



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Envejecimiento Neuronal y Transporte de Ca²⁺ Intracelular

Autor: M^a Elena Hernando Pérez

Tutor/es: Dres. Carlos Villalobos y Lucía Núñez

Tutor Docente: Dra. Raquel Muñoz

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	3
2	RESUMEN/ ABSTRACT	6
2.1	RESUMEN	6
2.2	ABSTRACT	6
3	INTRODUCCIÓN	7
3.1	HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR	7
3.1.1	Transporte de Calcio a través de la Membrana Plasmática	9
3.1.2	Transporte de Ca ²⁺ a través de la Mitocondria	14
3.1.3	Transporte de Ca ²⁺ en el Retículo Endoplasmático	16
3.2	REMODELACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR EN EL ENVEJECIMIENTO NEURONAL	22
3.2.1	Hipótesis del Remodelado del Calcio en el Envejecimiento Neuronal.....	23
3.2.2	Fisiopatología del Envejecimiento Neuronal.....	24
3.2.3	Modelos para el Estudio del Envejecimiento Fisiológico <i>In Vitro</i>	27
4	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	30
4.1	OBJETIVOS	30
4.2	PLAN DE TRABAJO	30
5	MATERIAL Y MÉTODOS	31
5.1	MATERIAL	31
5.1.1	Equipos Empleados	31
5.1.2	Tampones y Soluciones	31
5.1.3	Reactivos	34
5.1.4	Animales	36
5.2	MÉTODOS EXPERIMENTALES	36
5.2.1	Cultivos Primarios de Neuronas de Hipocampo.....	36
5.2.2	Imagen de Calcio Intracelular Empleando la Sonda Fluorescente Fura2/ AM.....	40
5.2.3	Inmunocitoquímica.....	44

5.2.4	Estudio del Potencial Mitocondrial en Neuronas de Hipocampo	51
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
6.1	RESULTADOS.....	53
6.1.1	Caracterización de Cultivos Mixtos de Hipocampo de Rata.....	53
6.1.2	Expresión Diferencial del IP ₃ R en el Envejecimiento.....	57
6.1.3	Medida del Potencial Mitocondrial en Neuronas de Hipocampo.....	61
6.2	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	64
7	CONCLUSIONES.....	67
8	BIBLIOGRAFÍA	68
9	LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS	73
9.1	LISTADO DE FIGURAS.....	73
9.2	LISTADO DE TABLAS.....	74

1 ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_{cit} Concentración citosólica de Ca²⁺

ΔΨ_m Potencial Mitocondrial

α anti

Ach Acetilcolina

AMPA amino 3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato.

BSA Albumina de suero bovino libre de ácidos grasos

CICR Liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺

DAG Diacilglicerol

DAPI 4'-6-diamino-2-fenilindon

DIV Días *In Vitro*

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EIM Espacio Intermembrana

FBS Suero Bovino Fetal

FCCP Carbonil Cianida para-(trifluorometoxi) fenilhidrazona

GPCRs Receptores Acoplados a Proteínas G

GS Suero de Cabra

HBSS Solución Salina Equilibrada de Hank's

HEPES Ácido N-(2-hidroximetil) piperazina-N'-(2-etanosulfónico)

ICC Inmunocitoquímica

IP₃R Receptor de Inositol-trifosfato

LTD Depresión a Largo Plazo

LTP Potenciación a Largo Plazo

MCU Uniportador de Ca^{2+} Mitocondrial

MME Membrana Mitocondrial Externa

MMI Membrana Mitocondrial Interna

MP Membrana Plasmática

NCX intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

NCXm Intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial

NMDA N-metil-D-aspartato

PBS Tampón fosfato salino

PFA Paraformaldehído

PIP2 Fosfolinositol 4,5 bifosfato

PKC Proteína Quinasa C

PLC FosfoLipasa C

PMCA Bomba de Ca^{2+} de la Membrana Plasmática

RE Retículo Endoplasmático

ROCs Canales de Calcio Operados por Receptor

ROS Especies Reactivas de Oxígeno

RyR Receptor de Rianodina

SERCA Bomba de Ca^{2+} del Retículo Endoplasmático

SMOCs Canales de Calcio Operados por Segundos Mensajeros

SNC Sistema Nervioso Central

SOCE Entrada de Ca^{2+} Operada por Depósitos

SOCS Canales de Calcio Operados por Depósitos

STIM Molécula de Interacción del Estroma

TMRM Éster metílico de la Tetrametilrodamina

TRP canales tipo Potencial de Receptor Transitorio.

u.a. Unidades Alternativas

VDACs Canales Aniónicos dependientes de Voltaje

VOCCs Canales de Calcio Operados por Voltaje

2 RESUMEN/ABSTRACT

2.1 RESUMEN

El envejecimiento promueve pérdida cognitiva y susceptibilidad a enfermedades neurodegenerativas, lo que se ha relacionado con la dishomeostasis del Ca^{2+} intracelular. Para investigar esta hipótesis se utiliza el cultivo a largo plazo de neuronas de hipocampo de rata, modelo de envejecimiento neuronal *in vitro*. Mediante imagen de fluorescencia se han estudiado cambios en transporte de Ca^{2+} en neuronas a lo largo del envejecimiento *in vitro*. Las neuronas se han identificado mediante inmunofluorescencia e imagen de Ca^{2+} . Los resultados indican que la entrada de Ca^{2+} inducida por NMDA y los receptores IP_3 aumentan con el envejecimiento lo que favorecería la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} . Sin embargo, el potencial mitocondrial, la fuerza electromotriz de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, disminuye con el envejecimiento. Así, el envejecimiento neuronal está asociado a un remodelado del transporte de Ca^{2+} que favorece el metabolismo energético a expensas de aumentar la susceptibilidad a la muerte neuronal.

2.2 ABSTRACT

Aging promotes cognitive loss and susceptibility to neurodegenerative disorders, which have been related to dishomeostasis of intracellular Ca^{2+} . To investigate this hypothesis we have used long-term cultures of rat hippocampal neurons, a model of neuronal *in vitro* Aging. Neurons were identified by immunofluorescence and calcium imaging. Results indicate that Ca^{2+} responses to NMDA and expression of IP_3 receptors increase with *in vitro* aging, thus favoring mitochondrial Ca^{2+} overload. However, mitochondrial potential, the driving force for mitochondrial Ca^{2+} uptake, decreases with *in vitro* aging. Therefore, we conclude that neuronal aging is associated to the remodeling of intracellular Ca^{2+} transport that favors energetic metabolism at the expense of increasing susceptibility to neuron cell death.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR

Los iones, átomos y moléculas cargadas, juegan un papel importante en la Biología y la Fisiología Celular. Al no ser creados ni destruidos por las células, los iones son transportados a favor y en contra de gradientes químicos y eléctricos y contribuyen a la generación de los mismos. Estos gradientes electroquímicos son esenciales para la vida. Por ejemplo, el gradiente de protones de las mitocondrias, es la energía requerida para la síntesis de ATP; los gradientes de Na^+ y K^+ en la membrana plasmática, permiten el transporte de solutos al interior celular. Así pues, el transporte de iones a través de las membranas biológicas constituye uno de las principales ramas de estudio de la Fisiología Celular. Entre todos los iones destaca el ión Ca^{2+} , que ha sido seleccionado por la naturaleza, como el más importante y versátil segundo mensajero que participa en muchísimas funciones celulares y fisiológicas en prácticamente todos los tipos de células. Así pues, el Ca^{2+} es una herramienta universal usada en la transducción de señales, siendo el segundo mensajero intracelular por excelencia en la mayoría de los seres vivos, tanto procariotas como eucariotas. Éste juega un papel de suma importancia a nivel celular, ya que interviene en la regulación de un amplio abanico de funciones celulares, abarcando desde el control de la contracción del músculo cardíaco hasta la regulación de puntos clave del ciclo celular, como son la proliferación y la muerte celular (Clapham, 1995) (Berridge, 2003).

La versatilidad del Ca^{2+} como mensajero intracelular se debe, principalmente, a la diferencia de concentración entre el espacio extracelular (del orden de 1 mM) y el citosol (100 nM). Por lo tanto, el gradiente químico generado es de cuatro órdenes de magnitud (10000:1) que, unido al potencial de membrana en reposo, de signo negativo en el interior celular, favorece la entrada de calcio a la célula a favor del enorme gradiente electroquímico. Además, existen numerosas enzimas y otras proteínas cuya actividad está regulada directamente por Ca^{2+} o por proteínas que unen Ca^{2+} como, por ejemplo, calmodulina. A consecuencia de lo anterior, existen en la célula números procesos controlados, directa o indirectamente por la concentración de calcio en el citosol $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, donde pequeñas variaciones de dicha concentración pueden desencadenar la activación de

múltiples procesos celulares. Para mantener dicho gradiente, y que no se llegue a una situación de equilibrio, sino de estado estacionario, existen distintos elementos que permiten mantener una adecuada homeostasis del calcio. Dichos elementos pueden ir, desde canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática y orgánulos subcelulares que permiten el flujo de Ca^{2+} hacia el citosol a favor de gradiente, hasta proteínas que unen y tamponan los cambios de Ca^{2+} intracelular o, los sistemas de extrusión de Ca^{2+} , que transportan el ión fuera del citosol en contra de gradiente electroquímico (Figura 1) (Berridge, M. J., 2003) (Rizzuto, 2006).

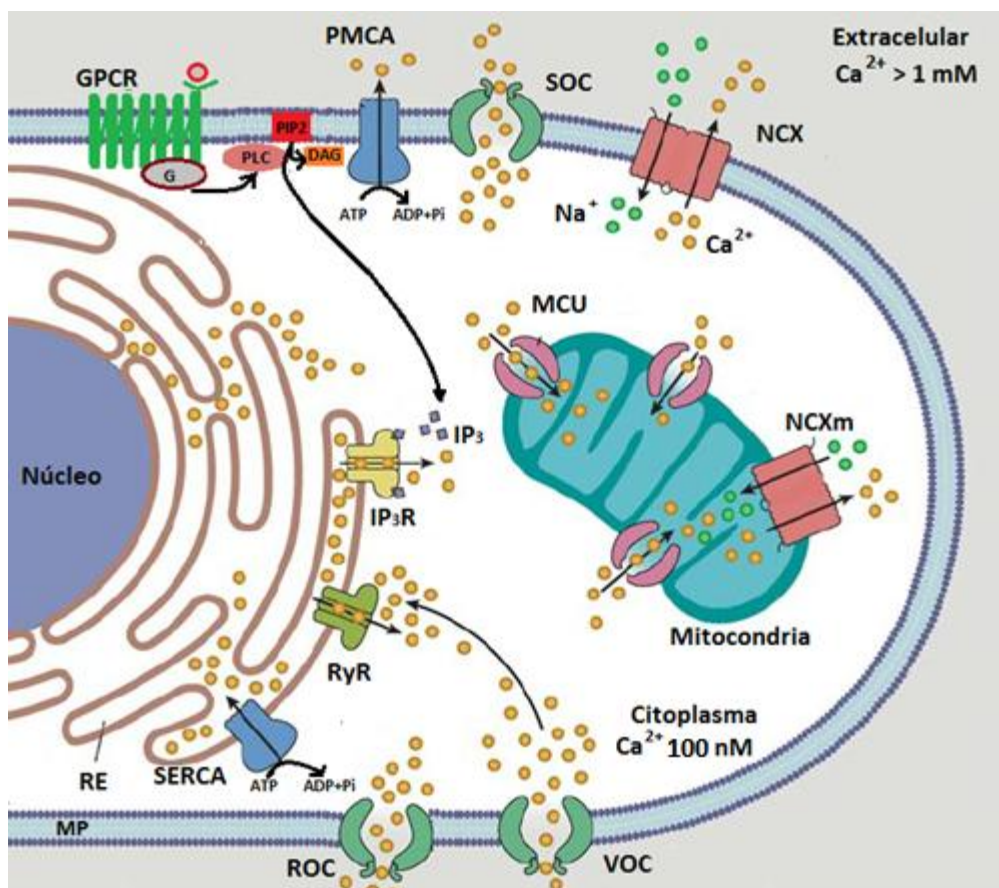


Figura 1. Homeostasis del Ca^{2+} intracelular en neuronas. En la imagen se representan diferentes fuentes de Ca^{2+} , mecanismos de extrusión y tamponadores en una neurona en condiciones fisiológicas. Se representan los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCs), canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCs), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y canales de Ca^{2+} operados por depósitos (SOCs) que participan en la entrada de Ca^{2+} (bolas amarillas) en el citosol. La liberación de Ca^{2+} al citosol también tiene lugar desde los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , a través de los receptores de rianodina (RyR) y los receptores de inositol-trifosfato (IP_3 R). También se muestran los sistemas de extrusión de Ca^{2+} , entre los que se incluyen el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) y del RE (SERCA). El uniportador de calcio mitocondrial (MCU), el poro de transición mitocondrial (PTPm) y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (NCXm) que también contribuyen a la regulación del Ca^{2+} (Dong, 2006).

Algunos de los orgánulos intracelulares actúan como depósitos de calcio, es decir son capaces de almacenar calcio en su interior, el cual, tras una estimulación celular se libera de forma transitoria (Figura 1). Entre estos orgánulos, se encuentra el retículo endoplasmático (RE), el cual presenta una concentración de Ca^{2+} libre similar a la del medio extracelular (1 mM). Ésta regulación no es banal pues, por ejemplo, elevadas $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se relacionan con la muerte celular. Por ello, es de suma importancia evitar una activación celular continuada, mantener los niveles basales de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y preparar a las células para estímulos consecutivos, para lo cual las células disponen de diversos sistemas de extrusión del Ca^{2+} , localizándose tanto en la membrana plasmática, como en las endomembranas.

Aunque, de forma general, es de vital importancia mantener la homeostasis del calcio intracelular, lo es más aún, si cabe, en las células excitables. Esta afirmación se sustenta en que, para estas células, la conexión entre los gradientes electroquímicos y las vías de señalización intracelulares son de especial importancia. Como células excitables, cabe destacar a las neuronas, pues éstas juegan un papel protagonista en el presente trabajo. En ellas, el Ca^{2+} intracelular está implicado en un compendio de procesos, como son la excitabilidad neuronal, la integración de las señales eléctricas, la plasticidad sináptica, la expresión génica, el metabolismo, la liberación de neurotransmisores y la muerte celular programada. Tal es así, que éstas células han desarrollado mecanismos de control extremadamente fino de la homeostasis del calcio, pues una desregulación de ésta se relaciona con procesos tales como la neurodegeneración y el envejecimiento.

3.1.1 Transporte de Calcio a través de la Membrana Plasmática

En la membrana plasmática (MP) pueden distinguirse diferentes mecanismos de transporte. Por un lado, está el transporte pasivo, donde los canales de Ca^{2+} permiten el transporte pasivo del ión a favor de gradiente electroquímico al interior celular siempre que estén abiertos. Los canales de Ca^{2+} se diferencian por distintos mecanismos de apertura (gating). Por otro lado, se tienen mecanismos de transporte activo, llevados a cabo por bombas e intercambiadores, éstos transportan el calcio en contra de su gradiente

electroquímico y se activan por el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular. Así, la acción de ambos tipos de transporte permite mantener la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ basal.

Según el mecanismo de activación o apertura, los canales iónicos se pueden agrupar en dos familias: a) *Canales de Calcio Operados por Voltaje* (VOCCs) que, como su propio nombre indica, se activan por un cambio en el potencial de membrana, y b) *Canales de Calcio No Operados por Voltaje*, los cuales pueden ser inducidos por la unión de un ligando a un receptor (ROCs), por segundos mensajeros (SMOCs) o por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (SOCs). Estos canales son particularmente importantes en las células no excitables, las cuales no presentan cambios agudos en el potencial de membrana, lo que no significa que no puedan estar presentes en las células excitables. En neuronas, por ejemplo, los canales predominantes son los VOCCs y los ROCs.

a) Canales de Calcio Operados por Voltaje :

¿Qué quiere decir que los VOCCs sean canales operados por voltaje? Significa que es el potencial de membrana quien los regula, abriéndose abruptamente cuando éste se despolariza, lo que permite el flujo de Ca^{2+} al interior celular a favor de gradiente electroquímico. Puesto que la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ es mucho menor que en el medio extracelular, su apertura permite el flujo de Ca^{2+} desde el espacio extracelular hasta el citosol, el aumento de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico y si este es suficiente, la activación celular. Los VOCCs son una familia de canales formada por 6 miembros principales, pudiéndose clasificar éstos según su umbral de activación:

- Alto umbral de activación: L, N, P, Q, y R.
- Bajo umbral de activación, canales tipo T.

Estos canales no se encuentran distribuidos de igual forma en los diferentes tipos de células excitables. Por ejemplo, en las neuronas de hipocampo los canales mayoritarios son, en orden decreciente, los canales P,Q, seguido de los tipo L y los tipo N y R.

Los VOCs 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.

b) Canales No Operados por Voltaje

b.1) ROCs:

Además de los VOCCs, en la membrana plasmática también se encuentran los ROCs, cuya apertura depende de la unión de un ligando específico, hormonas o neurotransmisores, a su dominio de unión. La unión del ligando provoca un cambio conformacional en la estructura del canal, originando así, la apertura de éste, y por ende, la consecuente entrada de iones a través del poro del canal. Un ejemplo de estos ligandos, también conocidos como agonistas, es el aminoácido L-glutamato, siendo el neurotransmisor más abundante e importante del *Sistema Nervioso Central (SNC)*, capaz de actuar sobre dos tipos de ROCs: ionotrópicos y metabotrópicos. En concreto, en los receptores ionotrópicos, la unión del neurotransmisor permite la entrada de Ca^{2+} y/o Na^+ a favor de gradiente electroquímico. Se han caracterizado tres formas de receptores ionotrópicos de glutamato en el SNC, los cuales se denominan de acuerdo a la molécula agonista que los activa:

- *Receptores de tipo kainato*, activados por ácido kaínico.
- *Receptores de tipo AMPA*, activados por amino 3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato.
- *Receptores NMDA*, activados por N-metil-D-aspartato. Éstos deben su nombre a que pueden ser activados selectivamente por el análogo artificial del glutamato, *Metil-O-Aspartamo*. Este receptor juega un papel de suma importancia en procesos de memoria y aprendizaje. Su relevancia se debe a que presenta una alta permeabilidad a Na^+ y Ca^{2+} , y a su función como detector de coincidencia, esto es, que requieren, para ser activados, tanto de la presencia de glutamato, como de la despolarización de la membrana, dado que a potenciales de membrana de reposo el receptor se encuentra inhibido por el ión Mg^{2+} . Dicha inhibición se revierte al despolarizarse la membrana, probablemente producida por la apertura de los canales Kainato y AMPA en presencia de glutamato.

Otro canal de tipo ROC, es el receptor nicotínico de acetilcolina, el cual de la misma forma que el receptor de glutamato puede dividirse en dos grandes grupo: receptores ionotrópicos, que permiten la apertura del canal iónico al unirse el neurotransmisor (generalmente la Acetilcolina (Ach); y los receptores metabotrópicos, asociados a proteínas G (proteínas de unión a nucleótidos de guanina).

b.2) SMOCs

Se activan por segundos mensajeros procedentes de diversas cascadas de señalización. Un ejemplo de estos canales son los canales de Ca^{2+} activados por ácido araquidónico, un segundo mensajero liberado de los fosfolípidos de la membrana plasmática tras la activación de la fosfolipasa A_2 .

b.3) SOCs

Los canales de Ca^{2+} operados por depósitos se activan en respuesta al vaciamiento de Ca^{2+} del RE promovido por mensajeros fisiológicos capaces de movilizar Ca^{2+} o por diferentes fármacos.

La entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de dichos canales de la membrana plasmática se conoce como *Entrada de Ca^{2+} Operada por Depósitos (SOCE)*. Esta entrada es relativamente poco importante en células excitables, no obstante está presente en las neuronas. La entrada de Ca^{2+} a través de esta vía regula gran variedad de funciones celulares, y guarda una importante relación funcional con orgánulos subcelulares que participan en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular como son la mitocondria y el RE.

La proteína transmembrana STIM (*molécula de interacción estromal*) actúa como un sensor de Ca^{2+} de los depósitos (Figura 2). Esto se debe a que en su estructura, en concreto, en la cara del lumen del RE, hay un dominio conocido como mano EF que une Ca^{2+} . Por lo tanto, cuando la concentración de este ión disminuye dentro de los depósitos, también disminuye el porcentaje del mismo que permanece unido al dominio mano EF, lo que produce oligomerización entre varios STIMs. Dicha oligomerización permite la interacción de estas proteínas con los SOCs, como por ejemplo ORAIs y TRPs, los cuales se encuentran

localizados en la membrana plasmática formándose un poro que, al interactuar con STIM, permite la entrada selectiva de Ca^{2+} (Feske, 2006).

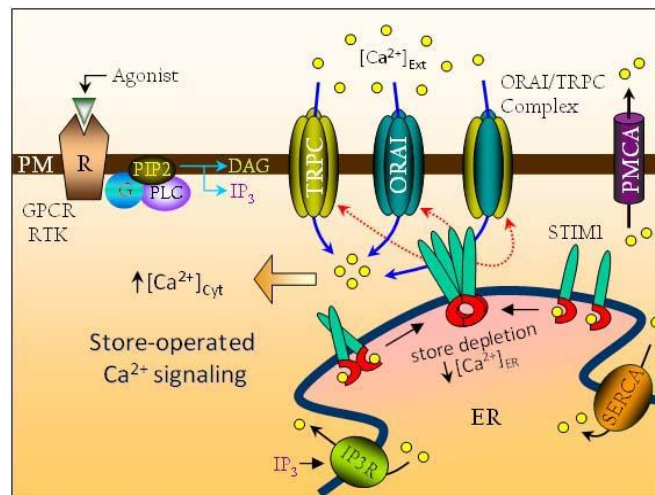


Figura 2. Entrada Capacitativa de Calcio (SOCE). Tras la liberación de Ca^{2+} del RE al citosol, los STIMs, los cuales poseen un dominio de unión a Ca^{2+} que, tras la liberación, quedará vacante, oligomerizan y provocan su acercamiento hacia la membrana plasmática. Allí se encuentran una serie de proteínas llamadas SOCs, como son ORAI y TRPC. Éstas, al interactuar con STIM, forman unos canales (tetrámeros) que permiten la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular hacia el citosol para, posteriormente, rellenar los depósitos previamente vaciados (Pani, 2012).

En cuanto a qué isoformas de estas proteínas es más relevante, cabe decir que depende del tipo celular. Por ello, mientras que en las células no excitables, SOCE está controlado por STIM1, en las neuronas lo está por la isoforma STIM2 (Berna-Erro, 2009). Recientes investigaciones sugieren que SOCE participa en ciertas funciones neuronales, como pueden ser la señalización por factores de transcripción, crecimiento guiado del axón o la plasticidad sináptica (Majewski, 2015).

Durante la activación 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, dado que un aumento mantenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tiene efectos negativos en la célula que podrían, incluso, conducir a la muerte celular. Para regular este proceso existen diversos sistemas de extrusión de Ca^{2+} hacia el medio extracelular, manteniendo así los niveles basales de Ca^{2+} . Los mecanismos principales de extrusión de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática son dos, a saber, la *ATPasa de calcio* (PMCA) y el *intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$* (NCX).

- La *PMCA* es un mecanismo de transporte activo primario, luego se produce en contra del gradiente electroquímico, expulsándose Ca^{2+} al espacio extracelular con el consecuente gasto de energía, energía que se obtiene de la hidrólisis de ATP.
- El *NCX* constituye un sistema de transporte activo secundario pues, aunque el transporte de Ca^{2+} al espacio extracelular se da en contra del gradiente electroquímico, gracias al intercambio de Na^+ se alcanza una situación donde la energía total es favorable, es decir, que la energía liberada al transportarse Na^+ a favor de gradiente, se emplea para el transporte de Ca^{2+} en contra de gradiente.

3.1.2 Transporte de Ca^{2+} a través de la Mitocondria

La mitocondria es un orgánulo subcelular que participa de forma activa en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, por lo que está implicada en numerosos procesos celulares. Está delimitada por dos membranas, la *membrana mitocondrial externa* (MME) y la *membrana mitocondrial interna* (MMI). La MME posee una gran cantidad de canales, como las porinas o *canales aniónicos dependientes de voltaje* (VDACs) lo que le confiere una elevada permeabilidad a iones, como el Ca^{2+} , y a proteínas pequeñas. La MMI es impermeable a iones y presenta una extensión mucho mayor que la membrana externa, ya que presenta numerosas crestas, luego la superficie efectiva de esta membrana interna es elevada. En el *espacio intermembrana* (EIM) se encuentran diversas enzimas, entre las que destacan la creatina quinasa y el citocromo C.

Estos orgánulos poseen una gran movilidad, sobre todo en neuronas. Suelen localizarse en regiones con una elevada demanda metabólica, como por ejemplo los granulos de secreción (Hollenbeck, 2005). La mitocondria es responsable de la síntesis aeróbica de ATP mediante la fosforilación oxidativa, la moneda de cambio energético celular, pues en sus enlaces fosfoanhidrido se guarda una gran cantidad de energía que, al romperse, es liberada y utilizada para un sinnúmero de procesos fisiológicos. En el ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos se producen una serie de metabolitos de alto potencial redox como el NADH y el FADH_2 . Estos compuestos van cediendo sus electrones secuencialmente a través de complejos enzimáticos (cadena de transporte electrónica) hasta el último aceptor electrónico el O_2 para generar H_2O . La energía redox obtenida es utilizada por estos

elementos en bombear H^+ desde la matriz mitocondrial hasta el EIM, generándose un potencial eléctrico de unos -180 mV. La energía química almacenada en forma de potencial eléctrico es utilizada por la ATP sintasa que retorna los H^+ a la matriz mitocondria y sintetiza ATP a expensas de ADP de un modo tremendamente eficaz. Debido a este potencial tan negativo, la entrada de Ca^{2+} desde el citosol a la mitocondria se ve muy favorecida (Parekh, 2005). Así, la mitocondria tiene gran importancia en la regulación local de la homeostasis de Ca^{2+} celular ya que capta Ca^{2+} del citosol en respuesta a flujos de Ca^{2+} a través de canales en la membrana plasmática o liberación de Ca^{2+} desde el RE. La mitocondria produce la mayor parte del ATP presente en las neuronas, su energía almacenada es empleada para procesos como la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Mattson, 2007).

Curiosamente, una hipótesis bastante aceptada sugiere que las mitocondrias, proceden de procariotas aeróbicos que fueron endocitados (“tragados”) por células procariotas anaeróbicas las cuales eran suficientemente eficientes a la hora de emplear combustible para generar energía, pues no usaban el oxígeno para ello. Se generó una simbiosis beneficiosa entre ambas células contribuyendo a la evolución hacia las células eucariotas (Margulis, L. 1975) .

3.1.2.1 *Entrada de Ca^{2+} a la Mitocondria*

En condiciones de reposo, la concentración de Ca^{2+} mitocondrial es similar a la citosólica. Para alcanzar la matriz mitocondrial, el Ca^{2+} ha de atravesar la MME, proceso llevado a cabo por transporte pasivo, y, posteriormente, la MMI. La enorme diferencia de potencial entre la mitocondria y el citosol propicia la acumulación de Ca^{2+} en el interior mitocondrial a favor de su gradiente electroquímico. Puesto que dicha diferencia de potencial es provocada por el bombeo de protones a lo largo de la cadena respiratoria, la pérdida del potencial mitocondrial provocada por bloqueantes de ésta (Antimicina A) o por el empleo de protonóforos (*carbonil cianida para-(trifluorometoxi) fenilhidrazona* (FCCP)), anula la captación de Ca^{2+} mitocondrial (Nuñez, 2006).

La entrada de Ca^{2+} al interior de la mitocondria es mediada, básicamente, por el *Uniportador de Ca^{2+} Mitocondrial* (MCU), localizado en la MMI (Figura 1). Un canal de Ca^{2+} intracelular que transporta Ca^{2+} a favor de gradiente electroquímico, sin ser necesario el acoplamiento a la hidrólisis de ATP o transporte de otros iones.

3.1.2.2 Salida de Ca^{2+} desde la Mitocondria al Citosol

El Ca^{2+} que ha acumulado la mitocondria se extruye de la matriz mitocondrial por medio de intercambiadores mitocondriales ubicados en la MMI, estos utilizan el gradiente electroquímico de cationes monovalentes para evitar que se llegue al equilibrio eléctrico. El *intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial* (NCXm) (Figura 1) (Palty, 2010), se expresa fundamentalmente en células excitables, intercambiándose 3 iones Na^+ por cada ión Ca^{2+} que elimina; mientras que el que el intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial es mayoritario en células no excitables, introduce un H^+ por cada Ca^{2+} que extruye.

3.1.3 Transporte de Ca^{2+} en el Retículo Endoplasmático

El retículo endoplasmático es un orgánulo presente en todas las neuronas que se extiende desde el núcleo pasando por soma, dendritas y espinas dendríticas, hasta los axones y las terminales presinápticas. Puede considerarse al RE como un depósito intracelular de Ca^{2+} . Sin embargo, no es un mero almacén pasivo de Ca^{2+} , pues participa activamente en los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ que tienen lugar durante la activación celular. En condiciones normales, la concentración de Ca^{2+} libre en el RE es similar a la concentración de Ca^{2+} del medio extracelular (Montero, 1995). Por lo tanto, el RE posee canales y sensores dedicados al mantenimiento de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

Los principales canales responsables de la liberación de Ca^{2+} desde el RE al citosol en respuesta a estímulos, en las neuronas, son el *Receptor de Rianodina* (RyR) y el *Receptor de Inositol-trifosfato* (IP_3R). Además, en el RE hay sistemas de bombeo de Ca^{2+} , como la *ATPasa de Calcio del Retículo Sarcoendoplásmico* (SERCA), formando un sistema de transporte de alta afinidad por Ca^{2+} , pues son capaces de responder a pequeñas elevaciones de la concentración de Ca^{2+} , lo que permite ajustar los valores basales de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en reposo y rellenar los depósitos tras su vaciamiento, lo que consume energía proveniente de la hidrólisis de ATP (Figura 1).

Estos depósitos intracelulares, además, juegan un papel importante en la regulación de las señales de Ca^{2+} . Por ejemplo, el RE, la mitocondria o los lisosomas actúan como sistemas tamponadores de Ca^{2+} . Existen dos mecanismos posibles de regulación:

1. Liberación del Ca^{2+} de los depósitos para intensificar la señal de Ca^{2+} .
2. Eliminación del Ca^{2+} del citosol tras un aumento de este ión.

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. Por otro lado, a pesar de que el núcleo y las mitocondrias también pueden capturar Ca^{2+} , tras la estimulación celular, sólo lo hacen de forma transitoria, pues en condiciones basales presentan una concentración de Ca^{2+} libre similar al citosol (Montero, 1995), (Chamero, 2002).

3.1.3.1 Liberación de Ca^{2+} desde el Retículo Endoplasmático

Dada las características y funciones de las neuronas, es de suma 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. Se piensa que, en estas células, el RE es ininterrumpido, proporcionando un sistema continuo que permite la sincronización a lo largo de los diferentes compartimentos espaciales y funcionales de la neurona. Una serie de ejemplos se muestran a continuación:

- Dendritas: La liberación de Ca^{2+} de los depósitos participa en la modulación de las respuestas postsinápticas, así como en la plasticidad sináptica.
- Terminales Axónicos: La liberación de Ca^{2+} de los depósitos participa en la fusión de vesículas y en la liberación de neurotransmisores.
- Soma: La liberación de Ca^{2+} de los depósitos está acoplada a la activación de vías de señalización sensibles a Ca^{2+} , como actividades quinasa y fosfatasa.
- Espacio Perinuclear: La liberación de Ca^{2+} de los depósitos parece desencadenar la transcripción de genes.

Existen evidencias que muestran cómo 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 su funcionalidad (Stutzmann, 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).
- Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, *Calcium-Induced Calcium Released*), en la que están involucrados los RyR. Además, el Ca^{2+} puede ser liberado de forma pasiva a través de los canales tipo "leak".

3.1.3.1.1 Vía del IP_3 : Receptores de Inositol-trifosfato

La unión de neurotransmisores a receptores específicos de la membrana plasmática, como son los receptores metabotrópicos de glutamato, receptores muscarínicos de ACh o receptores de ATP tipo P2Y, lleva a la activación de la *FosfoLipasa C* (PLC), que cataliza la hidrólisis de *Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato* (PIP_2), produciendo los segundos mensajeros intracelulares IP_3 y *Diacilglicerol* (DAG) (Figura 3). El IP_3 posee gran movilidad por el citoplasma y es capaz de difundir al interior celular, permitiendo su unión a los Receptores de IP_3 (IP_3Rs) del RE. Esta unión provoca un cambio conformacional de los IP_3Rs , dando lugar a la apertura del canal y, por ende, a la liberación de Ca^{2+} al citosol a favor del gradiente electroquímico, pues, como ya se ha explicado anteriormente, éste se encuentra almacenado en grandes concentraciones dentro del RE. Posteriormente, mediante la acción conjunta del DAG, fosfatidilserina (lípidos de membrana de la cara citosólica) y del Ca^{2+} recién liberado, se activa la *Proteína Quinasa C* (PKC) implicada en diversos procesos celulares.

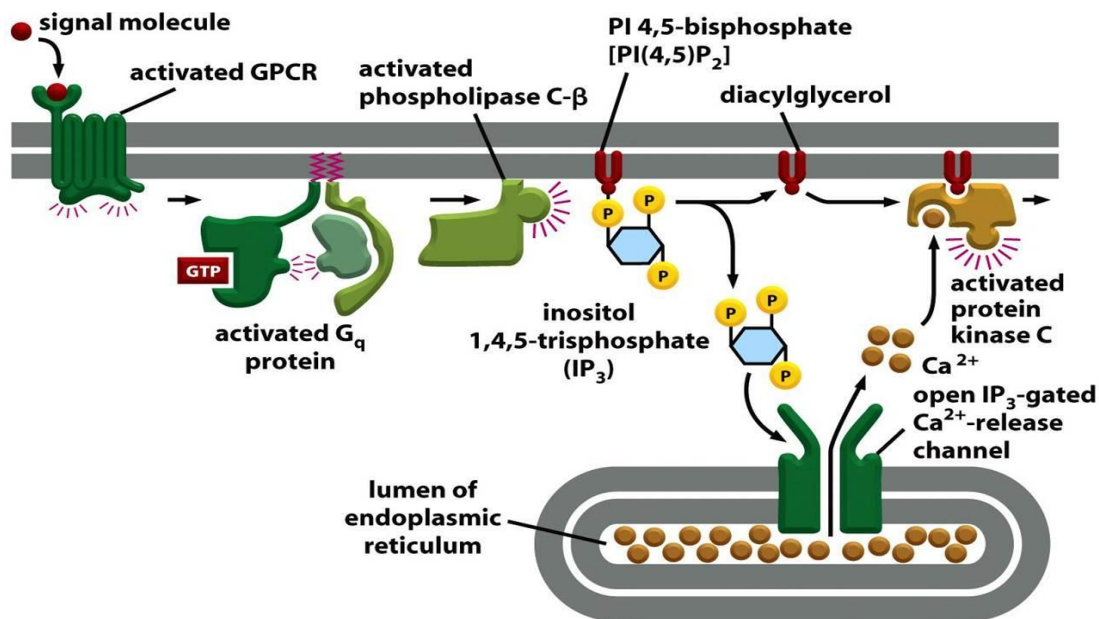


Figura 3. Liberación de Ca^{2+} a través de Receptores. Aquí, la unión del agonista al GPCR provoca la hidrólisis, por la actuación de la PLC, del PIP_2 en dos compuestos, IP_3 y DAG. El IP_3 difunde por el citosol hasta los IP_3Rs del RE, uniéndose a ellos y provocando un cambio conformacional de los mismos que permiten la liberación de Ca^{2+} al citosol, desde el RE, a favor de su gradiente electroquímico. La acción conjunta del Ca^{2+} liberado y del DAG, con ayuda de la fosfatidilserina, activan a la PKC.) (Alberst, Bray, Lewis, Raff, Roberts, & Watson, 2008)

Los IP_3Rs son canales de Ca^{2+} intracelulares activados por ligando, formados por cuatro subunidades. Se conocen tres genes diferentes que codifican para tres isoformas diferentes, $\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$ e $\text{IP}_3\text{R3}$. Cada una de ellas tiene sitios de splicing alternativo por lo que habría más de 3. Los diferentes isoformas están presentes de forma ubicua en todos los tejidos de animales, siendo la isoforma $\text{IP}_3\text{R1}$ la que se expresa principalmente en las neuronas.

Los IP_3R participan en diferentes procesos fisiológicos, como la transcripción de genes, procesos de aprendizaje y de memoria (Foskett, 2007). Como para casi todos los receptores, los IP_3R también tienen más de un regulador, pues el Ca^{2+} en sí mismo actúa como un modulador alostérico, dado que probabilidad de apertura de los IP_3R aumenta cuando se producen pequeños incrementos en la concentración de Ca^{2+} (<300 nM). Sin embargo, a elevadas concentraciones de Ca^{2+} (>1 μM) la apertura de estos receptores se ve inhibida (Foskett, 2007). Esta dependencia, en forma de campana, de la actividad de los IP_3R con la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ es crítica para la generación de señales de Ca^{2+} complejas en muchas células. Pero no sólo el Ca^{2+} y el IP_3 actúan como reguladores positivos de la actividad de estos canales, sino

que también lo hacen otras proteínas como calmodulina, proteína quinasa dependiente de calmodulina o PKC. Otro activador es el citocromo C, el cual interviene en la muerte celular por apoptosis, tal que cuando éste se libera desde la mitocondria, tiene lugar la apoptosis de origen mitocondrial. Como inhibidor de la actividad de los canales IP_3R s, cabe destacar a la cafeína.

La estructura de estos receptores consiste en tetrámeros de unos 2700 aminoácidos, conteniendo 6 segmentos transmembrana (Figura 4-Se muestra un dímero). El IP_3 se une en el extremo N-terminal. En esta zona de unión pueden distinguirse dos zonas estructurales, la zona alfa (que se llama así por estar formada por hélices- α) y la Beta (formada por hojas plegada β) que, cuando el IP_3 se aproxima, estas estructuras lo envuelven. Cada una de las subunidades tiene un sitio de unión para éste, pudiéndose unir hasta 4 moléculas por receptor. Sin embargo, se cree basta con que se unan entre 2 y 3 moléculas de IP_3 para activar el canal.

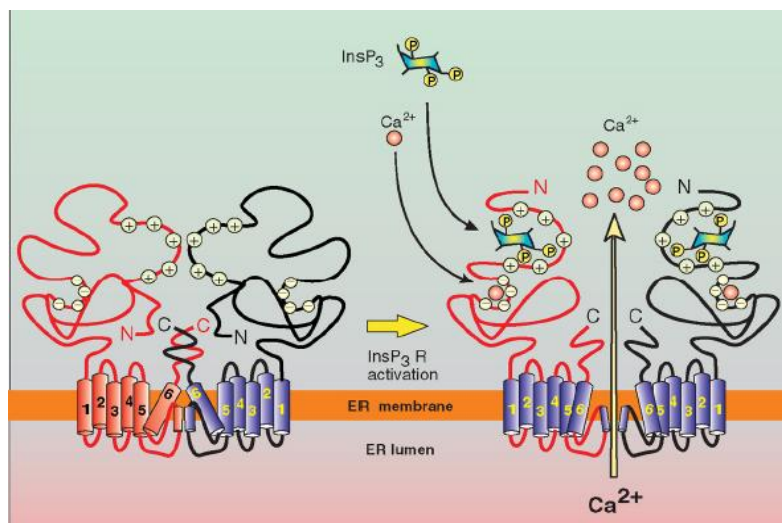


Figura 4. Salida de Ca^{2+} del retículo endoplasmático a través del IP_3R . Se observa como el Ca^{2+} y el IP_3 se unen al IP_3R originando un cambio conformacional de dicho receptor y, por ende, permitiendo así la salida de calcio del RE (Berridge M. J., 2012)

Como se observa en la Figura 4, lo que hay en el extremo amino terminal de cada subunidad proteica es una zona con abundantes cargas positivas y, dado que el IP_3 está cargado negativamente, propicia la unión de éste al receptor. El receptor también posee en su dominio citosólico, zonas con carga negativa de unión a Ca^{2+} . Por lo tanto, para que estos receptores se abran es necesario IP_3 y Ca^{2+} .

En la siguiente figura puede observarse cómo varían las probabilidades de apertura de estos receptores, según las concentraciones de IP_3 y Ca^{2+} .

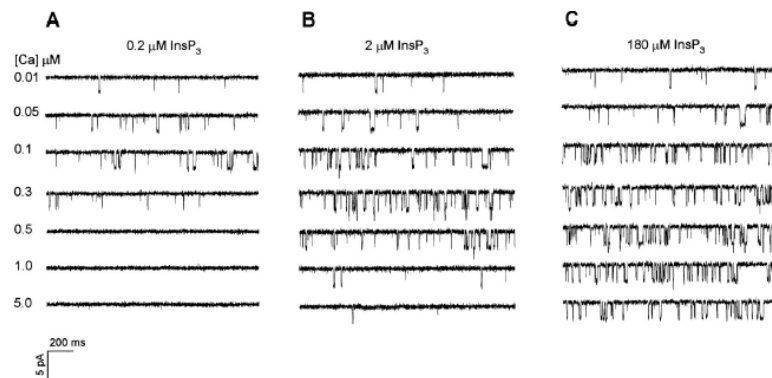


Figura 5. Corrientes unitarias generadas por distintas concentraciones de Ca^{2+} e IP_3 . A-C. Cambio de la probabilidad de apertura del IP_3R en función de la $[\text{Ca}^{2+}]$ y $[\text{IP}_3]$. (Kaftan, 1997).

El Ca^{2+} activa el IP_3R a bajas concentraciones, pero cuando ésta aumenta, se observa una inhibición o disminución de la probabilidad de apertura. Por lo tanto, el Ca^{2+} actúa como arma de doble filo, activando e inhibiendo el IP_3R según su concentración, lo que permite que no haya una excesiva liberación de este ión. Esta regulación podría generar oscilaciones de la concentración de Ca^{2+} citosólica, pues cuando vuelve a disminuir su concentración citosólica, hasta un cierto punto, el IP_3R podrá volverse a activar.

Cabe destacar cómo, por debajo de concentraciones fisiológicas, 100 nM, el IP_3R prácticamente no se activa, a pesar de elevadas concentraciones de IP_3 . La probabilidad de apertura de estos canales aumenta a medida que la concentración de IP_3 y de Ca^{2+} lo hace. Sin embargo, esta probabilidad de apertura difiere entre isoformas.

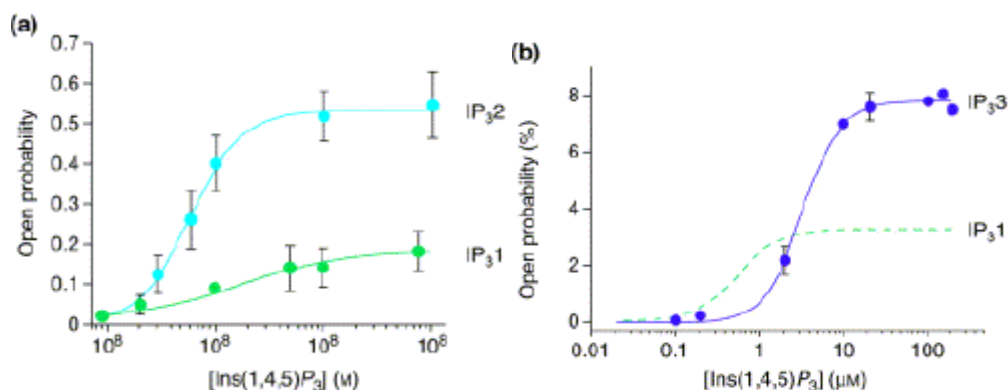


Figura 6. Probabilidad de apertura de las distintas isoformas de IP_3R según la $[\text{IP}_3]$. Cambio de la probabilidad de apertura de las diferentes isoformas del IP_3R en función de la $[\text{IP}_3]$. (Mak, 2001).

Éstos receptores también son activados por ATP. Desplaza la curva de activación tal que será necesaria una concentración de Ca^{2+} menor para que los IP_3R se activen.

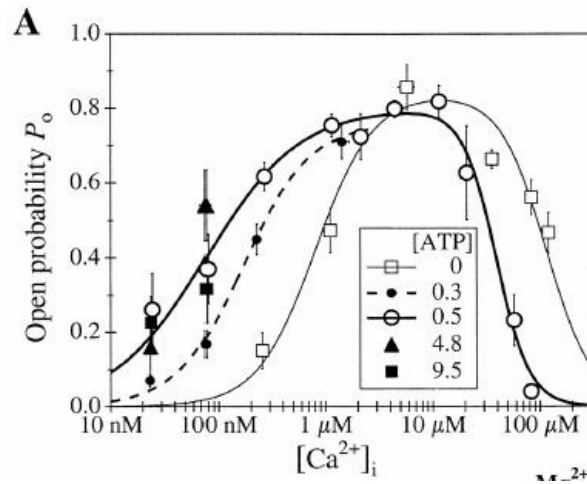


Figura 7. Probabilidad de apertura de IP_3R en función de la $[\text{ATP}]$ y $[\text{Ca}^{2+}]$. Cambio de la probabilidad de apertura del IP_3R en función de la $[\text{Ca}^{2+}]$ y $[\text{ATP}]$ (Mak, 2001).

3.2 REMODELACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR EN EL ENVEJECIMIENTO NEURONAL

Todo lo expuesto hasta aquí explica la correcta regulación del Ca^{2+} intracelular a nivel celular. Sin embargo, los diversos mecanismos regulatorios de esta homeostasis pueden verse alterados por diversas razones, como por ejemplo ciertas patologías o viceversa, la dishomeostasis del Ca^{2+} intracelular puede contribuir al desarrollo de diferentes patologías. Entre estas causas y consecuencias, y dada la temática del presente trabajo, cabe destacar el envejecimiento neuronal y, consecuentemente, enfermedades neurodegenerativas. Los efectos de esta desregulación pueden dar lugar a una pérdida de la función sináptica, menor plasticidad sináptica y degeneración neuronal que llevaría al deterioro cognitivo y la enfermedad neurodegenerativa.

Entre otros factores que pueden jugar un papel importante en la desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, cabe destacar el estrés oxidativo, las modificaciones a nivel del metabolismo energético mitocondrial y la formación de agregados de proteínas que se relacionan con enfermedades, como es el caso del péptido β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer.

3.2.1 Hipótesis del Remodelado del Calcio en el Envejecimiento Neuronal

En la década de los 80, surgió una hipótesis relacionada con la fisiología del envejecimiento neuronal y la neurodegeneración que sugería un papel importante por parte de los mecanismos de regulación del Ca^{2+} intracelular (Khachaturian, 1987)(Disterhoft, 1994). Alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular se traducen en una mayor susceptibilidad a enfermedades relacionadas con el envejecimiento y muerte neuronal. No obstante, dependiendo del tipo neuronal, los cambios y la susceptibilidad a dichos cambios difiere, teniéndose que es mayor para las neuronas hipocampales y corticales (Foster, 2007).

Entre los diferentes mecanismos alterados que regulan la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, se encuentran (Figura 8):

- Mayor actividad de los VOCCs.
- Disminución de proteínas tamponadoras de Ca^{2+} como calbindina
- Anormalidades a nivel mitocondrial:
 - Disfunción de la cadena de transporte de electrones.
 - Cambios en el $\Delta\Psi_m$.
 - Sobreexpresión del MCU (Calvo-Rodríguez, 2016)

Esto da lugar a la muerte celular, pues la producción de *especies reactivas de oxígeno* (ROS) se ve aumentada a consecuencia de lo anterior (Petrosillo, 2004).

- Depósitos de Ca^{2+} menos eficientes:
 - Aumenta la actividad de los RyR y, por ende, se libera más Ca^{2+} al citosol desde los depósitos.
 - Disfunción de la SERCA.

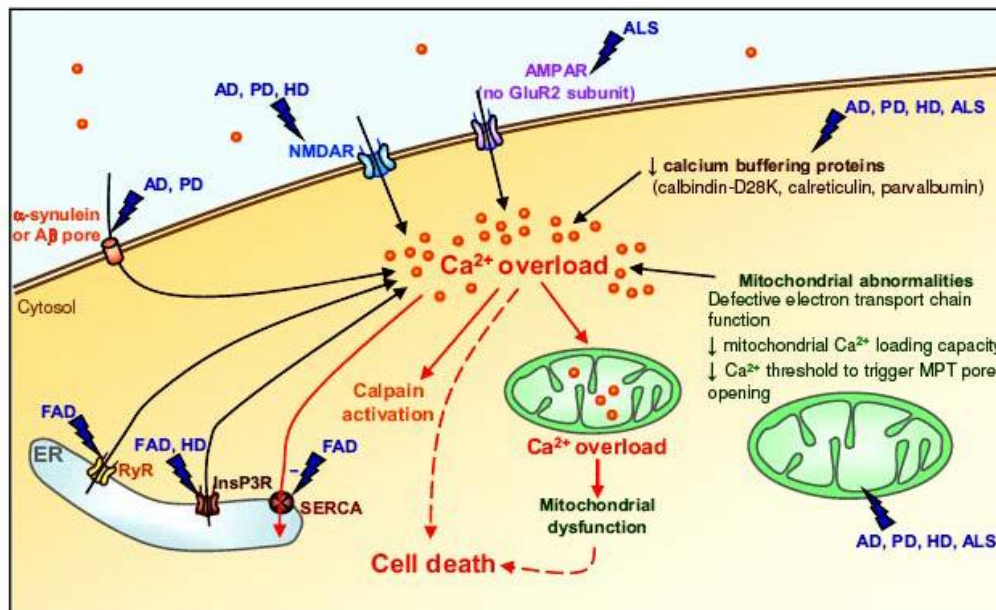


Figura 8. Remodelado del Ca^{2+} intracelular en la neurodegeneración. Se muestran las alteraciones producidas en la homeostasis del calcio intracelular en el proceso de neurodegeneración. Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease (HD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). (Marambaud, 2009).

Es importante remarcar que las alteraciones que sufren los mecanismos reguladores de la homeostasis del Ca^{2+} no son ni globales ni instantáneos, sino que son de carácter progresivo, a la par que locales (Toescu, 2007).

3.2.2 Fisiopatología del Envejecimiento Neuronal.

3.2.2.1 Plasticidad Neuronal

La plasticidad neuronal es la capacidad de estas células para crear nuevas conexiones, así como para destruirlas, así como de promover cambios en la eficacia sináptica con el fin de modificar su funcionamiento y, por ende, aprender, mejorar la respuesta a estímulos externos, etc ... o en otras palabras, de la capacidad de cambiar la fuerza de las conexiones sinápticas entre dos neuronas. Aquí cabe destacar los mecanismos de *Potenciación a Largo Plazo* (LTP) y la *Depresión a Largo Plazo* (LTD)

- La LTP puede ser entendida como un patrón de actividad sináptica que intensifica la fuerza sináptica de forma prolongada, resultado de la estimulación sincrónica de las

neuronas que intervienen en dicha sinapsis, aumentando así la densidad sináptica de *Receptores de Glutamato*. Así, la LTP en el hipocampo de los mamíferos depende de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de los receptores NMDA. El LTP es importante en tanto que parece estar relacionado con los procesos de aprendizaje y memoria, pensándose en éste mecanismo como uno de los principales en dichos procesos. En concreto, se ha observado un importante papel del Ca^{2+} en la plasticidad sináptica, pues, para que la LTP tenga lugar, es necesaria la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana postsináptica (Bliss, 1993).

El problema surge cuando, como se ha visto anteriormente, la concentración de Ca^{2+} se ve aumentada, pues esta situación resulta en una menor excitabilidad. Por lo tanto, en los sistemas nerviosos de animales envejecidos, respecto de los animales jóvenes, será necesaria una mayor estimulación para que la LTP tenga lugar (Foster, 2007).

- LTD: En animales envejecidos aumenta la susceptibilidad a LTD, pues el umbral que ésta requiere disminuye en éstos, respecto de los animales jóvenes. Esto, en cierto modo, puede explicar las dificultades de aprendizaje y problemas de memoria que presentan los animales ancianos.

3.2.2.2 *Entrada de Ca^{2+} en la Neurona*

Cabe distinguir las siguientes rutas de entrada de Ca^{2+} en la neurona:

- *Vía Receptores NMDA (NMDARs)*: Los NMDARs constituyen una de las principales vías de entrada de Ca^{2+} en la neurona post-sináptica. Además, están involucrados en la plasticidad sináptica, la memoria y en la excitotoxicidad del SNC, los cuales juegan un importante papel en el envejecimiento neuronal, sobretodo hipocampal. A pesar de los numerosos estudios realizados sobre el papel de estos receptores en el envejecimiento neuronal, los resultados inferidos muestran resultados contradictorios. Por un lado, unos autores afirman que la expresión, a nivel de proteína, de NMDARs, o la actividad de estos, se ve reducida (Lehohla, 2008)

(Bodhinathan, 2010). Por otro lado, se tiene una corriente totalmente contraria a lo anterior, pues hay estudios que afirman que se produce un aumento de la actividad de NMDAR (Brewer, 2007). Recientemente se ha descrito que el envejecimiento promueve cambios relativos en la expresión de diferentes isoformas de NMDARs que dan lugar a una mayor entrada de Ca^{2+} con el envejecimiento (Calvo, 2015).

- Vía VOCCs: En las neuronas de hipocampo, pero no por ello en todos los tipos neuronales, se han encontrado evidencias de que la entrada de Ca^{2+} en la neurona a través de los VOCCs está correlacionado positivamente con la edad. Esto podría deberse al aumento de los canales tipo L, puesto que éstos tienden a permanecer mayor tiempo abiertos cuanto más envejecida esté la neurona, lo que posibilita una mayor entrada de Ca^{2+} (Chan, 2007), (Thibault, 2007).

3.2.2.3 *Bombeo de Ca^{2+} y Proteínas de Unión a Ca^{2+}*

A diferencia de las neuronas jóvenes, en las envejecidas la eficiencia del proceso de vuelta al estado basal tras una estimulación se ve disminuida, pues requiere de un mayor lapso de tiempo para llevarse a cabo. En este proceso de recuperación tienen mucho que ver los sistemas de bombeo de Ca^{2+} , tal como la *Bomba de Ca^{2+} de la Membrana Plasmática* (PMCA), para la que existen evidencias de una menor expresión y una reducción de su actividad en las células envejecidas, respecto de las jóvenes, pues los ROS generados a raíz de la disfunción mitocondrial, tienen cierto carácter inhibitorio sobre dicha bomba, tanto directamente o a través de un regulador suyo, la calmodulina (Zaidi, 1998) (Zaid, 1999) (Michaelis, 1996). La calmodulina, al igual que otras proteínas tales como calbindina y parvalbúmina, actúan como tamponadores de Ca^{2+} dada su afinidad por el mismo. Aunque no es generalizable a todos los tipos neuronales, en el SNC la expresión de estas proteínas se ve disminuida con la edad.

3.2.2.4 *Depósitos Intracelulares de Ca^{2+}*

En lo referente al RE, (Thibault, 2007) evidenciaron, en neuronas hipocampales, un aumento de la liberación de Ca^{2+} a través, tanto de IP_3R como de RyR, así como una reducción en la actividad de la SERCA (Pottorf, 2000). Sin embargo, (Kirischuk, 1996) encontraron que este hecho no es generalizable a los diferentes tipos neuronales.

En cuanto a la mitocondria, como ya se ha comentado anteriormente, ve su funcionalidad alterada. Hay evidencias claras de que, con el envejecimiento, se produce una despolarización del potencial de membrana mitocondrial (Hagen, 1997), lo que resultaría en un descenso de la capacidad mitocondrial para la captura de Ca^{2+} (Xiong, 2004). En contraposición, podría verse esta modificación como una ventaja adaptativa dado el hecho de que así se impide, en cierto modo, una sobrecarga de Ca^{2+} en la mitocondria y, por ende, dificultando el alcanzar la muerte celular que dicha sobrecarga podría provocar (Toescu, 2007).

Las neuronas son unas de las células que mayor energía consumen. Y en este punto se observan claras diferencias entre las neuronas jóvenes y envejecidas, pues estas últimas son menos eficientes en la generación de ATP al verse dañada la actividad de las ATPasas, provocando que los niveles de Ca^{2+} permanezcan elevados, resultado de lo anterior con una entrada mantenida del mismo Ca^{2+} a través de los Receptores de glutamato y de los VOCCs (Navarro, 2004) (Nicholls, 2008).

3.2.3 Modelos para el Estudio del Envejecimiento Fisiológico *In Vitro*

El estudio del envejecimiento fisiológico del cerebro puede realizarse a través de diversos modelos, desde cultivos *in vitro* hasta animales *in vivo* o rodajas de cerebro. Los modelos animales o rodajas de cerebros se emplean para el estudio del desarrollo neuronal o la degeneración. Sin embargo, dada la complejidad del tejido nervioso a estudiar y de los mecanismos a nivel celular o molecular en estos modelos, resulta en un camino un tanto tortuoso. Para intentar sortear esta complejidad, en ocasiones se recurre a los sistemas *in vitro* que, aunque no presentan las características de un tejido intacto, son menos complejos que el tejido neuronal y, por lo tanto, resultan ideales para estudiar, tanto la localización subcelular de proteínas de interés, como la homeostasis de ciertos iones.

En cuanto a las líneas celulares continuas, éstas no suelen utilizarse, pues al dividirse no envejecen de igual forma a como lo hacen las neuronas en condiciones reales. Por ello, en la mayoría de las investigaciones de tal índole se recurre a los cultivos primarios. Para estos cultivos pueden emplearse células obtenidas de tejido procedente de un cerebro viejo.

Sin embargo, dada la alta complejidad de estos tejidos para el cultivo celular, tanto en su obtención como en su mantenimiento, los cultivos de neuronas se preparan normalmente a partir de embriones en los últimos estadios del desarrollo o de ratas recién nacidas. El hecho de elegir ratas como modelo animal se debe a que el genoma de éstas comparte un 97 % de homología con el de los seres humanos.

Está descrito que las neuronas, mantenidas en cultivo a largo plazo, provenientes de cultivos primarios de embriones o de ratas neonatas, puede considerarse, al menos en parte, un buen modelo para el estudio de diversos aspectos del envejecimiento neuronal (Brewer, 2007), (Sodero, 2011). Por ejemplo, se ha encontrado una correlación entre estudios *in vivo* y estos cultivos al estudiar el aumento progresivo de la vulnerabilidad a la excitotoxicidad, la cual sucede a medida que los cultivos envejecen. También se han descrito, en neuronas de hipocampo en cultivo, más marcadores que correlacionan con el envejecimiento neuronal *in vivo*, como son la acumulación de *Especies Reactivas del Oxígeno* (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, todos ellos tras pocas semanas en cultivo (Sodero, 2011). A su vez, las neuronas de hipocampo en cultivo muestran un aumento del tamaño de los cuerpos celulares a medida que éstas envejecen, así como la formación de una extensa red de neuritas (Banker, 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, 1994).

A nivel mitocondrial, existe un cambio en el potencial de membrana, pues en ciertas preparaciones se ha observado que con el envejecimiento parte de las mitocondrias aparecen despolarizadas (Hagen, 1997). 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, 2005), característica que también se observa en las neuronas que han sido envejecidas en cultivo (Sodero, 2011).

Por lo tanto, queda patente que el modelo *in vitro* de neuronas de hipocampo a partir de cultivos primarios de ratas neonatas proporcionan un buen modelo animal para estudiar la fisiología del envejecimiento neuronal.

4 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

4.1 OBJETIVOS

En relación a los antecedentes anteriormente descritos, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: El envejecimiento neuronal se relaciona con un aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ y la remodelación del Ca^{2+} de los orgánulos subcelulares, entre los que destacan la mitocondria y el retículo endoplásmico. De acuerdo a esto, el principal objetivo del presente trabajo es contribuir a estudiar las posibles alteraciones a nivel de la regulación del Ca^{2+} intracelular en el envejecimiento. Para abordar dicho objetivo se plantea abordar los siguientes objetivos:

1. Caracterización de cultivos mixtos de hipocampo de rata tras diferentes días de cultivo *in vitro*.
2. Análisis de expresión diferencial, a nivel de proteína, de las isoformas del IP_3R durante el envejecimiento neuronal *in vitro*.
3. Estudio de la variación del potencial mitocondrial de neuronas con el envejecimiento *in vitro*.

4.2 PLAN DE TRABAJO

Para poder alcanzar los objetivos descritos en el apartado anterior se han seguido las siguientes etapas:

1. Revisión bibliográfica.
2. Obtener cultivos primarios de hipocampo de rata.
3. Caracterización de los tipos celulares presentes en el cultivo.
4. Demostrar la funcionalidad de las neuronas.
5. Determinar el nivel de expresión de las distintas isoformas del Receptor Inositol-trifosfato en neuronas durante el envejecimiento *in vitro*.
6. Evaluar el potencial mitocondrial de neuronas a diferentes días *In Vitro*.
7. Análisis de resultados y elaboración de conclusiones.
8. Elaboración de la memoria.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1 Equipos Empleados

A lo largo de este trabajo se han empleado diversos equipos, los cuales se enumeran a continuación:

- Incubador Hera Cell 150 (Thermo Scientific)
- Campana de Flujo Laminar (Telstar Biostar)
- Equipo de imagen de fluorescencia dotado de microscopio invertido Zeiss S100 TV con cámara de fluorescencia Hamamatsu ER-ORCA (Hamamatsu Photonics France), rueda de filtros y sistema de perfusión.
- Microscopio Eclipse 90i (Nikon)
- Microscopio eclipse T5100 (Nikon)
- Microscopio Gmbt Stemi 305 Zeiss

5.1.2 Tampones y Soluciones

5.1.2.1 Medios para Cultivos Celulares y Disgregación de Tejidos

➤ **Medio HANK'S BSA 0.6%**

- *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS)
- Albumina de suero bobino libre de ácidos grasos (BSA)0.6%

➤ **Medio Nutriente F-12 HAM (pH 7.42)**

- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) 4.5 g/L de glucosa
- *4-2-Hidroxyethyl piperazine-1-ethanesulfonic acid* (HEPES) 25 mM
- NaHCO_3 4 mM

➤ **Medio Neurobasal**

- Neurobasal
- Gentamicina 1 µg/mL
- L-Glutamina 2 mM
- Vitamina B27 2 %
- *Suero Bovino Fetal* (FBS) 10%

➤ **Tampón Fosfato Salino (PBS) (pH 7.4)**

- NaCl 136 mM
- KCl 2.7 mM
- Na₂HPO₄ 8 mM
- KH₂PO₄ 1.5 mM

5.1.2.2 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 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 (Ca⁰) (pH 7,42)**

- NaCl 145 mM
- KCl 5 mM
- MgCl₂ 1 mM
- HEPES 10 mM
- Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) 0.5 mM

➤ **Medio NMDA Libre de Magnesio (Mg⁰)**

- MgO
- Glucosa 10 mM
- CaCl₂ 1 mM
- NMDA 100 μM
- Glicina 10 μM

➤ **Medio FCCP 10 μM en Ca²⁺ 1mM (Ca1)**

- Ca1 mM
- FCCP 10 μM
- Oligomicina 0.12 μM

➤ **Dicloroacetato (DCA) 5mM en Ca1**

- Ca1 mM
- DCA

5.1.3 Reactivos

➤ **BD Transduction Laboratories (Madrid, España):**

- Poly-D-Lysine
- Anticuerpo primario policlonal de ratón anti (α) IP₃R3

➤ **Covance (Princeton, NJ, EE.UU):**

- Anticuerpo primario monoclonal de ratón α - β -tubulina III

➤ **Gibco (Barcelona, España):**

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

➤ **Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU):**

- Fura2/AM
- TMRM
- Anticuerpo secundario polilonal α -IgG de conejo conjugado Alexa Flúor 488, hecho en cabra.
- Anticuerpo secundario polilonal α -IgG de conejo conjugado Alexa Flúor 488, hecho en mono.

➤ **Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU):**

- Anticuerpo secundario α -IgG de conejo conjugado Alexa Flúor 594

➤ **Lonza (Barcelona, Spain):**

- *Suero Bovino Fetal* (FBS)

➤ **Merck (Madrid, España):**

- Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)

- CaCl₂

- KCl

- Na₂HPO₄

- KH₂PO₄

- HCl

- MgCl₂

- NaCl

- NaOH

- Tris-HCl

- Triton X-100

➤ **Milipore Corp (Bedford, MA,EE.UU)**

- Filtros estériles de 0.22 μ m

➤ **Nunc Labclinics (Barcelona, Spain):**

- Placas de cultivo de cuatro pocillos

- Placas Petri

➤ **Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España):**

- 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI)

- Anticuerpo secundario α -IgG de ratón conjugado con FITC, hecho en cabra

- Anticuerpo primario policlonal de conejo α -GFAP

- DCA

- DNAsa I

- *Albumina de Suero Bovino* libre de ácidos grasos (BSA)

- Glicina

- HEPES
- NMDA
- *Paraformaldehído* (PFA)

➤ **Worthington (Lakewood, NJ, EE.UU):**

- Papaína 37.1 u/mgP

➤ **Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, EE.UU):**

- Anticuerpo primario policlonal de cabra α -IP₃R1
- Anticuerpo primario policlonal de cabra α -IP₃R2

5.1.4 Animales

Las ratas Wistar neonatas son suministradas por el animalario de la Universidad de Valladolid. Todos los animales se manipulan de acuerdo al estándar ético de la Universidad de Valladolid, bajo los protocolos aprobados por el animalario de acuerdo a la Convención Europea 123/consejo de Europa y la Directiva 86/609/EEC.

5.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

5.2.1 Cultivos Primarios de Neuronas de Hipocampo

5.2.1.1 Preparación de Placas de Cultivo Celular

➤ **Cristales de Poly-D-Lisina**

Se utilizan cristales de 12 mm de diámetro. Se sumergen en etanol 100 % para esterilizar. Se colocan apoyados en la pared de una placa Petri grande con el fondo cubierto de parafilm para que se sequen. Una vez se ha evaporado el etanol, se colocan los cristales en el fondo de la placa y con ayuda de una pipeta Pasteur se añade a cada uno una gota de poly-D-Lisina de concentración 1 mg/mL. La Poly-D-Lys facilita la unión de proteínas y células a superficies sólidas para aplicaciones biológicas, dado que mejora la interacción electrostática entre los iones cargados negativamente de la membrana celular y los iones cargados positivamente de la superficie del cultivo al aumentar el número de sitios cargados positivamente disponibles para la unión a las células.

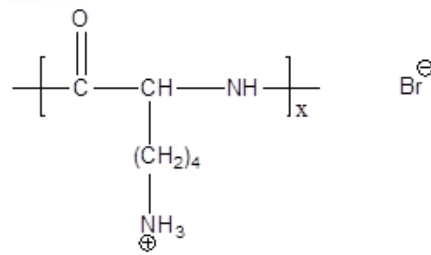


Figura 9. Estructura Poly-D-Lys. Se trata de un polímero sintético cargado positivamente procedente del aminoácido D-Lisina.

Se deja actuar durante 12 h en el incubador a 37 °C y 10% de CO₂ en condiciones de esterilidad. Transcurrido este tiempo, se retira la poly-D-Lys con una pipeta Pasteur y a continuación, se lava con agua desionizada estéril. Para ello se añade una gota de agua desionizada estéril, se deja actuar durante 15 minutos y se retira con una pipeta. Se realizan seis lavados. Finalmente, se coloca un cristal, con el lado tratado hacia arriba, en cada uno de los cuatro pocillos de una placa de cultivo celular (Nunc).

➤ **Placas Nunc**

Bajo campana de flujo laminar se añaden 500 µL de Neurobasal a cada pocillo y se guardan en el incubador a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta el momento de su uso, para que el medio tenga el pH idóneo.

5.2.1.2 *Cultivo de Neuronas de Hipocampo*

Las ratas Wistar neonatas (0-1 días) se sacrifican por decapitación siguiendo el protocolo de Brewer (Brewer G. T., 1993) modificado por Perez-Otaño (Perez-Otano, 2006) en condiciones de esterilidad, para posteriormente extraer el cerebro y diseccionarlo, separando el hipocampo de la corteza. Las células de interés se disocian mecánicamente y por digestión enzimática obteniendo una mezcla de neuronas y células glía.

➤ **Disección**

Previamente a la disección, se activa la papaína, encargada de la disgregación enzimática del hipocampo. Para ello, en campana, en un eppendorf se añaden 1800 µL de BSA 0.6 % y 2% de papaína 36.8 mgP/mL y se se incuba durante 20 minutos a 37 °C y 10 %

de CO₂. Una vez que la papaína esta activada, se filtra utilizando un filtro PUDF de 0.22 µm a un eppendorf estéril.

La rata se sacrifica por decapitación y la cabeza se lava en HAM'S F-12. Posteriormente, ésta se coloca sobre una placa Petri con el fondo cubierto de HAM'S F-12 para proceder a la extracción del cerebro, para ello se corta la piel y el cráneo, y con ayuda de una espátula se extrae el cerebro, el cual se lava en medio HAM'S F-12. Tras la extracción del cerebro, con ayuda de un bisturí, se realizan cortes longitudinales en cada hemisferio, entre la corteza y el mesencéfalo y se transfieren las partes seleccionadas (hemisferios) a una placa Petri con medio HAM'S F-12. Usando un microscopio estereoscópico de tipo Greenough, se retiran las meninges. El hipocampo es una pequeña estructura con forma de haba situada en el lóbulo temporal medio. El hipocampo se separa de la corteza, empleando unas tijeras de oftalmólogo, se retira el giro dentado. Posteriormente, el tejido de hipocampo se transfiere a una placa de 4 pocillos que contiene medio HANK'S BSA 0.6 % y se trocea el tejido con tijera de oftalmólogo.

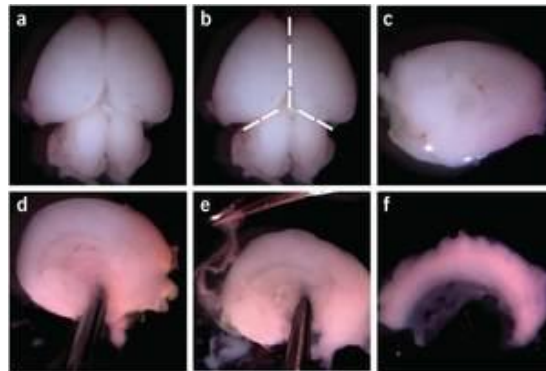


Figura 10. Disección Hipocampo de ratas neonatas. Tras extraer el cerebro, se realizan cortes siguiendo la línea discontinua blanca que muestra la figura b separando así ambos hemisferios. A continuación, se retiran las meninges y posteriormente el giro dentado, obteniendo así el hipocampo.

A continuación, los trozos de hipocampo se digieren mecánicamente. Para ello, se transfieren a un eppendorf, el cual contiene 1800 µL una disolución de papaína (20 unidades de papaína por mL medio de HAM's F-12) previamente activada y filtrada; y se incuban durante 15 minutos a 37 °C en una atmosfera a 10 % de CO₂. Tras la incubación se añaden 80 µL DNAsa I (50 µg/mL) y se incuba en las mismas condiciones durante 15 minutos, de esta forma se elimina el DNA que puede quedar en el medio, ya que resulta tóxico para las neuronas.

➤ **Purificación de las células**

Posteriormente a la incubación con papaína y DNAsa I se lava el tejido 3 veces con medio Neurobasal, dejando decantar los fragmentos de hipocampo y retirando el sobrenadante. A continuación, se disgregan de forma mecánica con una pipeta de 5 mL en medio Neurobasal y el sobrenadante se pasa a un tubo estéril de 10 mL hasta obtener un volumen aproximadamente de 9 mL. La suspensión de células resultante se centrifuga a 900 rpm y 24 °C durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y las células se resuspenden en 100 µL de *Horse Serum* (HS) y 900 µL de medio Neurobasal.

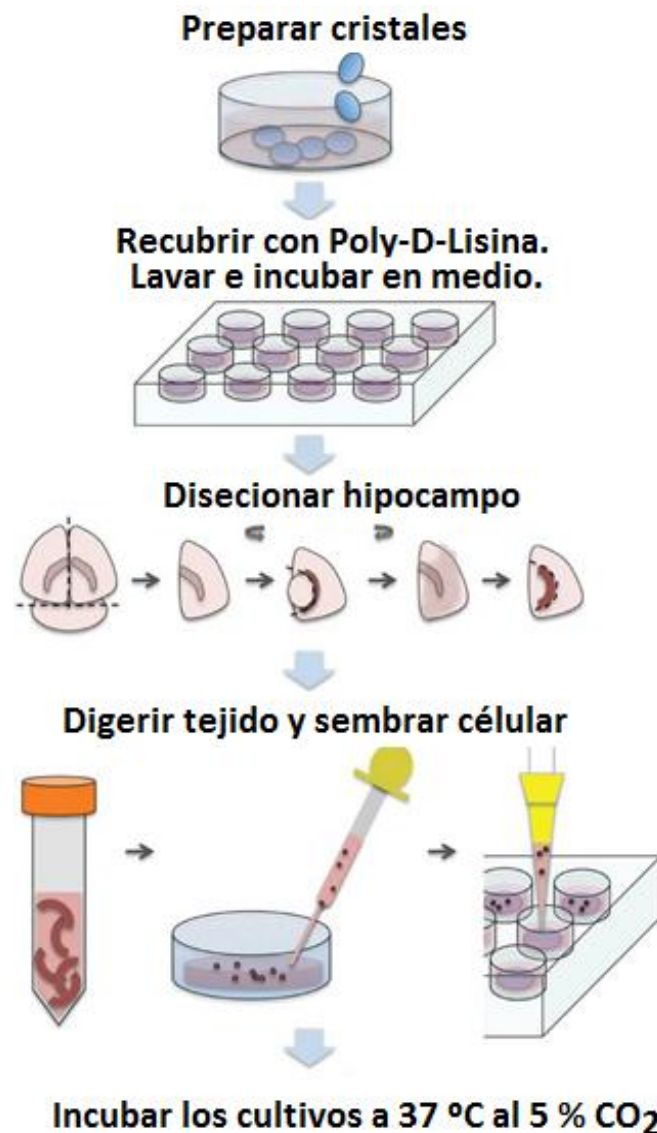


Figura 11. Protocolos para cultivos primarios de células de hipocampo de ratas neonatas. En orden decreciente: i) Preparación de cristales de Poly-D-Lysina, ii) Extracción del hipocampo de ratas neonatas. iii) Disgregación del tejido, iv) Siembra de las células en cristales cubiertos de poly-D-Lysina. Modificado de (Beaudoin, 2012).

➤ **Recuento y siembra de células**

En una cámara *Neubauer* y con ayuda de una pipeta Pasteur se añade una pequeña alícuota de la suspensión celular. A continuación, en el microscopio se cuentan las células. Para, posteriormente, determinar el volumen necesario de la suspensión celular para sembrar en cada cristal el número de células deseado, en este caso 30 000 células/cristal.

$$V(\mu L) = \frac{30\,000 \text{ cél}}{\text{número de cél/mL}} \cdot \frac{1000 \mu L}{1 \text{ mL}}$$

Una vez hallado el volumen necesario, éste se añade gota a gota en forma de cruz sobre los cristales, colocados en placas de cultivo celular (Nunc), para que las células queden repartidas homogéneamente y se incuban a 37 °C y 5 % CO₂ hasta su utilización.

5.2.2 Imagen de Calcio Intracelular Empleando la Sonda Fluorescente Fura2/ AM

La medida de la concentración de Ca²⁺ libre en el citosol a nivel de célula única se realiza mediante imagen de fluorescencia, empleando la sonda fluorescente fura-2/AM. El fura-2 es una sonda quelante fluorescente, desarrollada por el premio Nobel Prof. Roger Tsien, recientemente fallecido, de tal forma que compleja al Ca²⁺ y permite su monitorización en tiempo real. El espectro de excitación de fura-2 explica las propiedades de esta quelante como sonda de Ca²⁺. Al aumentar la concentración de Ca²⁺ aumenta la fluorescencia emitida a 510 nm cuando excitamos la sonda con luz de 340 nm. Por el contrario, el aumento de la concentración de Ca²⁺ induce el apagamiento de la fluorescencia emitida a 510 nm cuando excitamos con luz a 380 nm. Este diferente comportamiento a estas dos longitudes de onda permite realizar medidas ratiométricas, lo que tiene varias ventajas. El cociente de fluorescencias F340/F380 cambia mucho más que cualquiera de las dos fluorescencias por separado y hace la medida de calcio independiente de la carga de colorante en cada célula (Grynkiewicz, 1985).

El fura-2 es un indicador de Ca²⁺ que contiene restos aromáticos, los cuales le confieren sus propiedades fluorescentes. Se trata de una molécula polar, y por ende, incapaz de atravesar las membranas celulares, por lo que es incluido en las células en forma de su derivado acetoximetiléster (fura-2/AM), el cual, gracias a su carácter hidrófobo atraviesa las

membranas celulares mediante transporte pasivo. Una vez en el interior de las células es hidrolizado por esterasas intracelulares liberando la molécula de fura-2 ácido y quedando retenido el fluoróforo en el interior (Figura 12).

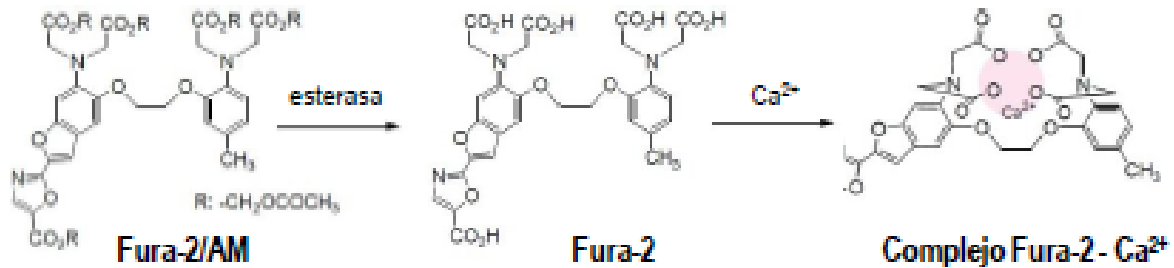


Figura 12. Estructura química del fura-2/AM, fura-2 ácido y el complejo fura-2-Ca²⁺. Tras la incubación de las células con Fura-2/AM, molécula liposoluble, una vez alcanzado el interior celular, las esterasas hidrolizan dicha molécula a su forma hidrosoluble (FURA-2). La unión del Ca²⁺ al FURA-2 provoca la emisión de fluorescencia proporcional a la [Ca²⁺].

La unión de Ca²⁺ al Fura-2 modifica el espectro de excitación del fluoróforo. La Figura 13 muestra el espectro de excitación del fura-2 para distintas concentraciones de Ca²⁺ (en el rango nM). La figura muestra la intensidad de fluorescencia emitida por el colorante a 510 nm tras la excitación con distintas longitudes de onda. Se puede apreciar cómo varía la intensidad con la concentración de Ca²⁺ libre. La fluorescencia emitida por el fura-2 aumenta con concentraciones crecientes de Ca²⁺ 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 [Ca²⁺]_{cit}, estimada a partir de la relación entre las intensidades detectadas al excitar con 340 y 380 nm (cociente o ratio F340/F380), esto hace que las medidas sean independientes de la cantidad de colorante acumulado dentro de la célula 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 (Tsién, 1988). En otras palabras, la medida ratiométrica de las señales obtenidas a ambas longitudes de onda permite eliminar artefactos. 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 Ca²⁺ como ocurre con otros indicadores. El registro obtenido de fluorescencia emitida en tiempo real permite la monitorización de la [Ca²⁺]_{cit} en las células vivas (Grynkiewicz, 1985).

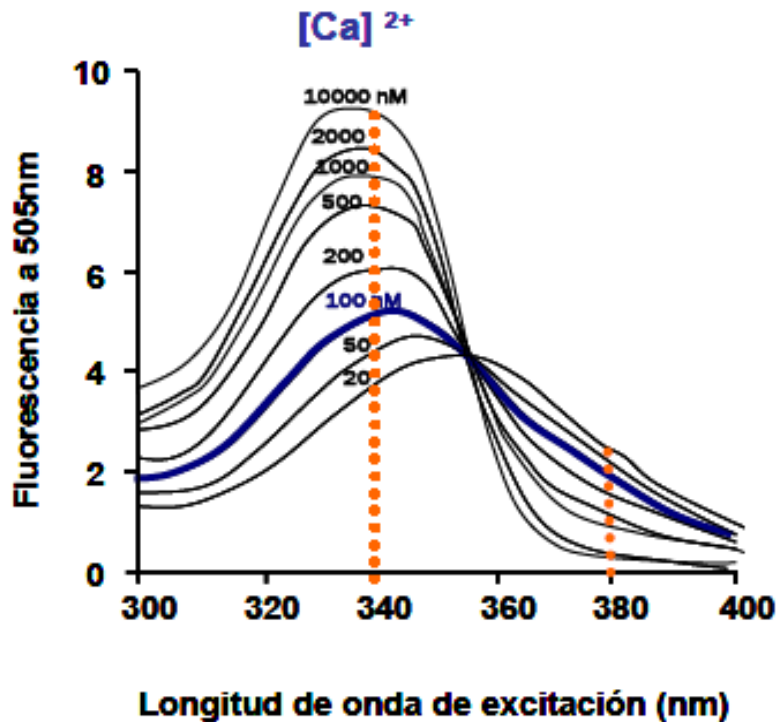


Figura 13. Espectro de excitación del fura-2. La gráfica muestra la emisión de fluorescencia de la molécula de fura-2 a 505 nm cuando es excitado con longitudes de onda entre 300 y 400 nm. Medidas realizadas con Ca^{2+} libre a concentraciones entre 20 nM y 0,1 mM, a 20 °C. Se observa el máximo de emisión del complejo fura-2- Ca^{2+} 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, 1985)

Los procedimientos de determinación de Ca^{2+} basados en el empleo de fura-2 como colorante, que se mide a dos longitudes de onda diferentes, ofrecen claras ventajas sobre otros que se miden a una única longitud de onda, como por ejemplo el Fluo3. Esto se debe a que las estimaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ con estos otros colorantes, al no usar como señal una medida ratiométrica, éstas señales no serán independientes de la cantidad de colorante acumulado dentro de la célula, del espesor de ésta ni de la intensidad de la luz de excitación (Tsien, 1988).

Para la realización de las medidas de Ca^{2+} citosólico las células se sembraron con una densidad alrededor de 30.000 células/cristal y se dejaron en cultivo. Como se ha mencionado anteriormente, el fura-2 es una molécula muy polar, incapaz de atravesar las membranas celulares, por ello las células se incuban durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad con el derivado pentaacetoximetiléster del fura-2 (fura-2/AM) a una

concentración de 4 μM , pues este, al ser hidrofóbico atraviesa la membrana mediante transporte pasivo. Una vez en el interior celular, es hidrolizado por esterasas intracelulares liberando la molécula de fura-2 en forma de ácido libre quedando retenido el fluoróforo en el interior. Posteriormente, los cristales con las células se colocan sobre una cámara de perfusión (Warner Instruments) termostaticado a 37 °C, donde se perfunden de forma constante, y se fija en a la pletina del microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert S100 TV) (Figura 14). Las células se excitan alternativamente con longitudes de onda de 340 nm y 380 nm mediante una rueda de filtros (Warner Instruments) sincronizada a la fuente de excitación halógena (Zeiss X-Cite Series 120; la fluorescencia emitida a 510 nm es recogida a través de un objetivo de inmersión en aceite 40x (Zeiss 40/1,30 oil y capturada por una cámara digital (OrcaER de Hamamatsu Photonics)) y una cámara digital. Las imágenes de fluorescencia fueron analizadas mediante el programa de análisis *AquaCosmos 2.0 de Hamamatsu*. Los registros de la medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se realizan tanto a 340 como a 380 nm. Así, en la representación gráfica que se lleva a cabo, la variable dependiente es el cociente de fluorescencias (Ratio F340/F380), que es directamente proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$.

Como se ha mencionado anteriormente, los cultivos de hipocampo, son cultivos mixtos, en los cuales se distinguen neuronas y células de la glía. Por ello, es necesario identificar ambos tipos para estudiar su respuesta de forma independiente. Con el fin de lograr la identificación de neuronas y glía se perfunden las células con medio libre de Mg^{2+} (Mg^0) y se aplica NMDA 100 μM en dicho medio.

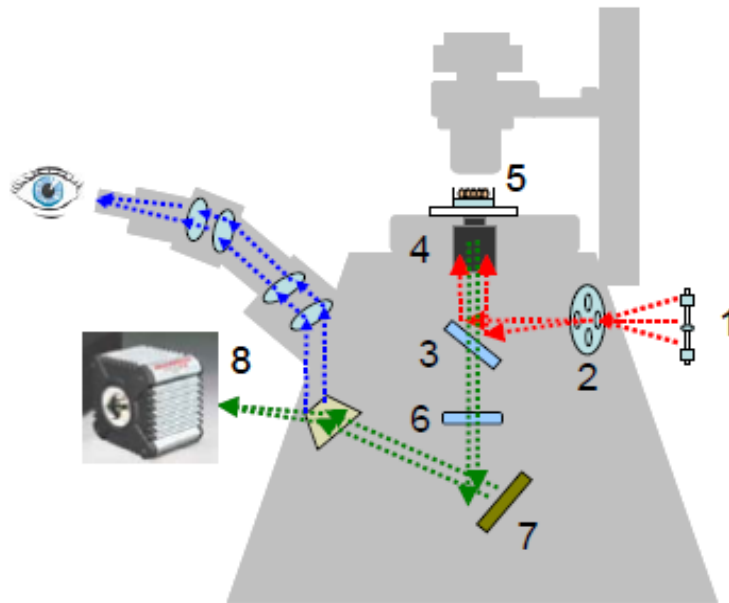


Figura 14. Representación del equipo de fluorescencia usado en los experimentos de determinación de $[Ca^{2+}]_{cit}$. (1) Lámpara de fluorescencia de excitación (línea roja) que atraviesa la rueda de filtros monocromados de excitación (2). (3) El espejo dicróico, inclinado 45° respecto del haz de luz incidente desvía la luz hacia la cámara termostatazada con células (5). Las imágenes de fluorescencia emitidas (línea azul) se recogen a través de un objetivo de inmersión 40x (Nikon, fluor 40/1.30 oil), pasan a través de un espejo dicróico (6), son filtradas por un filtro de emisión ($\lambda = 520 \text{ nm}$) (7) y son capturadas por una cámara de alta sensibilidad de adquisición de imágenes (8). Finalmente las imágenes son procesadas en un ordenador.

5.2.3 Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es una técnica que se ocupa de la localización microscópica de moléculas, tales como proteínas, presentes en células, utilizando como base la reacción específica antígeno-anticuerpo. En nuestro caso el antígeno es una proteína o parte de una proteína que se quiere detectar en las células. En la actualidad, gracias a la estandarización de su protocolo (Figura 15) se ha convertido en un método sencillo, rápido y potente. Se basa en la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer a moléculas y unirse a ellas. Además, la conjugación de los anticuerpos con enzimas o con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en células.

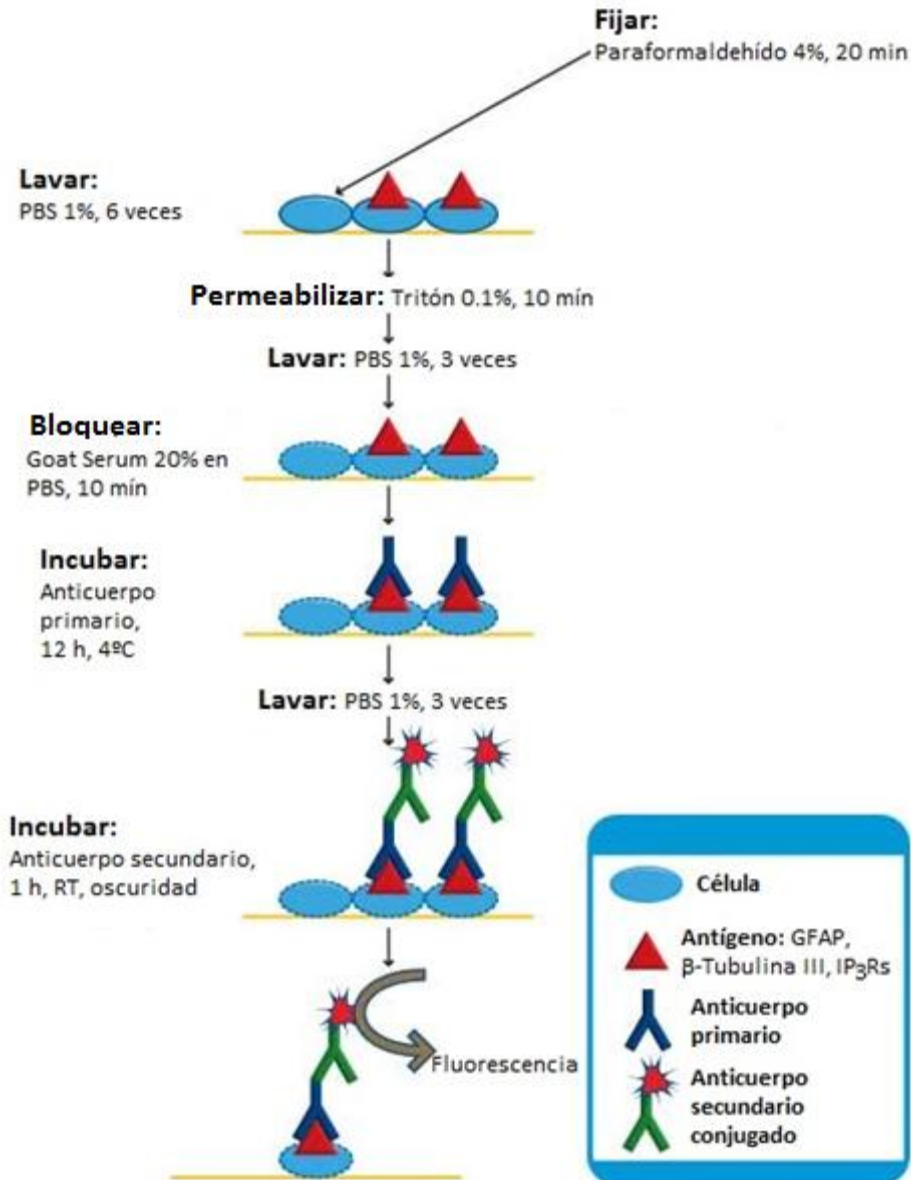


Figura 15. Protocolo Inmunocitoquímica. i) Fijar células ii) Lavar con PBS 1 %, iii) Bloquear con tritón 0.1 %, iv) Lavar con PBS 1 %, v) Permeabilizar la membrana utilizando GS 20, vi) Incubar con el anticuerpo primario vii) lavar con PBS 1 %, viii) Incubar con anticuerpo secundario.

5.2.3.1 Caracterización de cultivos primarios de hipocampo

Los cultivos primarios de células de hipocampo son cultivos mixtos, en ellos se distinguen neuronas y células de la glía. Con el fin de caracterizar los dos tipos de células presentes en los cultivos se realiza una doble inmunocitoquímica que permite diferenciar las glías y las neuronas. Para llevar a cabo la identificación de las neuronas se emplea como anticuerpo primario Anti-β-tubulina III de ratón, el cual se une específicamente a la tubulina

III, una proteína del citoesqueleto específica en neuronas. Como anticuerpo secundario se utiliza α -IgG policlonal de ratón conjugada con FITC, hecho en cabra, que emite fluorescencia verde. Para la identificación de las glías se emplea como anticuerpo primario α -GFAP (anti-proteína fibrilar ácida de la glía) hecho conejo, y α -IgG de conejo policlonal conjugado con Alexa Flúor 594, hecho en cabra, como anticuerpo secundario que emite fluorescencia roja.

Para llevar a cabo la inmunocitoquímica, una vez sembradas las células en cristales de 12 mm tratados con poli-D-Lisina, se fijan en primer lugar las células, para ello se retira el medio de incubación de los cultivos (Neurobasal) y se lavan tres veces con PBS 1 % y se incuban en paraformaldehído al 4 % (PFA 4 %) en solución tampón fosfato (PBS) durante 20 min. Tras la incubación se lavan las células 6 veces con PBS 1 %. Seguidamente se permeabilizan las células, esto permite la unión del anticuerpo a su diana específica. La permeabilización de las células se realiza incubando estas durante 10 min con el detergente Tritón X100 al 0.1 % en suero de cabra (GS) al 10 % en PBS, tras los cuales se realizan tres lavados con PBS 1 %. A continuación, se añade GS al 20 % en PBS y se incuba durante 10 min. Esta operación permite evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario que puedan interferir con la detección de la proteína deseada. Posteriormente, se incuban las células con un volumen de 50 μ L de los dos anticuerpos primarios preparados con GS al 10 % en PBS a una dilución 1:300 y se incuban durante 12 h a 4 °C. Se utilizan dos anticuerpos primarios dirigidos a dos proteínas: por un lado se utiliza un anticuerpo anti- β -tubulina III de ratón, el cual es capaz de unirse a una proteína específica del citoesqueleto neuronal y por otro, se utiliza el anticuerpo primario de conejo dirigido a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP). A continuación, se lavan las células con PBS 1 % tres veces y se incuban con los anticuerpos secundarios preparados en GS al 10 % en PBS y a una dilución de (1:300) durante una hora a temperatura ambiente en ausencia de luz. Para la β -tubulina se utiliza el anticuerpo secundario α -IgG de ratón conjugado con FITC, el cual permite observar fluorescencia verde en presencia de la proteína mientras que el anticuerpo secundario para la glía es un anti IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 594 que permite detectar fluorescencia rojo en presencia de GFAP. Por último se realiza una tinción de las células con DAPI en GS al 10 % en PBS a una dilución 1:5000 durante 3 minutos, de esta forma se logran teñir todos los núcleos de las células en azul. Seguidamente, se lava una vez con PBS 1 % y después con agua desionizada. Finalmente, se montan las células en portaobjetos

previamente limpiado con alcohol sobre una gota de unos 3 μ L de solución de montaje (50 % glicerol en PBS), se sellan con esmalte y se almacenan en oscuridad a 4 °C hasta el momento de observarlas en el microscopio.

La Tabla 1 muestra los anticuerpos, diluciones de los mismos y condiciones usadas para la realización de la doble inmunocitoquímica.

Tabla 1. Anticuerpos y diluciones utilizados en la doble inmunocitoquímica para la caracterización de los cultivos primarios de hipocampo de rata.

Célula	Anticuerpo	Nombre/ especificidad	Dilución	Tiempo de incubación (h)	Temperatura
Neurona	Anticuerpo Primario monoclonal	Ratón α -IgG β - tubulina III	1:300	12	4 °C
	Anticuerpo Secundario monoclonal	Ratón α -Ig FITC	1:300	1	Temperatura ambiente
Glía	Anticuerpo Primario policlonal	Conejo α -IgG GFAP	1:300	12	4 °C
	Anticuerpo Secundario policlonal	Cabra α -IgG de conejo Alexa Flúor 594	1:300	1	Temperatura ambiente

La captura de imágenes se realiza en el microscopio de epifluorescencia con el programa *NIS Elements*, el cual permite analizar los resultados de la IC utilizando luces excitadoras de distintas longitudes de onda (λ). Para el fluorocromo FITC se utiliza una λ de 494 nm, para Alexa Fluor 594 se emplea una λ de 540 nm y para el DAPI una λ de 359 nm. Una vez tomadas las imágenes, se analiza la densidad óptica de cada una de ellas

empleando el programa *ImageJ*, para posteriormente analizar los datos en el programa *Origin 7.0*.

5.2.3.2 Detección de los IP₃R en Neuronas de Hipocampo

Se han utilizado técnicas de inmunofluorescencia en la detección de las distintas isoformas del IP₃R siguiendo el mismo protocolo que para la caracterización del cultivo primario de hipocampo explicado en punto 5.2.3 de la presente memoria. Las neuronas de hipocampo cultivadas durante distintos periodos de tiempo, *Días in vitro* (DIV): jóvenes (4-5 DIV), maduras (14-15 DIV) y envejecidas (>20 DIV) y tras el proceso de fijación con PFA 4% en PBS 1%, permeabilización y bloqueo. Posteriormente, se incuban con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 2) durante toda la noche a 4°C. A continuación se incuban con el anticuerpo secundario (Tabla 2) 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. En todos los casos se realiza un experimento control, en ausencia de anticuerpo primario, para así descartar la posible tinción por inespecificidad del anticuerpo primario.

La captura de imágenes se realiza en el microscopio de epifluorescencia con el programa *NIS Elements*. La densidad óptica promedio fue medida en cada neurona de forma individual utilizando el software *Image J*.

Tabla 2. Anticuerpos y diluciones en la detección de las isoformas del IP₃R del retículo endoplasmático.

Isoforma	Anticuerpo Primario	Dilución Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario	Dilución Anticuerpo Secundario
IP ₃ R1	Policlonal. Cabra α-Ig IP ₃ R1	1:50	Policlonal. Mono α-IgG cabra Alexa flúor 488	1:300
IP ₃ R2	Policlonal. Cabra α-Ig IP ₃ R2	1:50	Policlonal. Mono α-IgG cabra Alexa flúor 488	1:300
IP ₃ R3	Policlonal. Ratón α-Ig IP ₃ R3	1:50	Monoclonal. Ratón Anti-IgG ratón Alexa flúor 594	1:300

5.2.3.3 Análisis de Datos de la Inmunocitoquímica

Para cada isoforma, se ha evaluado el efecto del factor días de cultivo *in vitro* a tres niveles. Cada nivel se considera una población. Por lo tanto, dado que se tienen más de dos poblaciones: células jóvenes (4-5 DIV), células maduras (14-15 DIV), células envejecidas (>20 DIV), en caso de que las poblaciones cumplan las condiciones de Normalidad (Prueba de Shapiro-Wilks) y de homocedasticidad (Prueba de Levene) se procede a realizar un análisis de varianza (ANOVA). En caso contrario, si alguna de las dos condiciones anteriores no se cumpla, se recurre a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Así, se acepta la hipótesis nula de que los datos se ajustan a una población Normal $X_{i\text{ DIV}} \sim N(\mu_{i\text{ DIV}}, \sigma_i^2)$.

El ANOVA permite contrastar las siguientes hipótesis:

H_0 : el factor evaluado NO influye sobre la variabilidad de los resultados (igualdad de los efectos medios):

$$\mu_{jóvenes} = \mu_{maduras} = \mu_{envejecidas}$$

H_1 : el factor evaluado SÍ influye sobre la variabilidad de los resultados (al menos una de las poblaciones tiene un efecto medio diferente):

$$\mu_{jóvenes} \neq \mu_{maduras} \neq \mu_{envejecidas}$$

Una vez se ha corroborado el cumplimiento de dichas premisas se procede a llevar a cabo el análisis de varianza. Debe tenerse en cuenta que en el caso de rechazar la H_0 y aceptar la H_1 , se acepta que el factor tiene efecto sobre los resultados obtenidos, pero no entre que poblaciones existen diferencias significativas, o entre cuáles no.

Aquí emerge un problema de gran importancia en el mundo del análisis de datos, conocido como comparaciones múltiples. Esto se debe a que, si se consideran significativos aquellos efectos que produzcan un p valor inferior a un nivel de significación alfa (por ejemplo 0.05) dicho valor carece de sentido a la hora de realizar, simultáneamente, más de un contraste de hipótesis. El nivel de significación, viene a indicar el porcentaje de falsos positivos que se cometen. Así, realizando un solo contraste de hipótesis, la probabilidad de que este sea un falso positivo es $\alpha \cdot 100\%$ (5%). Sin embargo, si se realizaran 50 contrastes

de hipótesis se esperaría obtener $\alpha \cdot 50$ falsos positivos (2.5 falsos positivos, siendo $\alpha=0.05$). O dicho de otro modo, la probabilidad de cometer al menos un falso positivo, si solo se realiza un contraste de hipótesis, es α , mientras que si se realizan 50 la probabilidad de cometer un falso positivo, siendo α 0.05, es:

$$P(\text{Falsos positivos} \geq 1) = 1 - P(\text{No Cometer ningún Falso Positivo}) = 1 - (1 - 0.05)^{50} = 0.923$$

Por ello, en vez de controlar el porcentaje de falsos positivos, una estrategia a seguir, es por ejemplo controlar la probabilidad de cometer al menos un falso positivo.

$$P(\text{Falsos positivos} \geq 1) = 1 - P(\text{No Cometer ningún Falso Positivo}) = 1 - (1 - \alpha')^{50} = 0.05$$

En este caso, se ha decidido controlar el valor de α mediante el método Post-Hoc llamado Bonferroni, tal que se consideran el número total de comparaciones dos a dos que se pueden realizar:

$$\alpha' = \frac{\alpha}{\binom{\text{niveles}}{2}}$$

Así, se calcula el siguiente valor estadístico t para el contraste de hipótesis

$$t_{calc} = \frac{|\bar{X}_a - \bar{X}_b|}{S_D \sqrt{\frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b}}}$$

Y se compara con el siguiente valor:

$$t_{crit} = t_{\frac{\alpha/2}{\binom{\text{niveles}}{2}}, N-\text{niveles}}$$

Donde se consideraran poblaciones diferentes aquellas tal que:

$$t_{crit} < t_{calc}$$

Para expresar la magnitud del cambio de expresión, se proporcionan los valores del *Fold Change* (FC):

$$FC_{i,j} = \frac{\text{Densidad Óptica}_i}{\text{Densidad Óptica}_j}$$

Siendo i y j diferentes niveles del factor DIV, y $j > i$.

5.2.4 Estudio del Potencial Mitocondrial en Neuronas de Hipocampo

El potencial mitocondrial se determina por medio de los cambios relativos en la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda TMRM (éster metílico de la tetrametilrodamina) (Figura 16) antes y después de la aplicación de ciertos estímulos específicos (detallados en la Tabla 3).

Tabla 3. Estímulos aplicados para las medidas del Ca^{2+} citosólico.

Estímulo	Concentración
FCCP	10 μM
K^+	145 mM
NMDA	10 μM
DCA	5 mM

El potencial mitocondrial en células vivas se registra por imagen de fluorescencia en células incubadas con la sonda fluorescente TMRM. Se trata de una sonda catiónica, lo que añadido a su solubilidad lipofílica, permite que se acumule en las mitocondrias, gracias al potencial negativo (aproximadamente -180 mV) de éstas con respecto al citosol (Valero, 2008). Al producirse la despolarización mitocondrial se produce la salida del colorante de las mitocondrias y, por tanto, disminuye la fluorescencia de la sonda acumulada en ellas.

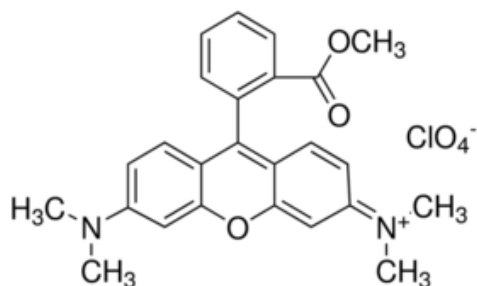


Figura 16. Estructura química éster metílico de tetrametilrodamina, colorante fluorescente, sintetizado por primera vez en 1988.

Para estimar el potencial mitocondrial de neuronas de hipocampo, se emplean cristales sembrados con una densidad próxima a $30 \cdot 10^3$ células/cristal. Estos cristales se incuban durante 30 min con TMRM 10 nM a temperatura ambiente. Transcurridos los 30 min, se lava el cristal con MEC y posteriormente se coloca en la cámara de perfusión de un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100 TV. Las neuronas se perfunden continuamente con la solución MEC precalentada a 37 °C. Las imágenes de fluorescencia se tomaron cada 5 s con una videocámara Hamamatsu Orca-ER. La respuesta en las gráficas se expresa como porcentaje de fluorescencia TMRM respecto del nivel basal.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 RESULTADOS

6.1.1 Caracterización de Cultivos Mixtos de Hipocampo de Rata

Los cultivos primarios de hipocampo son cultivos mixtos, los cuales constan de dos tipos celulares: glías y neuronas. Dado que este trabajo se ha enfocado en el estudio de la expresión de los IP₃Rs en neuronas y en la medida de su potencial mitocondrial, el primer objetivo es caracterizar el cultivo para así poder identificar las neuronas presentes en el mismo. Para ello se han empleado dos técnicas diferentes, IC e imagen de Ca²⁺.

- **IC:** Las neuronas expresan de forma exclusiva la β -tubulina III, una proteína del citoesqueleto, mientras que las células de la glía presentan la proteína fibrilar ácida (GFAP), una de las proteínas fibrosas que constituyen los filamentos intermedios de su citoesqueleto. Esta expresión diferencial conlleva a que, mediante la identificación de dichas proteínas, sea posible la distinción y, por ende, la identificación, de los distintos tipos celulares presentes en el cultivo mediante la IC. Para ello, se emplean, de forma simultánea, anticuerpos primarios específicos dirigidos a cada una de estas dos proteínas (α - β -tubulina III para neuronas y α -GFAP para las glías).

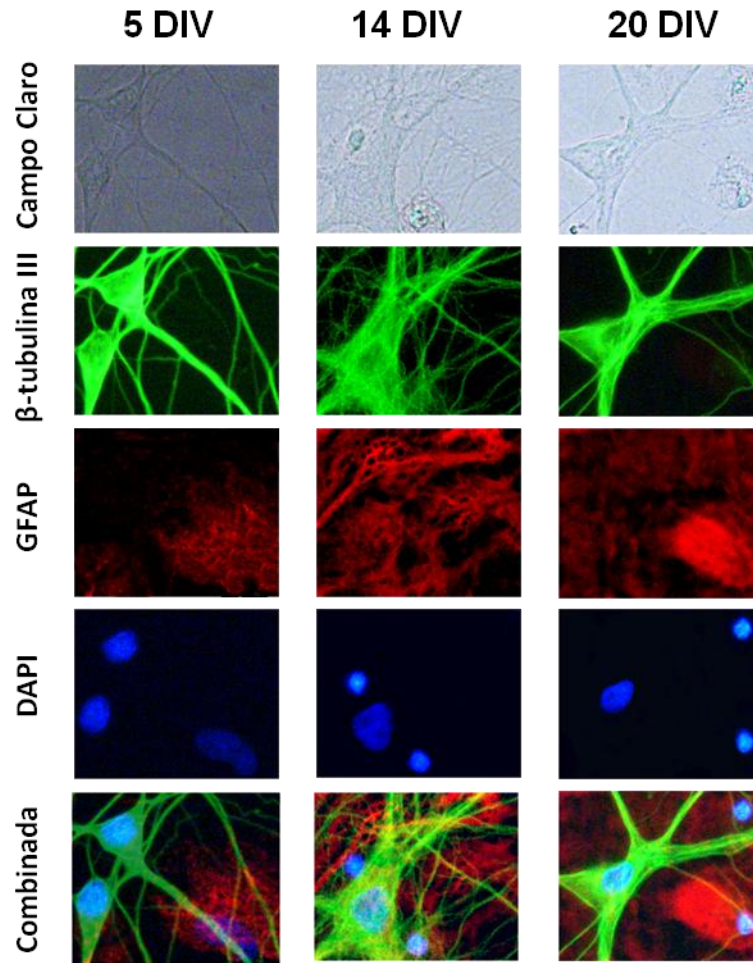


Figura 17. Caracterización de cultivos primarios mixtos de hipocampo de rata. Los cultivos primarios de neuronas y células gliales de hipocampo de rata se cultivan durante diferentes *Días In Vitro* (DIV): 3-5 DIV (células jóvenes), 14 DIV (células maduras) y >20 DIV (células envejecidas). Imagen representativa de una doble inmunocitoquímica realizada en las células, para ello se fijan y se incuban con anticuerpos específicos: β -tubulina III (marcador de linaje neuronal, en verde) y GFAP (marcador glial, en rojo). Los núcleos se tiñeron con una sonda específica, DAPI (en azul). Combinada: superposición de las imágenes anteriores.

En la Figura 17 se muestra el resultado de la doble IC, confirmándose que los cultivos primarios de hipocampo constan, tanto de neuronas (verde), como por glías (rojo). Además, en las imágenes se observa cómo las neuronas en cultivo sufren cambios morfológicos a medida que envejecen *in vitro* pues, a medida que aumentan los DIV, las neuronas se agrandan y forman extensas redes.

- **Imagen de Ca^{2+} en célula única:** Otra forma de identificar los dos tipos celulares, presentes en los cultivos primarios de hipocampo, consiste en realizar medidas de Ca^{2+} . En la Figura 18A se muestran las imágenes de Ca^{2+} de transmisión, la imagen

control de fluorescencia a 340 nm, donde se observa de forma clara el citoplasma tanto de neuronas como de glías, y la imagen de fluorescencia a 340 nm en presencia de NMDA. En esta última, se observa cómo estimulando las células con NMDA únicamente responden las neuronas, dado que las neuronas presentan de forma exclusiva los receptores NMDA (NMDAR) y, en respuesta a este estímulo, se abren los canales de dichos receptores permitiendo la entrada de Ca^{2+} al citosol y, por ende, aumentando su concentración citosólica. Este hecho se ve potenciado con el envejecimiento *in vitro*, tal como se observa en la Figura 18B, pues las neuronas envejecidas muestran una mayor entrada de Ca^{2+} , lo que está de acuerdo con el hecho de que presentan una mayor densidad de NMDAR en la membrana plasmática respecto de las más jóvenes.

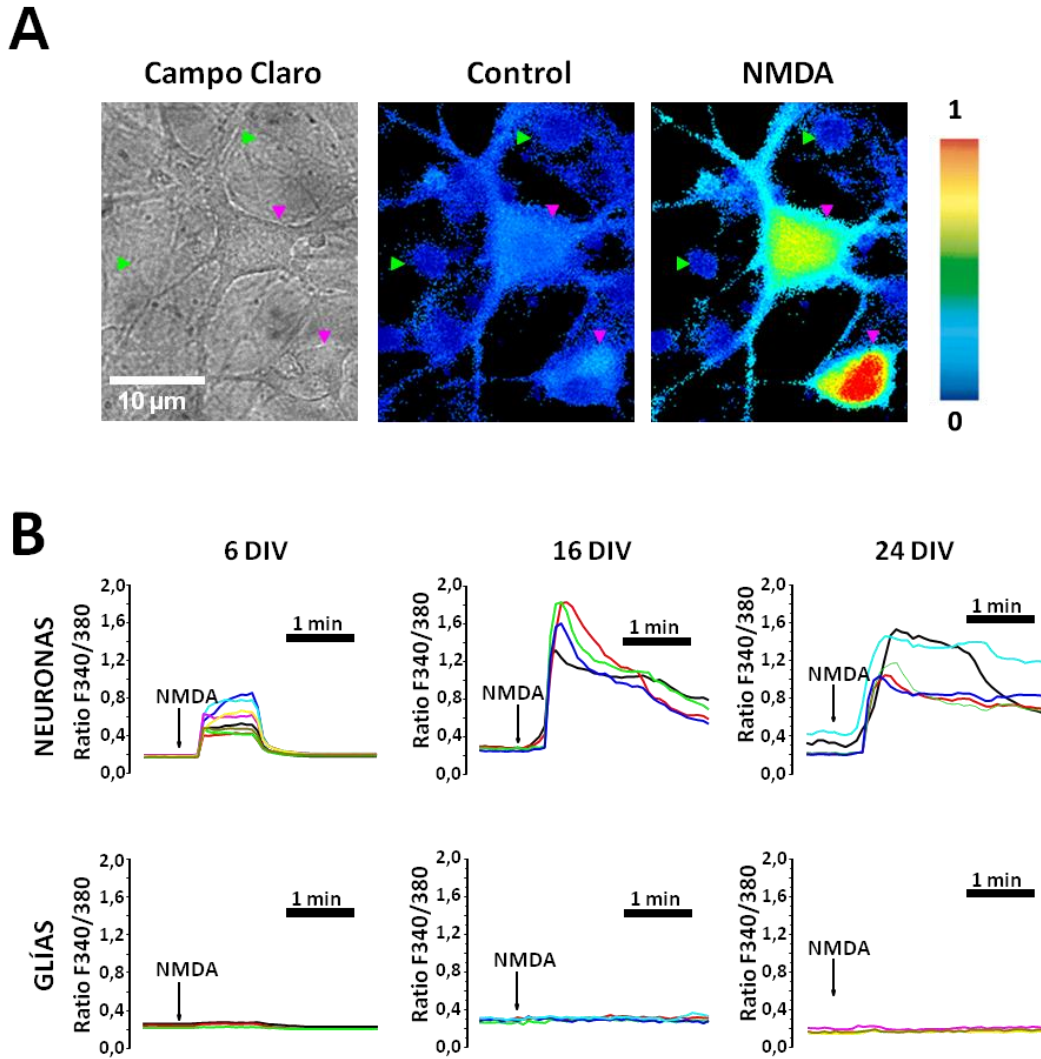


Figura 18. Caracterización funcional de neuronas y glías en cultivos de hipocampo de rata. Los diferentes cultivos mixtos de células de hipocampo de rata se incuban con la sonda FURA2/AM para medir la concentración de Ca^{2+} citosólica, expresada como ratio de fluorescencia entre 340 nm y 380 nm. Imágenes representativas de fluorescencia de Ca^{2+} citosólico codificadas en una escala de pseudo color (**A**) y registros representativos de imagen de fluorescencia de Ca^{2+} en neuronas y glías tras un estímulo de NMDA 100 μM (**B**). Flechas: Verde glías, rosa neuronas. Solo las neuronas muestran incrementos de la concentración de Ca^{2+} citosólica en respuesta a NMDA.

Así, se ha demostrado cómo el reconocimiento de las neuronas en los cultivos primarios mixtos puede llevarse a cabo, no sólo por técnicas de IC, sino también por imagen de Ca^{2+} . Dado que con la práctica también es posible distinguir los diferentes tipos celulares por su morfología, es posible caracterizar los diferentes cultivos mixtos y distinguir a las neuronas del resto de tipos celulares sin necesidad de recurrir a las técnicas anteriores, imagen de Ca^{2+} o doble IC.

6.1.2 Expresión Diferencial del IP₃R en el Envejecimiento

Se observa una expresión diferencial del receptor de Inositol-trifosfato (IP₃R) relacionada con el envejecimiento neuronal, la cual es diferente dependiendo de la isoforma del receptor.

- IP₃R1: Ésta es la isoforma predominante en las neuronas. En las neuronas maduras se observa un aumento de la expresión del IP₃R1 respecto de las jóvenes. Sin embargo, en las neuronas envejecidas, la expresión de IP₃R1 es igual a la expresión en neuronas maduras, lo que indica un aumento de la expresión de este receptor hasta una edad madura a partir de la cual se mantiene constante:

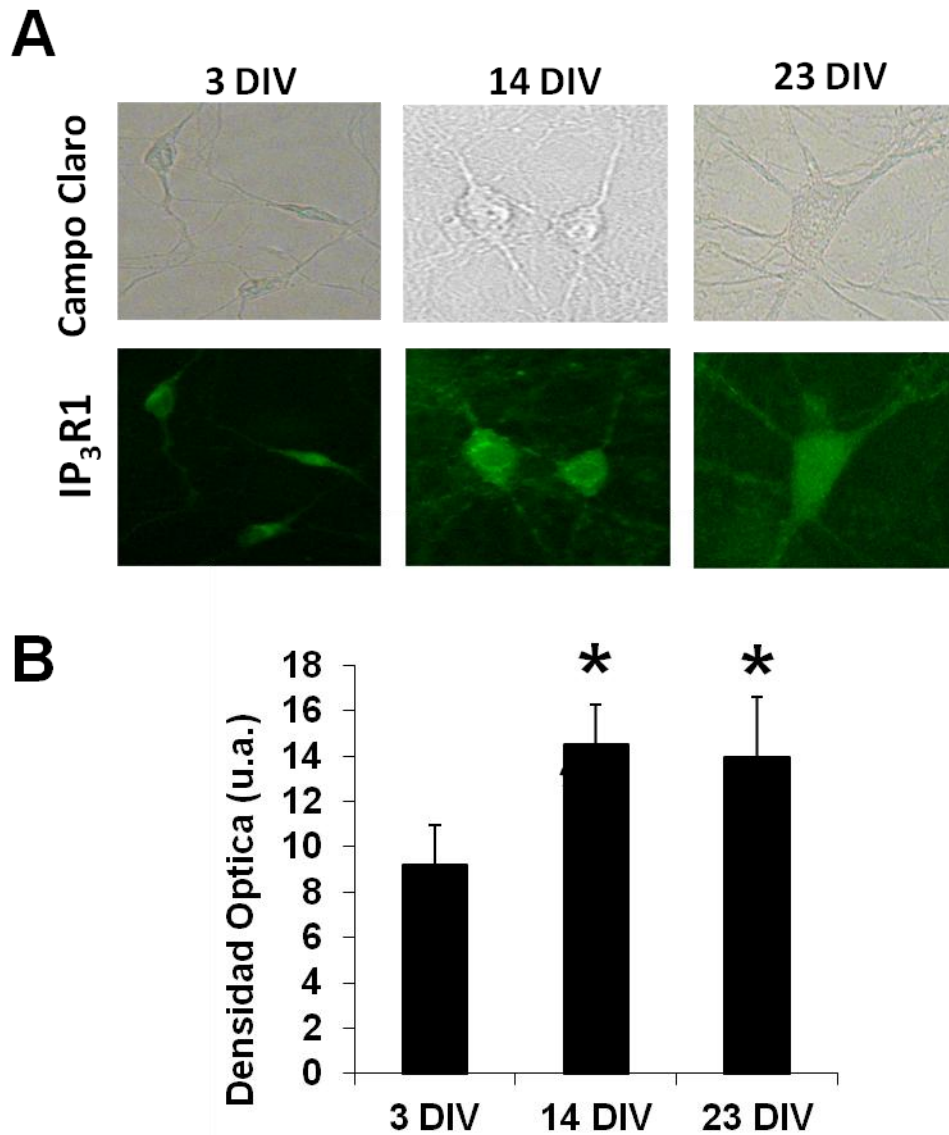


Figura 19. Determinación de los niveles de expresión IP₃R1 en cultivos de neuronas de hipocampo de rata durante el envejecimiento *in vitro*. La expresión de IP₃R1 se detectó mediante inmunocitoquímica. Las células cultivadas a diferentes días *in vitro*: 3 DIV (jóvenes), 14 DIV (maduras) y 23 DIV (envejecidas) se fijaron e incubaron con el anticuerpo primario α -IP₃R1 (1:50). La fluorescencia emitida se detectó en los cultivos de neuronas jóvenes, maduras y envejecidas. **A.** Imágenes representativas en campo claro y de fluorescencia de IP₃R1 (verde) para los distintos cultivos. **B.** El gráfico de barras muestra los valores de la densidad óptica de la fluorescencia media (media \pm intervalo de confianza) en unidades arbitrarias (u.a) para los diferentes DIV. Los datos corresponden a 34, 34, 15 células respectivamente. * p-ajustado < 0.05 respecto de 3DIV. El envejecimiento *in vitro* está asociado a una sobreexpresión de IP₃R1. Los pvalores ajustados y FCs son: Jóvenes vs. Maduras: $p=3,976 \cdot 10^{-6}$, $FC=1,58 \pm 0,21$; Maduras vs. Envejecidas: $p=1$, $FC=0,96 \pm 0,13$; Jóvenes vs. Envejecidas: $p=0,0015$; $FC=1,51 \pm 0,24$.

- IP₃R2: Esta es la isoforma menos predominante en las neuronas. Su comportamiento es idéntico al de la isoforma IP₃R1 a nivel de expresión respecto de la edad de las neuronas:

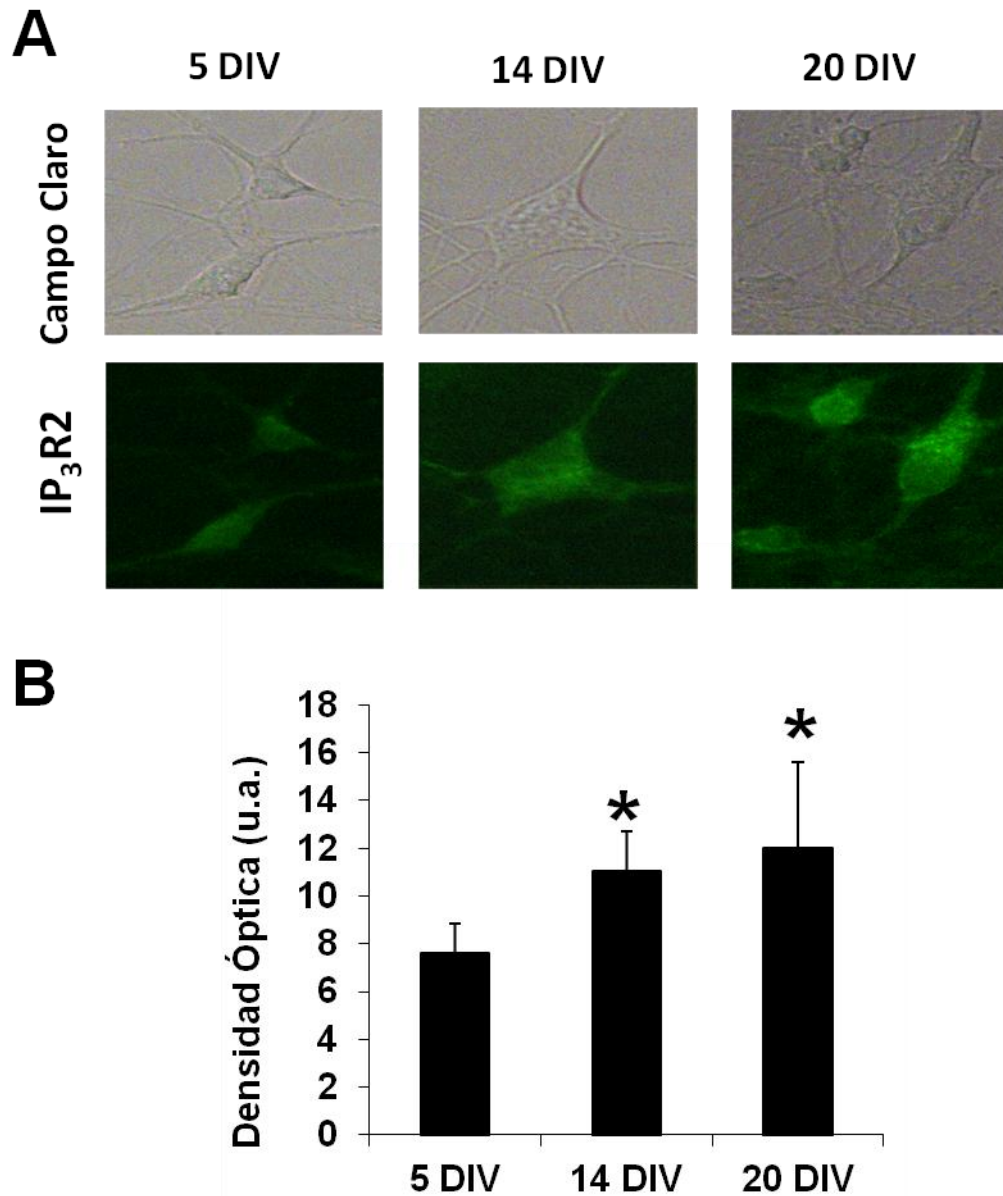


Figura 20. Determinación de los niveles de expresión IP₃R2 en cultivos de neuronas de hipocampo de rata durante el envejecimiento *in vitro*. La fluorescencia emitida se detectó en los cultivos de neuronas jóvenes (5 DIV), maduras (14 DIV) y envejecidas (20 DIV), previamente fijados e incubados con el anticuerpo primario α -IP₃R2 (1:50) **A.** Imágenes de fluorescencia representativas de campo claro y de fluorescencia del IP₃R2 (verde) para los distintos cultivos. **B.** El gráfico de barras muestra el análisis semicuantitativo de la intensidad de fluorescencia (densidad óptica expresado en u.a.) para IP₃R2. Las barras representan la media \pm Intervalo de confianza para los diferentes DIV. Los datos corresponden a 39, 19, 4 células respectivamente. Los * p-ajustado < 0.05 respecto de 3DIV. El envejecimiento *in vitro* está asociado a una sobreexpresión de IP₃R2. Los pvalores ajustados y FCs son: Jóvenes vs. Maduras: p=0,00045, FC=1,45 \pm 0,19 ; Maduras vs. Envejecidas: p=1, FC=1,09 \pm 0,21 ; Jóvenes vs. Envejecidas: p=0,019, FC=1,58 \pm 0,31.

- IP₃R3: A diferencia de las isoformas IP₃R1 y IP₃R2, IP₃R3 aumenta muy paulatinamente sin aparentes cambios con el envejecimiento, pues no hay diferencias significativas entre las neuronas jóvenes y maduras, así como entre las maduras y las envejecidas. Sin embargo, sí hay diferencias significativas a nivel de expresión del IP₃R3 entre las neuronas jóvenes y las envejecidas:

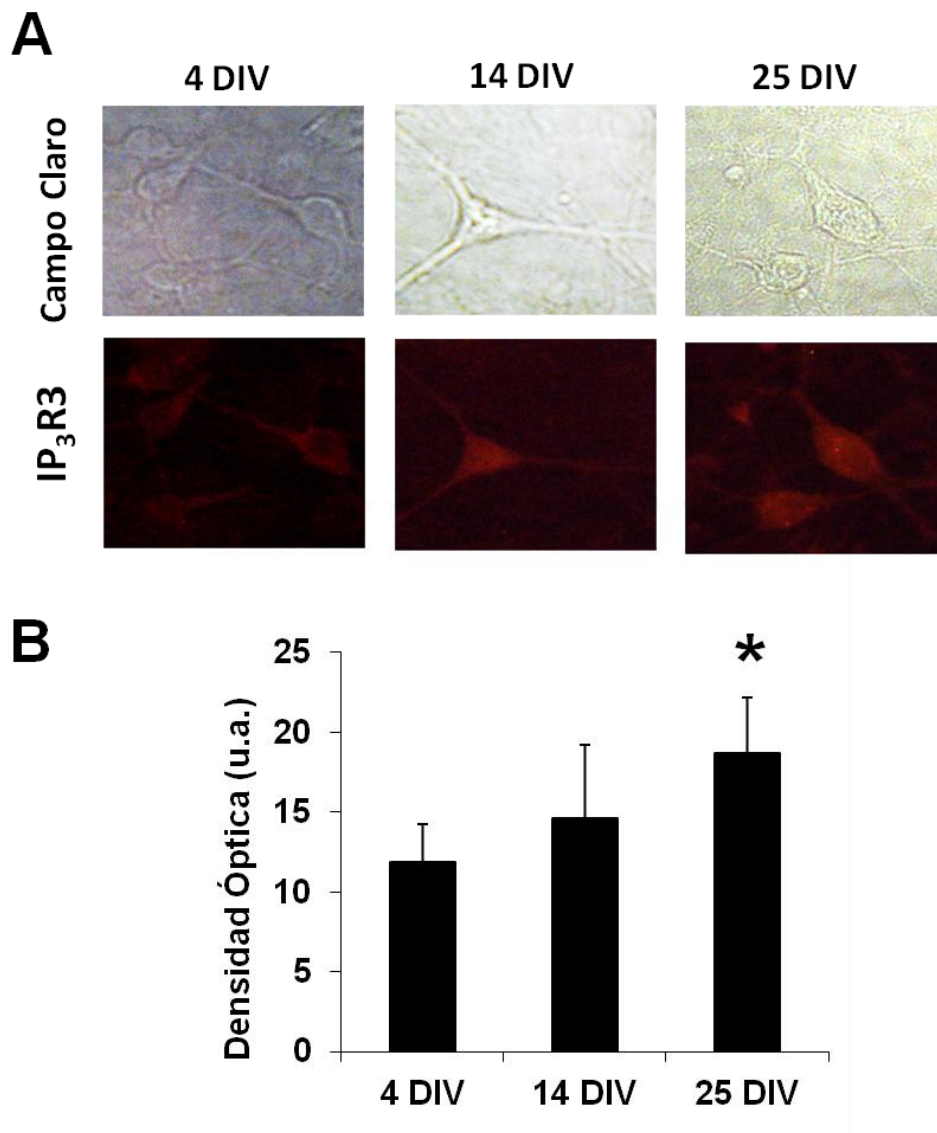


Figura 21. Determinación de los niveles de expresión IP₃R3 en cultivos de neuronas de hipocampo de rata durante el envejecimiento *in vitro*. Las neuronas de hipocampo mantenidas en cultivo durante 4 DIV (jóvenes), 14 DIV (maduras), 25 DIV (envejecidas) se trataron con el anticuerpo primario α -IP₃R3 (1:50) **A.** Imágenes representativas de campo claro y de la inmunofluorescencia del IP₃R3 en neuronas de hipocampo a diferentes DIV. **B.** Registro de la densidad óptica de la fluorescencia media (u.a) para los diferentes cultivos. Los datos se corresponde a 29, 8, 14 células respectivamente. Se representa la media \pm Intervalo de confianza para los diferentes DIV. Los . * p-ajustado < 0.05 respecto de 3DIV. El envejecimiento *in vitro* está asociado a una sobreexpresión de IP₃R3. Los pvalores ajustados y FCs son: Jóvenes vs. Maduras: p=0,5711, FC=1,23 \pm 0,29; Maduras vs. Envejecidas: p=0,2485, FC=1,28 \pm 0,26; Jóvenes vs. Envejecidas: p=0,00057, FC=1,58 \pm 0,25.

6.1.3 Medida del Potencial Mitochondrial en Neuronas de Hipocampo

Para evaluar el $\Delta\Psi_m$ en células vivas se usa la sonda mitocondrial fluorescente TMRM y distintos estímulos que inducen cambios conocidos en el $\Delta\Psi$. Se trata de una sonda catiónica que se acumula en la mitocondria en función del $\Delta\Psi_m$ de las células, pues dadas las características de dicha sonda, tiende a dirigirse hacia zonas de potenciales más negativos. Una disminución en la fluorescencia emitida indica una pérdida de $\Delta\Psi_m$, o sea, más cercana a cero. Así, al aplicar el desacoplante mitocondrial FCCP se produce una pérdida de fluorescencia consistente con la despolarización mitocondrial inducida por el compuesto (Figura 22). Sin embargo, al añadir DCA se induce el aumento de la fluorescencia de TMRM consistente con la hiperpolarización mitocondrial que favorece el transporte de piruvato inducido por DCA (Figura 23). Por tanto, la medida de la fluorescencia de TMRM permite estimar posibles cambios en el potencial mitocondrial durante el envejecimiento neuronal *in vitro*.

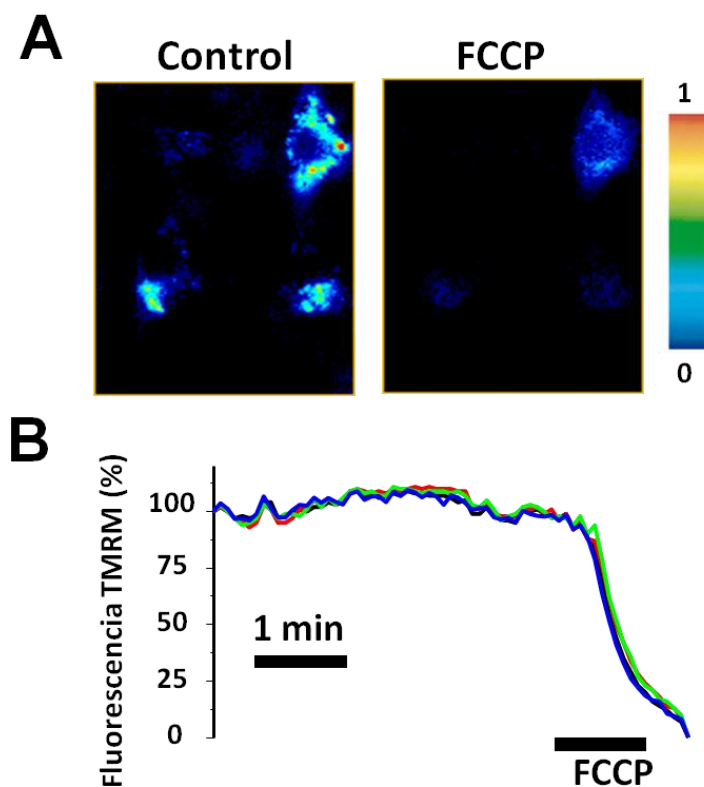


Figura 22. Medida del Potencial Mitochondrial en cultivos de neuronas de hipocampo de rata. Las neuronas (15 DIV) se preincubaban con la sonda TMRM 10 nM durante 30 min a RT en oscuridad y se capturan imágenes de fluorescencia cada 5 s. Las neuronas se estimulan con FCCP 10 μ M (estímulo despolarizante) **A.** Imagen de fluorescencia del control (izquierda) y estímulo con FCCP (derecha) **B.** Registros de los porcentajes de fluorescencia de TMRM a lo largo del tiempo.

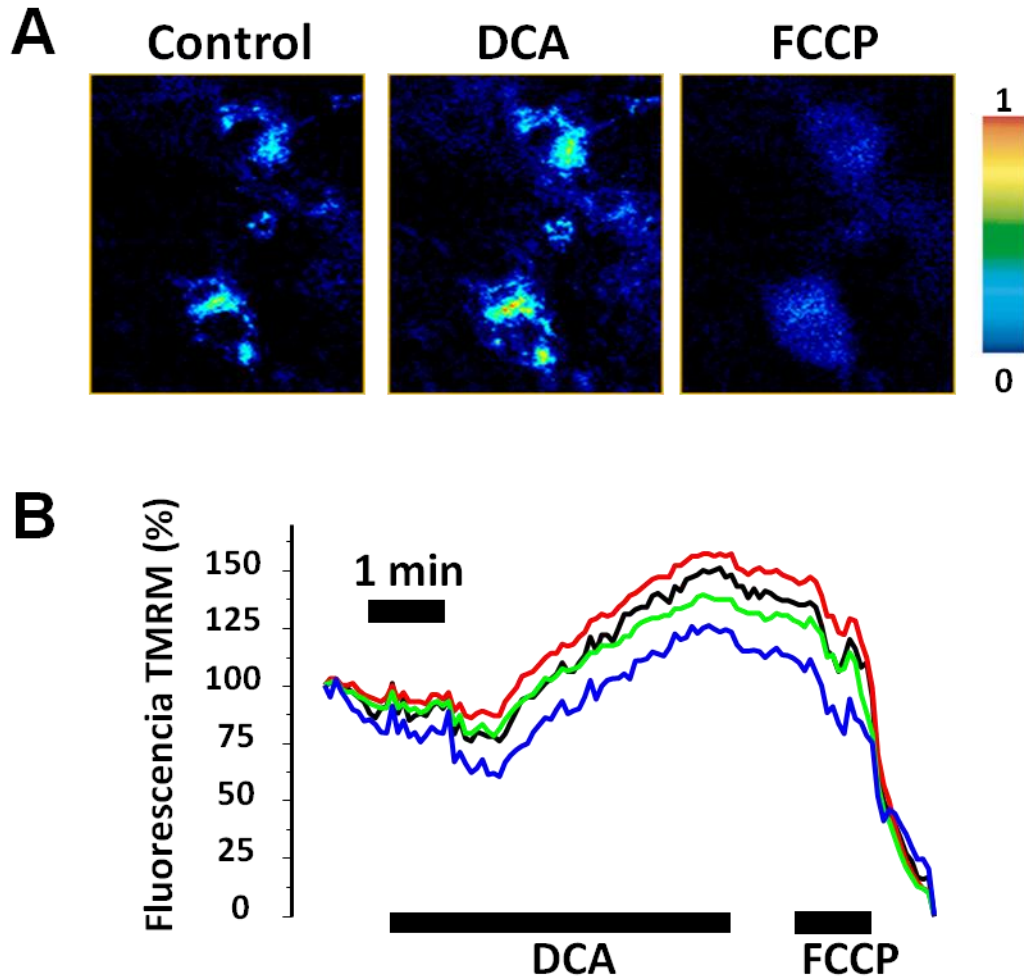


Figura 23. Medida del Potencial Mitocondrial en cultivos de neuronas de hipocampo de rata. Las neuronas (15 DIV) se preincubaron con la sonda TMRM 10 nM durante 30 min a RT en oscuridad y se capturaron imágenes de fluorescencia cada 5 s. Las neuronas se estimularon por DCA 5 mM (estímulo hiperpolarizante) **A.** Imágenes representativas de fluorescencia de TMRM antes del estímulo (control) y tras el estímulo con DCA y con estímulo con FCCP **B.** Registros del porcentaje de fluorescencia de TMRM a lo largo del tiempo.

6.1.3.1 NMDA

En la Figura 24 se muestran las imágenes y los registros de fluorescencia de TMRM, expresado como tanto por ciento de la fluorescencia original, que se obtienen cuando se perfunden las células con NMDA, observándose una disminución de la fluorescencia de TMRM, lo que significa una disminución del $\Delta\Psi_m$ (la membrana mitocondrial se despolariza). Posteriormente, se estimulan con FCCP, el cual provoca una disminución brusca del potencial mitocondrial (Figura 24A).

6.1.3.2 K^+

Tras estimular las neuronas con K^+ 145 mM, se produce una despolarización de la membrana mitocondrial. Posteriormente, se estimulan las neuronas con FCCP, donde se observa una despolarización más brusca que la observada con K^+ (Figura 24B).

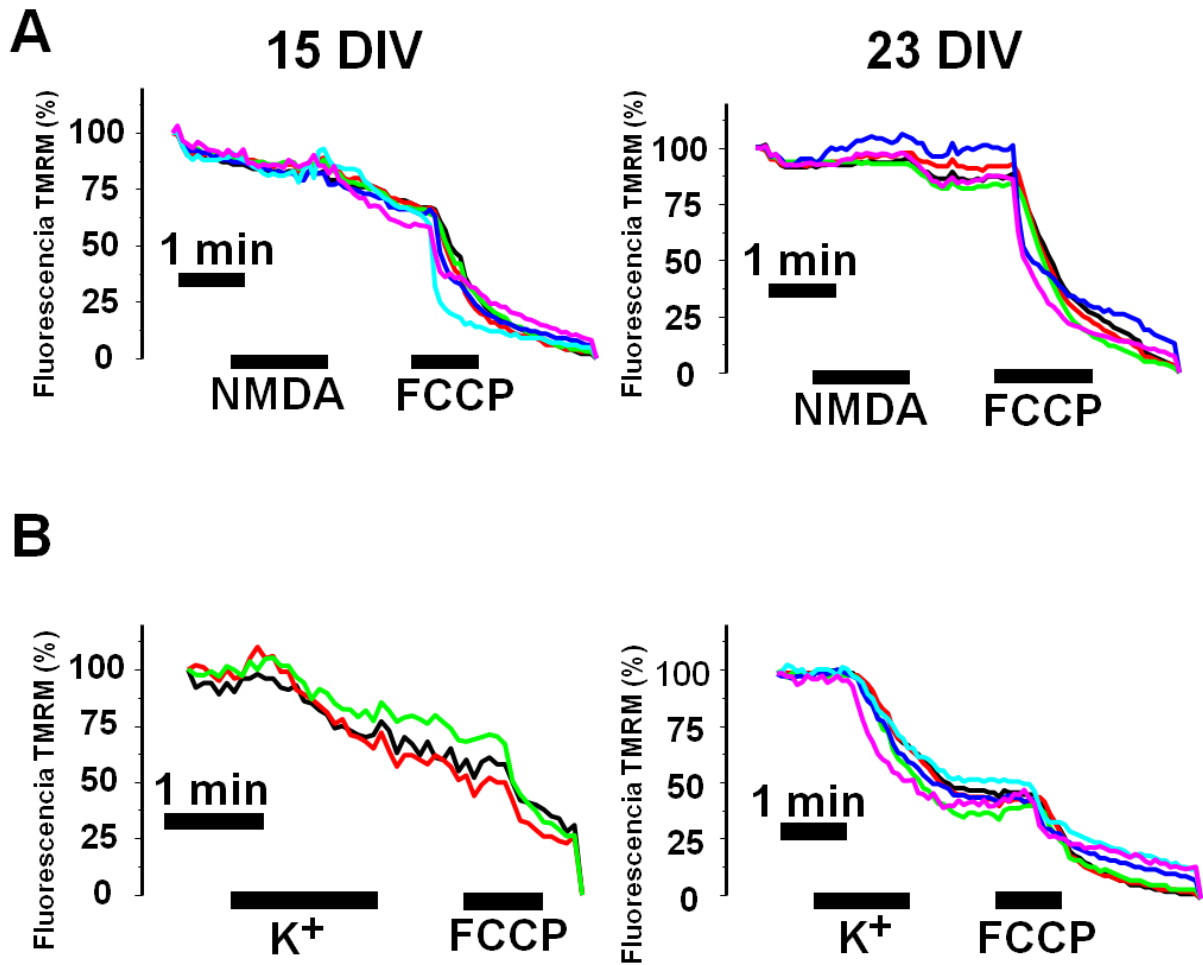


Figura 24. Medida del Potencial Mitocondrial en cultivos de neuronas de hipocampo de rata a diferentes días *in vitro*. Los cultivos de neuronas maduras (15 DIV) y envejecidas (23 DIV) se preincubaron con la sonda TMRM 10 nM durante 30 min a RT en oscuridad. La fluorescencia emitida por la sonda TMRM se registró cada 5 s a lo largo del experimento. Las células jóvenes (izquierda) y envejecidas (derecha) se estimularon con NMDA 100 μ M (A) o K^+ 145 mM (B). Al final de cada registro se perfundi6 FCCP 10 μ M para obtener el valor m6nimo de potencial mitocondrial (0% de Fluorescencia TMRM).

6.2 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Como queda patente a lo largo de este trabajo, la homeostasis del Ca^{2+} intracelular es un mecanismo de suma importancia, pues regula procesos tales como la muerte celular programada (apoptosis), proliferación, secreción, migración, etc. Dos orgánulos celulares que contribuyen enormemente a esta homeostasis son la mitocondria y el Retículo endoplásmico (RE), donde se acumulan grandes cantidades de este catión que, en diferentes momentos de la vida de la célula, lo liberan o lo captan. Pero no en todas las células tiene las mismas funciones, pues por ejemplo, las neuronas, las cuales son células excitables, el Ca^{2+} juega un papel importante en la excitabilidad de las mismas, lo cual no ocurre, por definición, en las células no excitables.

Para alcanzar los objetivos propuestos en el presente trabajo, se han obtenido cultivos primarios de hipocampo de rata, y se han incubado durante diferentes periodos de tiempo, considerando las células incubadas durante 3-5 días jóvenes, durante 14-15 días maduras y más de 20 DIV envejecidas (Calvo, 2015). Dado que los cultivos primarios obtenidos son mixtos, es decir, hay más de un tipo celular, y puesto que se desea realizar los estudios en uno solo, las neuronas, es necesario caracterizarlos. Para tal fin, se realiza una doble IC, pues las neuronas expresan, de forma exclusiva, β -tubulina III, luego es un buen objetivo para distinguirlas del resto de tipos celulares.

Para demostrar que estos cultivos son funcionales se ha empleado, por un lado, la técnica conocida como *Imagen de Fluorescencia de Calcio en Célula Única*. Puesto que las neuronas expresan, de forma exclusiva, los receptores NMDA, y que éstos se activan con NMDA permitiendo la entrada de Ca^{2+} a la célula, los cultivos se han estimulado con éste y se ha observado cómo, efectivamente, la concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta, encontrándose que este aumento es mayor en las células envejecidas, lo que está de acuerdo con el hecho de que las neuronas maduras y envejecidas expresan más receptores de NMDA descrito previamente (Calvo, 2015).

Por otro lado, cabe destacar que los análisis de IC para las isoformas de IP_3R , revelan un aumento de la expresión de las tres isoformas con la edad. Puesto que estos receptores se encuentran en el RE, y que éste es un reservorio de Ca^{2+} , al aumentar su expresión

aumentará también la liberación de Ca^{2+} al citosol (Duncan, Hwang, & Koulen, 2007)(Hertle & Yeckel, 2007) inducida por un mismo estímulo. Se ha descrito que la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos es tamponada, entre otros sistemas, por la red mitocondrial. De este modo, el aumento en la expresión de receptores para IP_3 así como el aumento descrito previamente en el contenido de Ca^{2+} de los depósitos (Calvo-Rodríguez et al., 2017) podrían facilitar la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} en las neuronas más envejecidas. Como es sabido, la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} es uno de los mecanismos implicados en la muerte neuronal. Así pues, el remodelado de los receptores de IP_3 podría favorecer la susceptibilidad a la muerte neuronal durante el proceso de envejecimiento neuronal. Sin embargo, esta disposición de receptores podría tener una contrapartida beneficiosa. Se ha descrito que el metabolismo energético del ciclo de Krebs es activado por pequeños aumentos de la concentración mitocondrial de Ca^{2+} . Esto favorece el aporte de equivalentes de reducción a la cadena de transporte electrónico y la síntesis de ATP. Además, se ha descrito que los canales/receptores de IP_3 pueden funcionar como canales “leak” de Ca^{2+} y la disposición de mitocondrias junto al RE podrían facilitar el “leak” continuo de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria durante el envejecimiento para paliar los déficits energéticos de las neuronas envejecidas. Así, el aumento en la expresión de receptores de IP_3 podría tener ventajas energéticas a expensas de aumentar la susceptibilidad de las neuronas envejecidas a la muerte celular.

Por otro lado, la mitocondria, cuando funciona correctamente, actúa como tampón del Ca^{2+} intracelular, pues ésta tiene un potencial muy negativo en su interior, de -180 mV. Sin embargo, cabe destacar cómo, en el envejecimiento, este potencial se ve alterado, disminuyendo significativamente con el envejecimiento. Para medir los cambios de potencial mitocondrial que acontecen durante el envejecimiento, se ha usado la sonda TMRM, la cual se dirige a zonas con potenciales muy negativos, como es la mitocondria, por lo que, a menor potencial mitocondrial, menor TMRM se detectará en el interior de la mitocondria. Este menor potencial disminuye la captación de Ca^{2+} mitocondrial lo que, aunque podría disminuir el metabolismo energético de las mitocondrias, también impide la sobrecarga de calcio mitocondrial. Así pues, los cambios en la expresión de receptores de IP_3 y el potencial mitocondrial observados durante el envejecimiento neuronal *in vitro* podrían compensarse mutuamente. De hecho, podría especularse que el aumento de la expresión de receptores

de IP_3 podría ser un mecanismo adaptativo de las neuronas envejecidas a la despolarización mitocondrial secundaria al envejecimiento. Estos resultados plantean hipótesis interesantes susceptibles de ser evaluadas experimentalmente en nuestro modelo de envejecimiento *in vitro*.

7 CONCLUSIONES

1. El cultivo primario de células de hipocampo de rata permite el estudio de las señales de calcio, la expresión de canales/receptores IP₃ y el potencial mitocondrial en neuronas durante el envejecimiento neuronal *in vitro*.
2. Las neuronas de hipocampo de rata expresan las 3 isoformas de IP₃R (1,2,3). La expresión relativa de las distintas isoformas estudiada mediante inmunofluorescencia semicuantitativa podría cambiar durante el envejecimiento *in vitro*, contribuyendo así al remodelado de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular durante el envejecimiento.
3. La medida de la fluorescencia debida a la acumulación de TMRM permite estudiar los cambios en el potencial mitocondrial en neuronas, durante el envejecimiento *in vitro*, así como los efectos de estímulos que inducen la entrada de calcio tales como NMDA o el medio con alto K⁺.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Banker, G. A. & Cowan W. M. (1977) «Rat Hippocampal Neurons in Dispersed Cell Culture.» Brain Research 126 (3): 391-342.
- Basarsky, T. A., Parpura, V. & Haydon, P. G. (1994) «Hippocampal synaptogenesis in cell culture: developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution.» Journal of Neuroscience 14(11): 6402-6411.
- Beaudoin III, G.M., Lee, S-H., Singh, D., Yuan, Y., Yu-Gie, N. , Reichardt, F.L. & Arikath, J. (2012) «Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex.» Nature Protocols 7: 1741-1754.
- Berna-Erro, A., Braun, A., Kraft, R., Kleinschnitz, C., Schuhmann, M. K., Stegner, D., Wultsch, T., Eilers, J., Meuth, S. G., Stoll, G. & Nieswandt, B. (2009) «STIM2 Regulates Capacitive Ca²⁺ Entry in Neurons and Plays a Key Role in Hypoxic Neuronal Cell Death.» Science Signaling 2(93): ra67.
- Berridge, M. J., Bootman, M.D. & Roderick, H. L. (2003)«Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling.» Nature Reviews Molecular Cell Biology 4(7): 517-529.
- Berridge, M. J. (2012) «Neuronal Signalling.» Cell Signalling Biology 10.
- Bliss T. V. & Collingridge ,G.L. (1993) «A Synaptic Model of Memory: Long-Term Potentiation in the Hippocampus.» Nature 361(6407): 31-39.
- Bodhinathan, K., Kumar, A. & Foster, T. C. (2010) «Intracellular Redox State Alters NMDA Receptor Response During Aging through Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II.» Journal of Neuroscience 30(5): 1914-1924.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., & Price, P.J. (1993)«Optimized Survival of Hippocampal Neurons in B27-Supplemented Neurobasal, a New Serum-Free Medium Combination.» Journal of Neuroscience Research 35(5): 567-76.
- Calvo-Rodríguez, M., de la Fuente, C., García-Durillo, M., García-Rodríguez, C., Villalobos, C. & Núñez, L. (2017)«Aging and amyloid β oligomers enhance.» Journal of Neuroinflammation 14(24).
- 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.» Biochimica et Biophysica Acta: 2637-2649.

- Chamero, P., Villalobos, C., Alonso, M. T. & Garcia-Sancho, J. (2002) «Dampening of Cytosolic Ca²⁺ Oscillations on Propagation to Nucleus.» Journal of Biological Chemistry 277: 50226-50229.
- Chan, C. S., Guzman, J. N., Ilijic, E., Mercer, J. N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G. E. & Surmeier, D. J. «Rejuvenation Protects Neurons in Mouse Models of Parkinson's Disease.» Nature 447.7148 (2007): 1081-1086.
- Clapham, D. E. (1995) «Calcium Signaling.» Cell Press 80(2): 259-268.
- Disterhoft, J. F., Moyer, J. R. & Thompson, L. T. (1994) «The Calcium Rationale in Aging and Alzheimer's Disease. Evidence from an Animal Model of Normal Aging.» Annals of the New York Academy Sciences 747: 382-406.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J.M. & Venkatachalam, M.A. (2006) «Calcium in Cell Injury and Death.» Pathology Mechanisms of Disease 1(1): 405-435.
- Duncan, S.R., Hwang, S.Y. & Koulen, P. (2007) «Differential Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Signaling in a Neuronal Cell Line.» International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39: 1852-1862.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly M. & Rao, A. (2006) «A Mutation in Orai1 Causes Immune Deficiency by Abrogating CRAC Channel Function.» Nature 441(7090): 179-1785.
- Foskett, J. K., White, C., Cheung K. H. & Mak, D. O. «Inositol Trisphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channels.» Physiological Reviews 87.2 (2007): 593-658.
- Foster, T. C. (2007) «Calcium Homeostasis and Modulation of Synaptic Plasticity in the Aged Brain.» Aging Cell 6(3): 319-325.
- Gerard, M., Beaudoin, J. & Lee, S. H. (2012) «Culturing Pyramidal Neurons from the Early Postnatal Mouse Hippocampus and Cortex.» Nature Protocols: 1741-1754.
- Gray, D. A. & Woulfe, J. (2005) «Lipofuscin and Aging: a Matter of Toxic Waste.» Science of Aging Knowledge Environment 5: re 1.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. (1985) «A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties.» Journal of Biological Chemistry 260(6): 3440-3450.

- Hagen, T. M., Yowe, D. L., Bartholomew, J. C., Wehr, C. M., Do, K. L., Park, J. Y. & Ames, B. N. (1997) «Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase.» Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A 94(7): 3064-3069.
- Hertle, D.N. & Yeckel, M.F. (2007) «Distribution of Inositol-1,4,5-Trisphosphate Receptor Isoforms and Ryanodine Receptor Isoforms During Maturation of the Rat Hippocampus.» Neuroscience 150(3): 625-638.
- Hollenbeck, P. J. & Saxton, W. M. (2005) «The Axonal Transport of Mitochondria.» Journal of Cell Science 118(23): 5411-5419.
- Kaftan, E.J., Ehrlich, B.E. & Watras J. (1997) «Inositol 1,4,5-Trisphosphate (InsP3) and Calcium Interact to Increase the Dynamic Range of InsP3Receptor-Dependent Calcium Signaling.» Journal of General Physiology 110(5): 529-538.
- Khachaturian, Z. S. (1987) «Hypothesis on the Regulation of Cytosol Calcium Concentration and the Aging Brain.» Neurobiology Aging 8(4): 345-346.
- Kirschuk, S. & Verkhratsky, A. (1996)«Calcium Homeostasis in Aged Neurons.» Life Sciences 59(5): 451-459.
- Koeppen, B. (2009) Fisiología. Elsevier Mosby, 6ª Edición.
- Lehohla, M., Kellaway, L. & Russell, V. A. (2008) «Effect of Ageing on Ca²⁺ Uptake via NMDA Receptors into Barrel Cortex Slices of Spontaneously Hypertensive Rats.» Metabolic Brain Disease 23(1) : 1-8.
- Magnusson, K. R. (1998) «The aging of the NMDA receptor complex.» Frontiers Bioscience 3: 70-80.
- Majewski, L. and Kuznicki, J. (2015)«SOCE in Neurons: Signaling or Just Refilling?» Biochimia et Biophysica Acta 9(1853): 1940-1952.
- Mak, D.O., McBride, S. & Foskett, J.K. (2001) «ATP-Dependent Adenophostin Activation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Channel Gating: Kinetic Implications for the Durations of Calcium Puffs in Cells.» Journal of General Physiology 117(4): 299-314.
- Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U. & Vingtdeux, V. (2009) «Molecular Neurodegeneration.» BioMed Central 4(20)

- Mattson, M. P. (2007) «Calcium and Neurodegeneration.» Aging Cell 6(3): 337-350.
- Michaelis, M. L., Bigelow, D. J., Schoneich, C., Williams, T. D., Ramonda, L., Yin, D., Huhmer, A. F., Yao, Y., Gao, J. & Squier, T. C. (1996)«Decreased Plasma Membrane Calcium Transport Activity in Aging Brain.» Life Science 59(6): 405-412.
- Montero, M., Brini, M., Marsault, R., Alvarez, J., Sitia, R., Pozzan, T. & Rizzuto, R. (1995)«Monitoring Dynamic Changes in Free Ca²⁺ Concentration in the Endoplasmic Reticulum of Intact Cells.» EMBO Journal 14(22): 5467-5475.
- Navarro, A. (2004) «Mitochondrial Enzyme Activities as Biochemical Markers of Aging.» Molecular Aspects of Medicine 25(1-2): 37-48.
- Nuñez, L., Valero, R. A., Senovilla, L., Sanz-Blasco, S., Garcia-Sancho, J. & Villalobos, C. (2006) «Cell Proliferation Depends on Mitochondrial Ca²⁺ Uptake: Inhibition by Salicylate.» Journal of Physiology 571(1): 57-73.
- Palty, R., Silverman, W. F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvil, D. & Sekler, I. (2010) «NCLX is an Essential Component of Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ Exchange.» Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A 107(1): 436-441.
- Pani, B., Bollimuntha, S. & Singh, B.B. (2012)«The TRP to Ca²⁺ Signaling Just Got STIM: an Update Activated TRPC Channels.» Frontiers in Bioscience 17: 805-823.
- Parekh, A. B. and Putney, J. W. (2005) «Store-Operated Calcium Channels.» Physiological Reviews 85(2): 757-810.
- Perez-Otano, I., Lujan, R., Tavalin, S. J., Plomann, M., Modregger, J., Liu, X. B., Jones, E. G., Heinemann, S. F., Lo, D. C. & Ehlers, M. D. (2006)«Endocytosis and Synaptic Removal of NR3A-Containing NMDA Receptors by PACSIN1/Syndapin1.» Nature Neuroscience 9(5): 611-621.
- Pérez-Otano, Y., Lujan, S., Tavalin, M.J., Plomann, J.M., Modregger, X.J., Liu, E.B., Jones, S.G., Heinemann, D.S., Lo, C. & Ehlers, M.D. (2006) «Endocytosis and Synaptic Removal of Nr3a-Containing Nmda Receptors by Pacsin1/Syndapin1.» Nature Neuroscience 9(5): 611-21.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F. M., Pistolese, M. & Paradies, G. (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.» Journal of Biological Chemistry 279(51): 53103-53108.
- Pottorf, W. J., Duckles, S. P. & Buchholz, J. N. (2000) «SERCA Function Declines with Age in Adrenergic Nerves from the Superior Cervical Ganglion.» Journal of Autonomic Pharmacology 20(5-6): 281-290.
- Rizzuto, R. & Pozzan, T. (2006) «Microdomains of Intracellular Ca^{2+} : Molecular Determinants and Functional Consequences.» Physiological Reviews 86(1): 369-408.
- Sodero, A. O., Weissmann, C., Ledesma, M. D. & Dotti, C. G. (2011) «Cellular Stress from Excitatory Neurotransmission Contributes to Cholesterol Loss in Hippocampal Neurons Aging In Vitro.» Neurobiology of Aging 32(6): 1043-1053.
- Stutzmann, G. E. & Mattson, M. P. (2011): «Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Handling in Excitable Cells in Health and Disease.» Pharmacological Reviews 63(3) 700-727.
- Thibault, O., Gant, J. C. & Landfield, P. W. (2007) «Expansion of the Calcium hypothesis of Brain Aging and Alzheimer's Disease: Minding the Store.» Aging Cell 6(3): 307-317.
- Toescu, E. C. & Verkhratsky, A. (2007) «The Importance of Being Subtle: Small Changes in Calcium Homeostasis Control Cognitive Decline in Normal Aging.» Aging Cell 6(3): 267-273.
- Tsien, R. D. & Wong, R.K. (1988) «Cellular Mechanism of Neuronal Synchronization in Epilepsy.» Science 11(10): 745-747.
- Valero, R. A., Senovilla, L., Nuñez, L. & Villalobos, C. (2008) «The Role of Mitochondrial Potential in Control of Calcium Signals Involved in Cell Proliferation.» Cell Calcium 44(3): 259-269.
- Xiong, J., Camello, P. J., Verkhratsky, A. & Toescu, E. C. (2004) «Mitochondrial Polarisation Status and $[Ca^{2+}]_i$ Signalling in Sat Cerebellar Granule Neurones Aged in Vitro.» Neurobiology of Aging 25(3): 349-359.
- Zaidi, A. & Michaelis, M. L. (1999) «Effects of Reactive Oxygen Species on Brain Synaptic Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase.» Free Radical Biology and Medicine 27(7-8): 810-821.
- Zaidi, A., Gao, J., Squier, T. C., & Michaelis, M. L. (1998) «Age-Related Decrease in Brain Synaptic Membrane Ca^{2+} -ATPase in F344/BNF1 Rats.» Neurobiology Aging 19(5): 487-495.

9 LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

9.1 LISTADO DE FIGURAS

Figuras	Título	Página
Figura 1	Homeostasis del Ca^{2+} intracelular en neuronas	8
Figura 2	Entrada Capacitativa de Calcio (SOCE)	13
Figura 3	Liberación de Ca^{2+} a través de Receptores	19
Figura 4	Salida de Ca^{2+} del retículo endoplasmático a través del IP_3R	20
Figura 5	Corrientes unitarias generadas por distintas concentraciones de Ca^{2+} e IP_3	21
Figura 6	Probabilidad de apertura de las distintas isoformas de IP_3R según la $[\text{IP}_3]$.	21
Figura 7	Probabilidad de apertura de IP_3R en función de la $[\text{ATP}]$ y $[\text{Ca}^{2+}]$.	22
Figura 8	Remodelado del Ca^{2+} intracelular en la neurodegeneración	24
Figura 9	Estructura Poly-D-Lys	37
Figura 10	Diseción Hipocampo de ratas neonatas	38
Figura 11	Protocolos para cultivos primarios de células de hipocampo de ratas neonatas	39
Figura 12	Estructura química del fura-2/AM, fura-2 ácido y el complejo fura-2- Ca^{2+}	41
Figura 13	Espectro de excitación del fura-2	42
Figura 14	Representación del equipo de fluorescencia usado en los experimentos de determinación de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$	44
Figura 15	Protocolo Inmunocitoquímica.	45
Figura 16	Estructura química Éster metílico de tetrametilrodamina	52
Figura 17	Caracterización de cultivos primarios mixtos de hipocampo de rata. Los cultivos primarios de neuronas y células gliales de hipocampo de rata se cultivan durante diferentes <i>Días In Vitro (DIV)</i> : 3-5 DIV (células jóvenes), 14 DIV (células maduras) y >20 DIV (células envejecidas)	54
Figura 18	Caracterización funcional de neuronas y glías en cultivos de hipocampo de rata.	56
Figura 19	Determinación de los niveles de expresión $\text{IP}_3\text{R1}$ en cultivos de neuronas de hipocampo de rata durante el envejecimiento <i>in vitro</i> .	58
Figura 20	Determinación de los niveles de expresión $\text{IP}_3\text{R2}$ en cultivos de neuronas de hipocampo de rata durante el envejecimiento <i>in vitro</i> .	59
Figura 21	Determinación de los niveles de expresión $\text{IP}_3\text{R3}$ en cultivos de neuronas de hipocampo de rata durante el envejecimiento <i>in vitro</i> .	60
Figura 22	Medida del Potencial Mitocondrial en cultivos de neuronas de hipocampo de rata.	61
Figura 23	Medida del Potencial Mitocondrial en cultivos de neuronas de hipocampo de rata	62
Figura 24	Medida del Potencial Mitocondrial en cultivos de neuronas de hipocampo de rata.	63

9.2 LISTADO DE TABLAS

Tabla	Título	Página
Tabla 1	Anticuerpos y diluciones utilizados en la doble inmunocitoquímica para la caracterización de los cultivos primarios de hipocampo de rata	47
Tabla 2	Anticuerpos y diluciones en la detección de las isoformas del IP ₃ R del retículo endoplasmático	48
Tabla 3	Estímulos aplicados para las medidas del Ca ²⁺ citosólico	51