



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

Modulación de la señal de calcio y los receptores de IP₃ en neuronas de hipocampo envejecidas *in vitro* y tratadas con oligómeros del péptido amiloide.

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

Sara López Vázquez

Directores

Dra. Lucía Núñez Llorente

Dr. Carlos Villalobos Jorge

Valladolid, septiembre 2019.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Homeostasis del Calcio Intracelular.....	1
1.1.1 Sistemas de extrusión de Ca^{2+} de la membrana plasmática.....	1
1.1.2 Sistemas de influjo de Ca^{2+} en la célula.....	1
1.1.3 Homeostasis del Ca^{2+} en el retículo endoplasmático.....	2
1.1.4 Homeostasis del Ca^{2+} en la mitocondria.....	4
1.2 Entrada Capacitativa de Calcio o Entrada Dependiente de Depósitos (SOCE).....	4
1.2.1 STIM.....	5
1.2.2 ORAI.....	5
1.3 Receptores de IP_3	5
1.4 Envejecimiento y enfermedad de Alzheimer.....	6
1.4.1 Homeostasis de Ca^{2+} y envejecimiento.....	7
1.4.2 Homeostasis de Ca^{2+} y Alzheimer.....	8
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
3.1 Material, reactivos y medios.....	12
3.2 Métodos experimentales.....	13
3.2.1 Obtención y cultivo de neuronas de hipocampo de ratas neonatas.....	13
3.2.2 Registro de Ca^{2+} citosólico por imagen de fluorescencia.....	14
3.2.3 Tratamiento con $\text{A}\beta$	15
3.2.4 Inmunofluorescencia.....	16
3.2.5 IP_3 enjaulado o <i>Caged-Ins (1, 4, 5)P_3/PM</i>	16
3.2.6 Análisis estadístico.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1 Efectos de MDEB sobre SOCE en neuronas jóvenes y envejecidas.....	18
4.2 Análisis de la expresión de los receptores de IP_3 (IP_3Rs) por inmunofluorescencia.....	19
4.3 Medida de la liberación de Ca^{2+} tras el estímulo con <i>caged-IP₃</i>	21
5. DISCUSIÓN.....	23
6. CONCLUSIONES.....	25
7. AGRADECIMIENTOS.....	26
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

ABREVIATURAS:

[Ca²⁺]: concentración de calcio

2-APB: 2-Aminoetoxidifenil-borato

Aβ_o: oligómeros del péptido Aβ₁₋₄₂

AMPA: ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

APP: proteína precursora amiloidea

ATP: adenosina-5'-trifosfato

Caged-IP₃: Caged-Ins (1, 4, 5) P₃/PM

CIC: cóctel inhibidor de canales voltaje-dependientes

CICR: corriente de calcio inducida por calcio

CMPc: citidín monofosfato cíclico

CNQX: 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

CRAC: canales de calcio activados por calcio

DAG: diacilglicerol

DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol

DIV: días *in vitro*

DMEM: medio de Eagle Modificado por Dubelcco

ENV: envejecidas

HBSS: solución salina

IP₃: inositol 1,4,5-trisfosfato

IP₃Rs: receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato

LTD: depresión a largo plazo

LTP: potenciación a largo plazo

MCU: uniportador de calcio mitocondrial

MDEB: metoxi-dietilborinato

MEC: médio externo estándar

NMDA: ácido N-metil-D-aspártico

PBS: tampón fosfato salino

PFA: paraformaldehído

PLC: fosfolipasa C

PM: propionoximeileno

PS1: presilina 1

PS2: presilina 2

ROCCs: canales de calcio operados por receptor

RE: retículo endoplasmático

RyRs: receptores de Ryanodina

SERCA: Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplasmático

SMOCCs: canales de calcio operados por segundos mensajeros

SOCCs: canales de calcio operados por depósitos

SOCE: entrada capacitativa de Ca^{2+} o entrada de Ca^{2+} operada por depósitos

TTX: tetrodotoxina

VDAC: canales aniónicos dependientes de voltaje

VOCCs: canales de calcio operados por voltaje

RESUMEN

El envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas asociadas al mismo son actualmente un reto social, debido a su incipiente aumento en los países desarrollados. Entre estas enfermedades destacamos la enfermedad de Alzheimer, cuya causa es desconocida pero relacionada con la acumulación del péptido A β_{1-42} y la formación de placas amiloides en el cerebro. Tanto el envejecimiento como la enfermedad de Alzheimer cursan con una desregulación de la homeostasis del Ca²⁺ que es un importante mecanismo de señalización en las células, incluyendo a las neuronas. Estudios anteriores del laboratorio determinaron que el envejecimiento neuronal está asociado al remodelado de la homeostasis del calcio intracelular, principalmente la pérdida o disminución de la entrada capacitativa de Ca²⁺ (SOCE), una vía de entrada de calcio implicada en los procesos de memoria y aprendizaje, y el aumento de la liberación de Ca²⁺ de los depósitos, un proceso implicado en la susceptibilidad a la muerte neuronal.

Por ello nos hemos propuesto investigar si es posible revertir la pérdida de SOCE con MDEB, un agonista de dicha entrada recientemente descrito. Además, nos hemos planteado investigar el efecto del envejecimiento neuronal y los oligómeros del péptido amiloide, la principal neurotoxina en la enfermedad de Alzheimer, sobre la expresión y actividad de los receptores de IP₃ responsables de la liberación de calcio de los depósitos.

Para ello, se utilizaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratas neonatas que a tiempos cortos de cultivo semejan neuronas jóvenes y a tiempos largos tienen características de neuronas envejecidas. Las medidas de SOCE se llevaron a cabo mediante la monitorización del Ca²⁺ intracelular por imagen de fluorescencia. La expresión y actividad de los receptores de IP₃ fueron evaluadas por inmunofluorescencia e imagen confocal en células cargadas con IP₃ enjaulado o *caged-IP₃*.

Los resultados del estudio muestran que el potenciador MDEB aumenta la SOCE en neuronas de hipocampo jóvenes, pero no en las envejecidas. Esta falta de efecto podría deberse a la pérdida de ORAI1 durante el envejecimiento. Por otro lado, el envejecimiento y el tratamiento con los oligómeros del péptido A β_{1-42} producen cambios poco significativos en la expresión de las tres isoformas de los receptores de IP₃. Sin embargo, el envejecimiento neuronal *in vitro* aumenta significativamente la liberación de Ca²⁺ inducida por IP₃. Finalmente, el tratamiento con oligómeros del péptido amiloide también modificó significativamente la liberación de Ca²⁺ inducida por IP₃.

En conclusión, se requiere de otro tipo de agonistas independientes de ORAI1 para potenciar SOCE en el envejecimiento neuronal. Además, el envejecimiento y los oligómeros del péptido amiloide provocan cambios significativos en la actividad de los receptores de IP₃ que podrían estar relacionados con la degeneración neuronal. Se requieren más estudios para determinar los cambios que ocurren, sus bases moleculares y su implicación en los procesos de pérdida cognitiva asociada al envejecimiento.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR:

El ión calcio (Ca^{2+}) es de vital importancia en la vida de la célula, ya que su papel como segundo mensajero le hace tener funciones específicas muy relevantes: metabolismo, transcripción, crecimiento, división celular, excitación, secreción, motilidad y apoptosis (Clapham DE, 2007). Este ión divalente no puede alterarse químicamente como las moléculas complejas; por tanto, las células mantienen estable la concentración de Ca^{2+} libre intracelular mediante la unión a agentes quelantes y la extrusión o transporte hacia compartimentos intracelulares o el medio extracelular. La “homeostasis del calcio” es el proceso por el cual la célula regula la relación de la concentración de calcio ($[\text{Ca}^{2+}]$) entre el medio intracelular (del orden de 100 nM libre) y extracelular (1-2 mM). De esta forma, existe un gradiente de concentraciones de aproximadamente 10.000 veces entre ambos espacios; el cual es mantenido por la célula gracias a sistemas de transporte localizados en la membrana y orgánulos celulares.

1.1.1 Sistemas de extrusión de Ca^{2+} de la membrana plasmática:

El gradiente de concentración de Ca^{2+} existente en las células es mantenido gracias a bombas de transporte activo localizadas en la membrana plasmática que transportan Ca^{2+} desde el citosol hacia el medio extracelular en contra de gradiente:

- **Calcio ATPasa de la membrana plasmática (PMCA, o *plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*):** ATPasa de tipo P constituida por 10 hélices transmembrana, que transporta un ión Ca^{2+} al exterior celular por cada molécula de ATP hidrolizada. En humanos existen dos isoformas de la proteína (PMCA1 y PMCA2) cuya cinética se explica por la formación de dos intermediarios conformacionales distintos (Mangialavori IC et al., 2013).
- **Intercambiador sodio/calcio (NCX, o *sodium-calcium exchanger*):** Proteína antiporte que toma la energía del transporte de 3 Na^+ hacia el interior celular para exportar un ión Ca^{2+} . Se ha descrito una alta expresión en corazón, seguido de cerebro (Komuro I et al., 1992).

1.1.2. Sistemas de influjo de Ca^{2+} en la célula:

El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el interior celular es un mecanismo de señalización que desencadena numerosos procesos dentro de la célula. A menudo, las señales de Ca^{2+} se dan en forma de oscilaciones repetitivas y de corta duración (Appleby PA et al., 2013), evitando la posible activación inespecífica de las distintas rutas de señalización. Este incremento requiere en general la entrada de Ca^{2+} desde el medio externo al interior de la célula, lo que implica la activación de una serie de canales:

- **Canales operados por voltaje (VOCCs, o *Voltage-Operated Ca^{2+} Channels*):** son proteínas sensibles a variaciones en la diferencia de potencial a ambos lados de la membrana, por lo que se activan cuando hay una despolarización de la misma. Su estructura se basa en una subunidad principal (α_1) que actúa como poro y sensor de voltaje, a la cual se unen subunidades accesorias (β y α_2 , entre otras) (Catterall WA, 1991). En función del rango de voltaje necesario para la activación de los canales se distinguen dos grupos: los canales tipo T (bajo umbral) y los tipo L, N, P, Q y R (alto

umbral). Los primeros necesitan de pequeñas despolarizaciones para su activación, mientras que los últimos se activan por grandes despolarizaciones de la membrana. Los VOCCs son la vía de entrada de Ca^{2+} más importante en células excitables, tales como neuronas, células musculares y células pertenecientes a glándulas endocrinas. Debido a que son un punto de conexión entre las señales eléctricas de membrana y la señalización bioquímica intracelular, son partícipes de múltiples procesos fisiológicos y patológicos.

- **Canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCCs, o Receptor-Operated Ca^{2+} Channels):** su activación ocurre por la unión de un ligando a un receptor de membrana. Estos canales se caracterizan por la propiedad de generar corrientes catiónicas no selectivas, siendo la selectividad por el ión Ca^{2+} variable. Por ejemplo, el ATP desencadena la activación de los receptores purinérgicos P2X; proteínas triméricas con una distribución tisular generalizada. En neuronas, estos receptores tienen un papel de neuromodulación (Khakh BS, 2012) y de iniciación del potencial acción (Vandenbeuch A et al., 2015 y Burnstock G, 2014). Otros ligandos descritos como activadores de corrientes de Ca^{2+} son la noradrenalina (Byrne y Large, 1991), que actúa sobre receptores adrenérgicos tipo α_1 ; la acetilcolina (Kim SJ et al., 1998), que activa receptores nicotínicos; y el glutamato, que actúa como agonista de los receptores NMDA, AMPA y kainato. Estos tres ligandos actúan como neurotransmisores en el sistema nervioso; y concretamente el glutamato, es de gran importancia en la enfermedad de Alzheimer, ya que la activación de receptores NMDA está relacionada con la plasticidad sináptica y la memoria; factores alterados en dicha patología (Li F y Tsien JZ, 2009).
- **Canales de Ca^{2+} operados por segundos mensajeros (SMOCCs: Second-Messenger-Operated Channels):** difieren de los ROCCs en que el ligando que permite la activación del canal se localiza en el interior celular, siendo éste además un segundo mensajero. Se han descrito canales de Ca^{2+} activados por diacilglicerol (DAG) (Guderman et al., 2004), ácido araquidónico (Meves H, 2008) y nucleótidos cíclicos como el AMPc o el CMPc (Kaupp UB y Seifert R, 2002).
- **Canales operados por depósitos (SOCCs, o Store-Operated Ca^{2+} Channels):** su activación es dependiente del nivel de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, principalmente del retículo endoplasmático (RE). El ejemplo más relevante es el canal ORAI1, localizado en la membrana plasmática y cuya activación está mediada por la proteína STIM1, un sensor de Ca^{2+} del retículo endoplasmático.

Además de los mecanismos descritos arriba, otro sistema de regular la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular es por medio de orgánulos intracelulares como el retículo endoplasmático y las mitocondrias. Estos orgánulos presentan su propia homeostasis de Ca^{2+} .

1.1.3 Homeostasis del calcio en el retículo endoplasmático:

El retículo endoplasmático es el principal depósito de Ca^{2+} de la célula, con una concentración del mismo en el rango mM, mientras que en el citoplasma la $[\text{Ca}^{2+}]$ es del orden de nM. A través de los receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3Rs) y los receptores de Ryanodina (RyRs), el Ca^{2+} sale del RE a favor de gradiente. Ambos receptores, especialmente los de rianodina, participan en el mecanismo conocido como liberación de calcio inducida por calcio (CICR, o Calcium Induced Calcium Release), por el cual los canales de Ca^{2+} de la membrana producen un aumento del Ca^{2+} intracelular y en respuesta, hay una liberación de Ca^{2+} desde el RE. En neuronas el RE se extiende a lo largo del soma,

axones y espinas dendríticas; lo que permite una rápida señalización en todo el volumen de la célula. Esto le permite intervenir en múltiples funciones dentro de la neurona, como participar en respuestas postsinápticas o en la plasticidad sináptica, base del aprendizaje y la memoria.

La ruta canónica por la que ocurre la liberación de Ca^{2+} desde el RE, a través de los IP_3R (explicados posteriormente más ampliamente), se representa en la *Figura 1*. La activación de la fosfolipasa C (PLC) por un agonista permite la hidrólisis de fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato (PIP_2) en DAG e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3). La molécula de IP_3 difunde rápidamente por el citosol hasta el RE, donde interacciona con los IP_3R . La unión ligando-receptor provoca la salida de Ca^{2+} desde el lumen al citosol. Ante el vaciado de los depósitos, tiene lugar la entrada capacitativa de Ca^{2+} (SOCE), la cual se explicará en profundidad más adelante.

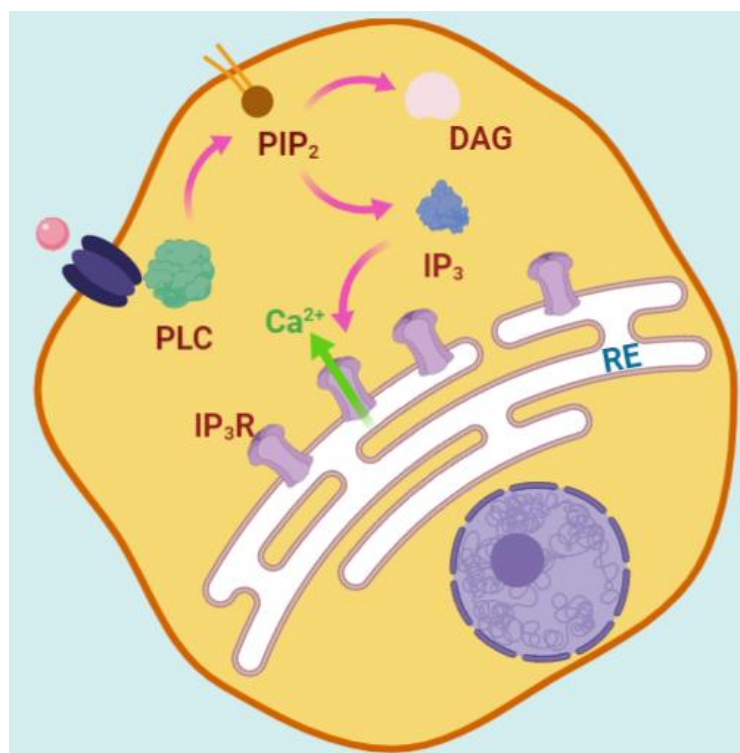


Figura 1. Liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (basado en Soboloff J. et al., 2012).

Además, en el RE se localiza la bomba Ca^{2+} -ATPasa del Retículo Sarcoplasmático y Endoplasmático (SERCA, o *sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*), que frente a un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico, introduce este ión hacia el RE, permitiendo que la concentración de calcio dentro del mismo retorne a niveles basales en el rango mM. Los depósitos del RE están continuamente vaciando y rellenándose, aunque lentamente. En estudios funcionales de la señalización por Ca^{2+} es común el uso de tapsigargina, un inhibidor irreversible de la SERCA que provoca el lento vaciamiento del RE sin activar a los IP_3Rs . Los canales tipo *leak* liberan calcio del RE lentamente y de forma continua. La inhibición de la entrada vía SERCA produce la lenta depleción de los depósitos del RE lo que, secundariamente, activa los canales tipo SOCC y, por tanto, la entrada capacitativa de Ca^{2+} .

1.1.4 Homeostasis del calcio en la mitocondria:

La mitocondria es un orgánulo de gran relevancia en la homeostasis de Ca^{2+} ; ya que por su gran potencial negativo actúa como un tampón de calcio, que controla espacial y temporalmente los incrementos de Ca^{2+} en el citosol (Rizzuto R y Pozzan T, 2006). Su estructura consta de dos membranas: la membrana mitocondrial externa, la cual es muy permeable a Ca^{2+} por la presencia de canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC); y la membrana mitocondrial interna, cuya permeabilidad a Ca^{2+} es menor, y está regulada por la presencia del uniportador de calcio mitocondrial (MCU, o *mitochondrial calcium uniporter*). El complejo MCU se activa por el aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol, y requiere la existencia del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi$) que permite la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria sin gasto de energía. La salida de Ca^{2+} de la mitocondria se da a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCC) y el intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mHCX), ambos localizados en la membrana interna mitocondrial.

En neuronas, la actividad mitocondrial es de relevante importancia, tanto para el suministro de energía en forma de ATP como para controlar la homeostasis del Ca^{2+} , regulando la despolarización y transmisión sináptica (Li Z et al., 2004).

1.2.- ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+} O ENTRADA DEPENDIENTE DE DEPÓSITOS (SOCE):

La entrada capacitativa de Ca^{2+} o entrada de Ca^{2+} dependiente de depósitos (abreviado como SOCE por sus siglas en inglés: “*store-operated calcium entry*”) es un mecanismo ubicuo, presente tanto en células excitables como no excitables, de relleno de los depósitos desde el citosol, lo que contribuye al mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Figura 2).

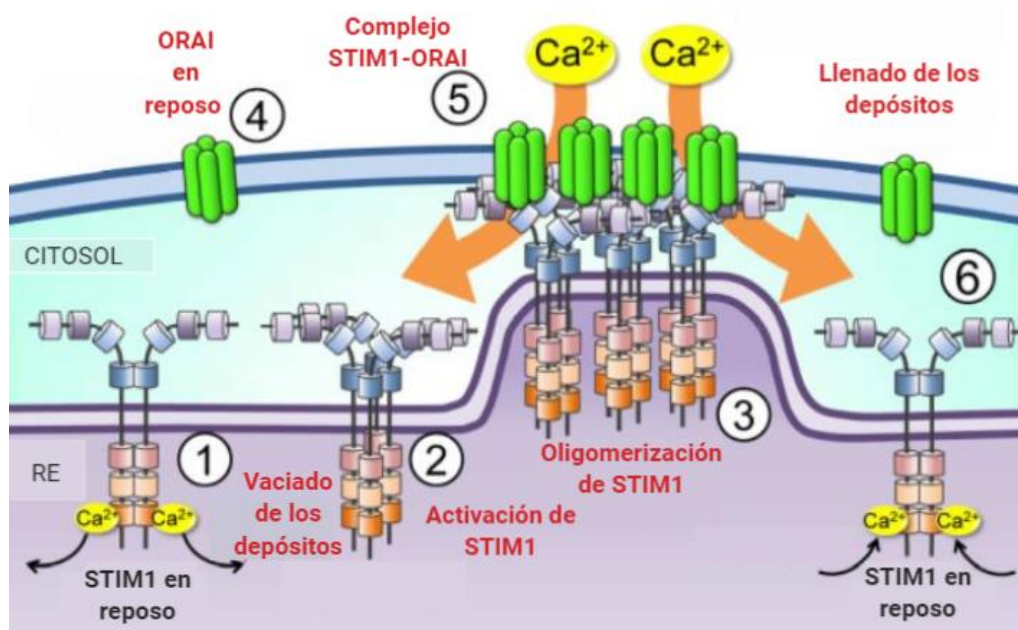


Figura 2. Entrada Capacitativa de Calcio (SOCE). El vaciado de los depósitos provoca que la proteína STIM1, localizada en el RE, libere el Ca^{2+} unido a su dominio en mano EF (1). Así, STIM1 activado oligomeriza e interacciona con los canales Orai presentes en la membrana plasmática (2,3). A través de los canales Orai entra el Ca^{2+} al citosol a favor de gradiente, desde el medio extracelular (4-6). (Basado en Chen YF et al., 2013).

Estudios electrofisiológicos en mastocitos permitieron el descubrimiento de una corriente activada por el vaciamiento de los depósitos y selectiva para Ca^{2+} (Hoth M y Penner R, 1992). Los canales implicados en esta corriente fueron denominados canales de Ca^{2+} activados por Ca^{2+} (CRAC, o Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} current), un tipo de canales SOCs. Entre los años 2005 y 2006 se descubrieron las bases moleculares de SOCE que incluían los sensores o proteínas STIM y los canales tipo ORAI.

El estudio de SOCE, condujo al uso de agonistas y antagonistas de estos canales. Uno de los pocos agonistas desarrollados, el metoxi-dietilborinato (MDEB), es una molécula descrita como un potenciador de la SOCE en leucocitos y líneas celulares cancerígenas (Djillani A et al., 2015). Se trata de un compuesto análogo al 2-Aminoetoxidifenil-borato (2-APB), una molécula que a bajas concentraciones estimula SOCE; sin embargo, a altas concentraciones tiene un efecto inhibitor. La ventaja del MDEB es su especificidad sobre la SOCE, ya que el 2-APB puede afectar a otros mecanismos de transporte de Ca^{2+} .

1.2.1 STIM

La proteína STIM está descrita como un sensor de Ca^{2+} responsable de la apertura de los canales CRAC, tras la bajada de concentración de Ca^{2+} en el lumen del RE (Liou J et al., 2005). Existen dos isoformas de la proteína: STIM1, que se puede localizar en la membrana del RE o en la membrana plasmática, actúa como sensor de Ca^{2+} del RE y activador de los canales CRAC. Por otro lado, STIM2 únicamente se localiza en la membrana del RE, actúa débilmente como activador de los canales CRAC y es responsable del mantenimiento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, evitando una activación descontrolada de SOCE. La estructura de las proteínas STIM se basa en una región C-terminal orientada hacia el citosol, una región transmembrana y una región N-terminal orientada hacia el lumen del RE.

En neuronas de hipocampo de rata se ha propuesto a STIM2, en lugar de STIM1, como el verdadero sensor del Ca^{2+} en el RE (Berna-Erro et al., 2009). Sin embargo, existe controversia ya que otros indican que ambas isoformas participan en la señalización: STIM1 actuaría como activador de la SOCE, mientras que STIM2 regularía los niveles de Ca^{2+} en reposo (Gruszczynska et al., 2011).

1.2.2 ORAI

Las proteínas ORAI han sido identificadas como los canales CRAC (Feske S et al., 2006). La familia ORAI está compuesta por tres isoformas: ORAI1, ORAI2 y ORAI3; las cuales se localizan en la membrana plasmática. La interacción STIM1-ORAI se determinó mediante FRET (Förster resonance energy transfer): ante un vaciado de los depósitos de Ca^{2+} , STIM1 pierde el Ca^{2+} unido en su región N-terminal, produciendo una desestabilización de su estructura y la formación de oligómeros de STIM1. Tras ello, STIM1 transloca a la membrana plasmática donde promueve la formación de clústeres y la activación de los canales tipo ORAI (Muik M et al., 2011).

1.3.- RECEPTORES DE IP_3

Los receptores de IP_3 (IP_3R) son canales de Ca^{2+} localizados en la membrana del RE, cuya activación es dependiente de IP_3 y su función es permitir la liberación de Ca^{2+} de los depósitos. Estos receptores pueden encontrarse en otras localizaciones celulares como en las vesículas secretoras de células neuroendocrinas y en la membrana plasmática.

Se conocen 3 isoformas de los IP₃Rs: IP₃R1, IP₃R2 e IP₃R3; codificados por distintos genes (3p26.1, 12p11.23 y 6p21.31, respectivamente) y con diferentes funciones en la señalización celular. La afinidad con la que las tres isoformas unen IP₃ es distinta, presentando IP₃R2 la mayor afinidad e IP₃R3 la menor; con una diferencia de 10 veces entre ambas (Iwai M et al., 2007). Las tres isoformas presentan una amplia localización, estando presentes en todos los tejidos; pero su expresión en el cerebelo aumenta considerablemente, sobre todo la isoforma IP₃R1 en el soma de las células de Purkinje cerebelares. También esta isoforma se concentra en las neuronas de la región CA₁ del hipocampo, en el núcleo caudado, el putamen y la corteza cerebral (Matsumoto et al., 1996).

La estructura de los receptores de IP₃ consta de un dominio N-terminal donde se localiza el sitio de unión a IP₃ y un dominio modulador de la respuesta, y un dominio C-terminal que conforma el canal de Ca²⁺ (Figura 3). Estos canales forman parte de una superfamilia de canales catiónicos tetraméricos en la que cada monómero presenta 6 hélices transmembrana; siendo las hélices 5 y 6 de cada monómero, las que se agrupan formando el poro conductor de iones (Baker MR et al., 2017).

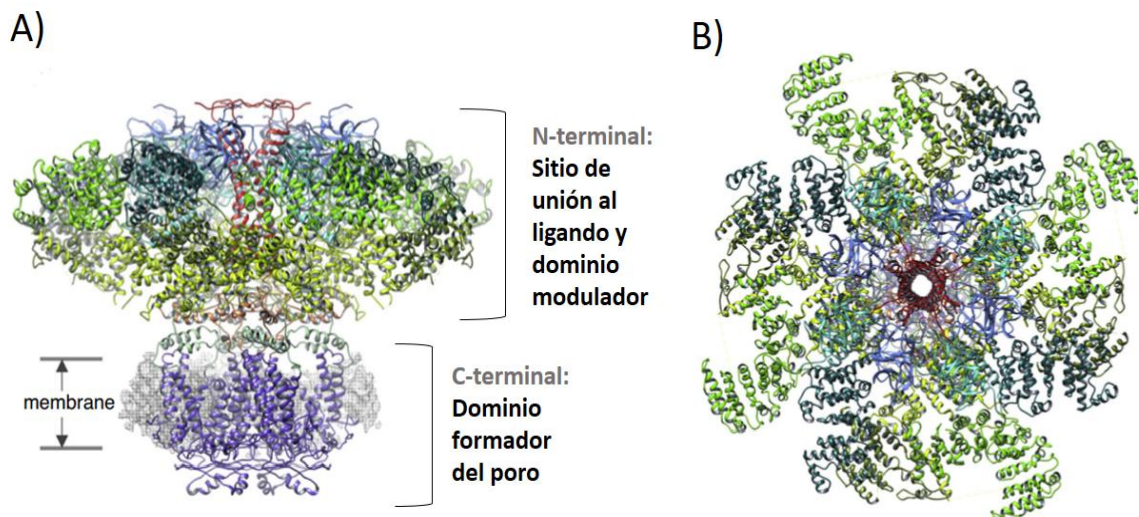


Figura 3. Estructura de IP₃R1 resuelta por criomicroscopía electrónica de una muestra procedente de cerebelo de rata. (A) Vista en el plano a lo largo de la membrana donde se muestran los dominios citosólicos hacia arriba. (B) Vista en el plano del eje del poro formado por las cuatro subunidades desde el lado citosólico. (Modificado de Baker MR., 2017).

1.4.- ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El envejecimiento es un proceso en el que el tiempo produce sobre los seres vivos un conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas, desencadenando un deterioro físico que incluye una pérdida cognitiva progresiva. Asociadas a una edad longeva, encontramos las enfermedades neurodegenerativas, un grupo heterogéneo de patologías que se caracterizan por la pérdida de función neuronal progresiva; siendo el la enfermedad de Alzheimer la demencia más prevalentes en la población. Recientemente se ha descrito que, tanto en el envejecimiento como en la enfermedad de Alzheimer, existe una alteración en la homeostasis del Ca²⁺intracelular, haciendo de estas modificaciones un punto interesante de estudio para comprender cómo ocurren dichos fenómenos.

1.4.1 Homeostasis del Ca²⁺ y envejecimiento.

La señalización por Ca²⁺ es esencial en múltiples procesos neuronales, tales como la excitabilidad, la integración de señales eléctricas, y la plasticidad sináptica, la cual es la base del aprendizaje y la memoria. Las alteraciones en la homeostasis de Ca²⁺ existentes en el envejecimiento ocurren de diferente forma en función del tipo neuronal, siendo las neuronas de hipocampo unas de las más afectadas (Foster TC, 2007). Dichas modificaciones ocurren de manera sutil y gradual, teniendo consecuencias funcionales muy significativas.

Uno de los cambios más relevantes relacionados con la edad, es la alteración de la plasticidad sináptica, propiedad que permite a las neuronas reforzar o debilitar circuitos nerviosos. Una de las formas más relevantes de plasticidad sináptica es la potenciación a largo plazo (LTP, o *long-term potentiation*). En la LTP participa un complejo conjunto de procesos presinápticos y postsinápticos. Para que tenga lugar la LTP es necesaria una entrada de Ca²⁺ en la membrana postsináptica, lo que permite un aumento mantenido del cambio de potencial en la membrana. En el envejecimiento la concentración de Ca²⁺ basal se ve aumentada (Khachaturian ZS, 1989), por lo que aumenta el umbral necesario para que se produzca la LTP. De esta forma, para inducir LTP en neuronas envejecidas es necesaria una fuerte estimulación, siendo esta estimulación menor en neuronas jóvenes (Foster TC, 2007). La LTP ha sido recientemente relacionada con la entrada de Ca²⁺ operada por depósitos (SOCE), ya que antagonistas de la SOCE reducen la LTP en neuronas de hipocampo (Baba A et al., 2003). Por otro lado, la depresión a largo plazo (LTD, o *long-term depression*), es otro proceso de plasticidad que puede revertir la LTP. El aumento de la concentración de Ca²⁺ basal en las neuronas envejecidas hace que el umbral necesario para alcanzar la LTD sea menor, con respecto a neuronas jóvenes. Todo ello, explica que el déficit de aprendizaje y memoria asociado a la longevidad se relacione con la homeostasis del calcio.

Otros efectos del envejecimiento sobre la homeostasis de Ca²⁺ son: el aumento de la entrada de Ca²⁺ a través de los canales VOCCs (Thibault O y Landfield PW, 1996), la disminución de la expresión de la bomba de extrusión PMCA (Zaidi A et al., 1998) y la reducción de los sistemas tamponadores de Ca²⁺ (Kishimoto J et al., 1998). Además, estudios previos del laboratorio abordaron los efectos del envejecimiento sobre la entrada capacitativa de Ca²⁺ en células neuronales de hipocampo de rata. Se determinó que en células envejecidas hay una reducción de la entrada capacitativa de Ca²⁺ con respecto a cultivos jóvenes. Asimismo, estudios de inmunofluorescencia señalaron que en células envejecidas hay una reducción de los niveles de ORA11 y STIM1, elementos principales de la SOCE (Calvo-Rodríguez M et al., 2016). Esto podría ser muy relevante ya que SOCE y estas proteínas podrían ser esenciales para la estabilidad de las neuritas, y por tanto, los procesos de plasticidad sináptica (Bezprozvanny I et al., 2015).

Los compartimentos intracelulares también muestran cambios en la homeostasis de Ca²⁺:

- La mitocondria actúa en la célula como un sistema productor de energía y un tampón de altos niveles de Ca²⁺ citosólicos. En el envejecimiento se ha visto que un porcentaje de las neuronas muestran mitocondrias despolarizadas, por tanto, el umbral de Ca²⁺ que se necesita para iniciar la captación mitocondrial aumenta (Xiong J et al., 2004). Este hecho dificulta la captación del exceso de Ca²⁺ en neuronas envejecidas, lo que puede considerarse como un mecanismo adaptativo en lugar de

una desventaja de la célula, dado que así se evita la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial que conlleva a la muerte (Toescu EC y Verkhatsky A, 2007).

- Los cambios en la homeostasis del RE durante el envejecimiento son en gran parte desconocidos. Existen estudios que sugieren la existencia de una disminución de la actividad de la SERCA en neuronas envejecidas (Murchison D y Griffith WH, 1999) y un aumento de la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3Rs y los RyRs (Thibault O et al., 2007) pero que no ocurre en todos los tipos neuronales.

1.4.2 Homeostasis del Ca^{2+} y Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno progresivo en el que las neuronas degeneran y mueren. Las consecuencias son un deterioro cognitivo progresivo e irreversible y trastornos conductuales, que impiden la autonomía del paciente que las padece. Anteriormente se mencionó el importante papel que desempeña el Ca^{2+} en los procesos de memoria y aprendizaje; además de su relación con la supervivencia y muerte neuronal. Así mismo se ha propuesto que la desregulación de la señal de calcio está implicada en la enfermedad de Alzheimer.

La *Hipótesis del Calcio en la Enfermedad de Alzheimer* (Khachaturian ZS, 1989; Mattson MP et al., 1993) busca explicar cómo la pérdida de memoria progresiva y el aumento de muerte neuronal están asociadas con el péptido amiloide y la dishomeostasis de la señal de Ca^{2+} (Figura 4). La ruta amiloide es un mecanismo en el que el péptido precursor amiloide es degradado por una serie de enzimas originando el péptido $\text{A}\beta_{1-42}$, el cual forma oligómeros, agregados y placas seniles, que se encuentran en el cerebro de pacientes que padecen Alzheimer. Las causas de la activación de la ruta amiloidogénica son el envejecimiento y mutaciones en genes de la ruta amiloide, principalmente APP, PS1 y PS2. Como consecuencia, se produce una alteración de la homeostasis de Ca^{2+} , desencadenando en último término la enfermedad de Alzheimer.

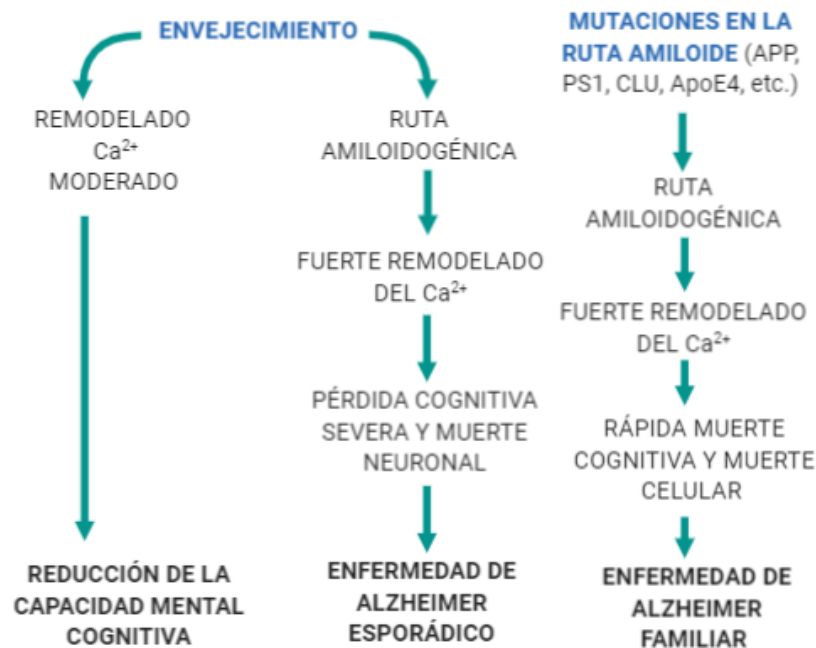


Figura 4. Posibles rutas implicadas en la aparición de Alzheimer por remodelado del Ca^{2+} citosólico (Basado en Samad N et al., 2017). Diferentes mutaciones inducen la acumulación excesiva de $\text{A}\beta_{1-42}$, originando la enfermedad de Alzheimer familiar (derecha). Por otro lado, el envejecimiento por causas desconocidas puede activar la ruta amiloidogénica, originando la enfermedad de Alzheimer esporádico (izquierda).

Las neuronas aumentan la $[Ca^{2+}]$ citosólico cuando son incubadas durante varias horas con el péptido $A\beta_{1-42}$ (Mattson MP et al., 1992). Además, estudios de nuestro laboratorio concluyeron que la interacción de los oligómeros del péptido amiloide ($A\beta_o$) con la membrana plasmática tiene como consecuencia un aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} y la muerte neuronal (Sanz-Blasco S et al., 2008).

Múltiples estudios han intentado averiguar cómo se produce este aumento del Ca^{2+} en el citosol, generándose distintas hipótesis y mecanismos:

- Formación del poro amiloide: En cultivos primarios de hipocampo se ha visto que el péptido $A\beta_{1-42}$ forma unas estructuras similares a canales catiónicos selectivos permeables a Ca^{2+} (Simakova O y Arispe NJ, 2006).
- Permeabilización de la membrana: El péptido $A\beta_{1-42}$ disminuye el grosor de la membrana celular, lo que dificulta a la propia neurona mantener estables las concentraciones iónicas internas. De esta manera, se originaría un flujo de Ca^{2+} desde el exterior hacia el citoplasma, con la consecuente liberación de Ca^{2+} de los depósitos (Demuro A et al., 2005).
- Modulación de canales: Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ producen un aumento de la actividad del receptor de NMDA, en consecuencia, ante la estimulación por glutamato aumentaría el flujo de Ca^{2+} (Mattson MP, 2004).

El péptido amiloide también afecta la homeostasis del Ca^{2+} en los compartimentos celulares:

- En la enfermedad de Alzheimer el flujo de Ca^{2+} entre la mitocondria y el retículo se ve alterado. La mitocondria capta una cantidad Ca^{2+} mayor, la cual si es excesiva puede culminar en la muerte neuronal (Berridge MJ, 2010). Además, nuestro propio grupo de investigación determinó que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y no las fibrillas, al estimular la entrada de Ca^{2+} al interior celular causan una sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria; lo que provoca la muerte de la neurona (Sanz-Blasco S et al., 2008). También se ha visto que el péptido amiloide puede localizarse en la membrana de las mitocondrias, provocando en ellas cambios estructurales y funcionales (Caspersen C et al., 2005).
- En el RE se localizan unas proteínas integrales de membrana llamadas presenilinas: PS1 y PS2. En cultivos neuronales se ha visto que mutaciones en PS1 producen un aumento de la liberación de Ca^{2+} desde el RE cuando hay estimulación por ligandos que activan los RyR o la producción de IP_3 (Guo Q et al., 1996).

2. OBJETIVOS

El envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas asociadas al mismo, como la enfermedad de Alzheimer, están vinculados a cambios en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular que incluyen pérdida de la entrada capacitativa de calcio que podría ser necesaria para procesos de plasticidad sináptica y cambios en la liberación de calcio del retículo que podrían ser relevantes en el metabolismo neuronal y la susceptibilidad a la muerte neuronal.

El objetivo principal de este *Trabajo de Fin de Máster* es profundizar en el estudio del remodelado del calcio intracelular en el envejecimiento neuronal y la enfermedad de Alzheimer. Para ello utilizaremos nuevas herramientas farmacológicas para determinar la posibilidad de modular positivamente la entrada capacitativa de calcio que se pierde progresivamente en el envejecimiento neuronal, y trataremos de comprender los cambios en la liberación de calcio estudiando la expresión y actividad de los receptores de IP_3 . Por tanto, los objetivos específicos planteados en este trabajo de TFM son los siguientes:

1. Estudiar si el compuesto MDEB que potencia la SOCE en otros tipos celulares, es capaz de potenciar SOCE en neuronas de hipocampo de rata, cultivadas a tiempos cortos (neuronas jóvenes) y largos (neuronas envejecidas).
2. Estudiar la expresión de los IP_3 Rs en neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas tras el tratamiento con $\text{A}\beta_0$, la principal neurotoxina en la enfermedad de Alzheimer.
3. Estudiar la actividad de los IP_3 Rs en cultivos de neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas tras el tratamiento con $\text{A}\beta_0$.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1.- MATERIAL, REACTIVOS Y MEDIOS.

Tabla 1. Material y reactivos.

Casa Comercial	Materiales y reactivos
Bachem AG (Bubendorf, Suiza)	Péptido A β ₁₋₄₂
BD (Madrid, España)	Poly-D-Lysina; Anticuerpo primario policlonal de ratón α -IP ₃ R3
Gibco (Barcelona, España)	HBSS; Neurobasal; B27; suero de caballo; Gentamicina; L-Glutamina; PBS; MEM; suero de cabra
Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU)	Fura2/AM; Fluo-4/AM; Medio DMEM alta glucosa (4,5 g/l)
Lonza (Barcelona, España)	Suero Fetal Bovino (FBS), Penicilina-Estreptomina
Merck (Madrid, España)	N,N,N',N'-tetraacético (EGTA); KCl; Na ₂ HPO ₄ ; KH ₂ PO ₄ ; HCl; MgCl ₂ ; NaCl; NaOH; Tris-HCl; Tritón X-100; CaCl ₂ ; Glucosa
Millipore	Filtros estériles PVDF 0,22 μ m
Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU)	Anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488; Anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594
Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, EE.UU)	Anticuerpo primario policlonal de cabra α -IP ₃ R1 Anticuerpo primario policlonal de cabra α -IP ₃ R2
Sichem GmbH (Bremen, Alemania)	IP ₃ enjaulado
Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)	MDEB; DNAsa I (1 mg/ml), HEPES, Albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA), 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI); Paraformaldehído (PFA)
Worthington (Lakewood, NJ, EE. UU)	Papaína (27,2 U/mgP)

Tablas 2 y 3. Medios.

Medios para el cultivo de neuronas de hipocampo de rata	Composición
DMEM F12 HAM's (pH 7,42)	DMEM (Medio de Eagle modificado por Dubelcco) alta glucosa (4,5 g/l); HEPES 25 mM; NaHCO ₃ 4 mM
HANK's BSA 0,6%	HBSS (Solución salina balanceada de Hank); 0,6% BSA
Neurobasal suplementado	Neurobasal; Gentamicina 1 μ g/ml; L-glutamina 2mM; 2% B27; 10% FBS.
Tampón Fosfato Salino (PBS)	NaCl 136 mM; KCl 2,7 mM; Na ₂ HPO ₄ 8 mM; KH ₂ PO ₄
MEM	DMEM (4,5 g/l); Cu ²⁺ 0,5 g/l; Fe ²⁺ 1,3 mg/l; Zn 0,5 g/ml

Medios utilizados en experimentos de imagen de Ca ²⁺	Composición
Medio libre de Calcio (Ca0) (pH 7,42)	NaCl 145 mM; KCl 5mM; MgCl ₂ 1 mM; HEPES 10 mM; Tris-HCl 1mM-EGTA 0,5 mM; Glucosa 10 mM
Medio externo estándar (MEC, Ca1) (pH 7,42)	NaCl 145 mM; KCl 5 mM; MgCl ₂ 1 mM; HEPES 10 mM; CaCl ₂ 1 mM; Glucosa 10 mM
Ca0+CIC	Ca0; TTX 1 μM; CNQX 10 μM; Nifedipina 5 μM; D-AP5 10 μM
Ca1+CIC	Ca1; TTX 1 μM; CNQX 10 μM; Nifedipina 5 μM; D-AP5 10 μM
Ca0+CIC+MDEB	Ca0+CIC; MDEB 1 mM
Ca1+CIC+MDEB	Ca1+CIC; MDEB 1 mM
Medio libre de magnesio (Mg 0) (pH 7,42)	NaCl 146 mM; KCl 5 mM; HEPES 10 mM; Glucosa 10 mM; CaCl ₂ 1 mM
NMDA 100 μM	Mg0; NMDA 100 μM; Glicina 10 μM; CaCl ₂ 100 μM; Glucosa 100 μM

3.2.- MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.2.1 Obtención y cultivo de neuronas de hipocampo de ratas neonatas:

El cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata se realizó siguiendo el protocolo de Brewer (Brewer et al., 1993), previamente utilizado como modelo de estudio de envejecimiento neuronal. Las ratas Wistar neonatas (0-1 días) se recogieron del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, y fueron manipuladas según las normas éticas aprobadas por la Facultad de Medicina de Valladolid, las cuales se rigen por el Convenio ETS 123-Directiva 86/609/EEC del Consejo Europeo. La *Figura 5* muestra un esquema de la preparación de los cultivos de neuronas de hipocampo. Brevemente, en el laboratorio, los cuerpos de los animales se colocaron en posición ventral y se realizó la eutanasia por decapitación. Los cráneos se abrieron con tijeras y pinzas, y se extrajeron los cerebros, los cuales fueron manipulados sobre placas Petri con medio DMEM F-12 HAM's. Con ayuda de una lupa e instrumental quirúrgico, se aislaron los hipocampos en medio HANK's BSA 0.6% y se trocearon. Los fragmentos resultantes se pasaron a una solución de papaína (28 μl papaína (20 u/ml) y 1600 μl de medio HANK's BSA 0.6%) y se incubaron durante 15 min a 37 °C y 10% CO₂. Transcurrido este tiempo, se añadieron 80 μl de DNAsa (1 mg/ml) y se incubaron de nuevo 15 min a 37 °C y 10% CO₂. Los fragmentos se introdujeron en un tubo con fondo cónico con 4 ml de medio Neurobasal, donde se procedió a la digestión mecánica de los mismos con una pipeta de 5 ml. Las células en suspensión se centrifugaron a 900 rpm durante 4 min y a 24 °C. El pellet resultante se resuspendió cuidadosamente en 100 μl de suero de caballo y 900 μl de medio Neurobasal. En cámaras Neubauer se realizó el conteo de células y en función de la densidad celular de la solución, se sembró el volumen correspondiente a 30.000 células por pocillo en placas NUNC, sobre cristales de 12 mm de diámetro tratados previamente con poly-D-Lysina. Los cultivos celulares se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ durante diferentes periodos de días *in vitro* (DIV).

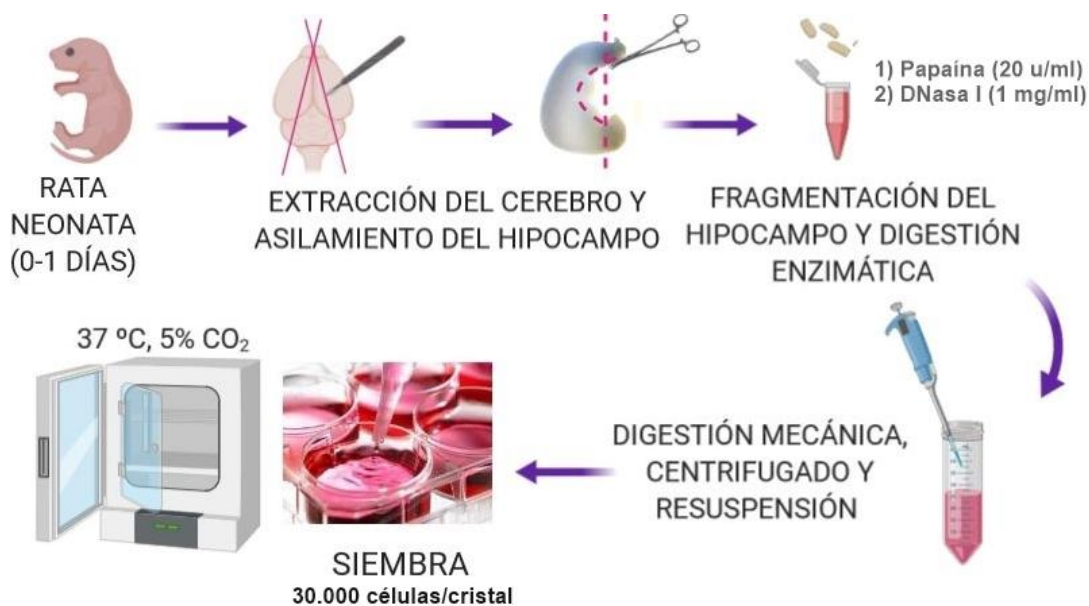


Figura 5. Preparación de cultivo de neuronas de hipocampo. Basado en el protocolo de Brewer (Brewer et al., 1993).

3.2.2 Registro de Ca^{2+} citosólico mediante imagen de fluorescencia:

La sonda fluorescente Fura2/AM permite la monitorización de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico en tiempo real, a nivel de célula única. Utilizando microscopía de imagen de fluorescencia se pueden estudiar las variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en respuesta a diferentes estímulos.

El Fura2/AM es una modificación de la molécula de Fura2, a la cual se le añadió un grupo éster, que por su hidrofobicidad permite al compuesto atravesar de forma pasiva la membrana plasmática. En el interior celular, la molécula es de-esterificada por esterasas intracelulares que liberan la molécula de Fura2 ácido, que por su carga negativa no puede atravesar la membrana quedando el fluoróforo retenido en el interior celular (Grynkiewicz, 1985). El Fura2/AM es un quelante de alta afinidad por Ca^{2+} , cuyos restos aromáticos le confieren propiedades fluorescentes: tras la unión a Ca^{2+} , la excitación de la molécula a 340 nm aumenta la emisión de fluorescencia; sin embargo, esta cae al excitar con 380 nm. Por ello, las medidas de fluorescencia con Fura2/AM se hacen de forma ratiométrica: 340/380 nm; lo que permite trabajar con una mayor sensibilidad, hacer mediciones independientes de la carga de colorante de la célula y eliminar artefactos asociados a la imagen de fluorescencia.

En los experimentos de imagen de calcio se utilizaron cultivos de neuronas de hipocampo jóvenes (5-7 DIV) y cultivos envejecidos (20-22DIV); sembrados en cristales de poly-D-Lysina de 12 mm de diámetro, a una densidad de 30.000 células e incubados con Fura2/AM (4 μM , 1h, temperatura ambiente, oscuridad). Con el fin de hacer mediciones únicamente de la entrada capacitativa de Ca^{2+} (SOCE) se utilizó la solución CIC (cóctel inhibidor de canales voltaje dependientes). El CIC está compuesto por: tetradotoxina (TTX, 1 μM), inhibidor de canales de Na^+ voltaje dependientes; cyanquixaline (CNQX, 10 μM) antagonista competitivo de receptores AMPA y kainato; Nifedipina (5 μM), bloqueante de canales de Ca^{2+} de tipo dihidropiridina y D-AP5 (10 μM), antagonista de los receptores de NMDA. Las células cargadas con Fura2/AM se incubaron con tapsigargina, un bloqueante de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (1 μM , 30 min, temperatura ambiente, oscuridad). Se utilizó un

microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert S100 TV) con una plataforma de perfusión termostatazada, que mantenía los medios perfundidos sobre los cristales a 37 °C (*referenciados en Tabla 3, material y métodos*).

La lámpara de epi-iluminación Zeiss X-Cite Series 120 se utilizó para excitar las muestras de forma alternativa a 340 y 380 nm, con una rueda de filtros (Warner Instruments). La fluorescencia emitida a 505 nm fue recogida por la cámara Orca ER (Hamamatsu Photonics). Los registros se hicieron con el objetivo de 40x de inmersión en aceite (Zeiss 40/1,30), utilizando el programa analizador de píxeles Aquacosmos 2.0 (Hamamatsu).

3.2.3 Tratamiento con A β :

Para el estudio de los efectos de los oligómeros del péptido A β_{1-42} (A β_o) en neuronas de hipocampo se prepararon los oligómeros siguiendo el protocolo de preparación descrito por el laboratorio (Caballero E et al., 2016). Específicamente, A β_{1-42} se mantuvo a -20 °C disuelto en DMSO hasta el día anterior al tratamiento de las células, momento en el que se procede a realizar su oligomerización: 1,6 μ l de A β_{1-42} se diluyeron en 98,4 μ l de medio MEM, y la solución resultante se trató con ultrasonidos durante 10 min. El péptido se incubó a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se trataron los cultivos de neuronas con el péptido amiloide, cuya concentración teórica es de 1-2 μ M; sin embargo, estudios previos del laboratorio estimaron que la concentración es aproximadamente cuatro veces menor (*Figura 6*). Los cultivos se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5% CO₂.

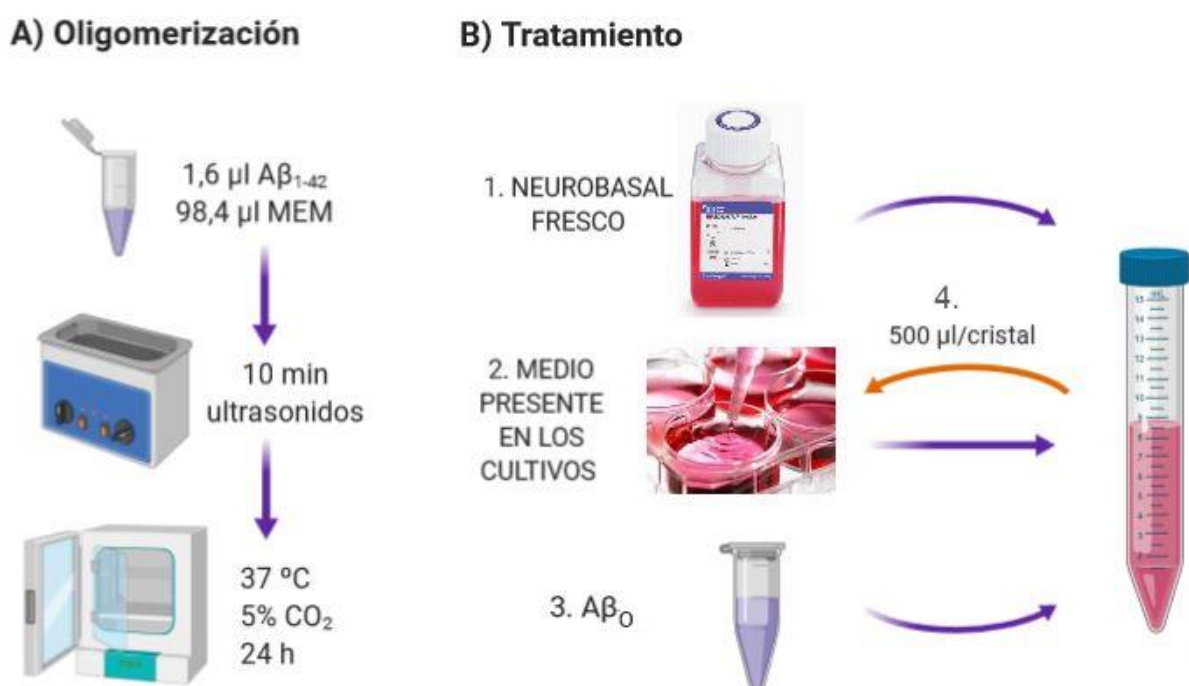


Figura 6. Tratamiento de cultivos de hipocampo de rata con A β_o . **A)** Día 1: Oligomerización del péptido A β_{1-42} . **B)** Día 2: Tratamiento de las neuronas de hipocampo. En función de la condición experimental de los cultivos, se siguió el siguiente esquema:

- *Jóvenes control:* medio placas jóvenes + Neurobasal hasta 500 μ l/cristal + 25 μ l MEM.
- *Jóvenes experimental:* medio placas jóvenes + Neurobasal hasta 500 μ l/cristal + 25 μ l A β_o .
- *Envejecidas control:* medio placas envejecidas + Neurobasal hasta 500 μ l/cristal + 25 μ l MEM.
- *Envejecidas experimental:* medio placas envejecidas + Neurobasal hasta 500 μ l/cristal + 25 μ l A β_o .

3.2.4 Inmunofluorescencia:

La inmunofluorescencia es una técnica que permite analizar la presencia de determinadas moléculas mediante el uso de anticuerpos. En este estudio las moléculas de interés son las tres isoformas de los receptores de IP₃ (IP₃R 1-3). Los cristales sembrados con neuronas de hipocampo se lavaron con una solución de PBS 1% y se fijaron incubando con paraformaldehído al 4% (200 µl/cristal, 20 min). Tras nuevos lavados con PBS 1%, las células se permeabilizaron con tritón 0.1% durante 10 min y se bloquearon los sitios de unión inespecífica con suero de cabra 20% (200 µl/cristal, 10 min). Seguidamente, se incubaron las células con el anticuerpo primario (*Tabla 4*) para cada isoforma del receptor de IP₃, a una dilución 1:50 (45 µl suero de cabra 20%, 5 µl tritón 1% y 1 µl de anticuerpo primario, 4 °C y 12 h en oscuridad). Transcurrido este tiempo, se lavaron los cristales con PBS 1% y se incubaron con el anticuerpo secundario (*Tabla 4*), que lleva ligado un resto fluorescente, a una dilución 1:300 en suero de cabra 10% (75 µl/cristal, 1 h, temperatura ambiente y oscuridad). La imagen de fluorescencia permite identificar y determinar semicuantitativamente la expresión de los antígenos, en este caso los IP₃Rs.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia.

	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
IP ₃ R1	α-IgG IP ₃ R1 cabra	anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (fluorescencia verde)
IP ₃ R2	α-IgG IP ₃ R2 cabra	anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (fluorescencia verde)
IP ₃ R3	α- IgG IP ₃ R3 ratón	anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594 (fluorescencia roja)

Transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo secundario, los cristales se lavaron con PBS 1% y se tiñeron los núcleos con DAPI a una dilución 1:5000 en suero de cabra 10% (250 µl/cristal, 10 min, temperatura ambiente y oscuridad). Seguidamente, se lavaron las células PBS 1% y con agua desionizada. Finalmente, los cristales se colocaron sobre un portaobjetos utilizando Vectashield como medio de montaje (3 µl/cristal).

3.2.5 IP₃ enjaulado o *Caged-Ins (1, 4, 5)P₃/PM*:

El IP₃ enjaulado (*caged-IP₃*) es una molécula compleja que mediante una reacción de fotólisis permite la liberación de IP₃, el cual de manera fisiológica interacciona con los IP₃Rs permitiendo la liberación de Ca²⁺ de los depósitos. La estructura de este compuesto se basa en una molécula de IP₃ que interacciona por su grupo 6-hidroxilo con un grupo nitrodimetoxibencilo, que bloquea su actividad biológica. Esta estructura es capaz de atravesar la membrana plasmática de forma inactiva gracias a un grupo propionoximeileno (PM) que por un enlace éster protege los grupos fosfato de la molécula de IP₃. Una vez atravesada, el compuesto es atacado por esterazas que rompen el enlace éster que une el grupo PM; en neuronas esto ocurre aproximadamente a los 90-120 min desde su administración. Seguidamente, el cultivo se irradia con un láser a 400 nm, lo que produce la fotólisis del compuesto y la inmediata liberación de la molécula de IP₃ en su forma biológicamente activa (*Figura 7*). Para observar la liberación de Ca²⁺ de los depósitos se

utilizó el compuesto Fluo-4/AM, una sonda fluorescente que se une a Ca^{2+} ; cuyo máximo de excitación se encuentra a 494 nm y el de emisión a 506 nm.

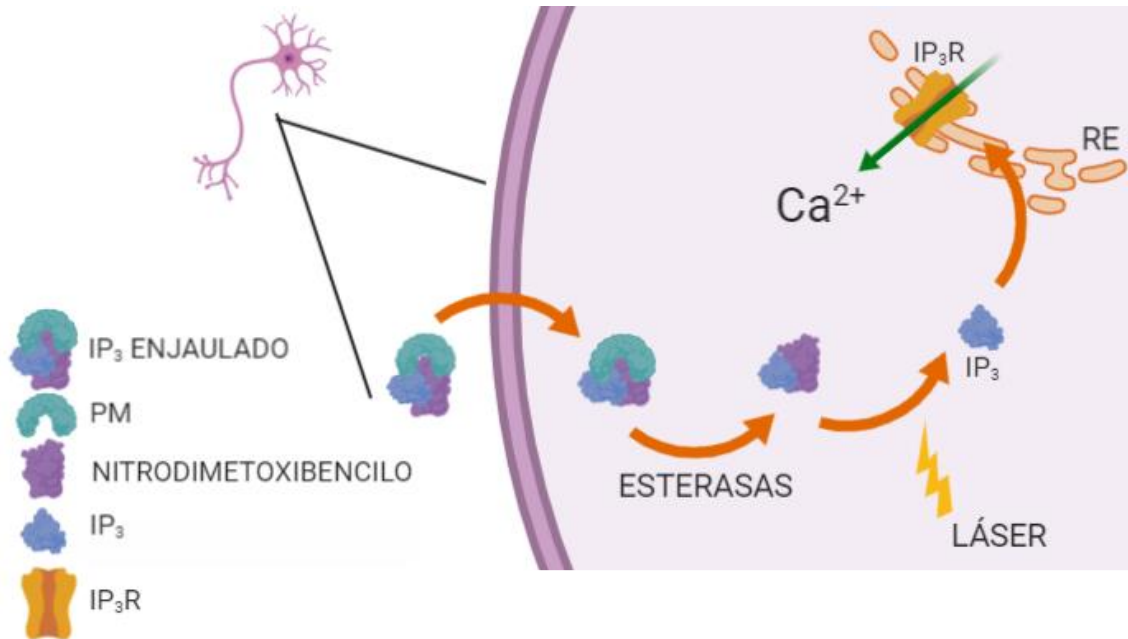


Figura 7. Liberación de Ca^{2+} de los depósitos por la acción del IP_3 enjaulado.

Los cristales cultivados con neuronas jóvenes y envejecidas, se lavaron con medio externo estándar (MEC) y se incubaron con el medio de carga: 2 μM Fluo-4 y 4 μM caged- IP_3 en MEC (250 μl /cristal, 2 h, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 y oscuridad). Se utilizó el microscopio confocal Leica TCS SP5 para llevar a cabo la fotólisis del compuesto y el análisis de la liberación de Ca^{2+} de los depósitos. Los datos de fluorescencia obtenidos se normalizaron respecto a la basal ($F-F_0$).

3.2.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos, y en primer lugar se realizaron diversos modelos lineales y se evaluaron las suposiciones de homocedasticidad y normalidad de los datos. En caso de violarse alguno de estos supuestos del modelo, se procedió eliminando outliers o transformando las variables respuesta. Posteriormente se evaluó la significación de cada factor, así como sus interacciones, mediante el análisis de la varianza. En caso de que algún factor resultase significativo, se hicieron las correspondientes comparaciones dos a dos para analizar exactamente entre qué niveles del factor en cuestión hubo diferencias significativas. Estas comparaciones dos a dos se realizaron mediante métodos que controlan las tasas de error para hacer frente al problema de las comparaciones múltiples y evitar así falsos positivos, como puede ser la prueba de LSD de Fisher o Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1.- EFECTOS DE MDEB SOBRE SOCE EN NEURONAS JÓVENES Y ENVEJECIDAS.

La disminución de SOCE en cultivos primarios de neuronas envejecidas con respecto a cultivos jóvenes planteó la cuestión de la posibilidad de aumentar esta entrada de Ca^{2+} en cultivos a largo plazo; con el fin de revertir el efecto del envejecimiento en neuronas. Con este propósito, se estudiaron los efectos del compuesto MDEB como potenciador de SOCE (Figura 8).

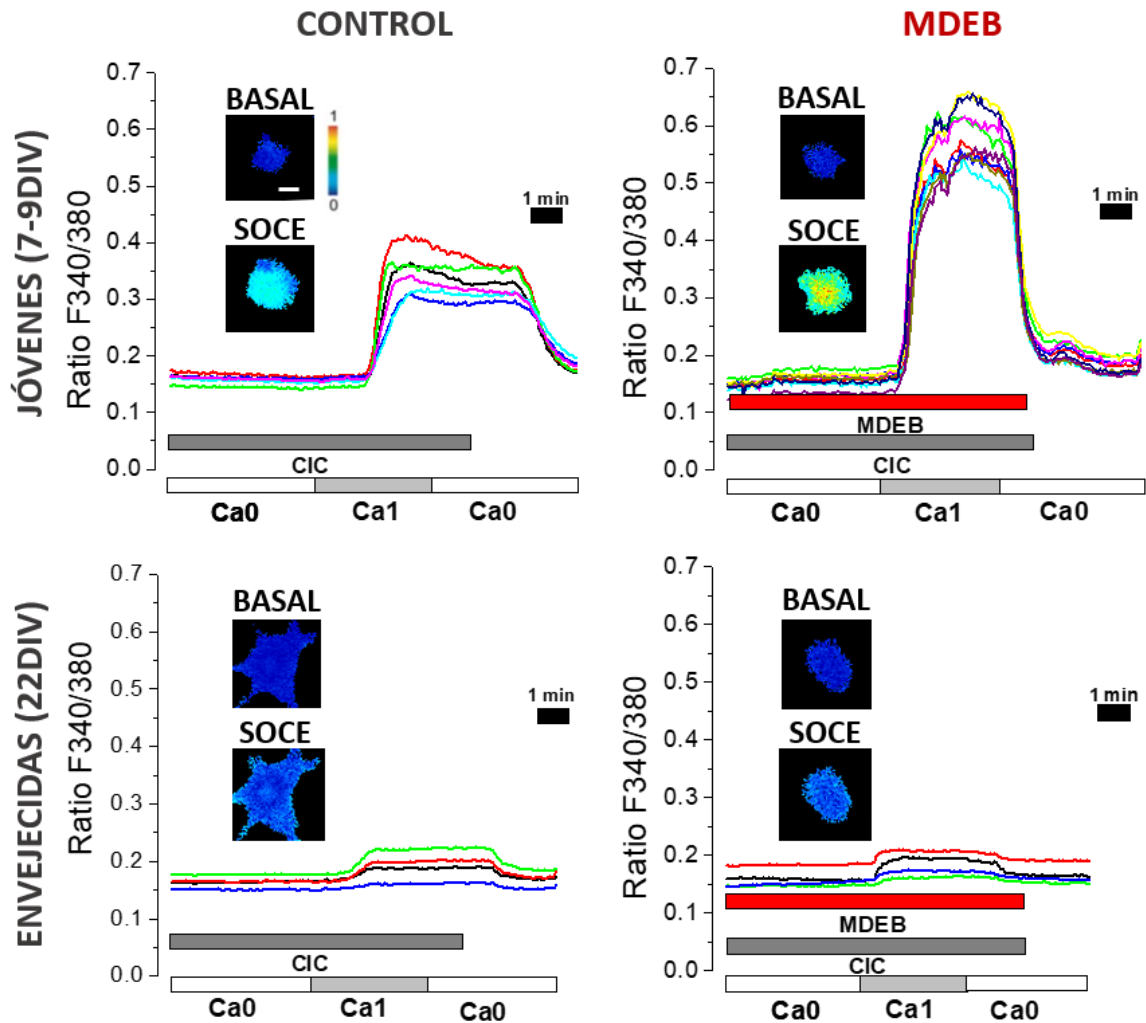


Figura 8. Efecto del compuesto MDEB sobre la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósitos neuronas jóvenes y envejecidas. Las neuronas de hipocampo jóvenes (7-9 DIV) y envejecidas (22 DIV) fueron cargadas con Fura-2/AM y estimuladas con MDEB (1mM) durante 4 minutos en medio externo libre de Ca^{2+} (Ca_0) y cóctel inhibidor de canales voltaje dependientes (CIC). Registros representativos de los niveles de Ca^{2+} medidos por fluorescencia (Ratio F340/F380) a nivel de célula única. Imágenes insertadas son representativas de los niveles de Ca^{2+} en neuronas jóvenes y envejecidas; en cada gráfica arriba en estado basal y abajo la misma célula durante la SOCE. La barra blanca simboliza 10 μm en todas las imágenes y la escala de pseudocolor ratio 0-1.

Se trataron neuronas jóvenes y envejecidas con tapsigargina (1 μM , 10 min) en medio libre de Ca^{2+} (Ca_0) y se estimuló la entrada capacitativa de Ca^{2+} añadiendo calcio al medio. Debido a la amplia presencia de canales de calcio en estas neuronas y para descartar la entrada de Ca^{2+} por otros canales se añadió CIC (TTX 1 μM ; CNQX 10 μM ; Nifedipina 5 μM ; D-AP5 10 μM) al medio. La *Figura 9* muestra que, como se ha descrito previamente, SOCE es mucho mayor en neuronas jóvenes que en las envejecidas. Además, se muestra que el uso del compuesto MDEB (1 mM) aumenta SOCE en neuronas jóvenes de forma significativa. Sin embargo, este compuesto no tiene efecto sobre SOCE en neuronas envejecidas *in vitro*.

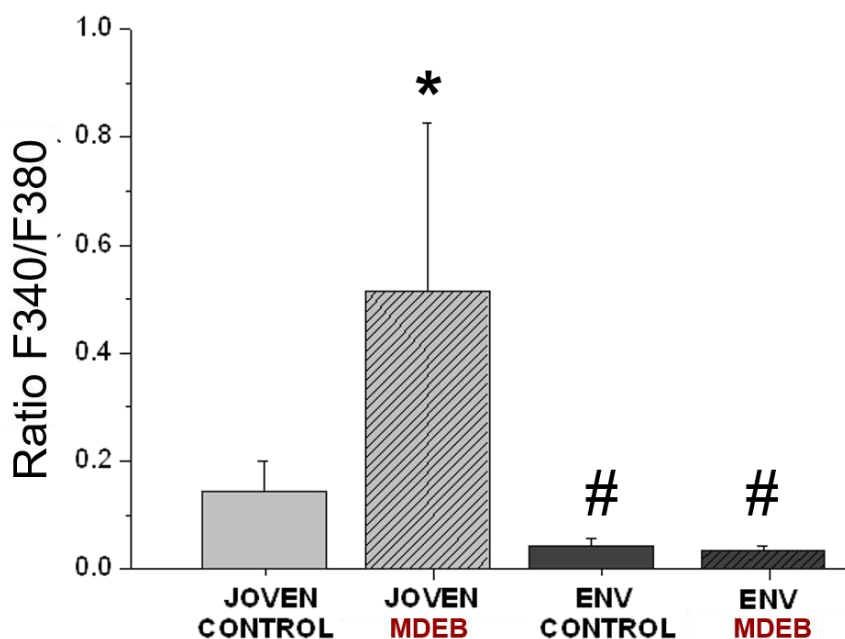


Figura 9. Análisis del efecto del compuesto MDEB sobre la entrada de Ca^{2+} dependiente de depósitos en neuronas jóvenes y envejecidas. Las barras representan la densidad óptica (Ratio F340/F380) como media \pm error estándar. n= 6, 3, 8 y 14 experimentos (2-10 neuronas de hipocampo por experimento). *p <0.05 en comparación con el grupo control. #p <0.05 en comparación con los jóvenes.

4.2.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE IP_3 (IP_3RS) POR INMUNOFLUORESCENCIA.

Se estudió la expresión de las tres isoformas del receptor de IP_3 ($\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$ e $\text{IP}_3\text{R3}$) en neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas, tras el tratamiento con los oligómeros del péptido amiloide ($\text{A}\beta_0$) durante 24 h. El análisis inmunocitoquímico se realizó de forma independiente para las tres isoformas, mostrándose los resultados obtenidos en la *Figura 10*.

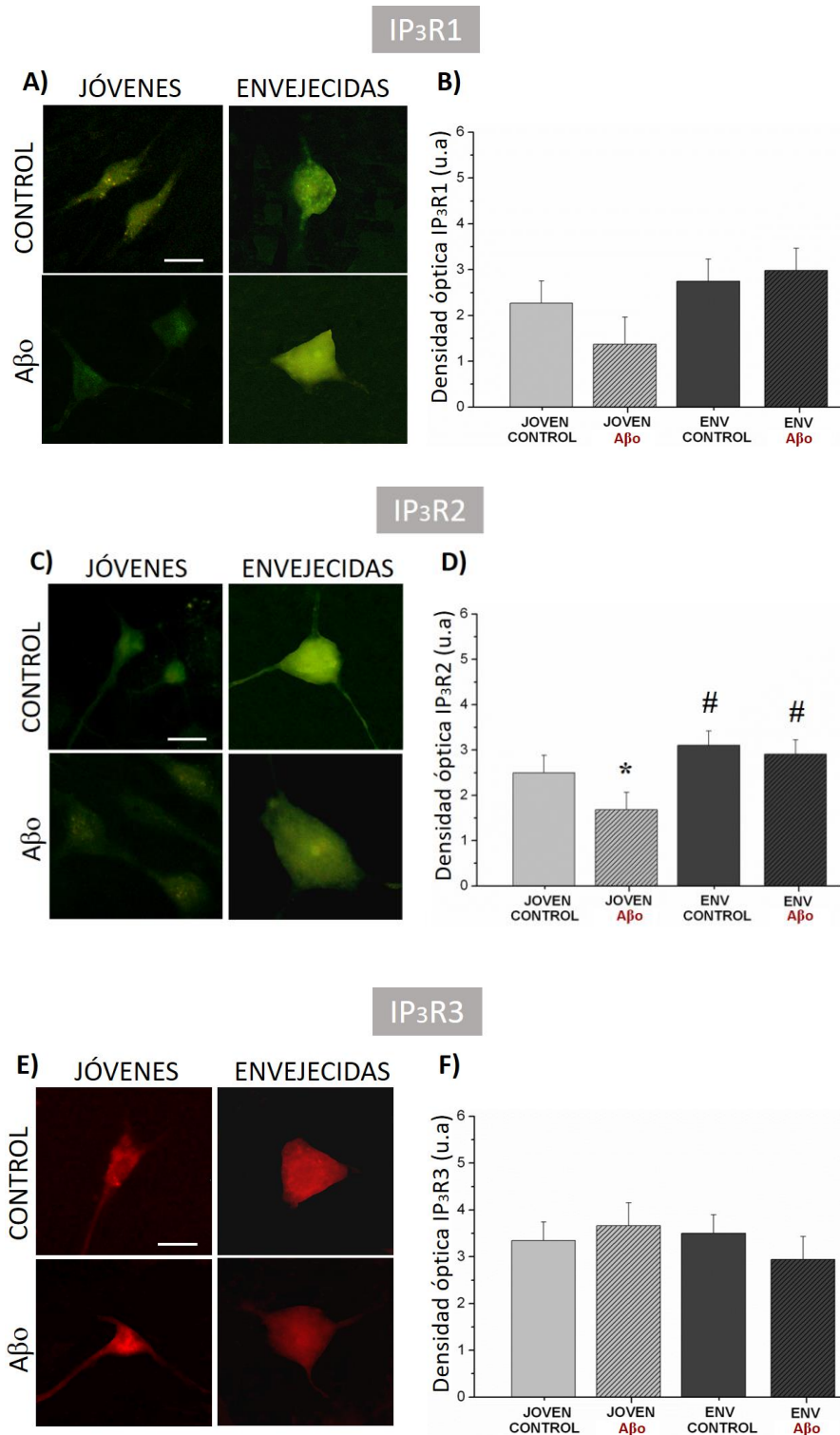


Figura 10. Expresión de los IP₃Rs en neuronas de hipocampo de rata tratadas con Aβ_o. Análisis inmunocitoquímico de la expresión de IP₃Rs en cultivos de neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas tratadas con los oligómeros del péptido Aβ₁₋₄₂. **(A, C, E)** Imágenes representativas de la fluorescencia detectada en cultivos jóvenes (6-7 DIV) y cultivos envejecidos (21-22 DIV), tratados con Aβ_o (1 μM, 24 h) o control. La barra representa 10 μm en todas las imágenes. **(B, D, F)** Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia (densidad óptica, unidades arbitrarias). Las barras representan la media ± error estándar. n_(IP₃R1)= 232, 112, 76 y 107; n_(IP₃R2)= 163, 121, 80 y 92; n_(IP₃R3)= 115, 106, 85 y 90 neuronas respectivamente, procedentes de 4 cultivos independientes. *p<0.05 en comparación con el grupo control. # p <0.05 en comparación con los jóvenes.

- **IP₃R1**: La tendencia de la expresión de la isoforma 1 del receptor es de aumentar en las células envejecidas respecto a las jóvenes. En cuanto al tratamiento con Aβ_o, muestran una tendencia de disminución de la expresión de IP₃R1 en neuronas jóvenes y de aumento en envejecidas.
- **IP₃R2**: La expresión de la isoforma 2 del receptor es mayor en neuronas envejecidas que en cultivos jóvenes. El tratamiento con Aβ_o hace que exista una tendencia de disminución de la isoforma 2 del receptor, tanto en jóvenes como en envejecidas, siendo en el primer caso, una disminución significativa.
- **IP₃R3**: La isoforma 3 del receptor presenta una expresión similar en células jóvenes y envejecidas, ya sean tratadas con Aβ_o o control.

4.3.- MEDIDA DE LA LIBERACIÓN DE Ca²⁺ TRAS EL ESTÍMULO CON CAGED-IP₃

El siguiente paso en la investigación fue analizar la liberación de Ca²⁺ del RE, inducida por la molécula *caged-IP₃*, la cual libera IP₃ intracelularmente activando los IP₃Rs permitiendo la salida de Ca²⁺ de los depósitos. Los resultados de los niveles de Ca²⁺ liberados por el RE en cultivos a corto y largo plazo; y tratados con los oligómeros del péptido Aβ₁₋₄₂, se muestran en las Figuras 11 y 12.

El envejecimiento produce sobre las neuronas un aumento de la liberación de Ca²⁺ desde el RE a través de los IP₃Rs. El tratamiento de las neuronas jóvenes con Aβ_o produce en las mismas una disminución de la liberación de Ca²⁺ a través de dichos receptores. De forma destacable, las neuronas de cultivos envejecidos no tratadas con el péptido muestran una liberación grande de Ca²⁺ desde el RE, siendo ésta sostenida en el tiempo.

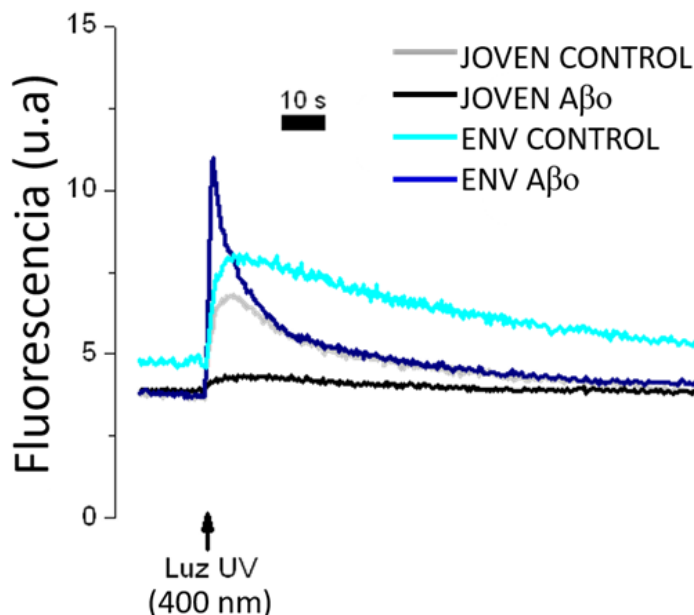


Figura 11. Liberación de Ca²⁺ a través de los IP₃Rs por la molécula *caged-IP₃* en células de hipocampo de rata tratadas con Aβ_o. Neuronas de hipocampo jóvenes (7-9 DIV) y envejecidas (21-22 DIV) tratadas con Aβ_o (1 μM) o no tratadas (control) fueron cargadas con Fluo-4/AM y *caged-IP₃* (3 μM) en medio externo estándar (Ca1). El *caged-IP₃* fue fotoliberado mediante irradiación a 400nm. Se tomaron imágenes de fluorescencia mediante microscopía confocal para estimar la salida de Ca²⁺ a través de los receptores de IP₃ en neuronas. Se muestran registros representativos de los niveles de Ca²⁺ medidos por fluorescencia (u.a) a nivel de célula única.

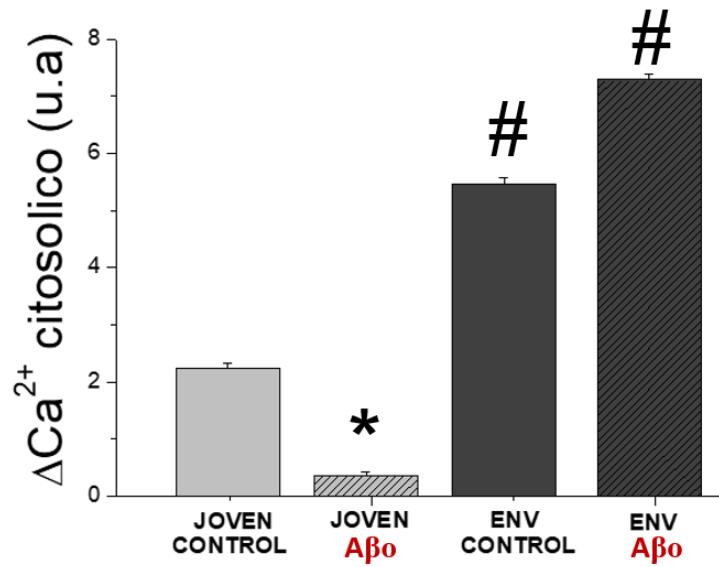


Figura 12. Análisis de la liberación de Ca²⁺ a través de los IP₃Rs por la molécula caged-IP₃ en células de hipocampo de rata tratadas con Aβ₀. Las barras representan la fluorescencia como media ± error estándar del incremento de fluorescencia de un experimento representativo de los 7 experimentos llevados a cabo. n= 3, 8, 11 y 3 células, respectivamente. *p <0.05 en comparación con el grupo control. #p <0.05 en comparación con los jóvenes.

5. DISCUSIÓN

El aumento de la esperanza de vida y la reducción progresiva de la mortalidad hacen que en los países desarrollados exista un aumento de la población anciana, generando así un importante reto sanitario, social y económico. La investigación en envejecimiento y patologías asociadas supone un punto de apoyo para tratar este creciente problema. El tiempo produce sobre los seres vivos un acúmulo de alteraciones a nivel celular; entre estas, encontramos la desregulación de la homeostasis de Ca^{2+} . Dado que el Ca^{2+} es un segundo mensajero de gran relevancia en la célula, no es de extrañar su participación en estos procesos asociados a una edad longeva.

Una de las líneas de investigación de nuestro laboratorio busca entender cómo ocurren los procesos celulares relacionados con el Ca^{2+} intracelular y el envejecimiento. Estudios previos de determinaron que en neuronas envejecidas existe una baja SOCE, en comparación con la alta entrada existente neuronas jóvenes (Calvo-Rodríguez M et al., 2016). Puesto que una baja SOCE está asociada a la falta de estabilidad de las neuritas, nos planteamos que podría ser interesante tratar de aumentar SOCE en las neuronas envejecidas y quizás así restaurar la pérdida cognitiva asociada al envejecimiento. Para ello, decidimos estudiar los efectos de potenciador de la SOCE recientemente propuesto, el MDEB. Los resultados muestran que la entrada capacitativa de Ca^{2+} se vio claramente aumentada en neuronas jóvenes con el uso del potenciador, sin embargo, en las neuronas envejecidas, con mucha menor SOCE, no se observó ningún efecto. Una posible explicación para el efecto potenciador del MDEB en cultivos de neuronas a corto plazo y no en cultivos a largo plazo podría estar relacionado con la expresión de ORAI1 en las neuronas. Los estudios de Aleaddine Djillani sobre el MDEB determinaron que la funcionalidad de este compuesto es dependiente de la presencia del canal ORAI1 en la membrana de las células (Djillani A et al., 2015). Siguiendo este contexto, estudios previos del laboratorio determinaron que las neuronas de hipocampo de cultivos envejecidos expresan bajos niveles del canal ORAI1 (Calvo-Rodríguez M et al., 2016), pudiendo ser esta la razón por la que el compuesto MDEB no tiene efecto potenciador en las neuronas de hipocampo envejecidas. Los resultados obtenidos invitan a probar nuevos potenciadores de SOCE u otras estrategias que pudiesen tener efecto sobre las neuronas de cultivos a largo plazo, precisamente las neuronas a las que sería interesante potenciar SOCE en el contexto de la restauración de las plenas funcionalidades neuronales perdidas durante el proceso de envejecimiento, o debidas a la enfermedad de Alzheimer.

Además de los cambios en SOCE, nuestro laboratorio ha descrito que el envejecimiento neuronal está asociado a un aumento del nivel de llenado de los depósitos de calcio intracelular, mayor liberación de calcio inducida por cafeína que activa el proceso CICR y mayor respuesta a acetilcolina que activa receptores de IP_3 . Además, todos estos procesos se ven incrementados todavía más si las neuronas envejecidas son tratadas con oligómeros del péptido amiloide (Calvo-Rodríguez M et al., 2018 y 2019). La conclusión de estos estudios previos de nuestro grupo es que el envejecimiento promueve el acoplamiento funcional entre el RE y las mitocondrias. El elemento más importante de este acoplamiento es el receptor IP_3 , por tanto, determinar la expresión de las distintas isoformas de estos receptores y los efectos del envejecimiento y los oligómeros sobre la expresión y la funcionalidad de las isoformas es muy relevante para entender los mecanismo de muerte en las enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas vienen en gran parte determinadas por la edad. Dada su relación con el envejecimiento, resulta interesante cómo la presencia de tóxicos relacionados con estas patologías (como los $A\beta_0$ en el Alzheimer) produce alteraciones en la señalización por Ca^{2+} en modelos de envejecimiento. El Alzheimer es una de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes en la población. Numerosas investigaciones asocian esta enfermedad a la acumulación de la proteína amiloide ($A\beta_{1-42}$), la cual forma agregados en forma de oligómeros y placas seniles, que se encuentran en cerebros de pacientes de Alzheimer. Nuestro grupo de investigación estudia cómo la presencia de los oligómeros de la proteína $A\beta_{1-42}$ puede afectar a la homeostasis del Ca^{2+} en neuronas de hipocampo. Dada la relación entre el envejecimiento y el Alzheimer, y el papel de la señalización por Ca^{2+} en ambos procesos, surgió la incertidumbre sobre cómo la presencia de los oligómeros $A\beta_{1-42}$ podría provocar algún impacto sobre la expresión de los receptores IP_3 . Los resultados muestran que existe una tendencia al aumento de la expresión de dichos receptores en neuronas envejecidas respecto a las jóvenes. En cuanto al tratamiento de los cultivos de neuronas de hipocampo con los oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$, en cultivos jóvenes el tratamiento con $A\beta_0$ promueve una pequeña disminución de la expresión de la isoforma 2 del receptor de IP_3 (IP_3R2). Estos resultados sugieren que ni el envejecimiento ni el tratamiento con oligómeros del péptido amiloide parecen inducir cambios en la expresión de receptores de IP_3 , o al menos estos parecen insuficientes para explicar los cambios en la homeostasis del calcio intracelular durante el envejecimiento neuronal.

A pesar de que los posibles cambios en la expresión de IP_3 Rs no parecen ser muy significativos, ello no implica necesariamente que no haya diferencias en su actividad. Por ello, se llevó a cabo el análisis de la liberación de Ca^{2+} del RE por la estimulación de los IP_3 Rs con un análogo del IP_3 , el *caged-IP₃* o IP_3 -enjuado. Los resultados obtenidos con la aplicación del *caged-IP₃* en neuronas de hipocampo muestran una mayor liberación de Ca^{2+} de los depósitos en neuronas envejecidas respecto a cultivos jóvenes. Este resultado podría explicar los cambios en la liberación de calcio inducidos por acetilcolina en neuronas envejecidas descritos recientemente por nuestro laboratorio (Calvo-Rodríguez M et al., 2018). Además, los resultados muestran que el tratamiento con los oligómeros del péptido amiloide parece disminuir la actividad de los receptores de IP_3 en las neuronas jóvenes. Este cambio, de confirmarse, podría ser relevante ya que la actividad de los receptores de IP_3 es determinante en la fisiología neuronal. Se ha descrito que se requiere una cierta actividad de los receptores para que haya una entrada de calcio a la mitocondria mantenida para permitir la síntesis de ATP (Cárdenas C et al., 2000). En ausencia de este flujo, se produce la activación de la autofagia que puede conducir a la muerte neuronal. Es necesario confirmar los resultados expuestos en un mayor número de muestras.

Estos análisis suponen un pequeño aporte a la investigación en envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, aún queda mucho por conocer. Debido al gran desconocimiento, futuros experimentos podrían estar enfocados a la acción de los oligómeros del péptido $A\beta_{1-42}$ sobre otros componentes participantes en la homeostasis de Ca^{2+} o en una profundización sobre SOCE y la liberación de Ca^{2+} de los depósitos, elementos presentados en este trabajo.

6. CONCLUSIONES

Los estudios desarrollados en este *Trabajo de Fin de Máster* se pueden resumir en las siguientes conclusiones:

1. El cultivo primario de células de hipocampo de rata permite estudiar la señalización por Ca^{2+} , la expresión de los IP_3Rs y la liberación de Ca^{2+} desde el RE inducida por la molécula *caged-IP₃*.
2. Las neuronas de hipocampo de rata de cultivos a largo plazo no son sensibles al compuesto MDEB, potenciador de la SOCE. Sin embargo, las neuronas de hipocampo de rata de cultivos a corto plazo ven aumentada de forma significativa la SOCE en presencia de MDEB.
3. Las neuronas de hipocampo de rata tratadas con oligómeros del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ expresan las tres isoformas de los IP_3Rs ($\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$ e $\text{IP}_3\text{R3}$). Los estudios de inmunofluorescencia han mostrado el aumento de expresión de la isoforma $\text{IP}_3\text{R2}$ durante el envejecimiento y su disminución tras el tratamiento con $\text{A}\beta_o$ en neuronas jóvenes.
4. La liberación de Ca^{2+} desde el RE, mediante la estimulación de los IP_3Rs en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata, se ve incrementada durante el envejecimiento. El tratamiento con oligómeros del péptido $\text{A}\beta_{1-42}$ reduce la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3Rs en neuronas jóvenes.

7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación con referencia VA294P18 y RTI2018-099298-B-100; de la Junta de Castilla y León y el Ministerio de Ciencia e Innovación y Universidades. Agradecemos a M^a Elena Hernando-Pérez y Enrique Pérez-Riesgo su colaboración con el análisis estadístico de los datos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berna-Erro A, Braun A, Kraft R, Kleinschnitz C, Schuhmann MK, Stegner D, Wultsch T, Eilers J, Meuth SG, Stoll G, Nieswandt B (2009). "STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death". *Sci Signal*. 2(93): ra67.
- Appleby PA, Shabir S, Southgate J, Walker D (2013). "Cell-type-specific modelling of intracellular calcium signalling: a urothelial cell model". *J R Soc Interface*. 10(86): 20130187.
- Baba A, Yasui T, Fujisawa S, Yamada RX, Yamada MK, Nishiyama N, Matsuki N, Ikegaya Y (2003). "Activity-evoked capacitative Ca²⁺ entry: implications in synaptic plasticity". *J Neurosci*. 23: 7737-7741.
- Baker MR, Fan G, Serysheva II (2017). "Structure of IP₃R channel: high-resolution insights from cryo-EM". *Current Opinion in Structural Biology*. 46: 38-47.
- Berridge MJ (2010). "Calcium hypothesis of Alzheimer's disease". *Pflugers Arch*. 459(3): 441-449.
- Bezprozvanny I, Zhang H, Wu L, Pchitskaya E, Zakharova O, Saito T, Saido T (2015). "Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease" *J Neurosci*. 35(39): 13275-13286.
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993). "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination". *J Neurosci Res*. 35(5): 567-576.
- Burnstock G (2014). "Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease". *Purinergic signal*. 10(1): 103-155.
- Byrne N, Large WA (1988). "Membrane ionic mechanisms activated by noradrenaline in cells isolated from the rabbit portal vein". *J Physiol*. 404: 557-573.
- Caballero E, Calvo-Rodríguez M, Gonzalo-Ruiz A, Villalobos C, Nuñez L (2016). "A new procedure for amyloid β oligomers preparation enables the unambiguous testing of their effects on cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ entry and cell death in primary neurons". *Neurosci Lett*. 612: 66-73.
- Calvo-Rodríguez M, García-Durillo M, Villalobos C, Núñez L (2016). "In vitro aging promotes endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria Ca²⁺ cross talk and loss of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) in rat hippocampal neurons". *Biochim Biophys Acta*. 1863(11): 2637-2649.
- Calvo-Rodríguez M, Núñez L, Caballero E, García-Durillo M, Villalobos C (2018). "Neurotoxic Ca²⁺ Signaling Induced by Amyloid-β Oligomers in Aged Hippocampal Neurons In Vitro". *Methods Mol Biol*. 1779: 341-354.
- Calvo-Rodríguez M, Hernando-Perez E, Núñez L, Villalobos C (2019). "Amyloid β Oligomers Increase ER-Mitochondria Ca²⁺ Cross Talk in Young Hippocampal Neurons and Exacerbate Aging-Induced Intracellular Ca²⁺ Remodeling". *Front Cell Neurosci*. 13:22.
- Cárdenas C, Cheung KH, Shineman D, Müller M, Mei L, Yang J, Tomita T, Iwatsubo T, Lee VM, Foscett JK (2008) "Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating". *Neuron*. 58(6): 871-883.

- Caspersen C, Wang N, Yao J, Sosunov A, Chen X, Lustbader JW, Xu HW, Stern D, McKhann G, Yan SD (2005). "Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease" *FASEB J.* 19(14): 2040-2041.
- Catterall WA (1991). "Functional Subunit Structure of Voltage-Calcium Channels". *Science.* 253: 1499-1500.
- Chen YF, Chen YT, Chiu WT, Shen MR (2013). "Remodeling of calcium signalling in tumor progression". *J Biomed Sci.* 20: 23
- Clapham DE (2007). "Calcium signaling". *Cell.* 131(6): 1047-1058.
- Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG (2005). "Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers". *J Biol Chem.* 280(17): 17294-17300.
- Djillani A, Doignon I, Luyten T, Lamkhioued B, Gangloff SC, Parys JB, Nüße O, Chomienne C, Dellis O (2015) "Potentiation of the store-operated calcium entry (SOCE) induces phytohemagglutinin-activated Jurkat T cell apoptosis". *Cell Calcium.* 58(2):171-185.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A (2006). "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function". *Nature.* 441(7090): 179-185.
- Foster TC (2007). "Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain" *Aging Cell* 6(3): 319-325.
- Gruszczynska-Biegala J, Pomorski P, Wisniewska MB, Kuznicki J. "Differential roles for STIM1 and STIM2 in store-operated calcium entry in rat neurons". *PLoS One.* 6(4): e19285.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties". *J Biol Chem.* 260: 3440-3450.
- Gudermann T, Hoffman T, Mederos y Schinitler M, Dietrich A. (2004). "Activation, subunit composition and physiological relevance of DAG-sensitive TRPC proteins". *Novartis Found Symp.* 258: 103-118.
- Guo Q, Furukawa K, Shopper BL, Pham DG, Xie J, Robinson N, Martin GM, Mattson MP (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.
- Hoth M, Penner R (1992). "Depletion of Intracellular Calcium Stores Activates a Calcium Current in Mast Cells". *Nature.* 355(6358): 353-356.
- Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, Dumalska I, Salyha Y, Ben-Ari Y, Medina I (2006). "Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA Receptors regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons". *J Physiol.* 572: 789-798.
- Iwai M, Michikawa T, Bosanac I, Ikura M, Mikoshiba K (2007). "Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate Receptors" . *The Journal of Biological Chemistry.* 282(17): 12755-12764.
- Khakh BS, North RA (2012). "Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS". *Neuron.* 76: 51-69.
- Kaupp UB, Seifert R (2002). "Cyclic nucleotide-gated ion channels". *Physiol Rev.* 82(3): 769-824.
- Khachaturian ZS (1989). "Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain" *Neurobiol Aging.* 8(4): 345-346.

- Kim SJ, Koh EM, Kang TM, Kim YC, So I, Isenberg G, Kim KW (1998). "Ca²⁺ influx through carbachol-activated non-selective cation channels in guinea-pig gastric myocytes". *J Physiol.* 513: 749-760.
- Kishimoto J, Tsuchiya T, Cox H, Emson PC, Nakayama Y (1998). "Aged-related changes of calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin mRNAs in the hamster brain". *Neurobiol Aging.* 19(1): 77-82.
- Komuro I, Wenninger KE, Philipson KD, Izumo S (1992). "Molecular cloning and characterization of human cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger cDNA". *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(10): 4769-4773.
- Li F, Tsien JZ (2009). "Memory and NMDA Receptors". *N Engl J Med.* 361(3):302-303.
- Li Z, Okamoto K, Hayasi Y, Sheng M (2004). "The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses". *Cell.* 119: 873-887.
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr, Meyer T (2005). "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx". *Curr Biol.* 15(13): 1235-1241.
- Mangialavori IC, Ferreira-Gomes MS, Saffioti NA, Gonzalez-Lebrero, Rossi RC, Rossi JP (2013). "Conformational Changes Produced by ATP Binding to the Plasma Membrane Calcium Pump". *J Biol Chem.* 288: 31030-31041.
- Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, Nagata E, Tanaka K, Takano H, Minowa O, Kuno J, Sakakibara S, Yamada M, Yoneshima H, Miyawaki A, Fukuuchi Y, Furuichi T, Okano H, Mikoshiba K, Noda T (1996). "Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor". *Nature.* 379(6561), 168-171.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Brayant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992). "Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity". *J Neurosci.* 12(2): 376-389.
- Mattson MP, Rydel RE, Lieberburg I, Smith-Swintosky (1993). "Altered calcium signalling and neuronal injury: stroke and Alzheimer's disease as examples" *Ann N Y Acad Sci.* 679: 1-21.
- Mattson MP (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease" *Nature.* 340(7000): 631-639.
- Meves H (2008). "Arachidonic acid and ion channels: an update". *Br J Pharmacol.* 155(1): 4-16.
- Muik M, Fahrner M, Schindl R, Stathopoulos P, Frischauf I, Derler I, Plenk P, Lackner B, Groschner K, Ikura M, Romanin C (2011), "STIM1 couples to ORAI1 via intramolecular transition into an extended conformation". *EMBO J.* 30(9): 1678-1689.
- Murchison D, Griffith WH (1999) "Age-related alterations in caffeine-sensitive calcium stores and mitochondrial buffering in rat basal forebrain". *Cell Calcium.* 25(6): 439-452.
- Rizzuto R, Pozzan T (2006). "Microdomains of Intracellular Ca²⁺: Molecular Determinants and Functional Consequences". *Physiol Rev.* 86(1): 369-408.
- Samad N, Ishaq S, Bano S, Manzoor N (2017). "Calcium Regulation in Alzheimer's Disease: Mechanistic Understanding". *J Coll Physicians Sur Pak.* 27(9):566-571.
- Sanz-Blasco S, Valero RA, Rodríguez Crespo I, Villalobos C, Núñez L (2008). "Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs". *PLoS One.* 3(7):2718.

- Simakova O, Arispe NJ (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.
- Thibault O, Landfield PW (1996). "Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging". *Science*. 272(5264): 1017-1020.
- Thibault O, Gant JC, Landfield PW (2007). "Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store". *Aging Cell*. 6(3):307-317.
- Toescu EC, Verkhratsky (2007). "The importance of being subtle: small changes in calcium homeostasis control cognitive decline in normal aging". *J Anat*. 197(4): 563-569.
- Vandenbeuch A, Larson ED, Anderson CB, Smith SA, Ford AP, Finger TE, Kinnamon SC (2015). "Postsynaptic P2X3-containing receptors in gustatory nerve fibres mediate responses to all taste qualities in mice". *J Physiol*. 593(5): 1113-1125.
- Xiong J, Camello PJ, Verkhratsky A, Toescu EC (2004). "Mitochondrial polarisation status and $[Ca^{2+}]_i$ signalling in rat cerebellar granule neurones aged in vitro". *Neurobiol Aging*. 25(3): 349-359.
- Zaidi A, Gao J, Squier TC, Michaelis ML (1998). "Aged-related decrease in brain synaptic membrane Ca^{2+} -ATPase in F344/BNF1 rats" *Neurobiol Aging*. 19(5):487-495.