IP_3 . Además en neuronas envejecidas presentan un aumento en la expresión del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. Estos cambios podrían contribuir a la mayor susceptibilidad de las neuronas envejecidas a la muerte neuronal.
3. El tratamiento crónico (24 h) con oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ no altera el contenido de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} en neuronas jóvenes, pero sí el de las neuronas envejecidas en cultivo. Además, este tratamiento incrementa las oscilaciones sincrónicas de Ca^{2+} y la liberación de Ca^{2+} inducida por ACh y cafeína solo en las neuronas envejecidas, intensificando así el remodelado del Ca^{2+} intracelular asociado al envejecimiento.
4. Las neuronas de hipocampo envejecidas en cultivo son mucho más vulnerables a la muerte inducida por estímulos excitotóxicos (NMDA) y neurodegenerativos (oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$) que las neuronas jóvenes. Estos estímulos inducen incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico y mitocondrial mucho mayores en las neuronas envejecidas que en las jóvenes.
5. Las neuronas de hipocampo envejecidas en cultivo muestran cambios en la expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA

consistentes con los descritos *in vivo* durante el envejecimiento, que podrían contribuir a la mayor susceptibilidad a la muerte durante el envejecimiento.

6. La inhibición de la captación de Ca^{2+} mitocondrial por desacoplantes mitocondriales previene la muerte neuronal inducida por NMDA y los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$, indicando el importante papel de la sobrecarga de mitocondrial de Ca^{2+} en el daño excitotóxico y neurodegenerativo.

7. El metabolito de la aspirina, salicilato, y otros AINEs, despolarizan parcialmente la mitocondria e inhiben la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y la muerte neuronal inducida por el NMDA y por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$. Este mecanismo podría explicar el efecto neuroprotector de los AINEs en la pérdida cognitiva asociada al envejecimiento, el accidente cerebrovascular y la Enfermedad de Alzheimer.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adrain, C. and S. J. Martin (2001). "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome *c*." Trends Biochem Sci **26**(6): 390-397.

Ahuja, M. and S. Muallem (2014). "The gatekeepers of mitochondrial calcium influx: MICU1 and MICU2." EMBO Rep **15**(3): 205-206.

Aisen, P. S., K. A. Schafer, M. Grundman, E. Pfeiffer, M. Sano, K. L. Davis, M. R. Farlow, S. Jin, R. G. Thomas, L. J. Thal and S. Alzheimer's Disease Cooperative (2003). "Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial." JAMA **289**(21): 2819-2826.

Aisen, P. S., J. Schmeidler and G. M. Pasinetti (2002). "Randomized pilot study of nimesulide treatment in Alzheimer's disease." Neurology **58**(7): 1050-1054.

Alvarez, J. and M. Montero (2002). "Measuring [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum with aequorin." Cell Calcium **32**(5-6): 251-260.

Allen, D. G., J. R. Blinks and F. G. Prendergast (1977). "Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration—a calcium-independent component." Science **195**(4282): 996-998.

Allen, J. W., B. A. Eldadah and A. I. Faden (1999). "Beta-amyloid-induced apoptosis of cerebellar granule cells and cortical neurons: exacerbation by selective inhibition of group I metabotropic glutamate receptors." Neuropharmacology **38**(8): 1243-1252.

Amatniek, J. C., W. A. Hauser, C. DelCastillo-Castaneda, D. M. Jacobs, K. Marder, K. Bell, M. Albert, J. Brandt and Y. Stern (2006). "Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease." Epilepsia **47**(5): 867-872.

Andersen, J. K. (2004). "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?" Nat Med **10 Suppl**: S18-25.

Arispe, N., E. Rojas and H. B. Pollard (1993). "Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 567-571.

Arora, K., N. Alfulaj, J. K. Higa, J. Panee and R. A. Nichols (2013). "Impact of sustained exposure to beta-amyloid on calcium homeostasis and neuronal integrity in model nerve cell system expressing alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors." J Biol Chem **288**(16): 11175-11190.

Arundine, M. and M. Tymianski (2003). "Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity." Cell Calcium **34**(4-5): 325-337.

Arundine, M. and M. Tymianski (2004). "Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury." Cell Mol Life Sci **61**(6): 657-668.

Asanuma, M., S. Nishibayashi-Asanuma, I. Miyazaki, M. Kohno and N. Ogawa (2001). "Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals." J Neurochem **76**(6): 1895-1904.

Auld, D. S., S. Kar and R. Quirion (1998). "Beta-amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link?" Trends Neurosci **21**(1): 43-49.

Avramovich, Y., T. Amit and M. B. Youdim (2002). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs stimulate secretion of non-amyloidogenic precursor protein." J Biol Chem **277**(35): 31466-31473.

Baba, A., T. Yasui, S. Fujisawa, R. X. Yamada, M. K. Yamada, N. Nishiyama, N. Matsuki and Y. Ikegaya (2003). "Activity-evoked capacitative Ca²⁺ entry: implications in synaptic plasticity." J Neurosci **23**(21): 7737-7741.

Badminton, M. N., A. K. Campbell and C. M. Rembold (1996). "Differential regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺ in HeLa cells." J Biol Chem **271**(49): 31210-31214.

Baines, C. P., R. A. Kaiser, N. H. Purcell, N. S. Blair, H. Osinska, M. A. Hambleton, E. W. Brunskill, M. R. Sayen, R. A. Gottlieb, G. W. Dorn, J. Robbins and J. D. Molkentin (2005). "Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death." Nature **434**(7033): 658-662.

Banker, G. A. and W. M. Cowan (1977). "Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture." Brain Res **126**(3): 397-342.

Barish, M. E. and N. B. Mansdorf (1991). "Development of intracellular calcium responses to depolarization and to kainate and N-methyl-D-aspartate in cultured mouse hippocampal neurons." Brain Res Dev Brain Res **63**(1-2): 53-61.

Basarsky, T. A., V. Papura and P. G. Haydon (1994). "Hippocampal synaptogenesis in cell culture: developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution." J Neurosci **14**(11 Pt 1): 6402-6411.

- Baughman, J. M., F. Perocchi, H. S. Girgis, M. Plovanich, C. A. Belcher-Timme, Y. Sancak, X. R. Bao, L. Strittmatter, O. Goldberger, R. L. Bogorad, V. Kotliansky and V. K. Mootha (2011). "Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter." Nature **476**(7360): 341-345.
- Beeler, T. J., I. Jona and A. Martonosi (1979). "The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes." J Biol Chem **254**(14): 6229-6231.
- Bereiter-Hahn, J. (2014). "Do we age because we have mitochondria?" Protoplasma **251**(1): 3-23.
- Berna-Erro, A., A. Braun, R. Kraft, C. Kleinschnitz, M. K. Schuhmann, D. Stegner, T. Wultsch, J. Eilers, S. G. Meuth, G. Stoll and B. Nieswandt (2009). "STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death." Sci Signal **2**(93): ra67.
- Bernardi, P. and S. von Stockum (2012). "The permeability transition pore as a Ca(2+) release channel: new answers to an old question." Cell Calcium **52**(1): 22-27.
- Berridge, M. J. (2010). "Calcium hypothesis of Alzheimer's disease." Pflugers Arch **459**(3): 441-449.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and H. L. Roderick (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-529.
- Bezprozvanny, I. (2009). "Calcium signaling and neurodegenerative diseases." Trends Mol Med **15**(3): 89-100.
- Bird, G. S., W. I. DeHaven, J. T. Smyth and J. W. Putney, Jr. (2008). "Methods for studying store-operated calcium entry." Methods **46**(3): 204-212.
- Blinks, J. R., F. G. Prendergast and D. G. Allen (1976). "Photoproteins as biological calcium indicators." Pharmacol Rev **28**(1): 1-93.
- Blinks, J. R., R. Rudel and S. R. Taylor (1978). "Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: detection with aequorin." J Physiol **277**: 291-323.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.

Bodhinathan, K., A. Kumar and T. C. Foster (2010). "Intracellular redox state alters NMDA receptor response during aging through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II." J Neurosci **30**(5): 1914-1924.

Bonfoco, E., D. Krainc, M. Ankarcrona, P. Nicotera and S. A. Lipton (1995). "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7162-7166.

Bowen, D. M., C. B. Smith, P. White and A. N. Davison (1976). "Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies." Brain **99**(3): 459-496.

Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-259.

Brewer, G. J., J. R. Torricelli, E. K. Evege and P. J. Price (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination." J Neurosci Res **35**(5): 567-576.

Brewer, L. D., O. Thibault, J. Staton, V. Thibault, J. T. Rogers, G. Garcia-Ramos, S. Kraner, P. W. Landfield and N. M. Porter (2007). "Increased vulnerability of hippocampal neurons with age in culture: temporal association with increases in NMDA receptor current, NR2A subunit expression and recruitment of L-type calcium channels." Brain Res **1151**: 20-31.

Brini, M. and E. Carafoli (2009). "Calcium pumps in health and disease." Physiol Rev **89**(4): 1341-1378.

Brini, M., R. Marsault, C. Bastianutto, J. Alvarez, T. Pozzan and R. Rizzuto (1995). "Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c). A critical evaluation." J Biol Chem **270**(17): 9896-9903.

Brini, M., M. Murgia, L. Pasti, D. Picard, T. Pozzan and R. Rizzuto (1993). "Nuclear Ca²⁺ concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin." EMBO J **12**(12): 4813-4819.

Broide, R. S. and F. M. Leslie (1999). "The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity." Mol Neurobiol **20**(1): 1-16.

Burdick, D., B. Soreghan, M. Kwon, J. Kosmoski, M. Knauer, A. Henschen, J. Yates, C. Cotman and C. Glabe (1992). "Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs." J Biol Chem **267**(1): 546-554.

Butterfield, D. A., J. Drake, C. Pocernich and A. Castegna (2001). "Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide." Trends Mol Med **7**(12): 548-554.

Cady, C., M. S. Evans and G. J. Brewer (2001). "Age-related differences in NMDA responses in cultured rat hippocampal neurons." Brain Res **921**(1-2): 1-11.

Cai, C., P. Lin, K. H. Cheung, N. Li, C. Levchook, Z. Pan, C. Ferrante, G. L. Boulianne, J. K. Foskett, D. Danielpour and J. Ma (2006). "The presenilin-2 loop peptide perturbs intracellular Ca²⁺ homeostasis and accelerates apoptosis." J Biol Chem **281**(24): 16649-16655.

Camello, C., R. Lomax, O. H. Petersen and A. V. Tepikin (2002). "Calcium leak from intracellular stores--the enigma of calcium signalling." Cell Calcium **32**(5-6): 355-361.

Carafoli, E. (2002). "Calcium signaling: a tale for all seasons." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1115-1122.

Carafoli, E. and M. Brini (2000). "Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport." Curr Opin Chem Biol **4**(2): 152-161.

Cardenas, C., R. A. Miller, I. Smith, T. Bui, J. Molgo, M. Muller, H. Vais, K. H. Cheung, J. Yang, I. Parker, C. B. Thompson, M. J. Birnbaum, K. R. Hallows and J. K. Foskett (2010). "Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria." Cell **142**(2): 270-283.

Caspersen, C., N. Wang, J. Yao, A. Sosunov, X. Chen, J. W. Lustbader, H. W. Xu, D. Stern, G. McKhann and S. D. Yan (2005). "Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease." FASEB J **19**(14): 2040-2041.

Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 521-555.

Catterall, W. A. and A. P. Few (2008). "Calcium channel regulation and presynaptic plasticity." Neuron **59**(6): 882-901.

Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature **426**(6966): 517-524.

Cobbold, P. H. (1980). "Cytoplasmic free calcium and amoeboid movement." Nature **285**(5765): 441-446.

Conti-Tronconi, B. M., M. W. Hunkapiller, J. M. Lindstrom and M. A. Raftery (1982). "Subunit structure of the acetylcholine receptor from *Electrophorus electricus*." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(21): 6489-6493.

Contreras, L., I. Drago, E. Zampese and T. Pozzan (2010). "Mitochondria: the calcium connection." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 607-618.

Couratier, P., M. Lesort, P. Sindou, F. Esclaire, C. Yardin and J. Hugon (1996). "Modifications of neuronal phosphorylated tau immunoreactivity induced by NMDA toxicity." Mol Chem Neuropathol **27**(3): 259-273.

Cui, Z., R. Feng, S. Jacobs, Y. Duan, H. Wang, X. Cao and J. Z. Tsien (2013). "Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory." Sci Rep **3**: 1036.

Chamero, P., C. Villalobos, M. T. Alonso and J. Garcia-Sancho (2002). "Dampening of cytosolic Ca²⁺ oscillations on propagation to nucleus." J Biol Chem **277**(52): 50226-50229.

Chan, C. S., J. N. Guzman, E. Ilijic, J. N. Mercer, C. Rick, T. Tkatch, G. E. Meredith and D. J. Surmeier (2007). "'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease." Nature **447**(7148): 1081-1086.

Chan, S. L., M. Mayne, C. P. Holden, J. D. Geiger and M. P. Mattson (2000). "Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons." J Biol Chem **275**(24): 18195-18200.

Choi, D. W. (1985). "Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent." Neurosci Lett **58**(3): 293-297.

Choi, D. W., J. Y. Koh and S. Peters (1988). "Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists." J Neurosci **8**(1): 185-196.

Choi, D. W., M. Maulucci-Gedde and A. R. Kriegstein (1987). "Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture." J Neurosci **7**(2): 357-368.

Davies, P. and A. J. Maloney (1976). "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease." Lancet **2**(8000): 1403.

de Brito, O. M. and L. Scorrano (2008). "Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria." Nature **456**(7222): 605-610.

De Felice, F. G., P. T. Velasco, M. P. Lambert, K. Viola, S. J. Fernandez, S. T. Ferreira and W. L. Klein (2007). "Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine." J Biol Chem **282**(15): 11590-11601.

De Stefani, D., A. Raffaello, E. Teardo, I. Szabo and R. Rizzuto (2011). "A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter." Nature **476**(7360): 336-340.

Demuro, A., E. Mina, R. Kayed, S. C. Milton, I. Parker and C. G. Glabe (2005). "Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers." J Biol Chem **280**(17): 17294-17300.

Demuro, A., I. Parker and G. E. Stutzmann (2010). "Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease." J Biol Chem **285**(17): 12463-12468.

Deshpande, J. K., B. K. Siesjo and T. Wieloch (1987). "Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **7**(1): 89-95.

Devi, L., B. M. Prabhu, D. F. Galati, N. G. Avadhani and H. K. Anandatheerthavarada (2006). "Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction." J Neurosci **26**(35): 9057-9068.

Di Girolamo, G., M. Farina, M. L. Riberio, D. Ogando, J. Aisemberg, A. R. de los Santos, M. L. Marti and A. M. Franchi (2003). "Effects of cyclooxygenase inhibitor pretreatment on nitric oxide production, nNOS and iNOS expression in rat cerebellum." Br J Pharmacol **139**(6): 1164-1170.

Disterhoft, J. F., J. R. Moyer, Jr. and L. T. Thompson (1994). "The calcium rationale in aging and Alzheimer's disease. Evidence from an animal model of normal aging." Ann N Y Acad Sci **747**: 382-406.

Dong, W., S. Cheng, F. Huang, W. Fan, Y. Chen, H. Shi and H. He (2011). "Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging." Med Sci Monit **17**(4): BR91-96.

Drachman, D. A. and J. Leavitt (1974). "Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging?" Arch Neurol **30**(2): 113-121.

Dreses-Werringloer, U., J. C. Lambert, V. Vingtdeux, H. Zhao, H. Vais, A. Siebert, A. Jain, J. Koppel, A. Rovelet-Lecrux, D. Hannequin, F. Pasquier, D. Galimberti, E. Scarpini, D. Mann, C. Lendon, D. Campion, P. Amouyel, P. Davies, J. K. Foskett, F. Campagne and P. Marambaud (2008). "A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk." Cell **133**(7): 1149-1161.

Du, H., L. Guo, F. Fang, D. Chen, A. A. Sosunov, G. M. McKhann, Y. Yan, C. Wang, H. Zhang, J. D. Molkenin, F. J. Gunn-Moore, J. P. Vonsattel, O. Arancio, J. X. Chen and S. D. Yan (2008). "Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease." Nat Med **14**(10): 1097-1105.

Dubinsky, J. M. and Y. Levi (1998). "Calcium-induced activation of the mitochondrial permeability transition in hippocampal neurons." J Neurosci Res **53**(6): 728-741.

Duchen, M. R. (2000). "Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death." J Physiol **529 Pt 1**: 57-68.

Eckert, A., S. Hauptmann, I. Scherping, V. Rhein, F. Muller-Spahn, J. Gotz and W. E. Muller (2008). "Soluble beta-amyloid leads to mitochondrial defects in amyloid precursor protein and tau transgenic mice." Neurodegener Dis **5**(3-4): 157-159.

Etcheberrigaray, R., N. Hirashima, L. Nee, J. Prince, S. Govoni, M. Racchi, R. E. Tanzi and D. L. Alkon (1998). "Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families." Neurobiol Dis **5**(1): 37-45.

Etminan, M., S. Gill and A. Samii (2003). "Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies." BMJ **327**(7407): 128.

Fa, M., I. J. Orozco, Y. I. Francis, F. Saeed, Y. Gong and O. Arancio (2010). "Preparation of oligomeric beta-amyloid 1-42 and induction of synaptic plasticity impairment on hippocampal slices." J Vis Exp(41).

Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S. H. Puppel, B. Tanasa, P. G. Hogan, R. S. Lewis, M. Daly and A. Rao (2006). "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." Nature **441**(7090): 179-185.

Floyd, R. A. and J. M. Carney (1992). "Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress." Ann Neurol **32 Suppl**: S22-27.

Foskett, J. K., C. White, K. H. Cheung and D. O. Mak (2007). "Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels." Physiol Rev **87**(2): 593-658.

Foster, T. C. (2007). "Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain." Aging Cell **6**(3): 319-325.

Frandsen, A. and A. Schousboe (1991). "Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and Ca²⁺ release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons." J Neurochem **56**(3): 1075-1078.

Furukawa, H., S. K. Singh, R. Mancusso and E. Gouaux (2005). "Subunit arrangement and function in NMDA receptors." Nature **438**(7065): 185-192.

Gallagher, M., P. W. Landfield, B. McEwen, M. J. Meaney, P. R. Rapp, R. Sapolsky and M. J. West (1996). "Hippocampal neurodegeneration in aging." Science **274**(5287): 484-485.

Gibson, G. E. and C. Peterson (1987). "Calcium and the aging nervous system." Neurobiol Aging **8**(4): 329-343.

Gibson, G. E., K. F. Sheu and J. P. Blass (1998). "Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease." J Neural Transm **105**(8-9): 855-870.

Gibson, G. E., H. Zhang, L. Toral-Barza, S. Szolosi and B. Tofel-Grehl (1996). "Calcium stores in cultured fibroblasts and their changes with Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1316**(2): 71-77.

Goldberg, M. P. and D. W. Choi (1993). "Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury." J Neurosci **13**(8): 3510-3524.

Gray, D. A. and J. Woulfe (2005). "Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste." Sci Aging Knowledge Environ **2005**(5): re1.

Green, K. N., A. Demuro, Y. Akbari, B. D. Hitt, I. F. Smith, I. Parker and F. M. LaFerla (2008). "SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production." J Cell Biol **181**(7): 1107-1116.

Green, K. N., I. F. Smith and F. M. Laferla (2007). "Role of calcium in the pathogenesis of Alzheimer's disease and transgenic models." Subcell Biochem **45**: 507-521.

Green, R. C., L. S. Schneider, D. A. Amato, A. P. Beelen, G. Wilcock, E. A. Swabb, K. H. Zavitz and G. Tarenflur bil Phase 3 Study (2009). "Effect of tarenflur bil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial." JAMA **302**(23): 2557-2564.

Greenamyre, J. T., W. F. Maragos, R. L. Albin, J. B. Penney and A. B. Young (1988). "Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **12**(4): 421-430.

Grilli, M., M. Pizzi, M. Memo and P. Spano (1996). "Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation." Science **274**(5291): 1383-1385.

Grynkiewicz, G., M. Poenie and R. Y. Tsien (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.

Guevara, R., M. Gianotti, P. Roca and J. Oliver (2011). "Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial function." Cell Physiol Biochem **27**(3-4): 201-206.

Gunter, K. K. and T. E. Gunter (1994). "Transport of calcium by mitochondria." J Bioenerg Biomembr **26**(5): 471-485.

Guo, Q., K. Furukawa, B. L. Sopher, D. G. Pham, J. Xie, N. Robinson, G. M. Martin and M. P. Mattson (1996). "Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide." Neuroreport **8**(1): 379-383.

Hagen, T. M., D. L. Yowe, J. C. Bartholomew, C. M. Wehr, K. L. Do, J. Y. Park and B. N. Ames (1997). "Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3064-3069.

Hajjeva, P., C. Kuhlmann, H. J. Luhmann and C. Behl (2009). "Impaired calcium homeostasis in aged hippocampal neurons." Neurosci Lett **451**(2): 119-123.

Hardingham, G. E. and H. Bading (2010). "Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders." Nat Rev Neurosci **11**(10): 682-696.

Hardingham, G. E., Y. Fukunaga and H. Bading (2002). "Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways." Nat Neurosci **5**(5): 405-414.

Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-356.

He, L. and J. J. Lemasters (2002). "Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function?" FEBS Lett **512**(1-3): 1-7.

Henrich, M. and K. J. Buckler (2008). "Effects of anoxia and aglycemia on cytosolic calcium regulation in rat sensory neurons." J Neurophysiol **100**(1): 456-473.

Hensley, K., J. M. Carney, M. P. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J. F. Wu, R. A. Floyd and D. A. Butterfield (1994). "A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3270-3274.

Hertle, D. N. and M. F. Yeckel (2007). "Distribution of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor isotypes and ryanodine receptor isotypes during maturation of the rat hippocampus." Neuroscience **150**(3): 625-638.

Ho, L., D. Purohit, V. Haroutunian, J. D. Luteran, F. Willis, J. Naslund, J. D. Buxbaum, R. C. Mohs, P. S. Aisen and G. M. Pasinetti (2001). "Neuronal cyclooxygenase 2 expression in the hippocampal formation as a function of the clinical progression of Alzheimer disease." Arch Neurol **58**(3): 487-492.

Hollenbeck, P. J. and W. M. Saxton (2005). "The axonal transport of mitochondria." J Cell Sci **118**(Pt 23): 5411-5419.

Hoozemans, J. J., R. Veerhuis, A. J. Rozemuller and P. Eikelenboom (2003). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase in Alzheimer's disease." Curr Drug Targets **4**(6): 461-468.

Huang, H. M., H. C. Ou and S. J. Hsieh (2000). "Antioxidants prevent amyloid peptide-induced apoptosis and alteration of calcium homeostasis in cultured cortical neurons." Life Sci **66**(19): 1879-1892.

Hung, C. H., Y. S. Ho and R. C. Chang (2010). "Modulation of mitochondrial calcium as a pharmacological target for Alzheimer's disease." Ageing Res Rev **9**(4): 447-456.

Irving, A. J. and G. L. Collingridge (1998). "A characterization of muscarinic receptor-mediated intracellular Ca²⁺ mobilization in cultured rat hippocampal neurones." J Physiol **511 (Pt 3)**: 747-759.

Itkin, A., V. Dupres, Y. F. Dufrene, B. Bechinger, J. M. Ruyschaert and V. Raussens (2011). "Calcium ions promote formation of amyloid beta-peptide (1-40) oligomers causally implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease." PLoS One **6**(3): e18250.

Jaffe, D. B., W. N. Ross, J. E. Lisman, N. Lasser-Ross, H. Miyakawa and D. Johnston (1994). "A model for dendritic Ca²⁺ accumulation in hippocampal pyramidal neurons based on fluorescence imaging measurements." J Neurophysiol **71**(3): 1065-1077.

Jones, C. K., N. Byun and M. Bubser (2012). "Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists and allosteric modulators for the treatment of schizophrenia." Neuropsychopharmacology **37**(1): 16-42.

Kaech, S. and G. Banker (2006). "Culturing hippocampal neurons." Nat Protoc **1**(5): 2406-2415.

Kaether, C. and C. Haass (2004). "A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation." J Cell Biol **167**(5): 809-812.

Kayed, R., E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman and C. G. Glabe (2003). "Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis." Science **300**(5618): 486-489.

Kendall, J. M., G. Sala-Newby, V. Ghalaut, R. L. Dormer and A. K. Campbell (1992). "Engineering aequorin to measure Ca²⁺ in defined compartments of living cells." Biochem Soc Trans **20**(2): 144S.

Kern, S., I. Skoog, S. Ostling, J. Kern and A. Borjesson-Hanson (2012). "Does low-dose acetylsalicylic acid prevent cognitive decline in women with high cardiovascular risk? A 5-year follow-up of a non-demented population-based cohort of Swedish elderly women." BMJ Open **2**(5).

Khachaturian, Z. S. (1987). "Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain." Neurobiol Aging **8**(4): 345-346.

Khachaturian, Z. S. (1989). "The role of calcium regulation in brain aging: reexamination of a hypothesis." Aging (Milano) **1**(1): 17-34.

Kirischuk, S. and A. Verkhratsky (1996). "Calcium homeostasis in aged neurones." Life Sci **59**(5-6): 451-459.

Kishimoto, J., T. Tsuchiya, H. Cox, P. C. Emson and Y. Nakayama (1998). "Age-related changes of calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin mRNAs in the hamster brain." Neurobiol Aging **19**(1): 77-82.

Klein, W. L. (2002). "Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets." Neurochem Int **41**(5): 345-352.

Klein, W. L., W. B. Stine, Jr. and D. B. Teplow (2004). "Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **25**(5): 569-580.

Korde, A. S., L. C. Pettigrew, S. D. Craddock and W. F. Maragos (2005). "The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia." J Neurochem **94**(6): 1676-1684.

Kretsinger, R. H. (1980). "Crystallographic studies of calmodulin and homologs." Ann N Y Acad Sci **356**: 14-19.

Kruman, II and M. P. Mattson (1999). "Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis." J Neurochem **72**(2): 529-540.

Kuchibhotla, K. V., S. T. Goldman, C. R. Lattarulo, H. Y. Wu, B. T. Hyman and B. J. Bacskai (2008). "Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks." Neuron **59**(2): 214-225.

Kumar, A., K. Bodhinathan and T. C. Foster (2009). "Susceptibility to Calcium Dysregulation during Brain Aging." Front Aging Neurosci **1**: 2.

Kumar, S., N. Rezaei-Ghaleh, D. Terwel, D. R. Thal, M. Richard, M. Hoch, J. M. McDonald, U. Wullner, K. Glebov, M. T. Heneka, D. M. Walsh, M. Zweckstetter and J.

Walter (2011). "Extracellular phosphorylation of the amyloid beta-peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease." EMBO J **30**(11): 2255-2265.

Kuroda, Y., K. Kobayashi, M. Ichikawa, M. Kawahara and K. Muramoto (1995). "Application of long-term cultured neurons in aging and neurological research: aluminum neurotoxicity, synaptic degeneration and Alzheimer's disease." Gerontology **41 Suppl 1**: 2-6.

LaFerla, F. M. (2002). "Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **3**(11): 862-872.

LaFerla, F. M., K. N. Green and S. Oddo (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **8**(7): 499-509.

Lanner, J. T. (2012). "Ryanodine receptor physiology and its role in disease." Adv Exp Med Biol **740**: 217-234.

Lauren, J., D. A. Gimbel, H. B. Nygaard, J. W. Gilbert and S. M. Strittmatter (2009). "Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers." Nature **457**(7233): 1128-1132.

Lazarov, O., M. Lee, D. A. Peterson and S. S. Sisodia (2002). "Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice." J Neurosci **22**(22): 9785-9793.

Lehohla, M., L. Kellaway and V. A. Russell (2008). "Effect of ageing on Ca²⁺ uptake via NMDA receptors into barrel cortex slices of spontaneously hypertensive rats." Metab Brain Dis **23**(1): 1-8.

Leinekugel, X., I. Medina, I. Khalilov, Y. Ben-Ari and R. Khazipov (1997). "Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus." Neuron **18**(2): 243-255.

Leissring, M. A., B. A. Paul, I. Parker, C. W. Cotman and F. M. LaFerla (1999). "Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling in *Xenopus oocytes*." J Neurochem **72**(3): 1061-1068.

Li, G., E. B. Larson, J. A. Sonnen, J. B. Shofer, E. C. Petrie, A. Schantz, E. R. Peskind, M. A. Raskind, J. C. Breitner and T. J. Montine (2007). "Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease." Neurology **69**(9): 878-885.

Li, S., M. Mallory, M. Alford, S. Tanaka and E. Masliah (1997). "Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression." J Neuropathol Exp Neurol **56**(8): 901-911.

Lin, T. Y., C. W. Lu, C. C. Wang, S. K. Huang and S. J. Wang (2014). "Cyclooxygenase 2 inhibitor celecoxib inhibits glutamate release by attenuating the PGE2/EP2 pathway in rat cerebral cortex endings." J Pharmacol Exp Ther **351**(1): 134-145.

Lipton, S. A. (1993). "Molecular mechanisms of trauma-induced neuronal degeneration." Curr Opin Neurol Neurosurg **6**(4): 588-596.

Lipton, S. A. (2005). Excitotoxicity. Neuroprotection, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 291-313.

Lipton, S. A. and P. A. Rosenberg (1994). "Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders." N Engl J Med **330**(9): 613-622.

Liu, Y., T. P. Wong, M. Aarts, A. Rooyackers, L. Liu, T. W. Lai, D. C. Wu, J. Lu, M. Tymianski, A. M. Craig and Y. T. Wang (2007). "NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo." J Neurosci **27**(11): 2846-2857.

Liu, Z., C. E. Stafstrom, M. Sarkisian, P. Tandon, Y. Yang, A. Hori and G. L. Holmes (1996). "Age-dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus." Brain Res Dev Brain Res **97**(2): 178-184.

Lucas, D. R. and J. P. Newhouse (1957). "The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina." AMA Arch Ophthalmol **58**(2): 193-201.

Lustbader, J. W., M. Cirilli, C. Lin, H. W. Xu, K. Takuma, N. Wang, C. Caspersen, X. Chen, S. Pollak, M. Chaney, F. Trinchese, S. Liu, F. Gunn-Moore, L. F. Lue, D. G. Walker, P. Kuppasamy, Z. L. Zewier, O. Arancio, D. Stern, S. S. Yan and H. Wu (2004). "ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease." Science **304**(5669): 448-452.

MacDermott, A. B., M. L. Mayer, G. L. Westbrook, S. J. Smith and J. L. Barker (1986). "NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones." Nature **321**(6069): 519-522.

Madathil, S. K., S. S. Karuppagounder and K. P. Mohanakumar (2013). "Sodium salicylate protects against rotenone-induced parkinsonism in rats." Synapse **67**(8): 502-514.

Magnusson, K. R. (1998). "The aging of the NMDA receptor complex." Front Biosci **3**: e70-80.

Majewski, L. and J. Kuznicki (2015). "SOCE in neurons: Signaling or just refilling?" Biochim Biophys Acta.

Mantyh, P. W., J. R. Ghilardi, S. Rogers, E. DeMaster, C. J. Allen, E. R. Stimson and J. E. Maggio (1993). "Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide." J Neurochem **61**(3): 1171-1174.

Mark, R. J., K. Hensley, D. A. Butterfield and M. P. Mattson (1995). "Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death." J Neurosci **15**(9): 6239-6249.

Mark, R. J., Z. Pang, J. W. Geddes, K. Uchida and M. P. Mattson (1997). "Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation." J Neurosci **17**(3): 1046-1054.

Martin, M. G., L. Trovo, S. Perga, A. Sadowska, A. Rasola, F. Chiara and C. G. Dotti (2011). "Cyp46-mediated cholesterol loss promotes survival in stressed hippocampal neurons." Neurobiol Aging **32**(5): 933-943.

Matsumoto, K., Y. Akao, H. Yi, M. Shamoto-Nagai, W. Maruyama and M. Naoi (2006). "Overexpression of amyloid precursor protein induces susceptibility to oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." J Neural Transm **113**(2): 125-135.

Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." Physiol Rev **77**(4): 1081-1132.

Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature **430**(7000): 631-639.

Mattson, M. P. (2007). "Calcium and neurodegeneration." Aging Cell **6**(3): 337-350.

Mattson, M. P. and S. L. Chan (2003). "Calcium orchestrates apoptosis." Nat Cell Biol **5**(12): 1041-1043.

- Mattson, M. P. and S. L. Chan (2003). "Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease." Cell Calcium **34**(4-5): 385-397.
- Mattson, M. P., B. Cheng, D. Davis, K. Bryant, I. Lieberburg and R. E. Rydel (1992). "beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity." J Neurosci **12**(2): 376-389.
- Mattson, M. P., R. E. Rydel, I. Lieberburg and V. L. Smith-Swintosky (1993). "Altered calcium signaling and neuronal injury: stroke and Alzheimer's disease as examples." Ann N Y Acad Sci **679**: 1-21.
- Mattson, M. P., H. Zhu, J. Yu and M. S. Kindy (2000). "Presenilin-1 mutation increases neuronal vulnerability to focal ischemia in vivo and to hypoxia and glucose deprivation in cell culture: involvement of perturbed calcium homeostasis." J Neurosci **20**(4): 1358-1364.
- Mayer, B. and R. Oberbauer (2003). "Mitochondrial regulation of apoptosis." News Physiol Sci **18**: 89-94.
- Mayeux, R. (2003). "Epidemiology of neurodegeneration." Annu Rev Neurosci **26**: 81-104.
- Mazumder, M. K. and A. Borah (2014). "Piroxicam inhibits NMDA receptor-mediated excitotoxicity through allosteric inhibition of the GluN2B subunit: an in silico study elucidating a novel mechanism of action of the drug." Med Hypotheses **83**(6): 740-746.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2002). "Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease." J Neurovirol **8**(6): 529-538.
- Mehta, A., M. Prabhakar, P. Kumar, R. Deshmukh and P. L. Sharma (2013). "Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders." Eur J Pharmacol **698**(1-3): 6-18.
- Michaelis, M. L., D. J. Bigelow, C. Schoneich, T. D. Williams, L. Ramonda, D. Yin, A. F. Huhmer, Y. Yao, J. Gao and T. C. Squier (1996). "Decreased plasma membrane calcium transport activity in aging brain." Life Sci **59**(5-6): 405-412.
- Michalak, M., J. Groenendyk, E. Szabo, L. I. Gold and M. Opas (2009). "Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum." Biochem J **417**(3): 651-666.

Mintz, I. M., M. E. Adams and B. P. Bean (1992). "P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons." Neuron **9**(1): 85-95.

Miyakawa, H., W. N. Ross, D. Jaffe, J. C. Callaway, N. Lasser-Ross, J. E. Lisman and D. Johnston (1992). "Synaptically activated increases in Ca²⁺ concentration in hippocampal CA1 pyramidal cells are primarily due to voltage-gated Ca²⁺ channels." Neuron **9**(6): 1163-1173.

Montero, M., M. T. Alonso, E. Carnicero, I. Cuchillo-Ibanez, A. Albillos, A. G. Garcia, J. Garcia-Sancho and J. Alvarez (2000). "Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion." Nat Cell Biol **2**(2): 57-61.

Montero, M., M. Brini, R. Marsault, J. Alvarez, R. Sitia, T. Pozzan and R. Rizzuto (1995). "Monitoring dynamic changes in free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells." EMBO J **14**(22): 5467-5475.

Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann and P. H. Seeburg (1992). "Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes." Science **256**(5060): 1217-1221.

Moran, M. M., H. Xu and D. E. Clapham (2004). "TRP ion channels in the nervous system." Curr Opin Neurobiol **14**(3): 362-369.

Morikawa, E., H. Mori, Y. Kiyama, M. Mishina, T. Asano and T. Kirino (1998). "Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the epsilon1 (NR2A) subunit of NMDA receptor." J Neurosci **18**(23): 9727-9732.

Murphy, T. H. and J. M. Baraban (1990). "Glutamate toxicity in immature cortical neurons precedes development of glutamate receptor currents." Brain Res Dev Brain Res **57**(1): 146-150.

Murray, F. E., J. P. Landsberg, R. J. Williams, M. M. Esiri and F. Watt (1992). "Elemental analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease using proton-induced X-ray analysis." Ciba Found Symp **169**: 201-210; discussion 210-206.

Nathalie, P. and O. Jean-Noel (2008). "Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity." Curr Alzheimer Res **5**(2): 92-99.

Navarro, A. (2004). "Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging." Mol Aspects Med **25**(1-2): 37-48.

- Nelson, O., H. Tu, T. Lei, M. Bentahir, B. de Strooper and I. Bezprozvanny (2007). "Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1." J Clin Invest **117**(5): 1230-1239.
- Nicholson, A. M. and A. Ferreira (2009). "Increased membrane cholesterol might render mature hippocampal neurons more susceptible to beta-amyloid-induced calpain activation and tau toxicity." J Neurosci **29**(14): 4640-4651.
- Nicholls, D. G. (2008). "Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction." Ann N Y Acad Sci **1147**: 53-60.
- Núñez, L., A. Sanchez, R. I. Fonteriz and J. Garcia-Sancho (1996). "Mechanisms for synchronous calcium oscillations in cultured rat cerebellar neurons." Eur J Neurosci **8**(1): 192-201.
- Núñez, L., L. Senovilla, S. Sanz-Blasco, P. Chamero, M. T. Alonso, C. Villalobos and J. Garcia-Sancho (2007). "Bioluminescence imaging of mitochondrial Ca²⁺ dynamics in soma and neurites of individual adult mouse sympathetic neurons." J Physiol **580**(Pt. 2): 385-395.
- Núñez, L., R. A. Valero, L. Senovilla, S. Sanz-Blasco, J. Garcia-Sancho and C. Villalobos (2006). "Cell proliferation depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake: inhibition by salicylate." J Physiol **571**(Pt 1): 57-73.
- Olivera, B. M., G. P. Miljanich, J. Ramachandran and M. E. Adams (1994). "Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins." Annu Rev Biochem **63**: 823-867.
- Olney, J. W. (1969). "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate." Science **164**(3880): 719-721.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky and P. Nicotera (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 552-565.
- Ozawa, S., T. Nakamura and M. Yuzaki (1988). "Cation permeability change caused by L-glutamate in cultured rat hippocampal neurons." Brain Res **443**(1-2): 85-94.
- Palmer, G. C. (2001). "Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies." Curr Drug Targets **2**(3): 241-271.

Palty, R., W. F. Silverman, M. Hershfinkel, T. Caporale, S. L. Sensi, J. Parnis, C. Nolte, D. Fishman, V. Shoshan-Barmatz, S. Herrmann, D. Khananshvili and I. Sekler (2010). "NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 436-441.

Parekh, A. B. and J. W. Putney, Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." Physiol Rev **85**(2): 757-810.

Pearson, H. A. and C. Peers (2006). "Physiological roles for amyloid beta peptides." J Physiol **575**(Pt 1): 5-10.

Peng, T. I. and J. T. Greenamyre (1998). "Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors." Mol Pharmacol **53**(6): 974-980.

Perez-Otano, I., R. Lujan, S. J. Tavalin, M. Plomann, J. Modregger, X. B. Liu, E. G. Jones, S. F. Heinemann, D. C. Lo and M. D. Ehlers (2006). "Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1." Nat Neurosci **9**(5): 611-621.

Perocchi, F., V. M. Gohil, H. S. Girgis, X. R. Bao, J. E. McCombs, A. E. Palmer and V. K. Mootha (2010). "MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake." Nature **467**(7313): 291-296.

Peterson, C., J. H. Neal and C. W. Cotman (1989). "Development of N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons." Brain Res Dev Brain Res **48**(2): 187-195.

Petralia, R. S., Y. X. Wang, F. Hua, Z. Yi, A. Zhou, L. Ge, F. A. Stephenson and R. J. Wenthold (2010). "Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations." Neuroscience **167**(1): 68-87.

Petronilli, V., G. Miotto, M. Canton, R. Colonna, P. Bernardi and F. Di Lisa (1998). "Imaging the mitochondrial permeability transition pore in intact cells." Biofactors **8**(3-4): 263-272.

Petrosillo, G., F. M. Ruggiero, M. Pistolese and G. Paradies (2004). "Ca²⁺-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin." J Biol Chem **279**(51): 53103-53108.

Pinton, P., D. Ferrari, E. Rapizzi, F. Di Virgilio, T. Pozzan and R. Rizzuto (2001). "The Ca^{2+} concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action." EMBO J **20**(11): 2690-2701.

Plovanich, M., R. L. Bogorad, Y. Sancak, K. J. Kamer, L. Strittmatter, A. A. Li, H. S. Girgis, S. Kuchimanchi, J. De Groot, L. Speciner, N. Taneja, J. Oshea, V. Koteliansky and V. K. Mootha (2013). "MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling." PLoS One **8**(2): e55785.

Porter, A. C., F. P. Bymaster, N. W. DeLapp, M. Yamada, J. Wess, S. E. Hamilton, N. M. Nathanson and C. C. Felder (2002). "M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex." Brain Res **944**(1-2): 82-89.

Porter, N. M., O. Thibault, V. Thibault, K. C. Chen and P. W. Landfield (1997). "Calcium channel density and hippocampal cell death with age in long-term culture." J Neurosci **17**(14): 5629-5639.

Pottorf, W. J., S. P. Duckles and J. N. Buchholz (2000). "SERCA function declines with age in adrenergic nerves from the superior cervical ganglion." J Auton Pharmacol **20**(5-6): 281-290.

Putney, J. W., Jr. (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." Cell Calcium **7**(1): 1-12.

Qiu, J., Y. W. Tan, A. M. Hagenston, M. A. Martel, N. Kneisel, P. A. Skehel, D. J. Wyllie, H. Bading and G. E. Hardingham (2013). "Mitochondrial calcium uniporter Mcu controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals." Nat Commun **4**: 2034.

Raina, M. and M. Ibba (2014). "tRNAs as regulators of biological processes." Front Genet **5**: 171.

Rasola, A. and P. Bernardi (2011). "Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis." Cell Calcium **50**(3): 222-233.

Riascos, D., D. de Leon, A. Baker-Nigh, A. Nicholas, R. Yukhananov, J. Bu, C. K. Wu and C. Geula (2011). "Age-related loss of calcium buffering and selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **122**(5): 565-576.

Ridgway, E. B. and C. C. Ashley (1967). "Calcium transients in single muscle fibers." Biochem Biophys Res Commun **29**(2): 229-234.

Ritchie, C. W., A. I. Bush, A. Mackinnon, S. Macfarlane, M. Mastwyk, L. MacGregor, L. Kiers, R. Cherny, Q. X. Li, A. Tammer, D. Carrington, C. Mavros, I. Volitakis, M. Xilinas, D. Ames, S. Davis, K. Beyreuther, R. E. Tanzi and C. L. Masters (2003). "Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial." Arch Neurol **60**(12): 1685-1691.

Rizzuto, R., M. Brini, M. Murgia and T. Pozzan (1993). "Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria." Science **262**(5134): 744-747.

Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F. S. Fay, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft and T. Pozzan (1998). "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses." Science **280**(5370): 1763-1766.

Rizzuto, R. and T. Pozzan (2006). "Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences." Physiol Rev **86**(1): 369-408.

Rizzuto, R., A. W. Simpson, M. Brini and T. Pozzan (1992). "Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin." Nature **358**(6384): 325-327.

Rogaeva, E., Y. Meng, J. H. Lee, Y. Gu, T. Kawarai, F. Zou, T. Katayama, C. T. Baldwin, R. Cheng, H. Hasegawa, F. Chen, N. Shibata, K. L. Lunetta, R. Pardossi-Piquard, C. Bohm, Y. Wakutani, L. A. Cupples, K. T. Cuenco, R. C. Green, L. Pinessi, I. Rainero, S. Sorbi, A. Bruni, R. Duara, R. P. Friedland, R. Inzelberg, W. Hampe, H. Bujo, Y. Q. Song, O. M. Andersen, T. E. Willnow, N. Graff-Radford, R. C. Petersen, D. Dickson, S. D. Der, P. E. Fraser, G. Schmitt-Ulms, S. Younkin, R. Mayeux, L. A. Farrer and P. St George-Hyslop (2007). "The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease." Nat Genet **39**(2): 168-177.

Rogers, K. L., J. Stinnakre, C. Agulhon, D. Jublot, S. L. Shorte, E. J. Kremer and P. Brulet (2005). "Visualization of local Ca²⁺ dynamics with genetically encoded bioluminescent reporters." Eur J Neurosci **21**(3): 597-610.

Roses, A. D. (1997). "A model for susceptibility polymorphisms for complex diseases: apolipoprotein E and Alzheimer disease." Neurogenetics **1**(1): 3-11.

Rowland, A. A. and G. K. Voeltz (2012). "Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(10): 607-625.

Ruknudin, A. M. and E. G. Lakatta (2007). "The regulation of the Na/Ca exchanger and plasmalemmal Ca²⁺ ATPase by other proteins." Ann N Y Acad Sci **1099**: 86-102.

Sancak, Y., A. L. Markhard, T. Kitami, E. Kovacs-Bogdan, K. J. Kamer, N. D. Udeshi, S. A. Carr, D. Chaudhuri, D. E. Clapham, A. A. Li, S. E. Calvo, O. Goldberger and V. K. Mootha (2013). "EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex." Science **342**(6164): 1379-1382.

Sanz-Blasco, S., R. A. Valero, I. Rodriguez-Crespo, C. Villalobos and L. Nuñez (2008). "Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs." PLoS One **3**(7): e2718.

Sastre, M., I. Dewachter, G. E. Landreth, T. M. Willson, T. Klockgether, F. van Leuven and M. T. Heneka (2003). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase." J Neurosci **23**(30): 9796-9804.

Sattler, R. and M. Tymianski (2001). "Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death." Mol Neurobiol **24**(1-3): 107-129.

Schmidt, B., S. Baumann, H. A. Braun and G. Larbig (2006). "Inhibitors and modulators of beta- and gamma-secretase." Curr Top Med Chem **6**(4): 377-392.

Seguela, P., J. Wadiche, K. Dineley-Miller, J. A. Dani and J. W. Patrick (1993). "Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium." J Neurosci **13**(2): 596-604.

Shalbuyeva, N., T. Brustovetsky, A. Bolshakov and N. Brustovetsky (2006). "Calcium-dependent spontaneously reversible remodeling of brain mitochondria." J Biol Chem **281**(49): 37547-37558.

Shimomura, O. (1995). "Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions." Biochem Biophys Res Commun **211**(2): 359-363.

Shimomura, O., F. H. Johnson and Y. Saiga (1962). "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea." J Cell Comp Physiol **59**: 223-239.

Shimomura, O., Y. Kishi and S. Inouye (1993). "The relative rate of aequorin regeneration from apoaequorin and coelenterazine analogues." Biochem J **296** (Pt 3): 549-551.

Shimomura, O., B. Musicki, Y. Kishi and S. Inouye (1993). "Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium." Cell Calcium **14**(5): 373-378.

Simakova, O. and N. J. Arispe (2006). "Early and late cytotoxic effects of external application of the Alzheimer's Abeta result from the initial formation and function of Abeta ion channels." Biochemistry **45**(18): 5907-5915.

Smith, M. A., G. Perry, P. L. Richey, L. M. Sayre, V. E. Anderson, M. F. Beal and N. Kowall (1996). "Oxidative damage in Alzheimer's." Nature **382**(6587): 120-121.

Sobradillo, D., M. Hernandez-Morales, D. Ubierna, M. P. Moyer, L. Nuñez and C. Villalobos (2014). "A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca²⁺ remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells." J Biol Chem **289**(42): 28765-28782.

Sodero, A. O., C. Weissmann, M. D. Ledesma and C. G. Dotti (2011). "Cellular stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons aging in vitro." Neurobiol Aging **32**(6): 1043-1053.

Solomon, B., R. Koppel, E. Hanan and T. Katzav (1996). "Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 452-455.

Sonsalla, P. K., D. E. Riordan and R. E. Heikkila (1991). "Competitive and noncompetitive antagonists at N-methyl-D-aspartate receptors protect against methamphetamine-induced dopaminergic damage in mice." J Pharmacol Exp Ther **256**(2): 506-512.

Stanika, R. I., I. Villanueva, G. Kazanina, S. B. Andrews and N. B. Pivovarova (2012). "Comparative impact of voltage-gated calcium channels and NMDA receptors on mitochondria-mediated neuronal injury." J Neurosci **32**(19): 6642-6650.

Starkov, A. A. and F. M. Beal (2008). "Portal to Alzheimer's disease." Nat Med **14**(10): 1020-1021.

- Stathopoulos, P. B., L. Zheng, G. Y. Li, M. J. Plevin and M. Ikura (2008). "Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry." Cell **135**(1): 110-122.
- Stout, A. K., H. M. Raphael, B. I. Kanterewicz, E. Klann and I. J. Reynolds (1998). "Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake." Nat Neurosci **1**(5): 366-373.
- Stutzmann, G. E. (2005). "Calcium dysregulation, IP3 signaling, and Alzheimer's disease." Neuroscientist **11**(2): 110-115.
- Stutzmann, G. E. and M. P. Mattson (2011). "Endoplasmic reticulum Ca(2+) handling in excitable cells in health and disease." Pharmacol Rev **63**(3): 700-727.
- Sun, L., F. L. Margolis, M. T. Shipley and M. S. Lidow (1998). "Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain." FEBS Lett **441**(3): 392-396.
- Sung, S., H. Yang, K. Uryu, E. B. Lee, L. Zhao, D. Shineman, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee and D. Pratico (2004). "Modulation of nuclear factor-kappa B activity by indomethacin influences A beta levels but not A beta precursor protein metabolism in a model of Alzheimer's disease." Am J Pathol **165**(6): 2197-2206.
- Tanveer, A., S. Virji, L. Andreeva, N. F. Totty, J. J. Hsuan, J. M. Ward and M. Crompton (1996). "Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca²⁺ and oxidant stress." Eur J Biochem **238**(1): 166-172.
- Teramoto, T., T. Niidome, T. Miyagawa, Y. Nishizawa, K. Katayama and K. Sawada (1995). "Two types of calcium channels sensitive to omega-agatoxin-TK in cultured rat hippocampal neurones." Neuroreport **6**(12): 1684-1688.
- Thibault, O., J. C. Gant and P. W. Landfield (2007). "Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store." Aging Cell **6**(3): 307-317.
- Thibault, O. and P. W. Landfield (1996). "Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging." Science **272**(5264): 1017-1020.
- Thomas, C. G., A. J. Miller and G. L. Westbrook (2006). "Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons." J Neurophysiol **95**(3): 1727-1734.

- Tian, J., S. F. Kim, L. Hester and S. H. Snyder (2008). "S-nitrosylation/activation of COX-2 mediates NMDA neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10537-10540.
- Toescu, E. C., N. Myronova and A. Verkhratsky (2000). "Age-related structural and functional changes of brain mitochondria." Cell Calcium **28**(5-6): 329-338.
- Toescu, E. C. and A. Verkhratsky (2000). "Parameters of calcium homeostasis in normal neuronal ageing." J Anat **197 Pt 4**: 563-569.
- Toescu, E. C. and A. Verkhratsky (2003). "Neuronal ageing from an intraneuronal perspective: roles of endoplasmic reticulum and mitochondria." Cell Calcium **34**(4-5): 311-323.
- Toescu, E. C. and A. Verkhratsky (2007). "The importance of being subtle: small changes in calcium homeostasis control cognitive decline in normal aging." Aging Cell **6**(3): 267-273.
- Traub, R. D. and R. K. Wong (1982). "Cellular mechanism of neuronal synchronization in epilepsy." Science **216**(4547): 745-747.
- Tsien, R. Y. (1988). "Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium." Trends Neurosci **11**(10): 419-424.
- Tu, H., O. Nelson, A. Bezprozvanny, Z. Wang, S. F. Lee, Y. H. Hao, L. Serneels, B. De Strooper, G. Yu and I. Bezprozvanny (2006). "Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations." Cell **126**(5): 981-993.
- Turetsky, D. M., L. M. Canzoniero, S. L. Sensi, J. H. Weiss, M. P. Goldberg and D. W. Choi (1994). "Cortical neurones exhibiting kainate-activated Co²⁺ uptake are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated toxicity." Neurobiol Dis **1**(3): 101-110.
- Tymianski, M., M. P. Charlton, P. L. Carlen and C. H. Tator (1993). "Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons." J Neurosci **13**(5): 2085-2104.
- Ujihara, H. and E. X. Albuquerque (1992). "Ontogeny of N-methyl-D-aspartate-induced current in cultured hippocampal neurons." J Pharmacol Exp Ther **263**(2): 859-867.

Vaca, L. and D. L. Kunze (1994). "Depletion of intracellular Ca²⁺ stores activates a Ca(2+)-selective channel in vascular endothelium." Am J Physiol **267**(4 Pt 1): C920-925.

Valero, R. A., L. Senovilla, L. Nuñez and C. Villalobos (2008). "The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation." Cell Calcium **44**(3): 259-269.

Van Baelen, K., J. Vanoevelen, L. Missiaen, L. Raeymaekers and F. Wuytack (2001). "The Golgi PMR1 P-type ATPase of *Caenorhabditis elegans*. Identification of the gene and demonstration of calcium and manganese transport." J Biol Chem **276**(14): 10683-10691.

Vane, J. R. (1971). "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs." Nat New Biol **231**(25): 232-235.

Verkhatsky, A. J. and O. H. Petersen (1998). "Neuronal calcium stores." Cell Calcium **24**(5-6): 333-343.

Villalobos, C., E. Caballero, S. Sanz-Blasco and L. Nuñez (2012). "Study of neurotoxic intracellular calcium signalling triggered by amyloids." Methods Mol Biol **849**: 289-302.

Villalobos, C., A. Nadal, L. Nuñez, I. Quesada, P. Chamero, M. T. Alonso and J. Garcia-Sancho (2005). "Bioluminescence imaging of nuclear calcium oscillations in intact pancreatic islets of Langerhans from the mouse." Cell Calcium **38**(2): 131-139.

Villalobos, C., L. Nuñez, P. Chamero, M. T. Alonso and J. Garcia-Sancho (2001). "Mitochondrial [Ca(2+)] oscillations driven by local high [Ca(2+)] domains generated by spontaneous electric activity." J Biol Chem **276**(43): 40293-40297.

Villalobos, C., L. Nuñez, M. Montero, A. G. Garcia, M. T. Alonso, P. Chamero, J. Alvarez and J. Garcia-Sancho (2002). "Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells." FASEB J **16**(3): 343-353.

Voronina, S. G., S. L. Barrow, O. V. Gerasimenko, O. H. Petersen and A. V. Tepikin (2004). "Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane potential of pancreatic acinar cells: comparison of different modes of evaluating DeltaPsim." J Biol Chem **279**(26): 27327-27338.

Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, W. K. Cullen, R. Anwyl, M. S. Wolfe, M. J. Rowan and D. J. Selkoe (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein

potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." Nature **416**(6880): 535-539.

Walsh, D. M., B. P. Tseng, R. E. Rydel, M. B. Podlisny and D. J. Selkoe (2000). "The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain." Biochemistry **39**(35): 10831-10839.

Weggen, S., J. L. Eriksen, P. Das, S. A. Sagi, R. Wang, C. U. Pietrzik, K. A. Findlay, T. E. Smith, M. P. Murphy, T. Bulter, D. E. Kang, N. Marquez-Sterling, T. E. Golde and E. H. Koo (2001). "A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity." Nature **414**(6860): 212-216.

Werth, J. L., Y. M. Usachev and S. A. Thayer (1996). "Modulation of calcium efflux from cultured rat dorsal root ganglion neurons." J Neurosci **16**(3): 1008-1015.

Wilcock, G. K., S. E. Black, S. B. Hendrix, K. H. Zavitz, E. A. Swabb, M. A. Laughlin and I. I. S. i. Tarenflurbil Phase (2008). "Efficacy and safety of tarenflurbil in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomised phase II trial." Lancet Neurol **7**(6): 483-493.

Wisniewski, M. L., J. Hwang and B. A. Bahr (2011). "Submicromolar Abeta42 reduces hippocampal glutamate receptors and presynaptic markers in an aggregation-dependent manner." Biochim Biophys Acta **1812**(12): 1664-1674.

Wu, J., R. Anwyl and M. J. Rowan (1995). "beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus." Neuroreport **6**(17): 2409-2413.

Xiong, J., P. J. Camello, A. Verkhratsky and E. C. Toescu (2004). "Mitochondrial polarisation status and [Ca²⁺]_i signalling in rat cerebellar granule neurones aged in vitro." Neurobiol Aging **25**(3): 349-359.

Yang, H., R. Cong, L. Na, G. Ju and S. W. You (2010). "Long-term primary culture of highly-pure rat embryonic hippocampal neurons of low-density." Neurochem Res **35**(9): 1333-1342.

Yasojima, K., C. Schwab, E. G. McGeer and P. L. McGeer (1999). "Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs." Brain Res **830**(2): 226-236.

Yoshida, H. (2007). "ER stress and diseases." FEBS J **274**(3): 630-658.

Younkin, S. G. (1998). "The role of A beta 42 in Alzheimer's disease." J Physiol Paris **92**(3-4): 289-292.

Zaidan, E. and N. R. Sims (1994). "The calcium content of mitochondria from brain subregions following short-term forebrain ischemia and recirculation in the rat." J Neurochem **63**(5): 1812-1819.

Zaidi, A., J. Gao, T. C. Squier and M. L. Michaelis (1998). "Age-related decrease in brain synaptic membrane Ca²⁺-ATPase in F344/BNF1 rats." Neurobiol Aging **19**(5): 487-495.

Zaidi, A. and M. L. Michaelis (1999). "Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca(2+)-ATPase." Free Radic Biol Med **27**(7-8): 810-821.

Zhang, H., Q. Li, R. K. Graham, E. Slow, M. R. Hayden and I. Bezprozvanny (2008). "Full length mutant huntingtin is required for altered Ca²⁺ signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease." Neurobiol Dis **31**(1): 80-88.

Zhang, Y. W., R. Thompson, H. Zhang and H. Xu (2011). "APP processing in Alzheimer's disease." Mol Brain **4**: 3.

Zhu, Y. J., H. Lin and R. Lal (2000). "Fresh and nonfibrillar amyloid beta protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for AbetaP-channel-mediated cellular toxicity." FASEB J **14**(9): 1244-1254.