



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TESIS DOCTORAL:

**REMODELADO DEL CALCIO INTRACELULAR
EN EL ENVEJECIMIENTO NEURONAL Y LOS
TUMORES CEREBRALES**

Presentada por MARÍA ELENA HERNANDO PÉREZ para
optar al grado de
Doctor/a por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dra. LUCÍA NÚÑEZ LLORENTE
Dr. CARLOS VILLALOBOS JORGE



FINANCIACIÓN

Este proyecto de tesis se ha desarrollado gracias a una ayuda destinada a la financiación de Contratos Predoctorales de Personal Investigador de la Junta de Castilla y León, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo al amparo de la Orden 29 de octubre de 2018 de la Consejería de Educación, y a un contrato financiado por el proyecto Programa Estratégico IBGM- Escalera de Excelencia con ref. CCVC8485 de la Junta de Castilla y León.

Además, este trabajo también se ha llevado a cabo gracias a la financiación obtenida de los siguientes proyectos de investigación:

- Proyecto titulado “Modulación de los canales de calcio operados por depósitos y señal de calcio en cáncer y envejecimiento neuronal” de Ref. PID2021-125909OB-100 del Ministerio de Ciencia e Innovación, IPs Carlos Villalobos y Lucía Núñez.
- Proyecto titulado “Comprender y revertir el remodelado del calcio intracelular en cáncer y envejecimiento neuronal” con ref. RTI2018-099298-B-100 del Ministerio de Ciencia e Innovación. IPs Carlos Villalobos y Lucía Núñez.
- Proyecto titulado “Bases celulares y moleculares del envejecimiento neuronal y de la susceptibilidad asociada a las enfermedades neurodegenerativas” de Ref. VA294P18 de la Junta de Castilla y León. IP Lucía Núñez
- Proyecto titulado "Predicción de la recurrencia tumoral en glioblastomas mediante resonancia magnética, aprendizaje automático y análisis transcriptómico: un análisis supra total resección guiada por inteligencia artificial", de Ref. PI22/01680 del Instituto de Salud Carlos III. IP Santiago Cepeda.

APORTACIONES CIENTÍFICAS

Durante el desarrollo de la tesis doctoral, se han realizado las siguientes publicaciones científicas:

- Pérez-Riesgo, E., **Hernando-Pérez, E.**, Feijóo, V., Tajada, S., Núñez, L., & Villalobos, C. (2023). Transcriptional Basis of Ca^{2+} Remodeling Reversal Induced by Polyamine Synthesis Inhibition in Colorectal Cancer Cells. *Cancers*, 15(5), 1600. <https://doi.org/10.3390/cancers15051600>
- Caballero, E., **Hernando-Pérez, E.**, Tapias, V., Calvo-Rodríguez, M., Villalobos, C., & Núñez, L. (2022). Amyloid Beta Oligomers-Induced Ca^{2+} Entry Pathways: Role of Neuronal Networks, NMDA Receptors and Amyloid Channel Formation. *Biomedicines*, 10(5), 1153. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051153>
- **Hernando-Pérez, E.**, Pérez-Riesgo, E., Cepeda, S., Arrese, I., Sarabia, R., Villalobos, C., & Núñez, L. (2021). Differential Ca^{2+} responses and store operated Ca^{2+} entry in primary cells from human brain tumors. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1868(8), 119060. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119060>
- Calvo-Rodriguez, M., **Hernando-Pérez, E.**, López-Vázquez, S., Núñez, J., Villalobos, C., & Núñez, L. (2020). Remodeling of Intracellular Ca^{2+} Homeostasis in Rat Hippocampal Neurons Aged In Vitro. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1549. <https://doi.org/10.3390/ijms21041549>
- Calvo-Rodriguez, M., **Hernando-Pérez, E.**, Nuñez, L., & Villalobos, C. (2019). Amyloid β Oligomers Increase ER-Mitochondria Ca^{2+} Cross Talk in Young Hippocampal Neurons and Exacerbate Aging-Induced Intracellular Ca^{2+} Remodeling. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00022>
- Núñez, L., Bird, G. S., **Hernando-Pérez, E.**, Pérez-Riesgo, E., Putney, J. W., Jr, & Villalobos, C. (2019). Store-operated Ca^{2+} entry and Ca^{2+} responses to hypothalamic releasing hormones in anterior pituitary cells from Orai1-/- and heptaTRPC knockout mice. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1866(7), 1124–1136. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.11.006>

Además, se ha participado en diferentes congresos en forma de comunicación oral o póster.

- Congreso /Evento: VIII Congreso Red Española de Canales Iónicos (RECI)
Hernando-Pérez, E., Pérez-Riesgo, E., Villalobos, C. and Nuñez, L. Transcriptomic Remodeling of Intracellular calcium homeostasis in rat hippocampal neurons during in vitro aging.
Comunicación en forma de Póster. Abstract publicado en libro de abstracts del congreso. Lugar de celebración: Alicante, España. Fecha: 25-27 septiembre de 2022.
- Congreso /Evento: The 8th ECS Workshop “Calcium Signaling in Aging and Neurodegenerative Diseases”.
Núñez L., López-Vázquez S., **Hernando-Pérez E.**, Villalobos C. Effects of aging and amyloid oligomers on IP_3 receptor expression and IP_3 dependent calcium release in rat hippocampal neurons.
Comunicación en forma de Póster. Abstract publicado en libro de abstracts del congreso. Lugar de celebración: Coimbra, Portugal. Fecha: 18-20 septiembre de 2019.

- Congreso /Evento: VII Congreso Red Española de Canales Iónicos (RECI).
Hernando-Pérez, E., M. Calvo-Rodriguez. M., García-Durillo, M, Villalobos, C. and Nuñez, L. Aging enhances expression of IP₃ receptors and ER-mitochondria colocalization leading to Ca²⁺ remodelling in rat hippocampal neurons.
 Comunicación en forma de Póster. Abstract publicado en libro de abstracts del congreso.
 Lugar de celebración: Cáceres, España. Fecha: 15-17 mayo de 2019.
- Congreso /Evento: XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF).
Hernando-Pérez E, García-Durillo M, Villalobos C, Núñez L. In vitro aging of rat hippocampal neurons is associated to changes in calcium responses to NMDA and expression of IP₃ receptor isoforms.
 Comunicación Oral.
 Lugar de celebración: Cádiz, España. Fecha:18-21 septiembre de 2018.
- Congreso /Evento: XV International Meeting of the European Calcium Society (ECS2018).
 Núñez L, Bird GS, **Hernando-Pérez E**, Pérez-Riesgo E, Birnbaumer L, Villalobos C and Putney JW. Store-operated Ca²⁺ entry and Ca²⁺ responses to hypothalamic releasing hormones in anterior pituitary cells from Orai1 and hepta TRPC knockout mice.
 Comunicación en forma de Póster. Publicación: Abstract publicado en libro de abstracts y Artículo completo en *BBA Mol Cel Res*.
 Lugar de celebración: Hamburgo, Alemania Fecha:9-13 septiembre de 2018.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	7
ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	xvii
1 EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	1
1.1 Organización del sistema nervioso central.....	1
1.2 El hipocampo.....	3
2 ENVEJECIMIENTO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	4
2.1 Envejecimiento fisiológico cerebral.....	5
2.2 <i>Hallmarks</i> del envejecimiento.....	7
2.3 Envejecimiento y desarrollo de enfermedades asociadas	17
2.3.1 Envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas	18
2.3.2 Envejecimiento y Cáncer.....	19
3 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	21
1.1 Factores de riesgo.....	22
1.2 Hipótesis sobre el origen de la enfermedad de Alzheimer	23
1.2.1 Hipótesis de la cascada amiloide	23
1.2.2 Hipótesis de la proteína tau.....	28
1.2.3 Hipótesis colinérgica	29
1.3 Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.....	30
1.3.1 Tratamiento farmacológico.....	30
1.3.2 Tratamiento no farmacológico.....	32
4 TUMORES CEREBRALES.....	33
4.1 Aspectos generales del cáncer	33
4.1.1 Incidencia.....	33
4.1.2 <i>Hallmarks</i> del cáncer	34
4.2 Tumores cerebrales	40
4.2.1 Clasificación	42
4.3 Glioblastoma.....	46
4.3.1 Aspectos generales: Incidencia y prevalencia.....	46
4.3.2 Factores de riesgo.....	47
4.3.3 Diagnóstico	47

4.3.4	Tratamientos	50
5	HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR.....	60
5.1	Sistemas de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática	61
5.1.1	Mecanismos de entrada de Ca^{2+} de la membrana plasmática	62
5.1.2	Mecanismos de extrusión de Ca^{2+} de la membrana plasmática	74
5.2	Retículo endoplasmático	77
5.2.1	Sistemas de liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático	78
5.2.2	Mecanismos de entrada de Ca^{2+} al retículo endoplasmático	81
5.3	La Mitocondria.....	84
5.3.1	Mecanismos de captación de Ca^{2+} de la mitocondria.....	86
5.3.2	Mecanismos de salida de Ca^{2+} desde la mitocondria: Intercambiadores.....	89
5.4	Superfamilia de los TRP	91
5.5	Entrada de Ca^{2+} operada por depósitos	95
5.5.1	ORAI	96
5.5.2	STIM.....	98
5.5.3	Moduladores de SOCE	99
6	HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN EL ENVEJECIMIENTO NEURONAL, ALZHEIMER Y TUMORES CEREBRALES	102
6.1	Remodelado del Ca^{2+} intracelular en el envejecimiento neuronal.....	102
6.1.1	Efectos del envejecimiento sobre los sistemas de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática.....	102
6.1.2	Efectos del envejecimiento sobre los sistemas de transporte de Ca^{2+} del RE	104
6.1.3	Efectos del envejecimiento sobre los sistemas de transporte de Ca^{2+} en la mitocondria	105
6.1.4	Efectos del envejecimiento sobre la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos.....	106
6.2	Remodelado del Ca^{2+} intracelular y enfermedad de Alzheimer	107
6.2.1	$\text{A}\beta$ y entrada de Ca^{2+}	107
6.2.2	Procesamiento amiloide y liberación de Ca^{2+} de los depósitos	108
6.2.3	Enfermedad de Alzheimer y mitocondria	109
6.3	Remodelado del Ca^{2+} intracelular en tumores cerebrales.....	111
6.3.1	Remodelado del Ca^{2+} en gliomas sobre la proliferación celular	111
6.3.2	Remodelado del Ca^{2+} en gliomas y migración celular.....	112
6.3.3	Influencia en el entorno tumoral mediante la señal de glutamato	113
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	115
1	HIPÓTESIS	117
2	OBJETIVOS	117
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	119

1	MATERIAL	121
2	MÉTODOS	124
2.1	Modelos de estudio.....	124
2.1.1	Modelo de envejecimiento neuronal	124
2.1.2	Modelo de Enfermedad de Alzheimer	125
2.1.3	Modelos de tumores cerebrales humanos	126
2.2	Medida de la concentración de calcio citosólico.....	128
2.2.1	Imagen de Ca^{2+} en cultivos de hipocampo: SOCE	129
2.2.2	Imagen de Ca^{2+} en cultivos primarios de tumores cerebrales	130
2.2.3	Análisis de datos de imagen de Ca^{2+}	131
2.3	Inmunofluorescencia.....	131
2.4	Medida de la liberación de Ca^{2+} con IP_3 enjaulado	133
2.5	Colocalización retículo-mitocondria	135
2.6	Estudio del potencial mitocondrial.....	135
2.7	Medida de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno.....	135
2.8	Ensayo de proliferación celular	136
2.9	Extracción de ARN	137
2.9.1	Extracción de ARN de cultivos celulares de hipocampo de ratas neonatas	137
2.9.2	Extracción de ARN a partir de muestras de tejido tumoral	138
2.10	Enriquecimiento de glías en cultivos de hipocampo	139
2.11	Técnicas Transcriptómicas	140
2.11.1	Microarrays	140
2.11.2	RNA-Seq	143
2.12	Diseño experimental y análisis transcriptómico en neuronas de hipocampo: Microarrays	144
2.12.1	Análisis transcriptómico en el envejecimiento neuronal <i>in vitro</i>	144
2.12.2	Análisis transcriptómico del efecto del $\text{A}\beta_{1-42}$ en neuronas envejecidas	145
2.13	Diseño experimental y análisis transcriptómico en GBM: RNA-seq	146
2.13.1	Análisis de calidad y preparación de librerías	147
2.13.2	Secuenciación	147
2.13.3	Preprocesamiento de los datos de RNA-seq.....	147
2.13.4	Análisis de datos de RNA-seq	148
IV.	RESULTADOS	151
1	ESTUDIO DEL REMODELADO DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO NEURONAL <i>IN VITRO</i>	153
1.1	Reversión de la pérdida de SOCE en neuronas envejecidas	156

1.2	Efecto del envejecimiento y los oligómeros de A β sobre el potencial mitocondrial en neuronas de hipocampo.....	158
1.3	Efecto del tratamiento con los oligómeros de A β sobre la formación de especies reactivas de oxígeno en neuronas de hipocampo.....	159
1.4	El envejecimiento y el tratamiento con los oligómeros de A β aumenta la colocalización RE-Mitocondria en neuronas de hipocampo	159
1.5	Efecto del envejecimiento y los oligómeros de A β sobre la expresión de receptores de IP ₃ en neuronas de hipocampo.....	161
1.5.1	Efecto del envejecimiento sobre la expresión de isoformas del IP ₃ R	161
1.5.2	Efecto de los oligómeros de A β_{1-42} sobre la expresión de los receptores de IP ₃ en neuronas de hipocampo.....	162
1.6	Efecto del envejecimiento sobre la liberación de Ca ²⁺ inducida por IP ₃ enjaulado	162
2	ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL REMODELADO DEL Ca²⁺ EN EL ENVEJECIMIENTO NEURONAL.....	165
2.1	Análisis de la expresión diferencial entre neuronas envejecidas y jóvenes	168
2.2	Análisis de significación biológica.....	173
2.2.1	Perfiles de expresión de las muestras de cultivos de hipocampo	173
2.2.2	Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes	174
3	EFFECTOS A NIVEL TRANSCRIPTÓMICO DE LOS OLIGÓMEROS DE Aβ_{1-42} SOBRE NEURONAS DE HIPOCAMPO.....	177
3.1	Análisis de expresión diferencial del efecto de los oligómeros de A β sobre neuronas de hipocampo envejecidas.....	178
4	REMODELADO DEL Ca²⁺ INTRACELULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMORES CEREBRALES	184
4.1	Análisis de la homeostasis del Ca ²⁺ intracelular en tumores cerebrales	185
4.1.1	Análisis del nivel basal de Ca ²⁺ en tumores cerebrales.....	187
4.1.2	Análisis de la señal de Ca ²⁺ en respuesta a ATP	187
4.1.3	Efecto de la despolarización con medio con alta concentración de K ⁺	189
4.1.4	Análisis de SOCE en cultivos primarios de tumores cerebrales.....	191
4.2	Análisis de la Señal del Ca ²⁺ en Gliomas: respuesta a ATP, K ⁺ y SOCE.....	193
4.3	Efecto de eliminar el Na ⁺ extracelular sobre SOCE en gliomas	194
4.4	Efecto de la inhibición de SOCE sobre la proliferación de cultivos de GBM.....	196
4.5	Perfil de expresión de los genes implicados en el transporte de Ca ²⁺ intracelular en GBM.....	197
4.6	Estudio del remodelado del Ca ²⁺ en GBM y áreas peritumorales	201
4.6.1	Análisis de la Señal de Ca ²⁺ en GBM y regiones peritumorales	202
4.6.2	Perfil de expresión de los genes implicados en el transporte de Ca ²⁺ intracelular en muestras de GBM y peritumorales.....	206
4.6.3	Análisis transcriptómico en GBM y regiones peritumorales	214

4.6.4	Análisis de significación biológica.....	222
V.	DISCUSIÓN.....	225
1	REMODELADO DE LA HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN MODELOS CELULARES DE ENVEJECIMIENTO NEURONAL Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	227
1.1.	La disminución de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) durante el envejecimiento <i>in vitro</i> no se revierte con potenciadores de esta vía.....	228
1.2.	Efectos del envejecimiento <i>in vitro</i> de las neuronas de hipocampo sobre el potencial mitocondrial, formación de ROS y expresión de genes implicados en SOCE.....	228
1.3.	Efectos del envejecimiento <i>in vitro</i> de las neuronas de hipocampo sobre la colocalización RE-mitocondria, expresión de receptores de IP_3 y liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3	230
1.4.	Análisis transcriptómico del remodelado de otros sistemas de transporte de Ca^{2+} en el envejecimiento neuronal <i>in vitro</i> y efecto de los oligómeros del péptido β -amiloide	231
2	REMODELADO DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN TUMORES CEREBRALES	237
2.1	Caracterización de la señal de Ca^{2+} en diferentes tumores cerebrales	237
2.2.	Transcriptoma del transporte de Ca^{2+} intracelular en glioblastomas humanos	239
2.3.	Remodelado del transporte de Ca^{2+} en GBM respecto a áreas peritumorales	245
VI.	CONCLUSIONES	251
	CONCLUSIONES	253
VII.	REFERENCIAS	255
	REFERENCIAS.....	257

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_{cit}: concentración de Ca²⁺ citosólica

[Ca²⁺]_{Ext}: concentración de Ca²⁺ extracelular

[Ca²⁺]_{MT}: concentración de Ca²⁺ en la mitocondria

[Ca²⁺]_{RE}: concentración de Ca²⁺ en el retículo endoplásmico

2-APB: 2-aminoetoxidifenilborato

5-ALA: ácido 5- aminolevulínico

AC: adenilato cilasa

ACh: acetilcolina

AChR: receptor de acetilcolina

ACP: análisis de componentes principales

ADN: ácido desoxirribonucleico

AICD: dominio intracelular de APP (del inglés, *APP intracellular domain*)

AMPA: ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPAR: receptor AMPA

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

APAF1: factor activador de peptidasa apoptótica 1 (del inglés, *apoptosis protease-activating factor-1*)

APoE: apoliproteína E

APP: proteína precursora amiloide (del inglés, *amyloid precursor protein*)

ARN: ácido ribonucleico

AT: astrocitoma

ATP: adenosín trifosfato

AUC: área bajo la curva (del inglés, *area under curve*)

Aβ: péptido β-amiloide (del inglés, *amyloid beta peptide*)

Aβo: oligómero péptido β-amiloide

BACE: β-secretasa

BHE: barrera hematoencefálica

BM: metástasis de mama (del inglés, *breast metastasis*)

CA: campo de *Ammon*

CaM: calmodulina

CAR: receptor de antígeno quimérico (del inglés, *chimeric antigen receptor*)

CAR-T: células T con receptores *CAR*

CBD: dominio de unión a CaM

CDK: quinasas dependientes de ciclinas (del inglés, *cyclin dependent kinases*)

ChaT: acetiltransferasa de colina (del inglés, *choline acetyltransferase*)

CIC: coctel de Inhibidores de canales

CICR: liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (del inglés, *calcium induced calcium release*)

CitC: citocromo C

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2, 3-diona (o cianquixalina)

CP: componente principal

CPA: ácido ciclopiazónico (del inglés, *cyclopiazonic acid*)

CRAC: canal activado por la liberación de Ca^{2+} (del inglés, *Ca^{2+} release-activated channel*)

CRACR2A: regulador de canal de Ca^{2+} activado por liberación de Ca^{2+} 2A (del inglés, *calcium release activated channel regulator 2A*)

CTE: cadena transportadora de electrones

DAG: diacilglicerol

D-AP5: ácido D-2-amino-5-fosfonopentanoico

DEG: genes diferencialmente expresados (del inglés, *differentially expressed genes*)

DIV: días *in vitro*

DO: densidad óptica

EA: enfermedad de Alzheimer

EGFR: receptor de factor de crecimiento

EGTA: ácido etilenglicol-bis-(b-aminoetil-eter)-N,N,N',N'-tetra-acético

EH: enfermedad de Huntington

ELA: esclerosis lateral amiotrófica

EMA: agencia europea del medicamento (del inglés, *European medicines agency*)

EMRE: regulador esencial de MCU (del inglés, *essential MCU regulator*)

ENVEJ: envejecido

EP: enfermedad de Parkinson

ETON: dominio transmembrana N-terminal extendido (*del inglés extended transmembrane Orai1 N-terminal*).

FBS: suero bovino fetal (del inglés, *fetal bovine serum*)

FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (del inglés, *carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine*)

FDA: *food and drug administration*

GBM: glioblastoma

GD: giro dentado

GFAP: proteína fibrilar ácida de la glía

GH: hormona del crecimiento (del inglés, *growth hormone*)

GluR: receptor de glutamato (del inglés, *glutamate receptor*)

GPCR: receptor acoplado a proteínas G (del inglés, *G protein-coupled receptor*)

GRP75: proteína regulada por glucosa de 75 kDa (del inglés, *75-kDa glucose-regulated protein*)

GS: suero de cabra (del inglés, *goat serum*)

GSC: células madre de glioma (del inglés, *glioma stem cells*)

HCXm: intercambiador H^+/Ca^{2+} mitocondrial (del inglés, *mitochondrial H^+/Ca^{2+} exchanger*)

HS: suero de caballo (del inglés, *horse serum*)

HVA: activados por alto voltaje (del inglés, *high voltage activated*)

IDH: isocitrato deshidrogenasa

iGluR: receptor ionotrópico de glutamato (del inglés, *ionotropic glutamate receptors*)

IL: interleucina o interleuquina

IP₃: inositol 1,4,5-trisfosfato (del inglés, *inositol 1,4,5-triphosphate*)

IP₃R: receptor de Inositol 1,4,5-trisfosfato (del inglés, *inositol 1,4,5-triphosphate receptor*)

IR: radiación infrarroja (del inglés, *infrared light*)

JG: cultivo joven enriquecido en glías

JM: cultivo joven mixto

KA: ácido kainato (del inglés, *kainic acid*)

KAR: receptor de KA (del inglés, *Kainic acid receptor*)

LDP: depresión a largo plazo (del inglés, *long-term depression*)

LM: metástasis de pulmón (del inglés, *lung metastasis*)

LTP: potenciación a largo plazo (del inglés, *long-term potentiation*)

LVA: bajo umbral de activación (del inglés, *low voltage activation*)

mAChR: receptor muscarínico de acetilcolina (del inglés, *muscarinic acetylcholine receptors*)

MAM: membranas asociadas a mitocondrias (del inglés, *mitochondria-associated membrane*)

MBD: dominio de unión a microtúbulo (del inglés, *microtubules binding domain*)

MBP: proteína básica de mielina (del inglés, *myelin basic protein*)

MCU: uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (del inglés, *mitochondrial Ca^{2+} uniporter*)

MDEB: dietilborinato de metoxi (del inglés, *methoxy diethylborinat*)

ME: metástasis cerebral

MEC: medio externo completo

MG: meningioma

mGluR: receptor metabotrópico de glutamato (del inglés, *metabotropic glutamate receptors*)

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, *major histocompatibility complex*)

MICU: carga de Ca^{2+} mitocondrial (del inglés, *mitochondrial Ca^{2+} uptake*)

MME: membrana mitocondrial externa

MMI: membrana mitocondrial interna

MP: membrana plasmática

MT: mitocondria

nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina

NCLX: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Li}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (del inglés, *$\text{Na}^+/\text{Li}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*)

NCX: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (del inglés, *mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*)

NEC: no clasificado en otra parte

NFAT: factor nuclear de células T activadas (del inglés, *nuclear factor of activated T-cells*)

NFT: ovillos neurofibrilares (del inglés, *neurofibrillary tangles*)

NGS: secuenciación de nueva generación (del inglés, *next-generation sequencing*)

NK: *natural killer*

NMDA: N-metil-D-aspartato (del inglés, *N-methyl-D-aspartate*)

NMDAR: receptor de NMDA (del inglés, *NMDA receptor*)

NOS: no especificado de otra manera

ODG: oligodendroglioma

OM: metástasis de ovario (del inglés, *ovarian metastasis*)

OMS: organización mundial de la salud

ORMDL3: orosomucoide tipo 3 (del inglés, *Orosomucoid-like-3*)

P/S: penicilina/estreptomicina

PET: tomografía por emisión de positrones

PFA: paraformaldehído

PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PLC: fosfolipasa C (del inglés, *phospholipase C*)

PM: propionoximetilo

PMCA: bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (del inglés, *plasma membrane Ca^{2+} ATPase*)

PpIX: protoporfirina IX

PS: presenilina

PTPm: poro de transición mitocondrial

RE: retículo endoplasmático

RIN: número de integridad del ARN (del inglés, *RNA integrity number*)

RM: resonancia magnética

ROCC: canal de Ca^{2+} operados por receptor (del inglés, *receptor-operated calcium channel*)

ROS: especies reactivas de oxígeno (del inglés, *reactive oxygen species*)

RPKM: lecturas por kilo base de transcripción por millón de lecturas mapeadas (del inglés, *reads per kilo base per million mapped reads*)

RyR: receptor de rianodina (del inglés, *ryanodine receptor*)

SARAF: factor regulador asociado a SOCE (del inglés, *SOCE associated regulatory factor*)

SASP: fenotipo secretor asociado a senescencia (del inglés, *senescence-associated secretory phenotype*)

SD: dominio supresor (del inglés, *suppressor domain*)

SERCA: ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (del inglés, *endoplasmic reticulum calcium ATPase*).

SMOCC: canales de Ca^{2+} operados por segundos mensajeros (del inglés, *second Messenger operated calcium channel*)

SNC: sistema nervioso central

SOCC: canales de Ca^{2+} operados por depósitos (del inglés, *store-operated Ca^{2+} channel*)

SOCE: entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (del inglés, *Store-operated Ca^{2+} entry*)

SPCA: ATPasa de Ca^{2+} de la vía secretora (del inglés, *secretory pathway Ca^{2+} ATPase*)

STIM: molécula de interacción estromal 1 (del inglés, *stromal interaction molecule 1*)

STIMATE: potenciador de la actividad de STIM (del inglés, *STIM-activating enhance*)

SW: schwannoma o neurinoma

Tg: tapsigargina

TKR: receptor tirosina quinasa (del inglés, *tyrosine kinase receptor*)

TM: transmembrana

TMRM: tetrametilrodamina (del inglés, *tetramethylrhodamine*)

TMZ: temozolomida

TRP: receptor de potencial transitorio (del inglés, *transient receptor potential*)

TRPA: receptor de potencial transitorio anquirina (del inglés, *transient receptor potential ankyrin*)

TRPC: receptor de potencial transitorio canónico (del inglés, *transient receptor potential canonical*)

TRPM: receptor de potencial transitorio melastatina (del inglés, *transient receptor potential melastatin*)

TRPML: receptor de potencial transitorio mucolipina (del inglés, *transient receptor potential mucolipin*)

TRPP: receptor de potencial transitorio policistina (del inglés, *transient receptor potential polycystin*)

TRPV: receptor de potencial transitorio vaniloide (del inglés, *transient receptor potential vanilloid*)

TTX: tetrodotoxina (del inglés, *tetrodotoxin*)

UPR: respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés, *unfolded protein response*)

UV: ultravioleta

VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje (del inglés, *voltage-dependent anion-selective*)

VG: cultivo envejecido enriquecido en glías

VM: cultivo envejecido mixto

VOCC: canal de Ca^{2+} operado por voltaje (del inglés, *voltage-operated calcium channel*)

WT: *wild type*

$\Delta\Psi_{\text{mit}}$: potencial mitocondrial (del inglés, *mitochondrial membrane potential*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes del cerebro	2
Figura 2. Imágenes del atlas del hipocampo de rata.....	4
Figura 3. Envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad	6
Figura 4. Sellos o Hallmarks del envejecimiento.....	8
Figura 5. Disfunción mitocondrial en el envejecimiento.....	13
Figura 6. Características distintivas de las células senescentes.	15
Figura 7. Envejecimiento y aparición de enfermedades	18
Figura 8. Acumulación de proteínas y enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento.....	19
Figura 9. Cambios fisiológicos que se producen en el cerebro durante la enfermedad de Alzheimer).	22
Figura 10. Hipótesis de la cascada amiloide en la EA.....	24
Figura 11. Vías de procesamiento de APP.....	25
Figura 12. Agregación del péptido β -amiloide.	26
Figura 13. Formación de ovillos neurofibrilares.....	29
Figura 14. Representación de la neurotransmisión de ACh	30
Figura 15. Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en el mundo y en España.....	34
Figura 16. Hallmarks o sellos del cáncer. Se han descrito hasta catorce características que distinguen a una célula sana de una tumoral	35
Figura 17. Incidencia de tumores del SNC en España	41
Figura 18. Clasificación de los gliomas.....	44
Figura 19. Relación entre los marcadores moleculares y los diferentes tipos de gliomas.....	46
Figura 20. Imágenes de resonancia magnética, diagnóstico y evolución de un GBM	48
Figura 21. Actividad de IDH.....	49
Figura 22. Esquema de los diferentes tratamientos para el GBM.....	50
Figura 23. Detección de un GBM con 5-ALA	52
Figura 24. Diagrama de los pasos de la terapia CAR-T cell.....	54
Figura 25. Terapia basada en la inhibición de puntos de control clave del sistema inmune	56
Figura 26. Homeostasis del Ca^{2+} intracelular	61
Figura 27. Estructura y mecanismo de activación de los VOCC	63
Figura 28. Receptores Operados por Receptor	65
Figura 29. Clasificación de los receptores de glutamato.....	66
Figura 30. Receptores ionotrópicos de glutamato	67
Figura 31. Estructura y vías de señalización de los receptores nicotínicos de ACh (nAChR)	70
Figura 32. Estructura y vías de señalización de mAChR.	71
Figura 33. Receptores purinérgicos y señalización purinérgica	72
Figura 34. Estructuras de PMCA.....	75
Figura 35. Topología NCX	76
Figura 36. Sistemas de transporte de Ca^{2+} en el RE	77
Figura 37. Estructura IP_3R	79
Figura 38. Estructura de la SERCA.....	82
Figura 39. Actividad de la SERCA.....	83
Figura 40. Sistemas de transporte de Ca^{2+} mitocondrial.....	85
Figura 41. Complejo MCU	87

Figura 42. Mecanismo de activación/ desactivación de VDAC	88
Figura 43. Modelo representativo de NCLX	90
Figura 44. Representación esquemática de HCXm	91
Figura 45. Superfamilia de los TRP.....	92
Figura 46. Mecanismo de activación de SOCE.	95
Figura 47. Estructura e isoformas de ORAI	97
Figura 48. STIM	98
Figura 49. Mecanismo de activación de STIM.....	99
Figura 50. Efecto del envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial.....	106
Figura 51. Remodelado de la señalización del Ca^{2+} en el RE debido a mutaciones en presenilinas en la EA.....	109
Figura 52. Vista esquemática del papel de la desregulación de Ca^{2+} mitocondrial en la EA	110
Figura 53. La señalización de Ca^{2+} media la proliferación, invasión y migración en células de gliomas.. ..	113
Figura 54. Representación esquemática de los procesos biológicos promovidos por los sistemas de señalización de Ca^{2+} en las células cancerígenas de tumores cerebrales	114
Figura 55. Protocolo de obtención de cultivos primarios de células de hipocampo de ratas neonatas (0-1 día)	125
Figura 56. Protocolo de preparación de los oligómeros del péptido β -amiloide.....	126
Figura 57. Protocolo para la obtención de cultivos primarios a partir de muestras de tumores cerebrales humanos.	127
Figura 58. Medida de la concentración de Ca^{2+} en célula única mediante la sonda Fura-2/AM	128
Figura 59. Protocolo de Inmunofluorescencia	132
Figura 60. Mecanismo de molecular del caged IP_3	134
Figura 61. Actividad de la sonda CM- H_2DCFDA	136
Figura 62. Protocolo de extracción de ARN a partir de cultivos primarios	137
Figura 63. Protocolo de extracción de ARN a partir de muestras de tejido cerebral.....	139
Figura 64. Esquema del procesamiento e hibridación del ARN para la realización de Microarrays.	141
Figura 65. Esquema de la tecnología de secuenciación masiva RNA-Seq.....	143
Figura 66. Diseño experimental del análisis transcriptómico en el envejecimiento neuronal in vitro	145
Figura 67. Diseño experimental para el estudio transcriptómico del efecto de $\text{A}\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo envejecidas.....	146
Figura 68. Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata	153
Figura 69. Identificación de neuronas y glías mediante inmunofluorescencia	154
Figura 70. Efecto del envejecimiento y del tratamiento con $\text{A}\beta$ sobre SOCE en cultivos primarios de hipocampo de rata neonata.....	155
Figura 71. Efecto del envejecimiento y del agonista MDEB sobre SOCE en cultivos de neuronas de hipocampo.....	157
Figura 72. El potencial mitocondrial disminuye con el envejecimiento y con el tratamiento de $\text{A}\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo	158
Figura 73. La formación de ROS aumenta con el envejecimiento y con el tratamiento con $\text{A}\beta_{1-42}$	159
Figura 74. El envejecimiento y el tratamiento con $\text{A}\beta_{1-42}$ aumenta la colocalización RE-Mitocondria en cultivos primarios neuronas de hipocampo.	160

Figura 75. La expresión de las tres isoformas del IP ₃ R aumenta con el envejecimiento neuronal.	161
Figura 76. El tratamiento con A β ₁₋₄₂ disminuye la expresión de IP ₃ R2 en neuronas de hipocampo jóvenes	162
Figura 77. La liberación de Ca ²⁺ a través de los IP ₃ R disminuye con el envejecimiento	163
Figura 78. El porcentaje de células que responden a IP ₃ cambia con el envejecimiento y con A β ₁₋₄₂	164
Figura 79. Diseño experimental del análisis transcriptómico del envejecimiento neuronal in vitro	166
Figura 80. El porcentaje de neuronas disminuye significativamente en los cultivos enriquecidos en glías	167
Figura 81. Análisis de componentes principales	167
Figura 82. Número de genes diferencialmente expresados en neuronas de hipocampo envejecidas	169
Figura 83. Expresión diferencial de los genes de la familia VOCC (A) y de bombas e intercambiadores de Ca ²⁺ (B) en neuronas de hipocampo envejecidas vs. neuronas jóvenes	169
Figura 84. Expresión diferencial de los genes que codifican para los receptores de glutamato NMDA (A) y No NMDA (B) en neuronas de hipocampo envejecidas vs jóvenes	170
Figura 85. DEG de la familia de genes que codifican para los receptores de Ach (A) y los receptores purinérgicos (B) en neuronas de hipocampo envejecidas	170
Figura 86. Expresión diferencial de la superfamilia de los TRP en neuronas de hipocampo envejecidas	171
Figura 87. Expresión diferencial de los genes implicados en SOCE (A) y sus reguladores (B y C) en neuronas de hipocampo envejecidas frente a neuronas jóvenes	172
Figura 88. Expresión diferencial de los genes implicados en el transporte de Ca ²⁺ del RE (A) y la mitocondria (B) en neuronas de hipocampo envejecidas	173
Figura 89. Perfiles de Expresión	174
Figura 90. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes	176
Figura 91. Diseño experimental para el estudio transcriptómico del efecto de A β ₁₋₄₂ en neuronas de hipocampo envejecidas	177
Figura 92. ACP de las muestras de cultivos de hipocampo envejecidas control y expuestas al tratamiento con los oligómeros de A β	178
Figura 93. Expresión diferencial de los genes que codifican para los diferentes mecanismos de transporte de Ca ²⁺ de la MP neuronas envejecidas de hipocampo tratadas con A β ₁₋₄₂	180
Figura 94. Expresión diferencial de los genes de la superfamilia de los TRP en neuronas envejecidas de hipocampo tratadas con A β ₁₋₄₂	181
Figura 95. Expresión diferencial de los genes que codifican para proteínas implicadas en SOCE (A, B, C) y en el transporte de Ca ²⁺ en el RE (D) y la Mitocondria (E) en neuronas envejecidas de hipocampo tratadas con A β ₁₋₄₂	182
Figura 96. Cultivos primarios de tumores cerebrales humanos	185
Figura 97. Respuesta del Ca ²⁺ a diferentes agonistas en cultivos celulares de diferentes tumores cerebrales humanos	186
Figura 98. Niveles basales de [Ca ²⁺] _{cit} en cultivos primarios de tumores cerebrales	187
Figura 99. Efectos del agonista ATP sobre la señal de Ca ²⁺ en células de diferentes tumores cerebrales humanos	188
Figura 100. Entrada de Ca ²⁺ a través de los VOCC en diferentes cultivos de tumores cerebrales humanos	190
Figura 101. SOCE es diferente en los distintos cultivos de tumores cerebrales	192

Figura 102. Respuesta del Ca^{2+} a ATP, K^+ y SOCE es diferente en los gliomas..	193
Figura 103. Efecto de eliminar el Na^+ y el FCCP sobre SOCE en cultivos de ODG y GBM.....	194
Figura 104. Incremento de Ca^{2+} y área bajo la curva de SOCE en un medio libre de Na^+ y/o FCCP.	195
Figura 105. Efecto del BTP2 y el FCCP en la proliferación de células de GBM.I.	196
Figura 106. Nivel de expresión de los genes que codifican para proteínas localizadas en la MP e implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en cultivos primarios de GBM humanos.....	197
Figura 107. Nivel de expresión de los genes que codifican para los miembros de la superfamilia TRP en cultivos primarios de GBM humanos	198
Figura 108. Nivel de expresión de los genes que codifican para las bombas de Ca^{2+} de la MP, RE y lisosomas, e intercambiadores NCX de la MP en cultivos primarios de GBM humanos...	199
Figura 109. Nivel de expresión de los genes que codifican para proteínas implicadas en SOCE y sus reguladores en cultivos primarios de GBM humanos.....	200
Figura 110. Nivel de expresión de los genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte de Ca^{2+} localizadas en el RE y la mitocondria en cultivos primarios de GBM humanos.....	201
Figura 111. Imágenes representativas de cultivos primarios de GBM y áreas peritumorales..	202
Figura 112. Registro en célula única del tamaño de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} en cultivos primarios de GBM y áreas peritumorales.	203
Figura 113. Registro en célula única de SOCE en cultivos primarios de GBM y áreas peritumorales.....	204
Figura 114. Caracterización de la señal de Ca^{2+} en respuesta ATP en cultivos de GBM y áreas peritumorales.	205
Figura 115. Nivel de expresión de los genes que codifican para VOCCs en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales.....	206
Figura 116. Nivel de expresión de los genes que codifican para receptores purinérgicos en cultivos primarios de GBM humanos y muestras pareadas tumorales y peritumorales	207
Figura 117. Nivel de expresión de la superfamilia de canales TRP en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales.....	209
Figura 118. Nivel de expresión de los genes que codifican para las bombas de Ca^{2+} de la MP, RE y lisosomas, e intercambiadores NCX de la MP en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales.	210
Figura 119. Nivel de expresión de los genes que codifican para proteínas implicadas en SOCE y sus reguladores en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales	211
Figura 120. Nivel de expresión de los genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte de Ca^{2+} localizadas en el RE y la mitocondria en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales	212
Figura 121. Nivel de expresión de los genes del transporte de Ca^{2+} mitocondrial en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales	213
Figura 122. Diagramas de Veen de la expresión diferencial	215
Figura 123. Diagrama de Veen de la expresión diferencial de los genes implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular	216
Figura 124. Expresión diferencial de los VOCC en muestras de GBM y peritumorales	217
Figura 125. Expresión diferencial de bombas e intercambiadores en muestras de GBM y peritumorales.....	217

Figura 126. Expresión diferencial de los receptores purinérgicos en muestras de GBM y peritumorales	218
Figura 127. Expresión diferencial de genes que codifican para los canales TRP en muestras de GBM y peritumorales	219
Figura 128. Expresión diferencial de genes implicados en SOCE y sus reguladores en muestras de GBM y peritumorales	220
Figura 129. Expresión diferencial de genes implicados en el transporte de Ca^{2+} en la RE y la mitocondria en muestras de GBM y peritumorales	221
Figura 130. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes MsigDB CDB “GBM” vs. “ γ ” .	223
Figura 131. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes MsigDB CDB “ α ” vs. “ γ ”	224
Figura 132. Expresión diferencial de los genes implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en neuronas de hipocampo envejecidas vs. neuronas jóvenes	235
Figura 133. Expresión diferencial, entre las muestras de tejido de glioblastoma y áreas peritumorales, de los genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} intracelular.....	249

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación entre los tratamientos con anticuerpos monoclonales (inmunoterapia) y los fármacos aprobados.....	32
Tabla 2. Clasificación de los VOCC.....	64
Tabla 3. Resumen de material y reactivos.....	121
Tabla 4. Resumen de material y reactivos.....	122
Tabla 5. Medios utilizados para la obtención de cultivos celulares	123
Tabla 6. Medios utilizados para el registro de experimentos de imagen de fluorescencia	123
Tabla 7. Anticuerpos y diluciones usados para la identificación de neuronas y glías mediante Inmunofluorescencia.....	133
Tabla 8. Anticuerpos y diluciones empleados en la detección de las isoformas del IP ₃ R.	133
Tabla 9. Parámetros establecidos para el registro de caged IP ₃	134
Tabla 10. Parámetros de calidad de las muestras secuenciadas.....	148
Tabla 11. Resumen de los DEG en neuronas de hipocampo envejecidas	168
Tabla 12. Resumen del filtrado y del análisis de expresión diferencial general del efecto del A β en neuronas envejecidas.....	178
Tabla 13. Resumen de las muestras de tumores cerebrales humanos.....	185
Tabla 14. Características de las muestras de glioblastoma (astrocitoma grado 4) y áreas peritumorales.....	201
Tabla 15. Resumen de las muestras incluidas en el estudio de RNA-seq.	214
Tabla 16. Resumen de la expresión diferencial de los genes implicados en la homeostasis del Ca ²⁺ intracelular en muestras de GBM y peritumorales.....	222

RESUMEN

En esta tesis se ha investigado la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, tanto a nivel funcional como molecular, en un modelo *in vitro* de envejecimiento neuronal y una serie de tumores cerebrales.

En primer lugar, se han investigado los cambios en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en neuronas de hipocampo de rata neonatal cultivadas a corto (células jóvenes) y largo plazo (envejecidas *in vitro*), cultivadas en presencia y ausencia de los oligómeros del péptido β -amiloide (A β), la principal toxina de la enfermedad de Alzheimer. Los resultados muestran que la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) disminuye con el envejecimiento, especialmente en presencia de A β . Además, el agonista de SOCE, MDEB, aumenta SOCE en neuronas jóvenes, pero no en envejecidas. El envejecimiento neuronal disminuye el potencial mitocondrial y aumenta las especies reactivas de O_2 (ROS), efectos potenciados por los A β , y que podrían explicar la pérdida de SOCE y la falta de efecto de MDEB. Estudiamos también el papel del RE. Encontramos que el envejecimiento aumenta la colocalización RE-mitocondria y la expresión de receptores de IP_3 pero disminuye el porcentaje de neuronas que liberan Ca^{2+} en respuesta a IP_3 enjaulado. Paradójicamente, los A β aumentan el porcentaje neuronas que liberan Ca^{2+} en respuesta a IP_3 enjaulado. A nivel molecular, el análisis transcriptómico de los cultivos neuronales indica que el envejecimiento aumenta la expresión de *P2X4* y *5*, los receptores acetilcolina *mAChR1,2*, el receptor de kainato *Gluk4*, los canales *TRPM2* y *3*, las proteínas implicadas en SOCE *Stim1*, *Orai2*, *Saraf*, *Mbp*, *Septin4*, y los receptores intracelulares *IP3R1,2* y *RyR3*. En paralelo, el envejecimiento disminuye la expresión del canal tipo T *Cav2.2*, el receptor purinérgico *P2Y1*, los receptores de acetilcolina *mAChR3* y *nAChR α 7*, el canal *TRPML3*, las *septin2,7,9,10* y *11*, *RyR2* y los sistemas mitocondriales *Mcu*, *Micu2* y *Vdac1,2* y *3*. El tratamiento con los A β no produjo cambios significativos en el transcriptoma de las neuronas hipocámpales envejecidas.

En segundo lugar, se han estudiado la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en cultivos primarios de tumores cerebrales humanos benignos (meningiomas y neurinomas), gliomas (oligodendrogliomas, astrocitomas y glioblastomas) y metástasis cerebrales. Los resultados muestran que ATP aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en tumores cerebrales humanos malignos y metástasis, pero menos en tumores benignos y oligodendrogliomas. La despolarización induce entrada de Ca^{2+} en glioblastomas, pero no en el resto de los tumores. SOCE es elevada en tumores benignos, intermedia en gliomas y pequeña en metástasis cerebrales. Sin embargo, en los gliomas, hay una correlación positiva entre malignidad y SOCE. La despolarización mitocondrial inhibe SOCE en gliomas, pero no en oligodendrogliomas. La inhibición de SOCE inhibe la proliferación de las células de glioblastoma. Posteriormente llevamos a cabo un análisis transcriptómico en glioblastomas. Estos tumores expresan altos niveles de canales *Cav1.2*, *Cav1.3*, *Cav2.1*, *Cav3.1*, *Cav3.2*, receptores *P2X4,7*, *P2Y1,12*, canales *TRPC1*, *TRPV1*, *TRPM2,4,7*, *TRPML1* y *TRPP1,2*, bombas *PMCA1,2,4*, *SERCA2*, *SPCA1*, intercambiadores *NCX1,3*, proteínas responsables de SOCE *Orai1,2,3*, *Stim1,2*, *STIMATE*, *ORMDL3*, *SARAF*, *Septin2,3,4,5,6,7,8,9,10,11*, canales del RE *IP3R1,2* y *RyR3* y TODOS los sistemas de transporte mitocondriales. Estudios funcionales y moleculares en muestras pareadas de glioblastomas y zonas peritumorales revelaron diferencias en el Ca^{2+} de los depósitos y la respuesta a ATP, pero no SOCE en las muestras pareadas. El análisis de expresión diferencial reveló que los glioblastomas sobreexpresan 3 canales, *Cav3.2*, los canales *TRPC6* y *TRPV4*, e infraexpresan los canales *Cav1.4*, los receptores *P2X7* y *P2Y2,12,13*, los canales *TRPV3,5,6* y *TRPM6*, y los moduladores *SEPTIN4* y *MICU3*. El análisis transcriptómico global de grupos de genes indica un fuerte parecido transcriptómico entre los glioblastomas, los tumores de pulmón, mama y cáncer de cuello de útero. Estos resultados podrían aportar nuevas oportunidades para su tratamiento.

I. INTRODUCCIÓN

1 EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El sistema nervioso central (SNC) desempeña un papel fundamental en la coordinación y regulación de diferentes funciones corporales, tales como el procesamiento de la información recibida a través del sistema sensorial, la frecuencia cardíaca, la respiración o regular la temperatura corporal, así como el control de los pensamientos, emociones, comportamientos o de la conducta. A continuación, se describirán brevemente las partes más relevantes que componen el SNC y, en particular, el hipocampo.

1.1 Organización del sistema nervioso central

La primera división que puede hacerse del SNC es en la medula espinal y el cerebro:

- **MEDULA ESPINAL**

La medula espinal es una estructura larga y delgada situada en el interior de la columna vertebral. Esta funciona como vía de comunicación entre el cerebro y el resto del cuerpo, pues transmite señales sensoriales desde el cuerpo al cerebro y señales motoras desde el cerebro al cuerpo.

- **CEREBRO**

El cerebro es la piedra angular del SNC. Es un órgano altamente complejo el cual desempeña un papel esencial en una amplia gama de funciones corporales y cognitivas. Sus diferentes partes y estructuras trabajan de forma coordinada para el correcto mantenimiento de numerosas funciones como el pensamiento, la memoria y las emociones, entre otras. El cerebro se divide en dos hemisferios, el izquierdo y el derecho. Curiosamente, cada hemisferio controla el lado opuesto del cuerpo; sin embargo, además, cada uno de ellos se ha especializado en el control de ciertos procesos o funciones. Ejemplo de ello es el habla, controlada por el hemisferio izquierdo, así como la comprensión, la aritmética y la escritura. De hecho, es el dominante en el uso de las manos y el lenguaje en alrededor del 92 % de las personas. Por su parte, el hemisferio derecho se encarga de la creatividad, la capacidad espacial y las habilidades artísticas. Ambos hemisferios se comunican por un haz de fibras llamado cuerpo calloso.

A grandes rasgos, el cerebro consta de tres partes superficiales: el encéfalo, el cerebelo y el tronco cerebral (figura 1).

- **LA CORTEZA CEREBRAL**

Es la delgada capa exterior (entre 2- 4 mm de grosor) que recubre la superficie del cerebro la cual presenta una gran superficie debido a sus pliegues, compuesta por billones de neuronas interconectadas. Desempeña un papel esencial en una amplia variedad de funciones cognitivas, tales como el pensamiento, la memoria, el razonamiento o la toma de decisiones. También está involucrada en el procesamiento de la información sensorial. La corteza cerebral esta interconectada con otras áreas del cerebro mediante complejas redes neuronales las cuales permiten la comunicación y la integración de información proveniente de diferentes partes del cerebro. Se caracteriza por tener una gran plasticidad, lo que conlleva, entre otras cosas, que tras una lesión cerebral tenga lugar una recuperación de las funciones dañadas. La corteza cerebral se divide en cuatro lóbulos:

- *Lóbulo Frontal*: asociado con el control motor, las funciones ejecutivas (como la planificación y el juicio) y la personalidad.

- *Lóbulo Parietal*: responsable de la percepción sensorial, el procesamiento espacial y la integración de información sensorial.
- *Lóbulo Temporal*: implicado en la audición, la memoria y algunas funciones lingüísticas.
- *Lóbulo Occipital*: relacionado con el procesamiento visual.

○ CEREBELO

Estructura cerebral relativamente pequeña ubicada en la parte posterior e inferior del cerebro, por debajo de los lóbulos temporal y occipital y por encima del tronco encefálico. Esta estructura está altamente interconectada con otras áreas del cerebro a través de las que transmite y recibe información sobre el movimiento. Cabe destacar que, a pesar de su tamaño, este supone el 10 % del volumen total del cerebro. En cuanto a su función, tiene un papel fundamental en la coordinación del movimiento y en el mantenimiento de la postura y el equilibrio; es decir, en la propiocepción. También está implicado en algunas funciones cognitivas, tales como la planificación y el aprendizaje motor. Está formado por dos hemisferios conectados por una estructura llamada vermis.

○ TRONCO ENCEFÁLICO

Es la parte inferior del cerebro y anterior del encéfalo la cual conecta el cerebro con la medula espinal. En él se distinguen tres partes fundamentales, cada una de ellas con ciertas funciones específicas: el bulbo raquídeo, la protuberancia y el mesencéfalo. A grandes rasgos, el tronco encefálico controla funciones vitales como la respiración, la frecuencia cardíaca y la regulación de la temperatura corporal. Además, también controla reflejos vitales como la tos, el estornudo y la deglución. Cabe destacar que también alberga áreas implicadas en la conciencia y en la alerta, lo que le hace crucial para el estado de vigilia y sueño.

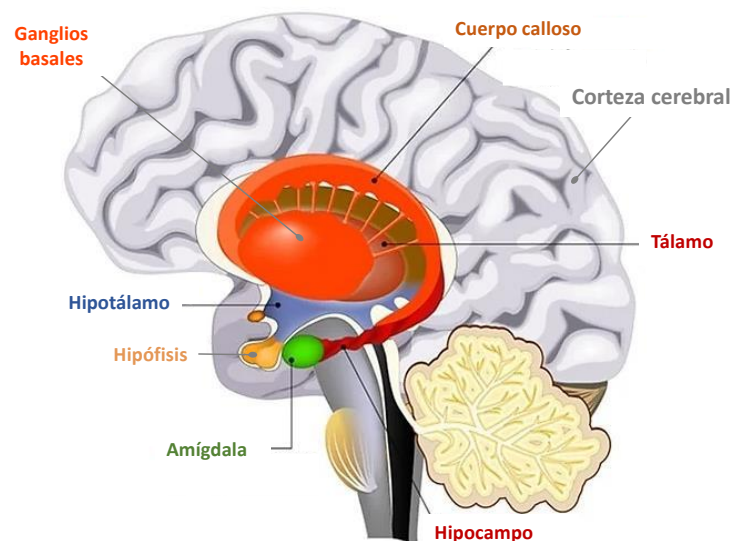


Figura 1. Partes del cerebro. En la imagen se muestra un esquema de las partes principales del cerebro.

Como ya se mencionó anteriormente, el cerebro es un órgano sumamente complejo. Tan es así que presenta otras muchas estructuras diferentes a las anteriormente mencionadas, regiones más profundas conocidas como estructuras subcorticales. De entre todas ellas, cabe mencionar

el hipotálamo, los ganglios basales, el cuerpo estriado, el sistema ventricular o el sistema límbico. Estas áreas se encuentran debajo de la corteza cerebral y desempeñan un papel esencial en múltiples funciones, desde la regulación de emociones, la coordinación del movimiento, hasta la toma de decisiones. Dado su papel central en gran parte de la presente tesis, debido a su implicación en los procesos de memoria y aprendizaje, así como por su asociación con el desarrollo de patologías, tales como demencia o la Enfermedad de Alzheimer (EA), en el siguiente apartado se hará especial mención al hipocampo, localizado en el sistema límbico.

1.2 El hipocampo

El hipocampo es una estructura cerebral que, a pesar de su tamaño relativamente pequeño, es de vital importancia pues esta, junto con la amígdala y el hipotálamo, constituye el sistema límbico. Se localiza en la parte interior del lóbulo temporal, abarcando desde el hipotálamo hasta la amígdala. Además, cabe destacar que cada encéfalo tiene dos hipocampos, uno por cada hemisferio del cerebro, los cuales, mediante complejos circuitos, están interconectados con otras áreas del cerebro como la corteza cerebral, el hipotálamo y la amígdala.

El hipocampo tiene un papel clave en la formación y consolidación de la memoria, especialmente de la memoria espacial y de la memoria episódica -la memoria de eventos y experiencias específicas-. Además, también se relaciona con la orientación y el modo en el que percibimos el espacio. Por lo tanto, el hipocampo es una pieza clave del cerebro y, en particular, del lóbulo temporal en los procesos de aprendizaje y memoria.

En cuanto a su estructura, presenta una morfología enrollada que se asemeja a un caballito de mar, hecho que dio origen a su nombre (hipocampo del griego “caballo de mar”). Consta de una parte anterior denominada giro dentado y una parte posterior llamada campo de *Ammon* (CA) (**Figura 2**). Esta última, que es la más grande, se divide en varias subregiones, donde cada una de ellas posee funciones específicas: CA1, CA2, CA3 y CA4. Entre las funciones del hipocampo destacan:

- **Memoria espacial:** desempeña un papel crítico en la memoria espacial lo que permite a las personas recordar lugares y rutas. Este aspecto de la memoria es fundamental para la navegación espacial y la orientación. De hecho, como curiosidad, los taxistas londinenses han mostrado un aumento en el tamaño de esta estructura. Esto se debe al riguroso proceso de entrenamiento conocido como "*The Knowledge*" por el cual se "enseña" a los taxistas a memorizar el intrincado mapa de las calles de Londres, incluyendo miles de sitios de interés y posibles rutas con el fin de actuar como una especie de *Google Maps* y encontrar la mejor ruta para ir del punto A al B.
- **Memoria episódica:** es la memoria implicada en recordar eventos y experiencias específicas de la vida la cual permite recordar detalles y contextos temporales de experiencias pasadas.
- **Aprendizaje:** se ocupa de la adquisición de nuevos conocimientos y habilidades al integrar información sensorial y contextual.
- **Transferencia de memoria a largo plazo:** el hipocampo actúa como un intermediario entre la memoria a corto y largo plazo.

El hipocampo es una de las regiones del cerebro con mayor plasticidad neuronal, lo que significa que puede adaptarse y cambiar en respuesta a la experiencia y aprendizaje. Además, es vulnerable a situaciones de estrés y a la falta de sueño, lo que puede afectar a la memoria.

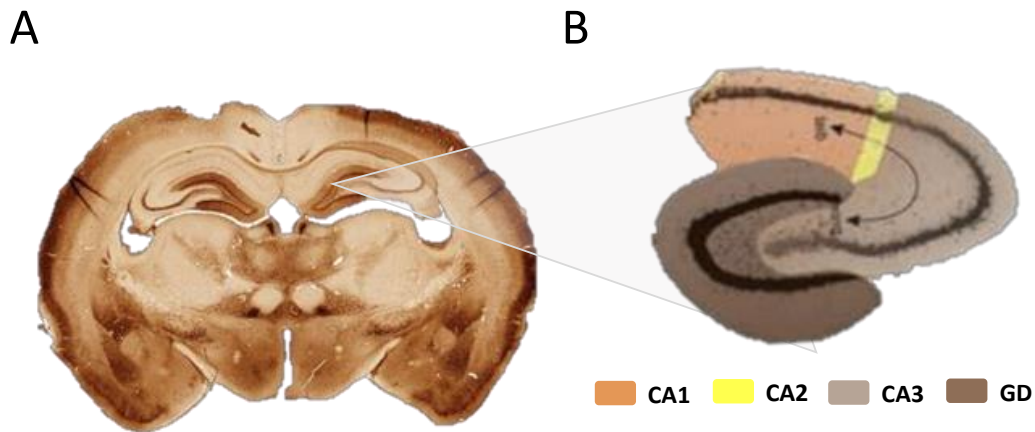


Figura 2. Imágenes del atlas del hipocampo de rata. A. Imagen de cerebro de rata en el que se observan las estructuras teñidas con calbindina. Las segmentaciones anatómicas del hipocampo se obtienen con una superposición gráfica codificada por colores B. Muestra la región del hipocampo amplificada donde se identifica cada región. CA1: en naranja, CA2: amarillo; CA3: marrón claro; GD: marrón oscuro. CA: cuerpo de Ammon; GD: giro dentado. Modificado de (Kjonigsen et al., 2011).

Dado que su función principal es la generación y recuperación de recuerdos, el hipocampo juega un papel muy importante en la consolidación del aprendizaje. Por un lado, permite almacenar información a largo plazo y, por otro lado, vincula estos aprendizajes con emociones. En consecuencia, alteraciones en esta región se relacionan con la aparición de ciertas patologías, tales como la demencia o las enfermedades neurodegenerativas en las que su función puede verse comprometida. De hecho, las personas que las sufren ven disminuida su capacidad para formar nuevos recuerdos o recordar informaciones más recientes. Sin embargo, aunque el hipocampo esté dañado, los recuerdos más antiguos y relevantes tardan mucho en desaparecer, lo que parece indicar que los recuerdos más antiguos y relevantes, con el tiempo, se van desvinculando del hipocampo y, quizás, consolidándose en otras regiones como si de una copia de seguridad se tratase.

2 ENVEJECIMIENTO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El envejecimiento provoca una serie de cambios en el cerebro a nivel físico, cognitivo y funcional. Uno de los cambios físicos más llamativo es la disminución del volumen cerebral. En concreto, el cerebro puede llegar a disminuir su volumen en torno al 5 % por década a partir de los 40 años, tasa que aumenta a partir de los 70 años. Esto se debe, en parte, a la disminución del número de neuronas y a cambios en su estructura, cambios como la disminución del número y la calidad de dendritas, lo que conduce a una reducción en la densidad de las conexiones sinápticas y de la plasticidad sináptica. A su vez, estos cambios disminuyen la capacidad para mantener la atención y la concentración lo cual afecta de forma negativa a la memoria episódica y a la memoria a corto plazo, lo que conlleva su deterioro. De hecho, la aparición de demencia y pérdida de memoria son los cambios cognitivos más observados con el envejecimiento, aunque no los únicos. Otro cambio estructural que tiene lugar son las alteraciones en la vasculatura cerebral, alteración que incrementa el riesgo de accidente cerebrovascular con la edad.

Los cambios estructurales no son los únicos culpables del deterioro de las funciones del hipocampo. De hecho, la disminución del rendimiento cognitivo se asocia con un menor nivel de neurotransmisores, tales como la dopamina, la serotonina y las hormonas sexuales, lo que se hace más evidente en mujeres postmenopáusicas debido a los cambios hormonales que tienen lugar en dicha etapa. Otros factores que se han

relacionado con el envejecimiento del cerebro son la desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, la disfunción mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, pueden aparecer depósitos anormales de proteínas como ovillos neurofibrilares (NFT) y placas β -amiloide los cuales se relacionan con la EA. Sin embargo, estos cambios no son uniformes en todas las regiones del cerebro, siendo más notorios en áreas específicas, como las áreas prefrontales, que desempeñan funciones ejecutivas, y el hipocampo, que, como ya hemos mencionado anteriormente, está involucrado en la memoria.

2.1 Envejecimiento fisiológico cerebral

El envejecimiento es un proceso natural, continuo, universal e irreversible por el cual los organismos vivos sufren una serie de alteraciones morfológicas y fisiológicas de forma gradual como consecuencia de la acción del tiempo y de múltiples factores. Los cambios experimentados a nivel molecular, celular y orgánico conllevan un deterioro de los procesos fisiológicos y una disminución de las capacidades cognitivas. Además, el envejecimiento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas como la artritis, la diabetes o enfermedades neurodegenerativas, tales como la EA, etc (Figura 3).

Durante el proceso de envejecimiento, el organismo sufre una serie de cambios anatómicos y fisiológicos en todos los sistemas del cuerpo, algunos de los cuales se recogen a continuación.

a) Efectos sobre los sistemas sensoriales:

- Disminución de la agudeza visual y de la visión periférica que conlleva la aparición de presbicia, miopía o cataratas.
- Pérdida progresiva de la audición (hipoacusia), sobre todo de los sonidos agudos.
- Disminución de la propiocepción de la planta de los pies.
- Disminución de la sensibilidad para discriminar los sabores salados, dulces y ácidos debido al deterioro de las papilas gustativas.
- Disminución de la capacidad sensorial del tacto. De hecho, se producen cambios en la piel que se aprecian a simple vista, tales como la aparición de arrugas, manchas, flacidez o sequedad. Estos cambios se producen como consecuencia de la disminución de la producción de colágeno y a la pérdida de grasa subcutánea y de masa muscular.

b) Efectos sobre el sistema osteoarticular:

- Disminución del cartílago de las articulaciones.
- Aparición de calcificaciones ligamentosas y tendinosas.

c) Efectos sobre la estructura muscular y sistema esquelético:

- Pérdida progresiva de masa muscular y atrofia de las fibras musculares, pues disminuyen en peso, número y diámetro, fenómeno conocido como sarcopenia. En consecuencia, se produce un deterioro de la fuerza muscular.
- Disminución de la masa esquelética, osteoporosis, ya que los huesos se vuelven más porosos. Además, debido a la desmineralización que sufren, se vuelven más frágiles y, por ende, más vulnerables a la fractura.
- Aumento de la rigidez articular debido a la degeneración de los cartílagos, tendones y ligamentos.

d) *Efectos sobre el sistema cardiovascular:*

- Pérdida de la capacidad de contracción del corazón debido al endurecimiento de sus fibras musculares como consecuencia de un aumento del tamaño del ventrículo izquierdo, a la mayor cantidad de grasa acumulada a su alrededor y a alteraciones del colágeno.
- Pérdida de elasticidad y estrechamiento de los vasos sanguíneos debido al aumento del grosor y a la acumulación de lípidos en las paredes de los vasos (aterosclerosis) que dificulta el paso de la sangre.
- Engrosamiento y pérdida de flexibilidad de las válvulas cardíacas, lo que provoca que necesiten más tiempo para cerrarse.

e) *Efectos en el sistema respiratorio:*

- Disminución del rendimiento del sistema respiratorio como consecuencia de la atrofia y debilitamiento de los músculos intercostales, cambios esqueléticos y deterioro de los bronquios. Estos cambios se traducen en una disminución del contenido en sangre, entre el 10-15 %, lo que puede conllevar la aparición de enfermedades respiratorias.

f) *Efectos en el sistema excretor:*

- Disminución de la capacidad del riñón para eliminar los productos de desecho.

g) *Efectos en el sistema digestivo:*

- Reducción de la capacidad para secretar enzimas digestivas y disminución de los movimientos esofágicos (contracción/relajación), lo que dificulta la deglución y la digestión.
- Disminución del tono muscular y del peristaltismo del intestino, lo que provoca estreñimiento.

h) *Efectos sobre el sistema nervioso:*

- Pérdida neuronal y disminución de las conexiones neuronales, lo que conlleva el enlentecimiento de las transmisiones sinápticas.
- Degeneración axonal.

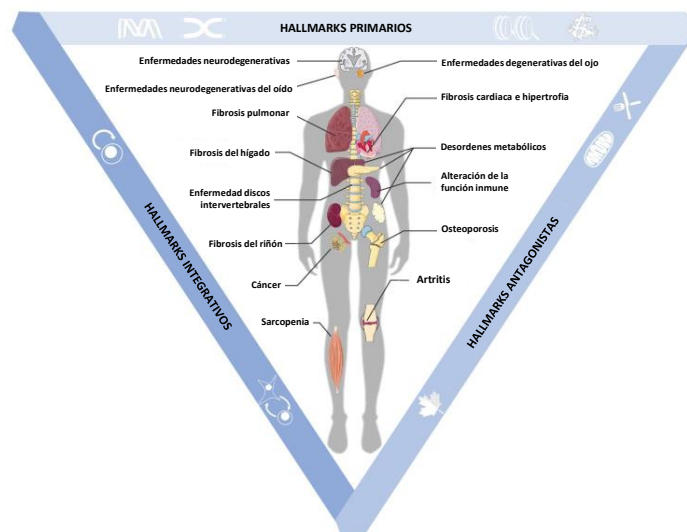


Figura 3. Envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad. El envejecimiento se caracteriza por una pérdida progresiva de las funciones biológicas ligada a la aparición y acumulación de daños moleculares y celulares que tienen lugar a lo largo de toda la vida. El conjunto de alteraciones tanto moleculares como celulares se recogen en los *hallmarks* del envejecimiento, características que, además, son la causa de numerosas patologías asociadas con la edad que afectan a todo el cuerpo. Modificado de (Alle et al., 2021).

La práctica de hábitos saludables como la actividad física regular, llevar una dieta equilibrada, evitar el consumo de tabaco y de alcohol, así como el esfuerzo cognitivo que ayuda a combatir el deterioro cognitivo, son factores protectores para el cerebro que, además, se relacionan con una mejora de la calidad de vida y mayor longevidad. A su vez, son hábitos coadyuvantes para la prevención de enfermedades cardiovasculares.

A pesar de todas las alteraciones y del incremento en la prevalencia e incidencia de muchas enfermedades crónicas y neurodegenerativas que se producen con el envejecimiento, en la actualidad, la vejez, por sí sola, no constituye una enfermedad. Sin embargo, dado que se trata de un fenómeno inevitable, sumado al descenso continuo de la natalidad y a un aumento de la esperanza de vida, supone un grave problema socioeconómico. Esto ha hecho que se hallan postulado alrededor de 300 teorías del envejecimiento las cuales intentan elucidar sus causas. Algunas de estas teorías tienen una perspectiva biológica y fisiológica, otras psicosocial, etc. No obstante, la mayoría de las teorías tienen algunos puntos en común, tales como la interrelación de factores genéticos y ambientales. La gran heterogeneidad genética de las especies y, sobre todo, la del ser humano junto con los factores ambientales ha dificultado establecer conclusiones respecto al proceso del envejecimiento.

Por todo ello, con el fin de entender los mecanismos moleculares que subyacen al envejecimiento e identificar sus moduladores, se han llevado a cabo numerosos estudios en diferentes organismos como *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*), moscas y mamíferos. Estos estudios han permitido identificar que las vías de señalización y moduladores del envejecimiento se conservan entre especies. En concreto, se han descrito hasta doce marcadores moleculares y alteraciones celulares que tienen lugar durante el envejecimiento, denominados *Hallmarks* del envejecimiento.

2.2 *Hallmarks* del envejecimiento

En 2013, López-Otín (López-Otín et al., 2013) propuso nueve *hallmarks* o sellos celulares y moleculares que contribuyen al proceso de envejecimiento y que determinan su fenotipo. Sin embargo, en 2023 estos se reorganizaron y ampliaron hasta un total de 12 (López-Otín et al., 2023a) los cuales se agrupan en tres categorías: primaria, antagónica e integradora (Figura 4). Entre los primarios, se incluyen la inestabilidad genómica, el acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, la pérdida de proteostasis y la macroautofagia desactivada. Los antagónicos engloban a la detección desregulada de nutrientes, la disfunción mitocondrial y senescencia celular. Por último, en la categoría integrativa se recogen el agotamiento de las células madre, la comunicación intercelular alterada, la inflamación crónica y la disbiosis. Para que estas características se consideren sellos o *hallmarks* del envejecimiento deben cumplir tres características clave: i) aparecen durante el envejecimiento normal ii) su agravamiento experimental debería acelerar el envejecimiento iii) por el contrario, su “reparación” debería, o al menos dar la oportunidad, de desacelerar, detener o revertir el envejecimiento normal y, por tanto, aumentar la calidad y/o esperanza de vida.

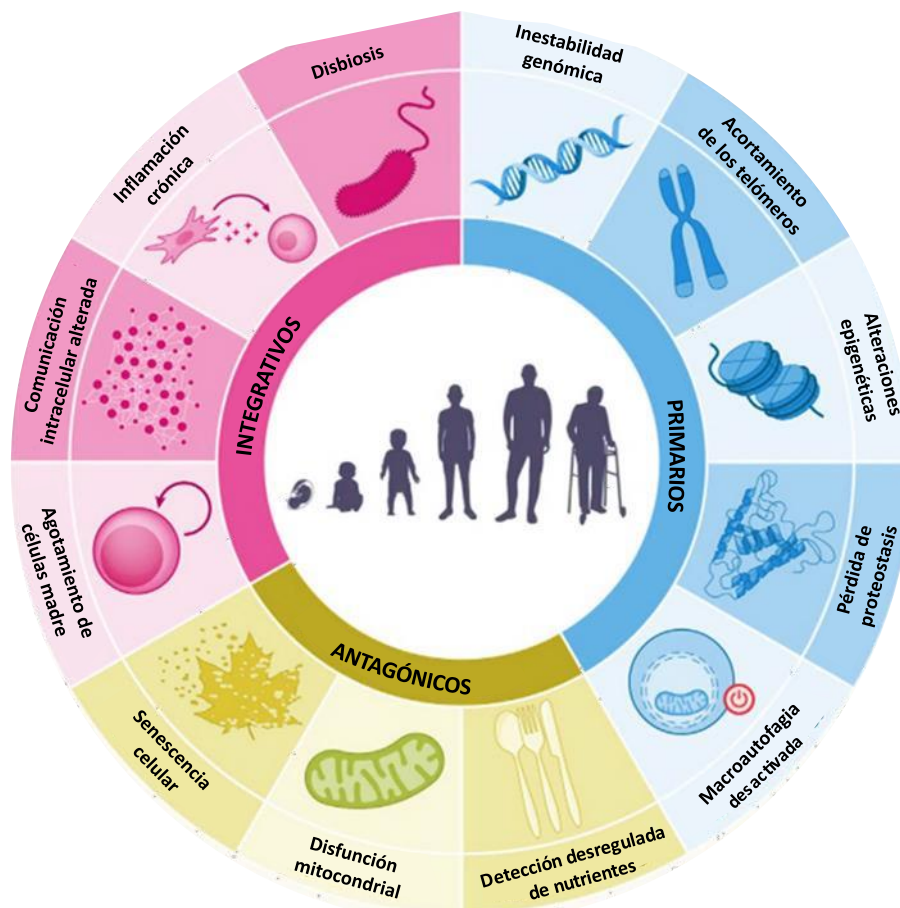


Figura 4. Sellos o *Hallmarks* del envejecimiento. En este esquema se representan las 12 características del envejecimiento agrupados en tres categorías: (1) *características primarias*: inestabilidad genómica, acortamiento de los telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de proteostasis y macroautofagia desactivada (2) *características antagónicas*: detección desregulada de nutrientes, disfunción mitocondrial y senescencia celular (3) *características integradoras*: agotamiento de células madre, comunicación intercelular alterada, inflamación crónica y disbiosis. Modificado de (López-Otín et al., 2023b).

A continuación, en los siguientes apartados, se van a describir cada uno de estos *Hallmarks*.

1) Inestabilidad genómica

La acumulación de daño genético es una de las características más comunes del envejecimiento. La exposición a factores físicos, químicos y biológicos externos como la radiación ultravioleta (UV) o infrarroja (IR), así como a factores endógenos como errores en la replicación del ADN, radiaciones hidrolíticas espontáneas o la acumulación de ROS, afectan a la integridad y estabilidad del ADN (Hoeijmakers, 2009). El daño genético puede provocar mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones, acortamiento de los telómeros, reordenamientos cromosómicos y alteraciones genéticas causadas por la integración de virus o transposones. A su vez, todas estas alteraciones moleculares pueden contribuir tanto al envejecimiento normal como patológico. En consecuencia, con el fin de minimizar estas lesiones, los organismos han desarrollado una compleja red de mecanismos de reparación y mantenimiento del ADN los cuales pierden eficiencia con la edad. Todo esto acentúa la acumulación de daño genómico y, por lo tanto, favorece la aparición de diferentes patologías como el cáncer.

Estudios con muestras de cerebro humano y de roedores han encontrado evidencias de que, durante el envejecimiento, aumenta el daño genómico nuclear y mitocondrial a la par que

disminuye la capacidad de reparación del ADN. De hecho, la acumulación del daño genómico es más notoria en neuronas envejecidas ya que la actividad sináptica produce más ROS lo que a su vez provoca más daño. Estas alteraciones observadas en cerebros sanos consecuencia del envejecimiento también se han observado en cerebros con patologías, pero de una forma más severa. De hecho, en cerebros humanos con EA el daño genómico es más evidente y conlleva la muerte de un gran número de neuronas. Cabe destacar que la inestabilidad genómica es una de las causas del daño cognitivo asociado al envejecimiento. La acumulación de daño genómico conlleva fallos en la reparación del ADN lo que, a su vez, induce neurodegeneración. Además, el daño en el ADN afecta a la función de las proteínas, hecho que favorece aún más la aparición de condiciones patológicas y a la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

2) Acortamiento de los telómeros

Los telómeros son una de las zonas más susceptibles al deterioro relacionado con la edad, pues, en cada replicación, el telómero se acorta y, en consecuencia, tras varias rondas de división celular, los telómeros sufren un acortamiento sustancial que induce inestabilidad genómica y que, finalmente, conduce a la senescencia celular o apoptosis. No obstante, hay que mencionar que existe una enzima, la ADN telomerasa, que es una ribonucleoproteína especializada en la replicación de los extremos terminales o regiones teloméricas de las moléculas de ADN que se encarga de alargar los telómeros con el fin de mantener una longitud adecuada. Por lo tanto, estos efectos nocivos pueden prevenirse mediante la acción de esta enzima. Sin embargo, la mayoría de las células somáticas no expresan dicha enzima, lo que conlleva el inevitable acortamiento de los telómeros. Cabe destacar que los telómeros no solo se acortan de forma progresiva por ausencia de telomerasa, sino que, además, en presencia de esta, el daño exógeno de los telómeros se vuelve invisible para la maquinaria de reparación del ADN debido a la formación de complejos de nucleoproteína conocidos como refugios. Por lo tanto, el daño en los telómeros es un daño persistente que conduce a efectos nocivos celulares, tales como la senescencia o la apoptosis (Fumagalli et al., 2012; Hewitt et al., 2012). No obstante, cabe destacar que la deficiencia de telomerasa en humanos también se relaciona con el desarrollo prematuro de enfermedades, tales como la fibrosis pulmonar o anemia aplásica las cuales implican la pérdida de la capacidad regenerativa de diversos tejidos (Alder & Armanios, 2022).

Evidentemente, el acortamiento de los telómeros durante un envejecimiento se ha observado en muchas otras especies diferentes a la humana, incluidos roedores. La tasa de desgaste de los telómeros viene influenciada por la edad, las variantes genéticas, el estilo de vida y los factores sociales. Diferentes experimentos en estas especies han arrojado luz al respecto. Por ejemplo, ratones con telómeros acortados o alargados exhiben una esperanza de vida disminuida o aumentada, respectivamente (Tomás-Loba et al., 2008). Otros estudios han demostrado que el envejecimiento prematuro de los ratones deficientes en telomerasa puede revertirse cuando esta se reactiva genéticamente (Jaskelioff et al., 2010). También se ha visto que el envejecimiento normal puede retrasarse en ratones mediante la activación farmacológica de la telomerasa (Bernardes de Jesus et al., 2012). Por lo tanto, la telomerasa es una diana clave que podría jugar un papel fundamental en la modulación del envejecimiento mediante la activación de esta.

1) Alteraciones epigenéticas

Las alteraciones epigenéticas producen cambios en la actividad genética que no implican cambios en la secuencia del ADN pero que, igualmente, pueden tener un impacto significativo en la función celular. La mayor parte de los cambios epigenéticos que contribuyen al envejecimiento implican alteraciones en los patrones de metilación del ADN (generalmente en

las regiones ricas en citosina y guanina), modificaciones postraduccionales de histonas, remodelación de la cromatina y función desregulada de los ARN no codificantes. Los cambios en los patrones de metilación, tanto hipermetilación como hipometilación, pueden afectar a regiones promotoras del gen y, en consecuencia, pueden reducir o activar, respectivamente, la expresión del gen y, por ende, de su producto final, la proteína. En cuanto a la modificación postraduccional de histonas, como la acetilación, la metilación o la fosforilación, pueden afectar a la compactación del ADN y, por lo tanto, a la accesibilidad de los genes. Por ejemplo, la acetilación de histonas tiende a estar asociada con la activación de genes, mientras que la metilación puede ser tanto activadora como represora. Estos cambios también pueden implicar, además, la remodelación de la cromatina. Una cromatina más condensada (heterocromatina), generalmente, silencia la expresión génica, mientras que una cromatina distendida (eucromatina) permite la expresión génica. Respecto al papel de los ARN no codificantes, moléculas de ARN que no codifican para proteínas, tales como los microARN, estos pueden unirse a las secuencias de ARN mensajero y degradarlos o inhibir su traducción, lo que conlleva una disminución de su producto final. Por último, factores ambientales como la exposición a toxinas, el estrés o el estilo de vida pueden influir en la aparición de alteraciones genéticas.

2) Pérdida de la proteostasis

El envejecimiento y algunas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como la EA, Enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), se asocian con una alteración de la homeostasis de las proteínas o proteostasis. Esto conlleva la acumulación de proteínas mal plegadas, oxidadas, glicadas o ubiquitiniladas que, a menudo, forman agregados como placas amiloides extracelulares.

A tal efecto, las células disponen de mecanismos de control para preservar la estabilidad y funcionalidad de las proteínas. Entre estos mecanismos destacan la estabilización de proteínas plegadas y los mecanismos de degradación de proteínas por el proteosoma o el lisosoma. Además, existen reguladores de la proteotoxicidad asociada con la edad, como MOAG-4. Estos mecanismos funcionan de forma coordinada para restaurar la estructura de péptidos mal plegados degradándolos y eliminándolos. De esta forma, se evita la acumulación de componentes dañinos y se asegura la renovación continua de proteínas intracelulares. Sin embargo, estos mecanismos de control de calidad pueden fallar como consecuencia de la función reducida de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) o cuando los mecanismos de degradación como el proteosoma o el lisosoma se ven comprometidos.

Muchos estudios han demostrado que, durante el envejecimiento, se produce una alteración de la proteostasis que acelera el envejecimiento. Por ejemplo, alimentar a la *Drosophila melanogaster* con productos finales de glicación o lipofuscina (agregado de proteínas, azúcares y lípidos entrecruzados covalentemente) provoca la acumulación de proteínas dañadas y reduce la esperanza de vida (Tsakiri et al., 2013). Por el contrario, la mejora experimental de la proteostasis puede retrasar el envejecimiento. La aplicación intranasal de la proteína HSP70 humana recombinante a ratones es capaz de mejorar la actividad del proteosoma, lo que reduce los niveles de lipofuscina en el cerebro y mejora las funciones cognitivas (Bobkova et al., 2015).

Además, enfermedades neurodegenerativas como ELA o EA pueden ser causadas por mutaciones en proteínas que las hacen intrínsecamente propensas al mal plegamiento y a la agregación, lo que satura los mecanismos de reparación, eliminación y renovación para el mantenimiento de la salud (López-Otín & Kroemer, 2021).

3) Macroautofagia desactivada

La autofagia o macroautofagia implica el secuestro de material citoplasmático en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas las cuales, a continuación, se fusionan con lisosomas para la digestión de contenido luminal. Mediante la autofagia se eliminan tanto proteínas mal plegadas como macromoléculas no proteicas, tales como ADN citosólico ectópico o vesículas lipídicas, así como orgánulos completos (mitocondrias disfuncionales, proceso conocido como mitofagia) o patógenos invasores. No obstante, en la vejez, la renovación de orgánulos se ve alterada debido a una disminución de la autofagia relacionada. En concreto, en humanos, se ha observado la disminución de genes relacionados con la autofagia, como *ATG5*, *ATG7* y *BECN1*. Además, la reducción de la autofagia, a su vez, se ha relacionado con la acumulación de proteínas y orgánulos disfuncionales, con la reducción de la eliminación de patógenos y con un aumento de la inflamación (Deretic & Kroemer, 2022).

En cuanto al efecto de modificaciones genéticas que inducen la inhibición de la autofagia, se ha visto que aceleran el proceso del envejecimiento en organismos modelo. Por ejemplo, la doxiciclina induce una disminución de la autofagia provocando la degeneración prematura y senescencia lo que conduce a una muerte prematura. Además, los modelos de inhibición transitoria de autofagia conllevan un aumento de la incidencia de neoplasias malignas. Por lo tanto, puede proponerse a la autofagia como un mecanismo supresor de tumores. En humanos, mutaciones en genes que regulan la autofagia se han relacionado con la aparición de diversas enfermedades, como trastornos cardiovasculares, infecciosos y neurodegenerativos (Klionsky et al., 2021). Por el contrario, el proceso de estimulación de la autofagia aumenta la esperanza y la calidad de vida. De hecho, en roedores, la sobreexpresión transgénica de *Atg5* prolonga la vida útil y mejora la salud metabólica y la función motora (Pyo et al., 2013).

4) Detección de nutrientes desregulada

La red de detección de nutrientes es un mecanismo altamente conservado en la evolución la cual incluye ligandos extracelulares como la insulina o el factor de crecimiento similar a insulina (IGF), los receptores tirosina quinasas (TKR) con los cuales interactúan y desencadenan cascadas de señalización celular. Estas cascadas involucran las vías PI3K/AKT y Ras/MEK/ERK así como factores transcripción como FOXO y E26. Esta red constituye el eje regulador de la actividad celular, incluida la autofagia, la biogénesis de ARNm y ribosomas; la síntesis de proteínas, el metabolismo de la glucosa, los nucleótidos y los lípidos, la biogénesis mitocondrial y la actividad del proteosoma. La actividad de la red viene regulada por el estado nutricional y del estrés, lo que activa el anabolismo en presencia de nutrientes y de bajo estrés, mientras que, en respuesta al estrés y/o a la escasez de nutrientes, se inducen vías de defensa celular. Cabe destacar que la reducción genética de la actividad de los componentes de la red de detección de nutrientes aumenta la esperanza de vida y la salud en diversos modelos animales. La actividad reducida de la red de detección de nutrientes influye en numerosos procesos como la modulación del metabolismo, la resistencia a diversos factores estresantes, la activación de mecanismos de reparación, la estimulación de la autofagia o el control de la inflamación.

El eje somatotrófico constituye una cascada estimulante del crecimiento que, en última instancia, involucra a la hormona del crecimiento (GH) producida por la hipófisis. Esta actúa sobre el receptor de GH de los hepatocitos estimulando la secreción de IGF1 el cual promueve el crecimiento y desarrollo a través del receptor de IGF1, lo que estimula señales tróficas mediante la activación de PI3K-AKT y MTORC1. La disminución de las funciones de GH, del receptor de IGF1 o de efectores intercelulares como AKT, mTOR o FOXO se han relacionado con una mayor longevidad tanto en humanos como en organismos modelos.

Medicamentos anticancerígenos o para el tratamiento de enfermedades metabólicas que actúan sobre esta red de detección de nutrientes, como la rapamicina que actúa sobre el complejo MTORC1, son candidatos para prolongar la longevidad. No obstante, la dieta es uno de los objetivos más accesible para la intervención en el envejecimiento humano. La sobre-nutrición activa sensores de nutrientes intercelulares como MTORC1 y la acetiltransferasa EP300. A su vez, inhibe los sensores que detectan la escasez de nutrientes (AMK y las sirtuinas 1 y 3 -SIRT1 y 3-) y suprime reacciones catabólicas (entre ellas la glucogenólisis, proteólisis y lipólisis), lo que, a su vez, suprime las funciones adaptativas, como las respuestas celulares al estrés, la autofagia, la defensa antioxidante y la reparación del ADN. Por el contrario, protocolos como el ayuno u otras estrategias para restringir el aporte calórico pueden inhibir MTORC y EP300; activar AMPK y SIRT1 y SIRT3; estimular respuestas adaptativas del estrés celular mediante la supresión del eje somatotrófico, y aumentar la longevidad en múltiples modelos de estudio, incluidos los primates.

5) Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias no solo actúan como centrales eléctricas de la célula, sino como desencadenantes de la muerte celular. En el envejecimiento, la función mitocondrial se deteriora debido a múltiples mecanismos interrelacionados, incluida la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial y la desregulación en la homeostasis de proteínas que conducen a la desestabilización de la cadena respiratoria (aumentando así la fuga de electrones y reduciendo la generación de ATP) y de la dinámica mitocondrial (de fisión/fusión y defectos en la mitofagia) (Figura 5). El daño mitocondrial sostenido en el tiempo provoca una disminución del metabolismo energético, aumenta la producción de ROS, reduce la amortiguación de Ca^{2+} y puede desencadenar la permeabilización de las membranas mitocondriales lo que, finalmente, provoca la muerte celular (Amorim et al., 2022).

Por un lado, en respuesta al daño celular, se produce una acumulación excesiva de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial el cual es el desencadenante de la apertura del poro de transición mitocondrial (PTPm), el cual actúa como canal. La apertura de este origina un gradiente electroquímico de protones, lo que compromete el gradiente de potencial e induce cambios en el pH. El aumento de la permeabilidad de la membrana conlleva la acumulación de ROS, lo que resulta en un mayor estrés oxidativo. A su vez, la mayor producción de ROS induce la peroxidación de lípidos de la membrana provocando la destrucción de lípidos y daño tisular. En consecuencia, esto genera una disminución de ATP y, en última instancia, conduce a la activación de la apoptosis y a la muerte celular.

Por otro lado, el aumento de permeabilidad mitocondrial favorece la fuga de proteínas al citoplasma, incluido el citocromo C (CitC). Cuando este sale de la mitocondria, se une a la proteína factor 1 activador de la apoptosis (APAF-1), forman una estructura multimérica llamada apoptosoma y desencadena la cascada de caspasas. La activación de esta vía; en concreto, la activación de las caspasas-3,-6 y -7, favorece la escisión enzimática del ADN y fragmentación nuclear asociada con la apoptosis.

En cuanto a los procesos de fisión y fusión mitocondrial, estos están mediados por guanosina trifosfatasa (GTPasas). Respecto a la fusión de mitocondrias, este proceso permite que los componentes funcionales de una mitocondria sana puedan compensar los componentes disfuncionales de una mitocondria dañada. Sin embargo, la fisión favorece la autofagia mitocondrial, conocida como mitofagia.

Por lo tanto, la alteración de la función mitocondrial es perjudicial para la viabilidad celular. Sin embargo, son las neuronas las células más susceptibles al deterioro mitocondrial ya que requieren mucha energía para su funcionamiento. De hecho, existe una fuerte evidencia que correlaciona la degeneración y la disfunción mitocondrial. Se ha observado una disfunción mitocondrial en el envejecimiento fisiológico, así como en enfermedades neurodegenerativas y cáncer. Así, se ha propuesto que, durante el envejecimiento, las neuronas experimentan una serie de cambios estructurales y funcionales como fragmentación, despolarización de la membrana, deterioro en la cadena de transporte de electrones y acumulación de ROS. El mecanismo molecular subyacente a este deterioro mitocondrial es controvertido.

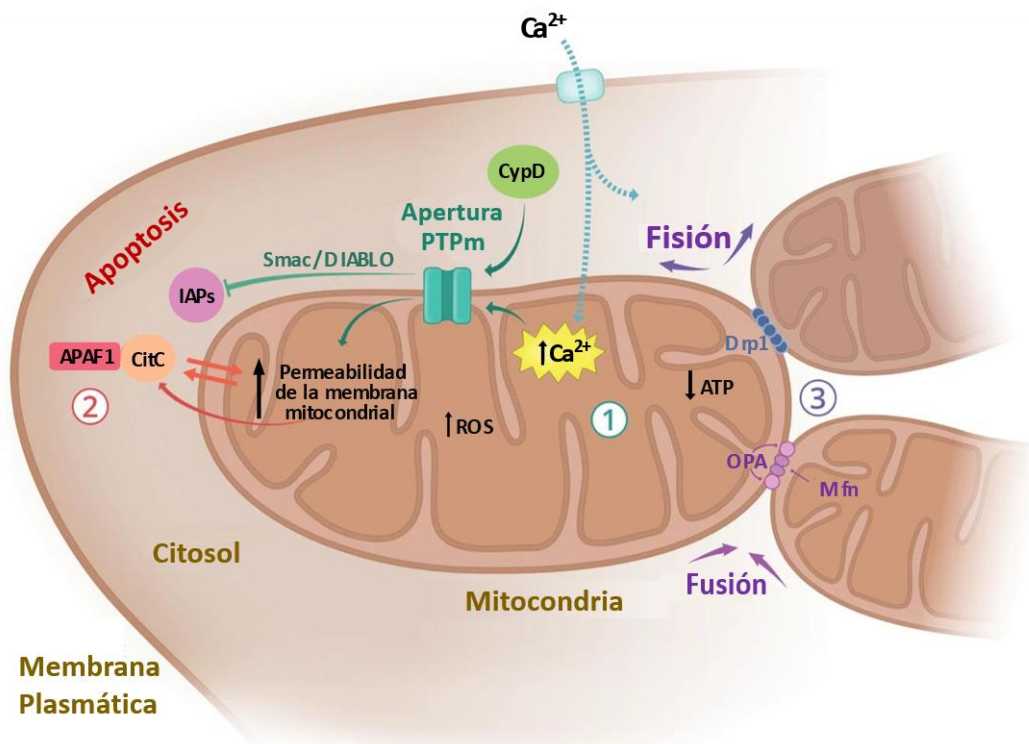


Figura 5. Disfunción mitocondrial en el envejecimiento. Las principales vías que conducen a la disfunción celular asociada a las mitocondrias son: (1) sobrecarga de Ca^{2+} en la matriz y apertura del PTPm (2) liberación de CitC y activación de la apoptosis y (3) defectos en la fisión y fusión mitocondrial que afectan la longevidad mitocondrial. APAF1: factor activador de proteasa apoptótica 1, ATP: trifosfato de adenosina, CitC: citocromo C, Drp1: proteína 1 relacionada con la dinamina, IAP: inhibidor IAP de las proteínas de la apoptosis, Mfn: mitofusina, PTPm: poro de transición de permeabilidad mitocondrial, OPA: proteína de fusión mitocondrial de atrofia óptica, ROS: especies reactivas de oxígeno, Smac/DIABLO: proteína mitocondrial proapoptótica. Modificado de (Norat et al., 2020).

6) Senescencia celular

La senescencia celular fue descrita en 1961 por Leonard Hayflick (Hayflick & Moorhead, 1961). Se define como una detención irreversible del ciclo celular como consecuencia de un daño agudo o crónico, como pueden ser el acortamiento de los telómeros, la acumulación de daño genómico, el estrés oxidativo o la disfunción mitocondrial. Así, cuando las células se vuelven senescentes, estas adquieren una serie de características entre las que destaca un aumento de la expresión de inhibidores dependientes de ciclinas (CDK) como p16 y/o p21. Además, estas células adquieren un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Este se caracteriza por un aumento en la secreción extracelular, la sobreproducción mitocondrial de ROS, la síntesis de

factores de crecimiento y la perturbación del sistema de autofagia-lisosomal el cual conlleva la expansión del contenido lisosomal, lo que aumenta la actividad de la β -galactosidasa (Figura 6).

Conociendo los procesos anteriores que tienen lugar durante la senescencia, es posible identificar las células senescentes para llevar a cabo diferentes estudios. En el caso de la enzima β -galactosidasa, a pH 6 origina precipitados azules que acaban tiñendo las células y, en consecuencia, facilita la detección de células senescentes mediante histoquímica. Además, en cultivo celulares, las células senescentes aparecen multinucleadas, granuladas, agrandadas o ven alterada la relación citoplasma/núcleo.

La acumulación de células senescentes aumenta con el envejecimiento, si bien es cierto que no lo hace en todos los tejidos. En particular, se ha observado un aumento en los pulmones, en la piel y el hígado, mientras que, en el corazón, en el músculo esquelético o en el riñón, no. La evidencia más convincente de que la senescencia influye en el envejecimiento es que la eliminación genética o farmacológica de células senescentes ha mostrado ser capaz de prolongar la vida útil y la longevidad en roedores. Es más, la eliminación genética o farmacológica de células senescentes se utiliza como herramienta terapéutica en muchos modelos de enfermedad en roedores (Wissler Gerdes et al., 2021).

La senescencia celular se ha relacionado con múltiples enfermedades no proliferativas, incluida la fibrosis pulmonar, enfermedades renales, síndrome metabólico asociado a la obesidad, la diabetes tipo I y II, la aterosclerosis, la EA o la EP. Sin embargo, su papel aún es controvertido, ya que presenta un papel dual según el contexto. Por un lado, en el cáncer, la senescencia celular actúa como un mecanismo fundamental en la supresión tumoral; algunos autores relacionan la senescencia celular con procesos de reparación de tejidos. En este sentido, se propone que las células senescentes inducen el reclutamiento de células inmunitarias que, después, eliminan a las senescentes (Meyer et al., 2022). Por otro lado, en el envejecimiento, el número de células senescentes aumenta, por lo que juega un papel clave en el desarrollo y la progresión de enfermedades neurodegenerativas. Por ello, en el envejecimiento, este mecanismo tiene un carácter patológico, pues no se logra la eliminación de estas células senescentes, lo que conlleva su acumulación, lo cual acaba por sumarse a la abundante secreción de factores proinflamatorios.

Todo esto ha llevado a proponer múltiples estrategias destinadas a destruir las células senescentes. En concreto, se han diseñado compuestos químicos cuya diana son las células senescentes, denominados senolíticos. De hecho, la eliminación de células senescentes con estos compuestos ha mostrado aumentar la longevidad de los ratones sin un aumento de la incidencia de cáncer (M. Xu et al., 2018).

Cabe destacar que los oligómeros de A β , cuya acumulación anormal es una de las hipótesis de desarrollo de EA, pueden inducir la expresión de p16 en neuronas de hipocampo de ratón que, como hemos visto anteriormente, es un marcador de senescencia (P. C. Wei et al., 2016). En este sentido, tanto en pacientes enfermos con Alzheimer como en modelos animales de Alzheimer, se ha detectado la acumulación de astrocitos, microglía, células endoteliales y neuronas senescentes cuya eliminación en estos modelos ha sido capaz de mejorar la cognición. En particular, se ha demostrado que la eliminación de células senescentes mejora la EA en algunos modelos de ratón (Bussian et al., 2018; Musi et al., 2018; P. Zhang et al., 2019).

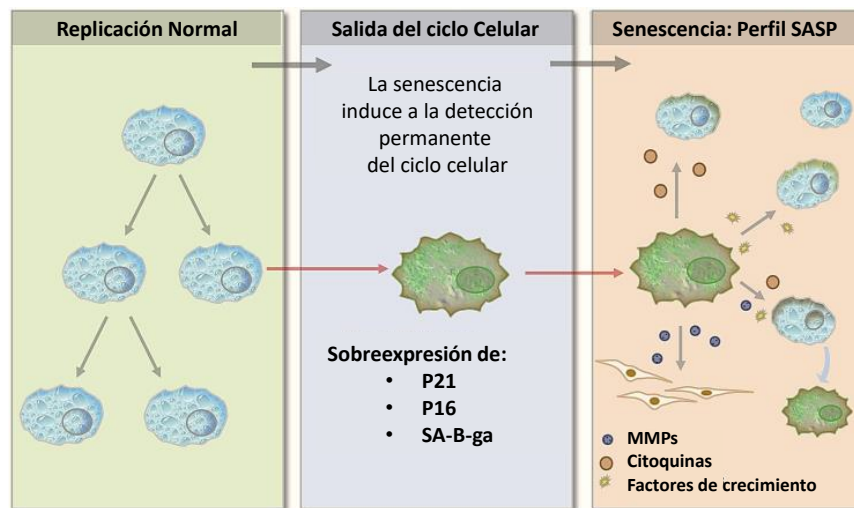


Figura 6. Características distintivas de las células senescentes. Cuando las células se vuelven senescentes adquieren una serie de características como la sobreexpresión de p21, p16 y la SA- β -ga. Además, estas células pueden alterar a las células del entorno debido al fenotipo que adquieren, el fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). Este fenotipo se caracteriza por la producción de citocinas, metaloproteinasas de matriz (MMP) y factores de crecimiento. Modificado de (Swenson et al., 2019).

7) Agotamiento de las células madre

El envejecimiento se relaciona con una renovación tisular reducida, así como una reparación tisular deteriorada tras una lesión. Cada órgano tiene su propia tasa y estrategia de renovación y reparación. En este ranking, la epidermis sería la que presenta una mayor tasa de renovación tisular, ya que cuenta con múltiples nichos de células madre. Por el contrario, el hígado, el páncreas y los pulmones presentan la menor tasa de renovación. Se piensa que la reparación de los tejidos depende, en gran parte, de la plasticidad y de la capacidad de diferenciación de las células inducida por lesiones.

Dado que todos los tipos celulares, tanto las células madre como las que no lo son, sufren el proceso de envejecimiento, se propone, como estrategia general, la reprogramación celular. Esta estrategia consiste en la conversión de células somáticas adultas en células pluripotentes mediante la acción de cuatro factores de transcripción transducidos externamente: OCT4, SOX2, KLF4 y MYC (Takahashi & Yamanaka, 2006). Esta reprogramación requiere de varias semanas. En las primeras semanas, las células pierden su fenotipo como consecuencia de la represión transcripcional de los genes de identidad celular para, posteriormente, activarse los genes de pluripotencia. La reprogramación celular implica tanto un cambio en la identidad como un rejuvenecimiento celular, caracterizado por la reducción del factor p16, extensión de los telómeros y reinicio del reloj de metilación del ADN.

8) Comunicación intercelular alterada

La comunicación intercelular entre células, tejidos y órganos es vital para el mantenimiento de la homeostasis. Esta puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos que conllevan la liberación de factores solubles los cuales afectan al funcionamiento de las células vecinas. Durante el envejecimiento, se producen alteraciones progresivas en la comunicación celular, como son las deficiencias en las vías de señalización neuronal, neuroendocrina y hormonal, entre los que se incluyen los sistemas adrenérgicos, dopaminérgico, el sistema insulina/IGF1, el sistema renina-angiotensina o las hormonas sexuales. Estas alteraciones en la comunicación celular no son procesos aislados, hecho que dificulta considerablemente su estudio, pues, en ocasiones, se hace difícil distinguir si se trata de la causa o de la consecuencia del proceso de envejecimiento.

Otro mecanismo esencial de comunicación intercelular que interviene en el mantenimiento de la homeostasis de diversos órganos y tejidos se relaciona con ciertos canales celulares los cuales permiten el transporte de segundos mensajeros, iones, pequeños metabolitos, péptidos lineales entre células adyacentes... Esta comunicación interviene en procesos de corta duración - conducción del potencial de acción o la difusión de moléculas de señalización- y fisiológicos lentos -crecimiento y el desarrollo- (Thévenin et al., 2013). Un tipo muy interesante de canales de la membrana plasmática que participan en la comunicación intercelular paracrina son los canales hexaméricos o hemicanales los cuales, comúnmente, han sido asociados con ciertos desencadenantes patológicos tales como la disminución de la concentración de Ca^{2+} extracelular, el estrés oxidativo o la despolarización de la membrana. Cuando dos hemicanales de dos células diferentes se juntan, dan lugar a la unión gap. En este sentido, se ha descrito que, durante el envejecimiento, disminuyen los niveles de las proteínas que constituyen los hemicanales, la familia de las conexinas, lo que conlleva una pérdida de estas uniones gap y, por ende, una disminución de la comunicación intercelular.

Los hemicanales permiten el paso de iones Na^+ , K^+ , la liberación de metabolitos como ATP o glutamato, de prostaglandinas, IP_3 o NAD^+ , todos ellos capaces de actuar como señales paracrinas que pueden llegar a inducir la respuesta de células vecinas. Por ejemplo, en el sistema nervioso central, como respuesta al daño, se produce la liberación de glutamato, lactato y ATP, lo que induce estrés y pérdida neuronal (Orellana et al., 2012). Esto, sumado a que en el envejecimiento se produce un aumento de estrés oxidativo y de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, favorece la apertura de los hemicanales con la consiguiente liberación de diferentes moléculas de señalización y propagación del estrés celular. Además, el mantenimiento de la comunicación en situación de estrés y en el envejecimiento puede resultar perjudicial debido a la propagación de señales dañinas.

La comunicación intercelular mediada por vesículas extracelulares permite el transporte de información entre células a través de todo el organismo. A través de estas vesículas, las células pueden deshacerse de componentes no deseados para mantener su homeostasis, pero, además pueden participar en la comunicación a larga distancia, como sucede en la diferenciación celular, la angiogénesis, la apoptosis, la progresión del cáncer, la propagación de infecciones y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neuronales (Kalluri & LeBleu, 2020). El contenido de las vesículas extracelulares condiciona el tipo de comunicación y la respuesta que desencadena. Así, tras el acoplamiento de la vesícula con la célula receptora, puede originarse la activación directa de receptores de la MP capaces de activar señales intercelulares o de liberar su contenido en la célula receptora. El contenido de las vesículas extracelulares y la cantidad de vesículas en circulación aumenta con el envejecimiento, hecho que puede deberse, al menos en parte, a la pérdida de proteostasis que tiene lugar en el envejecimiento. Se ha descrito que las vesículas extracelulares de animales jóvenes son capaces de atenuar e, incluso, revertir los efectos relacionados con el envejecimiento (Weilner et al., 2016).

9) Inflamación crónica

La inflamación aumenta con el envejecimiento con manifestaciones sistémicas, así como con fenotipos patológicos locales como la arteriosclerosis, neuroinflamación y osteoartritis. En consecuencia, se produce un aumento de citocinas circulantes y biomarcadores inflamatorios como la PCR. La inflamación crónica que tiene lugar durante el envejecimiento se relaciona mecánicamente con todas las alteraciones asociadas a la edad anteriormente mencionadas. Por ello, la inflamación puede considerarse como un efecto secundario resultante de una

proteostasis deficiente, de desregulaciones epigenéticas o de la disminución de la capacidad de autofagia.

10) Disbiosis

La alteración de la microbiota o del microbioma intestinal, conocida como disbiosis, ha cobrado relevancia en los últimos años. Esta se postula como un factor clave en múltiples procesos fisiológicos, como la digestión, la absorción de nutrientes, la protección contra patógenos o la producción de metabolitos esenciales, como vitaminas y ácidos biliares. La microbiota intestinal envía señales a los sistemas periférico y central, así como a órganos distantes. La interrupción de esta comunicación resulta en una disbiosis que contribuye a una variedad de condiciones patológicas, como la obesidad, diabetes tipo II, trastornos neurológicos, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Zmora et al., 2019).

Los componentes de la microbiota del tracto intestinal son muy variables entre individuos, ya que vienen determinados por variantes genéticas, la dieta, el estilo de vida o condiciones ambientales. Esto dificulta el poder establecer relaciones entre la microbiota y las alteraciones causadas por el envejecimiento o por diferentes enfermedades asociadas a la edad. La diversidad bacteriana se establece durante la edad y se mantiene relativamente estable durante la edad adulta. Sin embargo, la actividad y la arquitectura de las bacterias sufren cambios durante el envejecimiento, lo que conlleva una disminución de la diversidad.

2.3 Envejecimiento y desarrollo de enfermedades asociadas

El envejecimiento se caracteriza por una degeneración progresiva de los tejidos la cual tiene un impacto negativo en la estructura y en la función de los órganos vitales. La pérdida de integridad fisiológica resulta en una disminución progresiva de la homeostasis y en una reducción en la capacidad para responder a estímulos ambientales con la edad, lo que contribuye a un incremento en el riesgo de padecer enfermedades. Según la Organización Mundial de la salud (OMS), entre 2000 y 2050, la población mayor de 60 años se duplicará, constituyendo el 22 % de la población total. Esto plantea un desafío para la sociedad, ya que el envejecimiento es uno de los factores de riesgo más importantes para la mayoría de las enfermedades tales como enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y la enfermedad de Alzheimer, entre otras (Figura 7).

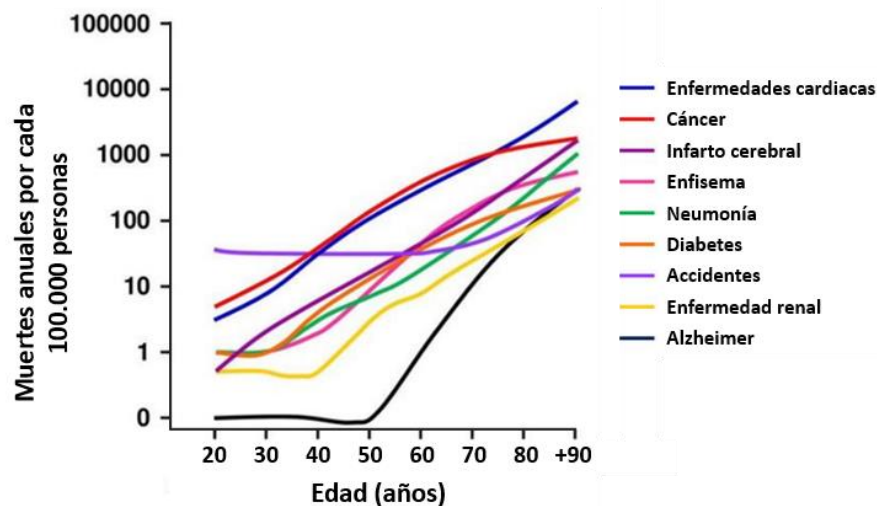


Figura 7. Envejecimiento y aparición de enfermedades. El envejecimiento es el principal factor de riesgo para la mayoría de las enfermedades humanas, incluidas las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y los trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer. Modificado de (MacNee et al., 2014).

2.3.1 Envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se definen como aquellas patologías hereditarias o adquiridas en las que se produce una disfunción progresiva del SNC; en concreto, defectos en las neuronas que pueden conducir a su muerte. Existen más de 600 enfermedades neurodegenerativas, entre las que destacan, por su elevada prevalencia y gravedad, la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas es el envejecimiento. Así, un envejecimiento progresivo de la población debido al descenso continuo de la natalidad y al aumento de la esperanza de vida supone un aumento de la prevalencia de este tipo de patologías. Por ello, las enfermedades neurodegenerativas suponen un grave problema para el sistema Nacional de Salud. No obstante, cabe destacar que el envejecimiento no es el único factor de riesgo, pues diferentes factores genéticos y/o ambientales pueden alterar los mecanismos fisiológicos del envejecimiento y, por ende, contribuir a la aparición de estas enfermedades. Además, es importante distinguir entre envejecimiento y enfermedades asociadas a este, ya que todos los individuos envejecen y, sin embargo, no todos desarrollan enfermedades asociadas a la edad.

La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un mecanismo patogénico común consistente en la agregación y en la acumulación de proteínas mal plegadas. Estas se depositan en forma de agregados intracelulares o extracelulares en el SNC y dan lugar al daño oxidativo e inflamatorio, daños que conllevan la muerte cerebral. Ejemplo de ello son la agregación del péptido β -amiloide y de la proteína fosforilada tau en la EA; de α -sinucleína (cuerpos de Lewy) en la EP; de superóxido o de la proteína huntingtina en la EH (Figura 8). Además, cada enfermedad se caracteriza por presentar una vulnerabilidad selectiva neuronal a nivel del SNC, lo que condiciona la degeneración de áreas concretas y, en consecuencia, produce una sintomatología acorde con la pérdida de función del área afectada. Por ejemplo, en la EP se ven afectadas regiones como la sustancia negra o el cuerpo estriado. El cuerpo estriado también se ve afectado en la EH, mientras que, en la EA, las regiones más dañadas son el hipocampo y la corteza.

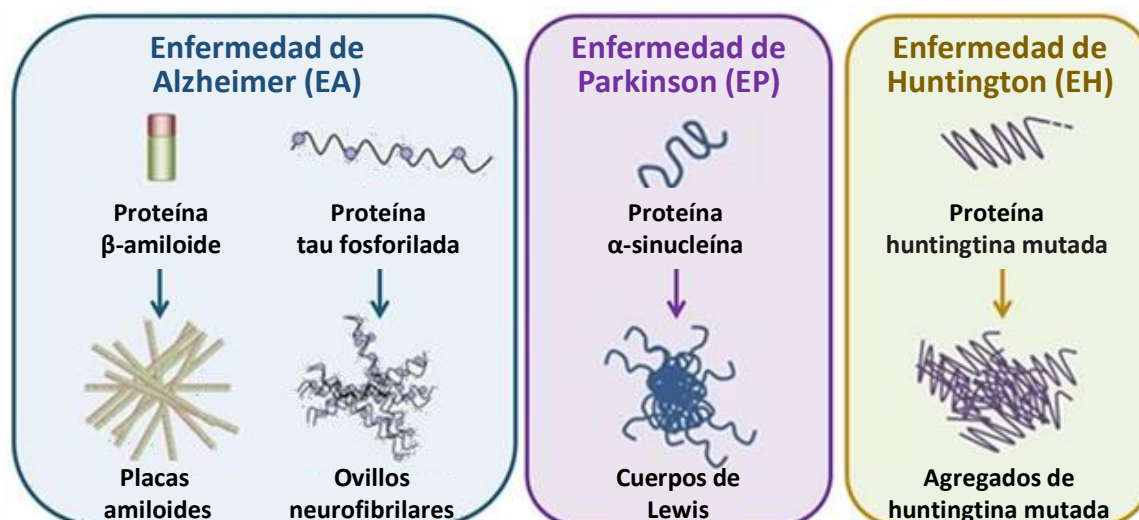


Figura 8. Acumulación de proteínas y enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento. La acumulación de proteínas es el mecanismo más común de desarrollo de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento. En la EA se produce la acumulación de la proteína β -amiloide y tau fosforilada las cuales originan placas amiloides y ovillos neurofibrilares, respectivamente. En la EP se produce la acumulación de la α -sinucleína, lo que da lugar a los cuerpos de Lewis, mientras que en la EH tiene lugar la agregación de proteína huntingtina mutada.

Actualmente, la terapia para las enfermedades neurodegenerativas no va más allá del tratamiento de la sintomatología en algunos casos y paliativo en todos ellos. Estas patologías conllevan la dependencia del afectado para llevar a cabo las actividades cotidianas más básicas y, en ocasiones, se ve afectada la autonomía personal. Por ello, la calidad de vida de las personas afectadas y de su familia se ve muy disminuida.

De entre todas las enfermedades neurodegenerativas mencionadas, así como de las diferentes vías que pueden desencadenar algunas de ellas, la presente tesis se ha centrado en la EA, desarrollada por la acción del péptido $A\beta$, la cual se describirá en el apartado "3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER". Brevemente, esta patología se caracteriza por la pérdida de la memoria, la disminución de la capacidad cognitiva y cambios en el comportamiento. El riesgo de desarrollar la EA se duplica cada 5 años a partir de los 65, aumentando drásticamente a partir de los 80 años. Dado que la esperanza de vida va aumentando poco a poco, el número de casos de Alzheimer, así como de otras enfermedades asociadas al envejecimiento, aumentarán significativamente. En concreto, en el año 2050, se estima que la EA afectará a 153 millones de personas en todo el mundo.

2.3.2 Envejecimiento y Cáncer

A pesar de que el cáncer afecta tanto a niños como a adolescentes y a adultos, la media de edad en la que se recibe un diagnóstico de cáncer es de 66 años. Por lo tanto, el cáncer se considera una enfermedad relacionada con el envejecimiento. Esto es un gran problema, ya que la esperanza de vida ha aumentado en las últimas décadas, lo que a su vez supone un aumento de la prevalencia de muchas enfermedades asociadas al envejecimiento, como es, precisamente, el cáncer. De hecho, a pesar de los esfuerzos por la búsqueda de tratamientos para esta enfermedad, el cáncer sigue siendo la segunda causa de muerte en todo el mundo, después de las enfermedades cardiovasculares.

Tanto el cáncer como el envejecimiento están estrechamente relacionados entre sí, pues ambos comparten numerosos mecanismos moleculares tales como la inestabilidad genómica, la pérdida de proteostasis, el acortamiento de los telómeros, el aumento de la inflamación o la senescencia celular. De esta manera, en el cáncer, las células normales sufren una serie de alteraciones que favorecen la adquisición de mutaciones específicas las cuales conducen a la transformación de las células normales en células tumorales; es decir, a la adquisición del fenotipo tumoral caracterizado por tasas de proliferación aumentada y con capacidad invasiva hacia otros tejidos del cuerpo. En consecuencia, y tal y como se ha dicho anteriormente, el cáncer se considera una enfermedad relacionada con el envejecimiento.

En particular, en el envejecimiento se produce la acumulación de estrés oxidativo y daño genómico causado por la exposición a factores tanto endógenos como exógenos. Esto puede conducir, eventualmente, a la transformación celular y al inicio del tumor. Además, las células senescentes que se acumulan durante el proceso de envejecimiento y que exhiben un fenotipo SASP, aumentan la secreción de mediadores inflamatorios los cuales pueden promover el crecimiento tumoral mediante la creación de microambientes tumorales. Otro punto de unión entre envejecimiento y cáncer es el deterioro progresivo de la función inmune en personas mayores, lo que puede conllevar una respuesta inmune disminuída o ineficiente contra los tumores en desarrollo. Estas y otras alteraciones favorecen la adquisición del fenotipo tumoral de las células.

En particular en este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los tumores cerebrales, de los cuales se hablará en el apartado “4. TUMORES CEREBRALES”.

3 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo progresivo e irreversible más común que conlleva la pérdida de memoria y alteraciones en el comportamiento. Se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas de la corteza cerebral y del hipocampo que podría deberse a la acumulación extracelular de depósitos de oligómeros de A β y de la acumulación intracelular de ovillos de tau hiperfosforilados.

En cuanto a su prevalencia, en España se diagnostican alrededor de 40.000 casos nuevos al año. En la actualidad, hay más de 800.000 personas diagnosticadas, lo que supone un 2 % de la población total. Por desgracia, se estima que en el año 2050 el número de personas afectadas llegará a duplicarse, alcanzando unas cifras de unos 2 millones de personas en toda España. Según la Sociedad Española de Neurología (SEN), el coste medio de cada paciente con Alzheimer supone más de 23.000 € al año, cuantía que aumenta con el progreso de la enfermedad. El riesgo de desarrollar la EA aumenta dramáticamente con la edad, especialmente a partir de los 70 años. No obstante, el Alzheimer no solo afecta a personas de edad muy avanzada; aproximadamente el 10 % de los casos se presenta en individuos menores de 65 años, y este porcentaje generalmente está relacionado con el Alzheimer de tipo familiar.

Respecto a su sintomatología, esta enfermedad cursa con alteraciones en el comportamiento y la conducta, deterioro de las habilidades cognitivas, especialmente aquellas relacionadas con la memoria y el aprendizaje, y trastorno del lenguaje. Las primeras manifestaciones de esta enfermedad son, por lo general, pequeñas alteraciones en la memoria autobiográfica y desorientaciones espaciales. A medida que avanza la enfermedad, aparecen déficits de atención, alteraciones en el lenguaje y en la orientación. La enfermedad, una vez aparece, acompañará al individuo hasta su muerte, causada, generalmente, por patologías asociadas y no por la propia enfermedad.

La EA fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1906, cuando describió el caso de *Auguste Deter*, una mujer de 51 años con trastornos cognitivos, desorientación, delirios y otras alteraciones del comportamiento. La evaluación neuropatológica *post mortem* de su cerebro mostró atrofia difusa y cambios particulares en los grupos de células corticales. Además, Alzheimer describió, de forma cualitativa, la aparición de una sustancia “peculiar” que formaba depósitos extracelulares en determinadas zonas del cerebro. Sin embargo, no fue hasta 1984 cuando se identificó que esta sustancia que aparecía en el cerebro y formaba agregados se trataba del péptido β -amiloide, el cual da lugar a las placas β -amiloides extracelulares, y de la proteína tau hiperfosforilada, capaz de formar ovillos neurofibrilares (NFT). Aunque los criterios de diagnóstico clínico para la EA se han ido modernizando con el tiempo, ambas características moleculares se siguen considerando como indicador de dicha enfermedad (Figura 9). En 2018, se reconoció el uso de diferentes biomarcadores capaces de caracterizar etapas preclínicas de la enfermedad (Soria Lopez et al., 2019).

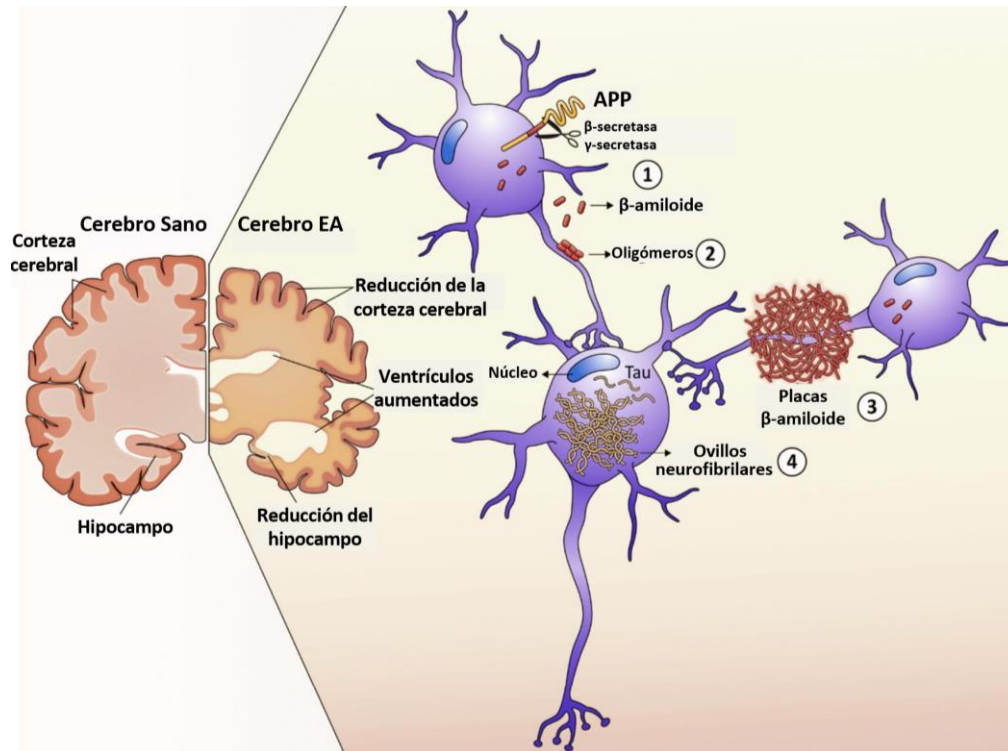


Figura 9. Cambios fisiológicos que se producen en el cerebro durante la enfermedad de Alzheimer. La imagen muestra un cerebro sano (izquierda) y un cerebro con EA (derecha). En el cerebro con EA se observa una disminución de la corteza cerebral, un aumento de los ventrículos y una disminución del tamaño del hipocampo. A nivel molecular, en la EA aparecen estructuras anómalas como las placas amiloides y la acumulación de ovillos neurofibrilares (NFT): **1.** Los péptidos β -amiloide se producen mediante la escisión de la proteína precursora de amiloide (APP) en la membrana de las neuronas. **2.** En el espacio entre las neuronas, el β -amiloide forma oligómeros que alteran la función de las sinapsis y actúan en los receptores presentes en la membrana plasmática de las neuronas. **3.** Las fibrillas de los oligómeros de β -amiloide se agregan formando placas, lo que interfiere con la función de las neuronas. **4.** La hiperfosforilación de tau provoca NFT dentro de las neuronas, desplazando orgánulos intracelulares e interrumpiendo el transporte vesicular. Modificado de (Gomez et al., 2020).

1.1 Factores de riesgo

A pesar de que la EA puede iniciarse de forma tanto esporádica como hereditaria, en ambos casos, las características moleculares son las mismas; la acumulación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares (NFT).

- Enfermedad de Alzheimer esporádica:** supone cerca del 90 % de los casos y aparece en personas de avanzada edad. Se caracteriza por un aumento de la muerte neuronal, así como de una disminución severa y progresiva de la memoria y de las capacidades cognitivas. Los principales factores de riesgo son: la edad avanzada, la genética, la presión arterial elevada, diabetes, el tabaquismo, la obesidad y falta de actividad física. El origen se debe a alteraciones en el procesamiento de $A\beta$ como consecuencia de cambios en la actividad de las enzimas degradadoras. Como resultado, se produce una acumulación de oligómeros β -amiloide y de NFT. Su diagnóstico se basa en la evaluación clínica de los síntomas, en pruebas neuropsicológicas, en análisis de sangre, y, en algunos casos, imágenes cerebrales de resonancia magnética y tomografía por emisión de positrones. Las causas que llevan al procesamiento alterado de APP en la EA esporádica no están claras, aunque se cree que ciertos cambios en la dinámica del Ca^{2+} intracelular podrían estar implicados (Green, Smith et al. 2007).

- **Enfermedad de Alzheimer familiar o hereditaria:** es la forma de EA minoritaria. Se desarrolla a edades tempranas, generalmente antes de los 60 años, y cursa con un desarrollo más rápido que la EA de tipo esporádica. La EA de tipo familiar se asocia con la aparición de mutaciones en 3 genes los cuales son determinantes para su aparición, pues están implicados en la vía amiloidogénica: el gen *APP* (en el cromosoma 21) y las presenilinas 1 y 2 (*PS1*, en el cromosoma 14; *PS2*, en el cromosoma 1) las cuales forman parte del complejo de la γ -secretasa. Por un lado, las mutaciones en *APP* pueden conducir a una mayor generación y agregación del péptido β -amiloide. Por otro lado, las mutaciones en *PS1* y *PS2* interfieren en el procesamiento de γ -secretasa, lo que induce la agregación de β -amiloide.

Además, se han descrito genes que predisponen la aparición de esta enfermedad. El gen de riesgo más común es una isoforma del gen Apoliproteína E, en concreto la *ApoE- ϵ 4*; se estima que entre el 40-65% de las personas diagnosticadas con EA presentan dicho gen. El gen *ApoE- ϵ 4*, junto con las dos isoformas más (*ApoE- ϵ 2,5*), es uno de los moduladores de la producción de $A\beta$ y su recaptación celular. El aumento de los niveles de *ApoE- ϵ 4* se relaciona con un aumento de la capacidad de agregación de $A\beta$ y de la reducción de su eliminación (Corder et al., 1993). Además, se han vinculado alteraciones en otros genes con la EA: *SORT1*, esencial para transportar APP desde la superficie celular al complejo golgi-retículo endoplasmático (Mishra et al., 2022); genes que codifican para proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria, como *TREM2* (Jay et al., 2017) y *CR1*; *ABCA7*, gen que codifica para la isoforma 7 del transportador de unión a ATP de la subfamilia A, implicado en el metabolismo del colesterol; *CALHM1*, que codifica para una proteína transmembrana que controla los niveles de Ca^{2+} citosólico (Dreses-Werringloer et al., 2008; Robinson et al., 2017). La presencia de alguno de estos polimorfismos no implica, necesariamente, la aparición de EA, pero si aumentan la susceptibilidad a desarrollarla cuando coexisten con otros factores de riesgo como la edad o el estilo de vida (dieta, actividad física o factores ambientales).

1.2 Hipótesis sobre el origen de la enfermedad de Alzheimer

A pesar de que se han descrito numerosos cambios a nivel molecular que tienen lugar durante la EA, el origen de esta sigue siendo desconocido. Se han enunciado varias hipótesis que buscan explicar el origen de la enfermedad. En concreto, en la actualidad, las tres hipótesis más aceptadas son: la hipótesis de la cascada amiloide, la cual propone que el origen de la EA se debe a la neurotoxicidad y acumulación de $A\beta$; y la hipótesis de la proteína tau, que plantea que el origen de la enfermedad se debe a la acumulación de tau o bien a la deficiencia de ACh.

Además, se postula que la toxicidad de las placas amiloides conduce a la aparición de otros escenarios como son la hiperfosforilación de tau que, a su vez, conduce a la producción de NFT, a la inflamación, al estrés oxidativo y a la excitotoxicidad. Estos eventos, a su vez, conducen a la muerte celular y a una disminución de los niveles de neurotransmisores, especialmente de Acetilcolina (ACh).

1.2.1 Hipótesis de la cascada amiloide

En 1991, John Hardy y David Allsop propusieron, por primera vez, la “hipótesis de la cascada amiloide”. Esta hipótesis propone que la causa de la EA se debe a un procesamiento erróneo de $A\beta$ y a la acumulación de este, esto podría estar causado tanto por el aumento de la producción como por la reducción en el aclaramiento de este. Esta hipótesis se apoya en la aparición de

ciertas mutaciones en algunos de los componentes de la vía amiloide los cuales serían los causantes de la EA familiar: APP, ApoE- ϵ 4, PS1, PS2 y SORL1. Sin embargo, en la EA de tipo esporádico, en la cual no aparecen dichas mutaciones, también se apoya esta hipótesis (Figura 10). En la actualidad, es la hipótesis más reconocida por los investigadores.

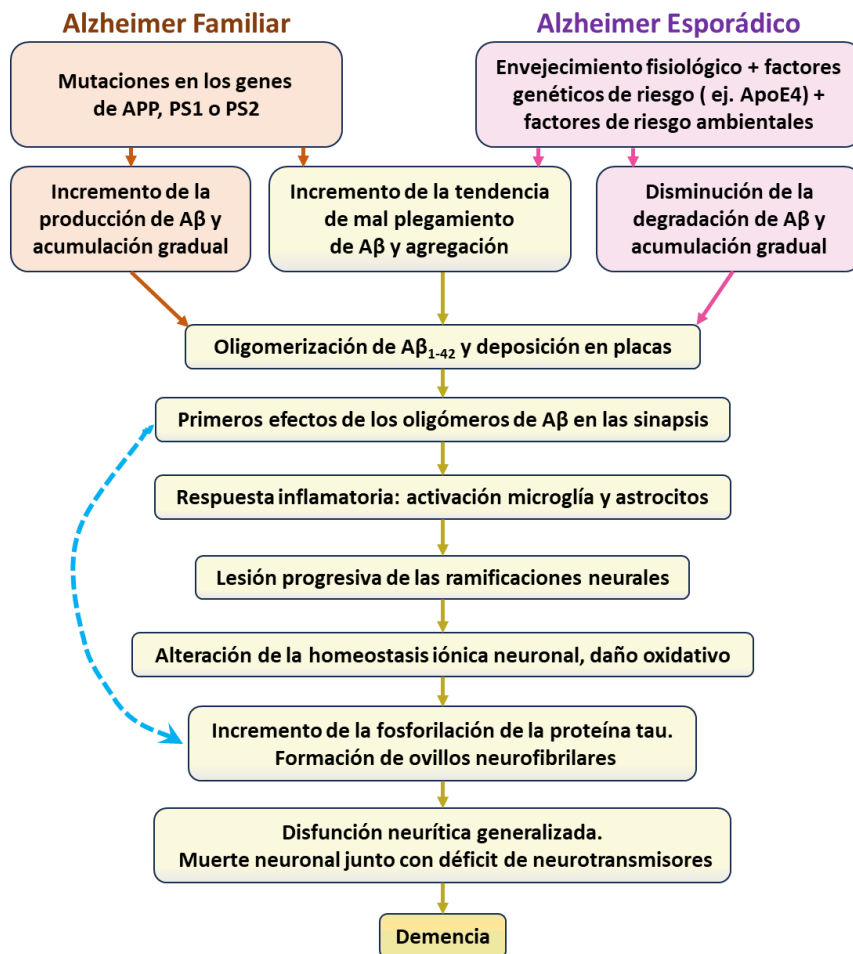


Figura 10. Hipótesis de la cascada amiloide en la EA. En la EA, diferentes mutaciones de los genes que participan en la vía amiloide inducen la producción y la acumulación excesiva de $A\beta_{1-42}$ en el cerebro. Esto conlleva una serie de alteraciones como la inflamación, dishomeostasis iónica, daño oxidativo, aumento de tau y, en última instancia, la aparición de neurodegeneración y demencia. Basado en (Barage & Sonawane, 2015).

1.2.1.1 Procesamiento de APP y formación de péptido -amiloide

La proteína precursora amiloide (APP) es una proteína transmembrana de tipo 1, producida por múltiples tipos de células, esta codificada por el cromosoma 21 y consta de 695 aminoácidos. Se trata de una proteína transmembrana con un gran dominio glicosilado extracelular. Aunque su función fisiológica no es clara, está directamente implicada en la regulación de la supervivencia neuronal, el crecimiento de neuritas, el tráfico de proteínas a lo largo del axón, la plasticidad sináptica y la adhesión celular. Se localiza en muchos tejidos, especialmente en la sinapsis.

En el SNC, APP puede sufrir una serie de escisiones secuenciales cuyo resultado final será el péptido amiloide. Este procesamiento está regulado por enzimas proteolíticas (α , β o γ -secretasas) y tiene lugar a través de dos vías diferentes, la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica. Ambas vías comparten el paso de la segunda escisión realizado por la γ -secretasa (Figura 11). A continuación, se explica brevemente cada una de ellas:

- Vía No amiloidogénica:** es la vía de procesamiento predominante, ya que la mayor parte de APP se procesa mediante esta vía. En primer lugar, el enzima α -secretasa realiza la primera escisión del APP, en el dominio de A β , por lo que, de esta forma, se evita la formación y liberación del péptido. Este corte origina dos fragmentos, un gran ectodominio N-terminal (sAPP α), el cual se secreta al medio extracelular, y un pequeño fragmento carboxilo terminal de 83 aminoácidos (C83) que permanece unido a la membrana a través de su extremo C-terminal. A continuación, C83 puede sufrir otra escisión llevado a cabo por el complejo γ -secretasa, lo que libera el fragmento p3 mientras que el dominio intracelular de APP queda unido a la membrana. El complejo γ -secretasa está formado por las presenilinas PS1 o PS2 junto con otras proteínas asociadas al retículo endoplasmático (RE). Por ello, el procesamiento de APP por la enzima α -secretasa se considera una vía protectora ya que, a través de esta, se fragmenta APP y se evita la producción de A β .
- Vía amiloidogénica:** se inicia con la fragmentación de APP por la acción de β -secretasa, también conocida como BACE1 (*β -site APP-cleaving enzyme 1*). Esta fragmentación libera un producto extracelular, denominado sAPP β , y un fragmento de 99 aminoácidos con extremo carboxilo terminal unido a la membrana (C99). A continuación, la γ -secretasa puede fragmentar C99, lo que da lugar a la secreción de A β y a un fragmento conocido como AICD (*APP Intracellular Domain*) el cual puede actuar como factor de transcripción. En función de la posición en la que la γ -secretasa realice la escisión, el tamaño de los péptidos de A β variará entre 37-42 aminoácidos. Cuanto mayor es el tamaño de los péptidos, mayor es su hidrofobicidad y, por ende, mayor su tendencia a formar agregados insolubles lo que, a su vez, conlleva una mayor neurotoxicidad de estos.

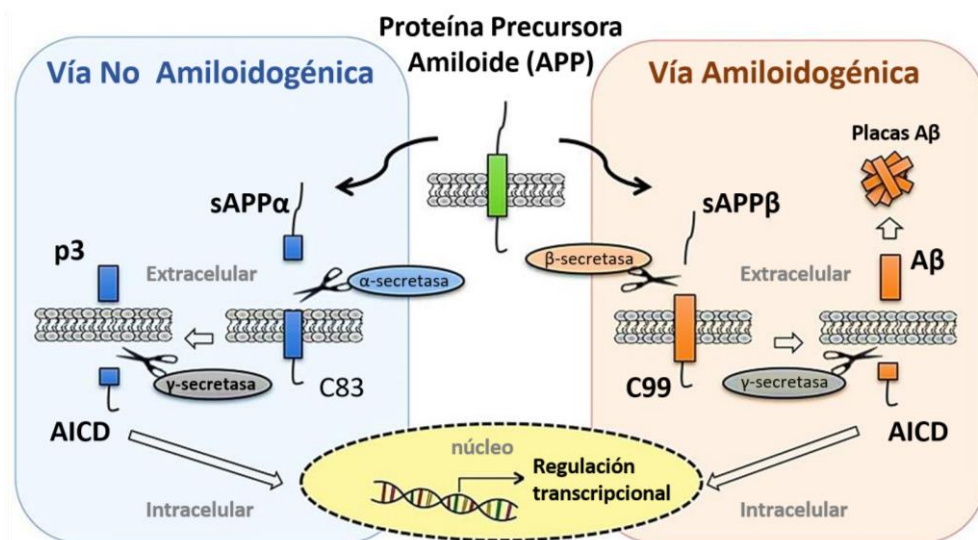


Figura 11. Vías de procesamiento de APP. La APP se procesa mediante dos vías proteolíticas: el procesamiento no amiloidogénico (en azul) y el procesamiento amiloidogénico (en naranja). El procesamiento no amiloidogénico libera en el espacio extracelular fragmentos de sAPP α y p3, mientras que el procesamiento amiloidogénico libera péptidos sAPP β y β -amiloide (A β). Ambas vías liberan fragmentos del dominio intracelular de APP (AICD) en el espacio intracelular que luego se trasladan a los núcleos y regulan la transcripción celular. sAPP α : proteína precursora de amiloide soluble; p3: fragmento extracelular no amiloidogénico de APP; C83: fragmento beta C-terminal de APP; AICD: dominio intracelular APP; sAPP β : proteína precursora de amiloide soluble escindida por β -secretasa; A β , péptido β -amiloide; C89: fragmento alfa C-terminal de APP. Modificado de (Ristori et al., 2020).

1.2.1.2 Estados de agregación de A β_{1-42}

El péptido A β puede oscilar entre una longitud de 37 a 42 aminoácidos. Estudios *in vivo* han demostrado que el péptido A β se libera en su forma monomérica. A su vez, varios de estos monómeros son capaces de ensamblarse de forma progresiva y dar lugar a formas más agregadas que pueden ir desde dímeros a oligómeros e, incluso, hasta fibrillas (Figura 12). En condiciones fisiológicas, estos oligómeros son solubles y pueden existir en todo el cerebro los cuales se relacionan con procesos fisiológicos tales como la supervivencia neuronal y la actividad sináptica (Bernabeu-Zornoza et al., 2019). Por lo tanto, la presencia de oligómeros de A β no implica, ni mucho menos, neurodegeneración. En concreto, el proceso de neurodegeneración tendría lugar cuando se produce un desequilibrio entre la producción del oligómero de A β y su degradación, desequilibrio que favorecería la formación de agregados insolubles. Como consecuencia del envejecimiento y de enfermedades como la EA, las fibrillas de A β precipitan y dan lugar a las placas de A β .

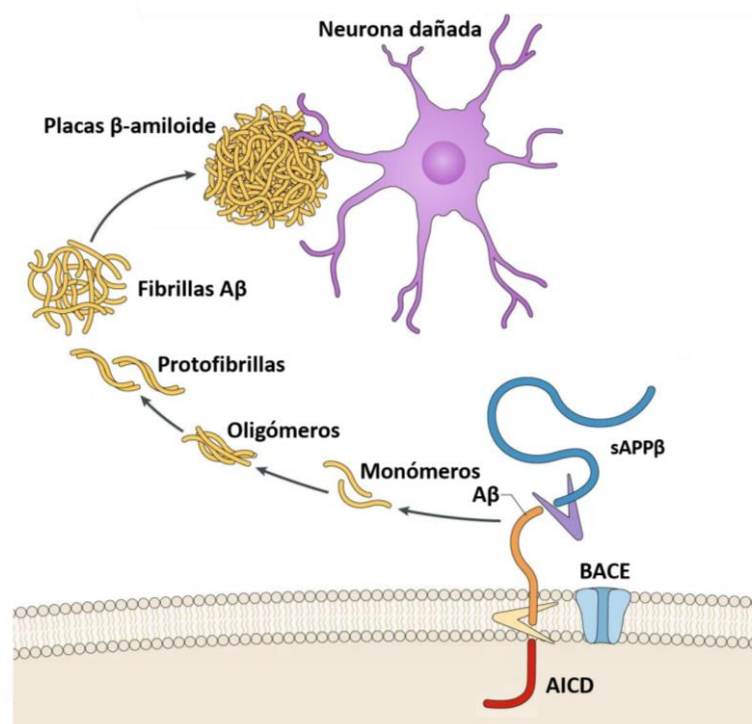


Figura 12. Agregación del péptido β -amiloide. La imagen muestra el proceso de agregación del $A\beta_{1-42}$ desde su estado monomérico hasta una fibrilla madura y la formación de placas β -amiloide, siendo estas últimas insolubles. AICD: dominio intracelular de la proteína precursora de amiloide (APP), BACE: β -secretasa, sAPP β : proteína β precursora de amiloide soluble. Modificado de (Ehsani & Ehsani, 2022).

1.2.1.3 Mecanismos patogénicos del péptido amiloide

Los mecanismos por los cuales los oligómeros de A β provocan neurodegeneración y muerte celular no están del todo claros. A continuación, se exponen brevemente algunos de los más importantes:

- **Toxicidad neuronal:** Uno de estos mecanismos propuestos vincula al Ca^{2+} con la toxicidad de los agregados de A β . En particular, varios estudios que apoyan esta teoría han mostrado que la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} se produce antes de la aparición de los síntomas de la EA, lo que sugiere que la desregulación del Ca^{2+} es un evento previo a la patogénesis de la EA (Pchitskaya et al., 2018). Además, se ha observado una relación

entre la sobrecarga de Ca^{2+} con la acumulación de placas de A β . De esta manera, los oligómeros del péptido amiloide pueden inducir la muerte neuronal directa a través de mecanismos que incluyen el estrés oxidativo, la disrupción del equilibrio del Ca^{2+} intracelular y la activación de vías de muerte celular programada (apoptosis).

- *Disfunción sináptica:* previo a la muerte neuronal, los oligómeros pueden causar una disminución significativa en la funcionalidad sináptica. Esto se manifiesta a través de la reducción de la densidad de las espinas dendríticas (estructuras clave para la transmisión sináptica) y la alteración de la liberación de neurotransmisores, lo que puede contribuir a déficits cognitivos.
- *Alteraciones en la señalización celular:* Los oligómeros interfieren con diversas vías de señalización intracelular, incluidas aquellas involucradas en la supervivencia neuronal, el metabolismo y la plasticidad sináptica. Esto puede resultar en la activación de cascadas de señalización que promueven la muerte celular o la disfunción.
- *Inducción de estrés oxidativo:* Los oligómeros pueden aumentar la producción de ROS, causando daño oxidativo a proteínas, lípidos y ADN, lo que contribuye a la disfunción y muerte celular.
- *Alteraciones en la señalización del Ca^{2+} :* Se ha observado que los oligómeros perturban la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, lo que es crucial para muchas funciones neuronales, incluida la transmisión de señales y la plasticidad sináptica.
- *Inflamación:* Aunque los cultivos primarios de hipocampo se centran en las células neuronales, los oligómeros también pueden afectar a las células de la glía presentes en estos cultivos, como los astrocitos y microglía, induciendo una respuesta inflamatoria que puede contribuir a un mayor daño neuronal.
- *Formación de Tau patológica:* Además de sus efectos directos, los oligómeros del péptido amiloide pueden promover la hiperfosforilación de la proteína Tau, un proceso vinculado a la formación de ovillos neurofibrilares y la disfunción neuronal en la enfermedad de Alzheimer.
- *Disrupción de la membrana celular:* Los oligómeros del péptido amiloide pueden insertarse en las membranas celulares, alterando su integridad y función. Esto puede llevar a un aumento de la permeabilidad de la membrana y, eventualmente, a la muerte celular.

Estos efectos resaltan la importancia de los oligómeros de péptido amiloide en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas y subrayan la necesidad de investigar estrategias terapéuticas que puedan neutralizar su toxicidad o prevenir su formación. La investigación en cultivos primarios de neuronas proporciona una plataforma valiosa para estudiar estos mecanismos en un entorno controlado que imita aspectos del ambiente neuronal in vivo.

1.2.2 Hipótesis de la proteína tau

En condiciones patológicas, como son la EA y otras enfermedades neurodegenerativas, se ha identificado la presencia de filamentos helicoidales unidos a tau, lo que se conoce como ovillos neurofibrilares (NFT). Tau es una proteína de unión a microtúbulos que, en condiciones normales, se localiza, principalmente, en los axones y dendritas de las neuronas donde se encarga de la regulación de los microtúbulos, modulando su ensamblaje y estabilidad (Kadavath et al., 2015). Por lo tanto, la proteína tau, promueve la formación de microtúbulos axonales, los estabiliza e impulsa el crecimiento de neuritas. Los microtúbulos se componen de heterodímeros de tubulina que se polimerizan y se asocian de forma lateral. La regulación de los microtúbulos por las proteínas de unión es esencial, pues desempeñan funciones esenciales en la función celular: participan en la división celular, la morfología celular, el transporte intracelular y la estabilidad axonal.

El cerebro humano adulto contiene 6 isoformas de tau. En cuanto a su estructura, esta consta de cuatro dominios: C-terminal, N-terminal, un dominio rico en prolina y un dominio de unión a microtúbulos (MBD). Cada dominio desempeña una función determinada, funciones que se verán alteradas en condiciones patológicas. En condiciones fisiológicas, el dominio N-terminal, conocido como dominio de activación de la fosfatasa, presenta carga negativa y, generalmente, permanece oculto. Sin embargo, en condiciones patológicas, el dominio N-terminal queda expuesto. En condiciones normales, el dominio C-terminal se asocia con la inhibición de la polimerización de tau, mientras que, en condiciones patológicas, se produce el truncamiento de dicho dominio lo cual facilita la polimerización de tau. En cuanto a los dominios MBD y el dominio rico en prolina, estos están involucrados en las interacciones proteína-proteína y en el ensamblaje de los microtúbulos. Todas estas alteraciones que sufre la proteína tau en condiciones patológicas conducen a un cambio en su conformación. De todas ellas, quizás, la modificación más relevante sea la hiperfosforilación de residuos de serina y treonina en sitios adyacentes o en el propio dominio MBD. Como consecuencia de estas fosforilaciones, se altera su conformación lo que conlleva que tau se desprenda de los microtúbulos y, por tanto, se perturbe el transporte axonal. Cuando tau se separa de los microtúbulos, esta puede agregarse formando agregados intracelulares insolubles, conocidos como NFT (Figura 13). De hecho, la presencia de estos ovillos se ha detectado en neuronas de la región CA1 del hipocampo en pacientes con EA (Arnsten et al., 2021).

A pesar de que diferentes alteraciones en la proteína tau se puedan asociar estrechamente con el deterioro cognitivo y la pérdida de neuronas, se ha detectado la presencia de estos en personas mayores que no presentan signos de neurodegeneración. Por lo tanto, estos hallazgos podrían sugerir que los ovillos de tau, por sí solos, no conllevan, necesariamente, el desarrollo de EA. Sin embargo, sí que se ha observado que en pacientes de la EA que presentan la acumulación de oligómeros de A β y de los ovillos tau, la neurodegeneración es mayor. Además, existe evidencia que sugiere que la aparición de placas A β empeora la patología mediada por tau (Gallardo & Holtzman, 2019).

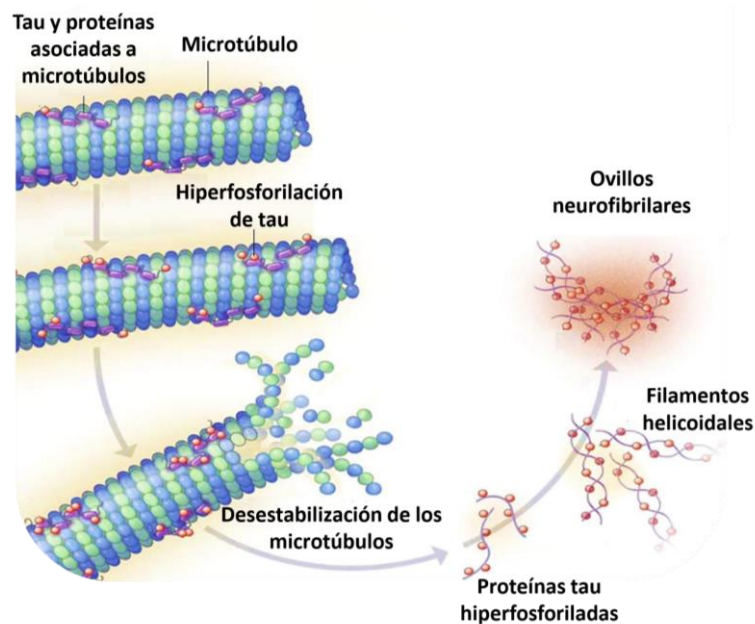


Figura 13. Formación de ovillos neurofibrilares. La hiperfosforilación de la proteína tau, por un exceso de glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β), quinasa dependiente de ciclina (cdk5) o bien por una reducción de fosfatasa o ambas, da como resultado la desestabilización de los microtúbulos seguido de un desprendimiento de tau hiperfosforiladas y agregación de estas formando filamentos helicoidales y ovillos neurofibrilares. Modificado de (Querfurth & LaFerla, 2010).

1.2.3 Hipótesis colinérgica

En la década de 1970, Drachman y Leavitt sugirieron la implicación del sistema colinérgico en procesos de la memoria (Drachman & Leavitt, 1974). Más tarde, se observó que, en muestras de corteza e hipocampo de pacientes de EA, tenía lugar una degeneración de las neuronas colinérgicas debida a déficits de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT), implicada en la síntesis de ACh (Bowen et al., 1976; Davies & Maloney, 1976). El déficit de dicha enzima provoca una disminución de ACh, lo que da lugar a alteraciones en la función cognitiva y a la pérdida de memoria (Hampel et al., 2018)

En condiciones fisiológicas, la ACh es un neurotransmisor el cual interviene en numerosos procesos fisiológicos como la memoria, la atención, la información sensorial, el aprendizaje y otras funciones. Se sintetiza en el citosol de las neuronas colinérgicas a partir de colina y la acetilcoenzima A mediante la acción de ChAT. Una vez sintetizada, la ACh se almacena en vesículas en el interior de la neurona presináptica. Cuando se produce el impulso nervioso, la ACh se libera al espacio intersináptico, lo que permite su interacción con los receptores colinérgicos de la neurona postsináptica. En el espacio intersináptico, también se encuentra la enzima encargada de degradar la ACh, la acetilcolinesterasa, la cual, debido a su acción, ayuda a regular los niveles de este neurotransmisor.

Uno de los pilares clave de la hipótesis colinérgica es la disminución de neuronas colinérgicas en regiones específicas del cerebro. Además, se ha observado una disminución de los niveles de ACh como consecuencia de la pérdida de neuronas colinérgicas y de la disminución de la enzima ChAT, enzima encargada de sintetizar ACh, a la disminución de la neurotransmisión mediada por ACh y a la presencia de antagonistas colinérgicos que perjudican la memoria (Figura 14).

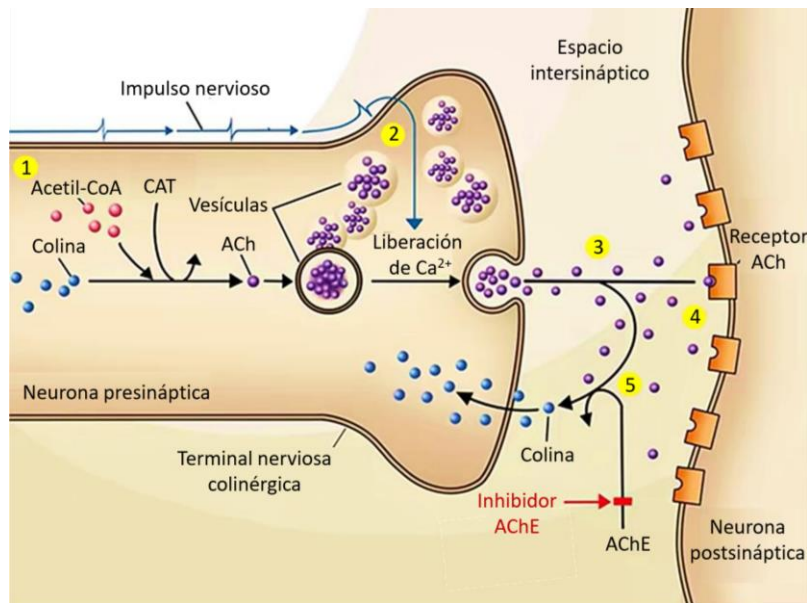


Figura 14. Representación de la neurotransmisión de ACh. (1) La ACh se sintetiza en el citosol de las neuronas colinérgicas presinápticas a partir de colina y acetilcoenzima A por la enzima acetiltransferasa (ChAT). Una vez sintetizada, la ACh se almacena en vesículas. (2) Tras la acción de un estímulo (ej. Un impulso nervioso que provoca la liberación Ca^{2+}) se induce la despolarización de la neurona presináptica, (3) y se libera la ACh mediante exocitosis al espacio intersináptico. (4) Posteriormente, la ACh actúa sobre los receptores de ACh de las neuronas postsinápticas, lo que desencadena respuestas excitatorias o inhibitorias. (5) En el espacio sináptico, la ACh es hidrolizada por la acetilcolinesterasa (AChE), lo que libera acetato y colina los cuales son recaptados por la neurona presináptica. Las personas con EA tienen deficiencia de ACh. Los inhibidores de AChE pueden inhibir la actividad de la AChE y así bloquear la hidrólisis de la ACh, lo que puede aumentar la concentración de ACh en las hendiduras sinápticas y prolongar la duración de la acción de la ACh para aliviar el deterioro cognitivo de los pacientes con EA. Modificado de (Chen et al., 2022).

1.3 Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

En la actualidad, sólo hay dos fármacos, basados en anticuerpos monoclonales diseñados para tratar de frenar la EA, los cuales únicamente está aprobado su uso en EE. UU. El resto de los tratamientos farmacológicos disponibles están enfocados a tratar su sintomatología. Es decir, a mejorar los aspectos cognitivos y funcionales de la enfermedad, aunque, probablemente, también modifiquen ciertos aspectos de la conducta. Los tratamientos pueden clasificarse en dos tipos: farmacológicos y no farmacológicos.

1.3.1 Tratamiento farmacológico

En la actualidad, existen cuatro tratamientos farmacológicos para la EA los cuales se pueden dividir en dos categorías: inhibidores de la colinesterasa y antagonistas parciales de los receptores de N-metil-D-aspartado (NMDA) o antiglutaminérgicos (Tabla 1). Todos ellos se administran por vía oral o transdérmica.

- **Inhibidores de colinesterasa:** son moléculas que actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa, enzima degradadora de la ACh, lo que conlleva un aumento de esta. Es decir, estos fármacos están destinados a corregir la deficiencia de ACh que se observa en el SNC de personas con EA. Dentro de esta categoría, la FDA ha aprobado el uso de tres medicamentos; *donepezilom*, *rivastigmina* y *galantamina*. El *donepezilom* se puede utilizar en todas las etapas de la EA, mientras que la galantamina y la rivastigmina se emplean en estadios de deterioro cognitivo leve y demencia.

- **Antagonistas parciales de NMDA o antilutaminérgicos:** se utilizan para aumentar los niveles de glutamato, neurotransmisor que tiene un papel clave en las funciones de aprendizaje y memoria. Se tratan de antagonistas no competitivos, pues bloquean los receptores de NMDA, lo que ralentiza la acumulación de Ca^{2+} intracelular. Actualmente, el único fármaco aprobado de este tipo es la memantina, indicado para el tratamiento de la EA moderado/grave.

Aunque estos tratamientos no son curativos, se utilizan con el fin de retrasar la evolución de la enfermedad, estabilizar y mejorar temporalmente las funciones cognitivas, y controlar los trastornos de la conducta.

A pesar de los esfuerzos intensivos y de los costosos programas para el desarrollo de fármacos, en Europa no se ha dado luz verde a nuevos fármacos desde el 2003, siendo la memantina el último aprobado. El enfoque principal en el desarrollo de fármacos se dirige principalmente a la patología de la EA subyacente de la hipótesis amiloide (Hardy & Higgins, 1992). Por ello, se plantean estrategias dirigidas a aumentar la eliminación de $\text{A}\beta$ o, por el contrario, a reducir la producción de las formas neurotóxicas de $\text{A}\beta$ mediante la inhibición de β y γ -secretasas, estrategias que han mostrado, en algunos casos, resultados contradictorios (Egan et al., 2019; Knopman, 2019) (Tabla 1).

Una de las vías de investigación que está adquiriendo más relevancia en la actualidad es la inmunoterapia anti-amiloide. Estas terapias se basan en el uso de anticuerpos monoclonales frente a $\text{A}\beta$ los cuales deberían de ser capaces de disolver los agregados de $\text{A}\beta$ y prevenir su formación. En 2016, se anunció un anticuerpo monoclonal humano, *aducanumab*, el cual se dirige selectivamente a los agregados de $\text{A}\beta$ y que mostró ser capaz de reducir los agregados en un modelo de EA en ratones transgénicos. Sin embargo, los estudios con este fármaco han estado sujetos a controversia. No obstante, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó su uso en 2021 (Dhillon, 2021), mientras que la *Agencia Europea del Medicamento* (EMA) ha rechazado la autorización de su comercialización, pues asegura que la relación beneficio/riesgo es negativa. Además, en enero de 2023, EE.UU también aprobó el uso de otro anticuerpo monoclonal, *Lecanemab*. Actualmente, se están llevando a cabo numerosos ensayos con el uso de otros anticuerpos monoclonales, también dirigidos hacia la proteína tau y a la acumulación de NFT (Shi et al., 2022). Sin embargo, no son las únicas líneas de investigación. Por ejemplo, existen otras líneas que apuestan por la suplementación con probióticos y selenio (Tamtaji et al., 2019).

No obstante, teniendo en cuenta los numerosos ensayos farmacológicos fallidos, incluso en pacientes con EA leve, los resultados conducen a replanteamiento sobre si las dianas de actuación sobre la hipótesis β -amiloide abordadas hasta el momento son las adecuadas.

Tabla 1. Comparación entre los tratamientos con anticuerpos monoclonales (inmunoterapia) y los fármacos aprobados.

	Anticuerpos monoclonales	Inhibidores de colinesterasa	Antagonista del NMDAR
Fármaco	Aducanumab, Lecanemab	Dondepezil, rivastigmine y galantamine	Memantina
Mecanismo de acción	Se dirige selectivamente y elimina los agregados A β , las fibrillas A β y los oligómeros solubles, reduciendo el deterioro cognitivo en los pacientes.	Aumenta la transmisión colinérgica al inhibir la colinesterasa en la hendidura sináptica, mejorando así la función colinérgica cortical.	Ejerce efectos neuroprotectores al bloquear la estimulación patológica de los receptores NMDA del glutamato, disminuyendo así la excitotoxicidad
Indicación	EA moderada	EA moderada o severa	EA moderada o severa
Vía de administración	Intravenosa	Oral, transdermal (rivastigmine)	Oral
Observaciones	Solo aprobado por la FDA		

1.3.2 Tratamiento no farmacológico

Este tipo de tratamientos se utilizan como complemento a los tratamientos farmacológicos. Estos consisten en estimulación cognitiva, terapias conductuales, rehabilitación funcional, entrenamiento de actividades de la vida cotidiana, etc. De hecho, numerosos estudios muestran la existencia de una correlación positiva entre el aumento de la actividad física, el entrenamiento cognitivo o las intervenciones en la nutrición, entre otros, con una desaceleración del deterioro cognitivo.

Dado que las alteraciones en la EA ocurren de forma temprana y progresan con el tiempo, incluso décadas antes su diagnóstico, identificar factores de riesgo modificables (como el tabaquismo o la alimentación) e intervenir sobre ellos podría resultar beneficioso, pues esto permitiría no sólo utilizarlos como tratamientos farmacológicos, sino también como mecanismos de prevención para el EA

4 TUMORES CEREBRALES

En el presente capítulo se va a hacer una breve introducción sobre el cáncer, comenzando por una visión general para, finalmente, centrar la atención en los tumores cerebrales y, en particular, sobre los glioblastomas (GBM), por ser, este último, parte importante de la presente tesis. Entre otras cosas, se hablará de qué son, de cómo se clasifican estos tumores o de qué tratamientos existen y/o están en desarrollo.

4.1 Aspectos generales del cáncer

En los siguientes apartados, se va a hacer una exposición sobre algunos de los aspectos más generales relacionados con el cáncer: qué es, cuál es la incidencia de los diferentes tipos de cáncer, o que características comunes presentan los diferentes tipos de cáncer.

4.1.1 Incidencia

El cáncer engloba a un grupo de enfermedades, más de 100 tipos diferentes, caracterizadas por un crecimiento y proliferación descontrolados de células anormales en el cuerpo y que puede originarse en, prácticamente, cualquier tejido u órgano del cuerpo. Estos tipos de cáncer pueden ser clasificados según el tipo de célula que de origen a dicho cáncer.

Su incidencia es muy elevada a lo largo de todo el mundo. Cada año se diagnostican más de 19 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo los cuales causan alrededor de 10 millones de muertes, lo que sitúa al cáncer como la segunda causa de muerte en el mundo. En particular, en el año 2020 se registraron más de 308.000 nuevos casos de tumores cerebrales en todo el mundo, alcanzando el puesto 19 en cuanto a incidencia. Desafortunadamente, se sitúa en el puesto número 12 en cuanto a mortalidad. En concreto, en España, en el año 2022, se registraron más de 4.500 casos, alcanzando el puesto 17 en incidencia y el 10 en mortalidad. No obstante, según la OMS, se prevé que, en el año 2040, su incidencia alcanzará los 5.300 casos anuales (Figura 15).

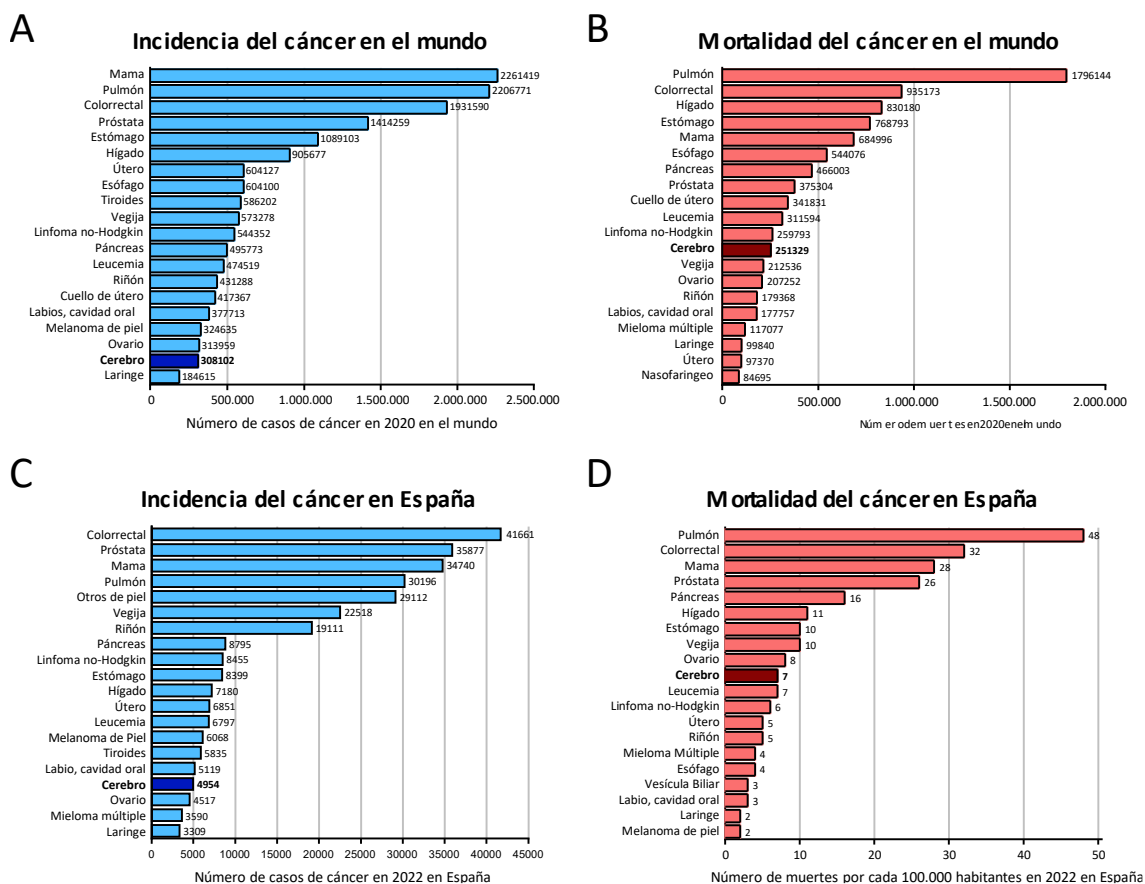


Figura 15. Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en el mundo y en España. Incidencia (A) y mortalidad (B) de los diferentes tipos de cáncer en el mundo en el año 2020. Incidencia (C) y mortalidad (D) de los diferentes tipos de cáncer en España en el año 2022. Datos obtenidos de GCO (<https://gco.iarc.fr/>) y del observatorio del cáncer de la AECC (<https://observatorio.contraelcancer.es/>).

4.1.2 Hallmarks del cáncer

A pesar de la gran complejidad y diversidad que existe entre los diferentes tipos de cáncer, es importante destacar que todos ellos tienen una serie de características en común, los *hallmarks* del cáncer. Ya en el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron 6 características o *hallmarks* capaces de distinguir a una célula tumoral de una sana (Hanahan & Weinberg, 2000). No obstante, los constantes avances en esta área de investigación, así como en otras relacionadas, han sido clave en el descubrimiento de más *hallmarks* de tal manera que, a día de hoy, se han descrito hasta un total de 14 características (Figura 16) (Hanahan, 2022).

Es importante señalar que una célula tumoral no presenta todas y cada una de estas 14 características desde el primer momento, sino que lo hace de una forma progresiva a lo largo de todo el proceso tumoral. Por lo tanto, el cáncer se desarrolla de forma gradual a partir de un número creciente de células que sufren una acumulación de cambios, como alteraciones a nivel tanto genético como epigenético, estructurales... Toda esta acumulación de “fallos” conlleva alteraciones en diferentes mecanismos relacionados con la división celular, la apoptosis y la diferenciación celular que, en último lugar, culmina con la aparición y la progresión del cáncer.

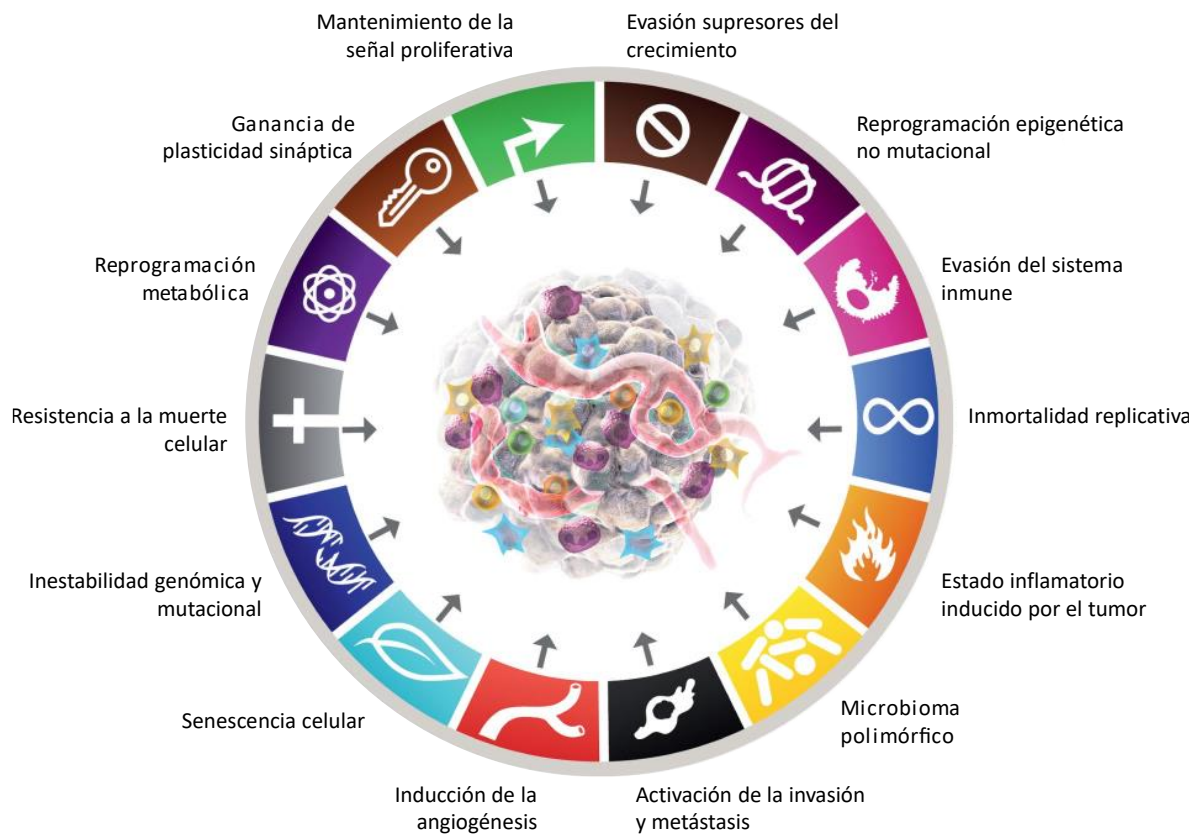


Figura 16. Hallmarks o sellos del cáncer. Se han descrito hasta catorce características que distinguen a una célula sana de una tumoral. En el año 2000, Hanahan y Weinberg describieron 6 *hallmarks* del cáncer, los cuales se han ido actualizando a medida que avanza la investigación en el cáncer hasta un total de 14. Modificado de (Hanahan, 2022).

Entre estos 14 *hallmarks*, se distinguen 8 capacidades funcionales adquiridas (características distintivas) y 6 características habilitantes (anomalías propias del estado neoplásico) que contribuyen a la adquisición de las capacidades distintivas. Por un lado, las capacidades funcionales adquiridas se corresponden con el mantenimiento de la señal proliferativa; la evasión de supresores del crecimiento; la evasión del sistema inmune; la inmortalidad replicativa; la activación de la invasión y la metástasis; la inducción de la angiogénesis; la resistencia a la muerte celular, y alteraciones en el metabolismo celular. Por otro lado, en cuanto a las características habilitantes, se han identificado las siguientes: reprogramación epigenética no mutacional; estado inflamatorio inducido por el tumor; variabilidad en el microbioma (microbiomas polimórficos); la senescencia celular; inestabilidad epigenética y mutacional, y ganancia de plasticidad sináptica.

1) Mantenimiento de la señal proliferativa

En condiciones normales, las células mantienen una tasa de crecimiento controlada y regulada por diferentes mecanismos de control tales como la inhibición por contacto, el acortamiento de los telómeros o señales inhibitorias del crecimiento ante un daño en el ADN producido en la replicación. A pesar de la existencia de estos complejos mecanismos de control y a la regulación de la proliferación, las células son capaces de evadirlos lo que les permite adquirir una autonomía proliferativa. Entre las diferentes vías de señalización proliferativas, destaca la señalización de la quinasa de fosfatilinoisitol-3 (PI3K) la cual está mediada por diversos factores de crecimiento que actúan sobre receptores tirosina quinasa (TKR). Así, en las células tumorales

se produce una sobreactivación de estas vías de señalización lo que puede ser debido a diferentes causas: sobreexpresión de sus receptores, aparición de mutaciones de ganancia de función sobre estos receptores que les permiten estar constitutivamente activos aun en ausencia de su ligando; sobreexpresión de otros componentes de la vía y/o mutaciones de ganancia de función, e, incluso, aumento en la liberación de factores de crecimiento.

2) Evasión de supresores del crecimiento

La habilidad de evadir las señales inhibitorias del crecimiento constituye otra de las estrategias adoptadas por las células tumorales que les permite adquirir la capacidad de la autonomía proliferativa. Este mecanismo tiene lugar cuando las células sortean algunas de las señales inhibitorias del crecimiento, por lo general evitando de algún modo la acción de genes supresores de tumores tales como *p53* o *PTEN* los cuales regulan negativamente el proceso de proliferación. En concreto, *p53*, en condiciones normales, se ubiquitina para su degradación; sin embargo, en presencia de daño en el ADN, este se estabiliza mediante su fosforilación. Esto provoca su acumulación en el núcleo y, en consecuencia, la activación de diferentes genes implicados en la reparación del ADN lo cual acaba por detener el ciclo celular hasta la reparación del ADN dañado. En este sentido, en numerosos tipos de cáncer se ha encontrado que el gen *p53* está mutado, silenciado o inactivado lo cual favorece la supervivencia de las células tumorales.

3) Reprogramación epigenética no mutacional

Las alteraciones epigenéticas son un tipo de alteración que tiene lugar en el ADN y la cual no implica una mutación, pero sí que conlleva un cambio en los patrones de expresión de los diferentes genes. Estas alteraciones pueden originarse tanto por la aparición de ciertas mutaciones como por la acción del mismo microambiente tumoral. Estas permiten a las células tumorales adquirir diferentes capacidades que favorecen el desarrollo y la progresión tumoral. Por ejemplo, es habitual que en el tumor haya regiones de hipoxia resultantes de una vascularización insuficiente lo cual provoca una reducción de la actividad de las desmetilasas lo que, a su vez, conlleva la hipermetilación de componentes del ADN que influirá en la expresión de otros genes.

4) Evasión del sistema inmune

El sistema inmune se caracteriza por distinguir lo propio de lo extraño; es decir, por ser capaz de detectar una amplia variedad de agentes externos entre los que se incluyen desde virus hasta parásitos. El sistema inmune es complejo pues está formado por diferentes órganos (ganglios linfáticos, timo, bazo, apéndice, médula ósea y vesículas linfáticas), cada uno de los cuales produce un tipo de células (células T, macrófagos, células dendríticas y células B) con funciones específicas. Por ejemplo, la fagocitosis y la destrucción de agentes extraños es llevada a cabo por las células B, linfocitos T, macrófagos y células NK.

De forma general, el sistema inmune reacciona ante la presencia de antígenos o células extrañas que da lugar a la activación de la proliferación de células T CD8 las cuales expresan el receptor de membrana de muerte celular programada 1 (PD-1, del inglés *programmed death 1*). No obstante, para evitar problemas de autoinmunidad y detectar como extraño lo propio, este receptor de las células T CD8 entra en contacto con una serie de proteínas transmembrana que presentan en su superficie las células propias, como PDL1 o PDL2 (ligando 1 o 2 de muerte programada, del inglés *programmed death ligand 1/2*). De esta manera, esta interacción envía una señal a estas células T para que detengan su proliferación y así evitar la auto-inmunidad.

Curiosamente, las células tumorales emplean este mismo mecanismo para eludir el sistema inmune a través de la sobreexpresión de PDL1, de forma que evitan ser detectadas por las células T como células extrañas y, así, evitar que estas las ataquen. Además, se han descrito otros mecanismos por los cuales las células tumorales son capaces de evadir el sistema inmune como la aparición de mutaciones en proteínas apoptóticas que las hacen menos susceptibles a la muerte o dejar de expresar ciertos antígenos inmunogénicos y moléculas presentadoras MHC1.

5) Inmortalidad replicativa

El número de replications que puede sufrir una célula a lo largo de su vida es limitado y viene determinado por la longitud de los telómeros, secuencias repetidas en la región terminal de los cromosomas. En cada división celular, la longitud de los telómeros se acorta por lo que, cuando se alcanza un mínimo de longitud del telómero, la célula entra en senescencia, situación metabólicamente activa en la cual la célula ni se divide ni prolifera. Esta situación de senescencia se logra por la activación de genes supresores de tumores como el *p53* o el *Rb*. Por lo tanto, alteraciones en estos genes pueden conllevar que las células sigan proliferando a pesar de haber alcanzado su límite. A pesar de que, cuando esta situación ocurre, tras varias rondas de replicación, la célula acaba muriendo por apoptosis, puede ocurrir que las células adquieran la capacidad de expresar telomerasa, enzima que sintetiza ADN telomérico durante la replicación, y, en consecuencia, que se vuelvan inmortales (Shay & Wright, 2011).

6) Estado inflamatorio inducido por el tumor

En áreas peritumorales, tanto de lesiones premalignas como malignas, se genera un entorno que favorece el crecimiento tumoral y la metástasis denominado microambiente tumoral. Este microambiente tumoral presenta infiltración de células inmunes que permite a los tumores generar un estado pro-inflamatorio en el que se liberan diferentes sustancias químicas que favorecen la aparición de ciertas mutaciones, así como el propio proceso tumorogénico e, incluso, el fenotipo invasivo. Además, las células inmunes infiltrantes, como son los macrófagos, también pueden secretar diferentes tipos de proteínas solubles como las citoquinas protumorales (TGF β o IL10), factores angiogénicos o productos metabólicos tales como prolina o poliaminas. En consecuencia, la secreción de todos estos factores activa vías de supervivencia y de proliferación en las células tumorales lo que favorece tanto el crecimiento tumoral como su capacidad invasiva.

7) Microbiomas polimórficos

La diversidad y variabilidad del microbioma presente en diferentes tejidos puede favorecer el fenotipo tumoral. En particular, puede influir sobre la capacidad de adquirir ciertas características distintivas del cáncer por parte de las células tumorales, como la inmunomodulación y la aparición de mutaciones lo que, a su vez, afecta al desarrollo y a la progresión del tumor.

8) Activación de la invasión y la metástasis

El proceso de invasión y metástasis se desencadena como consecuencia de la adquisición de un fenotipo mesenquimal por parte de algunas células tumorales, lo que las hace más invasivas. El cambio de fenotipo está regulado, principalmente, por dos vías de señalización: la señalización autocrina de las células tumorales y la señalización paracrina de las células estromales. Estas vías están altamente reguladas y se encargan de regular la expresión de diferentes proteínas relacionadas con la adhesión celular. Por lo tanto, alteraciones en estas vías de señalización pueden desencadenar la disminución y el debilitamiento de la adhesión célula-célula entre las células tumorales y las de su entorno, así como un aumento de la expresión de genes que

favorecen la activación de la transición epitelio mesenquimal. Además, la acción de las proteasas provoca la degradación de la matriz extracelular y de ciertas proteínas, lo que causa la liberación de factores de crecimiento. Todos estos cambios favorecen su motilidad y su capacidad de migración e invasión.

9) Inducción de la angiogénesis

En condiciones normales, las células requieren de un suministro regular de O_2 y de diferentes nutrientes los cuales obtienen a través de los vasos sanguíneos. No obstante, en aquellas situaciones en las que la concentración de O_2 disminuye, también lo hace el pH, el ATP y la glucosa, a la par que aumenta el lactato. Ante esta situación, las células entran en hipoxia y, junto a otras células como los macrófagos y los fibroblastos, liberan factores de la familia de los VEGF capaces de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como neovascularización, así como al crecimiento y ramificación de otros vasos ya existentes, angiogénesis. Y esto es, precisamente, lo que sucede en el entorno tumoral pues, debido a su crecimiento desmesurado, se generan zonas de hipoxia. A diferencia de la neovascularización y la angiogénesis que tiene lugar en condiciones fisiológicas, la neovascularización que ocurre en condiciones patológicas presenta morfología caótica de tal manera que los vasos sanguíneos están dilatados, su calibre es irregular y presentan múltiples ramificaciones, lo que les hace menos estables y más propensos a fugas. Esto, a su vez, provoca un aumento de factores angiogénicos y de metaloproteasas que inducen la degradación de la matriz extracelular y la transformación de las células tumorales en células similares a las mesenquimales con capacidad de invasión. En consecuencia, todos estos procesos favorecen la migración y diseminación de las células tumorales a otros tejidos a través del torrente sanguíneo.

10) Senescencia celular

Anteriormente, ya hemos mencionado la senescencia celular. Esta es una forma irreversible de detención de la proliferación que, probablemente, podría haber evolucionado como un mecanismo protector para mantener la homeostasis del tejido, como mecanismo complementario a la muerte celular programada, y permite inactivar y eliminar células disfuncionales. La senescencia puede inducirse por varios factores tales como el estrés microambiental, la privación de nutrientes, el daño al ADN o alteraciones en la señalización celular. Además de detener el ciclo de división celular, la senescencia provoca cambios en la morfología y el metabolismo celular. Esto, a su vez, activaría el SASP el cual implica la liberación de gran cantidad de proteínas bioactivas, como quimiocinas, citocinas y proteasas cuya identidad dependerá del tipo celular.

El principal mecanismo por el cual las células senescentes promueven el fenotipo tumoral es el SASP. Mediante la secreción de SASP, las células cancerígenas senescentes promueven la adquisición de capacidades distintivas a otras células cancerígenas viables: el mantenimiento de la señal proliferativa; la evasión de la apoptosis; la angiogénesis; la estimulación de la invasión y metástasis, o la supresión de la inmunidad tumoral.

11) Inestabilidad genómica y mutacional

Como ya hemos mencionado anteriormente, las células cuentan con una serie de mecanismos de reparación del ADN y de mantenimiento de la estabilidad genómica como son los genes supresores de tumores. Estos actúan manera que, en caso de que se detecte algún daño genómico y/o alguna mutación durante el proceso de replicación o síntesis de ADN, el ciclo celular se detiene para repararlo. Así, una vez se ha reparado el daño o corregido la mutación, la célula vuelve a entrar en el ciclo celular. Sin embargo, estos procesos no funcionan

adecuadamente en las células tumorales, pues están presentan diferentes mutaciones en genes supresores de tumores (u oncogenes) y/o alteraciones cromosómicas que dan lugar a la inestabilidad genómica. Por lo tanto, en las células tumorales no es extraño encontrarse con varias de estas alteraciones. Por ejemplo, una de las alteraciones en el ADN más frecuentes tiene lugar en los microsatélites, secuencias repetitivas cortas presentes en el genoma. Estas tienden a formar bucles que favorecen la aparición de mutaciones las cuales originan defectos en los sistemas de reparación de errores del ADN. Respecto a la inestabilidad cromosómica, suele aparecer como consecuencia de la alteración del número de cromosomas: ganar o perder un cromosoma (aneuploidía) o conjuntos de cromosomas (poliploidía), o sufrir alteraciones en sus estructuras tales como translocaciones, inversiones o deleciones. Así, a pesar de la aparición de estas mutaciones y reordenamientos genómicos, las células tumorales son capaces de continuar dividiéndose.

12) Resistencia a la muerte celular

La apoptosis es un proceso fisiológico por el cual las células se autoeliminan ante la presencia de daños irreparables e, incluso, permite el adecuado desarrollo del organismo (por ejemplo, las células interdigitales entran en apoptosis para permitir el adecuado desarrollo de los dedos). Este proceso puede activarse por dos vías: la vía intrínseca y la vía extrínseca. Por un lado, la vía intrínseca puede activarse en respuesta a diferentes alteraciones como la aparición de daño en el ADN o la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial (Giorgi et al., 2012). Por otro lado, la vía extrínseca es activada por el sistema inmune y otras señales de muerte celular. Ambas vías, tanto la intrínseca como la extrínseca, conllevan la fase de ejecución de la apoptosis. Esta fase se inicia tras la activación de la caspasa-3 la cual se traslada hasta el núcleo para catalizar la hidrólisis de las uniones entre los nucleótidos y, en consecuencia, el material genético se fragmenta. Además, la fosfatidilserina, que, en condiciones normales, se encuentra en la cara citosólica de la membrana plasmática (MP), se expone en la cara externa de la MP lo que favorecerá la atracción de macrófagos para ser fagocitados y, en consecuencia, evitará que se desencadene la respuesta inmune.

Por desgracia, las células tumorales son capaces de evadir las señales apoptóticas a través de diferentes mecanismos como son: aparición de mutaciones de pérdida de función en las caspasas; inhibición de la vía PI3K/Akt/PTEN (vía encargada de la regulación de la supervivencia y muerte celular), o bloqueo de la apoptosis por daño en el ADN. Además, las células tumorales también pueden volverse resistentes a la muerte debido a alteraciones en los procesos de autofagia o necrosis, procesos que se inician en respuesta a factores de estrés tales como la deficiencia de nutrientes, la hipoxia, el aumento de ROS o el estrés de RE.

13) Reprogramación metabólica

Debido a su elevada tasa de proliferación, así como a las condiciones del microambiente tumoral (escasez de nutrientes, condiciones de hipoxia...), las células tumorales requieren de grandes cantidades de energía. En consecuencia, y con el fin de poder abastecer sus requerimientos energéticos, las células tumorales se las ingenian para, por un lado, buscar fuentes alternativas de energía y, por otro lado, desarrollar otras rutas que permitan metabolizarlas. Tan es así que se han identificado numerosas reprogramaciones metabólicas en las células tumorales.

Un claro ejemplo de estas reprogramaciones metabólicas fue propuesto por *Warburg* ya en 1924 (Warburg, 1924). Este efecto se basa en que, en condiciones fisiológicas, las células obtienen su energía a través del metabolismo de la glucosa mediante el ciclo de Krebs. Sin embargo, en células tumorales, las cuales presentan un requerimiento energético mayor, el metabolismo de la glucosa es ineficiente debido a alteraciones en las rutas de señalización implicadas como MYC

o AKT, así como por alteraciones mitocondriales que las hacen menos funcionales. Todas estas alteraciones favorecen la captación de glucosa y un cambio metabólico que provoca que el piruvato se procese mediante el glucólisis anaeróbica lo que genera, en lugar de 38, 2 moléculas de ATP, etanol y lactato que, a su vez, desencadena la acidificación del medio. A toda esta reprogramación metabólica se le conoce como efecto *Warburg*.

14) Ganancia de plasticidad fenotípica

La organogénesis, el desarrollo y organización de las células en tejidos va acompañado de una diferenciación terminal mediante la cual las células progenitoras dejan de crecer. Esto resulta en un mecanismo antiproliferativo; es decir, constituye una barrera para la proliferación continua necesaria para la aparición o desarrollo de una neoplasia. Se han propuesto hasta tres mecanismos -desdiferenciación, diferenciación bloqueada o transdiferenciación- por los cuales las células cancerígenas son capaces de evadir la diferenciación terminal y mantener un estado de expansión similar al de la célula progenitora.

4.2 Tumores cerebrales

Los tumores del SNC abarcan un amplio espectro de cánceres que afectan tanto a niños como a adultos. Entre estos se incluyen algunos de los tipos de cáncer más agresivos y de mayor mortalidad tales como el GBM.

En la Figura 17 se muestran los datos de incidencia y prevalencia de los tumores del SNC. Como ya se indicó en el apartado “4.1.1. Incidencia”, los tumores cerebrales tienen una incidencia baja relativa, aunque se prevé una tendencia al alza en los próximos años (Figura 17A). La incidencia de los tumores cerebrales primarios depende de diferentes variables sociodemográficas tales como la edad, el sexo y la raza. En concreto, se observa una ligera mayor prevalencia en hombres que en mujeres, si bien es cierto que esta tendencia varía en función de si el tumor es benigno o maligno. Así, mientras que para los malignos se observa una mayor incidencia en hombres que en mujeres, para los tumores cerebrales benignos es al contrario. En cuanto a la edad, se observa un aumento de la incidencia con esta, aumento que se hace aún más notable a partir de los 65 años. Además, a medida que aumenta la edad, el pronóstico suele ser peor. Esto se debe, principalmente, a las características biológicas de los tumores y a las escasas opciones terapéuticas. Cabe destacar que, en cuestión de la raza, todo parece indicar que los caucásicos presentan la mayor incidencia de tumores cerebrales malignos (Figura 17B). Otros factores de riesgo de desarrollo de tumores cerebrales que se han propuesto son los antecedentes familiares tales como casos previos de glioma familiar, factores de riesgo exógenos como la radiación ionizante, o factores endógenos como la presencia de síndromes raros tales como el síndrome de *Li-Fraumeni* o el síndrome de *Cowden*, infección por citomegalovirus o virus Epstein-Barr. Sin embargo, la mayoría de los casos surgen de forma esporádica.

La mayor parte de los tumores cerebrales son de carácter benigno, siendo el meningioma (MG) el de mayor incidencia, seguido por los tumores hipofisarios. En cuanto a los tumores cerebrales malignos, representan cerca del 30 % de todos los tumores cerebrales (Figura 17C). De entre los malignos, los dos más frecuentes son el GBM, que representan el 49 % de los tumores cerebrales malignos y el 15 % de los tumores cerebrales en general, y los gliomas de grado inferior con infiltración difusa, que suponen cerca del 32 % de los tumores cerebrales malignos (Figura 17D). Cabe destacar que estos no son los únicos, también hay otros tipos de tumores cerebrales malignos con menor incidencia entre los que destacan el linfoma primario del sistema nervioso (7 %), las formas malignas de ependimoma (3 %) y los meningiomas malignos (2 %).

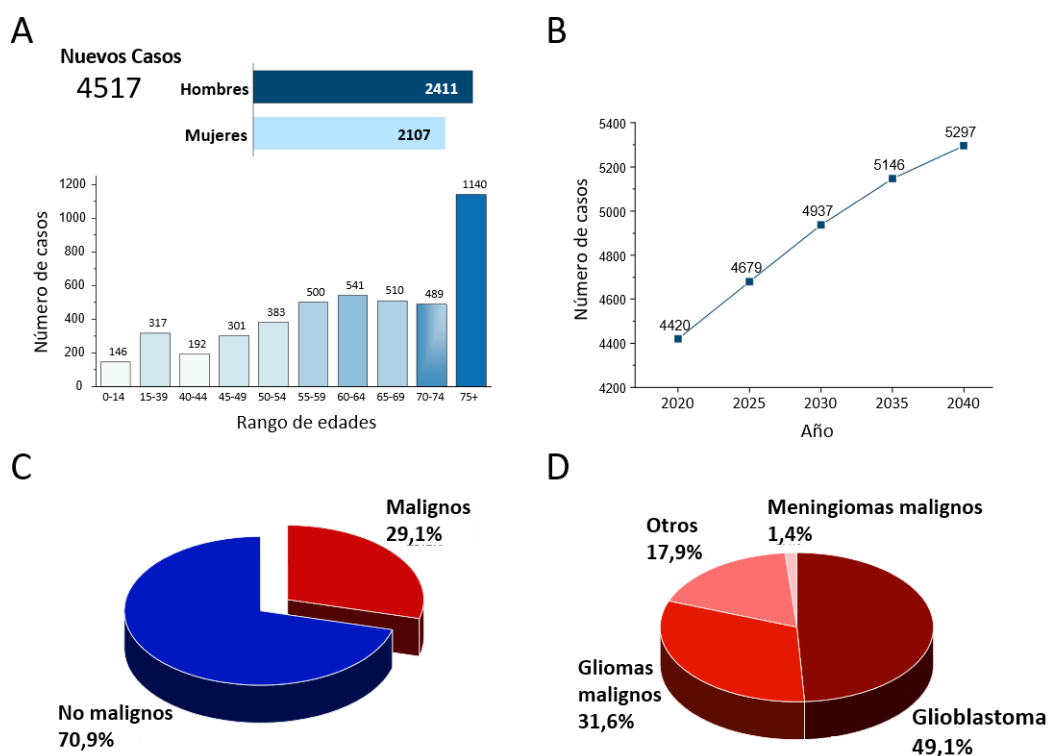


Figura 17. Incidencia de tumores del SNC en España. A. Número de casos nuevos registrados en España en el año 2022 y su distribución según sexo y edad. Los tumores del SNC son más frecuentes en hombres que en mujeres; su incidencia aumenta con la edad. B. Tendencia esperada en el número de casos de tumores del SNC en los próximos años. C. Incidencia de tumores del SNC benignos, en azul (70,9 %), y malignos, en rojo (29,1 %). D. Incidencia de los diferentes tipos de tumores malignos del SNC representados en escala de rojos, donde el color más intenso representa mayor incidencia, como es el caso del GBM.

El cuadro clínico de estos tumores cursa con la aparición de deterioro cognitivo, dolor de cabeza, convulsiones y alteraciones en el comportamiento y la conducta. Por ello, ante la aparición de alguno de estos síntomas, es importante recurrir a técnicas diagnósticas como la resonancia magnética (RM). Así, si se confirmara el diagnóstico mediante esta técnica, se procedería con la caracterización histopatológica y molecular con el fin de determinar el tipo de tumor y, por ende, proponer el tratamiento más adecuado para el tumor en cuestión.

La línea de actuación varía según el tipo de tumor, pero, de forma general se basa en la resección quirúrgica segura máxima posible seguida de tratamiento con radioterapia y quimioterapia (habitualmente con el fármaco temozolomida -TMZ-). No obstante, cabe destacar que, a menudo, la resección quirúrgica es compleja debido a la capacidad de invasión/infiltración celular difusa del tumor en el cerebro. En consecuencia, esto conlleva que la tasa de supervivencia relativa sea del 35 % a 5 años vista para los tumores malignos y otros tumores del SNC (Kukreja et al., 2022).

En cuanto a su clasificación, esta es compleja. En concreto, en la actualidad, se emplea la quinta edición de la clasificación de tumores del SNC de la OMS (OMS CNS5) propuesta en 2021, la cual se basa en características moleculares e histológicas (Louis et al., 2021). A continuación, en los siguientes apartados se hablará de esta clasificación y, posteriormente, se hará mención especial al GBM pues es el tipo de tumor en el cual se ha centrado la presente tesis. En concreto, se mencionarán los factores de riesgo, las técnicas diagnósticas y los diferentes tratamientos existentes.

4.2.1 Clasificación

Las características histopatológicas han formado, tradicionalmente, la base para la caracterización y clasificación de los tumores del SNC. Sin embargo, dichas características pueden ser heterogéneas dentro de un tumor determinado, lo que puede provocar un posible error de muestreo y subestimar el comportamiento biológico del tumor. Los cambios genéticos y moleculares parecen más uniformes, lo que da lugar a un diagnóstico más adecuado. Por ello, la información molecular se ha vuelto importante a la hora de lograr una mayor precisión en el diagnóstico, en mejorar el pronóstico y en una mejor evaluación de las diferentes opciones de tratamiento para el paciente; es decir, constituyen una herramienta importante para la medicina personalizada. Esto refuerza el uso de una estructura en capas, propuesta por Haarlem (Louis et al., 2014), para el diagnóstico de los tumores del SNC en la cual se integra toda la información disponible. Es decir, se basa en la combinación de características histopatológicas, de la clasificación de la OMS del SNC y de las alteraciones moleculares identificadas.

En 2016, la OMS incluyó, por primera vez, en la clasificación de estos, criterios histopatológicos e información molecular (Louis et al., 2016). Sin embargo, a medida que avanza la identificación de posibles biomarcadores moleculares en el diagnóstico de tumores cerebrales, surgen nuevos desafíos sobre cómo organizar su clasificación. Es más, en algunas ocasiones, la identificación de nuevos biomarcadores hace que se defina mejor el tipo tumoral, respaldando así la clasificación. No obstante, cabe destacar que, en ciertas ocasiones, no es posible diagnosticar el tumor mediante métodos moleculares.

Por ello, en 2021, la OMS publicó una actualización de dicha clasificación, la quinta edición (WHO CNS5). Esta incluye cambios sustanciales debidos al avance en el diagnóstico molecular de los tumores del SNC, si bien es cierto que mantiene las bases de la anterior. Es decir, la clasificación actual de los tumores del SNC se basa tanto en la histología como en la información molecular (Louis et al., 2021). De esta forma, la clasificación que, actualmente, está vigente presenta las siguientes características:

- La nomenclatura del tumor se indica mediante las categorías “tipo” y “subtipo”.
- Las alteraciones moleculares se indican de la siguiente forma: el nombre de los genes se escribe en cursiva, mientras que el de las proteínas o grupos de genes no.
- La longitud del tumor debe indicarse en milímetros (mm) para evitar el uso de decimales.
- Implementa el uso de números arábigos (1, 2, 3 y 4) para hacer referencia al grado de malignidad del tumor, dentro de un tipo de tumor determinado. Este grado de malignidad se asigna evaluando el potencial proliferativo y el fenotipo agresivo e invasivo.

Cabe destacar que no siempre se pueden llevar a cabo pruebas moleculares debido a la falta de recursos o bien a la calidad/cantidad de la muestra de tejido, por lo que se ha hecho necesario introducir o definir dos categorías: NOS y NEC. Por un lado, el término NOS (“no especificado de otra manera”) se incluye en los casos en los que la información molecular es insuficiente o no está disponible para realizar el diagnóstico específico. Por otro lado, el uso de NEC (“no clasificado en otra parte”) implica que se han realizado análisis adecuados pero que los resultados no proporcionan un diagnóstico preciso (Komori, 2022).

Dado el amplio espectro de tumores cerebrales y su complejidad, la presente tesis se ha centrado, únicamente, en los siguientes tumores cerebrales: neurinomas (SW), meningiomas

(MG), gliomas y metástasis cerebrales. Por ello, a continuación, se explica, brevemente, cada uno de ellos.

4.2.1.1 *Neurinomas*

Los Neurinomas (SW) son un tipo de tumores cerebrales que se conocen también bajo el nombre de *Schwannomas* puesto que derivan de las células de *Schwann*. Estas células son las responsables de formar la mielina que rodea los nervios periféricos. Aunque es de carácter benigno, su crecimiento puede comprimir las estructuras nerviosas cercanas y dar lugar a diferentes síntomas relacionados con dicha compresión. Entre los diferentes neurinomas, el más común es, el neurinoma del acústico el cual se origina en el nervio vestibulococlear, por ello, a veces se le denomina tumor del nervio auditivo. Algunos de los síntomas más comunes son la pérdida auditiva, zumbido en el oído afectado o dificultad para mantener el equilibrio.

4.2.1.2 *Meningiomas*

Es un tumor intracraneal primario con una incidencia anual de aproximadamente 8,6 casos por cada 100.000 habitantes. Su incidencia aumenta con la edad, especialmente a partir de los 65 años, y predomina en mujeres. Constituyen un tipo de tumor único el cual engloba hasta 15 subtipos. Su clasificación se basa, principalmente, en la presencia o no de mutaciones en el gen *NF2*. Los meningiomas convexos suelen presentar mutaciones en *NF2* y comprenden fenotipos fibroblásticos y de transición. Los más comunes son los de grado 2 y 3. Los meningiomas no *NF2* suelen tener su base en el cráneo e incluyen fenotipos menioteliales y secretores. En el caso de meningiomas atípicos agresivos y meningiomas con histopatología limítrofe de grados 2 y 3, se debe analizar la presencia de mutaciones en *TERTp* y la pérdida homocigótica de *CDKN2A/B* y, en el caso de que estas mutaciones están presentes, se designan como meningiomas de grado 3. La mayoría de las personas diagnosticadas con meningiomas se curan mediante la resección quirúrgica y radioterapia. Sin embargo, cuando las características histopatológicas del tumor son más agresivas y/o la resección es incompleta, a menudo reaparecen.

4.2.1.3 *Gliomas*

Los gliomas son tumores cerebrales primarios con origen en las células gliales del SNC. Estos son frecuentes en adultos y suponen, aproximadamente, entre el 30-45 % de los tumores cerebrales. Engloban a un grupo muy heterogéneo de tumores cerebrales clasificados, originalmente, según el tipo celular; es decir, según sus células precursoras y su grado de malignidad. Sin embargo, tal y como se comentó anteriormente, la quinta edición de la clasificación de los tumores del SNC de la OMS en 2021 establece una clasificación basada en características histopatológicas y aspectos moleculares como son las mutaciones en isocitrato deshidrogenasa (*IDH*) o la codeleción 1p/19q, entre otros. De esta forma, los gliomas se dividen en dos categorías principales: gliomas difusos o no difusos (Figura 18).

Los gliomas difusos se caracterizan porque sus células poseen la capacidad de migrar a grandes distancias hacia el parénquima cerebral lo que dificulta la resección quirúrgica total. Dentro de la categoría de gliomas difusos se incluye a los astrocitomas (AT) y a los oligodendrogliomas (ODG). Además, se evalúa el grado del tumor en función de la actividad mitótica, necrosis y/o proliferación microvascular. En cuanto a los gliomas no difusos o circunscritos y, a diferencia de los gliomas difusos, suelen estar más localizados; es decir, presentan márgenes bien definidos. Los gliomas no difusos suelen presentar comportamientos biológicos benignos que podrían tratarse con resección quirúrgica completa. En esta categoría, se incluye al ependimoma y astrocitoma pilocítico (grado 1 de la OMS del SNC), siendo estos los más comunes.

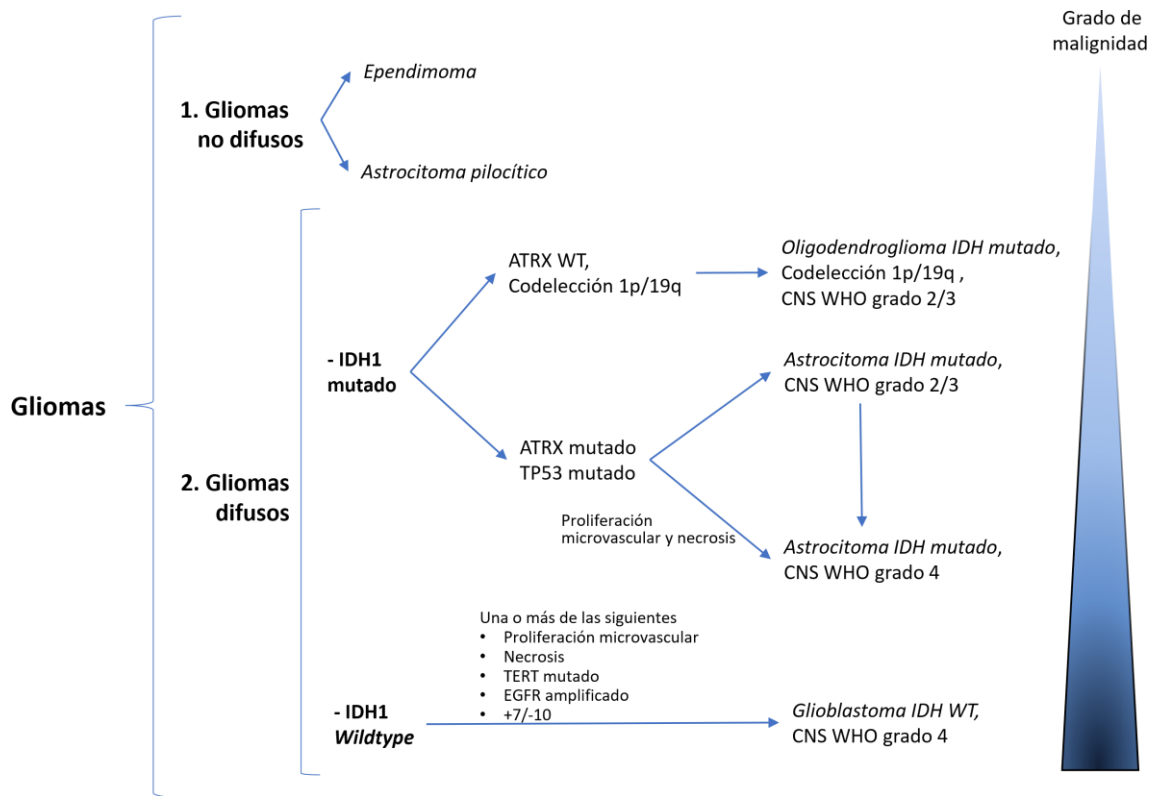


Figura 18. Clasificación de los gliomas. En el esquema se muestra la clasificación de los gliomas. Basado en (Torp et al., 2022).

➤ Gliomas no difusos

Los gliomas no difusos o circunscritos se caracterizan por tener un crecimiento más localizado y, en consecuencia, no tienen tendencia a infiltrarse ampliamente en el tejido cerebral circundante. Estos gliomas suelen tener un mejor pronóstico ya que su resección quirúrgica es más efectiva. Algunos de los gliomas no difusos más comunes son el ependimoma o el astrocitoma pilocítico:

- **Ependimoma:** surgen de las células ependimarias del SNC, células que revisten los ventrículos del cerebro y el canal central de la médula espinal, responsables de la producción de líquido cefalorraquídeo. Aunque pueden aparecer a cualquier edad, son más frecuentes en niños y en adultos jóvenes.
- **Astrocitoma pilocítico:** es el glioma no difuso más común. Se presenta con mayor frecuencia en niños y en adolescentes. Por lo general, se localizan en el cerebelo, aunque pueden aparecer en otras partes del cerebro y médula espinal. Aunque es un tumor de crecimiento lento, puede causar síntomas por su efecto de masa o por bloquear el flujo del líquido cefalorraquídeo.

➤ Gliomas Difusos

Se caracterizan por su tendencia a infiltrar en el tejido cerebral circundante de manera extensa, lo que dificulta su resección total. Debido a esta capacidad de infiltración, son tumores más agresivos, con peor pronóstico y, a pesar de su resección, a menudo, reaparecen después del tratamiento. La identificación de características genéticas y moleculares han jugado un papel crucial en la clasificación de estos. Por ejemplo, la identificación de mutaciones puntuales en los genes *IDH1* y *2* ha sido un gran impulsor de la clasificación de los gliomas difusos junto con la identificación en 1994 de la codelección 1p/19.

De acuerdo con la ausencia o presencia de mutación en los genes *IDH1* e *IDH2*, los gliomas difusos se clasifican en dos grupos: GBM o AT *IDH wild type (WT)*, aquellos que no tienen *IDH* mutado, y AT *IDH* mutado, aquellos que presentan mutación. A su vez, cada tipo de tumor se clasifican según el grado del tumor (2, 3, 4) que, según la OMS, se hará atendiendo a parámetros histopatológicos de necrosis y/o proliferación microvascular, generalmente evaluando el índice proliferativo Ki-67 el cual aumenta significativamente con el grado del tumor (Figura 19).

- **IDH mutado:** Los gliomas que presentan el gen *IDH* mutado (*IDH1* o *IDH2*) se caracterizan por tener un mejor pronóstico que los que son de tipo WT. Constituyen un tipo de tumor único y, a su vez, se subdividen en dos grupos en función de la presencia o ausencia de otros marcadores moleculares como la codeleción 1p/19q. Dentro de cada tipo/subtipo de tumor, se clasifican en función del grado de malignidad:
 - **Oligodendrogliomas (ODG):** presentan codeleción del brazo corto del cromosoma 1 (1p) y del brazo largo del cromosoma 19 (19q), *1p/19q*. Además, suelen presentar la pérdida de expresión de *ATRX* y/o *TP53*. En función de su tasa de proliferación, se pueden clasificar en grado 2 o 3. Generalmente, responden de forma más favorable a la quimioterapia y radioterapia.
 - **Astrocitomas (AT):** se caracterizan por presentar mutación en *ATRX* y *TP53*. A su vez, la evaluación de su actividad mitótica y del grado de necrosis, permite clasificar a estos tumores en dos grupos. Por un lado, de grado 2 o 3, que son aquellos tumores que presentan una tasa de proliferación relativamente baja y no presentan necrosis. Por otro lado, si la tasa de proliferación es alta y se evidencia necrosis, entonces se corresponden con grado 4 o GBM. Cabe destacar que los tumores de grado 2 o 3 pueden evolucionar a grados superiores.
- **IDH WT o Glioblastomas:** también denominados astrocitomas de grado 4. Los GBM se clasifican, a su vez, atendiendo al grado del tumor establecido por la OMS, según su tasa de proliferación o necrosis. Los AT considerados de grado 2 o 3 no presentan necrosis o proliferación vascular, mientras que los de grado 4, GBM, suelen presentar necrosis y/o proliferación microvascular. Sin embargo, puesto que todos ellos se comportan de forma similar, en su clasificación se incluye la evaluación de otras alteraciones moleculares que puedan predecir su comportamiento agresivo. Algunas de estas alteraciones moleculares son la amplificación de EGFR, mutaciones en la región promotora del gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa (*TERTp*), la ganancia del cromosoma 7 o la pérdida del cromosoma 10. Por lo tanto, un AT difuso *IDH WT* que presente, al menos, alguna de las anteriores alteraciones moleculares, permite su diagnóstico como AT *IDH WT* de grado 4 de la OMS, también llamado GBM *IDH WT* de grado 4 (Torp et al., 2022).

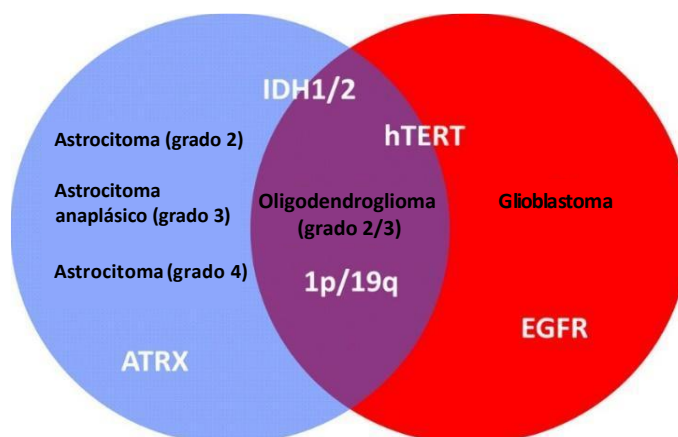


Figura 19. Relación entre los marcadores moleculares y los diferentes tipos de gliomas. En rojo se representan los glioblastomas, en azul los astrocitomas de grado 2, 3 y 4, mientras que en morado los oligodendrogliomas. Modificado de (Thakkar et al., 2014).

4.2.1.4 Metástasis cerebrales

No surgen en el SNC, sino que son el resultado de la diseminación de células cancerígenas de un tumor primario localizado en otra parte del cuerpo que han sido capaces de migrar hasta el cerebro. Curiosamente, a pesar de que este proceso es complejo, son más habituales que los propios tumores cerebrales primarios. La aparición de metástasis cerebrales se desencadena cuando las células, a través de modificaciones genéticas y moleculares, adquieren la capacidad de invadir tejidos circundantes y logran entrar al torrente sanguíneo o sistema linfático. Una vez en el torrente sanguíneo o sistema linfático, las células cancerígenas se convierten en células tumorales circulantes. A pesar de que no todas las células sobrevivirán, las que lo hacen se adhieren al endotelio y atraviesan la barrera hematoencefálica. Una vez que atraviesan la barrera protectora, las células tumorales podrán colonizar el tejido cerebral, donde comenzarán a proliferar y, en consecuencia, darán lugar a tumores secundarios; es decir, metástasis cerebrales. Los tumores primarios que metastatizan en el cerebro con más frecuencia son el cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma maligno, cáncer renal y cáncer de colon. La presentación clínica de estas depende de la ubicación y del tamaño de estas lesiones, al igual que ocurre con los tumores cerebrales primarios. Los síntomas más comunes incluyen dolores de cabeza, náuseas, problemas en el equilibrio o de coordinación, convulsiones, entre otros.

4.3 Glioblastoma

Debido a la relevancia de este tipo tumoral a lo largo de la tesis, se ha creído necesario explicarlo en un apartado aparte. Así, en los siguientes párrafos se describirá, brevemente, este tipo de tumor.

4.3.1 Aspectos generales: Incidencia y prevalencia

Los GBM son los tumores cerebrales malignos más frecuentes, representan el 16 % de todas las neoplasias y el 49 % de las neoplasias malignas del SNC. Su incidencia es relativamente baja respecto a otros cánceres como el cáncer de pulmón o mama. De hecho, cada año se diagnostican 3 nuevos casos por cada 100.000 personas con una edad mediana de 64 años. Estos se desarrollan mayoritariamente en el cerebro, aunque también pueden desarrollarse en el tronco del encéfalo y la médula espinal. Cabe destacar que el 61 % de todos los GBM se observan en los lóbulos del cerebro: 25 % en el lóbulo frontal, 20 % lóbulo temporal, 13 % lóbulo parietal y 3 % en el lóbulo occipital.

Los GBM y AT de grado 4, son tumores cerebrales devastadores y refractarios al tratamiento. Por un lado, los GBM se corresponden con el fenotipo IDH WT y aparecen en pacientes sin antecedentes clínicos de tumores cerebrales. Por otro lado, los AT de grado 4, pueden surgir a partir de tumores de bajo grado que se caracterizan por presentar IDH mutado. Cabe destacar que la mayoría de los GBM, que suponen el 90 % de los casos, se caracterizan por presentar un peor pronóstico y aparecer en pacientes de edad más avanzada que los AT de grado 4.

Este tipo de tumores se caracteriza por su alta vascularización, heterogeneidad y capacidad para infiltrar en la sustancia blanca adyacente. Estas características le confieren un carácter muy agresivo y, por tanto, presentan un fatal pronóstico con, por lo general, una tasa de supervivencia a 5 años inferior al 5 % y una supervivencia entre 16-21 meses tras el diagnóstico. Además, desafortunadamente, los GBM presentan una alta capacidad de recidiva las cuales, en su gran mayoría, se originan a menos de 2 cm de la neoplasia original, lo que podría explicar su mal pronóstico. Sin embargo, la capacidad de metastatizar de estos tumores es muy baja, pues menos del 2 % desarrollan metástasis extracraneales debido, en parte, a la barrera hematoencefálica. La calidad de vida de los pacientes disminuye de forma progresiva a medida que aumentan los síntomas causados por la infiltración y/o el crecimiento del tumor en otros tejidos del cerebro. En cuanto a su tratamiento estándar, se incluye la resección quirúrgica máxima y segura posible, seguida de radioterapia y quimioterapia con TMZ.

Estudios del perfil genómico de este tipo de tumores, algunos de los cuales llegaron a secuenciar más de 600 genes de más de 200 muestras de tumores, revelaron el complejo perfil genético de los GBM, identificando un conjunto de vías de señalización que se muestran alteradas en el GBM (Parsons et al., 2008). Esas alteraciones convergen en tres vías de señalización: la vía de señalización p53, la vía de señalización de TKR/Ras/PI3K, y la vía de la retinoblastoma. La alteración de estas vías da lugar a una proliferación celular descontrolada y a una mayor supervivencia celular, al tiempo que permite que la célula tumoral escape de los puntos de control del ciclo celular, senescencia y apoptosis. Además, se han reconocido alteraciones moleculares de expresión génica como la sobreexpresión del EGFR, mutaciones del homólogo de fosfato y tensina (PTEN) y la codeleción 1p/19q. En el GBM secundario, se observan, con frecuencia, mutaciones en IDH1, mutaciones en p53 y la codeleción 1p/19q.

4.3.2 Factores de riesgo

El principal factor de riesgo para el desarrollo de GBM es la edad, pues su incidencia aumenta con la edad, siendo aún más notable a partir de los 65 años. Además, a medida que aumenta la edad, el pronóstico suele ser peor. Esto se debe, principalmente, a las características biológicas de los tumores y a las escasas opciones terapéuticas. También existen otros factores de riesgo, como casos previos de glioma familiar, externos como la radiación ionizante, o endógenos como la presencia de síndromes raros tales como el síndrome de *Li-Fraumeni* o el síndrome de *Cowden*, infección por citomegalovirus o virus *Epstein-Barr*. A pesar de todo este conjunto de factores de riesgo, cabe destacar que la mayoría de los casos tienen lugar de forma esporádica.

4.3.3 Diagnóstico

Actualmente, no existe un procedimiento estándar capaz de detectar de forma precoz los tumores del SNC. Por ello, su diagnóstico se suele realizar tras la aparición de síntomas, mediante técnicas de imagen y la posterior confirmación mediante biopsia. A continuación, se detallan los procedimientos diagnósticos más habituales.

4.3.3.1 Diagnóstico clínico

El diagnóstico de los tumores cerebrales comienza por su sintomatología, pues la variedad de los síntomas depende tanto del tamaño como de la ubicación del tumor en el cerebro. Por lo general, los pacientes presentan déficits neurológicos focales, cefaleas (intermitentes y de intensidad variable), convulsiones y cambios en la personalidad. Respecto al déficit neurológico, este provoca un deterioro progresivo neurológico el cual puede aparecer de forma insidiosa durante meses y evolucionar con el tiempo; además, dependerá de la zona en la que se desarrollan. Cabe destacar que la aparición de todos estos síntomas es consecuencia de la compresión, infiltración y/o desplazamiento del tejido cerebral sano causado por una hipertensión craneal. Por lo tanto, cuando se presentan algunos de estos síntomas, el siguiente paso es utilizar técnicas de imagen para el diagnóstico.

4.3.3.2 Diagnóstico radiológico

Una de las técnicas más empleadas es la imagen por RM con contraste (generalmente con gadolinio). El uso de contraste aumenta notablemente la sensibilidad de la técnica, pues dicho contraste realza la masa tumoral lo que, a su vez, permite definir los límites tumorales macroscópicos. Además, esta técnica resulta muy útil para monitorizar la respuesta al tratamiento y la progresión de la neoplasia (Figura 20).

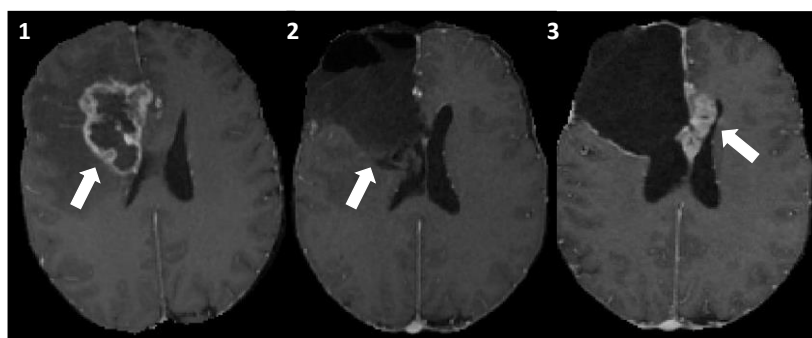


Figura 20. Imágenes de resonancia magnética, diagnóstico y evolución de un GBM. Imágenes axiales de resonancia magnética tras la administración de contraste con gadolinio. (1) Imagen preoperatoria, se observa masa irregular, heterogénea (flecha blanca) asociada con GBM localizado en el lóbulo frontal derecho. (2) Imagen postoperatoria, un mes tras la resección quirúrgica. La flecha indica la zona de la que se resecó el GBM. (3) Imagen postoperatoria, 18 meses tras el diagnóstico, en la que se observa la recidiva del tumor (flecha blanca) en el hemisferio contrario, con edema periférico (imágenes cedidas por el servicio de neurocirugía del HURH de Valladolid).

Otras técnicas de diagnóstico por imagen utilizadas son la tomografía computerizada o la tomografía por emisión de positrones (PET).

4.3.3.3 Diagnóstico molecular

El diagnóstico definitivo se basa en un análisis histopatológico del tumor mediante el que se evalúa el índice mitótico, necrosis o neovascularización. Además, mediante inmunohistoquímica, se analiza la expresión de marcadores moleculares claves los cuales permiten clasificar o identificar el tipo tumoral de forma más precisa (tal como se ha descrito en el apartado “4.2 Clasificación”). Las alteraciones genéticas más importantes en gliomas son las mutaciones en el gen IDH1/2, codeleción 1p/19q, EGFR, o ATRX. Además, también se evalúa su índice de proliferación Ki-67. A continuación, se explican brevemente cada uno de ellos:

- **IDH1:** La mutación en IDH1 es la más frecuente, se encuentra en un 50-80 % de los casos de gliomas de bajo grado (AT y ODG) y GBM secundarios. Únicamente, en un 3 % de los casos se han identificado mutaciones en el gen IDH2. Estas son mutaciones con un elevado potencial cancerígeno; sin embargo, se asocian con la aparición, en pacientes jóvenes de glioblastomas secundarios y con mayor supervivencia global. Así, la aparición de mutaciones en IDH1 o en IDH2 se relacionan con un mejor pronóstico y una mejor respuesta al tratamiento en comparación con los tumores IDH-WT.

IDH es una enzima citoplasmática que, en condiciones normales, catalizan la descarboxilación oxidativa de D-isocitrato en α -cetoglutarato y NADPH. Sin embargo, cuando está mutada (mutación en su dominio catalítico R132H para IDH1 y R172 para IDH2), su función se ve alterada y, en consecuencia, la reacción no se detiene en el α -cetoglutarato, sino que se desencadenan nuevos procesos de catálisis, de tal forma que el α -cetoglutarato se convierte en 2-hidroxiglutarato (2-HG), un oncometabolito. Este puede intervenir en múltiples procesos celulares, incluida la modificación epigenética del ADN lo que, a su vez, puede favorecer la oncogénesis (Figura 21).

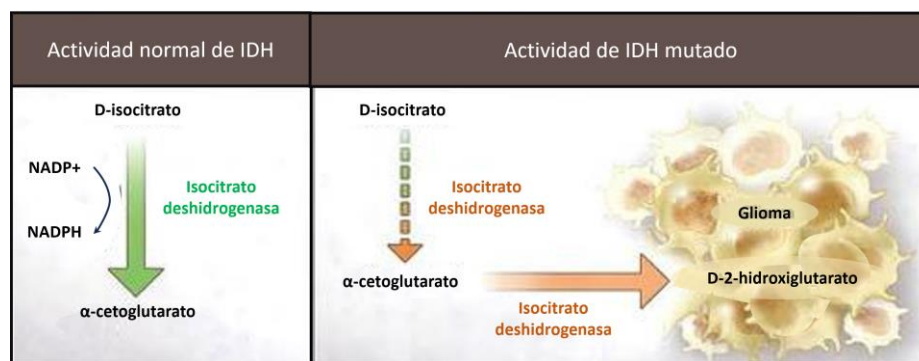


Figura 21. Actividad de IDH. A. En condiciones fisiológicas, IDH cataliza la conversión de D-isocitrato en α -cetoglutarato. B. Si el gen *IDH* está mutado, la actividad de esta enzima se ve alterada, de forma que el proceso no se detiene en el producto α -cetoglutarato, sino que continúa y tiene lugar la conversión del α -cetoglutarato en D-2-hidroxiglutarato, un oncometabolito. Modificado de <https://www.savallnet.cl/cienciaymedicina/progresosmedicos/18154.html>

- **Codeleción 1p/19q:** esto se refiere a la pérdida simultánea del brazo corto del cromosoma 1 (1p) y el brazo largo del cromosoma 19 (19q). La presencia de esta codeleción es esencial para el diagnóstico de ODG, habitualmente junto con la aparición de mutaciones en IDH1 o IDH2. La presencia de esta codeleción es un factor predictor de mejor pronóstico y de una respuesta favorable al tratamiento.
- **ATRX:** esta proteína está implicada en el remodelado de la cromatina y tiene un papel esencial en la replicación del ADN y en la estabilidad de los telómeros. La presencia de dicha mutación se asocia con gliomas de bajo grado (1 y 2) y glioblastomas secundarios. La presencia de dicha mutación suele ir acompañada de mutaciones en los genes K, así como de la codeleción 1p/19q. De forma general, la presencia de la mutación en ATRX suele indicar un pronóstico más favorable frente aquellos que no la tienen.
- **EGFR:** este es un receptor transmembrana el cual tiene un dominio citoplasmático que contiene una tirosina quinasa con capacidad de activar vías oncogénicas. La aparición de mutaciones en este gen, tales como EGFR VIII (expresado en un 20-30 % de los casos de GBM), dan lugar a una actividad tirosina quinasa constitutiva lo que, a su vez, promueve una mayor proliferación, resistencia a terapia, migración e inhibición de la apoptosis.

- **Ki-67:** se trata de una proteína nuclear asociada con la proliferación celular la cual se expresa en todas fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis), pero no en las células en fase de reposo (fase G0). Por ello, se utiliza para evaluar la tasa de proliferación celular mediante el porcentaje de células tumorales que presentan Ki-67. Esto se relaciona de forma positiva con el grado del tumor, con una mayor progresión y con un peor pronóstico.

4.3.4 Tratamientos

El GBM es un tumor sólido que no sólo es una masa homogénea de células neoplásicas, sino que alberga nichos diferentes con distintos tipos de celulares, lo que en conjunto se denomina microambiente tumoral. Se ha descrito que este microambiente consta de células madre de tumores cerebrales, células endoteliales y regiones hipóxicas, células inmunitarias, astrocitos, células madre neuronales y células madre mesenquimales. A diferencia de otros tumores sólidos, los GBM se infiltran ampliamente en el tejido circundante, pero rara vez metastatizan en otros órganos. Debido a su potencial infiltrativo, la resección quirúrgica, por sí sola, es insuficiente para erradicar el tumor, lo que hace necesario el uso de radioterapia y quimioterapia. Por todo ello, el tratamiento del GBM requiere de un enfoque multidisciplinar. No obstante, la combinación de estos tratamientos no es suficiente para acabar con el tumor y/o mejorar la supervivencia de los pacientes. Por ello, se están realizando numerosos esfuerzos para encontrar nuevos tratamientos (ver apartado “4.3.4.1. Tratamientos actuales”) que mejoren el pronóstico de los pacientes. Entre estos tratamientos, destaca el uso de anticuerpos monoclonales, la terapia *CAR-T cell* o el tratamiento con virus oncolíticos, entre otros (Figura 22).

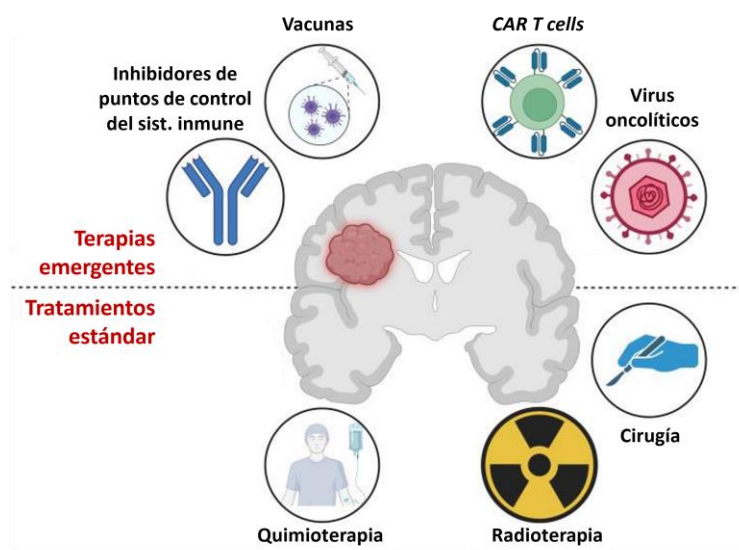


Figura 22. Esquema de los diferentes tratamientos para el GBM. En la parte inferior, se muestran los tratamientos estándar para el GBM, que incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. En la parte superior, se recogen algunas de las inmunoterapias en investigación como son los virus oncolíticos, la terapia *CAR-T cell*, las vacunas de células dendríticas y los inhibidores de puntos de control clave del sistema inmune. Modificado de (Gardam et al., 2023).

4.3.4.1 Tratamientos actuales

La terapia estándar actual incluye la resección máxima segura con el fin de que se preserven, en la medida de lo posible, las funciones neurológicas. A esto, se le complementa con un posterior tratamiento con radioterapia simultánea con TMZ, agente quimioterapéutico alquilante oral y, posteriormente, quimioterapia adyuvante con este mismo compuesto.

A pesar del uso de terapias multimodales, que incluyen la resección máxima segura, radioterapia y quimioterapia, alrededor del 70 % de los pacientes con GBM experimentan una recidiva dentro del primer año, desarrollándose de nuevo a 2-3 cm de la localización primaria. Además, menos del 5 % de los pacientes sobreviven 5 años tras el diagnóstico. Para más inri, los tratamientos estándar, a menudo, provocan déficits motores y neurológicos que alteran las habilidades físicas y disminuyen la calidad de vida de los pacientes.

Los tratamientos fracasan, principalmente, debido a las características moleculares únicas del GBM. Especialmente, debido a la presencia de una población de células madre de glioma (GSC) con capacidad de autorrenovación y tumorigenicidad que las hace resistentes a los tratamientos de radioterapia y quimioterapia (expresan CD133, A2B5 y EGFRvIII). Además, las células tumorales de GBM son altamente invasivas y tienden a infiltrarse en el tejido cerebral normal adyacente a la zona del tumor, lo que dificulta la resección total del tumor y limita el efecto de la quimioterapia. Otras características del GBM que contribuyen a su mal pronóstico son la existencia de la barrera hematoencefálica (BHE) y el estado inmunológico privilegiado del SNC. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas basadas en las vías de señalización dominantes en el tumor y perfiles genéticos pueden contribuir a mejorar los resultados de supervivencia en pacientes con GBM. Por ello, los esfuerzos en investigación continúan para la búsqueda de un tratamiento más eficaz, que mejore el pronóstico y la vida de los pacientes.

A continuación, se presentan y se explican, brevemente, los diferentes tratamientos actuales, así como sus pros y sus contras.

4.3.4.2 Quirúrgico

La cirugía es la primera opción. Sin embargo, a menudo, la resección quirúrgica es complicada debido a la capacidad de invasión e infiltración del GBM. El objetivo es eliminar el mayor volumen posible sin causar déficits neurológicos al paciente. Numerosos estudios han demostrado que una resección quirúrgica extensa se corresponde con una mayor supervivencia.

Afortunadamente, los avances tecnológicos en las técnicas de imagen y mapeo quirúrgico han permitido el desarrollo de técnicas intraoperatorias como la neuronavegación combinada con el uso de colorantes fluorescentes como el ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) el cual sirve de guía durante la resección. Esto se debe a que el 5-ALA permite distinguir entre la zona tumoral y la zona sana, logrando así maximizar la resección tumoral y minimizar los daños en el cerebro; es decir, que permite resecciones más extensas y seguras. Su administración es vía oral (20 mg/Kg de peso corporal), disuelto en agua, 3 horas antes de la anestesia. Los pacientes se protegen de la luz solar directa antes de la cirugía y se mantienen en luz tenue durante al menos 12 horas tras su administración (Roder et al., 2014).

El 5-ALA se genera a partir de sustratos del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), como la glicina y la succinil-CoA, en el primero de los ocho pasos de la biosíntesis del hemo. En condiciones fisiológicas, la concentración del grupo hemo se regula negativamente con la producción de 5-ALA. Sin embargo, si se administra 5-ALA de forma exógena, se aumenta considerablemente la producción de protoporfirinas; en concreto, la protoporfirina IX (PpIX), también conocida como hemo b. PpIX es un fotosensibilizador natural el cual emite fluorescencia roja tras su excitación con luz azul (400 nm) (Figura 23). Aunque el 5-ALA se absorbe tanto por las células normales como las tumorales, la PpIX inducida por el 5-ALA se acumula preferentemente en las células tumorales, lo que le convierte en una herramienta útil como guía intraoperatoria (McNicholas et al., 2019).

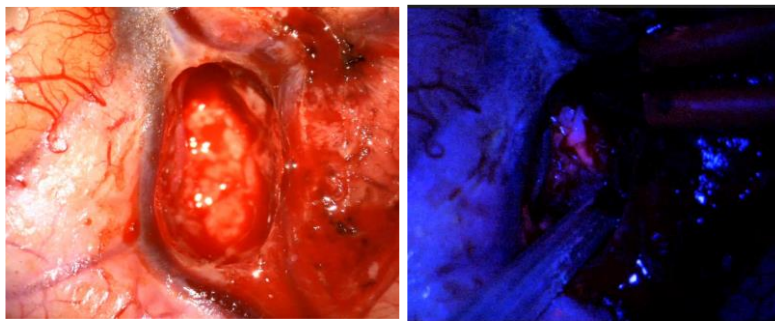


Figura 23. Detección de un GBM con 5-ALA. El 5-ALA provoca la síntesis y acumulación de porfirinas fluorescentes, predominantemente protoporfirina IX (PpIX), en tejido tumoral. La imagen de la izquierda muestra la misma cavidad de resección iluminada con luz blanca. La imagen de la derecha muestra el área de resección iluminada con luz azul en la que se observan áreas con fluorescencia intensa (fucsia), débiles (rosa claro, separadas por una línea blanca) o sin fluorescencia (imágenes cedidas por el servicio de neurocirugía del HURH de Valladolid).

La fluorescencia inducida por la administración de 5-ALA se ha observado en otros tipos de cáncer como los melanomas. Sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a la acumulación preferentemente de PpIX en las células tumorales siguen sin estar del todo claros. Las células tumorales, las cuales presentan unas mayores necesidades de energía y crecimiento, deben adaptarse para proliferar en entornos, a menudo hostiles, de estrés nutricional y con unos niveles de pH y de oxígeno reducidos.

➤ Quimioterapia

A pesar de los avances, el desarrollo de nuevas terapias para el GBM son mínimas. De hecho, el último fármaco que se introdujo, la temozolamida (TMZ), lo hizo hace más de 20 años. Este es el quimioterapéutico empleado concomitante a la radioterapia y/o posterior a ella. En el caso de gliomas de alto grado, permite aumentar, aunque no de forma llamativa, la supervivencia.

La TMZ se trata de un agente alquilante biodisponible por vía oral capaz de atravesar la barrera hematoencefálica debido a su pequeño tamaño (194 Da) y a su naturaleza lipofílica. A un pH superior a 7, se hidroliza de forma espontánea a su forma activa y actúa modificando el ADN o el ARN mediante la adición de grupos metilo (es decir, mediante alquilación) a la guanina en los sitios N7 y O6, y a la adenina en el sitio O3. Esto provoca la sustitución de timina por citosina durante la replicación del ADN, lo que genera un par de bases no coincidentes. A su vez, se desencadena la vía de reparación de errores de coincidencia del ADN, que intenta reparar el daño sin éxito, originando enlaces cruzados de ADN inapropiados y, en consecuencia, la detención del ciclo celular en G2 que, en última instancia, conduce a la apoptosis. Además, el uso de TMZ con radioterapia tiene un efecto sinérgico en la muerte de las células.

La toxicidad de la TMZ es moderada respecto a otros agentes quimioterapéuticos, aunque puede causar importantes efectos secundarios tales como la mielosupresión o la linfopenia grave (grado 3 /4), lo que se asocia con una supervivencia reducida y una respuesta deficiente a procesos inmunológicos. Además, puede provocar estreñimiento, fatiga y un ligero riesgo de desarrollar neoplasias malignas secundarias.

➤ Radioterapia

Se aplica de forma postquirúrgica o como primera opción ante tumores inoperables. Su dosis varía entre los 50 y 60 grays (Gy) en función del grado de malignidad del tumor, repartidas en dosis a lo largo de 5 o 6 semanas.

4.3.4.3 Búsqueda de nuevos tratamientos

Dados los escasos resultados de los tratamientos actuales para el tratamiento de tumores del SNC y, en concreto, del GBM, se hace necesario la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas.

Por ello, en la actualidad, se están llevando a cabo distintos ensayos con novedosas técnicas que se basan en los perfiles genéticos y epigenéticos, así como las interacciones del microambiente tumoral y el sistema inmunológico. Entre los diferentes ensayos que se están llevando a cabo, destacan los ensayos de inmunoterapia dirigida a bloquear puntos de control inmunológico, la terapia con células T con receptor de antígeno quimérico (CAR T), la viroterapia oncológica o la terapia con vacunas. Dado que una de las principales limitaciones de las terapias se debe a la administración insuficiente de fármacos debido a la BHE, se están llevando a cabo estudios para superar este obstáculo y conseguir la administración de fármacos de forma más efectiva mediante el uso de nanofármacos (Rong et al., 2022). Además, la identificación de marcadores predictivos podría ser útil para establecer tratamientos personalizados. Entre estos marcadores, destacan el factor de crecimiento epidérmico y el VEGF, ambos implicados en la progresión de los gliomas.

A continuación, se presentan algunos de estos nuevos enfoques que se están desarrollando y, en algunos casos, implementando en la actualidad.

➤ Inmunoterapia

La inmunoterapia es una modalidad de tratamiento que se basa en inducir la respuesta inmune específica del tumor para combatir, de forma selectiva, a las células tumorales. Esto se logra mediante la manipulación del propio sistema inmune del paciente. Algunas de las estrategias de inmunoterapia que se están desarrollando son la terapia CAR-T, vacunas, la desregulación de puntos de control o de células inmunes (Wilcox et al., 2018).

- **Terapia CAR-T:** se basa en el uso de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR). Las células T, las cuales, habitualmente, se extraen del propio paciente, aunque también pueden proceder de donantes (trasplante alogénico), se modifican genéticamente para expresar el CAR. El CAR se diseña de forma específica para reconocer un antígeno específico en la superficie de las células cancerígenas. Consta de un dominio extracelular, el cual se une al antígeno, y un dominio intracelular capaz de activar a la célula T para que ataque y destruya a la célula cancerígena. Una vez que las células T han sido modificadas, se expanden para obtener grandes cantidades y, a continuación, se reinfunden en el paciente. Una vez en el cuerpo, las células CAR-T buscan y reconocen las células cancerígenas que expresan el antígeno específico. Al unirse, las células CAR-T se activan y destruyen las células cancerígenas (Figura 24).

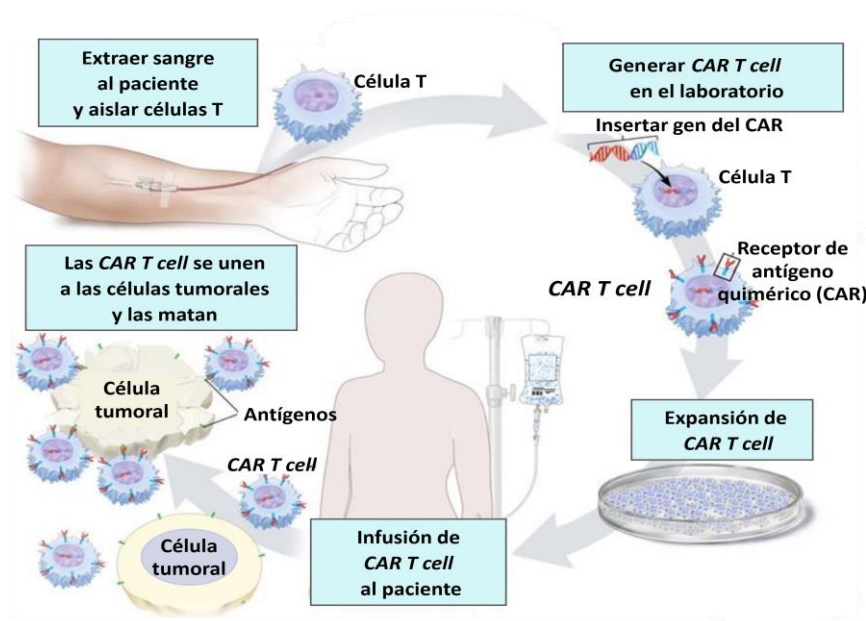


Figura 24. Diagrama de los pasos de la terapia CAR-T cell. En primer lugar, se extrae sangre de los pacientes para obtener una cantidad suficiente de células mononucleares de sangre periférica. A continuación, se aíslan las células T y se modifican genéticamente mediante la transfección de un vector viral (lentivirus o retrovirus) para expresar el receptor CAR específico en la superficie celular. Posteriormente, las células T modificadas genéticamente se expanden y se someten a un control de calidad. Finalmente, las células T modificadas se reinfunden al paciente. Modificado de (Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration, 2015).

Este tipo de terapia ha resultado ser efectiva en enfermedades hematológicas, como linfomas y leucemias. Sin embargo, su aplicación en tumores sólidos como el GBM supone aún grandes desafíos, pues implica que las células T modificadas lleguen y se infiltren en el tumor, superen el microambiente inmunosupresor y persistan lo suficiente para eliminar las células cancerígenas. Además, otro desafío que se plantea en este tratamiento contra el GBM es que estas células deben atravesar la BHE. Para ello, se están investigando diferentes estrategias para la administración directa de células CAR-T en el cerebro y técnicas que permitan aumentar la permeabilidad de la BHE.

Para el GBM, se han identificado y evaluado varios antígenos entre los que destaca el EGFRvIII. Actualmente, se están llevando a cabo más de seis ensayos clínicos de células T EGFRvIII-CAR en curso. EGFR es un receptor tirosina quinasa (TKR) implicado en el inicio y la progresión del cáncer. EGFRvIII es la mutación de EGFR más común la cual ocurre en, aproximadamente, el 45 % de los pacientes con GBM y surge de la eliminación de los exones 2 y 7, y que da lugar a un dominio extracelular truncado. Por ende, esta mutación da lugar a la activación de forma constitutiva de la señalización TKR/RAS/AKT. Hasta el momento, no hay datos concluyentes acerca de su eficacia clínica; sin embargo, esta terapia no ha mostrado toxicidad significativa (Land et al., 2020).

- **Vacunas:** el objeto de las vacunas es estimular el sistema inmunológico del paciente y atacar de forma específica a las células tumorales. Aunque el concepto de vacunación contra el GBM resulta un tratamiento prometedor, sigue siendo un área que requiere más investigación para determinar su eficacia, optimizar su diseño, administración y seguridad. En la actualidad, se están desarrollando diferentes estrategias de vacunación frente al glioblastoma, algunas de las cuales son las siguientes:

- *Vacunas basadas en péptidos:* emplean secuencias cortas de péptidos, fragmentos de proteínas, específicos de células de glioblastoma los cuales se conjugan con adyuvantes como la hemocianina de lapa californiana. Al inmunizar al paciente con estos péptidos, se busca inducir la respuesta inmune específica contra las células tumorales. Un ejemplo de estas vacunas es *Rindopepimut*, dirigida a EGFRvIII, cuyos resultados aún son controvertidos
 - *Vacunas basadas en células dendríticas:* las células dendríticas son células del sistema inmunológico que presentan antígenos a las células T y que son capaces de inducir la respuesta inmunológica. En esta estrategia, las células dendríticas se extraen del paciente, se modifican con antígenos específicos del tipo tumoral y, posteriormente, se reinfunden al paciente para estimular la respuesta inmune contra el tumor.
 - *Vacunas basadas en virus oncolíticos:* los virus oncolíticos son virus que se modifican para infectar y destruir, de forma específica, las células cancerígenas.
 - *Vacunas basadas en ADN o ARN:* estas vacunas utilizan material genético que codifica para antígenos tumorales específicos del propio tumor.
- **Inhibidores de puntos de control:** los puntos de control son proteínas presentes en las células inmunológicas, especialmente en las células T, las cuales necesitan ser activadas o inactivadas para desencadenar una respuesta inmunológica. En condiciones normales, estos puntos de control previenen que las respuestas inmunológicas sean demasiado intensas o descontroladas. Sin embargo, a menudo, las células cancerígenas aprovechan estos puntos de control para protegerse del sistema inmunológico. Por ello, el empleo de inhibidores de puntos de control, los cuales actúan desbloqueando las células del sistema inmune; es decir, activando a esta para que ataquen a las células cancerígenas, podría ser una terapia interesante (Figura 25). Algunos inhibidores de control y sus dianas se recogen a continuación:
- *PD1:* proteína localizada en la superficie celular de las células T que, al unirse a su ligando PD-L1 expresado en las células cancerígenas, inhibe la función de las células T. Los medicamentos que bloquean PD-1 o PD-L1 pueden aumentar la actividad de las células T contra células tumorales. Algunos medicamentos son *Nivolumab* o *Cemiplimab* (Huang et al., 2017).
 - *CTLA-4:* receptor del antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos. Se trata de una proteína que regula la activación de las células T. Al bloquear esta proteína con fármacos, como el *Ipilimumab*, se potencia la función de las células T.

El uso de estos inhibidores ha mostrado resultados favorables en varios tipos de cáncer, incluyendo melanoma o cáncer de pulmón. Sin embargo, no todos los pacientes responden a estos tratamientos, por lo que se hace necesario identificar biomarcadores que ayuden a predecir la respuesta de los pacientes al tratamiento.

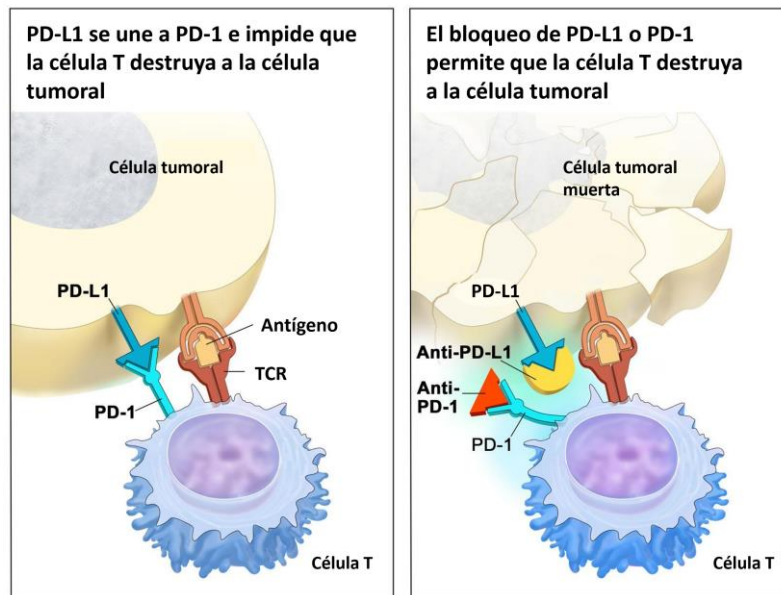


Figura 25. Terapia basada en la inhibición de puntos de control clave del sistema inmune. La unión de ligandos a puntos de control clásicos del sistema inmune, como puede ser la unión de PD-L1 (célula tumoral) a PD-1 (célula T), inhibe la proliferación de las células T, lo que favorece un ambiente inmunosupresor. Por lo tanto, el bloqueo de este tipo de uniones con anticuerpos monoclonales como *Nivolumab* se utiliza como estrategia antitumoral para permitir que el sistema inmune si detecte a las células tumorales y las destruya. Modificado de (Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration, 2017).

A pesar del potencial de la inmunoterapia, hoy en día, existen desafíos significativos en su aplicación al GBM debido al entorno inmunosupresor del tumor, la heterogeneidad del mismo y a la BHE que limita la entrada de agentes terapéuticos al cerebro.

➤ Regulación de la expresión de genes

La regulación de la expresión génica implica controlar cuándo, cómo y cuánto se expresan ciertos genes. Esto puede significar inducir la activación de genes supresores de tumores o inducir la inhibición de oncogenes -genes que promueven el crecimiento del tumor-. Algunas de las estrategias que se están explorando son:

- *ARN de interferencia (RNAi)*: se emplean moléculas pequeñas de ARN para silenciar oncogenes; de esta forma, se inhibe la progresión del tumor.
- *ARN antisentido*: se emplean moléculas de ARN diseñadas para unirse a ARN mensajeros y bloquear así su traducción a proteínas específicas del tumor.

➤ Nanopartículas

La BHE actúa como barrera protectora, evitando que sustancias potencialmente nocivas entren al SNC. Sin embargo, este mecanismo de defensa impide que los fármacos penetren en el SNC o que la biodisponibilidad de los fármacos sea baja. Para lograr una administración eficaz del agente terapéutico, se están desarrollando nanopartículas; es decir, portadores que liberen el fármaco de forma específica al tiempo que protegen su contenido, aumentando así su biodisponibilidad. Algunos ejemplos de nanopartículas que se están desarrollando son los liposomas, formados por bicapas lipídicas; nanopartículas poliméricas formadas a partir de polímeros biodegradables y biocompatibles, o magnéticas las cuales, mediante el uso de campos magnéticos externos, permiten ser dirigidas a zonas concretas.

➤ **Anticuerpos monoclonales**

La terapia con anticuerpos monoclonales se basa en el uso de anticuerpos dirigidos a genes que se postulan como biomarcadores de GBM. Así, la unión de estos anticuerpos interrumpe la transducción de señales posteriores. Algunos de los anticuerpos que se han sometido a ensayo son el *Cetuximab* y el *Nimotuzumab*, ambos dirigidos al dominio L2 de EGFR y que, por el momento, no han mostrado resultados satisfactorios

El bevacizumab es otro anticuerpo monoclonal que inhibe el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Su mecanismo de acción se basa en la unión de este a todas las isoformas del VEGF de tal forma que bloquea la interacción entre VEGF y los receptores VEGF (VEGFR). Por ello, la administración de bevacizumab puede llegar a inhibir el crecimiento de células tumorales y la formación de vasos sanguíneos. Generalmente, se administra en combinación de agentes quimioterapéuticos (Gerriets & Kasi, 2022). Este anticuerpo se emplea para tratar diferentes tipos de cáncer como el cáncer de cuello de útero o el cáncer de colon metastásico. Recientemente, obtuvo su aprobación acelerada de la FDA para el tratamiento de GBM recurrente sin completar el ensayo aleatorizado en fase III.

➤ **Epigenética y terapias epigenéticas**

La epigenética comprende varios mecanismos como las modificaciones de histonas o ADN, alteraciones no codificantes que influyen en la actividad genética sin alterar la secuencia de ADN subyacente. Otras modificaciones son la remodelación de la cromatina o los micro ARN.

En términos generales, la etiología del cáncer se complica tanto por factores hereditarios como ambientales con una desregulación epigenética subyacente. Los pacientes con cáncer pueden compartir la misma estadificación y grado de un cáncer; sin embargo, la manifestación de la enfermedad y su supervivencia pueden ser diferentes en función de sus perfiles epigenéticos. Además, en el mismo tumor, se pueden encontrar células tumorales con diversos patrones de modificaciones epigenéticas, por lo que existe una gran heterogeneidad a nivel celular. En general, el desarrollo de tumores puede resultar de la acción combinada de múltiples eventos epigenéticos. Dada las limitaciones de los tratamientos actuales, se necesitan nuevas modalidades de tratamiento.

A diferencia de otros tipos de cáncer, el tratamiento de muchos tumores cerebrales malignos sigue siendo ineficaz. Se requiere de la búsqueda de nuevas modalidades de tratamiento y, en especial, de aquellas diseñadas para atacar los mecanismos epigenéticos que parecen ser prometedores en el tratamiento de estos. El conocimiento del epigenoma continúa creciendo y puede arrojar luz sobre posibles interacciones en múltiples aspectos del cáncer, aspectos como la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores o la traducción de señales (asociadas con el crecimiento, invasión y la metástasis). Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos epigenéticos y es necesario mejorar varios de los puntos relacionados con los tratamientos enfocados a estos mecanismos.

En primer lugar, la especificidad; la mayoría de los factores epigenéticos son reguladores amplios, por lo que la inhibición específica de un solo factor con un fármaco conferirá efectos no específicos que serán necesarios controlar. En segundo lugar, la modulación de la actividad de reguladores epigenéticos, como las metiltransferasa. En tercer lugar, el diseño y el desarrollo de métodos óptimos de administración de fármacos al SNC. Los tumores cerebrales, a menudo, son difíciles de tratar debido a su ubicación y posible infiltración en áreas funcionales del cerebro a las que no se puede acceder por cirugía o que son altamente susceptibles de sufrir daños, incluso con la administración de radioterapia o quimioterapia.

Además, el método de administración debería poder atravesar la barrera hematoencefálica, el sistema protector de uniones estrechas entre el cerebro y los vasos sanguíneos, y minimizar la toxicidad para las células y tejidos sanos (Kukreja et al., 2022).

A continuación, se desglosan algunos de los mecanismos epigenéticos y se relacionan con los glioblastomas y su posible uso como dianas terapéuticas:

- **Metilación del ADN.** La metilación del ADN es un fenómeno epigenético bien caracterizado en el que las metiltransferasas del ADN añaden grupos metilo a las citosinas en los dinucleótidos CpG en las secuencias repetitivas o en las regiones promotoras de los genes, modificando o suprimiendo la transcripción genética. La metilación del ADN se puede mantener mediante la replicación del ADN y, por tanto, se trata de una modificación genética estable, pero también se puede revertir mediante una vía de desmetilación. El estado de metilación de los genes controla diversas actividades celulares como el crecimiento celular, la diferenciación celular o la progresión del tumor.

En gliomas se ha identificado la acumulación generalizada de mutaciones en el gen IDH1,2. Las proteínas mutadas IDH (prevalentes en gliomas de adultos y pediátricos) provocan un cambio en el metabolismo debido a la acumulación de D-2-hidroxiglutarato (D-2-HG), un producto erróneo del ciclo de Krebs. El D-2-HG bloquea la actividad de algunas ADN desmetilasas, lo que da lugar a la hipermetilación en muchas regiones promotoras de genes, lo que favorece el fenotipo tumoral. Por ello, se han diseñado estrategias dirigidas a tumores con mutaciones en IDH para inactivar las funciones de IDH mutado o los efectos de D-2-HG. Por lo tanto, IDH1 e IDH2 pueden considerarse funcionalmente como neoantígenos altamente específicos asociados a tumores a los que puede dirigirse la inmunoterapia.

El estado de metilación del promotor del gen MGMT puede predecir la capacidad de respuesta del paciente a la quimioterapia estándar con agentes alquilantes. En concreto, en los GBM, cuando el promotor no está metilado, MGMT se expresa activamente e invierte la alquilación en la posición O6 de un nucleótido de guanina, lo que conlleva la reparación de errores de desajuste del ADN en células tumorales y revierte los efectos de la quimioterapia. Cabe destacar que solo un 30 % de los pacientes con GBM tienen promotores MGMT metilados y muestran ausencia de expresión de MGMT. Estos pacientes responden favorablemente a los fármacos de quimioterapéuticos como la TMZ, que ha mostrado tener mejores resultados en comparación con los pacientes con promotores MGMT no metilados. Actualmente, se están llevando a cabo estudios para inducir la sensibilidad a TMZ en tumores con el promotor MGMT no metilado. Un ejemplo de estos es la inhibición de la glucógeno-sintasa quinas 3 β (GSK3 β), pues aumenta la metilación de la citosina del promotor MGMT lo cual puede mejorar la actividad de TMZ.

- **Modificación de histonas.** La acetilación de histonas es otra modificación que afecta a la expresión de genes y que es potencialmente susceptible de ser una diana terapéutica. Estas modificaciones pueden surgir en el dominio central o en los extremos N-terminal. La metilación de histonas se produce cuando las histonas metiltransferasas unen covalentemente entre dos o tres grupos metilo a residuos de arginina o lisina, respectivamente, mientras que las histonas desmetilasas revierten dicha unión. Dependiendo del residuo modificado, la metilación puede promover o inhibir la expresión de diferentes genes.
- **MicroARN.** Los ARN no codificantes, tanto los microARN (miARN) como los ARN largos no codificantes (lncARN), se consideran reguladores epigenéticos del cáncer. En concreto, los miARN desempeñan un papel fundamental en la regulación de la expresión génica ya que regulan la traducción del ARNm. Los miARN pueden funcionar como supresores de tumores u oncogenes. De forma general, están involucrados en múltiples procesos como la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN, o la angiogénesis. En concreto, en los GBM se han identificado numerosos miARN supresores de tumores los cuales están regulados negativamente en tumores cerebrales adultos, como miR-7, miR-124, miR-128, miR-138, miR-181a/b y miR138. Es decir, su disminución se asocia con un mayor crecimiento tumoral y metástasis (Shenouda & Alahari, 2009). Es importante destacar que se han detectado niveles elevados de miARN en tumores cerebrales capaces de actuar como oncogenes, como es el caso del miR-21 el cual está implicado en la proliferación, supervivencia celular, invasión y resistencia al tratamiento (Møller et al., 2012).

Actualmente, existen dos estrategias terapéuticas prometedoras dirigidas a los miARN en estudios preclínicos: una de ellas está dirigida a restaurar la función de los miARN supresores de tumores, mientras que la otra lo está a la inhibición funcional de los miARN oncogenes. Además, también se están llevando a cabo numerosos ensayos para el tratamiento de cánceres cerebrales, tanto en adultos como en niños, centrados en los mecanismos epigenéticos que incluyen tanto la metilación del ADN como la modificación de histonas.

5 HOMEOSTASIS DEL CALCIO INTRACELULAR

La homeostasis del Ca^{2+} hace referencia a una serie de mecanismos fundamentales que se encargan del equilibrio y de la regulación de los niveles de Ca^{2+} dentro de las células. El equilibrio de este catión es crucial para el correcto funcionamiento celular, ya que juega un papel vital como segundo mensajero en numerosos procesos celulares, incluyendo la señalización, la excitación-contracción muscular, la neurotransmisión, la regulación de la expresión génica, el metabolismo, la fosforilación y desfosforilación de proteínas, la proliferación, división y diferenciación celular, la motilidad celular, los acoplamiento estímulo-secreción, la muerte celular programada... En concreto, en el cerebro, el Ca^{2+} desempeña un papel crítico en numerosos aspectos de la función neuronal, incluida la señalización celular, la plasticidad sináptica y la neurotransmisión.

Para lograr esta versatilidad, el sistema de señalización de Ca^{2+} opera de muchas formas diferentes regulando los procesos celulares que funcionan en un amplio rango dinámico. En un extremo estarían procesos tales como la unión sináptica, por ejemplo, donde el Ca^{2+} desencadena la exocitosis en microsegundos. En el otro extremo de la escala estarían aquellos procesos en los que el Ca^{2+} tiene que operar durante minutos u horas para impulsar eventos tales como la transcripción de genes y la proliferación celular. La versatilidad y efectividad de las señales de Ca^{2+} es posible gracias al gradiente de concentración de Ca^{2+} , de cuatro órdenes de magnitud, entre el medio intracelular (50-100 nM) y el medio extracelular (1 mM) en estado de reposo. Además, orgánulos subcelulares como el retículo endoplasmático (RE) o los lisosomas también presentan una elevada concentración de Ca^{2+} en comparación con el citosol, similar a la del medio extracelular. Por lo tanto, para garantizar que las células funcionen de manera óptima, se debe mantener un adecuado y cuidadoso equilibrio de los niveles de Ca^{2+} . De hecho, niveles elevados de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ durante periodos largos pueden conducir a la muerte celular.

El mantenimiento de esta diferencia de concentraciones se logra a través de una compleja red de sistemas de transporte y amortiguación de Ca^{2+} que controlan, con precisión, el flujo temporal y espacial de entrada y salida de Ca^{2+} desde las células y orgánulos celulares en el rango nanomolar. En esta red están implicados numerosos sistemas de transporte altamente controlados, como los canales, intercambiadores, proteínas de unión y bombas de Ca^{2+} . Cabe destacar que esta red de transporte de Ca^{2+} es propia de cada tipo celular, pues, en función de sus necesidades y requerimientos, cada tipo celular expresará un subconjunto de los componentes de esta red de señalización y regulación de Ca^{2+} . En consecuencia, permitirá una regulación de este catión diferente en función de los componentes expresados en cada tipo celular lo cual conlleva diferentes propiedades espaciales y temporales en la señalización por Ca^{2+} .

La actividad de las neuronas está regulada por cambios en los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ que pueden desencadenarse en respuesta a distintos estímulos como la despolarización de la membrana plasmática (MP), la presencia de agentes tóxicos, agonistas extracelulares, mensajeros intracelulares e, incluso, activarse en respuesta al vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares. De forma general, un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ conlleva tanto de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular como de la liberación desde los depósitos intracelulares, es capaz de desencadenar respuestas celulares específicas, como la activación de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE). Sin embargo, es crucial que los niveles de Ca^{2+} se restablezcan a su estado basal para evitar la sobrecarga, la cual puede llegar a ser tóxica para las células nerviosas.

Como cualquier otro mecanismo fisiológico, la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular también es susceptible de verse alterada bajo ciertas situaciones patológicas. En particular, la pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el cerebro no es trivial. Es más, esta disregulación se ha implicado en diversas enfermedades que abarcan desde enfermedades neurodegenerativas como la EA hasta trastornos epilépticos e, incluso, cáncer, lo que subraya la importancia de la adecuada regulación de los mecanismos que velan por el mantenimiento de esta homeostasis en la actividad del SNC y en el funcionamiento cognitivo. Por ello, comprender los mecanismos precisos de la regulación del Ca^{2+} en neuronas y otras células del cerebro es fundamental para conocer la fisiopatología del SNC.

5.1 Sistemas de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática

El transporte de Ca^{2+} a través de la MP es fundamental para mantener la homeostasis de dicho ion. Como ya se ha dicho anteriormente, la concentración de Ca^{2+} en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$) es considerablemente menor que la del medio extracelular o la de ciertos orgánulos, lo que establece un gradiente electroquímico que favorece la entrada de Ca^{2+} a la célula. Por ello, las células han desarrollado mecanismos de transporte que modulan el flujo de entrada y salida de este ion (Figura 26).

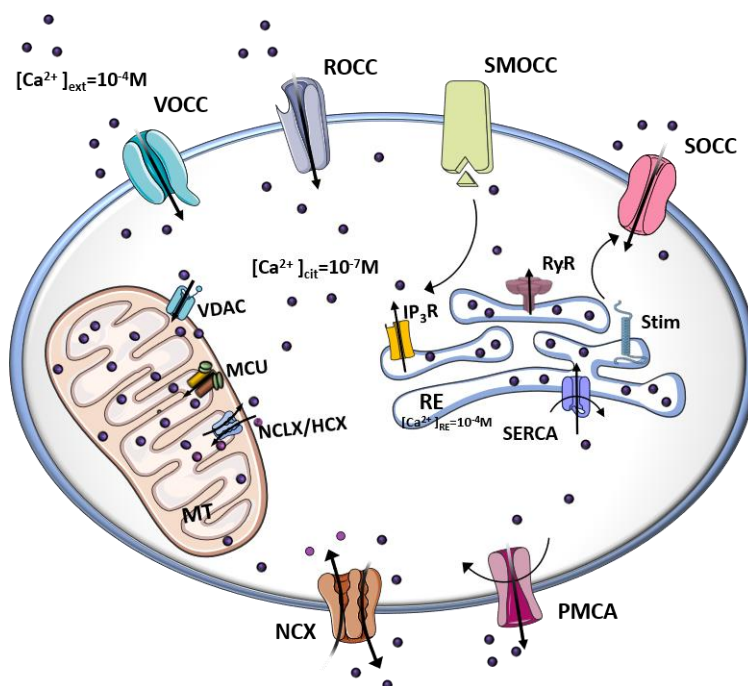


Figura 26. Homeostasis del Ca^{2+} intracelular. La célula tiene una compleja red de transporte del Ca^{2+} intracelular. El Ca^{2+} entra a la célula a favor de gradiente a través de canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCC), operados por receptor (ROCC), por segundos mensajeros (SMOCC) o por depósitos (SOCC). El Ca^{2+} sale de la célula a través de la membrana plasmática (MP) gracias a la bomba PMCA y al intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Dentro de la célula, el RE actúa como depósito de Ca^{2+} , presenta una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ de 10^{-4} M, este Ca^{2+} puede liberarse al citoplasma a través de los receptores de rianodina (RyR) o de los receptores de IP_3 (IP_3R). Además, el Ca^{2+} se introduce al interior del RE a través de la bomba SERCA. Por último, la mitocondria, cuya $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ es similar a la del citosol, también puede captar Ca^{2+} del citoplasma dado que su potencial de membrana es muy negativo (-180 mV), por lo que el Ca^{2+} entra a la mitocondria a través del uniportador mitocondrial (MCU) o los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC). La mitocondria puede liberar Ca^{2+} al citoplasma a través de los intercambiadores HCY y NCLX a cambio de introducir iones H^+ o Na^+/Li^+ , respectivamente, a su interior.

5.1.1 Mecanismos de entrada de Ca^{2+} de la membrana plasmática

La entrada de Ca^{2+} al citosol está mediada por diferentes canales iónicos como son los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOCC), los canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCC), los canales de Ca^{2+} activados por liberación de Ca^{2+} (CRAC) y los canales de Ca^{2+} transitorios de receptores (TRP).

5.1.1.1 Canales de Ca^{2+} operados por voltaje

Los VOCC se activan con la despolarización de la membrana y permiten la entrada de Ca^{2+} en respuesta a potenciales de acción y señales despolarizantes subumbrales. La entrada de Ca^{2+} a través de estos canales desencadena diferentes procesos celulares dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, en las células cardíacas y del músculo liso estos canales participan en la contracción, mientras que en las neuronas son los encargados de iniciar la transmisión sináptica. Por lo tanto, estos canales actúan de transductores de la señal y son elementos clave en la excitabilidad eléctrica. No obstante, con el fin de prevenir la sobrecarga de Ca^{2+} en respuesta a una despolarización prolongada, los VOCC poseen mecanismos de inactivación dependientes de voltaje y/o Ca^{2+} .

Estos canales, en función del umbral que induce su activación y del tipo de corriente de Ca^{2+} que originan, pueden clasificarse en dos categorías principales: (1) canales activados por alto voltaje (HVA) los cuales se abren en respuesta a grandes despolarizaciones de la membrana, y (2) canales activados por bajo voltaje (LVA), que son más sensibles y se activan por cambios de voltaje menores (hasta -70 mV). Por un lado, los HVA requieren potenciales superiores a -30 mV para su activación y, en función del tipo de corriente de Ca^{2+} que generan, se dividen en tipo L, aquellos que muestran una corriente de larga duración y una inactivación lenta, y los no-L (N, P/Q y R). Por otro lado, LVA se activan a potenciales superiores a -50 mV; es decir, son más sensibles y se activan ante pequeñas variaciones en el potencial de membrana. Además, presentan corrientes de Ca^{2+} transitorias y una inactivación rápida.

Cabe destacar que el tipo de estímulo que origina su apertura dependerá de la estructura de estos canales. Por un lado, los canales de tipo HVA son complejos proteicos heteromultiméricos que se forman por el ensamblaje de la subunidad $\text{Cav}\alpha 1$, formadora de poros, junto con las subunidades $\text{Cav}\beta$ y $\text{Cav}\alpha 2\delta$ y, posiblemente, $\text{Cav}\gamma$, además de la calmodulina (CaM). Por otro lado, los canales de tipo LVA carecen de subunidades auxiliares y funcionan como monómeros de la subunidad $\text{Cav}\alpha 1$. Por lo tanto, la subunidad $\text{Cav}\alpha 1$ es la determinante del subtipo de canal. El poro está constituido por el ensamblaje de cuatro monómeros de la subunidad $\text{Cav}\alpha 1$, cada una de las cuales contiene seis segmentos transmembrana, siendo el cuarto segmento el que actúa como sensor de voltaje, ya que contiene unos aminoácidos cargados positivamente (Figura 27).

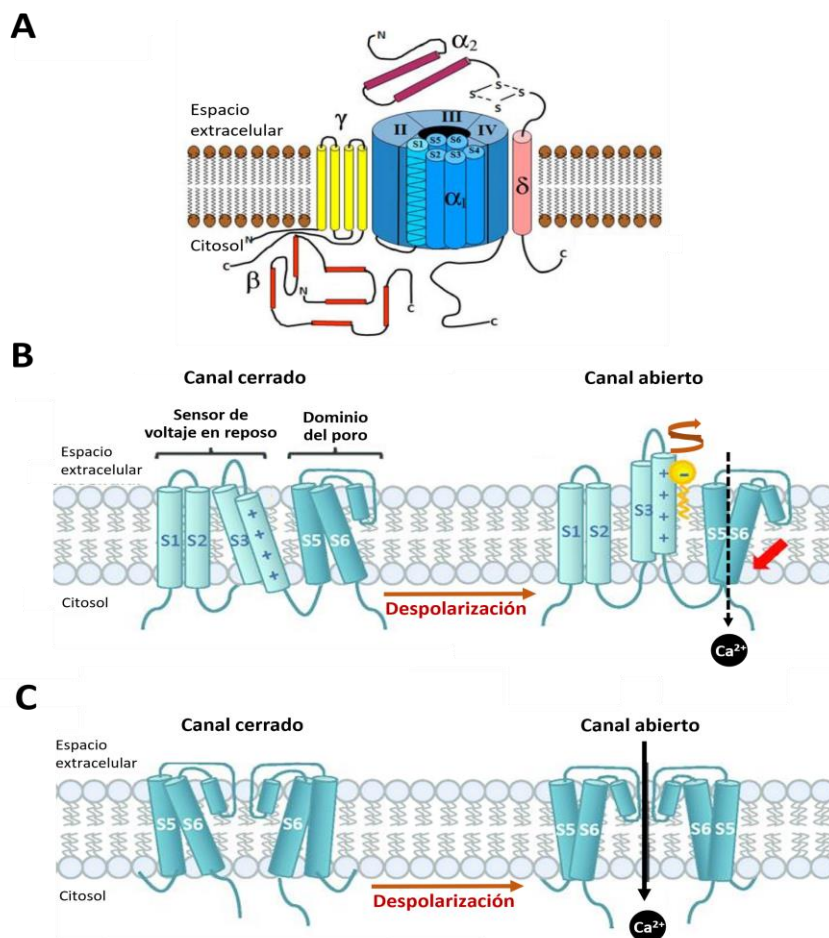


Figura 27. Estructura y mecanismo de activación de los VOCC. **A.** En la membrana celular, cuatro subunidades canónicas $\alpha 1$ (en azul) se ensamblan para formar el poro del canal. Cada subunidad $\alpha 1$ contiene 6 hélices (S1-6) y dominios N y C-terminal en la cara citosólica. Los segmentos S1-S4 forman el sensor de voltaje, mientras que los S5 y S6 forman el poro de iones. Las subunidades $\alpha 2\delta$ y β mejoran la expresión y modulan la dependencia del voltaje y la cinética de activación de los VOCC. **B-C.** En respuesta a despolarizaciones prolongadas, el S4, gracias a la presencia de residuos cargados positivamente, detecta dichas variaciones y se desplaza hacia arriba quedando perpendicular a la MP (flecha naranja). Una vez los cuatro S4 se han desplazado, se abre el dominio del poro (flecha roja), lo que permite la entrada de Ca^{2+} (**B**). **C.** El panel inferior muestra la vista frontal de los segmentos S5 y S6 en estado cerrado y abierto (**C**). Por simplicidad, se representan, únicamente, dos subunidades. Basado en (Gurkoff et al., 2013; Llinas & Moreno, 2017).

La subunidad $\text{Cav}\alpha 1$ define tres familias principales (Cav1, Cav2 y Cav3), cada una de las cuales, a su vez, consta de varios miembros. En primer lugar, la familia de canales Cav1, en la que se distinguen tres canales neuronales tipo L diferentes: Cav1.2, Cav1.3 y Cav1.4. En segundo lugar, está la familia de los Cav2 la cual incluye tres miembros Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3. El ensamblaje alternativo de Cav2.1 con subunidades auxiliares específicas da lugar a los canales tipo P y Q los cuales se bloquean por ω -agatoxina (péptido aislado del veneno de araña). Cav2.2 codifica para canales tipo N, que son inhibidos de forma selectiva por ω -agatoxinas (GVIA y MVIIA), toxinas aisladas del veneno de moluscos marinos. Cav2.3 se corresponde con canales de tipo R, los cuales se inhiben por SNX-482, péptido del veneno de *Hyristerates Gigas Tarántula*. En tercer lugar, están los canales de la familia Cav3, de los que se han descrito tres tipos (Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3), estos son canales tipo T, de bajo umbral, para lo que no se han descrito inhibidores selectivos (Tabla 2).

Los VOCC suelen expresarse en células excitables, como células del músculo esquelético, liso o cardíaco, en células neuroendocrinas y en neuronas. No obstante, también se han encontrado en células no excitables de hígado, riñón o colon. Los patrones de expresión de las isoformas dependen del tipo celular. En concreto, Cav1 aparece en células musculares, neuronales y endocrinas; Cav2 en neuronas, y Cav3 en células excitables y no excitables (Berridge, 2010a). Además, cabe destacar que la expresión de estos canales puede regularse por otras proteínas. Por ejemplo, la sobreexpresión de STIM1 (sensor de Ca^{2+} del RE y activador de la SOCE) es capaz de inhibir el componente del poro de Cav1.2 (Y. Wang et al., 2010).

En cuanto a su papel tanto fisiológico como fisiopatológico, se han construido varias líneas de ratones *Knockout* que carecen de subunidades específicas para estudiar la función de estos canales. Por ejemplo, en ratones que carecen de la isoforma Cav1.2 tanto en hipocampo como en la corteza se ha detectado un deterioro de la memoria espacial y comportamientos similar a la ansiedad (White et al., 2008). En ratones con deficiencia de Cav1.3 se ha visto que presentan sordera, ya que este canal es fundamental para la transmisión sináptica de las células auditivas; mientras que deficiencias en Cav1.4 se relaciona con ceguera debido a la implicación de dicho canal en la transmisión sináptica de los fotorreceptores de los bastones. La deficiencia del canal Cav2.2 hace a los ratones hiposensibles al dolor inflamatorio y neuropático, lo que demuestra la implicación de estos canales en la transmisión sináptica entre las fibras sensoriales y las neuronas de la asta dorsal (Simms & Zamponi, 2014).

Tabla 2. Clasificación de los VOCC.

Familia	VOCC	Gen	Subfamilia $\alpha 1$	Subunidades asociadas	Corriente	Principales funciones	Localización	Bloqueadores farmacológicos	Toxinas inhibitorias
Cav1	Cav1.1	CACNA1S	$\alpha 1S$	$\alpha 2\delta, \beta, \gamma$	HVA: L (cinética de inactivación lenta)	Acoplamiento excitación-contracción	Músculo esquelético	Sensibles a DHP (nifedipina, nisoldipina...)	
	Cav1.2	CACNA1C	$\alpha 1C$	$\alpha 2\delta, \beta$			Músculo cardíaco Músculo liso Neuronas		
	Cav1.3	CACNA1D	$\alpha 1D$	$\alpha 2\delta, \beta$			Páncreas Músculo cardíaco Neuronas		
	Cav1.4	CACNA1F	$\alpha 1F$	$\alpha 2\delta, \beta$			Ojo, Sistema inmune		
Cav2	Cav2.1	CACNA1A	$\alpha 1A$	$\alpha 2\delta, \beta$	HVA: P/Q	Liberación de neurotransmisores	Neuronas	No sensibles a DHP	ω -agatoxina IVA ω -conotoxina GVIA MVIIC
	Cav2.2	CACNA1A	$\alpha 1B$		HVA: N				ω -conotoxina IVA ω -conotoxina GVIA MVIIC
	Cav2.3	CACNA1E	$\alpha 1E$		HVA: R				SNX-482
Cav3	Cav3.1	CACNA1G	$\alpha 1G$		LVA: T (cinética de inactivación transitoria)	Participación en la formación del potencial de acción y en el control de los patrones de disparo repetitivo. Proliferación.	Músculo cardíaco Músculo esquelético Neuronas	No sensibles a DHP.	
	Cav3.2	CACNA1H	$\alpha 1H$				Músculo cardíaco Neuronas		
	Cav3.3	CACNA1L	$\alpha 1L$				Neuronas		

5.1.1.2 Canales de Ca^{2+} operados por receptor

Estos canales son un tipo de canales cuya activación se produce tras la unión de ligandos específicos (hormonas, neurotransmisores...). Esta unión induce una serie de cambios conformacionales que, directa o indirectamente, conllevan la apertura del canal, lo que permitirá el paso de ciertos iones a favor de gradiente electroquímico. Estos canales pueden dividirse en dos grandes grupos: (1) *canales ionotrópicos*, aquellos en los que tanto el receptor como el canal iónico forman parte de la misma estructura y (2) *metabotrópicos*, si el receptor y el canal iónico no forman parte de la misma estructura, sino que el receptor desencadena una cascada de señalización, tras ser estimulado, que conlleva la activación del canal y, en consecuencia, su apertura (**Figura 1**Figura 28).

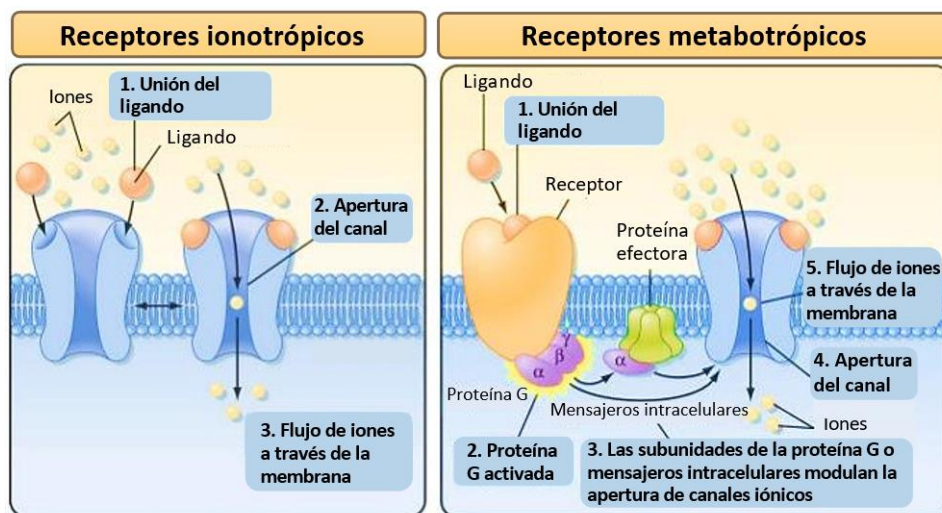


Figura 28. Receptores Operados por Receptor. Tras la unión de un ligando concreto a su dominio extracelular, estos receptores se activan y permiten el flujo iones a través de su canal asociado a favor del gradiente electroquímico. En función de si el receptor y el canal forman parte o no de la misma estructura, se distinguen dos tipos: receptores ionotrópicos (a la izquierda), aquellos cuyo canal asociado forman parte de la misma estructura que el receptor, y receptores metabotrópicos (a la derecha), cuyo canal es una estructura diferente al receptor. Estos últimos pueden ser GPCR o TKR y desencadenar cascadas de señalización que pueden tanto activar canales como otros procesos celulares.

- 1. Receptores ionotrópicos:** se caracterizan porque tanto el receptor como el propio canal forman parte de la misma estructura. Su estructura cuenta con dos o más dominios: un dominio transmembrana el cual forma el poro a través del cual pasan iones (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ o Cl^-), y un dominio extracelular al cual se une el ligando. Debido a su estructura, la unión del ligando al receptor provoca la apertura del canal y permite el paso de iones, por lo que su respuesta es rápida. En esta familia de receptores se incluyen a los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluR), canales dependientes de ATP y a la superfamilia de los TRP. La entrada de iones a través de estos canales induce una respuesta que puede ir desde la despolarización de la membrana por el flujo de iones a favor de gradiente hasta la entrada de Ca^{2+} el cual puede actuar como segundo mensajero.
- 2. Receptores metabotrópicos GPCR u operados por segundos mensajeros (SMOCC):** aquí, el receptor y el canal iónico no forman parte de la misma estructura, incluso pueden encontrarse en membranas diferentes de la misma célula. Dada esta separación, se requiere una vía de comunicación entre ambas proteínas, una cascada de señalización, por lo que su respuesta ante un estímulo es más lenta que en el caso de los ionotrópicos, si bien es cierto que también es más duradera en el tiempo.

La estructura de estos receptores cuenta con siete dominios transmembrana unidos mediante *loops* extracelulares, implicados en el reconocimiento de ligandos, y *loops* intracelulares, que interaccionan con la proteína G. La proteína G es una proteína trimérica formada por las subunidades α , γ y β que, en condiciones de reposo, está separada del receptor y unida a GDP. Sin embargo, tras la unión de un ligando específico al receptor, el receptor se activa y favorece la interacción receptor-proteína G y, en consecuencia, se intercambia GDP por GTP. La cascada de señalización que se desencadena es diferente en función de la proteína G y de las subunidades de esta. Además, en función del tipo de ligando que reconocen, se distinguen tres familias: A, la más numerosa, responde a prácticamente todos aminoácidos; B, que responde a hormonas y péptidos gastrointestinales, y C, la cual responde a neurotransmisores como glutamato, GABA y Ca^{2+} , importantes en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

A continuación, se van a presentar algunos de los ROCC más relevantes en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular según el ligando que desencadena su activación.

A) Receptores de Glutamato

El glutamato es uno de los neurotransmisores más abundante en el SNC. Este se libera al medio extracelular en las hendiduras sinápticas y, tras alcanzar la célula postsináptica, es capaz de activar los receptores de glutamato (GluR) de estas células y, en consecuencia, participar en la sinapsis y en procesos como la plasticidad sináptica o la expresión de genes. Estos receptores pueden ser tanto receptores ionotrópicos (iGluR) como receptores metabotrópicos (mGluR) (Figura 29).

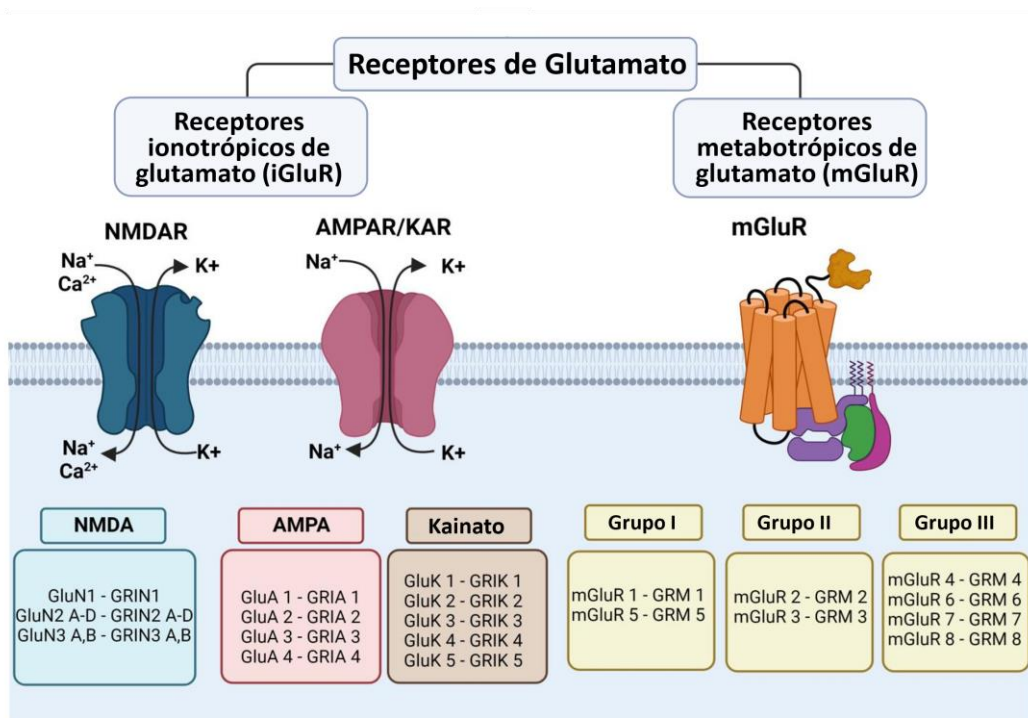


Figura 29. Clasificación de los receptores de glutamato. A la izquierda, se muestran los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluR) y los respectivos genes codificantes, entre los que se incluyen los receptores de NMDA (NMDAR), receptores AMPA (AMPA). Mientras, en la derecha, se representa la familia de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) y sus genes codificantes. Modificado de (García-Gaytán et al., 2022).

1) Receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR)

Se han descrito tres receptores iGluR los cuales se clasifican de acuerdo con el ligando que los activa: receptores NMDA (NMDAR), activados por NMDA, y los receptores de tipo no NMDA. Entre estos últimos se incluyen los receptores tipo AMPA (AMPA), activados por amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA), y los receptores de tipo kainato (KAR), activados por el ácido kaínico (KA). Al tratarse de canales ionotrópicos, la respuesta celular tras la unión del glutamato es rápida, lo que induce su apertura y, en consecuencia, permite el paso de diferentes cationes. Por un lado, en el caso de los receptores de tipo no NMDA (AMPA y KAR), permiten el paso de K^+ y de Na^+ . Por otro lado, en los NMDAR, su apertura permite el paso de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ . Además de diferenciarse en su permeabilidad iónica, la regulación entre estos tipos de receptores es diferente, tal y como se describe en los siguientes apartados (Figura 30).

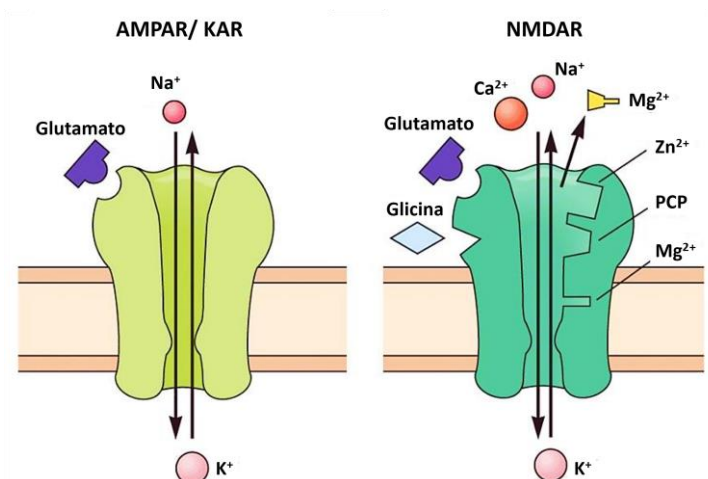


Figura 30. Receptores ionotrópicos de glutamato. Se han descrito tres tipos de iGluR: los AMPAR, KAR y NMDAR. A la izquierda se muestran los AMPAR y KAR, cuando el glutamato se une a estos receptores, se desencadena la apertura del canal permitiendo la salida de K^+ y la entrada de Na^+ . A la derecha se muestra el NMDAR el cual es el único canal cuya activación depende tanto de la unión del ligando como de la presencia de un agonista y del potencial de membrana. Cuando el potencial de membrana está en reposo, el NMDAR está bloqueado por Mg^{2+} . Sin embargo, cuando la membrana se despolariza parcialmente se fuerza al Mg^{2+} a salir del canal y, tras la unión de glutamato y un coagonista (glicina), se produce la apertura del canal, lo que permite la entrada tanto de Na^+ como de Ca^{2+} al citosol. Como se observa en la figura los canales de NMDAR, están altamente regulados en comparación con los AMPAR o KAR. Modificado de <https://pittmedneuro.com/glutamate.html>

a) Receptores de NMDA

Los NMDAR son permeables tanto a Na^+ como a Ca^{2+} , a diferencia de los AMPAR y KAR que son principalmente permeables a Na^+ y K^+ . Además, presentan una alta regulación por coagonistas como la glicina, la D-serina, algunas poliaminas o cambios en el voltaje. Por ello, la activación de este canal, además de la unión del glutamato a su receptor, requiere de una despolarización parcialmente de la membrana, la cual elimina el Mg^{2+} que se encuentra bloqueando el poro del canal, y la unión de un coagonista. Este canal presenta una regulación negativa con Zn^{2+} o el pH ácido, por lo que en presencia de estos se produce la inactivación del canal. La activación de estos canales y el consecuente flujo de cationes al citosol provoca la despolarización de la MP y, por ende, la activación de diferentes canales VOC.

Su estructura resulta de la combinación de 4 subunidades: NR1, NR2A-NR2D, NR3A y NR3B. La subunidad NR1 es esencial y ubicua. Además, para que el receptor sea funcional requiere de la unión de dos subunidades de NR1 junto con dos NR2 o con la combinación de una subunidad NR2 y NR3. Las subunidades NR1 y NR3 contienen los sitios de unión a glicina, mientras que la subunidad NR2 el sitio de unión a glutamato. En consecuencia, las diferentes combinaciones de las subunidades le otorgan propiedades funcionales diferentes como la susceptibilidad al bloqueo por Mg^{2+} , sensibilidad a glicina, afinidad a glutamato o la conductancia del canal.

El NMDAR participa en la neurotransmisión y en la plasticidad neuronal de tal forma que, según el número de iGluR en la membrana de la célula postsináptica, la plasticidad neuronal puede ser de potenciación a largo plazo (LTP) o depresión a corto plazo (LTD), importante en procesos de memoria y aprendizaje. Además, estos receptores se relacionan con la supervivencia neuronal. Sin embargo, la acumulación excesiva de glutamato puede conducir a una sobreactivación de estos receptores y, en consecuencia, a un aumento del flujo de Ca^{2+} , lo que se conoce como excitotoxicidad la cual puede conllevar la muerte celular. En este sentido, se ha descrito excitotoxicidad en diversas patologías del SNC y enfermedades neurodegenerativas como la EA (Sattler & Tymianski, 2001).

La inhibición de estos canales tiene una amplia gama de aplicaciones, desde el tratamiento de trastornos neurológicos y psiquiátricos hasta su uso en investigación neurológica para entender el funcionamiento cerebral. Algunos de los inhibidores farmacológicos más utilizados son la Ketamina, que se utiliza como anestésico o para tratar la depresión, y la memantina (antagonista no competitivo), utilizada en el tratamiento de la EA moderada o severa. El ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico (D-AP5) es un inhibidor específico de NMDAR. Se trata de un antagonista competitivo, por lo que se une al sitio de unión del glutamato de estos receptores de tal forma que acaba impidiendo que el glutamato active el receptor.

b) Receptores no NMDA

En la categoría de receptores de glutamato no NMDA se incluyen los AMPAR y KAR, los cuales permiten el paso de Na^+ y K^+ y de igual forma que en el caso de los NMDA. A continuación, se explica, brevemente, cada uno de ellos.

b.1) Receptores AMPAR

Son canales iónicos activados por glutamato que participan en la sinapsis. Su estructura consta de cuatro subunidades (GluA1-4) codificadas por diferentes genes (GRIA1-4). Estas se ensamblan para formar tetrámeros los cuales dan lugar al canal iónico. En cuanto a la estructura de estas subunidades, tanto los dominios TM como los de unión a ligando están altamente conservados. Por el contrario, tanto su extremo N-terminal, localizados en la cara extracelular, como el C-terminal, situado en la cara citosólica, son diferentes entre las diferentes subunidades.

A partir de estas diferencias, se hace la distinción entre estas subunidades según la longitud de su cola. Por un lado, están las subunidades denominadas de cola larga, GluA1 y GluA4, las cuales participan en la sinapsis en respuesta a la actividad neuronal y durante la inducción de LTP. Por otro lado, están las subunidades GluA2 y GluA3 las cuales pertenecen a la categoría de cola corta y participan de forma constitutiva en la sinapsis.

De esta manera, diferentes combinaciones de estas subunidades, que dependerá en gran parte del tejido, darán lugar a canales con diferentes propiedades biofísicas. Por ejemplo, en las neuronas de hipocampo de la región CA1 predomina la combinación de GluA1/GluA2 y GluA2/GluA3. En cuanto a su regulación, estos canales pueden interaccionar con proteínas

específicas y/o sufrir modificaciones postraduccionales tales como la fosforilación, ubiquitinación, glicosilación entre otras (Diering & Huganir, 2018).

b.2) Receptores de Kainato

Son receptores tetraméricos cuya activación permite el flujo de cationes a través de la membrana, lo que conduce a una despolarización de esta y a la activación neuronal. Los KAR son tetrámeros de cinco subunidades: GluK1 (codificada por el gen GRIK1), GluK2 (GRIK2), GluK3 (GRIK3), GluK4 (GRIK4) y GluK5 (GRIK5). De estos, GluK1-3 pueden formar homómeros o heterómeros funcionales, mientras que GluK4 y GluK5 solo participan en receptores heteroméricos, asociándose con cualquiera de las subunidades GluK1-3.

Cada subunidad cuenta con cuatro segmentos TM (TM1-4) y dos extremos: el extremo N-terminal en la cara extracelular, implicado en el ensamblaje, y el extremo C-terminal el cual queda expuesto en el lado citosólico. El segmento TM1 presenta la hendidura de unión de transmisores. El bucle formado entre los segmentos TM1-2, denominado “bucle o lazo p”, es el que determina la permeabilidad al Ca^{2+} . Estos canales pueden ser inhibidos por el antagonista competitivo cianquixalina (CNQX), el cual impide la unión del neurotransmisor y, en consecuencia, bloquea el paso de cationes, tanto en los KAR como en los AMPAR.

2) Receptores metabotrópicos de glutamato

La unión del glutamato a estos receptores activa la fosfolipasa C (PLC) la cual, a su vez, desencadena una cascada de señalización que induce la apertura de canales y otras señales celulares implicadas en procesos de la memoria y el aprendizaje. Estos se dividen en tres subfamilias de acuerdo con la homología de la secuencia y a los agonistas que provocan su activación: grupo I, que engloba a los mGluR1 y mGluR5, cuya activación desencadena la vía del IP_3/DAG la cual induce la liberación de Ca^{2+} desde el RE al citosol, por lo que participan en la homeostasis del Ca^{2+} ; grupo II, el cual incluye a los mGluR2 y 3, y el grupo III, que agrupa a los mGluR4, 6, 7 y 8. Estos receptores se expresan tanto en neuronas como en glías y participan tanto a nivel postsináptico como en células accesorias en respuesta a glutamato y a otros neurotransmisores.

B) Receptor de Acetilcolina

El neurotransmisor acetilcolina (ACh) actúa sobre los receptores de acetilcolina (AChR). Esta molécula es liberada, principalmente, por las neuronas colinérgicas y está implicada en diversos procesos como la función motora, la percepción sensorial, los procesos cognitivos, los ritmos circadianos, el ritmo cardíaco, la motilidad gastrointestinal o la actividad del músculo liso. Al igual que los NMDAR, los AChR se dividen en ionotrópicos, los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) los cuales se localizan en las uniones neuromusculares, sinapsis neuronales y células no excitables, y los receptores metabotrópicos, denominados receptores muscarínicos de ACh.

1) Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)

Los nAChR neuronales son canales iónicos pentaméricos ionotrópicos activados por ligando ACh (o nicotina); es decir, que la unión de su ligando, ACh, provoca su activación e induce un cambio conformacional que permite la entrada de iones Na^+ y K^+ (y Ca^{2+} en algún caso) al interior de la célula. Estos receptores regulan diferentes procesos como son la liberación de neurotransmisores y la excitabilidad celular. Presentan una estructura que es el resultado de la combinación de diferentes subunidades. En particular, se han identificado hasta nueve subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres β ($\beta 2$ - $\beta 4$), las cuales forman un poro a través del cual pasan los iones, flujo que conllevará la despolarización de la membrana y, en consecuencia, la activación de los VOCC.

Los nAChR pueden formar tanto homómeros, formados solo por la combinación de subunidades α , como heterómeros, formados por la combinación de subunidades α y β . Las diferentes combinaciones, que dependen del tipo celular, confieren distintas propiedades a los receptores. Las subunidades neuronales más abundantes son $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\alpha 7$, siendo el receptor de tipo homomérico predominante el formado por las subunidades $\alpha 7$ y el receptor heteromérico $\alpha 4\beta 2$ el de mayor abundancia (Figura 31). Este último, puede existir con dos estequiometrias diferentes. Por un lado, los receptores formados por 2 subunidades $\alpha 4$ y 3 subunidades $\beta 2$, $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, los cuales muestran baja permeabilidad a Ca^{2+} y alta afinidad por la ACh y nicotina. Por otro lado, los que presentan 3 subunidades $\alpha 4$ y 2 subunidades $\beta 2$, $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, que presentan una alta permeabilidad al Ca^{2+} . El receptor de tipo homomérico más abundante es el formado por la combinación de la subunidad $\alpha 7$. De igual forma, el nAChR $\alpha 7$ también muestra una alta permeabilidad al Ca^{2+} en relación con los nAChR $\alpha 4\beta 2$ heteroméricos. La acción de los nAChR $\alpha 4\beta 2$ puede aumentar los niveles intracelulares de Ca^{2+} mediante la activación de los VOCC, mientras que los nAChR $\alpha 7$ aumentan, preferentemente, la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares a través de los receptores de rianodina (RyR). La capacidad de estos diferentes subtipos de nAChR para acoplarse a mecanismos VOCC o CICR da como resultado distintos patrones de señalización de Ca^{2+} que pueden proporcionar un control más amplio de la plasticidad sináptica y la liberación de neurotransmisores, así como la transcripción de genes.

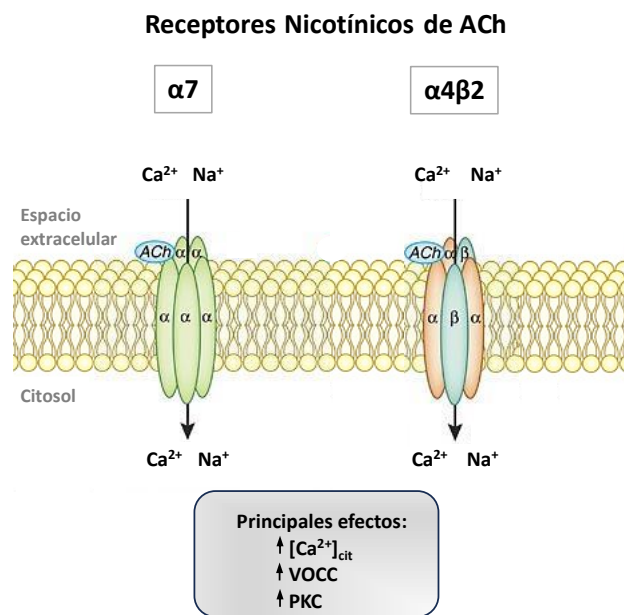


Figura 31. Estructura y vías de señalización de los receptores nicotínicos de ACh (nAChR). Los nAChR neuronales son receptores ionotrópicos pentaméricos formados por diferentes estequiometrías de subunidades α , β y α , siendo el subtipo $\alpha 4\beta 2$ el más abundante. Cabe destacar que la estequiometría determinará la permeabilidad por Ca^{2+} y su afinidad por ACh: así, mientras que los receptores formados por 2 subunidades $\alpha 4$ y 3 subunidades $\beta 2$, $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, muestran baja permeabilidad a Ca^{2+} y alta afinidad por la ACh y nicotina, los que poseen 3 subunidades $\alpha 4$ y 2 subunidades $\beta 2$, $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ presentan una alta permeabilidad al Ca^{2+} . Cuando estos canales se activan, aumenta la liberación de Ca^{2+} al citosol desde los depósitos intracelulares. Además, estos receptores son capaces de acoplarse a otros mecanismos de transporte de Ca^{2+} como los VOCC o CICR, lo que da lugar a diferentes patrones de señalización de Ca^{2+} los cuales permitirán un control más fino de la plasticidad sináptica y de la liberación de neurotransmisores. Modificado de (Jones et al., 2011).

2) Receptor muscarínico de acetilcolina (mAChR)

Los receptores muscarínicos de acetilcolina, mAChR, son receptores metabotrópicos los cuales se caracterizan por generar respuestas lentas. La unión de su ligando, ACh, desencadena una cascada de señalización que induce la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, por lo que tienen un papel importante en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} . Participan en una amplia gama de procesos tales como la regulación de la temperatura, la regulación cardiovascular y la memoria. En función de la proteína G que tengan acoplada, se han identificado cinco subtipos de mAChR. Por un lado, están los subtipos M1, M3 y M5, que tienen acoplada la proteína G_q y, por lo tanto, activan $\text{PLC}\beta$ que, a su vez, induce la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y la activación de SOCE. Por otro lado, están M2 y M4, acoplados a la proteína $G_{i/o}$, por lo que su activación conlleva la inhibición de la AC lo que disminuye la concentración de AMPc intracelular e induce y prolonga la apertura de los canales de K^+ (Figura 32). En el SNC, la forma predominante es el mAChR M1, localizado, principalmente, en neuronas postsinápticas donde desempeña papeles importantes en procesos cognitivos. Cabe destacar que todos los subtipos de mAChR muestran una alta homología de secuencia entre especies, particularmente en los sitios de unión de ACh.

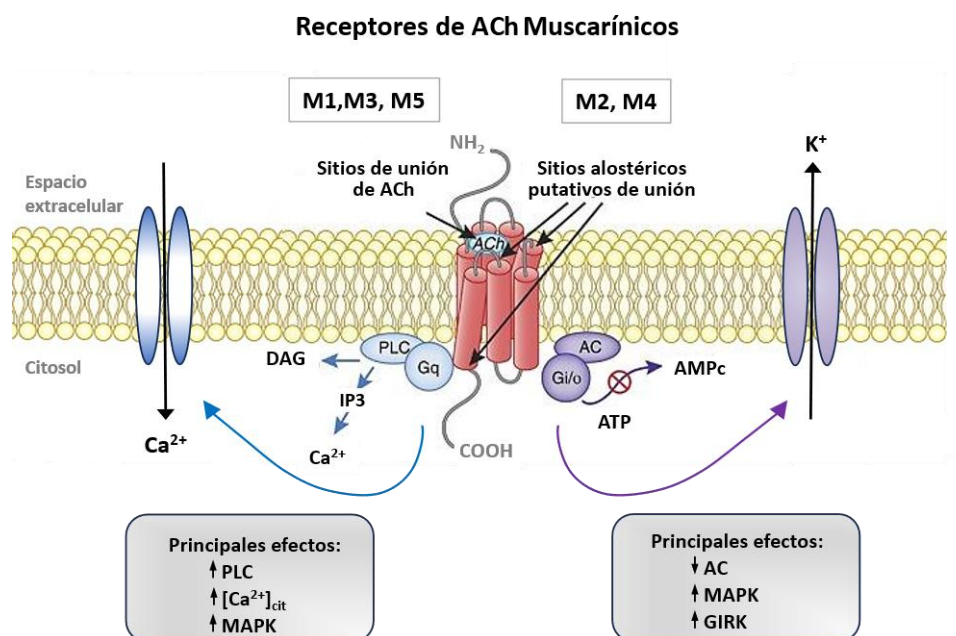


Figura 32. Estructura y vías de señalización de mAChR. La estructura de los mAChR consta de siete segmentos transmembrana, pertenecen a la categoría de los receptores metabotrópicos y, en base a las proteínas G que a las se acoplan, se dividen en dos clases funcionales principales. Por un lado, los mAChR M1, M3 y M5, que se acoplan selectivamente a las proteínas G de tipo G_q lo que da como resultado, la generación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y 1,2-diacylglicerol (DAG) a través de activación de $\text{PLC}\beta$ que, a su vez, conduce a un aumento de los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Por otro lado, están los mAChR M2 y M4 los cuales activan preferentemente las proteínas G de tipo G_i/G_o , inhibiendo así el adenilato ciclasa (AC), reduciendo la concentración intracelular de AMPc y prolongando la apertura de los canales de K^+ (GIRK). Modificado de (Jones et al., 2011).

C) Receptores Purinérgicos

Los receptores purinérgicos se activan mediante la unión de nucleótidos extracelulares como ATP, ADP, UTP o UDP... que se liberan de las células y se sintetizan en el medio extracelular. Los receptores purinérgicos se dividen en dos grupos en función de los ligandos que desencadenan su apertura: receptores P1, activados por adenosina, y P2, activados por ATP, ADP, UTP, UDP y UDP-Glucosa). Los receptores P1 son metabotrópicos y se pueden subdividir en 4 subtipos: A1, A2A, A2B, y A3. En cuanto a los receptores P2, estos se pueden subdividir en receptores ionotrópicos (P2X1-7) y en receptores metabotrópicos (P2Y1,2,4,6,11,12,13,14) (Figura 33). Las neuronas expresan tanto receptores P2X como P2Y, particularmente P2X2, P2X4, P2X6 y P2Y1. Su localización puede ser pre o postsináptica, y en función de dónde se localicen su papel será diferente: la expresión presináptica puede ser excitadora (P2X) o inhibitoria (P2Y), mientras que la expresión postsináptica siempre es excitadora (Merighi et al., 2021; Ribeiro-Rodrigues et al., 2023).

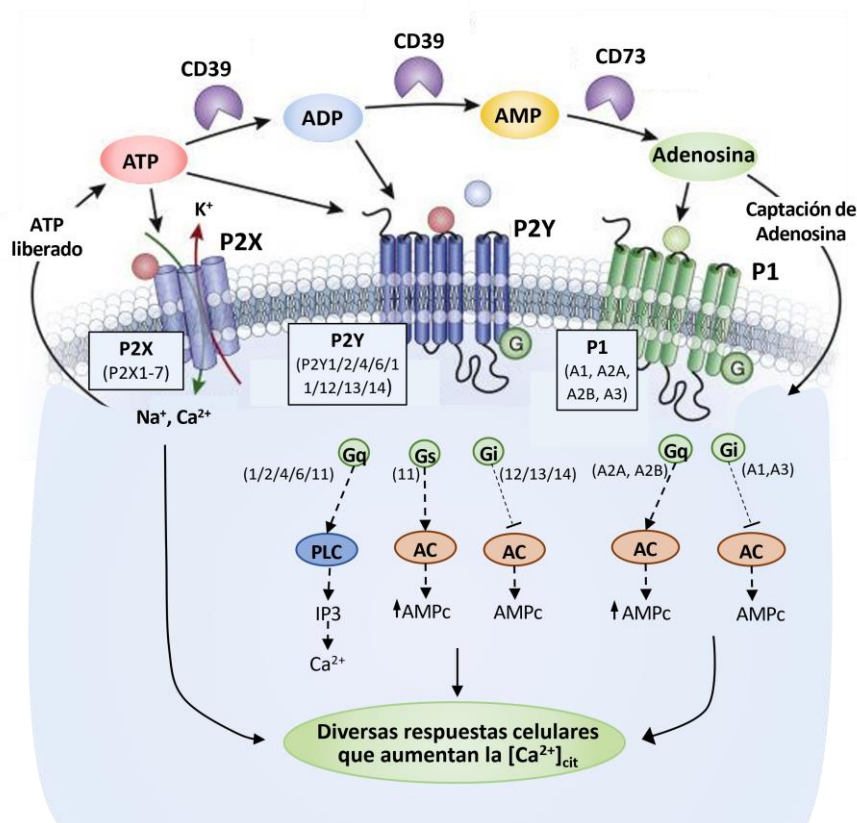


Figura 33. Receptores purinérgicos y señalización purinérgica. Una gran variedad de estímulos puede desencadenar la liberación de ATP al espacio extracelular. Posteriormente, las ectonucleotidasas ubicadas en la MP (CD39, E-MPP y CD73) catalizan la hidrólisis secuencial de ATP a ADP (adenosina difosfato), AMP (adenosina monofosfato) y adenosina. Los receptores P2X, de carácter ionotrópico, se activan por ATP formando un canal iónico que permite el paso de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Los receptores P2Y se activan por ATP y ADP y, dado que se trata de receptores metabotrópicos, se asocian a proteínas G y, en consecuencia, su activación desencadenará cascadas de segundos mensajeros intracelulares como el Ca^{2+} y AMPc. La adenosina activa los receptores P1, acoplados a las proteínas G, lo que permitirá el paso de AMPc. Basado en (Menzies et al., 2017).

1) Receptores purinérgicos ionotrópicos

Los receptores P2X son receptores ionotrópicos localizados en la membrana plasmática. Su apertura se induce tras la unión de ATP extracelular, lo que permite la entrada de Ca^{2+} al citosol. Se han identificado siete genes que codifican para estos receptores (P2X1-7), receptores cuya forma funcional presenta una estructura trimérica que puede ser tanto homo como heterotrimérica, donde cada subunidad contiene dos hélices TM y cuyos extremos apuntan a la cara intracelular. Se localizan tanto en glías como en neuronas y participan en procesos de respuesta celular tanto rápida como lenta, si bien es cierto que su función dependerá de la composición de su estructura. Por ejemplo, P2X2 o P2X3 presentan una inactivación rápida, por lo que median respuestas rápidas como la exocitosis y la secreción que tienen lugar en las neuronas durante la propagación del impulso nervioso o en la contracción muscular. Por el contrario, P2X7 se caracteriza por una inactivación lenta y media procesos de crecimiento celular. Cabe destacar que estos canales se han relacionado con patologías neurodegenerativas tales como EA y EP.

2) Receptores purinérgicos metabotrópicos

Los receptores P2Y son proteínas con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G los cuales se activan tras la unión de sus ligandos, nucleótidos de uridina y adenina. Se han identificado ocho genes que codifican para estos receptores, cada uno de los cuales con diferentes afinidades por los ligandos en función de su secuencia y el tipo de proteína G al que se acoplen. Estos receptores se subdividen en dos grupos: P2Y acoplados a proteínas G_q/G_{11} (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11) cuya activación genera IP_3 y provoca la liberación de Ca^{2+} desde el RE y la activación de SOCE; y los P2Y acoplados a proteínas G_i/G_o (P2Y12, P2Y13 y P2Y14) cuya activación provoca la inhibición de la AC. Estos receptores se han relacionado con la EA, aunque su señalización y función no está bien caracterizada. No obstante, es cierto que la mayoría de las respuestas mediadas por P2Y que se han estudiado parecen ser neuroprotectoras.

5.1.1.3 Canales de Ca^{2+} operados por depósitos

Existe una serie de canales iónicos que se activan en respuesta a la depleción de las reservas intracelulares de Ca^{2+} , principalmente del RE, lo que acaba por activar la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular al citosol. La liberación de Ca^{2+} desde el RE puede producirse por diversos mecanismos: a través de los receptores de rianodina (RyR), de los canales *leak*, del TRPM8. También puede desencadenarse mediante respuestas celulares a estímulos externos mediadas por ROCC, de tal manera que, tras la unión de un ligando a dicho ROCC, se activa PLC la cual, a su vez, cataliza la conversión de PIP2 a IP_3 y DAG. Así, el IP_3 generado activa a los receptores de inositol trifosfato (IP_3R) de la membrana del RE y, en consecuencia, se libera el Ca^{2+} al citosol. Tras esta liberación de Ca^{2+} al citosol, se activa la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) (Prakriya and Lewis (2015). En concreto, el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} , concretamente del RE, es percibido por la proteína *Stromal Interaction Molecule* (STIM), localizada en la membrana del RE, a través de su dominio EF-hand localizado en el interior del RE. En particular, cuando disminuye el contenido de Ca^{2+} en el RE, la unión entre este catión y el dominio EF-hand del STIM cesa y, en consecuencia, se produce un cambio conformacional de STIM que permite su oligomerización con otros STIM. Estos oligómeros que se forman en la membrana del RE se aproximan hacia la MP donde interaccionan con canales como Orai y/o TRP. Esta interacción conduce a que se abran los canales Orai y/o TRP y entre Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el citosol.

Una vez que el Ca^{2+} ha entrado en el citosol, con el fin de evitar un aumento excesivo de este en ciertas localizaciones, la célula dispone de otros mecanismos que, por un lado, son capaces de contrarrestar este aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y, por otro lado, de rellenar los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . De esto último se encarga la bomba SERCA, localizada en la membrana del RE, la cual bombea Ca^{2+} a su interior y, en consecuencia, rellena nuevamente los depósitos; en este caso, el RE.

Cabe destacar que, aunque SOCE es el mecanismo de entrada de Ca^{2+} más importante en las células no excitables, también tiene un papel importante en las células excitables como son las células musculares y las neuronas. Este mecanismo no solo es una estrategia celular diseñada para rellenar los depósitos de Ca^{2+} intracelulares, sino guarda una importante relación funcional con orgánulos subcelulares que participan en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular como son el RE y la mitocondria. Además, también se ha descrito que está implicado en diferentes procesos donde es necesario un mantenimiento de la señalización durante largos tiempos, procesos como la proliferación celular, la expresión de genes, el crecimiento guiado del axón o la plasticidad sináptica. De hecho, se ha descrito que, en cultivos primarios de neuronas de hipocampo envejecidas, existe una menor SOCE respecto de las neuronas jóvenes.

5.1.2 Mecanismos de extrusión de Ca^{2+} de la membrana plasmática

Tras el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ debida tanto a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} de la MP como a la salida al citosol desde diferentes orgánulos celulares, es de suma importancia que las células sean capaces de recuperar los niveles basales de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Para ello, tanto en la MP como en la membrana de diferentes orgánulos celulares (mitocondria o RE) hay presentes una serie de mecanismos que funcionan en contra de gradiente electroquímico. De esta manera, el Ca^{2+} citosólico puede ser extruido al medio extracelular o ser bombeado y/o captado por ciertos orgánulos celulares.

A continuación, se describen los mecanismos de extrusión de Ca^{2+} localizados en la MP; en concreto, las bombas de Ca^{2+} (PMCA) que dependen de la hidrólisis de ATP, y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).

5.1.2.1 ATPasa de la membrana plasmática

Las bombas de Ca^{2+} , a pesar de su baja capacidad, tienen una alta afinidad por Ca^{2+} . Se encargan de bombear Ca^{2+} al medio extracelular para mantener los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y prevenir de la muerte celular inducida por sobrecarga de Ca^{2+} . Para llevar a cabo esta extrusión de Ca^{2+} , utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP durante la cual se forma un intermediario aspartil fosfato, de tal manera que extruyen un ión Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada. En concreto, estas pertenecen a la familia de las ATPasas transportadoras de iones tipo P y, dentro de esta, a la subfamilia P2 o subtipo 2B. Se han identificado cuatro isoformas de PMCA (PMCA1-4) con hasta 30 variantes de *splicing alternativo* las cuales muestran patrones de expresión anatómicamente diferentes y propiedades estructurales y bioquímicas distintas en cuanto a su afinidad por Ca^{2+} , velocidad de transporte de Ca^{2+} o capacidad para interactuar con proteínas reguladoras y de señalización.

Su estructura cuenta con 10 dominios TM con grandes bucles citosólicos entre TM1-2 y entre TM3-4, de tal manera que sus extremos N y C-terminal quedan expuestos en la cara citosólica. El primer bucle citosólico (dominio A) consta de un sitio de unión "a" que regula la orientación a la membrana y sitios de unión a fosfolípidos. El segundo bucle tiene un sitio de fosforilación que contiene aspartilo (D), un sitio de unión a CaM, el sitio de unión "c" y un dominio PDZ (Figura

34). Por lo tanto, es evidente que la actividad de todas las PMCA está altamente regulada, especialmente por CaM. La unión de CaM revierte la autoinhibición de la bomba debido a cambios conformacionales que desplazan el extremo C-terminal de los bucles citosólicos. Entre sus funciones, se incluye la regulación y el mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} citosólico. De forma general, a las PMCA se les atribuye la función de mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, también participan en la acidez intracelular inducida por Ca^{2+} mediante el cotransporte de iones H^+ . Por lo tanto, PMCA desempeña un papel esencial en el control de la supervivencia y muerte celular.

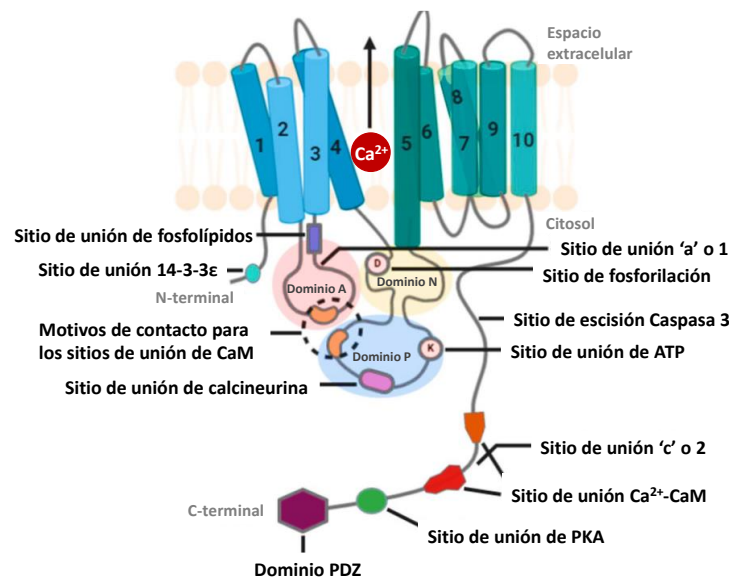


Figura 34. Estructuras de PMCA. La estructura de PMCA consta de diez dominios TM con los extremos N y C-terminal en el citosol. Los diez dominios están conectados por cinco bucles extracelulares cortos. El dominio N-terminal es la porción de la bomba que más varía entre las cuatro isoformas. Entre los extremos N y C-terminal se localizan tres estructuras en bucle denominadas dominios citosólicos: dominio A (círculo rojo entre TM 2-3), dominio P (círculo azul entre TM 4-5) y dominio N (círculo amarillo entre TM 4-5). Existen varios motivos de unión y sitios reguladores o de interacción en cada extremo y dominio citosólico, observándose variaciones en su presencia entre las isoformas de PMCA y las variantes de *splicing*. El dominio A (círculo rojo) contiene una serie de aminoácidos básicos, lo que constituye uno de los dos sitios de unión para el fosfolípido activador (rectángulo morado) y un dominio de unión a CaM (óvalo naranja), que, junto con el sitio de unión de CaM del dominio P (círculo azul), constituyen el sitio de unión de CaM. Además, el segundo bucle contiene el dominio catalítico de la bomba, es decir, el sitio de unión de ATP (círculo rosa, K) y la Lys (círculo rosa, D). El extremo C-terminal es el principal dominio regulador de la bomba, ya que contiene el sitio de unión a CaM, sitios de fosforilación para PKA y PKC y otros sitios de unión para varias proteínas reguladoras. Modificado de (Sharma et al., 2021).

En cuanto a su patrón de expresión, tanto PMCA1 como PMCA4 se expresan de manera ubicua en todos los tejidos, mientras que PMCA2 y PMCA3 son específicas de tejido, pues se expresan, casi de forma exclusiva, en las neuronas del cerebro. Estas presentan una alta actividad basal y pertenecen a las llamadas isoformas “rápidas”, mientras que PMCA1 y 4 son mucho más lentas (Boczek et al., 2019a). También se ha descrito que la expresión de PMCA cambia durante el desarrollo del cerebro. Además, se ha observado que, durante el envejecimiento, PMCA se hace menos eficiente en el proceso de extrusión de Ca^{2+} , lo que compromete la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y puede aumentar el riesgo de enfermedades neurodegenerativas. De hecho, en modelos de EA se ha visto que la actividad de PMCA, en particular, de PMCA4, se reduce ya que esta parece inhibirse por la proteína tau y β -amiloide, a la par que disminuye la expresión de PMCA2 (Berrocal et al., 2009).

5.1.2.2 Intercambiados $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática

El NCX es un mecanismo de transporte de baja afinidad por Ca^{2+} (hasta diez veces menor que las PMCA). Sin embargo, presenta una alta capacidad para extruir iones Ca^{2+} a través de la MP. Por ello, es el encargado de regular un aumento grande pero transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, especialmente importante en células del músculo cardíaco y neuronas. De forma general, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ aumenta, NCX, introduce 3 Na^+ por cada Ca^{2+} que extruye. En este caso, la energía es suministrada por el gradiente electroquímico a través de la membrana que resulta de la actividad de la bomba Na^+/K^+ . Por el contrario, cuando se produce un aumento de $[\text{Na}^+]_{\text{cit}}$ y/o una despolarización de la MP, NCX opera en modo inverso, extruye Na^+ e introduce Ca^{2+} .

Se han descrito tres isoformas para NCX (NCX1-3) codificadas por los genes *Slc8a1*, *Scl8a1* y *Scl8a3*. En cuanto a su perfil de expresión, difiere según la isoforma: NCX1 se expresa de forma ubicua; NCX2 se expresa en el cerebro, particularmente en dos regiones del cerebro, la corteza y el hipocampo, así como en el músculo esquelético, y NCX3, expresado en neuronas. La estructura de estos intercambiadores consta de 10 hélices transmembrana, las primeras 5 hélices transmembrana forman el extremo N-terminal, separado de las restantes hélices transmembrana por un bucle citosólico (lazo f). Este bucle citosólico o lazo f (situado entre los TM5 y 6 con una longitud de 500 aa) es un sitio regulador que tiene dos sitios de unión de Ca^{2+} , un sitio de *splicing* alternativo (no presente en NCX2), un dominio regulador (P1), un dominio de inactivación dependiente de Na^+ y un dominio inhibidor el cual es el sitio principal para detectar pequeños cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. (Figura 35). Se ha encontrado evidencia de la implicación de NCX en diferentes patologías neurodegenerativas como la EA, EP o ELA, aunque sus mecanismos todavía son desconocidos. En particular, se ha observado un aumento de la actividad de NCX en neuronas supervivientes de áreas afectadas por neurodegeneración, lo que sugiere que este aumento de la función de NCX puede tener un papel protector en la supervivencia neuronal (Pannaccione et al., 2020).

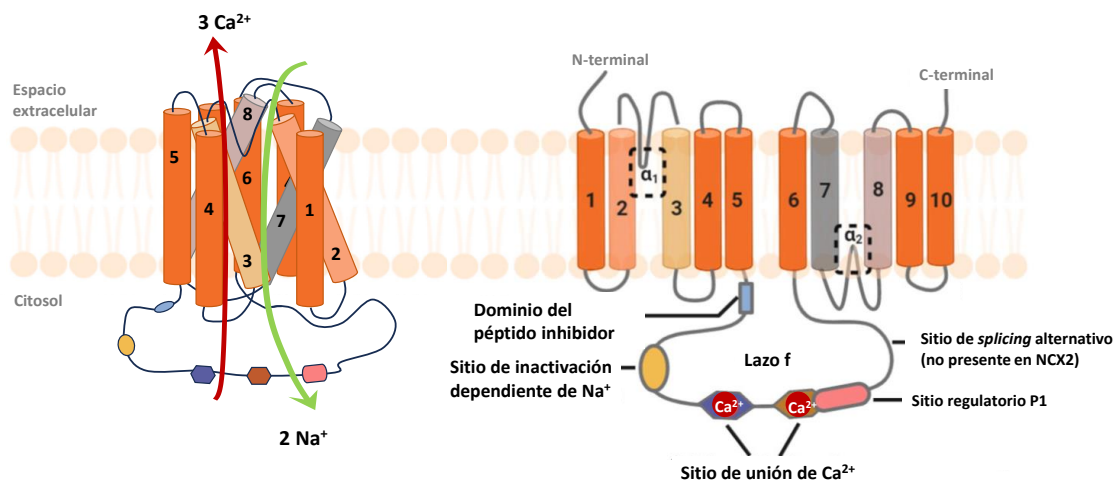


Figura 35. Topología NCX. A la izquierda se muestra la organización compleja de NCX y a la izquierda su disposición lineal en la MP. Su estructura cuenta con 10 dominios TM con los extremos N y C-terminal orientados al espacio extracelular. El lado citosólico consta de un “bucle o lazo f” localizado entre los dominios TM5 y 6 en el que hay dos sitios de unión a Ca^{2+} , un sitio de empalme alternativo, un sitio regulador, un sitio de inactivación dependiente de Na^+ y un dominio inhibidor. La estructura también consta de dos hélices α conservadas (α_1 y α_2) que influyen en la unión y el transporte de iones. Modificado de (Sharma et al., 2021).

5.2 Retículo endoplasmático

Los orgánulos celulares como el RE, la mitocondria o los lisosomas actúan como tamponadores de Ca^{2+} y contribuyen a la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} . En concreto, el RE actúa como un almacén de Ca^{2+} , de tal manera que, en condiciones normales, presenta una concentración de Ca^{2+} similar a la del medio extracelular, alrededor de 1 mM. Esto es así porque este orgánulo contribuye al mantenimiento de la reducida $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ basal, si bien es cierto que también participa en el aumento de esta concentración tras ciertos estímulos capaces de inducir la liberación del Ca^{2+} almacenado en su interior. Por tanto, el RE participa en la regulación de la homeostasis de dicho catión mediante dos mecanismos: la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos y en la captación del Ca^{2+} del citosol tras un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Figura 36).

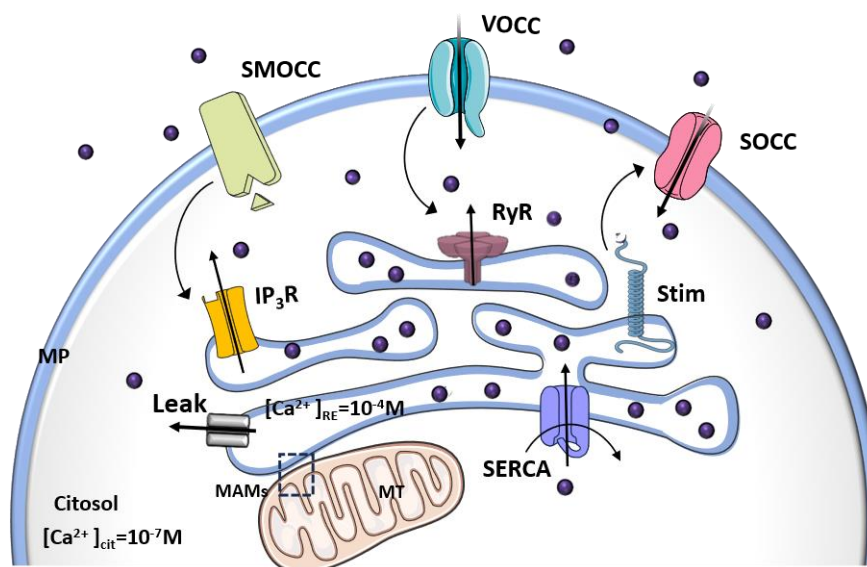


Figura 36. Sistemas de transporte de Ca^{2+} en el RE. El RE presenta una concentración de Ca^{2+} de 10^{-4} M, por lo que actúa como depósito de Ca^{2+} . El Ca^{2+} puede ser liberado al citosol a través de los receptores de inositol trifosfato (IP_3R) o de rianodina (RyR) y, en menor medida, también se puede liberar a través de canales de goteo o *leak*. La entrada de Ca^{2+} en el RE se produce a través de SERCA , bomba que consume ATP para introducir Ca^{2+} . Además, entre el RE y la mitocondria se forman unas estructuras denominadas membranas del RE asociadas a la mitocondria (MAMs) a través de la proteína regulada por glucosa 75 (GRP75) la cual establece una interacción directa entre los VDAC y los IP_3R , de tal forma que el Ca^{2+} liberado se dirige a la mitocondria.

El RE es un orgánulo presente en todas las células eucariotas el cual está formado por un complejo sistema de endomembranas. En las neuronas el RE se extiende desde el núcleo hasta el soma, dendritas y espinas dendríticas, así como a lo largo de todo el axón hasta las terminales presinápticas. Participa en la regulación de numerosas funciones fisiológicas como la síntesis de proteínas y lípidos. Además, también regula procesos como el estrés de RE o la apoptosis. Por ello, alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} del RE pueden contribuir al desarrollo de patologías.

5.2.1 Sistemas de liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático

El RE actúa como depósito de Ca^{2+} y, además, libera Ca^{2+} al citosol en respuesta a diferentes estímulos extracelulares y, en consecuencia, regular diferentes mecanismos celulares. En las neuronas, la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos está implicada en diferentes procesos celulares: en la modulación de las respuestas postsinápticas; en la plasticidad sináptica; en la modulación de la fusión de las vesículas y la liberación de neurotransmisores en los terminales axónicos; en el soma de las neuronas, este orgánulo está acoplado a la activación de vías de señalización sensibles a Ca^{2+} como actividades quinasa y fosfatasa, y, en el espacio perinuclear, parece desencadenar la transcripción de genes. Así mismo, variaciones locales en la morfología del RE están asociadas con la densidad y maduración de las espinas dendríticas, lo que relaciona la morfología del RE con cambios en la organización sináptica y en la función (Stutzmann & Mattson, 2011).

5.2.1.1 Receptores de inositol trifosfato

Son canales permeables a Ca^{2+} de gran conductancia que se localizan, de forma ubicua, en la membrana del RE los cuales deben su nombre a la molécula que origina su apertura, el IP_3 . Esta molécula se genera como consecuencia de la activación de ciertas GPCR o de algunos TKR que, en ambos casos, resulta en la activación de la PLC, enzima capaz de hidrolizar PIP_2 generando IP_3 y DAG. De esta manera, la unión de IP_3 a su receptor, IP_3R , provoca la apertura de estos y permiten la liberación de Ca^{2+} desde el RE al citosol.

Se han identificado tres isoformas para IP_3R , $\text{IP}_3\text{R1-3}$, las cuales, a pesar de estar codificadas por genes diferentes (*ITPR1-3*), muestran un 70 % de homología en su secuencia. Cada una de las isoformas presenta una afinidad por Ca^{2+} diferente, siendo $\text{IP}_3\text{R2}$ la de mayor afinidad, mientras que el $\text{IP}_3\text{R3}$ es la de menor ($\text{IP}_3\text{R2} > \text{IP}_3\text{R1} > \text{IP}_3\text{R3}$). Cabe destacar que estos canales pueden formar tanto homo como heterotetrámeros, de tal manera que cada uno de los monómeros presentan sus extremos N y C-terminal en la cara citosólica. Los dominios de estos receptores pueden dividirse en 5: dominio supresor (SD), dominio central de unión a IP_3 (LBD), dominio regulador, dominio transmembrana y dominio C-terminal (Figura 37A). Por un lado, en la cola C-terminal se localiza un segmento en espiral el cual participa en la formación del tetrámero, seguido del dominio transmembrana. Este último consta de seis segmentos TM (TM1-6) unidos entre sí por 3 bucles luminales y 2 citosólicos, donde son los TM5 y 6, así como el bucle luminal intermedio, son los formadores del poro (Figura 37B). En cuanto al extremo N-terminal, es aquí donde se localizan los otros 3 dominios funcionales los cuales participan en la regulación de estos canales: el dominio supresor (SD), también llamado dominio de acoplamiento N-terminal; el dominio LBD, el cual consta de dos partes unidas por una bisagra que forman la hendidura de unión de IP_3 , y el dominio modulador y transductor (Figura 37).

Estos tetrámeros tienen una apariencia “similar a un hongo” (Figura 37A), con el tallo insertado en la membrana del RE y la tapa expuesta al citosol. El tallo se compone, principalmente, por el dominio transmembrana con sus 6 segmentos TM. El resto de los dominios están en la “tapa”, expuestos al citosol. Esta disposición hace que el dominio de unión a IP_3 y el dominio regulador estén disponibles para numerosas interacciones y modificaciones postranscripcionales capaces de regular la actividad del receptor, incluidas la fosforilación y oxidación.

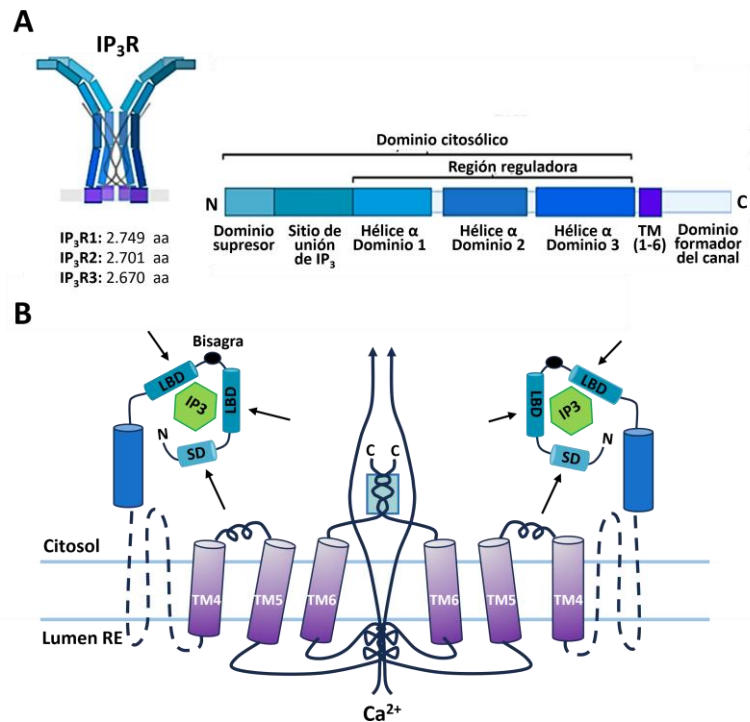


Figura 37. Estructura IP₃R. **A.** Se han descrito 3 isoformas de IP₃R (IP₃R1-3), cada una formada por cuatro subunidades que se ensamblan formando tetrámeros. La mayor parte de la estructura del IP₃R, en concreto, 5 dominios, se localiza en la cara citosólica. **B.** El IP₃R forma un tetrámero, pero, para mayor claridad, en la figura, únicamente, se representan dos subunidades del IP₃R1. Las partes coloreadas expuestas en la cara citosólica indican los primeros tres dominios funcionales: el dominio supresor (SD, también llamado dominio de acoplamiento N-terminal); los dominios LBD unidos por una bisagra y que forman la hendidura de unión de IP₃, y el dominio modulador y transductor. El dominio del canal subsiguiente y la cola C-terminal, juntos, constan de seis dominios transmembrana (TM1-6) unidos por tres bucles luminales y dos bucles citosólicos, así como de un segmento en espiral (CC) que participa en el ensamblaje del tetrámero. En particular, el poro del canal está formado por TM5 y TM6 y el bucle luminal intermedio. La unión de IP₃ se transmite al canal mediante una interacción directa entre el dominio supresor (N-terminal) y el bucle citosólico entre TM4 y TM5 a través del dominio modulador y transductor. Basado en (Parys & De Smedt, 2012).

La actividad de los IP₃R está regulada por diferentes moléculas las cuales pueden actuar como agonistas o antagonistas. Entre las que actúan como agonistas, destaca el ATP, ROS o el propio Ca²⁺, tanto el citosólico como el luminal. Cabe señalar que el Ca²⁺ citosólico tiene un papel dual. Por un lado, a bajas concentraciones, el Ca²⁺ citosólico puede estimular la liberación a través de receptores IP₃R mediante un mecanismo conocido como liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR, del inglés *Ca²⁺ induced Ca²⁺ release*). Por otro lado, a concentraciones elevadas (superiores a 300 nM) este mismo catión actúa como antagonista. Otras moléculas capaces de actuar como antagonistas de este receptor son la cafeína o la CaM, entre otras. Pero la actividad de estos canales no está únicamente regulada por la acción de diferentes agonistas o antagonistas, sino también por la acción de enzimas como la PKA, la cual modula positivamente estos canales mediante su fosforilación, o la PKB, que los modula negativamente.

Hay que tener en cuenta que una de las principales características de la señal de Ca²⁺ intracelular es su versatilidad, debida, en parte, a las fluctuaciones de la [Ca²⁺]_{cit} que generan patrones de señalización tanto oscilatorios como transitorios. Por un lado, la isoforma IP₃R1 presenta ambos tipos de patrón de señalización, tanto oscilatorio como transitorio. Por otro lado, están las otras dos isoformas, de tal manera que en la isoforma IP₃R2 predomina la señalización oscilatoria, mientras que en IP₃R3 presenta una señalización de tipo transitorio (Kerkhofs et al., 2018).

Por lo tanto, cada isoforma de IP₃R desempeña un papel específico en la señalización. Además, puesto que su expresión es diferente según el tipo celular, aunque la mayoría de los tipos celulares expresan más de un subtipo de IP₃R, la expresión diferencial de estas isoformas entre los diferentes tejidos da lugar a diferentes patrones de expresión específicos de tejido/célula. Por ejemplo, en el cerebro, la isoforma 1, IP₃R1, es la predominante, particularmente en neuronas de regiones del cerebelo, el hipocampo y la neocorteza. Por el contrario, la expresión de IP₃R2 en el cerebro es limitada y se ha implicado en la comunicación entre neuronas y astrocitos. En cuanto a la isoforma 3, esta está involucrada en la liberación de neurotransmisores.

Debido a su expresión ubicua, la existencia de diversas isoformas y las complejas interacciones reguladoras que afectan a la actividad de IP₃R, las señales de Ca²⁺ mediadas por IP₃R son capaces de controlar un amplio abanico de funciones que van desde la transcripción y secreción de genes hasta actividades cerebrales, como el aprendizaje y la memoria. De hecho, las alteraciones en la señalización de IP₃R se relacionan con numerosas enfermedades como la EA, la EH, la insuficiencia cardiaca o el cáncer (Baker et al., 2023).

5.2.1.2 *Receptores de rianodina*

Son canales iónicos de gran tamaño los cuales presentan una gran conductancia de Ca²⁺ y son capaces de crear aumentos rápidos y transitorios de Ca²⁺. Se localizan en la membrana del RE y su activación se origina por el alcaloide rianodina. Este tiene un papel dual ya que, a bajas concentraciones, es capaz de estimular la liberación de Ca²⁺ desde el RE a través de los RyR mientras que, a altas la inhibe.

Se han identificado tres isoformas del RyR (RyR1-3), cada una de ellas codificadas por un gen diferente. Al igual que ocurre con los IP₃R, la expresión de las isoformas difiere en función del tipo celular/tejido. En concreto, se tiene que la isoforma RyR1 es la predominante en el músculo esquelético y en algunas neuronas. En cuanto a la isoforma RyR2, esta se expresa en el músculo cardiaco y liso. Por último, la isoforma RyR3 está ampliamente distribuida en el músculo y en el cerebro; de hecho, en neuronas de hipocampo la isoforma 3 es la mayoritaria.

Presentan una gran homología con los IP₃R y, al igual que estos, forman tetrámeros donde cada uno consta de 5-6 hélices α con un dominio C-terminal citosólico que forma el canal. El dominio N-terminal, localizado en la cara citosólica, presenta un dominio regulador que permite la modulación de la actividad del canal por diversas moléculas como la cafeína, el ATP, el ADP, la ribosa o el óxido nítrico, las cuales actúan como agonistas. Uno de los moduladores fisiológicos más importantes, al igual que para los IP₃R, es el propio Ca²⁺ citosólico, también mediante el mecanismo CICR. Este mecanismo permite la amplificación de la señal de Ca²⁺ que se produce tras el aumento de Ca²⁺ citosólico originado tanto por la entrada de Ca²⁺ a través de los VOCC, como por la liberación de Ca²⁺ desde el RE a través de los IP₃R.

La principal función de estos canales es el acoplamiento excitación-contracción del músculo esquelético y cardiaco. Alteraciones en la expresión de estos genes o la presencia de ciertas mutaciones se han asociado con diversas enfermedades. Por ejemplo, mutaciones en *Ryr1* se relacionan con enfermedades musculares debilitantes o potencialmente mortales como la hipertermia maligna o las parálisis periódicas atípicas. Del mismo modo, mutaciones en *Ryr2* se han asociado con enfermedades que afectan al músculo esquelético y cardiaco (Lanner et al., 2010).

5.2.2 Mecanismos de entrada de Ca^{2+} al retículo endoplasmático

En el mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} en el interior del RE también entran en juego las bombas que captan el Ca^{2+} citosólico y permiten que exista tal gradiente de concentración entre el interior de este y el citosol. El principal mecanismo es la bomba SERCA, ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplasmático.

5.2.2.1 ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplasmático

SERCA es una proteína integral del RE que facilita la entrada de Ca^{2+} al RE cuyo papel principal será la regulación de los niveles de Ca^{2+} citosólico. Pertenece a la familia de las ATPasas de tipo P entre las que se incluye una gran variedad de bombas de membrana las cuales utilizan la energía liberada a través de la hidrólisis de ATP y una enzima fosforilada intermedia para transportar el Ca^{2+} a través de la membrana en contra de gradiente químico.

Se han identificado tres genes distintos (*ATP2A1-3*) los cuales codifican para tres isoformas, SERCA1-3 respectivamente, y hasta 12 variantes de *splicing* alternativo. A pesar de que todas las isoformas tienen una estructura altamente conservada, sus patrones de expresión y afinidad por Ca^{2+} difieren (Britzolaki et al., 2020). Estas isoformas comparten una estructura general que se compone de una única cadena polipeptídica (110 KDa) formada por diez hélices α transmembranas (TM1-10) las cuales constituyen el dominio M, un bucle luminal corto y tres dominios citosólicos (A, N y P) (Figura 38). En concreto, los segmentos TM2, TM5, TM6 y TM8 son los formadores del poro y, en consecuencia, facilitan el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana. Además, cuatro de las hélices α TM (TM2-5) se extienden más allá de la membrana del RE y sobresalen hacia el citosol, formando tres dominios citosólicos: el dominio actuador (dominio A) que media la unión y liberación de Ca^{2+} ; el dominio de unión de ATP (dominio N), y el dominio de fosforilación (dominio P). En el lado citosólico, concretamente en las hélices TM4 y 5, se localizan dos sitios de unión de Ca^{2+} (sitios I y II) muy próximos entre sí. Estos sitios actúan de forma cooperativa entre sí, de manera que la unión de iones Ca^{2+} al sitio I aumenta la afinidad de unión por el sitio II. Una vez que los dos sitios de Ca^{2+} están ocupados, los dominios citoplasmáticos (dominio N, P y A) sufren cambios conformacionales y translocan iones de Ca^{2+} hacia el interior del RE. Esta organización está altamente conservada entre todas las isoformas, presentándose las principales diferencias en el extremo C-terminal (Britzolaki et al., 2020).

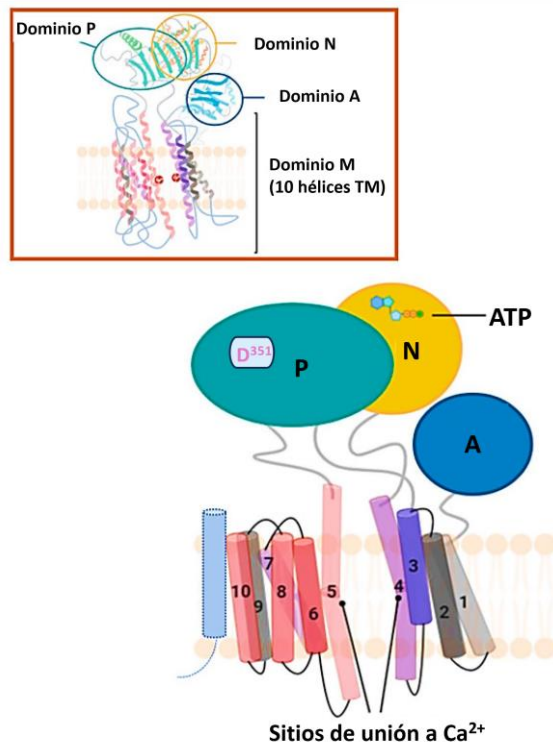


Figura 38. Estructura de la SERCA. Su estructura se compone de cuatro dominios: un dominio actuador o dominio A (para desfosforilación); un dominio M transmembrana (formado por 10 hélices y 2 sitios de unión de iones Ca^{2+} entre las hélices TM4 y 5); un dominio N (fuente de fosforilación), y un dominio P que consta del sitio de fosforilación, el residuo de aspartato 351 (D351). La imagen del recuadro superior muestra una representación simplificada de la estructura cristalina de SERCA. Modificado de (Sharma et al., 2021).

El papel de la SERCA implica el bombeo de Ca^{2+} al RE, lo que resulta en una disminución de los niveles de Ca^{2+} citosólico y en el mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} del RE. Específicamente, la SERCA acopla el transporte de 2 iones de Ca^{2+} a expensas de una molécula de ATP a lo largo de un ciclo de alteraciones conformacionales entre dos estados: E1 y E2. En la Figura 39 se muestra el mecanismo de transporte de la SERCA. Según el modelo, el ciclo de la bomba comienza en el estado E1-ATP; es decir, cuando la SERCA tiene una alta afinidad por Ca^{2+} . Tras la unión de los iones Ca^{2+} tiene lugar una serie de cambios conformacionales dentro de los dominios transmembrana y el citoplasmático, lo que acerca el ATP del dominio N al residuo de aspartato 351 (D351, en el dominio P) para facilitar la transferencia del γ -fosfato, lo que provoca el cambio de estado a $\text{Ca}_2\text{-E1-P-ADP}$. Desde este estado intermedio de alta energía ($\text{Ca}_2\text{-E1-P-ADP}$), la bomba se prepara para pasar a un estado de menor energía, ($\text{Ca}_2\text{-E2-P-ADP}$), transfiriendo completamente el γ -fosfato al dominio P y coordinando iones Mg^{2+} con todos los grupos fosfato presentes. Nuevamente, en un proceso de dos pasos, se intercambia, en primer lugar, ADP por ATP en el RE, lo que provoca cambios conformacionales que propician la creación de un canal (E2-P-ATP). En segundo lugar, en este estado, el Ca^{2+} queda expuesto al interior del RE y su afinidad de unión a SERCA es muy baja, lo que resulta en su liberación. Al mismo tiempo, se unen a la SERCA 3 H^+ y la bomba restablece su estado de reposo (Figura 39).

No obstante, si esta bomba, en lugar de funcionar como lo hace, se bloqueará o se inhibiese, se induciría un vaciamiento lento del Ca^{2+} . Entre los inhibidores más utilizados destacan el inhibidor irreversible, la tapsigargina (Tg) o inhibidores reversibles como el ácido ciclopiazónico (CPA).

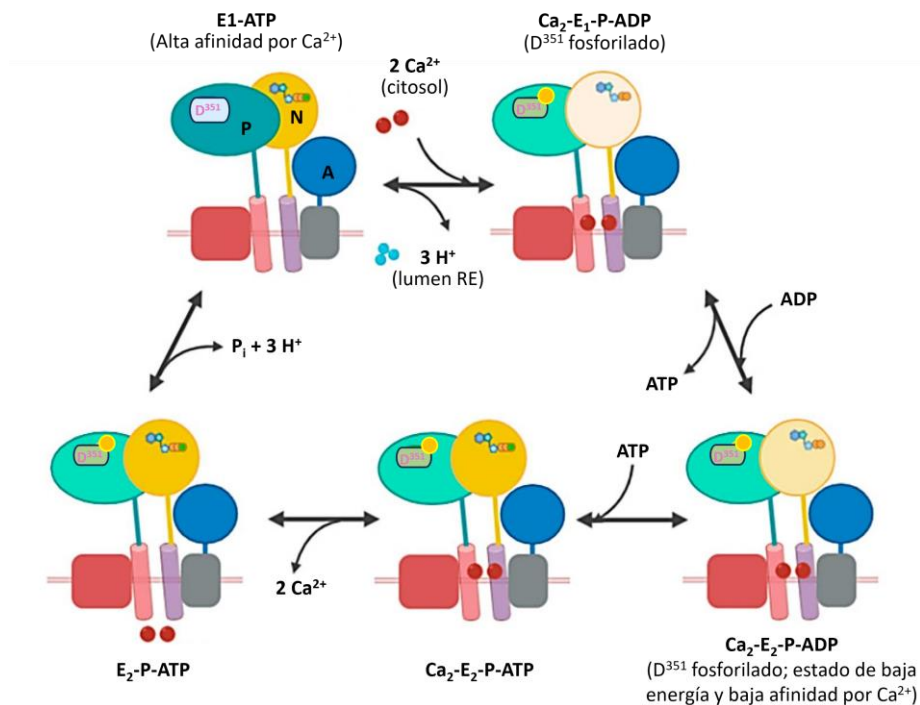


Figura 39. Actividad de la SERCA. El ciclo de la bomba comienza en el estado E1-ATP, estado en el que la bomba presenta una alta afinidad por Ca^{2+} . Este estado permite la unión de 2 iones Ca^{2+} lo que da lugar a una serie de cambios conformacionales que acercan el ATP (del dominio N) al Aspartato (del dominio P) pasando SERCA al estado $\text{Ca}_2\text{-E}_1\text{-P-ADP}$. A continuación, tiene lugar la fosforilación del Aspartato (D^{351}) y con ello el cambio de estado a $\text{Ca}_2\text{-E}_2\text{-P-ADP}$, estado es de menor energía que el anterior y de menor afinidad por Ca^{2+} . En este estado, la bomba intercambia el ADP por ATP induciendo de nuevo cambios conformacionales que generan un canal al que queda expuesto el Ca^{2+} (estado $\text{Ca}_2\text{-E}_2\text{-P-ATP}$). Este nuevo estado presenta una baja afinidad por Ca^{2+} , lo que resulta en la liberación de Ca^{2+} , el cual a través del canal entra al lumen del RE, pasando la bomba al estado $\text{E}_2\text{-P-ATP}$. Al mismo tiempo que se libera el Ca^{2+} , se unen a SERCA 3 H^+ lo que conduce a la SERCA a su estado inicial de reposo. Modificado de (Sharma et al., 2021).

Las funciones de SERCA dependen tanto de las isoformas como de las diferentes variantes de *splicing*, pues entre ellas presentan ligeras diferencias en la afinidad por el Ca^{2+} . Además, los perfiles de expresión de las isoformas son diferentes a lo largo de los diferentes tejidos, lo que sugiere funciones específicas en cada uno de dichos tejidos. En concreto, se han identificado dos isoformas de SERCA1, la SERCA1a y la SERCA1b, que se expresan, principalmente, en células de músculo esquelético adulto y neonatal, respectivamente. Respecto a la SERCA2, se han descrito cuatro variantes (SERCA2a-d) con expresión específica de tejido. En cuanto a la SERCA2a, esta se expresa en el tejido cardíaco y en los músculos de contracción lenta, mientras que la SERCA2b se encuentra en el músculo liso y en tejidos no musculares. Respecto de la isoforma SERCA2c, esta se ha identificado en monocitos y tejido cardíaco. Por último, la isoforma SERCA2d se ha detectado en el músculo esquelético. Respecto de la isoforma SERCA3, se ha identificado su expresión en células no musculares.

En cuanto a su papel fisiopatológico, alteraciones en la actividad de SERCA se han relacionado con diferentes patologías cardíacas. Además, recientemente, también se ha implicado a SERCA2 en trastornos que afectan a la función cognitiva, incluida la EA, mientras que alteraciones en la expresión de SERCA3 se ha relacionado con diversos tipos de cáncer como mama, colon y pulmón.

5.3 La Mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares que participan en diversas funciones esenciales para la célula. Entre estas funciones, destaca su papel en la bioenergética celular mediante la producción de ATP y otros intermediarios a través del ciclo de Krebs y de la fosforilación oxidativa. Además, participa en diferentes mecanismos como la regulación de ROS o la respuesta ante el estrés celular mediante dos mecanismos claves: la autofagia y la apoptosis. También participan en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular gracias a su capacidad amortiguadora ante incrementos de Ca^{2+} citosólico.

Este orgánulo está formado por una doble membrana: la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI), por lo que todas aquellas moléculas, proteínas o iones que deban entrar o salir de la mitocondria, lo harán atravesando las dos membranas. Por un lado, en la MME se localizan una gran cantidad de canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC) o porinas que permiten el paso de Ca^{2+} o proteínas inferiores a 5 KDa. Por otro lado, la MMI es impermeable a la mayoría de los iones y presenta una superficie mucho mayor que la MME debido al gran número de crestas que posee. En esta membrana se disponen diferentes sistemas de transporte entre los que destacan el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU), canal que permite la entrada de Ca^{2+} al interior de las mitocondrias, y los intercambiadores catiónicos que permiten la salida de Ca^{2+} (Figura 40). Además, en la MMI se localizan diferentes complejos enzimáticos los cuales constituyen la cadena transportadora de electrones. En cuanto al espacio intermembrana que generan las dos membranas anteriores, hay presentes enzimas como la creatina quinasa y el citocromo C (CitC), este último muy importante en procesos de apoptosis.

No obstante, a pesar de que las mitocondrias no presentan bombas, estas son capaces de captar grandes cantidades de Ca^{2+} y de actuar como tamponadoras de Ca^{2+} . Además, también son capaces de absorber otros cationes como el hierro y el Ca^{2+} . Esto es posible gracias a la diferencia de potencial entre el citosol y la matriz mitocondrial como consecuencia de la cadena de transporte de electrones. Este transporte de electrones entre los diferentes complejos de la cadena respiratoria genera un flujo de H^+ hacia el espacio intermembrana que genera un gradiente (en torno a -180 mV) el cual es aprovechado por la ATPsintetasa para sintetizar ATP. Esta diferencia genera un enorme gradiente electroquímico que permite la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, que se produce normalmente a través del MCU. Cabe señalar que el MCU se localiza en la MMI y que presenta una baja afinidad por Ca^{2+} , por lo que la mitocondria no es capaz de captar Ca^{2+} directamente desde el citosol, a menos que se generen microdominios de alta $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ entorno a estos canales. Por ello, para poder mantener los niveles basales de Ca^{2+} es necesaria una transferencia directa desde otros orgánulos, lo cual es posible gracias a la capacidad dinámica de estos orgánulos. En este sentido, las mitocondrias presentan una gran movilidad y pueden sufrir procesos de fusión y fisión.

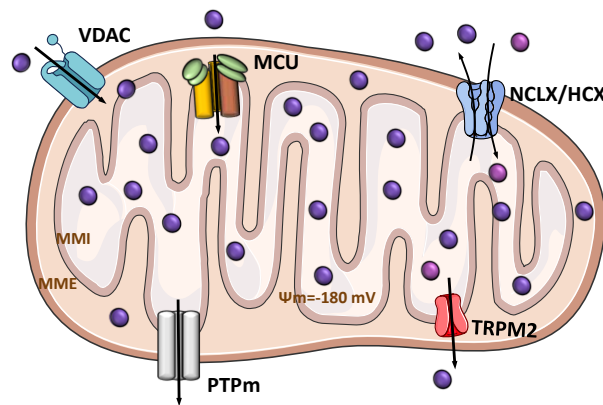


Figura 40. Sistemas de transporte de Ca^{2+} mitocondrial. El esquema muestra la mitocondria y los componentes claves involucrados en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial. La mitocondria es un orgánulo formado por dos membranas: la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI). Por lo tanto, para alcanzar la matriz mitocondrial todas aquellas moléculas, proteínas e iones deben atravesar ambas membranas. En la MME se localizan los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC) que permiten el paso de Ca^{2+} y otras proteínas de pequeño tamaño. La MMI es impermeable a la mayoría de los iones y presenta una extensión superior a la MMI. En ella se localizan sistemas de transporte como el uniportador de calcio mitocondrial (MCU) a través del cual entra Ca^{2+} a la matriz mitocondrial e intercambiadores catiónicos que permiten la salida de Ca^{2+} como son el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCLX) y el intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (HCX). Cabe destacar, también, la participación de otros mecanismos de transporte como el TRPM2 localizado en la MMI, o el poro de transición mitocondrial (PTPm), los cuales extruyen Ca^{2+} al citosol.

La dinámica mitocondrial está modulada por una gran variedad de señales y estímulos, incluida la bioenergética, el ciclo celular y la diferenciación celular. Por un lado, la función principal de la fusión es proteger las mitocondrias, pues permite la complementación funcional entre estas mediante el intercambio de sus componentes. Por otro lado, la fisión mitocondrial es esencial para la estructura. Además, permite la generación de pequeñas mitocondrias que, cuando se dañan, pueden ser degradadas selectivamente por los autofagosomas.

El papel de la mitocondria en la bioenergética celular es clave. Ya en la década de 1960, Mitchell propuso la hipótesis quimiosmótica, un hito en el campo de la bioenergética mitocondrial. De acuerdo con esta teoría, los complejos de la cadena respiratoria oxidan los equivalentes reducidos durante la oxidación, lo que permite el bombeo de protones al espacio intermembrana de la mitocondria. Este proceso genera una diferencia de cargas y pH a través de la membrana mitocondrial interna, lo que se denomina potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mit}}$). La energía procedente de este gradiente electroquímico se utiliza para la síntesis de ATP. En ciertos tejidos, como son los del SNC, existe una demanda energética muy alta, energía que se obtiene, en su mayoría, a través de la energía generada mediante la fosforilación oxidativa.

La homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial es un proceso altamente regulado y fundamental para la regulación del metabolismo aeróbico y la supervivencia celular. Desempeña un papel importante en la modulación de la amplitud y en la sincronización de las señales de Ca^{2+} intracelular a través de dos mecanismos: la capacidad tamponadora de Ca^{2+} e interacciones funcionales con otros canales u orgánulos celulares. Las mitocondrias presentan una capacidad amortiguadora de Ca^{2+} que puede oscilar entre 50-500 nM. Gracias a esta capacidad, son capaces de amortiguar sobrecargas de Ca^{2+} citosólico en ocasiones patológicas. Además, el estrecho contacto entre las mitocondrias y algunos canales de la membrana del RE o de la MP permite crear microdominios de Ca^{2+} citosólico que, a su vez, provocan un aumento del Ca^{2+} mitocondrial. Se han observado regiones de contacto entre las mitocondrias y el RE donde, al abrirse los canales de IP_3R , la

superficie de las mitocondrias queda expuesta a altas $[Ca^{2+}]_{cit}$, lo que provoca un aumento del Ca^{2+} mitocondrial. El espacio restringido entre el RE y las mitocondrias se conoce como MAM (membranas asociadas a mitocondrias). En particular, alrededor del 20 % de la superficie de las mitocondrias está en estrecho contacto con el RE y proteínas mitocondriales. Entre las diferentes proteínas que participan en este contacto estrecho destaca GRP75 la cual actúa como nexo entre los IP_3R del RE y los VDAC de la mitocondria. Otra molécula implicada en la unión del RE y las mitocondrias es la mitofusina 2 (MFN2).

La captación de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias es esencial no solo para la amortiguación del Ca^{2+} citosólico, sino también para la regulación metabólica. Este catión activa enzimas importantes involucradas en el metabolismo como la piruvato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Por lo tanto, niveles bajos de Ca^{2+} mitocondrial alteran la fosforilación oxidativa induciendo la autofagia. Por el contrario, la acumulación de Ca^{2+} excesiva desencadena procesos de necrosis y apoptosis. Además, ya hemos dicho que estos orgánulos son capaces de captar este catión en contra del gradiente de concentración gracias a un elevado potencial negativo en su interior. Este potencial de membrana varía según el estímulo o tipo celular. Un potencial de membrana bajo se asocia con una producción de ATP y superóxido limitada, lo que envía señales a las mitocondrias para su eliminación mediante la mitofagia. Por el contrario, un potencial mitocondrial elevado aumenta la síntesis de ATP y la producción de superóxido.

La mitocondria está relacionada con diversas patologías. En particular, se ha descrito que, en el cáncer, la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial está alterada debido a cambios en la expresión de diferentes proteínas transportadoras de Ca^{2+} , situación que conlleva un aumento de la concentración de Ca^{2+} mitocondrial y un aumento de ROS. Estos cambios, a su vez, activan vías de señalización relacionadas con la proliferación celular y cambios metabólicos que favorecen el fenotipo tumoral. También, el aumento de ROS se ha vinculado con la aparición de enfermedades cardiovasculares, diabetes o enfermedades neurodegenerativas como la EA (Delierneux et al., 2020; Woods et al., 2019).

5.3.1 Mecanismos de captación de Ca^{2+} de la mitocondria

Como ya se ha mencionado, la mitocondria es un orgánulo subcelular con doble membrana, por lo que, para acceder al lumen mitocondrial, los iones Ca^{2+} han de atravesar dos membranas: la MME y la MMI. En primer lugar, el Ca^{2+} accede al espacio intermembrana mitocondrial a través de los VDAC y, posteriormente, a través del MCU, accede al lumen mitocondrial.

5.3.1.1 El complejo uniportador de Ca^{2+} mitocondrial

El MCU, localizado en la MMI, presenta una baja afinidad por Ca^{2+} ($K_d=20-30 \mu M$), por lo que sólo es capaz de captar Ca^{2+} de microdominios citosólicos. Esta captación se ve favorecida gracias al gran potencial de membrana que se genera en la cadena respiratoria por el bombeo de protones al espacio intermembrana de la mitocondria. En humanos, MCU se expresa de forma ubicua en todos los tejidos, aunque no lo hace de igual forma en todos ellos. Por ejemplo, su expresión es ocho veces mayor en el cerebelo y músculo esquelético respecto del corazón.

En cuanto a su estructura, está formado por diferentes dominios funcionales de los cuales el MCU es la subunidad formadora del poro. En concreto, consta de dos hélices transmembrana con los extremos en la matriz mitocondrial, conectadas por un lazo corto con residuos ácidos situado en el espacio intermembrana. A parte de la subunidad formadora del poro, MCU, el complejo MCU se compone de numerosas subunidades que modulan la captación de Ca^{2+} :

MCUb, EMRE, MICU1, MICU2, MICU3 y MCUR1 (Figura 41). Cabe señalar que la expresión de estas subunidades no es la misma que para MCU; de forma general, su expresión es mayor a excepción de MCUb (Penna et al., 2018)

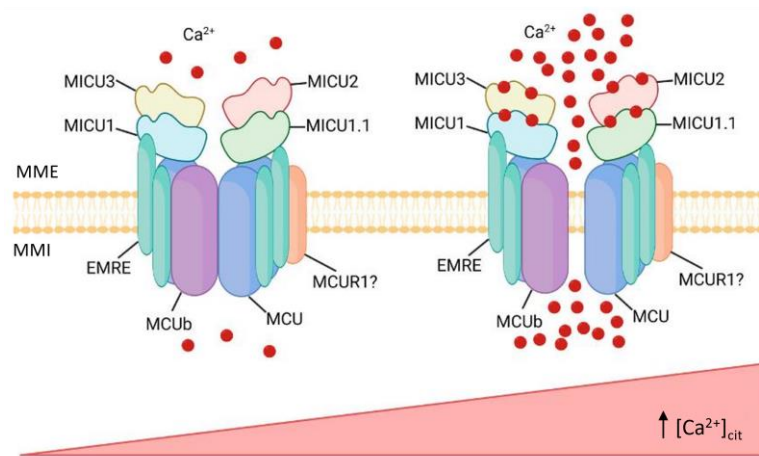


Figura 41. Complejo MCU. El complejo MCU se localiza en la MMI y está compuesto por las subunidades formadoras del poro, MCU, y las diferentes subunidades reguladoras como MCUb, la familia MICU y la proteína estructural EMRE. Las proteínas MICU detectan aumentos en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ a través de dominios de mano EF, de tal manera que son capaces de experimentar cambios conformacionales los cuales modulan la entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial. Modificado de (D'Angelo & Rizzuto, 2023a).

- **MCUb:** parálogo de MCU, puede oligomerizar consigo mismo o con MCU. Es un modulador negativo de MCU, lo que implica una disminución en la captación de Ca^{2+} .
- **Regulador esencial de MCU (EMRE):** como su propio nombre indica, es un regulador esencial del complejo MCU. Se localiza en la MMI y presenta un único dominio transmembrana con un extremo C-terminal ácido. Actúa de puente entre MCU y otros reguladores como MICU1 y MICU2.
- **MICU1:** estructura dimérica con dos manos EF que actúan como sensores de Ca^{2+} . Se localiza en el espacio intermembrana, por lo que interacciona y regula la actividad de MCU a través de la interacción con la subunidad EMRE. Tiene un papel dual en la captación de Ca^{2+} pues, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}} < 3 \mu\text{M}$, tiene un efecto inhibitorio, mientras que si la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ aumenta -es decir, se forman microdominios-, entonces MICU1 se disocia de MCU y el poro se abre para permitir la entrada de Ca^{2+} .
- **MICU2:** al igual que MICU1, presenta una estructura dimérica con dos dominios manos EF y regula la actividad de MCU mediante la interacción con MICU1 mediante un puente disulfuro. Se trata de un regulador negativo de la actividad de MCU, inhibiendo la captación de Ca^{2+} a grandes concentraciones. La expresión de esta subunidad es necesaria para el funcionamiento de MCU y viene determinada por la expresión de MICU1.
- **MICU3:** del mismo modo que MICU1 y MICU2, tiene una estructura dimérica con dos dominios manos EF que detectan el Ca^{2+} . Forma herodímeros con MICU1 a través de un puente disulfuro por el cual regula la actividad de MCU. Es un regulador positivo de la captación de Ca^{2+} . De forma general, su expresión es elevada, sobre todo en el SNC.

- **MCUR1:** subunidad reguladora que consta de dos hélices transmembrana con sus extremos dirigidos al espacio intermembrana, y un lazo que las une localizado en el espacio intermembrana. Interacciona directamente con MCU ejerciendo un efecto de regulación positiva.

Además, la actividad de MCU también se regula por cationes como el Mg^{2+} o el propio Ca^{2+} los cuales se unen a una región de su extremo N-terminal, lo que desestabiliza los oligómeros de MCU y da lugar a monómeros no funcionales. También, ROS es capaz de regular de forma directa y positiva la actividad de MCU a través de la Cys-97, de forma que la presencia de ROS favorece la captación de Ca^{2+} lo que, a su vez, induce la mayor producción de ROS y respuesta inflamatoria. La desregulación del MCU se asocia con la patogénesis de enfermedades de alta prevalencia como cáncer o enfermedades neurodegenerativas como la EP o la EA (D'Angelo & Rizzuto, 2023b).

5.3.1.2 Canales aniónicos dependientes de voltaje

Los VDAC se distribuyen ampliamente en la MME formando poros los cuales median el flujo de iones como el Ca^{2+} y de pequeños metabolitos entre el citosol y la mitocondria. Se han identificado tres isoformas (VDAC1-3) las cuales muestran una elevada expresión en SNC, corazón, músculo esquelético, sistema digestivo y reproductivo.

Los VDAC son proteínas transmembrana de 30 a 35 KDa que constan, aproximadamente, de entre 280-300 aa, que forman poros de 18-20 Å en forma de barril constituidos por 19 láminas β alineadas en orientación antiparalela. Su extremo N-terminal cuenta con una hélice α que recubre el poro del canal dentro del barril. Además, puede sufrir cambios conformacionales, aún de naturaleza desconocida, los cuales inducen cambios en la conductancia y en la selectividad del canal (Sander et al., 2021). También contienen un dominio sensor del voltaje cargado positivamente, el cual, en el estado abierto del canal, se localiza en el poro del canal y permite el flujo bidireccional de Ca^{2+} , ATP y ADP. Por el contrario, en el estado cerrado, el sensor de voltaje se desplaza fuera del canal, hacia la superficie de la membrana mitocondrial, lo que reduce el tamaño del poro e invierte la selectividad del canal. No obstante, aunque en este cerrado existe una impermeabilidad a ATP/ADP, todavía existe cierta permeabilidad a iones pequeños y Ca^{2+} (Figura 42).

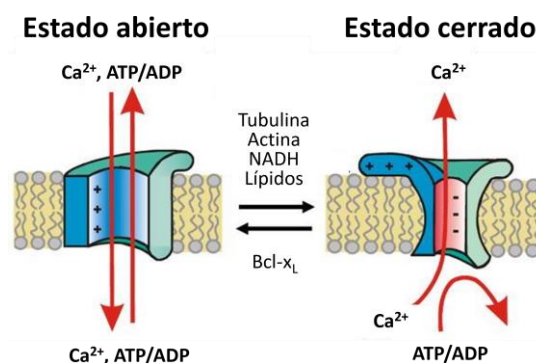


Figura 42. Mecanismo de activación/ desactivación de VDAC. VDAC presenta en su estructura un dominio sensor del voltaje cargado positivamente. En el estado abierto, el sensor del voltaje se localiza en el poro del canal, permitiendo el flujo bidireccional de Ca^{2+} , ATP y ADP. En el estado cerrado, el sensor de voltaje se desplaza hacia fuera del canal, en la superficie de la membrana mitocondrial, lo que conlleva una disminución del volumen del poro e inversión de la selectividad del canal. Los estados cerrados son impermeables a los flujos de ATP/ADP pero siguen conduciendo iones pequeños y Ca^{2+} . Existen múltiples estímulos que regulan la compuerta VDAC o inducen el bloqueo transitorio del estado abierto. Modificado de (Rostovtseva & Bezrukov, 2008).

Las tres isoformas de VDAC tienen una permeabilidad baja a Ca^{2+} pero significativamente diferente, siendo VDAC1 el menos selectivo para Ca^{2+} , mientras que el VDAC3 es el que más. Además, el papel de cada isoforma en la señalización por Ca^{2+} es diferente. Por ejemplo, VDAC1 forma un complejo con IP_3R mediado por la proteína chaperona regulada por glucosa 75 (GRP75). Por lo tanto, cabe destacar la capacidad de los VDAC en la regulación de la función mitocondrial a través de su interacción con múltiples proteínas. En concreto, entre las proteínas con las que interacciona destacan los RyR o IP_3R del RE, o con el receptor de potencial transitorio de mucolipina 1 (TRPML1) en los lisosomas, de tal manera que dicha interacción da lugar a los MAM y, en consecuencia, se permite la captación de grandes cantidades de Ca^{2+} . De esta forma, VDAC facilita la transferencia eficiente de Ca^{2+} desde el RE a las mitocondrias mediante la formación de estos complejos proteicos.

La actividad de estos canales puede ser modulada por diversos factores, incluidos el voltaje, ligandos específicos y diversas proteínas de membrana o citosólicas. Entre estas proteínas, se incluyen enzimas glucolíticas y proteínas neuronales íntimamente involucradas en diferentes enfermedades neurológicas, proteínas tales como la α -sinucleína, el péptido A β , tau o proteínas mitocondriales de la familia Bcl-2 -vinculadas a la apoptosis-. Todas estas proteínas pueden afectar a la permeabilidad del VDAC y, en consecuencia, afectar a la homeostasis mitocondrial (Rosencrans et al., 2021).

5.3.2 Mecanismos de salida de Ca^{2+} desde la mitocondria: Intercambiadores

La concentración de Ca^{2+} mitocondrial es similar a la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ pero, debido a su diferencia de potencial, esta actúa como amortiguador de Ca^{2+} pudiendo llegar a alcanzar una concentración de Ca^{2+} mitocondrial de 0,1 M. Por ello, para contrarrestar estos aumentos de Ca^{2+} y mantener los niveles, la mitocondria cuenta con mecanismos de transporte que liberan Ca^{2+} al citosol en contra de gradiente electroquímico como NCLX y mHCX. Por lo tanto, la expresión y actividad de estos intercambiadores es necesaria para prevenir la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial la cual conllevaría la apertura de PTPm.

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

El NCLX, se localiza en la MMI cuya expresión se da, de forma mayoritaria, en células excitables. Está codificado por el gen *Slc8b1* y pertenece a la familia de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Sin embargo, es el único intercambiador capaz de transportar Li^+ , $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$, propiedad que le da su otro nombre. Por lo tanto, tiene una doble función de intercambio: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$. Cabe señalar la estequiometría de intercambio de dicho intercambiador, ya que introduce 3 Na^+ por cada Ca^{2+} que expulsa, lo que hace que el NCLX sea electrogénico. Por lo tanto, existe la necesidad de aprovechar el potencial de membrana mitocondrial para expulsar Ca^{2+} de la matriz mitocondria (Katoshevski et al., 2021). Su actividad está regulada por la fosforilación de PKA en la Ser258 y por un sitio alostérico de detección de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$, tal que una disminución de 10 mV sería suficiente para inhibir la salida de Ca^{2+} (Figura 43).

Este intercambiador presenta una relativa alta afinidad por Na^+ incluso en reposo, por lo que pequeñas variaciones en la $[\text{Na}^+]_{\text{cit}}$ pueden tener un fuerte impacto en la tasa de intercambio de dicho intercambiador. Además, estudios recientes han destacado un papel importante de NCLX en la regulación de SOCE, principal vía de entrada de Ca^{2+} al citosol de las células no excitables. Como ya se mencionó anteriormente, SOCE consiste en que, tras el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares, del RE, se induce la entrada de Ca^{2+} a través de ORAI de la MP, pero también induce la entrada de Na^+ . Esta entrada de Na^+ es necesaria para activar el intercambio de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de NCLX que, a su vez, impulsa la entrada continuada de Ca^{2+} mediada por SOCE. El

vínculo entre NCLX y SOCE está mediado por una señal redox, concretamente con el aumento de ROS, la cual se origina por la actividad del NCLX y actúa sobre la cisteína 195 (Cys-195) de ORAI sincronizando su actividad (Nissim et al., 2017)

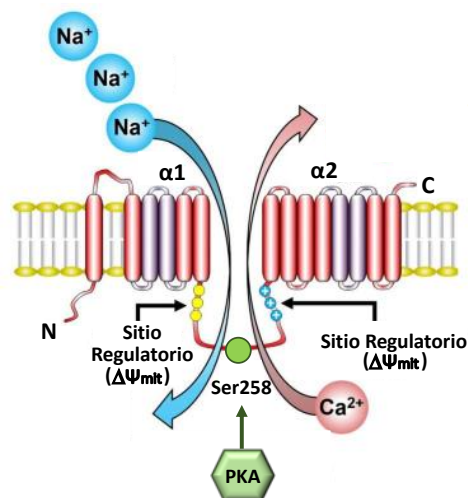


Figura 43. Modelo representativo de NCLX. Su estructura cuenta con dos dominios transmembrana denominados $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que forman los sitios catalíticos donde se unen los iones y desde los cuales los iones se translocan posteriormente a través de la membrana. Además, tiene un sitio alostérico desregulación (basado en la detección de potencial mitocondrial), así como un sitio de fosforilación de Ser258 dependiente de PKA. El potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_{mit}$) proporciona la fuerza impulsora para el transporte electrogénico de 3 Na^+ por un cada Ca^{2+} que extruye. La fosforilación de Ser258 por PKA aumenta la actividad de NCLX. Modificado de (Novorolsky et al., 2023).

Alteraciones en la actividad o en su expresión se relacionan con diversas patologías. Por un lado, alteraciones en su función que conllevan a una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial favorecen la progresión de la EA (Jadiya et al., 2019). Por otro lado, la delección de NCLX en cáncer de colon parece tener un papel dual, mientras que en etapas tempranas favorece el crecimiento del tumor, en etapas tardías se relaciona con una disminución de la capacidad de metastizar (Pathak et al., 2020).

5.3.2.2 Intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial

El mHCX, localizado en la MMI, presenta una amplia expresión en células excitables. Este intercambiador aprovecha el gradiente electroquímico de H^+ para catalizar el transporte en contra del gradiente de Ca^{2+} . En concreto, presenta una estequiometría 2:1 o 3:1; es decir, introduce 2 o 3 H^+ a cambio de expulsar un Ca^{2+} . Cabe destacar que, en función del pH y del gradiente de concentración de Ca^{2+} entre la matriz mitocondrial y el citosol, este intercambiador puede actuar en modo reverso. Además, su actividad se modula con rojo de rutenio, Mg^{2+} o proteínas como la CaM, que inhiben la actividad de este.

Este intercambiador, codificado por el gen *Letm1*, está compuesto de 12 hélices TM con los extremos N y C-terminal en la matriz mitocondrial (Figura 44). El dominio central (TM2-TM5 y TM7-TM10) está estrechamente empaquetado, mientras que el haz de activación formado por hélices largas, TM1 y TM6, está distendido. El extremo C-terminal cuenta con un dominio mano EF, el cual garantiza el funcionamiento como intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, ya que permite detectar los cambios en la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (Nishizawa et al., 2013). Cabe destacar que deficiencias de *Letm1* se han relacionado con diversas patologías tales como la resistencia o a la aparición de convulsiones.

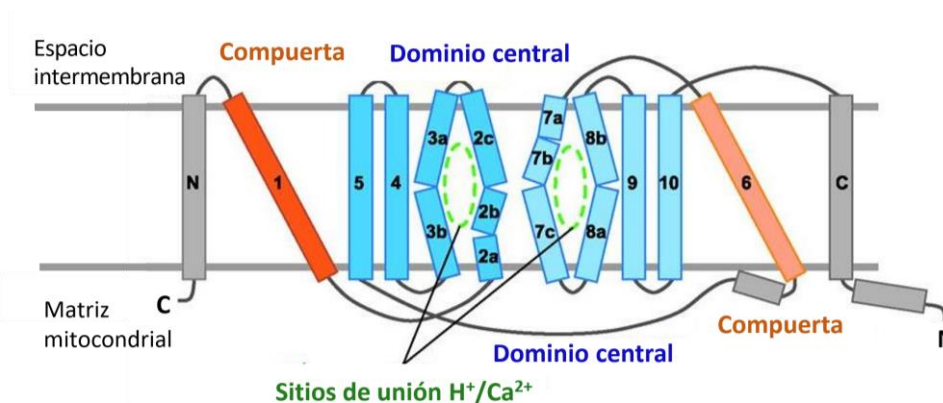
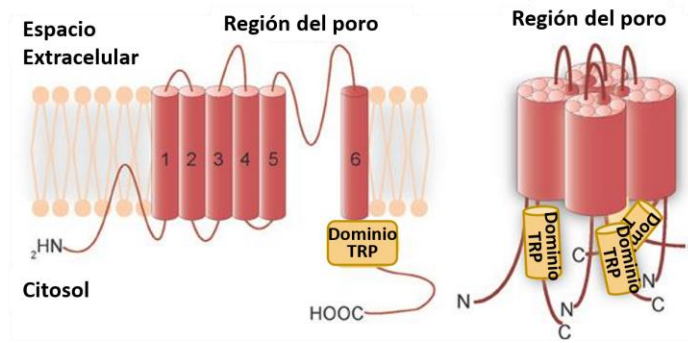


Figura 44. Representación esquemática de HcXm. Su estructura está formada por una única hélice transmembrana con 10 dominios. El dominio central del intercambiador está formado por las hélices TM2-5 y TM7-10 (en azul) y constituyen los sitios de unión de H^+/Ca^{2+} (representados con círculos verdes punteados), mientras que los dominios reguladores lo componen los dominios TM1 y TM6 (en naranja). Los segmentos transmembrana adicionales se muestran en gris. Modificado de (Nishizawa et al., 2013).

5.4 Superfamilia de los TRP

Los receptores de potencial transitorio (TRP) se expresan tanto en la MP como en la membrana de orgánulos intracelulares de todas las células eucariotas, constituyendo una de las familias de canales iónicos más grandes y diversas. Se han descrito hasta un total de 28 miembros de la superfamilia de los TRP clasificados en 6 familias (Figura 45B) según su homología de secuencia: TRPC (canónicos), TRPM (melastatina), TRPML (mucolipina), TRPV (vaniloides), TRPA (anquirina) y TRPP (policistina). Estos canales presentan una estructura tetramérica, donde cada monómero está formado por seis dominios TM (TM1-TM6), siendo los dominios TM5 y TM6 los formadores del poro (Figura 45A). Sus extremos N y C-terminal, así como el resto de los dominios estructurales se localizan en la cara citosólica, dominios que son, precisamente, las partes o regiones que difieren entre las diferentes familias. La mayoría de los TRP son capaces de formar tanto homómeros como heterómeros, lo que les permite modular su función, localización subcelular y las propiedades de los canales con los que interactúan. Además, también pueden asociarse con diferentes proteínas andamio.

A



B

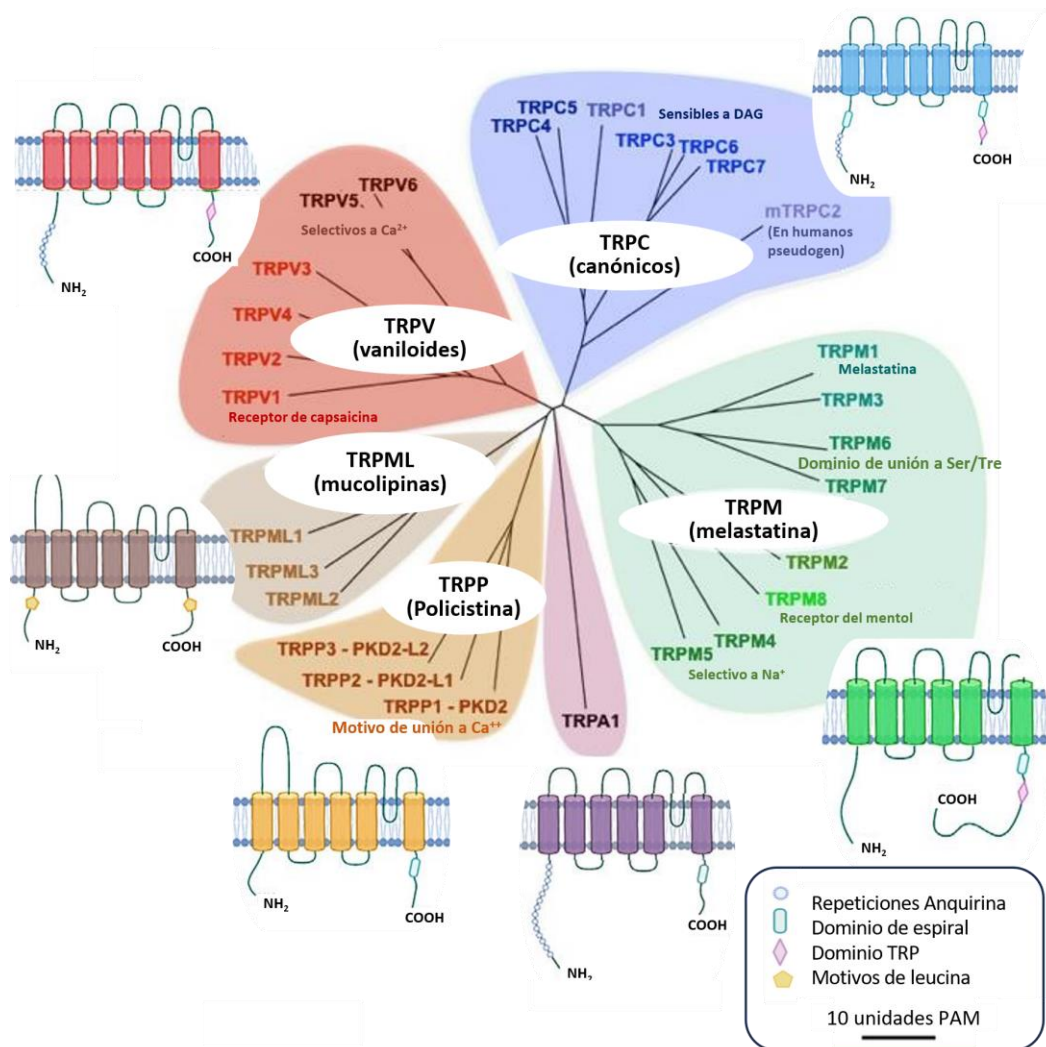


Figura 45. Superfamilia de los TRP. A. Estructura esquemática de los canales TRP. Los monómeros de los canales TRP constan de 6 dominios TM, siendo TM5 y TM6 los dominios formadores del poro. Los extremos N y C-terminal, intracelulares, se distinguen por la longitud y los dominios que presentan. B. Árbol filogenético de los canales TRP. Cada uno de los canales TRP está codificado por un gen humano (*Homo sapiens*), excepto TRPC2, que es un *pseudogén* en humanos, pero no en rata (*Rattus norvegicus*), y TRPN que no ha sido identificado en mamíferos, pero está presente en mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), no mostrado en la figura. En humanos, se han descrito hasta un total de 28 miembros de la familia de TRP clasificados en 6 familias según su homología de secuencia: TRPC (canónicos), TRPM (melastatina), TRPML (mucolipina), TRPV (vaniloides), TRPA (anquirina) y TRPP (policistina). Basado en (Clapham, 2003).

Son receptores no selectivos que permiten el paso de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , a excepción de TRPM4 y TRPM5 que no permiten el paso de Ca^{2+} . Estos receptores actúan como sensores celulares, pues se activan en respuesta a diferentes estímulos tanto ambientales como resultantes de diferentes funciones fisiológicas tales como variaciones en la temperatura, pH, osmolaridad, presión o en condiciones patológicas como la hipoxia. No obstante, los receptores TRP también pueden activarse a través de receptores como GPCR o TKR. Además, pueden activarse mediante la acción de pequeñas moléculas orgánicas exógenas, incluidos compuestos sintéticos y productos naturales (capsaicina, 2-APB); lípidos endógenos o productos del metabolismo de lípidos (diacilglicerol, fosfoinosítidos, eicosanoides); nucleótidos de purina y sus metabolitos, o iones inorgánicos como Ca^{2+} y Mg^{2+} . Algunos de ellos, como TRPV, TRPM, TRPA1 y TRPC, pueden regular su actividad dependiente de Ca^{2+} por CaM.

La disfunción de los canales TRP se ha implicado en diversas patologías que van desde el dolor crónico hasta vejiga hiperactiva (TRPV1), pasando por obesidad (TRPV4 y TRPM5), diabetes (TRPV1, TRPM4), tos crónica (TRPA1, TRPV1), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC; TRPV4), hipertrofia cardíaca (TRPC6), EA familiar (TRPM7), trastornos dermatológicos (TRPV3) o cáncer (TRPC6, TRPV2 y TRPM8) (Chinì et al., 2021a).

➤ TRPC

Los TRPC son una familia de receptores no selectivos a Ca^{2+} constituida por siete miembros, TRPC1-7, de los cuales, en humanos, se expresan 6, pues el TRPC2 es un *pseudogen*. A su vez, en función de su similitud en la secuencia, se dividen en cuatro subfamilias; TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 y TRPC4/5. En cuanto a su expresión, están presentes tanto en células excitables como en no excitables. En concreto, destaca la expresión de TRPC4 y TRPC5 de forma predominante en el cerebro, lo que podría explicar su relación con diferentes enfermedades neurodegenerativas como EA y EP.

Se han identificado dos mecanismos de activación para estos receptores: (i) mediante el DAG generado por la activación GPCR, (ii) tras el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} . El primer mecanismo se inicia tras un estímulo el cual es capaz de activar GPCR o TKR que, como resultado, acabarán por reclutar PLC. Esta enzima, a su vez, catalizará la hidrólisis de PIP2 y, como resultado, se obtendrá IP_3 y DAG, este último capaz de interactuar y activar los TRPC. Por otro lado, el segundo mecanismo de activación tiene lugar cuando el IP_3 se transloca hasta el RE donde activa los IP_3R y, en consecuencia, se liberará Ca^{2+} desde el RE al citosol. Esto provocará un vaciado del RE que conllevará la activación de SOCE, mecanismo en el que no solo participan los canales ORAI, sino también algunos TRP como el TRPC1, pues puede formar complejos con ORAI1 y STIM1 (Villalobos et al., 2019).

Esta familia de canales participa en una gran variedad de funciones celulares y en la regulación de diferentes procesos como proliferación y migración celular, plasticidad sináptica, desarrollo neuronal, secreción de hormonas y neurotransmisores o la activación de células T. Además, varios integrantes de esta familia también participan en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

➤ TRPV

Familia constituida por 6 miembros (TRPV1-6) divididos en dos grupos: TRPV1-4 y TRPV5-6. Son receptores no selectivos a Ca^{2+} a excepción de TRPV5 y TRPV6. Reciben su nombre por ser activados por compuestos vaniloides aunque también se les conoce como receptores termoiónicos ya que son capaces de detectar cambios en la temperatura que inducen su activación. De forma general se localizan en la MP, a excepción de TRPV1-4 que también se localizan en el RE. Se ha detectado su expresión en diferentes tejidos como, por ejemplo, en neuronas del sistema periférico cerebral y ganglios sensoriales (TRPV1-4), piel (TRPV1, 3, 4), páncreas (TRPV1, 5, 6), tracto gastrointestinal (TRPV1-6).

➤ TRPM

Esta familia de canales está formada por 8 miembros (TRPM1-8) que, a su vez, se agrupan en cuatro subfamilias: TRPM1/3, TRPM6/7, TRPM4/5 y TRPM2/8. Todos ellos son permeables a Ca^{2+} a excepción de TRPM4 y TRPM5. Se expresan ampliamente en una gran variedad de tejidos y tipos celulares: órganos sensoriales, células del sistema inmune, lengua, corazón, riñón... No obstante, esta expresión no es regular en todos ellos, pues algunas isoformas predominan en ciertos tejidos, como es el caso de TRPM1,2,3 y 6 los cuales se expresan de forma elevada en cerebro.

Estos canales se activan de forma sensorial; por ejemplo, TRPM2-3 se activan por calor, TRPM8 es sensible al frío ($T < 30^\circ$) y compuestos que dan sensación de frío como el mentol, TRPM5 detecta el sabor, TRPM1 es sensible a la luz y TRPM2,4,7 lo son al estrés oxidativo.

➤ TRPA

Familia integrada por un único miembro, TRPA1, el cual recibe su nombre por contener en su secuencia varias repeticiones de anquirina en su extremo N-terminal. Es un receptor no selectivo que actúan como sensor al daño, pues es capaz de detectar estímulos nocivos de origen térmico, químico y mecánico. También es un sensor de estrés oxidativo, ya que la presencia de ROS produce su activación. Por ello, se ha implicado en procesos como el picor, la inflamación o la neuropatía. Su actividad esta modulada directamente por Ca^{2+} . Además, se ha propuesto a TRPA1 como un regulador negativo de SOCE.

➤ TRPP

La familia de los TRPP cuenta con 4 miembros (TRPP1,2,3 y 5). Generalmente, se localizan en las membranas de orgánulos intracelulares y son capaces de detectar el flujo de fluidos, cambios en la osmolaridad y el estiramiento mecánico. Se expresan ampliamente en diversos tejidos.

➤ TRPML

La familia de los TRPML incluye tres miembros (TRPML1-3) y reciben su nombre por el gen que los codifica, mucopolipina. Se localizan en la membrana de endosomas y lisosomas. Participan en el control de pH, el tráfico a través de la membrana, la transducción de señales, la autofagia, la exocitosis y el transporte de vesículas.

5.5 Entrada de Ca^{2+} operada por depósitos

La entrada capacitativa de Ca^{2+} (CCE, del inglés *capacitative Ca^{2+} entry*) se describió, por primera vez, en 1986 por Putney basándose en estudios previos como los realizados por Berridge en 1984 (Berridge & Irvine, 1984; Putney, 1986). No obstante, en 1993 se instauró un nuevo término, más acorde al mecanismo real de funcionamiento de dicho sistema de transporte, por lo que pasó a denominarse entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE). Desde entonces, los estudios sobre este mecanismo de entrada de Ca^{2+} no han cesado, lo que ha permitido comprender con gran detalle el mecanismo de activación de dicho sistema de transporte y a sus integrantes.

La activación de SOCE tiene lugar tras la activación de ciertos receptores de la MP, como TKR y GPCR. La activación de estos desencadena, a su vez, la activación de la proteína G trimérica acoplada a ellos, la cual finalmente induce la activación de PLC. Esta última es una enzima que, a través de la hidrólisis de PIP₂ de la membrana plasmática da lugar a dos segundos mensajeros: DAG e IP₃. El IP₃ generado se transloca hasta el RE donde activa a los IP₃R de la membrana del RE, lo que permite la liberación de Ca^{2+} desde el lumen del RE al citosol que, a su vez, da lugar al vaciamiento de este. Este vaciado es detectado por las proteínas STIM (STIM1-2) situadas en la membrana del RE las cuales actúan como sensores de Ca^{2+} gracias al dominio mano EF, que une Ca^{2+} , presente en su estructura. Así, en condiciones basales, el Ca^{2+} permanece unido a estos sensores. Sin embargo, cuando se libera Ca^{2+} al citosol y baja la concentración de Ca^{2+} del RE, este catión deja de unirse a estos sensores y, en consecuencia, los STIM oligomerizan y acercan la membrana del RE a la MP, lo que actúa como nexo con los canales SOCC los cuales interaccionan con los STIM. Esta interacción da lugar a canales que permiten la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular al citosol (Figura 46). Cabe destacar que existen diferentes canales SOCC, cada uno con diferente selectividad por Ca^{2+} . Entre estos SOCC se encuentran las distintas isoformas de ORAI y algunos canales de la familia de los TRP como el TRPC1. Parte del Ca^{2+} que entra desde el medio extracelular al citosol a través de los canales SOCC, acaba entrando al RE a través de bombas como la SERCA, mientras que la otra parte permanecerá en el citosol. Esto permite recuperar la concentración de Ca^{2+} del RE, tras lo que desoligomerizan los sensores y, en consecuencia, se detiene este mecanismo de entrada de Ca^{2+} .

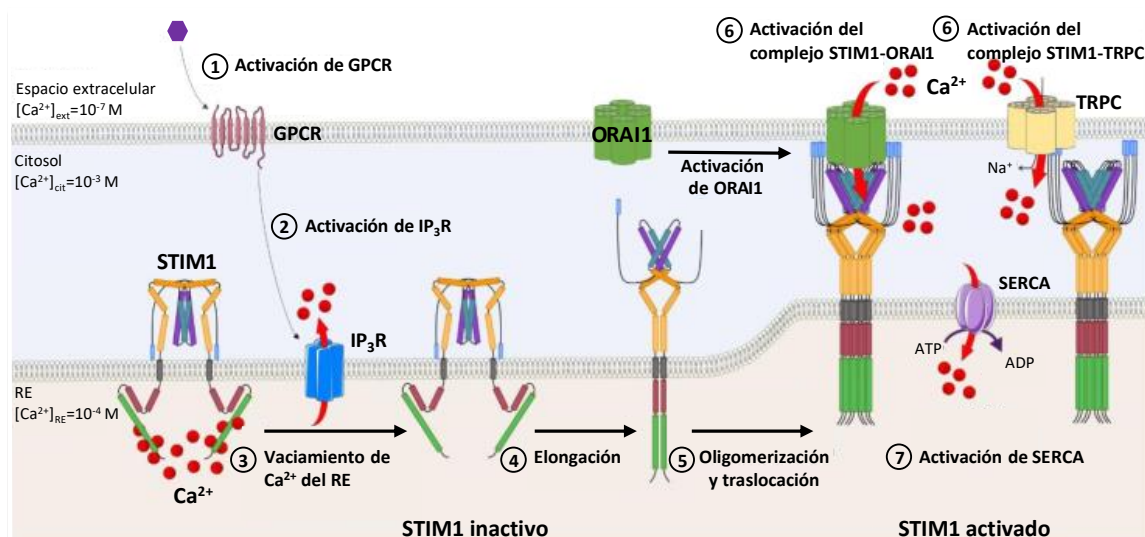


Figura 46. Mecanismo de activación de SOCE. El vaciamiento de Ca^{2+} del RE desencadena la disociación de Ca^{2+} de la mano EF de STIM1, lo que induce la elongación y la oligomerización de STIM1. Esto conlleva la interacción de STIM1 con los canales Orai1 y/o TRPC, lo que permite la entrada de Ca^{2+} al citosol. Modificado de (Masson et al., 2021).

5.5.1 ORAI

Se han descrito tres variantes para el gen *Orai* (*Orai1-3*), cada una de ellas codifica para una proteína diferente (ORAI1-3) las cuales presentan diferencias entre ellas tanto a nivel funcional como estructural. Estos monómeros, cuya estructura está altamente conservada, se agrupan formando hexámeros. Cada monómero está formado por cuatro segmentos TM (TM1-4) unidos entre sí por dos lazos intracelulares (1 y 3) y un lazo extracelular (2) cuyos extremos N y C-terminales se localizan en la cara citosólica (Figura 47). Precisamente, el extremo N-terminal es la región más característica de cada isoforma. En concreto, ORAI1 presenta, de forma exclusiva, 3 regiones que lo caracterizan: una región rica en prolinas y argininas, una región de modificación post-transcriptional y un dominio transmembrana N-terminal extendido (ETON). La región rica en prolinas y argininas participa en la reactivación tras la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} . La región de modificación post-transcriptional consta de una región de fosforilación por PKC en los residuos Ser-27 y Ser-30 que puede regular negativamente SOCE y CRAC. Respecto a la región ETON, esta cuenta con una zona de unión a Ca^{2+} -CaM y juega un papel importante tanto en la unión al dominio de activación de CRAC de STIM1 como en la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} . En cuanto a los segmentos TM, es el segmento TM1 la región más conservada entre las distintas isoformas, lo que tiene sentido ya que es la encargada de formar el poro y el filtro de selectividad iónica. Los segmentos TM2-4, de forma general, tienen un papel estabilizador ya que forman una segunda capa que rodea al poro formado por TM1. No obstante, también pueden ejercer diferentes efectos sobre SOCE. Por ejemplo, la Cys-195 del TM3 juega un papel clave en la regulación redox de ORAI1. En concreto, este residuo puede oxidarse debido a un aumento de la formación de ROS, consecuencia de la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, de tal forma que se inhibe la actividad de ORAI1.

La aparición de distintas regiones específicas o residuos hace que cada proteína presente una eficacia y afinidad diferente por Ca^{2+} , siendo ORAI1 la de mayor afinidad y ORAI3 la de menor. Además, estos canales no son selectivos por Ca^{2+} , pues, aunque presentan una grana afinidad por este ion, también son permeables a Na^{+} , siendo la isoforma ORAI3 el que mayor permeabilidad tiene por este ion. Por otro lado, el patrón de inactivación de estas proteínas también es diferente. Por ejemplo, el antagonista de SOCE, 2-APB, a altas concentraciones (50 μM) inhibe el flujo total a través de ORAI1, parcialmente el de ORAI2, pero no el de ORAI3, que, en lugar de inactivar, su efecto es totalmente el contrario, lo activa. Además, la inactivación de estos canales también puede darse de forma fisiológica por el propio Ca^{2+} mediante dos mecanismos diferentes, mediante la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} o mediante la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} . La inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} solo se ha observado en ORAI1, mientras que la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} se ha descrito para las tres isoformas, siendo mayor para la isoforma ORAI3.

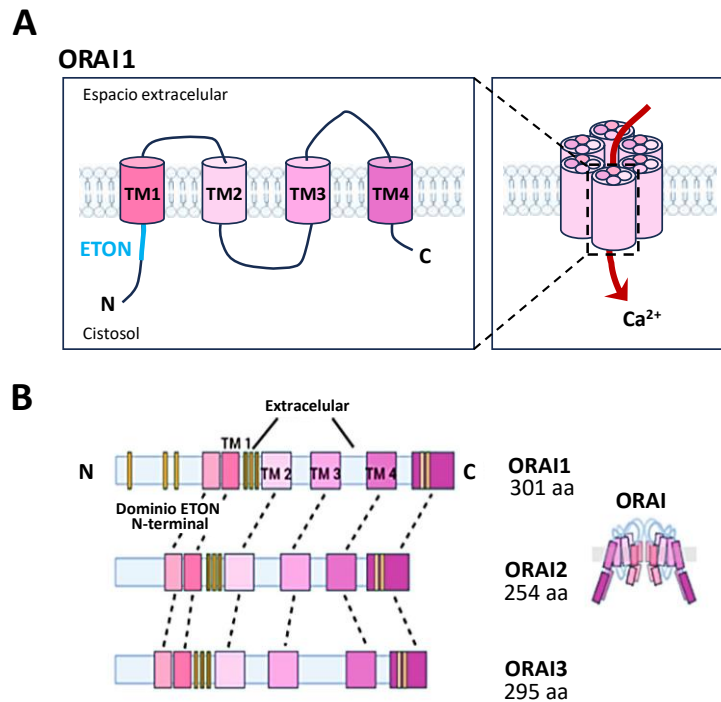


Figura 47. Estructura e isoformas de ORAI. **A.** Topología de las proteínas ORAI1; en concreto, se muestra el monómero de ORAI1 en la MP, a la izquierda, y a la derecha se muestra el hexámero que se forma mediante oligomerización de 3 subunidades de dímero. Cada monómero se compone de cuatro segmentos transmembrana (TM1-4) y extremos C y N-terminal en la cara citosólica, y, en el caso de ORAI1 en el extremo N-terminal aparecen 3 regiones reguladoras como es la región ETON. **B.** Se han identificado tres isoformas en humanos (ORAI1-3) con una estructura similar; de izquierda a derecha según la figura, su estructura consta de un extremo N- terminal (citosólico), cuatro segmentos TM y un extremo C-terminal en la cara citosólica. Los lazos entre TM1-2 y TM3-4 están expuestos al espacio extracelular mientras que el lazo entre TM2-3 está en la cara citosólica. Las barras verticales amarillas representan regiones de residuos de aminoácidos, los cuales influyen en la selectividad de los poros del canal ORAI. Basado en (Sharma et al., 2021).

Alteraciones en la expresión de ORAI se han involucrado en enfermedades cardiovasculares, respiratorias y cáncer. En particular, se ha relacionado el cambio en los patrones de expresión de ORAI con ciertas características del cáncer como el mantenimiento de la capacidad proliferativa, la resistencia a la muerte, la capacidad metastásica y migratoria, la angiogénesis tumoral o el escape inmune.

5.5.2 STIM

Las moléculas de interacción estromal (STIM, del inglés *STromal Interaction Molecules*) son proteínas que, junto con ORAI, forman el sistema de canales SOCC. Existen dos isoformas de STIM, STIM1-2, y, además cada una de ellas presenta variantes de *splicing alternativo* (Figura 48). Las diferentes isoformas y variantes de STIM se relacionan entre sí dando lugar a diferentes formas de modulación de procesos como SOCE.

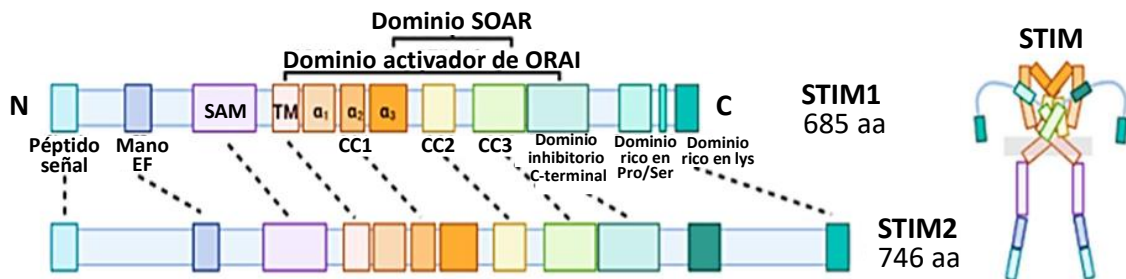


Figura 48. STIM. En humanos, STIM tiene dos isoformas (STIM1 y 2). Tanto STIM1 como STIM2 tienen una estructura transmembrana de tipo I compuesta por un péptido señal en el extremo N-terminal para la localización en el RE, un motivo de mano EF y un motivo α estéril para la unión de iones Ca^{2+} lumenales. Además, cuenta con el dominio SAM, sitio para interacciones proteína-proteína, y un segmento transmembrana corto seguido de tres dominios en espiral (CC1, CC2 y CC3), que forman el fragmento STIM activador de ORAI. La región CC2-CC3 (o dominio SOAR) también participa en las interacciones STIM-ORAI. En el extremo C-terminal se encuentra un dominio inhibidor dependiente de Ca^{2+} , una región rica en Prolina/Serina (Pro/Ser, polibásica) y un segmento de cola rico en lisina (lys). Basado en (Sharma et al., 2021).

Son proteínas transmembranas diméricas de paso único localizadas, principalmente, en la membrana del RE. Su extremo C-terminal se localiza en la cara citosólica mientras que el extremo N-terminal se sitúa en el lumen del RE y es ese, precisamente, el que presenta el dominio mano EF de unión a Ca^{2+} . Gracias a este dominio, STIM actúa como sensor de Ca^{2+} de tal forma que, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ disminuye, el Ca^{2+} se disocia de STIM. En consecuencia, STIM sufre una serie de cambios conformacionales que dan lugar a una conformación más distendida capaz de oligomerizar y acercarse a la MP para interactuar con los canales ORAI. Así, la esta interacción induce la apertura del canal ORAI permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular al citosol. Luego, parte de este Ca^{2+} es bombeado al RE a través de SERCA produciéndose el relleno de los depósitos de Ca^{2+} . Tras este llenado, STIM deja de interactuar con ORAI y se inactiva la entrada de Ca^{2+} . En consecuencia, tanto STIM como ORAI regresan a su situación de reposo (Figura 49).

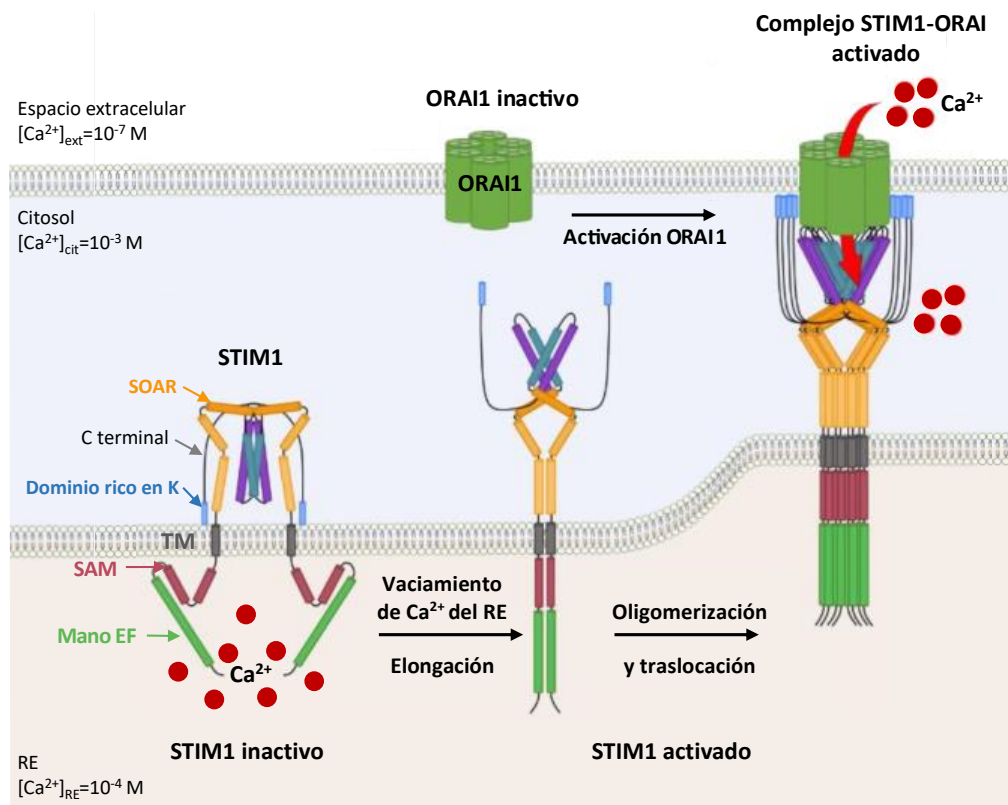


Figura 49. Mecanismo de activación de STIM. La liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3R conlleva el vaciado de Ca^{2+} del RE. Esto provoca que el Ca^{2+} se disocie del dominio de mano EF de STIM1, lo que induce la elongación, oligomerización y traslocación de este sensor hacia zonas próximas a Orai1. Esto, a su vez, permite que se establezca la interacción entre STIM1 y los canales Orai1 y/o TRPC, lo que permite la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular al citosol. Basado en (Masson et al., 2021).

5.5.3 Moduladores de SOCE

Se han identificado diferentes proteínas capaces de regular la actividad de los miembros de SOCE y que pueden jugar un papel clave en este mecanismo de transporte. A continuación, se describen los más relevantes.

5.5.3.1 CRACR2A

La proteína reguladora 2A del canal activado de liberación de Ca^{2+} (CRACR2A) se ubica en el citosol donde actúa como sensor de Ca^{2+} y modula, de forma positiva, la interacción de STIM1-Orai1 y, a su vez, regula la actividad del canal CRAC. En su extremo N-terminal contiene dos dominios mano EF que actúan como sitio de unión a Ca^{2+} . CRACR2A forma un complejo ternario con Orai1-STIM1 estabilizando así la interacción de estos. No obstante, la formación de este complejo es dependiente de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. Los dominios mano EF de CRACR2A detectan los cambios en la $[Ca^{2+}]_{cit}$, regulando la formación de dicho complejo ternario y la actividad del canal CRAC. Por lo tanto, si la $[Ca^{2+}]_{cit}$ es alta, CRACR2A se disocia de Orai1 y STIM1 de tal forma que se inhibe SOCE, mientras que si $[Ca^{2+}]_{cit}$ es baja, CRACR2A promueve la interacción STIM1-Orai1.

Se ha demostrado su papel como modulador positivo de SOCE, ya que, en células Jurkat y HEK293 en las que se silenció *Cracr2a*, se produjo una reducción de SOCE. Por el contrario, su sobreexpresión aumentó SOCE (Lopez et al., 2016a).

5.5.3.2 *Septinas*

Las septinas son una familia de proteínas GTPasas conservadas evolutivamente que desempeñan papeles clave en una gran variedad de procesos celulares, incluyendo la dinámica de la membrana, la división celular o remodelación de la membrana. Estas proteínas tienen la capacidad de formar filamentos y complejos hexámicos u octámicos organizados en filamentos lineales u otras estructuras; estas se asocian con membranas y otros componentes del citoesqueleto como microtúbulos y filamentos de actina (Lopez et al., 2016a).

En cuanto a su relación con SOCE, recientes investigaciones han revelado que las septinas pueden influir en este proceso de diversas maneras, si bien es cierto que el papel exacto y detallado de las septinas en la regulación de SOCE todavía se está investigando. En la actualidad, se propone un papel dual para estas, pues pueden funcionar como barreras de difusión o como andamios intracelulares. Por un lado, participan en la localización de componentes de SOCE, ya que las septinas pueden influir en la localización y/o estabilidad de las proteínas clave involucradas en SOCE como STIM y ORAI. Por ejemplo, se ha observado que las septinas pueden formar "barreras" en la membrana plasmática que limitan la difusión de proteínas y lípidos, lo que podría influir en la formación y estabilidad de complejos STIM-ORAI. Por otro lado, se han involucrado en el reclutamiento de proteínas, ya que estas pueden actuar como plataformas o sitios de reclutamiento para otras proteínas que modulan el SOCE. Por ejemplo, las Septinas 1 y 4 pueden reclutar o anclar proteínas que modulan la dinámica de los canales ORAI o la señalización *downstream* del Ca^{2+} . Por lo tanto, podría vincularse alteraciones de la expresión de septinas con alteraciones en SOCE (Serwach & Gruszczynska-Biegala, 2020).

La implicación de las septinas en SOCE subraya la complejidad y regulación polifacética de este proceso esencial. La disfunción de las septinas, ya sea en SOCE u otros procesos, puede tener implicaciones patológicas. Por ejemplo, anomalías en las septinas se han asociado con enfermedades neurodegenerativas y cáncer. Por lo tanto, entender el papel exacto de las septinas en SOCE no solo es crucial desde una perspectiva básica de la biología celular, sino también para comprender y tratar enfermedades relacionadas con estas proteínas y los procesos que regulan.

5.5.3.3 *ORMDL3*

La isoforma 3 de la proteína reguladora de la biosíntesis de esfingolípidos similar al orosomucoide (ORMDL3) se localiza en la membrana del RE con sus extremos N y C-terminal orientados al citosol. Esta proteína regula la actividad de SERCA, modificando así la señalización de Ca^{2+} del RE y provocando estrés en el RE. Además, actúa como regulador negativo de SOCE, ya que conduce a la inactivación de dicho mecanismo. Se ha demostrado que la sobreexpresión de ORMDL3 induce la atenuación de SOCE en células Jurkak y HEK293, mientras que el silenciamiento del gen *Ormdl3* mostró un aumento de SOCE (Lopez et al., 2016a).

5.5.3.4 *SARAF*

El factor regulador asociado a SOCE (SARAF) es una proteína con un único dominio transmembrana. Esta se localiza de forma predominante en el RE, aunque también se ha detectado en la MP, cuyo dominio N-terminal está en el lumen del RE y su extremo C-terminal en la cara citosólica. Esta actúa como un regulador negativo de SOCE a través de su interacción con STIM. En particular, en condiciones de reposo, el extremo C-terminal interacciona con STIM y, de esta manera, es capaz de evitar la oligomerización de este y, en consecuencia, la activación de SOCE de forma espontánea.

Además, SARAF puede regular otras proteínas implicadas en la señalización del Ca^{2+} . Cuando SARAF se expresa en la MP, puede modular la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de ácido araquidónico (ARC). Los canales ARC son complejos heteropentaméricos que constan de tres subunidades ORAI1, dos ORAI3 y STIM. Así, la sobreexpresión de SARAF disminuye la entrada de Ca^{2+} estimulada por ARC en células de neuroblastoma. También se ha demostrado que SARAF interactúa con TRPC1 de forma independiente en células de neuroblastoma deficientes en STIM1. El silenciamiento de SARAF en células deficientes en STIM1 también ha mostrado un aumento de la entrada de Ca^{2+} mediada por TRPC1 (Serwach & Gruszczynska-Biegala, 2020). En cuanto la expresión de esta proteína se expresa de forma elevada en tejidos neuronales.

5.5.3.5 STIMATE

El potenciador activador de STIM (STIMATE o también llamado TMEM110) es una proteína localizada en el RE y que se expresa ampliamente en diferentes tejidos humanos. Su estructura consta de varios dominios transmembrana con un extremo C-terminal básico y una secuencia característica de aminoácidos que retienen a STIMATE en el RE.

Inicialmente, se identificó como un regulador de la activación del factor de transcripción NFAT. Sin embargo, más adelante, se ha demostrado su papel como modulador positivo en la activación y traslocación de STIM, pues favorece la activación de canales CRAC. Su papel como regulador positivo de SOCE se confirmó mediante el silenciamiento genético en células HEK293, en las que se observó una disminución de SOCE (Lopez et al., 2016a).

5.5.3.6 Proteínas Golli

Las proteínas Golli son isoformas de la proteína básica de mielina (MBP) que se generan por corte y empalme alternativo del gen de la mielina, *Mbp*. Estas proteínas se expresan en diferentes tejidos, aunque lo hacen de forma abundante en las células inmunitarias y en el SNC. De hecho, juegan un papel esencial en el proceso de mielinización de los nervios en el SNC. En cuanto a su papel en SOCE, estas proteínas desempeñan un papel regulador negativo. En concreto, se ha observado que, en células de ratón deficientes en MBP, presentan una mayor SOCE, mientras que su sobreexpresión inhibe SOCE en células Jurkat (J. M. Feng et al., 2006).

6 HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN EL ENVEJECIMIENTO NEURONAL, ALZHEIMER Y TUMORES CEREBRALES

Como se ha descrito anteriormente, el Ca^{2+} es un segundo mensajero intracelular que participa en numerosas funciones celulares. Por lo tanto, un correcto mantenimiento de los sistemas de transporte de Ca^{2+} en la célula resulta esencial para el correcto control de diferentes procesos celulares tales como la transmisión y plasticidad sináptica, la sinaptogénesis o la supervivencia celular. Durante el envejecimiento, los sistemas que regulan la homeostasis del Ca^{2+} intracelular pueden verse afectados. Considerando que el envejecimiento supone una causa de riesgo para la aparición de enfermedades neurodegenerativas como la EA o diferentes tipos de cáncer como es el caso de los tumores cerebrales, no es de extrañar que, durante el transcurso de estas patologías, los mecanismos de transporte de Ca^{2+} se vean afectados o que incluso puedan contribuir a la fisiopatología de estos procesos. En el caso del envejecimiento y la neurodegeneración, algunas de las alteraciones que se producen son la disfunción sináptica, el deterioro de la plasticidad o la degeneración neuronal. Además, se produce estrés oxidativo debido a la acumulación de ROS, alteraciones en el metabolismo energético de la mitocondria y la agregación de proteínas implicadas en enfermedades neurodegenerativas (péptido β -amiloide, α -sinucleína, huntingtina, etc) las cuales afectan, de forma negativa, a la homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

6.1 Remodelado del Ca^{2+} intracelular en el envejecimiento neuronal

En 1987, Khachaturian propuso la Hipótesis del Ca^{2+} del envejecimiento (Khachaturian, 1987). Esta hipótesis sugiere que los mecanismos celulares que participan en la homeostasis del Ca^{2+} tienen un papel relevante en el proceso de envejecimiento y en la neurodegeneración. En concreto, el bajo rendimiento o disfunción de estos sistemas de transporte que tiene lugar durante el envejecimiento provoca un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, lo que aumenta la vulnerabilidad a ciertas enfermedades neurodegenerativas que, a la larga, conlleva la disfunción y muerte neuronal. Los cambios en la homeostasis del Ca^{2+} asociados a la edad son locales, sutiles y progresivos. Además, estos cambios son diferentes en función del tipo celular, siendo las neuronas hipocámpales y corticales las más vulnerables (Khachaturian, 1989).

Algunas de las alteraciones propuestas en la señalización de Ca^{2+} que podrían estar relacionadas con la edad y la neurodegeneración, todavía objeto de estudio, incluyen: elevados niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ debidos, en parte, a un aumento de la entrada de Ca^{2+} a través de diferentes canales de la MP; alteraciones en orgánulos intracelulares incluyendo a la mitocondria y el RE, o una posible mayor transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria (Hagen et al., 1997; Pottorf et al., 2000; Thibault et al., 2007; Thibault & Landfield, 1996). De esta manera, se sugiere que el conjunto de alteraciones en los mecanismos de transporte del Ca^{2+} intracelular que tiene lugar durante el envejecimiento podrían ser responsables, al menos en parte, de la mayor susceptibilidad a la muerte neuronal.

6.1.1 Efectos del envejecimiento sobre los sistemas de transporte de Ca^{2+} de la membrana plasmática

- La plasticidad sináptica de tipo potenciación a largo plazo (LTP) se define como un incremento mantenido de la eficacia de la transmisión sináptica en la que participan una compleja red de procesos pre- y postsinápticos que, a la larga, dan lugar a cambios en la

densidad sináptica de algunos receptores de glutamato (Bliss & Collingridge, 1993). En este sentido, el Ca^{2+} es fundamental en la plasticidad sináptica, pues es imprescindible que se produzca entrada de Ca^{2+} en la célula postsináptica para inducir la LTP. Esta tiene lugar cuando la sinapsis es estimulada repetidamente; es decir, cuando se unen un número elevado de moléculas de glutamato a los NMDAR. Esta estimulación produce una cascada celular de Ca^{2+} que da lugar a la inserción de más AMPAR en la membrana postsináptica. De esta forma, cuando el glutamato vuelva a ser liberado, este se unirá tanto a los NMDAR como a los AMPAR, por lo que la despolarización de la membrana será más eficiente. Por el contrario, si se unen pocas moléculas de glutamato a los NMDAR en una sinapsis, el Ca^{2+} que entra a través de estos induce la endocitosis de los AMPAR, lo que provoca que las neuronas postsinápticas sean menos sensibles al glutamato liberado desde la neurona presináptica. Tras la excitación neuronal, el Ca^{2+} puede entrar a las células por diferentes canales como son los VOCC o ROCC, siendo estos últimos una de las vías principales (Sanes & Lichtman, 1999).

En el envejecimiento neuronal se ha descrito que tiene lugar un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, lo que hace que aumente el umbral necesario para que se produzca LTP y, en consecuencia, la excitabilidad neuronal se ve afectada. Por lo tanto, se requiere una fuerte estimulación para poder generar LTP. Por el contrario, en el envejecimiento se ve favorecida la plasticidad sináptica de tipo depresión a largo plazo (LTD), ya que disminuye el umbral necesario para que esta se produzca, lo que explica los déficits de aprendizaje y de memoria asociados a la edad (Deak & Sonntag, 2012; Khachaturian, 1989).

- Los NMDARs están implicados en dos funciones celulares que se ven afectadas con el envejecimiento y la neurodegeneración: la plasticidad sináptica y la memoria, especialmente en la región del hipocampo, y la excitotoxicidad en el SNC. La señalización sináptica insuficiente a través de los NMDAR compromete la supervivencia de las neuronas. Sin embargo, la estimulación excesiva glutamatérgica produce excitotoxicidad que da lugar a daño o muerte celular en estas neuronas. A pesar de que la literatura sugiere que la toxicidad está mediada por la entrada excesiva de Ca^{2+} a través de NMDAR, los mecanismos por los que estas funciones se ven alteradas en el envejecimiento todavía no están claros. Por un lado, algunos autores proponen una disminución del número de NMDAR lo que se traduce en una menor señalización. Por otro lado, otros autores sugieren que puede deberse a un aumento de la corriente a través de los NMDAR (Calvo et al., 2015).

En el contexto de neurodegeneración o la EA, la evidencia acumulada sugiere que los oligómeros de A β desempeñan un papel central en la disfunción sináptica y en el deterioro cognitivo. Estudios basados en modelos animales han revelado que la disfunción sináptica inducida por A β implica múltiples eventos patológicos y varios sistemas de señalización como los receptores de glutamato y la posterior excitotoxicidad mediada por NMDA. En particular, se ha visto que concentraciones patológicas de A β interrumpen la absorción de glutamato de tal forma que inhiben parcialmente la LTP y, en consecuencia, se produce un aumento de los niveles de glutamato en los espacios intersinápticos. Este aumento, a su vez, produce una sobreactivación de los NMDAR, lo que resulta en un daño sináptico y en una gran variedad de cascadas transcripcionales aberrantes, así como modificaciones postraduccionales. Sin embargo, en pacientes con EA todas estas alteraciones siguen siendo controvertidas (Li et al., 2011; R. Wang & Reddy, 2017).

- La activación neuronal provoca, además, la entrada de Ca^{2+} a través de los VOCC como consecuencia de la despolarización de la membrana. La mayoría de los estudios sugieren que, durante el envejecimiento, se produce un aumento de la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales, probablemente debido a un aumento del número de canales tipo L y a que estos permanecen abiertos durante más tiempo debido a la despolarización de la membrana. Esto induce una sobrecarga de Ca^{2+} que da lugar a deterioros cognitivos y déficits en el aprendizaje (Moore & Murphy, 2020). Sin embargo, determinar específicamente qué canales están alterados es todavía un desafío. En concreto, uno de los candidatos propuestos con más evidencia es el Cav1.3 (Veng & Browning, 2002). Por lo tanto, estas alteraciones en los canales VOCC contribuyen al proceso neurodegenerativo y de la EA.
- Los sistemas de extrusión de Ca^{2+} de la MP también se ven alterados en el envejecimiento neuronal. En este contexto, las neuronas necesitan más tiempo para recuperarse tras una estimulación, lo que implica de forma directa a la respuesta de bombas como PMCA. Esto se debe, en parte, a la disminución de la expresión PMCA2 y PMCA3, lo que conlleva que la extrusión del Ca^{2+} sea más lenta. Además, se ha descrito una actividad ineficiente de las bombas en el envejecimiento debido, al menos en parte, a defectos funcionales de la CaM (modificaciones oxidativas), ya que estas regulan de forma directa y positiva la actividad de las PMCA (Boczek et al., 2019b).

6.1.2 Efectos del envejecimiento sobre los sistemas de transporte de Ca^{2+} del RE

En el envejecimiento neuronal se producen alteraciones en los sistemas de transporte de Ca^{2+} . Por un lado, se ha observado un aumento de la entrada de Ca^{2+} mientras que los sistemas que extruyen Ca^{2+} disminuyen su rendimiento y expresión. En consecuencia, las neuronas envejecidas presentan un mayor nivel de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. No obstante, no solo se ven alterados los mecanismos de transporte de la MP, también se ha observado una alteración en el transporte de Ca^{2+} en los orgánulos subcelulares como el RE y la mitocondria.

- En el envejecimiento neuronal la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ está aumentada, lo que podría verse favorecido por la mayor liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de los IP_3R y RyR (Chandran et al., 2017). Esta mayor liberación de Ca^{2+} a través de estos receptores puede ir en consonancia con el aumento de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales VOCC tipo L observado en el envejecimiento que, a su vez, inducen la CICR (Thibault et al., 2007).
- La estimulación de neuronas del hipocampo con ACh ha mostrado que la liberación de Ca^{2+} a través de los RyR es mayor en neuronas de hipocampo envejecidas. Sin embargo, esta mayor liberación puede deberse a cambios en los niveles de Ca^{2+} de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares (Calvo-Rodríguez et al., 2016a).
- Además, también se ha demostrado que la actividad de la SERCA, encargada de rellenar los depósitos de Ca^{2+} , disminuye en neuronas envejecidas (Britzolaki et al., 2020).

El conjunto de todas estas alteraciones da lugar a un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$, situación que afecta a la supervivencia neuronal. Tan es así que varios estudios han demostrado que el bloqueo de la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de los IP_3R o de los RyR puede proteger a las neuronas de la excitotoxicidad.

6.1.3 Efectos del envejecimiento sobre los sistemas de transporte de Ca^{2+} en la mitocondria

La mitocondria, orgánulo responsable de la fosforilación oxidativa, es la fuente de energía de la célula y el principal lugar de producción de ROS. Además, este orgánulo también participa en la captación de Ca^{2+} mitocondrial, mecanismo robusto clave en el control y mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y, en consecuencia, del correcto funcionamiento de la célula. Por ello, alteraciones en la función mitocondrial durante el envejecimiento pueden tener un efecto dramático en la señal de Ca^{2+} . Entre estas alteraciones, se han encontrado alteraciones en la dinámica de fisión y fusión mitocondrial; disminución del metabolismo de la glucosa y despolarización de la membrana mitocondrial; deterioro de la fosforilación oxidativa, cambios en la señalización de Ca^{2+} y en los mecanismos antioxidantes (una mayor producción de ROS).

Por todo ello, el SNC se ve particularmente afectado ante alteraciones mitocondriales, pues su principal fuente de ATP es a través de la fosforilación oxidativa, consumiendo el 20 % del O_2 total inhalado. De hecho, se ha sugerido que, durante el envejecimiento, se produce una disminución de la función mitocondrial, aunque los mecanismos que subyacen a ésta no están claros. A continuación, así como en la Figura 50, se presentan algunas de las alteraciones mitocondriales relacionadas con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular más relevantes en la neurodegeneración:

- La capacidad de producción de ATP de las mitocondrias se ve reducida debido a la disminución de las enzimas involucradas en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) así como de la cadena de transporte de electrones. Como consecuencia, se produce una disminución del metabolismo energético que resulta en estrés metabólico. Esta disregulación del metabolismo energético compromete, a su vez, la capacidad de las neuronas para regular los niveles y la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial.
- Se ha observado una disminución del potencial mitocondrial con el envejecimiento. Esto se traduce en una disminución de la captación de Ca^{2+} mitocondrial (Calvo-Rodríguez et al., 2016a). Algunos autores proponen que este cambio puede considerarse como una respuesta adaptativa de las células para impedir la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial.
- En neuronas envejecidas se ha detectado un aumento de la producción de ROS con el consiguiente aumento del estrés oxidativo. Este aumento del estrés oxidativo puede afectar a las vías fisiológicas de señalización del Ca^{2+} .
- La expresión de la proteína MCU, encargada de la captación de Ca^{2+} mitocondrial, aumenta su expresión durante el envejecimiento en neuronas de hipocampo (Calvo-Rodríguez et al., 2016a).
- La transferencia de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria aumenta con el envejecimiento. Esto podría explicarse, en parte, debido a la mayor liberación de Ca^{2+} desde el RE, lo que genera microdominios de Ca^{2+} lo suficientemente grandes y mantenidos en el tiempo como para promover la absorción de Ca^{2+} mitocondrial mediada por las MAM. De esta manera, gracias a la aparición de estos dominios y a una mayor expresión de MCU, tiene lugar una mayor captación de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias a pesar de la despolarización mitocondrial que tienen lugar durante el envejecimiento (Calvo-Rodríguez et al., 2016a).

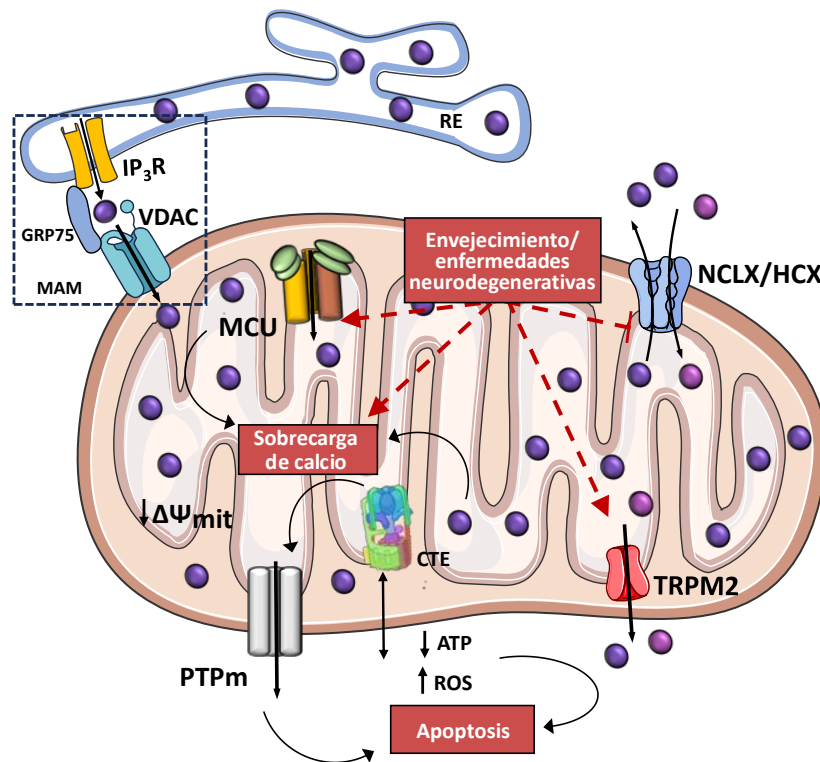


Figura 50. Efecto del envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial. Este esquema ilustra la mitocondria y los componentes clave involucrados en la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial. Como puede observarse, muchos de ellos se ven alterados durante el envejecimiento. Por un lado, tienen lugar alteraciones en la cadena respiratoria las cuales conllevan una menor producción de ATP y un aumento de la producción de ROS. Por otro lado, pueden producirse alteraciones en los sistemas de transporte como un aumento de la expresión de MCU y TRPM2, así como, una disminución de NCLX y HCX. Además, también puede verse aumentada la transferencia de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria a través de las MAM, lo que, a su vez, conllevaría una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y, en consecuencia, la apoptosis. En concreto, esto podría deberse a la mayor tasa de entrada de Ca^{2+} en comparación con la salida, lo que favorecería la acumulación de este ion en el interior mitocondrial hasta el punto de producir una sobrecarga de Ca^{2+} , una producción excesiva de ROS, la apertura de PTPm y, en consecuencia, desencadenar la apoptosis. En este sentido, se observa también una disminución del potencial mitocondrial, lo que podría ser consecuencia de todo lo anterior y ser, en realidad, una respuesta adaptativa cuyo fin sería el de evitar la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial. Basado en (Johnson et al., 2023).

6.1.4 Efectos del envejecimiento sobre la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos

La entrada de Ca^{2+} operada por depósitos o SOCE es una vía de entrada de Ca^{2+} implicada en diferentes funciones fisiológicas y en múltiples tipos celulares. En las neuronas del hipocampo se ha implicado en la estabilización de espinas dendríticas y, por tanto, en procesos de memoria y aprendizaje. Se ha observado una pérdida de SOCE en neuronas de hipocampo con el envejecimiento, lo que se piensa que podría contribuir al deterioro cognitivo asociado al envejecimiento. Aunque no se conoce el mecanismo, se ha propuesto que la disminución de SOCE podría deberse a la disminución de la expresión de STIM1 y ORAI1, dos de las proteínas implicadas en dicho mecanismo (Calvo-Rodríguez et al., 2016).

6.2 Remodelado del Ca^{2+} intracelular y enfermedad de Alzheimer

El Ca^{2+} participa en el proceso de aprendizaje y memoria, y, además, en la supervivencia y muerte neuronal. A pesar de que el origen de las enfermedades neurodegenerativas es amplio y complejo, alteraciones de la homeostasis del Ca^{2+} se han propuesto como un mecanismo común en la muerte neuronal que sucede en muchas de las enfermedades neurodegenerativas como la EA.

Como ya se mencionó anteriormente hay dos formas de EA: la EA esporádica, que representa la mayoría de los casos, se caracteriza por una disminución lenta y progresiva de la cognición y un aumento de la muerte de neuronas. La otra forma es la EA familiar, que se desarrolla mucho más rápido y está causada por mutaciones en componentes de la vía amiloide como *APP*, *ApoE4*, *PS1* y *PS2*. La rápida progresión de la EA de tipo familiar, asociada a estas mutaciones, ha sido un componente importante de la hipótesis de la cascada de amiloide, la cual vincula el metabolismo del péptido β -amiloide con la EA. Si bien los mecanismos bioquímicos responsables de la acumulación de amiloide se comprenden, todavía no está claro cómo estos cambios promueven la neurodegeneración progresiva y la muerte celular. La hipótesis del Ca^{2+} en la EA ocupa un lugar destacado como mecanismo potencial para vincular el metabolismo amiloide con la disfunción neuronal y neurodegeneración.

También, anteriormente, se ha mencionado que una de las hipótesis del desarrollo de EA es la acumulación de $\text{A}\beta$. En particular, la hipótesis del Ca^{2+} en la EA trata de explicar cómo la formación y la acumulación de amiloide podría conllevar tanto la disminución progresiva de la memoria como el aumento de la apoptosis de las neuronas. Esta hipótesis se basa en que la activación de la vía amiloidogénica da, como resultado, una remodelación de la señalización neuronal del Ca^{2+} . Esta remodelación, normalmente, aparece como una regulación positiva de la señalización, aunque en algunos casos también se ha descrito una regulación negativa. Este remodelado distorsiona los mecanismos normales dependientes de Ca^{2+} responsables del aprendizaje y la memoria.

En este sentido, se ha observado que esta acumulación induce un aumento de Ca^{2+} intracelular por la interacción de la proteína amiloide con los canales VOCC tipo L/P/Q, NMDAR, RyR e, indirectamente, por otros mecanismos. Curiosamente, algunas de las formas de EA familiar se deben a mutaciones de *PS1* que no afectan a la producción de $\text{A}\beta$, sino que aumentan la liberación de Ca^{2+} desde el RE al citosol, destacando el papel del Ca^{2+} en la apoptosis neuronal. Además, se ha demostrado que $\text{A}\beta$ aumenta el acoplamiento RE-mitocondria y la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a las mitocondrias. Este aumento del Ca^{2+} conduce a la disfunción mitocondrial y al inicio de la apoptosis. Probablemente, la pérdida de la regulación de Ca^{2+} por la acción de $\text{A}\beta$ es una de las principales causas del aumento de la producción de ROS en la EA (Godoy et al., 2021). A continuación, se resumen brevemente los datos sobre la posible implicación del Ca^{2+} en la EA.

6.2.1 $\text{A}\beta$ y entrada de Ca^{2+} .

En 1992, Mattson y otros describieron que la incubación de células con $\text{A}\beta_{1-42}$ producía disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En concreto, describieron que la incubación con $\text{A}\beta_{1-42}$ da lugar a un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (Mattson et al., 1992). Además, nuestro grupo de investigación ha propuesto que la interacción de $\text{A}\beta_{1-42}$ con la MP produce un aumento del Ca^{2+} intracelular, así como un aumento de la vulnerabilidad de las neuronas (Sanz-Blasco et al., 2008). Sin embargo, los mecanismos por los que $\text{A}\beta_{1-42}$ produce una alteración del Ca^{2+} intracelular son

controvertidos. No obstante, se ha visto que estos oligómeros de A β_{1-42} pueden aumentar la entrada de Ca $^{2+}$ funcionando como canales o regulando la actividad de canales en la MP.

En la década de los noventa, Arispe y sus colaboradores sugirieron una relación entre la proteína β -amiloide y el Ca $^{2+}$, lo que se denominó hipótesis del Ca $^{2+}$ en la EA (Arispe et al., 1993). Mediante la exposición de membranas sintéticas al péptido amiloide, observaron que éste formaba poros en la MP, lo que facilita el paso de cationes y permite la entrada de Ca $^{2+}$ en la célula. De esta manera, el A β podría crear canales selectivos para cationes que son permeables al Ca $^{2+}$, denominados canales de amiloide, tanto en sistemas de bicapas lipídicas como en diversos tipos celulares, entre los que incluyen líneas de celulares de neuronas y cultivos primarios del hipocampo (Simakova & Arispe, 2006).

Demuro (Demuro et al., 2005) y colaboradores plantearon la idea de que el péptido amiloide incrementa la permeabilidad de las membranas, no por la formación de canales iónicos, sino por efectos inespecíficos que alteran las concentraciones iónicas celulares. Esto, a su vez, resulta en modificaciones de la estructura de la MP y en un flujo descontrolado de Ca $^{2+}$ al interior de la célula. Paralelamente, otros estudios sugieren que el A β incrementa la susceptibilidad neuronal a través de la activación de NMDAR (Mattson, 2004). Además, también se ha implicado a la proteína priónica celular la cual podría asociarse con el A β y facilitar la entrada de Ca $^{2+}$ a través del NMDAR (Laurén et al., 2009). Otros autores también han propuesto que A β promueve la peroxidación lipídica de las membranas neuronales, lo que conduce a una sobrecarga de Ca $^{2+}$, al agotamiento de los niveles de ATP, la disfunción sináptica y el deterioro cognitivo (Mark et al., 1997).

6.2.2 Procesamiento amiloide y liberación de Ca $^{2+}$ de los depósitos

Las presenilinas (PS) son proteínas integrales de la membrana del RE con actividad γ -secretasa, esencial para la producción normal del péptido amiloide. Se expresan en múltiples tejidos celulares; en concreto, las neuronas expresan, principalmente, PS1 y PS2. Mutaciones en presenilinas, como E280A, se han propuesto como una de las causas de la aparición de EA familiar. Estas mutaciones conllevan el aumento de la producción de A β_{1-42} y, en consecuencia, perturban la homeostasis del Ca $^{2+}$.

En concreto, se ha observado que ratones con mutación en PS1 presentan un aumento de la liberación de Ca $^{2+}$ desde el RE a través de los IP $_3$ Rs (Figura 51). Otro mecanismo de transporte de Ca $^{2+}$ afectado son los RyR, cuya expresión aumenta y, en particular, la isoforma RyR3 (Supnet et al., 2006). Se ha propuesto que este aumento de la liberación de Ca $^{2+}$ es debido a que la PS1 mutada interacciona con las proteínas transportadoras y, en consecuencia, aumenta la sensibilidad. No obstante, esta sensibilidad también puede ser causada por la vía amiloidogénica. Sin embargo, esta mayor liberación de Ca $^{2+}$ también puede ser causa por un mayor contenido de dicho catión en el RE como consecuencia de una mayor actividad de la SERCA y una menor actividad de los canales *leak* (Green et al., 2008). En este sentido, otros estudios sugieren que las presenilinas pueden actuar como canales *leak*, por los que se libera Ca $^{2+}$ de forma pasiva de forma que, cuando estas están mutadas, pierden su función como canal *leak*, lo que da lugar a la acumulación excesiva de Ca $^{2+}$ en el RE (Figura 51) (Nelson et al., 2007).

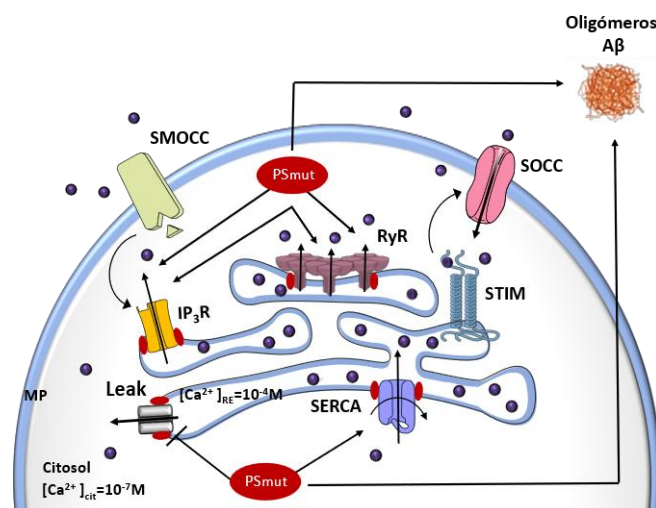


Figura 51. Remodelado de la señalización del Ca^{2+} en el RE debido a mutaciones en presenilinas en la EA. Las mutaciones en presenilina (PSmut) aumentan la expresión de RyR y provocan un aumento de la liberación de Ca^{2+} mediada por IP_3R . Además, la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3R se ve favorecida por la liberación de Ca^{2+} a través de los RyR por el mecanismo CICR. También se ha descrito que las PS forman canales de fuga de Ca^{2+} en el RE, una función que es suprimida por la aparición de mutaciones en estas, lo que causa una sobrecarga de Ca^{2+} en el RE. Las mutaciones en PS también tienen un efecto inhibitorio sobre SOCE, efecto que podría estar implicado en la generación de agregados de A β . Finalmente, las PS interactúan con SERCA, lo que también favorece la formación de A β .

6.2.3 Enfermedad de Alzheimer y mitocondria

Se ha propuesto que, en la EA, los oligómeros de A β entran a las mitocondrias a través de las translocasas TOM y TIM. Una vez dentro de la mitocondria, estos oligómeros pueden interactuar con diferentes estructuras tales como los complejos de la cadena respiratoria III y IV, lo que conlleva la disminución en la síntesis de ATP o ciclofilina D (CypD), lo que conduciría a la apertura de PTPm y, en consecuencia, el colapso de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ y la activación de la muerte celular (Figura 52).

Además, se ha descrito que en la EA aumenta la sensibilidad de las mitocondrias por Ca^{2+} , lo que también podría activar la vía intrínseca de la apoptosis inducida por este ion. En consecuencia, estos niveles excesivos de Ca^{2+} mitocondrial podrían aumentar la producción de ROS, reducir el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ y estimular la apertura de PTPm, lo que conduce a la liberación de factores proapoptóticos. Como se ha mencionado anteriormente, la interacción entre el RE y las mitocondrias regula la señalización del Ca^{2+} . Por ello, se sugiere que, cuando el Ca^{2+} se libera desde el RE a través de los IP_3R , este es captado por las mitocondrias las cuales actúan como amortiguadoras de Ca^{2+} . Así, si la acumulación de Ca^{2+} es excesiva, entonces se produce una sobrecarga que desencadena la apertura del PTPm, la pérdida del potencial mitocondrial y la liberación del CitC, lo que, finalmente, desencadena la apoptosis. Además, el exceso de Ca^{2+} puede elevar la producción de ROS que, a su vez, favorece la apertura del PTPm (Figura 52) (Berridge, 2010b).

Recientemente, nuestro grupo ha descrito que los oligómeros A β_{1-42} favorecen la entrada de Ca^{2+} a las células, lo que conduce a una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y a la muerte neuronal por apoptosis. En concreto, se demostró que este catión es crucial para la toxicidad del péptido amiloide, ya que la inhibición de la captación de Ca^{2+} mitocondrial debida al uso de desacoplantes mitocondriales tiene un efecto protector frente a la muerte neuronal (Sanz-Blasco et al., 2008). Finalmente, se ha propuesto que el A β_{1-42} puede integrarse en las membranas mitocondriales y causar alteraciones estructurales que pueden afectar a la actividad y a la dinámica mitocondrial.

Aunque la entrada de Ca^{2+} en las mitocondrias es fundamental para la función celular normal, la entrada de Ca^{2+} excesiva en estas puede generar una sobrecarga y provocar la activación del PTPm. Este fenómeno se ha asociado a muchos estados patológicos diferentes, por lo que se considera un objetivo prometedor para la intervención terapéutica de la EA. Así, al igual que en el envejecimiento y la neurodegeneración, la disfunción mitocondrial también es un proceso clave en la aparición y progresión de la EA. La disfunción mitocondrial y la degeneración axonal son algunas de las primeras características patológicas del deterioro cognitivo leve, un estado clínico que, frecuentemente, precede a la EA. En este sentido, el análisis de muestras de pacientes con EA reveló una disminución significativa en el número de mitocondrias en neuronas y una mayor vulnerabilidad al daño. Además, las neuronas de estos pacientes muestran niveles elevados de productos de degradación mitocondrial, lo que sugiere un aumento del recambio de las mitocondrias a través de la autofagia o un recambio proteolítico que conduce a la acumulación de ADN mitocondrial y proteínas mitocondriales (Godoy et al., 2021).

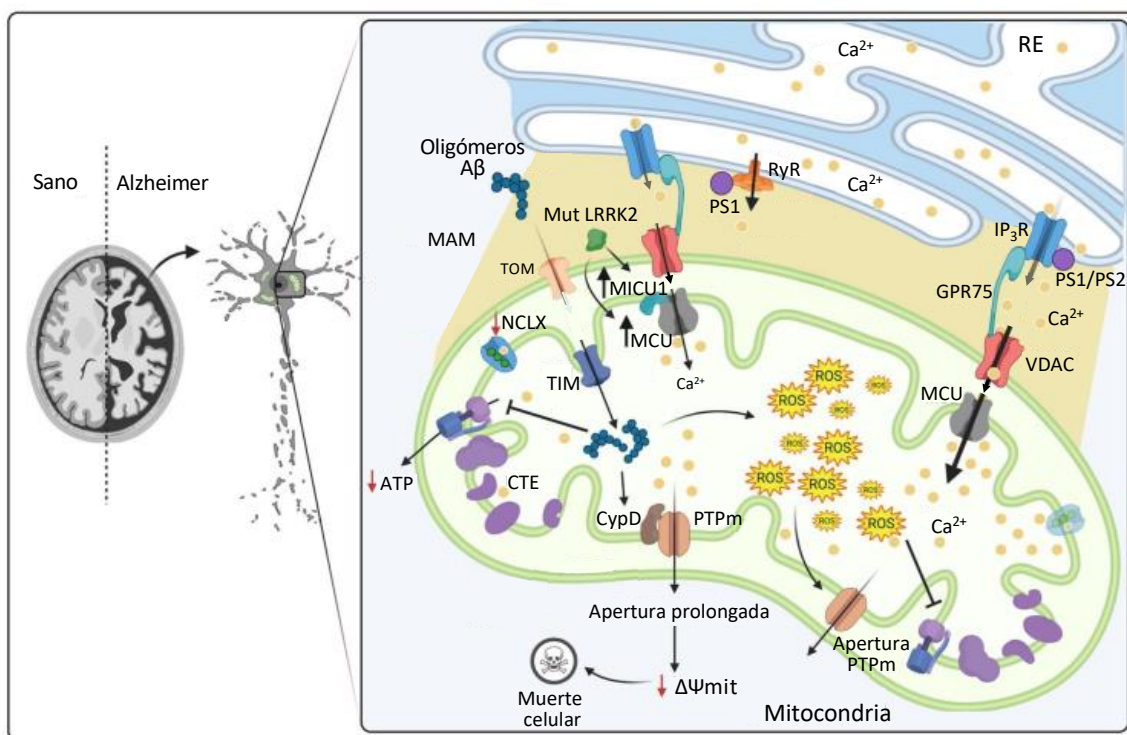


Figura 52. Vista esquemática del papel de la disregulación de Ca^{2+} mitocondrial en la EA. En la EA, los oligómeros de $\text{A}\beta$ entran a las mitocondrias a través de las translocasas TOM y TIM. Una vez dentro de la matriz, interactúan con objetivos específicos: (i) los complejos de la cadena respiratoria III y IV, que conducen a la reducción de la síntesis de ATP, y (ii) CypD, que conduce a la apertura de PTPm, el colapso de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ y la activación de la muerte celular. Los niveles excesivos de Ca^{2+} mitocondrial pueden aumentar la producción de ROS, reducir el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ y estimular la apertura de PTPm, lo que conduce a la liberación de factores proapoptóticos. Las PS1 y PS2 mutadas interactúan y modulan el canal de liberación de Ca^{2+} IP_3R provocando una fuerte activación de estos. La región N-terminal de PS1 puede interactuar con los RyR y aumentar su actividad. Modificado de (Modesti et al., 2021).

6.3 Remodelado del Ca^{2+} intracelular en tumores cerebrales

En los últimos años, el papel del remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el cáncer ha cobrado una gran importancia, pues se ha implicado en la adquisición de características propias del fenotipo tumoral o *los hallmarks del cancer*, como el mantenimiento de la proliferación, capacidad replicativa ilimitada, resistencia a la muerte, angiogénesis, motilidad, migración e invasión y metástasis, etc. En este sentido, se ha observado un remodelado de los sistemas de transporte de Ca^{2+} intracelular en el proceso tumoral en distintos tipos de cáncer, tales como cambios en la expresión de proteínas transportadoras, modificaciones postranscripcionales o diferentes mutaciones (Hernández-Morales et al., 2017a; Sobradillo et al., 2014; Villalobos et al., 2016; Xie et al., 2016).

En tumores cerebrales y, concretamente, en gliomas, se ha detectado la alteración en varios mecanismos de transporte de Ca^{2+} como SOCC, los TRP, VOCC y los P2X7, los cuales participan en la entrada de Ca^{2+} , alteraciones que acaban por activar diversas señales intracelulares como la motilidad celular (Leclerc et al., 2016; So et al., 2021). A continuación, se recogen algunos de los cambios descritos en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular que tienen lugar en los gliomas, estos cambios se han agrupado en función de la vía de señalización sobre la que tienen efecto.

6.3.1 Remodelado del Ca^{2+} en gliomas sobre la proliferación celular

En células de GBM, el tumor cerebral más agresivo y con peor pronóstico, se han identificado múltiples alteraciones en los sistemas de transporte de Ca^{2+} implicadas en la proliferación celular. Por ello, no es de extrañar que el Ca^{2+} juegue un papel fundamental en la tumorigénesis de los GBM. A continuación, se exponen algunas de las evidencias que relacionan el papel de este catión con los GBM:

- En líneas celulares de gliomas, tanto de origen animal, C6, como humanas, U251, se ha descrito que SOCE está mediada por STIM1 y ORAI1 y, que, esta es esencial para el mantenimiento de la proliferación sostenida. Además, se ha descrito que la expresión de STIM1 y ORAI1 es mayor en células de GBM derivadas de muestras quirúrgicas de astrocitos primarios humanos (HPA), lo que promueve una mayor SOCE (dos veces mayor) (Motiani et al., 2013a). Por otro lado, se ha descrito que la inhibición de SOCE reduce la proliferación y aumenta la apoptosis de células de GBM (H. Liu et al., 2011a). Sin embargo, la eliminación de estas proteínas mostró un efecto marginal sobre la proliferación. Además, ORAI2 también está sobreexpresado en GBM, el cual puede considerarse como un marcador de mal pronóstico (Yuan et al., 2019).
- Respecto a la superfamilia de los TRP, se ha detectado una sobreexpresión en células de GBM en varios de sus miembros: TRPC1, TRPC6, TRPM2, TRPM3, TRPM7, TRPM8, TRPV1 y TRPV2. El TRPC1 se asocia con la proliferación celular, el tamaño y la regulación de los canales de Cl^- durante los cambios en el volumen de las células de glioma que tienen lugar durante la proliferación (Cuddapah et al., 2013). El TRPC6 regula la hipoxilación y la estabilidad del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) (S. Li et al., 2015). Además, la disminución de la actividad de TRPC6 inhibe el crecimiento celular y detiene el ciclo celular. En cuanto al TRPC4, su activación induce una elevada entrada de Ca^{2+} a la célula, lo que se relaciona con la migración celular en meduloblastoma, un tipo de cáncer que surge en el cerebelo. Otra familia de TRP, los TRPM, se ha asociado con la progresión del glioma, migración e invasión de células de GBM. El TRPM7 promueve la migración y la invasión del glioma mediante las vías de señalización STAT3 y Notch (M. Liu et al., 2014),

mientras que la invasión de las células se redujo en células transfectadas con un mutante de TRPM7. Además, TRPM8 aumenta el Ca^{2+} citosólico lo que, posteriormente, conduce a la activación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} y, en consecuencia, se promueve la migración celular. Por ello, se ha sugerido que el bloqueo de TRPM8 puede reducir la migración y la supervivencia en células de GBM (Klumpp et al., 2017).

6.3.2 Remodelado del Ca^{2+} en gliomas y migración celular

Uno de los factores que conducen a un mal pronóstico del GBM es su naturaleza infiltrativa ya que hace que la resección quirúrgica sea ineficaz. Los canales iónicos y la señalización de Ca^{2+} pueden contribuir, directa o indirectamente, a esta capacidad de migración e invasión. Destaca el papel de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, la liberación de Ca^{2+} desde el RE y la activación de una proteína de unión a Ca^{2+} en estos procesos (Figura 53):

- En líneas celulares de glioma se ha identificado la sobreexpresión de varios tipos de TKR y GPCR que contribuyen a la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de la activación de IP_3R (S. S. Kang et al., 2010). Por ello, el bloqueo de la liberación de Ca^{2+} mediada por IP_3R con cafeína inhibe la invasión de GBM y aumenta la supervivencia. Sin embargo, también se ha demostrado que el aumento de la liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3R inhibe la proliferación, la motilidad y la invasión (S. Kang et al., 2017). Por lo tanto, estos resultados sugieren que las respuestas anormales, ya sea un aumento o una disminución de la liberación de Ca^{2+} , puede suprimir la migración e invasión de células de GBM. En este sentido, cabe destacar un estudio transcriptómico que reveló una mayor expresión del $\text{IP}_3\text{R3}$ y una disminución de $\text{IP}_3\text{R1}$ en muestras de GBM, mientras que la expresión de los RyR no mostró cambios (S. S. Kang et al., 2010).
- Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en células de GBM se relacionan con la proliferación y migración celular. Por un lado, el bloqueo o inhibición de VOCC tipo T, un tipo de canal que se activa ante pequeñas variaciones en el voltaje, reduce la proliferación y la migración en células de GBM (Zhang et al., 2012). Por otro lado, el bloqueo de los VOCC tipo P/Q y N afecta a la progresión del glioma al inhibir la proliferación y la viabilidad en líneas células de glioma, mientras que en astrocitos y microglía cercanos a la región del tumor *in vivo* e *in vitro* la aumenta (Nicoletti et al., 2017).
- Los receptores purinérgicos, en concreto el P2X7 que conduce a la entrada de Ca^{2+} al citosol, se relacionan con características malignas de células de gliomas. Este receptor se expresa en células de glioma C6 y su activación promueve la expresión de factores proinflamatorios y la movilidad celular (W. Wei et al., 2008). De acuerdo con estos resultados, otros grupos han descrito que la acción de agonistas de P2X7 es capaz de aumentar la migración y la proliferación a través de la vía de señalización MEK/ERK en células de glioma (Ji et al., 2018).
- En células de GBM se ha observado la sobreexpresión de la proteína S100A4, proteína de unión a Ca^{2+} la cual promueve la invasión y la metástasis en diferentes células tumorales.

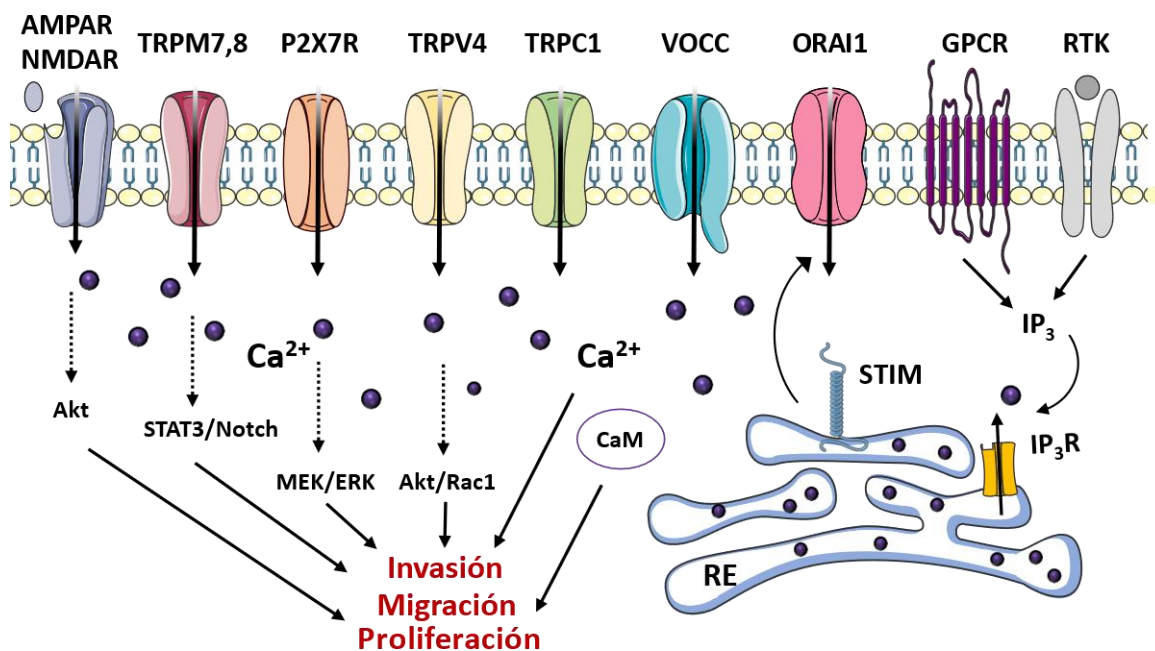


Figura 53. La señalización de Ca^{2+} media la proliferación, invasión y migración en células de gliomas. La entrada de Ca^{2+} al citosol a través de los TRP (TRPM7,8; TRPV4; TRPC1), los P2X7R, los canales VOCC tipo T y SOCE, así como la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de los IP_3R , produce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ que afecta de forma crítica a la capacidad de proliferación, migración e invasión de las células de glioma. Además, las células de glioma liberan glutamato a través de un intercambiador de cisteína-glutamato (no representado en la figura). Este glutamato liberado por las células de glioma activa tanto de forma autocrina como paracrina los AMPAR, a través de los cuales entra Ca^{2+} al citosol. Por un lado, la señalización autocrina favorece la migración y la invasión celular. Por otro lado, la señalización paracrina favorece la aparición de un microambiente tumoral, ya que la entrada sostenida de Ca^{2+} en células circundantes da lugar a una sobrecarga de Ca^{2+} y, en consecuencia, provoca la muerte excitotóxica de estas creando así un microambiente tumoral propicio a la invasión. Basado en (So et al., 2021).

6.3.3 Influencia en el entorno tumoral mediante la señal de glutamato

El glutamato es un neurotransmisor que interactúa con los receptores de glutamato localizados en la MP de las neuronas y las glías, interacción que lleva a la activación de múltiples vías de señalización. En particular, la señalización por glutamato desempeña funciones importantes en la proliferación, el crecimiento y el movimiento de las células tumorales cerebrales. De hecho, se ha demostrado que las células de glioma producen una gran cantidad de glutamato, lo que da como resultado un aumento de la concentración de este muy por encima de las concentraciones en tejidos cerebrales normales (Figura 54). Este glutamato es utilizado por las células de GBM como una señal autocrina y paracrina para promover la migración mediante la activación de los AMPAR, lo que aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ y la proliferación mediante la activación de Akt (Ishiuchi et al., 2007). Además, en experimentos con co-cultivos demostraron que la liberación de glutamato por las células de GBM induce la muerte neuronal (Ye et al., 1999).

En resumen, existen numerosas evidencias que muestran la expresión y función aberrante de las vías de señalización del Ca^{2+} en cáncer, y en particular en los GBM (Figura 53). Por ello, la identificación de proteínas de Ca^{2+} implicadas en procesos cancerígenos pueden suponer una importante oportunidad para la identificación de nuevas dianas terapéuticas para el diseño de fármacos e inhibidores que se dirijan a estas vías de señalización del Ca^{2+} alteradas. No obstante, mientras que la desregulación del Ca^{2+} no tiene por qué ser la causa principal de la tumorigénesis en el GBM, la pérdida de la homeostasis y regulación normal del Ca^{2+} podría favorecer el fenotipo tumoral.

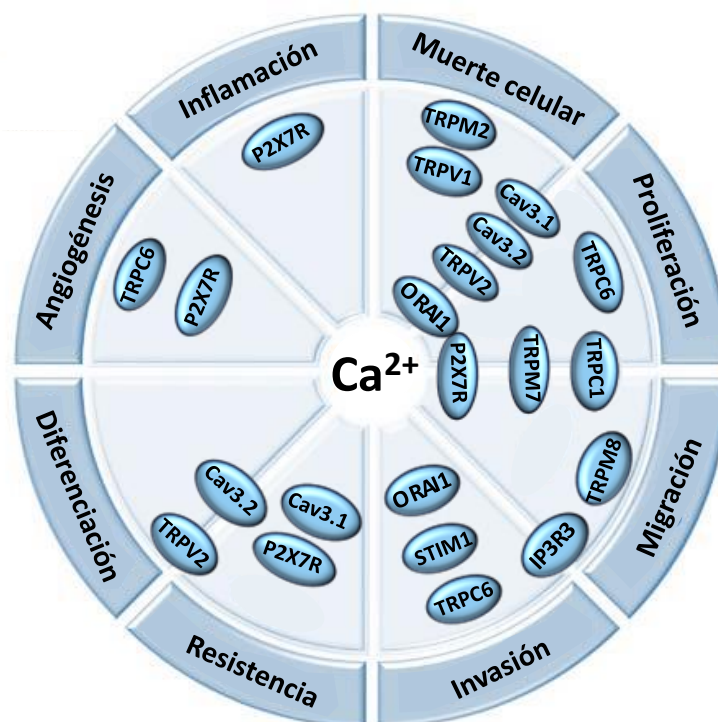


Figura 54. Representación esquemática de los procesos biológicos promovidos por los sistemas de señalización de Ca^{2+} en las células cancerígenas de tumores cerebrales. Se ha demostrado que varios canales de Ca^{2+} contribuyen a diversos procesos protumorales en células de glioma. Estos procesos incluyen proliferación, migración, invasión, resistencia a la terapia, diferenciación, angiogénesis, inflamación y muerte celular. Las proteínas que se encuentran en los límites de dos procesos contribuyen a ambos procesos. Basado en (Maklad et al., 2019).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1 HIPÓTESIS

La hipótesis básica del trabajo de Tesis Doctoral es que la homeostasis del calcio intracelular en neuronas y células cerebrales se ve modificada en diferentes situaciones fisiopatológicas como el envejecimiento neuronal y la presencia de oligómeros del péptido amiloide relacionados con la enfermedad de Alzheimer, así como en los tumores cerebrales y que estos cambios podrían contribuir a la mayor susceptibilidad a la muerte y disfunción neuronal asociada al envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer, así como al fenotipo tumoral de los tumores cerebrales.

2 OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral es caracterizar, en detalle, tanto a nivel funcional como molecular, los posibles cambios en la homeostasis del calcio intracelular en un modelo de envejecimiento neuronal *in vitro* de neuronas de hipocampo de rata neonata y en células de diferentes tumores cerebrales humanos. Para ello, perseguiremos los siguientes objetivos específicos.

1. Caracterizar los posibles cambios, a nivel funcional y molecular, en la homeostasis del calcio intracelular asociados al envejecimiento neuronal y al tratamiento con oligómeros del péptido amiloide.
 - 1.1. Caracterizar los cambios en la homeostasis del calcio intracelular asociados al envejecimiento neuronal y al tratamiento con oligómeros del péptido amiloide en neuronas de hipocampo envejecidas *in vitro*, incluyendo la entrada de calcio operada por depósitos, su modulación por agonistas específicos y la mitocondria, la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, la expresión de receptores de IP_3 y la colocalización entre el retículo y la mitocondria.
 - 1.2. Caracterizar los posibles cambios en la expresión de genes implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular asociados al envejecimiento neuronal y al tratamiento con oligómeros del péptido amiloide.
2. Caracterizar la señal de calcio y los posibles cambios en la homeostasis del calcio intracelular y sus bases moleculares en tumores cerebrales humanos, especialmente glioblastomas.
 - 2.1. Caracterizar los cambios en la concentración de calcio libre intracelular en respuestas a diferentes estímulos y la entrada de calcio operada por depósitos y su control por la mitocondria en cultivos primarios obtenidos de tumores cerebrales humanos incluyendo neurinomas, meningiomas, oligodendrogliomas, astrocitomas, glioblastomas y metástasis cerebrales de diferentes orígenes.
 - 2.2. Caracterizar los posibles cambios en la homeostasis del calcio intracelular y el perfil transcriptómico de glioblastomas y muestras ciegas pareadas correspondientes a zonas tumorales y peritumorales resecaadas por razones clínicas con énfasis en los genes implicados en transporte de Ca^{2+} diferencialmente expresados.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1 MATERIAL

A continuación, en las siguientes tablas, se recogen los diferentes materiales empleados durante la presente tesis, así como las casas comerciales de estos (Tabla 3 y Tabla 4).

Tabla 3. Resumen de material y reactivos

Materiales y reactivos	Casa Comercial
4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona (CNQX)	Tocris
Ácido ciclopiazónico (CPA)	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
Ácido(2R)-amino-5-fosfonoaléico (D-AP5)	Tocris
Adenosín trifosfato (ATP)	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
Albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (BSA)	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
Anticuerpo primario monoclonal α-β tubulina III	Covance (Princeton, NJ, EEUU)
Anticuerpo primario policlonal de cabra α-IP₃R1	Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, EE.UU)
Anticuerpo primario policlonal de cabra α-IP₃R1	Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, EE.UU)
Anticuerpo primario policlonal de cabra α-IP₃R2	Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, EE.UU)
Anticuerpo primario policlonal de conejo α-GFAP	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
Anticuerpo primario policlonal de ratón α-IP₃R3	BD (Madrid, España)
Anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa Flúor 488	Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU)
Anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa Flúor 594	Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU)
Anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con FITC	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
B27	Gibco (Barcelona, España)
BTP2	Calbiochem
CaCl₂	Merck (Madrid, España)
Caged-IP₃	Sichem GmbH (Bremen, Alemania)
Carbonil cianida para-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP)	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
D-Glucosa	Merck (Madrid, España)
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Merck (Madrid, España)
DMEM alta glucosa (4,5 g/L)	Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU)
DNAsa I (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
ER-Tracker RED	Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU)
Éster acetílico del diacetato de 5-(γ-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidro-fluoresceína (CM-H2DCFDA)	Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU)
Filtros estériles PVDF 0,22 μm	Millipore
Fluo-4/AM	Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU)
Fura-2/AM	Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU)

Tabla 4. Resumen de material y reactivos

Materiales y reactivos	Casa Comercial
Gentamicina	Gibco (Barcelona, España)
Glicina	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
HBSS	Gibco (Barcelona, España)
HCl	Merck (Madrid, España)
HEPES	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
KCl	Merck (Madrid, España)
KH₂PO₄	Merck (Madrid, España)
L-Glutamina	Gibco (Barcelona, España)
Metil dietil borinato (MDEB)	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
MEM	Gibco (Barcelona, España)
MgCl₂	Merck (Madrid, España)
Mitotracker Green	Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU)
N,N,N',N'-tetraacético (EGTA)	Merck (Madrid, España)
Na₂HPO₄	Merck (Madrid, España)
NaCl	Merck (Madrid, España)
NaOH	Merck (Madrid, España)
Neurobasal	Gibco (Barcelona, España)
Nifedipina	Tocris
N-metil-D-Aspartato (NMDA)	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
N-metil-D-Glucamina (NMDG)	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
Papaína	Worthington (Lakewood, NJ, EE. UU)
Paraformaldehído (PFA)	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
PBS	Gibco (Barcelona, España)
Penicilina-Estreptomicina (P/S)	Lonza (Barcelona, España)
Péptido Aβ₁₋₄₂	Bachem AG (Bubendorf, Suiza)
Poli-D-lisina	Alomone (Jerusalem, Israel)
Poli-L-lisina	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)
RNAlater	Invitrogen
Suero de caballo (HS)	Gibco (Barcelona, España)
Suero de cabra (GS)	Gibco (Barcelona, España)
Suero Fetal Bovino (FBS)	Lonza (Barcelona, España)
Tamiz Celular 40 μm	Fisher Scientific (Madrid, España)
Tapsigargina	Alomone (Jerusalem, Israel)
Tetrametilrodamina (TMRM)	Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU)
Tetrodotoxina (TTX)	Tocris
Tripsina-EDTA	Lonza (Barcelona, España)
Tris-HCl	Merck (Madrid, España)
Tritón X-100	Merck (Madrid, España)
Trizol	Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU)
β-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich Co. (Madrid, España)

En la siguiente tabla (Tabla 5), se muestran los diferentes medios de cultivos (columna de la izquierda) junto con la composición de cada uno de ellos (columna de la derecha).

Tabla 5. Medios utilizados para la obtención de cultivos celulares

Medios para la obtención de cultivos	Composición
Nutrient Mixture F12 (pH 7,42)	DMEM (Medio de Eaggel modificado por Dubelcco) 4,5 g/L Glucosa; HEPES 25 mM; NaHCO ₃ 4 mM
HANK'S + 0,6 % BSA	HBSS (Solución salina balanceada de Hank); 0,6% BSA
DMEM suplementado	DMEM 4,5 g/L Glucosa; Gentamicina 1 µg/mL; Penicilina/estreptomicina, 10% FBS
MEM	DMEM (4,5 g/L Glucosa); Cu ²⁺ 0,5 g/L; Fe ²⁺ 1,3 mg/L; Zn ²⁺ 0,5 g/mL
Neurobasal suplementado	Neurobasal; Gentamicina 1 µg/mL; L-Glutamina 2 mM; 2% B27; 10% FBS

A continuación, se recogen los diferentes medios empleados para los experimentos de imagen de Ca²⁺, todos ellos junto con su composición mostrada en la columna de la derecha (Tabla 6).

Tabla 6. Medios utilizados para el registro de experimentos de imagen de fluorescencia

Medios utilizados en experimentos de imagen de Ca ²⁺	Composición
ATP 100 µM	Ca1; ATP 100 µM
Ca0, medio libre de calcio (pH 7,42)	NaCl 145 mM; KCl 5mM; MgCl ₂ 1 mM; HEPES 10 mM; Tris-HCl 1mM-EGTA 0,5 mM; Glucosa 10 mM
Ca0 + CPA	Ca0; CPA 10 µM
Ca0+CIC	Ca0; TTX 1 µM; CNQX 10 µM; Nifedipina 5 µM; D-AP5 10 µM
Ca0+CIC+MDEB	Ca0+CIC; MDEB 1 mM
Ca1, Medio externo completo (MEC) (pH 7,42)	NaCl 145 mM; KCl 5 mM; MgCl ₂ 1 mM; HEPES 10 mM; CaCl ₂ 1 mM; Glucosa 10 mM
Ca1 + CPA	Ca1; CPA 10 µM
Ca1+CIC	Ca1; TTX 1 µM; CNQX 10 µM; Nifedipina 5 µM; D-AP5 10 µM
Ca1+CIC+MDEB	Ca1+CIC; MDEB 1 mM
Medio Alto K⁺ (pH 7,42)	KCl 75 mM; MgCl ₂ 1 mM; HEPES 10 mM; CaCl ₂ 1 mM; Glucosa 10 mM
Mg0, Medio libre de magnesio (pH 7,42)	NaCl 145 mM; KCl 5 mM; HEPES 10 mM; Glucosa 10 mM; CaCl ₂ 1 mM
Na0, Medio libre de sodio (pH 7,42)	N-metil D-glucamina 145 mM; KCl 5 mM; MgCl ₂ 1 mM; HEPES 10 mM
NMDA 100 µM	Mg0; NMDA 100 µM; Glicina 10 µM; CaCl ₂ 100 µM; Glucosa 100 µM

2 MÉTODOS

En los siguientes apartados se van a detallar brevemente los diferentes métodos experimentales llevados a cabo para realizar los diferentes experimentos y análisis mostrados en la presente tesis.

2.1 Modelos de estudio

Puesto que se han empleado diferentes modelos, todos ellos obtenidos a partir de cultivos primarios, a continuación, se muestran los procedimientos y protocolos seguidos para obtener cada uno de ellos.

2.1.1 Modelo de envejecimiento neuronal

Como modelo de envejecimiento se emplearon cultivos primarios de hipocampo de rata neonata. Estos cultivos mixtos de neuronas y glías de hipocampo se realizan en condiciones de esterilidad a partir de ratas Wistar neonatas (0-1 día), según el protocolo de (Brewer et al., 1993) modificado por Pérez-Otaño (Pérez-Otaño et al., 2006). Todos los animales fueron manipulados según el estándar ético de la Universidad de Valladolid bajo los protocolos aprobados por el animalario y de acuerdo con el Convenio Europeo 123/Consejo de Europa y la Directiva 86/609/CEE.

En primer lugar, las ratas se sacrifican por decapitación, se abre el cráneo y se extrae el cerebro. Posteriormente, se separan los hemisferios y se transfieren a una placa Petri con medio Nutrient Mixture F12 y, bajo una lupa, se eliminan las meninges y se extrae el hipocampo. A continuación, se fragmenta el hipocampo y se transfiere a un tubo eppendorf el cual contiene una solución de papaína (20 u/mL) previamente activada y filtrada, donde el tejido extraído se digiere enzimáticamente, lo cual requiere de una incubación durante 30 min a 37 °C. Tras 15 min de incubación, se añade ADNasa I (concentración final 50 µL/mL) y, transcurridos 15 min de incubación, los fragmentos de hipocampo se transfieren a un tubo cónico de 11 mL donde se lavan con medio de cultivo Neurobasal 3 veces. A continuación, con una pipeta de 5 mL, se disocia de forma mecánica para obtener una suspensión celular formada por glías y neuronas. Posteriormente, las células se centrifugan a 160 g durante 4 min, se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 900 µL de medio Neurobasal y 100 µL de suero de caballo (HS). Finalmente, estas células se siembran a una densidad de 30.000 células/mL sobre cubreobjetos (de 12 mm de diámetro) colocados en placas Nunc de 4 pocillos con 500 µL de Neurobasal por pocillo. Cabe destacar, las células se siembran sobre el propio medio en el que están inmersos estos cubreobjetos con el fin de que estas acaben adhiriéndose a estos. Respecto a los cubreobjetos, estos son cristales los cuales han sido previamente pretratados con poli-D-lisina (1 mg/mL) y almacenados en placas Nunc de 4 pocillos con 500 µL de Neurobasal por pocillo para su preservación hasta el sembrado de las células (Figura 55).

En cuanto al mantenimiento de estos cultivos, las células se mantienen en medio Neurobasal suplementado con L-Glutamina (1 mM), gentamicina (1 µg/mL), 2 % B27 y 10 % FBS de 6 a 21 días *in vitro* (DIV) según la condición experimental, sin cambios de medio, en un incubador a 37 °C y 5 % de CO₂. En particular, los cultivos incubados entre 6-8 DIV se consideran jóvenes, mientras que los que se cultivan entre 18-21 DIV envejecidos. La Figura 55 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** (Figura 55) muestra de forma esquematizada el protocolo de obtención del cultivo de hipocampo.

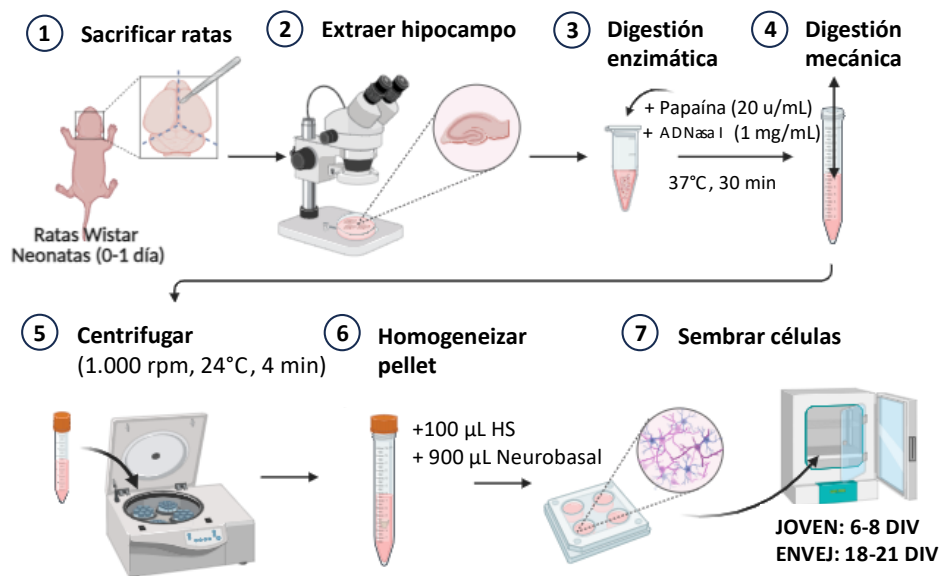


Figura 55. Protocolo de obtención de cultivos primarios de células de hipocampo de ratas neonatas (0-1 día). 1. Se sacrifican las ratas por decapitación. 2. Se extrae el hipocampo con ayuda de una lupa. 3. El tejido de hipocampo se somete a una digestión enzimática con papaína (20 u/mL) y ADNasa I (1mg/mL) a 37 °C durante 30 min. 4. Con ayuda de una pipeta, se digiere mecánicamente. 5. La suspensión celular se centrifuga a 160 g, 24 °C durante 4 min. 6. El pellet resultante se resuspende en 100 µL de HS y 900 µL de Neurobasal. 7. Las células se siembran en cubreobjetos previamente tratados con poli-D-lisina y se mantienen en el incubador a 37 °C y 5 % CO₂ durante diferentes periodos, entre 6-8 DIV lo que se considera cultivos jóvenes y entre 18-21 DIV cultivos envejecidos.

2.1.2 Modelo de Enfermedad de Alzheimer

Como modelo de la enfermedad de Alzheimer se han tratado los cultivos primarios mixtos de hipocampo de rata neonata con el péptido amiloide A β ₁₋₄₂. Este péptido se ha preparado según el protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio por Caballero, E. (Caballero et al., 2016) el cual, a su vez, se ha basado en protocolos descritos anteriormente por Klein (Klein, 2002), Fa, Orozco et al. (Fa et al., 2010), Itkin, Dupres et al. (Itkin et al., 2011) y Wisniewski, Hwang et al (Wisniewski et al., 2011). En concreto, el A β ₁₋₄₂ liofilizado comercial, almacenado a -20 °C, se mantiene durante 30 min a temperatura ambiente y se disuelve a concentración de 1 mM en ácido hexafluoroisopropanoico (HFIP). La solución resultante se reparte en 3 tubos eppendorfs no siliconados, se sellan con parafilm y se mantienen durante 2 h a temperatura ambiente para conseguir la disolución completa del A β ₁₋₄₂. Posteriormente, se evapora el ácido en una centrifuga de vacío (SpeedVac SPD111V) durante 15 min, obteniéndose una película transparente en el fondo del eppendorf. A continuación, el péptido se resuspende en DMSO a una concentración de 5 mM y se lleva a un baño de ultrasonidos durante 10 min. La solución resultante se alícuota en eppendorfs no siliconados y se almacenan a -20 °C hasta su uso (Figura 56).

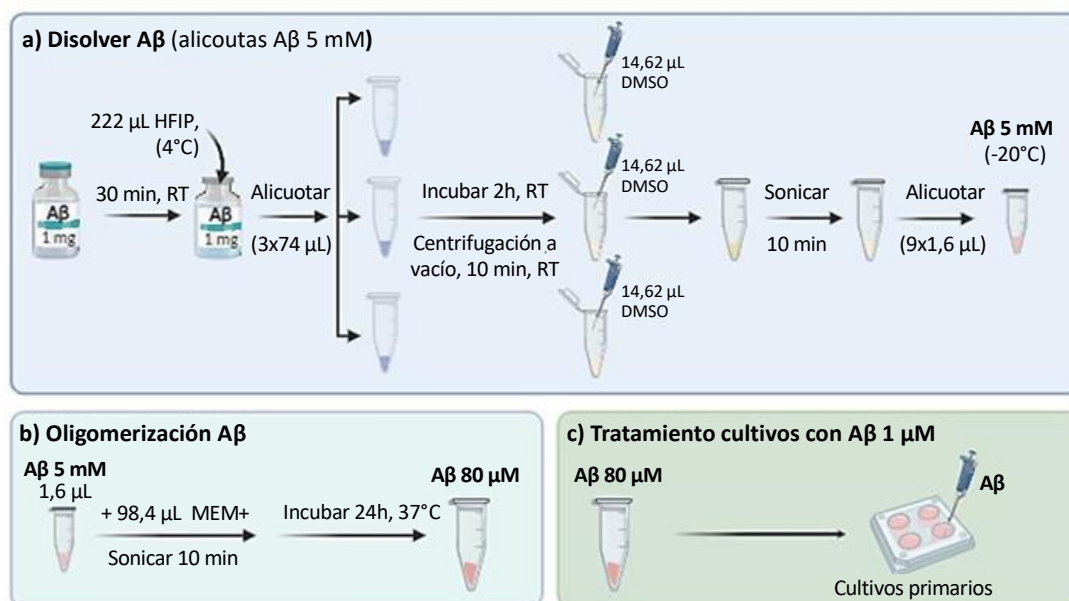


Figura 56. Protocolo de preparación de los oligómeros del péptido β-amiloide. Disolución de Aβ₁₋₄₂ (a), oligomerización del Aβ (b) y tratamiento de los cultivos primarios con Aβ 1 μM (c).

Para el estudio del efecto de los oligómeros de Aβ en neuronas de hipocampo se preparan los oligómeros según lo descrito anteriormente y, a partir de las alícuotas de Aβ₁₋₄₂ 5 mM, se diluyen el día previo al tratamiento en medio MEM (suplementado con Fe²⁺ 0,5 mg/mL, Zn²⁺ 0,5 mg/mL, Cu²⁺ 0,0013 mg/mL). En concreto, se obtiene una concentración de Aβ₁₋₄₂ 80 μM que, posteriormente, se lleva a un baño de ultrasonidos durante 10 min y, después, se incuba a 37 °C y 5 % CO₂ durante 24 h para permitir la oligomerización completa. Transcurrido este tiempo, los oligómeros se diluyen en el propio medio de cultivo de las células (Neurobasal suplementado con 2 % B27 y 10 % FBS) con el fin de obtener una concentración final de Aβ₁₋₄₂ 1 μM. Finalmente, estos se incuban durante 24 h a 37 °C y 5 % CO₂. La condición control se expone únicamente al vehículo, es decir con el medio MEM, realizando todos y cada uno de los pasos anteriores de forma paralela a excepción del uso de Aβ₁₋₄₂.

2.1.3 Modelos de tumores cerebrales humanos

Como modelos de diferentes tumores cerebrales humanos se emplearon cultivos primarios obtenidos a partir de muestras de tejido tumoral cerebral humano proporcionados por el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario Río Hortega (HURH) de Valladolid. El diagnóstico anatómico-patológico se realiza en el propio hospital por el servicio de anatomía patológica. Además, de cada uno de los pacientes se recogen datos clínicos como diagnóstico, grado del tumor, edad y sexo del paciente.

Inmediatamente tras su resección, el tejido tumoral se traslada, en condiciones de esterilidad y fresco, hasta el laboratorio ubicado en el IBGM donde será procesado. El protocolo de obtención del cultivo celular es similar al descrito en el apartado “2.1.1. Modelo de envejecimiento neuronal” para el cultivo primario neuronas de hipocampo, pero con alguna ligera modificación. Específicamente, la muestra se lava en medio HBSS + 0,6 % BSA y se fragmenta con ayuda de unas pinzas y un bisturí. Seguidamente, parte de la muestra se congela para futuros experimentos, bien en N₂ líquido y/o en la solución comercial *RNAlater* de Invitrogen. En el caso de preservar la muestra en la solución de estabilización del ARN, *RNAlater*, es necesario embeber

la muestra en la solución durante al menos 24 h a 4 °C y, una vez transcurrido este tiempo, retirarla el medio en exceso y congelarla a -80 °C.

El resto de muestra se procesa para la obtención de cultivos primarios. En primer lugar, la muestra se fragmenta y se transfiere a una solución de papaína previamente filtrada y activada, incubándola durante 30 min a 37 °C y 5 % CO₂. Pasados 15 min, se añade ADNasa I y se incuba durante 15 min. A continuación, se transfiere a un tubo cónico de 11 mL el cual contiene 4 mL de medio DMEM 4,5 g/L glucosa, tubo en el que la muestra se digieren mecánicamente con ayuda de una pipeta. Posteriormente, se filtra a través de un filtro de Nylon de 40 µm, de tal manera que la suspensión celular resultante se centrifuga durante 4 min a 160 g. El pellet de células que se obtiene es resuspendido cuidadosamente en medio DMEM 4,5 g/L glucosa. Tras medir la densidad celular en cámara Neubauer, éstas se siembran en gota a una densidad de 30.000 células/mL sobre cubreobjetos (de 12 mm de diámetro). Estos cubreobjetos, previamente al sembrado, han sido tratados con poli-L-lisina y colocados en placa Nunc de 4 pocillos. Posteriormente, las placas con los cubreobjetos, ya sembrados, se mantienen en el incubador a 37 °C y 10 % CO₂. Trascurridos 30 minutos, se adiciona medio de cultivo en los pocillos, 500 µL de DMEM 4,5 g/L glucosa suplementado con 1 % de P/S y 10 % FBS y se mantienen en el incubador a 37°C y 10 % CO₂ (Figura 57).

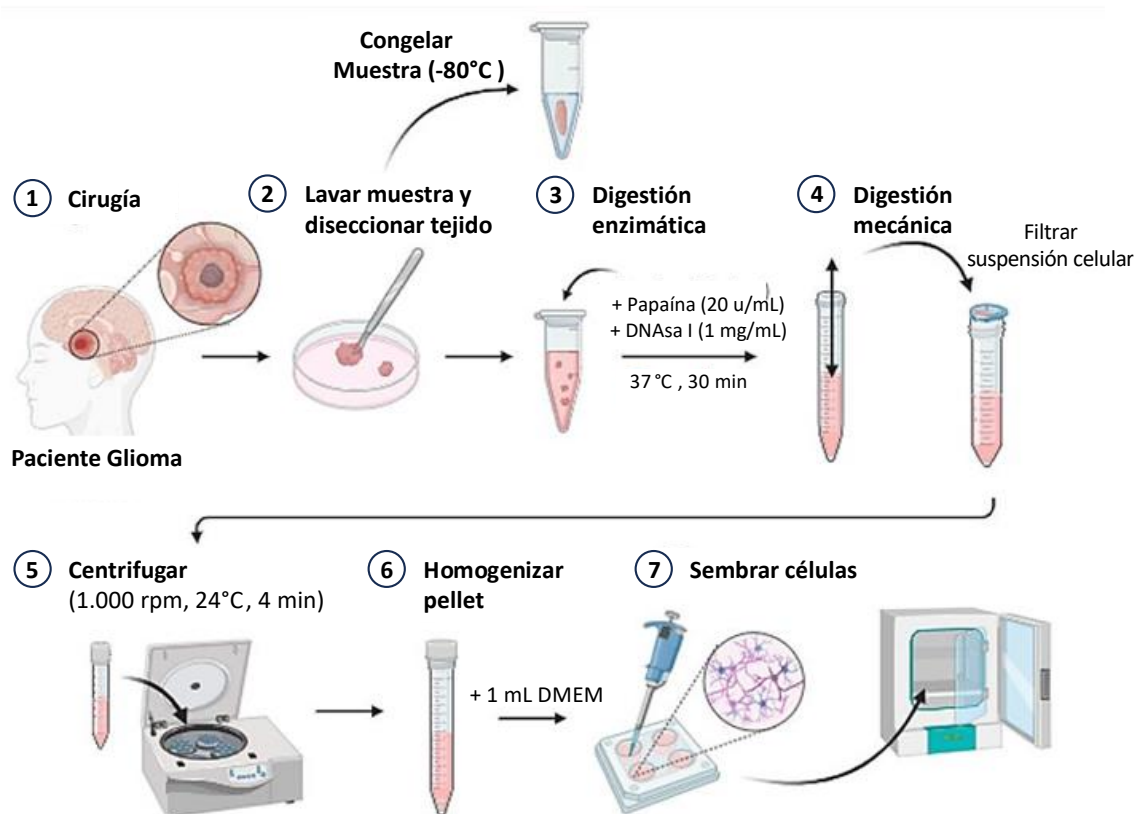


Figura 57. Protocolo para la obtención de cultivos primarios a partir de muestras de tumores cerebrales humanos. 1. Mediante cirugía, se extirpa el tumor. 2. Ya en el laboratorio, la muestra se lava en medio de cultivo y se disecciona. Parte de esta se preserva en solución *RNAlater* y se congela a -80 °C para futuros experimentos. La muestra restante se procesa para la obtención de cultivos primarios. 3. La muestra se somete a una digestión enzimática con papaína (20 u/mL) y ADNasa I (1 mg/mL) a 37 °C durante 30 min. 4. Con ayuda de una pipeta, se digiere mecánicamente y se filtra con un filtro de Nylon de 40 µm. 5. La suspensión celular resultante se centrifuga a 160 g, 24 °C durante 4 min. 6. El pellet obtenido se homogeniza en 1 mL de DMEM 4,5 g/L glucosa + 10 % FBS. 7. Las células se siembran en cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina y se mantienen en el incubador a 37 °C y 10 % CO₂.

2.2 Medida de la concentración de calcio citosólico

Para las medidas de la concentración de calcio citosólico $[Ca^{2+}]_{cit}$ y los cambios en ella, se ha recurrido a la técnica de imagen de fluorescencia de Ca^{2+} , pues permite monitorizar dichos cambios en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ a nivel de célula única. Estos cambios se detectan gracias al empleo de sondas fluorescentes de Ca^{2+} . En concreto, como sonda de Ca^{2+} se ha empleado la molécula penta-acetosimetilester de Fura-2 (Fura-2/AM), desarrollada por Roger Tsien en la década de los 80, la cual es una de las sondas fluorescentes más empleadas. Esta se trata de un derivado del quelante de alta afinidad por Ca^{2+} , el EGTA, al que se ha dotado de restos aromáticos le confieren propiedades fluorescentes y que, debido a su carácter hidrofóbico, es capaz de atravesar la membrana plasmática. Una vez en el interior celular, es hidrolizado por esterasas intracelulares las cuales escinden el grupo AM. De esta manera, se libera la molécula de Fura-2 que, debido a su carácter hidrofílico y a su gran tamaño, quedará retenida en el interior celular (Grynkiewicz et al., 1985).

Una característica que hace muy interesante al Fura-2 es que ratiométrico. Es decir, su espectro de excitación presenta dos máximos, un máximo a 340 nm para su forma complejada, Fura-2- Ca^{2+} , y un máximo a 380 nm para su forma libre de Ca^{2+} , Fura-2. En consecuencia, un aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ se corresponde con un aumento de la intensidad de fluorescencia excitada a 340 nm y una disminución de la fluorescencia excitada a 380 nm, y viceversa. De esta manera, es posible estimar la $[Ca^{2+}]_{cit}$ mediante el cociente de fluorescencia excitadas a 340/380 (Figura 58). Es importante remarcar que esta propiedad ratiométrica permite corregir variables no controlables o artefactos tales como espesor celular, el colorante acumulado en el interior celular o fluctuaciones en la intensidad de luz de excitación de la lámpara, entre otros. Esto se debe a que tales artefactos afectan por igual a la fluorescencia de ambas longitudes de onda y, al hacer el ratio, se corrigen.

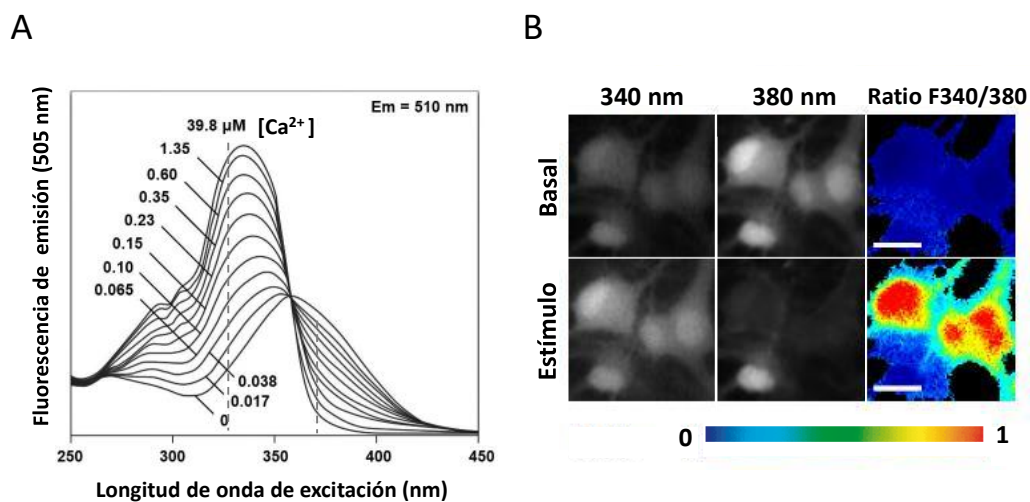


Figura 58. Medida de la concentración de Ca^{2+} en célula única mediante la sonda Fura-2/AM. **A.** Espectro de excitación del Fura-2. La gráfica muestra la emisión de fluorescencia de la molécula de Fura-2 a 505 nm cuando es excitado con longitudes de onda entre 300 y 400 nm. Medidas realizadas con Ca^{2+} libre a concentraciones entre 0 μM y 39,8 μM , 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 $[Ca^{2+}]_{cit}$ aumenta la fluorescencia a 340 nm y disminuye a 380 nm. Modificado de (Grynkiewicz et al., 1985). **B.** Imagen de fluorescencia de Ca^{2+} de neuronas cargadas con Fura-2/AM y excitadas a 340 y 380 nm, así como la ratio F340/F380 codificado en pseudocolor en situación de reposo (basal) y tras la estimulación (estímulo).

Para llevar a cabo los experimentos, los cultivos se mantienen en el incubador durante diferentes tiempos hasta su uso. Se incuban con la sonda ratiométrica Fura-2/AM 4 μM en MEC durante 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras la incubación, los cubreobjetos se colocan sobre la cámara de perfusión termostatzada a 37 °C de un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert S100 TV). Además, el microscopio cuenta con un sistema de perfusión (Warner Instruments, Hamden CT) que permite estimular a las células con el medio deseado. Durante el experimento, las células se mantienen perfundidas con MEC precalentado a 37 °C y, además, se excitan alternativamente con luz fluorescente a 340 nm y 380 nm mediante una rueda de filtros (Sutter Instruments, Novato, CA) sincronizada a la fuente de excitación halógena (Zeiss X-Cite Series 120). La fluorescencia emitida a 505 nm es recogida a través de un objetivo 40x de inmersión en aceite (Zeiss 40 y apertura numérica 1,30); esta fluorescencia atraviesa un espejo dicróico que refleja longitudes de onda superiores a 520 nm de tal manera que deja pasar las de menor longitud de onda. Finalmente, la fluorescencia se captura cada 5 segundos mediante una cámara digital Orca ER de Hamamatsu Photonics, (Hamamatsu, Japón). Evidentemente, en las imágenes de fluorescencia capturadas se seleccionan las regiones de interés (ROI); es decir, cada una de las células, de tal manera que las variaciones temporales de fluorescencia registradas para cada ROI se cuantifican mediante los softwares AquaCosmos 2.0 (Hamamatsu) y Origin 7.

2.2.1 Imagen de Ca^{2+} en cultivos de hipocampo: SOCE

Para llevar a cabo los análisis funcionales en los cultivos de neuronas de hipocampo, se empleó la técnica de imagen de Ca^{2+} con el fin de evaluar el remodelado de este ion en el modelo de envejecimiento neuronal y enfermedad de Alzheimer. En concreto, se llevaron a cabo experimentos en los que se evaluó la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE). No obstante, los experimentos realizados en el modelo de envejecimiento difieren ligeramente de los experimentos realizados en el modelo de Alzheimer. Por un lado, se evaluó SOCE de forma conjunta en los modelos de envejecimiento y Alzheimer y, por otro lado, la posible reversión de SOCE en el modelo de envejecimiento. Por ello, a continuación, se exponen los procedimientos llevados a cabo en cada modelo.

2.2.1.1 Estudio de SOCE en el envejecimiento neuronal y en enfermedad de Alzheimer

En primer lugar, las neuronas de hipocampo se incuban con Fura-2/AM 4 μM durante 1 h en oscuridad, tanto los cultivos jóvenes, 6-8 DIV, como los envejecidos, 18-21 DIV, tratados y sin tratar, 24 h antes, con $\text{A}\beta_{1-42}$. A continuación, se incuban durante 15 min con tapsigargina (Tg) 1 μM , un inhibidor irreversible de la SERCA, en medio libre de Ca^{2+} ($\text{Ca}0$). De esa forma, se induce el vaciado de Ca^{2+} del RE y se impide el rellenado. Finalmente, el cubreobjeto se coloca en el microscopio de imagen de fluorescencia para registrar los cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ debidos a la activación de SOCE que tiene lugar tras el vaciado de los depósitos. Inicialmente, se perfunde $\text{Ca}0$ en presencia de Tetrodotoxina (TTX 1 μM), inhibidor selectivo de los canales VOC de Na^+ dependientes de voltaje con el fin de impedir la propagación de potenciales de acción y evitar la entrada de Ca^{2+} a través de otros canales de la membrana plasmática. Posteriormente, tras 6 min de perfusión (y registro de la fluorescencia), se añade Ca^{2+} al medio, lo que permite revelar el mecanismo de entrada de Ca^{2+} denominado SOCE.

2.2.1.2 Estudio de SOCE y el efecto de MDEB en el modelo de envejecimiento

El procedimiento seguido para el estudio de SOCE y los efectos del agonista MDEB fue similar al seguido en el estudio de SOCE en los modelos de envejecimiento y Alzheimer. Así, en primer lugar, las neuronas de hipocampo se incuban con Fura-2/AM 4 μM durante 1 h en oscuridad, tanto los jóvenes, 6-8 DIV, como los envejecidos, 18-21 DIV. A continuación, se incuban durante 15 min con tapsigargina (Tg) 1 μM en medio libre de Ca^{2+} , inhibidor irreversible de la SERCA. De esa forma, en medio en Ca^{2+} 0 mM se produce el vaciado de Ca^{2+} del RE y se impide el rellenado. Finalmente, se coloca el cubreobjeto en el microscopio de imagen de fluorescencia para registrar los cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ debidos a la activación de SOCE que tiene lugar tras el vaciado de los depósitos. Para ello, se perfunde medio libre de Ca^{2+} en presencia de un coctel de inhibidores de canales (CIC), (Ca^{2+} 0 mM) con el fin de evitar la entrada de Ca^{2+} a través de otros canales de la membrana plasmática. Específicamente, CIC se compone de nifedipina (5 μM), inhibidor selectivo de los canales VOCC tipo L; tetrodotoxina (TTX 1 μM), inhibidor selectivo de los canales de Na^{+} dependientes de voltaje; D-AP5 (10 μM), inhibidor de los receptores tipo NMDA (NMDAR), y CNQX (10 μM), inhibidor de los receptores tipo AMPA (AMPA). Tras 6 min de perfusión (y registro de la fluorescencia), se añade Ca^{2+} al medio, lo que permite revelar el mecanismo de entrada de Ca^{2+} denominado SOCE. Cabe destacar que en este experimento hay dos condiciones: control, en la que se perfunden las células con Ca^{2+} con CIC, y experimental, donde esta última se perfunde, además, con MDEB 1 mM.

2.2.2 Imagen de Ca^{2+} en cultivos primarios de tumores cerebrales

Del mismo modo que para los cultivos primarios mixtos de hipocampo ratas neonatas, en los cultivos primarios de muestras de tumores cerebrales humanos también se ha utilizado la técnica de imagen de Ca^{2+} para evaluar la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y SOCE, así como para caracterizar la respuesta a diferentes agonistas.

2.2.2.1 Contenido de los depósitos Intracelulares de Ca^{2+} y SOCE

Para evaluar el contenido en Ca^{2+} del RE en los cultivos primarios de tumores cerebrales, estos se siembran en cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina. Entre las primeras 24-48 h tras la obtención del cultivo primario, las células se incuban con la sonda Fura-2/AM (4 μM , 1 h) y el cubreobjetos se coloca en la cámara de perfusión del microscopio. Así, para estudiar el tamaño de los depósitos de Ca^{2+} , se monitoriza el incremento de la concentración de Ca^{2+} inducido por el ácido ciclopiazónico (CPA), un inhibidor reversible de SERCA, en medio libre de Ca^{2+} . Inicialmente, se perfunde medio libre de Ca^{2+} (Ca^{2+} 0 mM) en presencia de CPA (10 μM), lo que induce la liberación de Ca^{2+} desde el RE y, a continuación, para revelar SOCE, se añade Ca^{2+} al medio.

2.2.2.2 Respuesta del Ca^{2+} a diferentes agonistas

También se estudió la respuesta a diferentes agonistas de las células de los cultivos primarios de tumores cerebrales. Para ello, estos cultivos, 24-48 h tras su obtención, se incuban con la sonda Fura-2/AM durante 1 h. A continuación, en un microscopio de fluorescencia, se registran los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducidos tras la estimulación de las células con diferentes agonistas: ATP 100 μM , K^{+} 75 mM y NMDA 100 μM .

2.2.3 Análisis de datos de imagen de Ca^{2+}

En cuanto al análisis de datos llevado a cabo en los experimentos de imagen de Ca^{2+} , es importante tener en cuenta que estos presentan una estructura jerárquica o multinivel que hace inviable hacer uso de los modelos lineales, ANOVA o contrastes de t habituales con el fin de evaluar la significación de las variables explicativas o de los tratamientos de interés. En particular, esto se debe a que este tipo de análisis supone que los datos o las observaciones son todas independientes; es decir, que no están correlacionadas, hecho que no se cumple en los datos de imagen de calcio.

Los datos de imagen muestran una estructura jerárquica o multinivel que agrupa las observaciones de tal manera que existe una estructura de correlación un tanto compleja entre ellas. Por un lado, en un mismo día se evalúan todas las posibles condiciones experimentales o tratamientos. A su vez, esto se replica en diferentes días, por lo que todas las observaciones de un mismo día están correlacionadas entre sí. Además, para cada una de las condiciones experimentales se pueden emplear, en un mismo día, uno o varios cubreobjetos (o cristales) de tal modo que todas las células de un mismo cristal también estarán correlacionadas entre sí. Por lo tanto, se puede observar cómo, claramente, existe una estructura de correlación con cierto carácter jerárquico. Por lo tanto, hay que desechar la estrategia de emplear los modelos o análisis más habituales basados en la independencia de las observaciones y recurrir a métodos más complejos que tienen en cuenta dicha estructura de correlación cuando hay datos agrupados y/o con estructura jerárquica: los modelos lineales mixtos.

Estos modelos lineales mixtos tienen una parte fija correspondiente a las variables explicativas de interés (tratamientos) y otra parte aleatoria correspondiente, en este caso, a los grupos que se forman y que dan lugar a los datos agrupados/jerárquicos correlacionados entre sí: el efecto del día y el efecto del cristal, ambos efectos aleatorios. No obstante, aunque en estos modelos es posible obtener p valores para cada uno de los tratamientos o para cada una de las comparaciones dos a dos de interés, existe cierta limitación dado que no se conoce exactamente la distribución de probabilidad que siguen los coeficientes de estos modelos. Por ello, se hace necesario combinar la información obtenida de los contrastes de hipótesis con lo que se conoce como el Criterio de Akaike (AIC). Este permite evaluar, sin realizar ningún contraste de hipótesis, si una variable explicativa (tratamiento, tiempo...) es capaz de explicar parte de la variabilidad de la variable dependiente (ratio de fluorescencia), algo similar a lo que haría un contraste de hipótesis, de tal manera que, si el valor de AIC indica que una variable explicativa ha de estar en el modelo, esto podría asemejarse a decir que una variable es significativa en el contexto del contraste de hipótesis.

2.3 Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia permite la detección y localización de una variedad de antígenos en diferentes tipos de preparaciones, tejido o cultivos celulares, utilizando como base la unión específica antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos son específicos y de alta afinidad para un determinado antígeno. Además, los anticuerpos se conjugan con sustancias que permiten su posterior detección, como sustancias fluorescentes. Para detectar la fluorescencia y, por tanto, la expresión de antígenos, las muestras marcadas se estudian bajo el microscopio.

Los cultivos de hipocampo son cultivos mixtos pues están formados por más de un tipo celular: neuronas y glías. Dado que nuestro interés se centra en la respuesta de las neuronas, es totalmente necesario diferenciar en el cultivo las neuronas de las glías. Por ello, con el fin de identificar ambos tipos celulares, se realiza una doble inmunofluorescencia (Figura 59). Para ello,

las células sembradas en cubreobjetos se fijan con paraformaldehído (PFA) al 4 % en una solución de tampón fosfato (PBS) durante 20 min. Tras lavar las células con PBS, se permeabilizan tratándolas con Tritón x-100 al 0,1 % durante 10 min. Previo a incubar las células con los anticuerpos, es necesario bloquear los sitios de unión inespecíficos. Para tal fin, las células se incuban en suero de cabra (GS) al 20 % durante 10 min. A continuación, los cultivos celulares se incuban durante 1 h con anticuerpos primarios específicos para cada tipo celular previamente preparados en PBS con 10 % GS, en dilución 1:300 (Figura 59, Tabla 7).

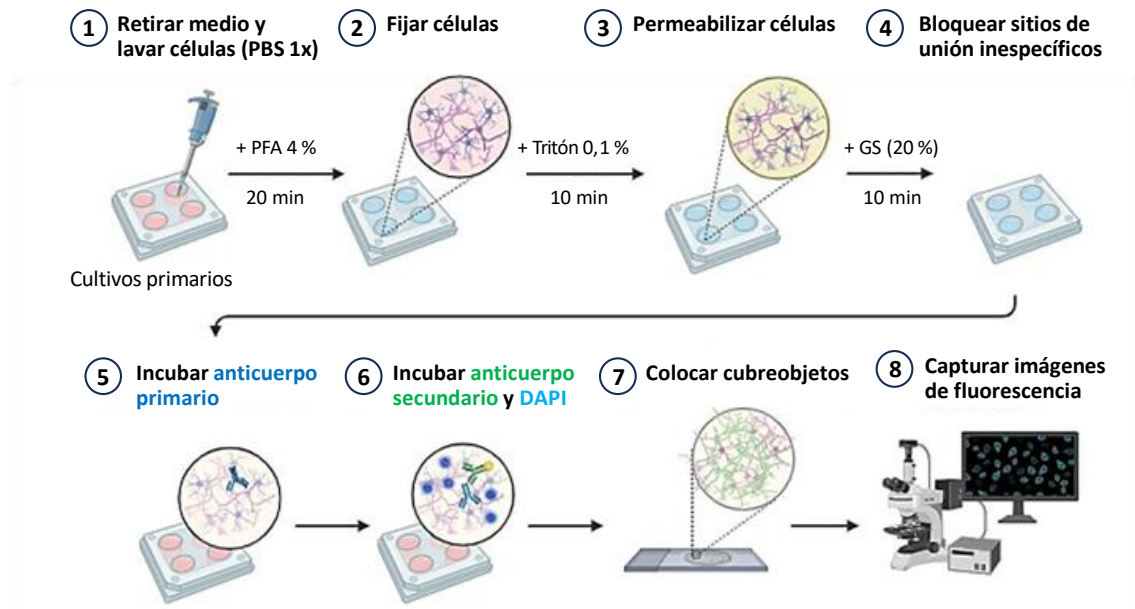


Figura 59. Protocolo de Inmunofluorescencia. 1. Se retira el medio de cultivo y se lavan las células con PBS 1x. 2. Las células se fijan con PFA 4% durante 20 min. 3. Se permeabilizan las células con una solución de tritón al 0,1 % en PBS 1x durante 10 min. 4. Se bloquean posibles sitios de unión inespecíficos, para lo que se incuban las células con suero de cabra al 20 % durante 10 min. 5. Se incuban el anticuerpo primario (el tiempo de incubación y la concentración de este depende del anticuerpo utilizado). 6. Las células se incuban con el anticuerpo secundario, el cual emite fluorescencia y se marcan los núcleos con DAPI. 7. Los cubreobjetos se colocan sobre el portaobjetos. 8. Se capturan imágenes en microscopio de fluorescencia, las cuales posteriormente se analizan mediante el *software Image J*.

Para identificar de las neuronas se detecta la proteína específica del citoesqueleto de neuronas, la proteína β -tubulina, por lo que se emplea un anticuerpo primario anti- β tubulina III de ratón (α IgG β -tubulina III). La identificación de las glías se lleva a cabo detectando la expresión de la proteína fibrilar ácida (GFAP), proteína que se expresa en glías, pero no en neuronas, para lo que se emplea un anticuerpo de conejo α -IgG GFAP. Finalizada la incubación de los anticuerpos primarios, las células se lavan en PBS y se incuban durante 1 h en oscuridad con los anticuerpos secundarios, anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), que emite fluorescencia verde, y anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Flúor 594, que emite fluorescencia roja. El marcaje de los núcleos se realiza incubando 5 min con DAPI, en dilución 1:5000 en PBS con 10 % GS. Por último, los cubreobjetos se colocan sobre un portaobjetos y se sellan con medio de montaje (50 % glicerol en PBS) para, finalmente, detectar la fluorescencia en un microscopio de fluorescencia.

Tabla 7. Anticuerpos y diluciones usados para la identificación de neuronas y glías mediante Inmunofluorescencia.

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

Esta técnica también se ha utilizado para la detección de las diferentes isoformas del receptor de IP_3 (IP_3R1 , IP_3R2 e IP_3R3) en cultivos primarios de neuronas de hipocampo siguiendo el mismo protocolo anteriormente indicado para la identificación de neuronas y glías en los cultivos de hipocampo, a excepción de los anticuerpos que, en este caso, sus epítomos serán regiones concretas de cada una de las isoformas de estos receptores (Tabla 8).

Tabla 8. Anticuerpos y diluciones empleados en la detección de las isoformas del IP_3R .

Isoforma	Anticuerpo Primario	Dilución Anticuerpo Primario	Anticuerpo Secundario	Dilución Anticuerpo Secundario
IP_3R1	Anti-IgG IP_3R1	1:50	IgG Cabra Alexa Flúor 488	1:300
IP_3R2	Anti-IgG IP_3R2	1:50	anti-IgG Cabra Alexa Flúor 488	1:300
IP_3R2	Anti-IgG IP_3R3	1:50	anti-IgG Ratón Alexa Flúor 594	1:300

2.4 Medida de la liberación de Ca^{2+} con IP_3 enjaulado

El IP_3 enjaulado (*caged IP_3*) es una forma inactiva del segundo mensajero IP_3 . Consiste en una molécula biológicamente activa, IP_3 , que lleva unido en su grupo 6-hidroxilo un grupo nitrodimetoxibencilo mediante un enlace fotolábil, enlace que le impide ejercer su actividad biológica. Además, con el fin de que la molécula pueda atravesar la membrana plasmática los grupos fosfatos están protegidos por un grupo propionoximetilo (PM) unido por un enlace éster. De este modo el *caged IP_3* atraviesa la membrana plasmática, y una vez en el interior celular, las esterasas rompen el enlace éster que une a la molécula con los grupos PM.

Lo interesante de esta molécula es que permite “elegir” cuándo el IP_3 actúa. En concreto, cuando esta molécula, el *caged IP_3* , ha alcanzado el interior celular, si se ilumina con un láser de, aproximadamente, 400 nm se produce la fotólisis de esta y, en consecuencia, se libera la molécula biológicamente activa IP_3 la cual, ahora sí, es capaz de unirse a los receptores de IP_3 (IP_3R) induciendo la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . De esta forma, es posible obtener, casi de inmediato, una gran cantidad de IP_3 en el citosol independientemente de la activación de un receptor de la membrana plasmática o de la PLC correspondiente, lo que conlleva la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos simulando una estimulación fisiológica de los IP_3R (Figura 60).

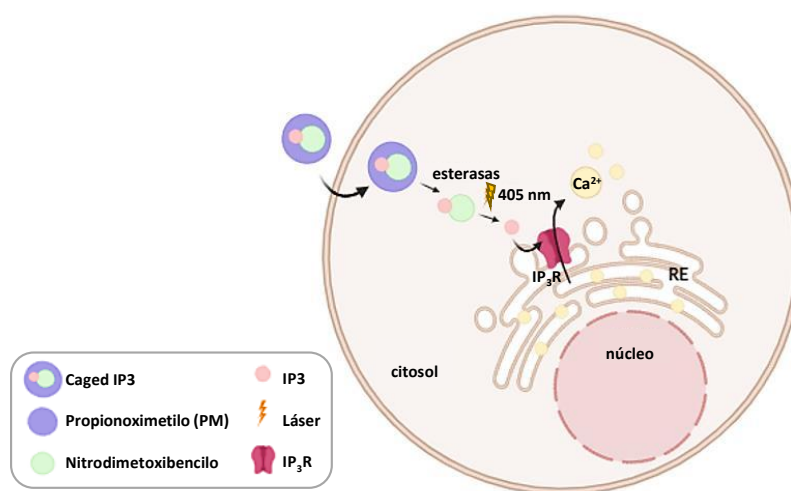


Figura 60. Mecanismo de molecular del *caged IP₃*. Debido a su hidrofobicidad, este compuesto es capaz de atravesar la membrana plasmática y alcanzar el citosol celular de manera que, tras la acción de las esterasas celulares se libera el propionoximetilo (PM) y, tras hacer incidir un láser a 405 nm, se libera la molécula de IP₃, capaz de activar los IP₃R y, en consecuencia, liberar Ca²⁺ desde el RE.

El registro del experimento se lleva a cabo en un microscopio confocal Leica TCS SP5X (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania) el cual permite controlar parámetros como el tiempo de incisión, la intensidad del láser o el plano xyz donde incide, entre otros (Tabla 9). El cambio en la [Ca²⁺]_{cit} que tiene lugar se detecta con la sonda fluorescente Fluo-4/AM la cual se excita a 494 nm y emite a 506 nm cuando une Ca²⁺.

Los cultivos de neuronas de hipocampo se siembran en placas Petri con fondo de cristal y se mantienen en el incubador diferentes periodos de tiempo hasta su uso; es decir, hasta que el cultivo se considere joven (6-8 DIV) o envejecido (19-21 DIV). El día previo al experimento, los cultivos se tratan con Aβ₁₋₄₂ 1 μM durante 24 h. Posteriormente, las células se incuban con *caged IP₃* 3 μM y Fluo-4/AM 2 μM durante 1 h en MEC a temperatura ambiente. Una vez cargadas las células, se realizan 3 lavados con MEC y, a continuación, se añaden 2 mL de MEC con un coctel de inhibidores (CIC: TTX μM, CNQX 10 μM, D-AP5 10 μM, Nifedipina 5 μM). Finalmente, se registra el experimento en el microscopio confocal Leica TCS SP5X usando el objetivo de 63x de aceite. El protocolo y los parámetros para el registro del experimento utilizados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 9):

Tabla 9. Parámetros establecidos para el registro de *caged IP₃*

Modo		Fly mode	
Tamaño		512x512	
Frecuencia		400 Hz	
Protocolo de Registro	Etapas	Láser (λ)	Numero frames
	Pre-Bleach	Ar, 490 nm	10 frames (2,586 s/frames)
	Bleach	Diodo, 405 nm	2 frames (2,586 s/frames)
	Post-Bleach	Ar, 490 nm	50 frames (2,586 s/frames)

2.5 Colocalización retículo-mitocondria

Las neuronas cultivadas entre 6-8 DIV, jóvenes, y 18-21 DIV, envejecidas, ambas expuestas a $A\beta_{1-42}$ 1 μ M durante 24 h, se lavan en PBS. Seguidamente, con el fin de marcar las mitocondrias y el retículo, se incuban de forma simultánea con las sondas fluorescentes, MitoTracker Green 200 nM y ERTracker Red 200 nM, respectivamente durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. De esta manera, dichas sondas permiten marcar las mitocondrias en verde y el retículo en rojo. Inmediatamente tras la tinción, y empleando el microscopio confocal Leica TCS SP5, se registran imágenes en vivo de fluorescencia independientes para cada canal. Para ello, se hace incidir el láser a 488 nm y a 543 nm, lo que excita la sonda MitoTracker Green y ERTracker Red, respectivamente. Las imágenes de fluorescencia se capturan con el software LAS AF Lite (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). El fondo se corrige en todas las imágenes y se analiza la colocalización de los dos marcadores en célula única en todos los planos a lo largo del eje Z capturados cada 0,8 μ m. Finalmente, se calculan los coeficientes de colocalización *Pearson* y *Manders2* con el plugin Análisis de Colocalización de *ImageJ*.

2.6 Estudio del potencial mitocondrial

El potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_{mit}$) se mide utilizando la sonda fluorescente éster metílico de la tetrametilrodamina (TMRM). Esta sonda, gracias a su solubilidad lipofílica y carga positiva, es capaz de atravesar la membrana plasmática y de acumularse en las mitocondrias, pues estos orgánulos se caracterizan, entre otras cosas, por su gran potencial negativo con respecto al citosol.

Las células, previamente sembradas en cubreobjetos y cultivadas diferentes periodos de tiempo, se exponen al tratamiento con $A\beta_{1-42}$ 1 μ M durante 24 h. Después, estas se lavan en medio MEC con Ca^{2+} 1 mM y se incuban con la sonda TMRM (10 nM) durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, los cubreobjetos se colocan en la cámara de perfusión de un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axiovert S100 TV con un objetivo de inmersión de aceite de 40x y, finalmente, se capturan imágenes de fluorescencia con la cámara Hamamatsu Orca-ER y filtro de rodamina.

2.7 Medida de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se forman como productos naturales del metabolismo celular y participan en la señalización celular de las células normales. El aumento de los niveles de ROS tiene efectos negativos sobre la homeostasis celular, estructura y funciones que conllevan un estrés oxidativo, lo que supone un factor de riesgo para diversas patologías

Los niveles intracelulares de ROS en neuronas de hipocampo se miden mediante imagen de fluorescencia con la sonda CM-H₂DCFDA. Esta sonda atraviesa las células y, una vez en el interior celular, las esterasas intracelulares escinden los grupos acetato, por lo que se libera su grupo clorometilo, grupo sensible a reaccionar con glutatión y otros tioles. La posterior oxidación produce un producto fluorescente el cual queda atrapado en el interior celular (Figura 61).

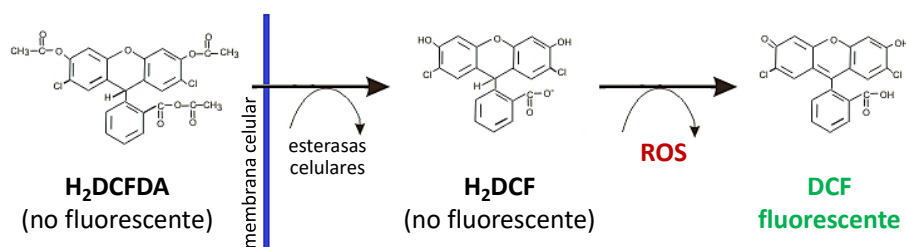


Figura 61. Actividad de la sonda CM-H₂DCFDA. Es una sonda no fluorescente y permeable la cual, una vez en el interior celular, las esterasas liberan los grupos acetato quedando así la molécula susceptible a la oxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS) y con capacidad de emisión fluorescente.

Así, las neuronas cultivadas a diferentes tiempos y expuestas a A β ₁₋₄₂ 1 μ M durante 24 h se incuban con la sonda CM-H₂DCFDA 2 μ M en medio extracelular (MEC) en presencia de Ca²⁺ 1 mM durante 40 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación, los cubreobjetos se colocan en una cámara de perfusión de un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axiovert S100TV y se iluminan con una lámpara halógena Zeiss X-Cite Serie 120 con filtro de FITC y, se capturan las imágenes de fluorescencia con una cámara de fluorescencia Hamamatsu ER-ORCA. Las imágenes resultantes se analizan con el software Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan).

2.8 Ensayo de proliferación celular

Las células procedentes de muestras de tejido tumoral se siembran en placas de 24 pocillos a una densidad de 15.000 células/pocillo y se mantienen en medio DMEM (DMEM 4,5 g/L glucosa + 10 % FBS) a 37 °C y 10 % CO₂. Transcurridas, 24 h, y sin haber adicionado ningún tratamiento, se mide la densidad celular a tiempo 0 (t₀). Para ello, las células del pocillo correspondiente se tripsinizan, se recoge una alícuota de 10 μ L y, en una cámara Neubauer, se cuentan las células de dicha muestra. A continuación, se añade al medio de cultivo los diferentes inhibidores de SOCE que se desean probar (BTP2 5 μ M, FCCP 1 μ M y la combinación de ambos). A las 24, 96 y 148 h, las células se cuentan por triplicado utilizando cámara Neubauer. Para estudiar las curvas de crecimiento de cada una de las condiciones experimentales y compararlas entre sí, se han empleado modelos lineales mixtos generalizados; en concreto, considerando que los datos siguen una distribución binomial negativa ya que esta distribución es adecuada cuando se tratan datos de conteo que pueden presentar sobredispersión, como es el caso. Para ello, mediante el software R y el paquete lmer4, se ha empleado la siguiente función:

$$\text{glmer.nb(ncell} \sim \text{btp2} * \text{fccp} * \text{t} + (\text{t} | \text{placa}), \text{data} = \text{datos})$$

donde las variables independientes de la parte fija del modelo son: btp2, tratamiento (Sí o No) con BTP2; fccp, tratamiento con FCCP (Sí o No), y t, el tiempo (tipificado) correspondiente a los días en los que se han medido las células. En cuanto a la parte aleatoria, se ha considerado que hay tanto interceptos aleatorios como una pendiente aleatoria debida al tiempo y que los datos se agrupan dentro de las placas tratadas en un mismo día. Cabe destacar que se han realizado 3 bloques; es decir, que se han realizado réplicas en 3 días diferentes y es eso, precisamente, la información que contiene el efecto aleatorio “placa”.

2.9 Extracción de ARN

En los siguientes subapartados se va a detallar cómo se ha realizado la extracción del ARN para el análisis transcriptómico según el experimento: por un lado, en los cultivos primarios mixtos de hipocampo de ratas neonatas, y, por otro lado, en los cultivos primarios de tejido tumoral cerebral humano.

2.9.1 Extracción de ARN de cultivos celulares de hipocampo de ratas neonatas

La extracción de ARN a partir de cultivos celulares primarios mixtos de ratas neonatas se realiza utilizando el kit de extracción *GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit de EURx* siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para ello, las células son sembradas en cubreobjetos de 12 mm pretratados con poli-D-lisina y mantenidos a diferentes DIV (6-8 DIV –cultivos jóvenes- y 18-21 DIV –cultivos envejecidos-) control y tratadas con A β_{1-42} 48 h (condición experimental). A continuación, las células se tripsinizan, se recogen y se centrifugan.

Posteriormente, se sigue el protocolo indicado por la casa comercial. En primer lugar, se lisan las células. Para ello, se añade un buffer en presencia de β -mercaptoetanol (β -Me) y, tras la adición del tampón de lisis, se produce la inactivación de las ARNasas. El lisado celular se transfiere a una columna de homogenización en la cual el ADN genómico queda retenido. A continuación, el eluido de la columna se transfiere a una columna de unión de ARN, columna que presenta una gran especificidad por el ARN. De esta manera, el ARN quedará retenido en la matriz de la columna. Posteriormente, se realizan una serie de lavados con distintas soluciones tampón o *buffers* para eliminar posibles contaminantes. Finalmente, el ARN se eluye de la columna mediante la adición de H₂O libre de ARNasas (Figura 62).

Una vez se extrae el ARN, este se cuantifica y su pureza es evaluada mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific, Waltham, MA) el cual emplea medidas de absorbancia a distintas longitudes de onda ($\lambda=230, 260$ y 280 nm). En concreto, para el estudio de microarrays utilizados, microarrays *Clariom D Rat*, la cantidad mínima de ARN requerida es de 100 ng y los parámetros de calidad ideales son $A_{260/280} \geq 1,8$ y $A_{260/230} \geq 1,5$. Otros parámetros para tener en cuenta son los parámetros de integridad $28S/18S \geq 1,2$ y el número de integridad del ARN (RIN) ≥ 7 , los cuales son evaluados con el *Bioanalyzer* de Agilent por el centro CABIMER que ha llevado a cabo el ensayo de los microarrays. Finalmente, las muestras de ARN se almacenan a -80 °C hasta su uso.

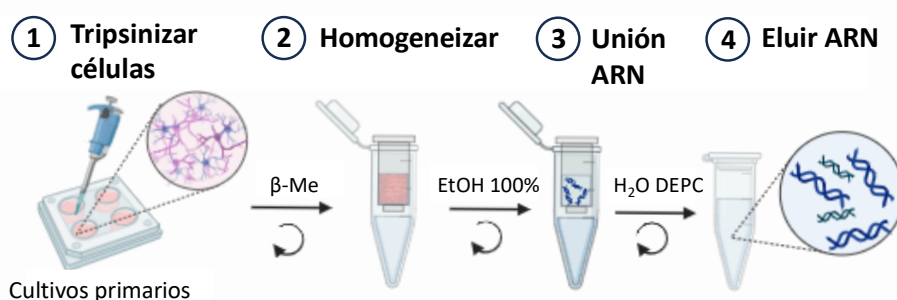


Figura 62. Protocolo de extracción de ARN a partir de cultivos primarios. 1. Las células se tripsinizan. 2. Se añade produce la lisis celular mediante la adición β -mercaptoetanol (β -Me). El lisado celular resultante se transfiere a una columna de homogenización en la cual queda retenido el ADN. 3. El eluido se añade sobre una columna que presenta una gran afinidad por el ARN, por lo que este quedará retenido en ella. 4. Finalmente el ARN se eluye tras la adición de H₂O y se cuantifica.

2.9.2 Extracción de ARN a partir de muestras de tejido tumoral

La extracción de ARN a partir de muestras de tejido tumoral cerebral se realiza en dos tipos de muestras. Por un lado, en 9 muestras de glioblastoma humano (GBM) y, por otro lado, en una serie de muestras pareadas (packs de 3, en concreto) procedentes de 8 pacientes diagnosticados de GBM. En concreto, estas muestras consisten en 3 submuestras procedentes de un mismo paciente: una muestra procedente de la zona tumoral (GBM) y dos muestras de zonas peritumorales con posibilidad de recidiva. Puesto que estas muestras pertenecen a un estudio clínico ciego, se desconoce qué muestra se corresponde con cada una de las 3 condiciones anteriores. Por ello, y de forma totalmente ciega, se han denominado a cada una de las muestras pareadas como “ α ”, “ β ” y “ γ ”. La extracción de ARN a partir de muestras de tejido tumoral humano se ha realizado empleando el kit de extracción *PureLink Micro RNA* (Invitrogen), el cual está indicado para muestras de tejido fresco o congelado de tamaño inferior a 5 mg.

Tanto si se parte de muestras de tejido tumoral congelado en N_2 líquido como fijado en la solución *RNAlater*, la muestra, en primer lugar, se deja descongelar en hielo y se homogeniza. Para ello, se transfiere a un tubo de homogenización *PRECELLYS24* el cual contiene 1 mL de *TRizol* y se realizan 3 ciclos a 6000 rpm durante 15 s/ciclo en el equipo de homogeneización. Una vez terminados estos ciclos, se transfiere el homogeneizado a un tubo eppendorf libre de ARNasas y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifuga a 14.000g durante 15 min a temperatura ambiente. Como resultado, se obtienen 3 fases: la fase inferior, de color rojo, que contiene las proteínas; fase media, de color blanquecino, que contiene el ADN, y la fase superior e incolora la cual contiene el ARN. En concreto, es la fase incolora, la que contiene el ARN, la que se transfiere a un nuevo eppendorf libre de ARN en el que, además, se añade el mismo volumen de etanol absoluto y se resuspende de forma vigorosa con la pipeta y se incuba durante 3 min; de esta forma, se consigue precipitar el ARN. Tras la incubación, se transfiere todo el volumen de muestra (incluido posibles restos de precipitado que puedan originarse) a una columna de unión de ARN y se centrifuga a 12.000 g durante 2 min. Se descarta el eluido y la columna se coloca en un nuevo tubo colector, ya que en ella está retenido el ARN. Seguidamente, se añaden 350 μ L de tampón de lavado I sobre la columna y se centrifuga a 12.000g durante 1 min. Se descarta el eluido y se añaden 20 μ L de solución de ADNasa I al centro de la columna y se incuba durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se añaden 350 μ L de buffer de lavado I y se centrifuga. Después, se lava la columna con 500 μ L de buffer de lavado II y se centrifuga. Posteriormente, se solubiliza el ARN de la columna, para lo cual se coloca la columna sobre un nuevo tubo eppendorf y se añaden 20 μ L de H_2O libre de ARNasas. Finalmente, se cuantifica y analiza la calidad del ARN en el espectrofotómetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific, Waltham, MA) a través de las medidas de $A_{260}/280 \geq 1,8$ y $A_{260}/230 \geq 1,5$. El ARN extraído se almacena a $-80^\circ C$ hasta el momento de uso (Figura 63).

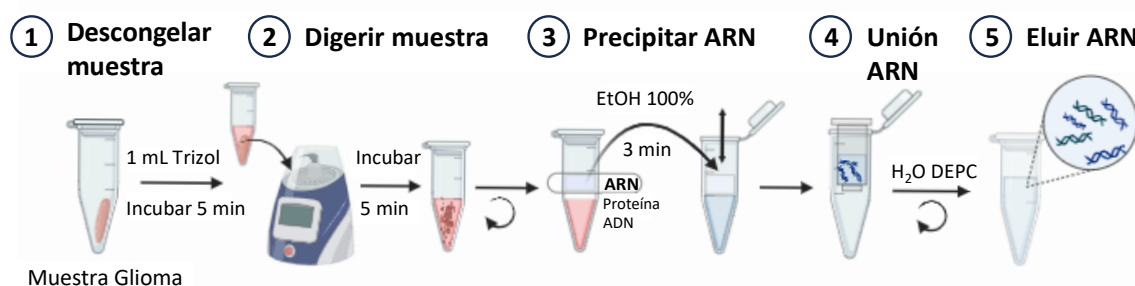


Figura 63. Protocolo de extracción de ARN a partir de muestras de tejido cerebral. 1. Se descongela el tejido. 2. Se digiere enzimáticamente, para ello, la muestra se incuba 5 min en TRizol y, posteriormente, se homogeniza en el equipo PRECELLYS24 tras lo que se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se obtienen tres fases 3, siendo la fase superior (incolores) la que contiene el ARN. 3. Se transfiere la fase que contiene el ARN y se añade EtOH 100% para que este precipite. 4. La solución (y posibles precipitados) resultantes se transfieren a una columna de unión de ARN, donde este quedará retenido. 5. Finalmente el ARN se eluye tras la adición de H₂O y se cuantifica.

2.10 Enriquecimiento de glías en cultivos de hipocampo

A partir de un cultivo primario de células de hipocampo de ratas, las células se siembran en cubreobjetos pretratados con poli-D-lisina y se mantienen en el incubador a diferentes días *in vitro* según la condición experimental: cultivo joven entre 6-8 DIV y cultivo envejecido entre 18-21 DIV. El día previo a la extracción de ARN, dado que las neuronas de hipocampo no son viables sin la glía, se sigue la estrategia experimental de aislar las glías en la mitad de los cubreobjetos del cultivo joven/envejecido, mientras que el resto se mantienen como cultivo mixto.

Para aislar las glías de las neuronas se procede de la siguiente forma: i) se retira medio de cultivo ii) se lava células en PBS iii) se retira PBS, se añaden 200 µL de Tripsina-EDTA/cubreobjeto y se incuba durante 4 min a 37 °C y 5 % CO₂ iv) se bloquea la tripsina-EDTA, se añaden 600 µL de medio con suero y se resuspende con ayuda de una pipeta v) se transfiere la suspensión de celular a un tubo cónico de 11 mL y se centrifuga a 160 g durante 4 min vi) se resuspende el pellet en medio sin suero y se siembran las células en placa Petri (diámetro 3 cm) y cristales de poli-L-lisina. Las células se mantienen en el incubador 24 h para, posteriormente, extraer el ARN. De esta forma, se obtiene un cultivo joven/envejecido enriquecido en glía.

Pasadas 24 h del enriquecimiento o aislamiento de las glías se procede a extraer el ARN de las cuatro condiciones experimentales: cultivo joven mixto, cultivo joven enriquecido en glías, cultivo envejecido mixto y cultivo envejecido enriquecido en glía. Cabe destacar que, a partir de un mismo cultivo de células de hipocampo, se obtienen las cuatro condiciones experimentales.

Con el objetivo de comprobar que el aislamiento de las glías ha sido efectivo, se llevó a cabo una doble inmunofluorescencia en la que, para la identificación de la glía, se utiliza la proteína GFAP y, para las neuronas, la β -tubulina III.

2.11 Técnicas Transcriptómicas

En la presente tesis se han empleado 2 técnicas diferentes para estudiar el transcriptoma completo de las muestras: los microarrays y la tecnología RNA-seq. A continuación, se explica cómo se ha procedido en cada caso.

2.11.1 Microarrays

Los microarrays son una tecnología transcriptómica de alto rendimiento que permiten analizar los niveles de expresión de miles de genes de forma simultánea. Se trata de un dispositivo en forma de chip que consta de una base o soporte sólido sobre el cual se imprimen, mediante litografía, con orden lógico y conocido, diferentes fragmentos de ADN, sondas complementarias a toda o parte de la secuencia de ADNc (de 25 bases) correspondiente a cada uno de los transcritos de interés. Cabe destacar que cada sonda es específica para un solo gen, si bien es cierto que, debido a su corta longitud, pueden darse situaciones en las que haya una hibridación no específica con otro gen diferente al objetivo. Como resultado, se obtiene un chip en el que, en cada punto o spot, hay millones de copias de una misma sonda.

Para el análisis de la expresión diferencial de genes durante el envejecimiento neuronal *in vitro* y el efecto de los oligómeros de A β en neuronas de hipocampo envejecidas se recurrió a los microarrays *Clariom D Rat* de Thermofisher, microarrays de expresión de *Affimetrix Genechip*, los cuales se caracterizan por tener una gran especificidad y permitir estudiar tanto el genoma completo como variantes de *splicing* alternativo con gran precisión. Estos se tratan de microarrays de un color que se caracterizan porque a cada gen le corresponde una media de 10 sondas por exón y de 4 sondas para cada unión exón-exón, las cuales abarcan regiones diferentes del gen diana. Como consecuencia, permiten estudiar no sólo la expresión de cada transcrito, sino también sus isoformas de *splicing* alternativo. En concreto, contienen más de 6.022.300 sondas las cuales proporcionan información para más de 66.100 genes – anotadas hasta abril de 2016 –, más de 214.900 transcritos y 498.500 exones.

El ARNm, tras su extracción, amplificación mediante PCR y fragmentado, se marca con un fluoróforo. A continuación, se añade ARN fragmentado y marcado sobre el microarray se deja hibridar entre 14-16 h. De esta forma, se permite que el ARN hibride con las sondas. Tras la hibridación, se aclara el microarray para eliminar el ARN no hibridado y, posteriormente, en un escáner, se ilumina con un láser y se detecta la fluorescencia emitida por cada *spot* la cual será proporcional a las sondas hibridadas en cada spot y, en consecuencia, a la expresión del gen correspondiente en la muestra. El conjunto de *spots* (o *probe cell*) que reconocen el mismo gen diana (pero diferentes regiones de este) constituyen lo que se denomina *probe set*. Por lo tanto, la expresión del gen diana es la combinación de los resultados de las *probe cell* (Figura 64).

El estudio de la expresión diferencial de genes durante el envejecimiento neuronal *in vitro* comienza con la obtención de los cultivos de hipocampo, los cuales se mantienen a 37 °C y 5 % de CO₂, de entre 6-8 DIV para cultivos jóvenes y entre 18-21 DIV para cultivos envejecidos. El día previo a la extracción de ARN, se aíslan las glías de las neuronas mediante un subcultivo, obteniendo así la condición experimental “enriquecido en glías”. De esta forma, se obtienen las distintas condiciones experimentales: Cultivo Joven Mixto, Cultivo Joven Enriquecido en glía, Cultivo Envejecido Mixto, Cultivo Envejecido Enriquecido en glía. Tras 24 h, se extrae el ARN empleando el kit de extracción EURx (ver apartado “2.9.1 Extracción de ARN de cultivos celulares de hipocampo de ratas neonatas”) y las muestras se almacenan a -80 °C hasta el momento de su uso. Cuando se dispone de todas las muestras, 16, estas se enviaron al centro CABIMER, donde se realizaron los microarrays. En primer lugar, analizaron la calidad, integridad y cantidad de ARN

mediante Bioanalyzer RNA 6000 Nano, obteniéndose valores de RIN adecuados para el procesamiento de todas las muestras (Figura 64). A continuación, una vez se obtiene que las muestras presentan unos parámetros de cantidad y calidad aceptables, a partir de 100 ng de ARN total y siguiendo el protocolo de “*GeneChip WT PLUS Reagent Kit Manual Target Preparation for GeneChip Whole Transcript (WT) Expression Arrays*” se sintetiza, amplifica, purifica y se marca con biotina el ss-DNA correspondiente de las muestras.

El flujo de trabajo es el que se indica en la Figura 64. Posteriormente, se realiza la hibridación de los arrays, revelado, lavado y lectura de la señal con el Scanner 3000 7G de Affymetrix. Los datos derivados se procesan con el programa *Affymetrix GeneChip Command 2.0* generando así archivos .CEL los cuales recogen los datos brutos de la hibridación. Estos ficheros de datos son los que nos devuelven al laboratorio para, posteriormente, llevar a cabo el análisis de los datos transcriptómicos.

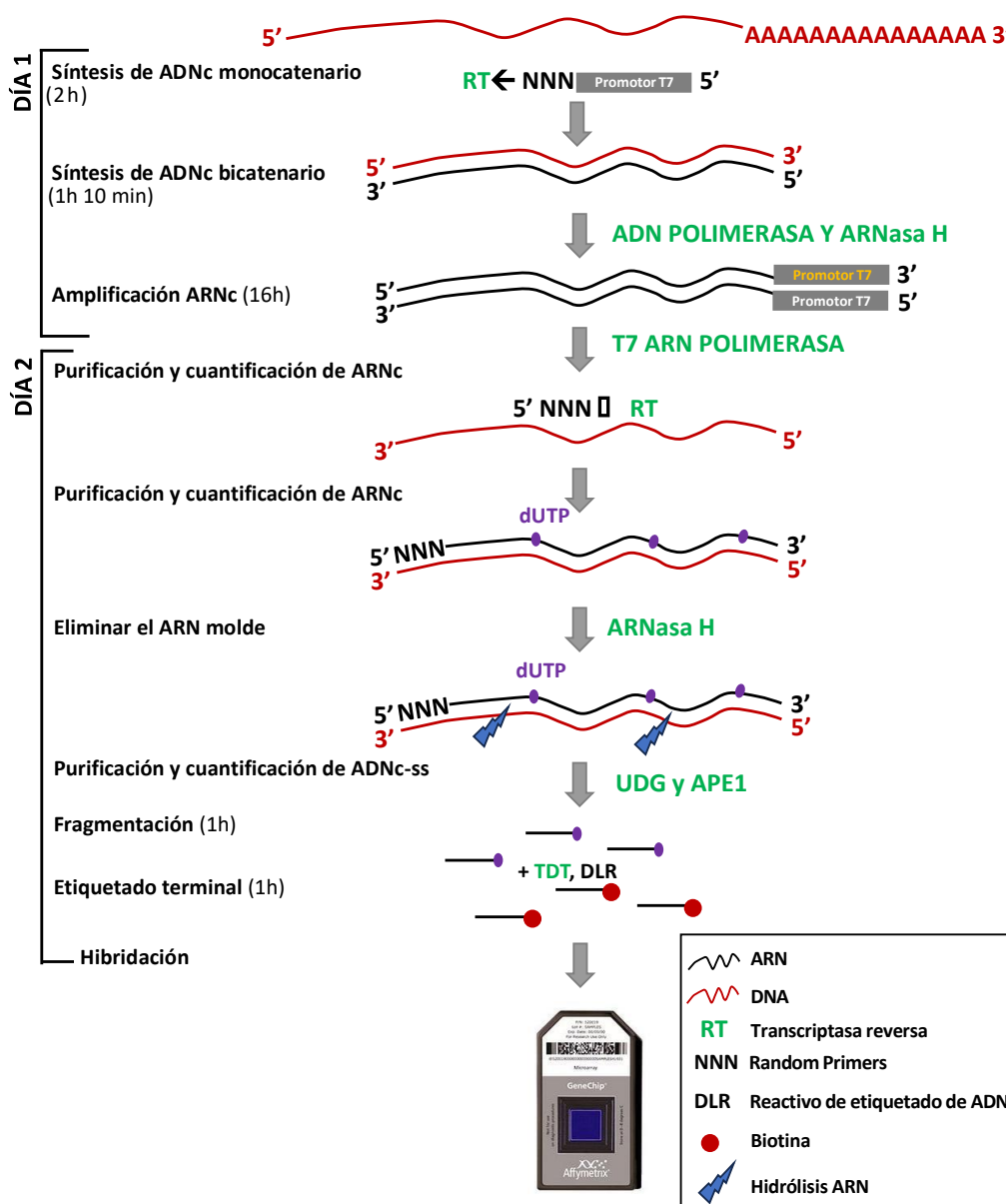


Figura 64. Esquema del procesamiento e hibridación del ARN para la realización de Microarrays.

2.11.1.1 Análisis de datos transcriptómicos de Microarrays de Affymetrix

Primero, se procesan los datos crudos generados por la tecnología de microarrays de Affymetrix, los archivos .CEL, que contienen los datos de fluorescencia de cada sonda en el microarray. Luego, se verifica la calidad de cada microarray usando técnicas tanto generales como específicas de Affymetrix. Las técnicas generales incluyen: análisis de la densidad kernel de la distribución de fluorescencia; gráficos de cajas y bigotes para la fluorescencia; análisis de componentes principales (ACP) junto con detección de *outliers* mediante la distancia de *Mahalanobis*; y análisis jerárquico con el método de Ward. En cuanto a las técnicas específicas de Affymetrix, que son métodos que analizan la calidad a nivel de sonda, se modela la fluorescencia de los microarrays, evaluando los valores tanto NUSE como RLE para cada microarray comparando dichos niveles entre los diferentes microarrays. Tras verificar la calidad, se descartan las muestras que no cumplen los criterios de calidad. Después, se aplica el método robust multi-array average (RMA) para minimizar el ruido, normalizar los datos y resumir la información de todas las sondas en un solo valor, según los estudios de (Irizarry et al., 2003) y (B. Bolstad, 2008).

Debido a la enorme cantidad de datos (decenas de miles de sondas), es totalmente necesario filtrar y descartar aquellas sondas que no muestren expresión relevante, que no varíen claramente a lo largo de los microarrays, o no coincidan con las anotaciones empleadas en análisis posteriores (UNIGENE o ALIAS). Sin embargo, independientemente de que el filtrado las “desechase” (es decir, independientemente de su nivel de expresión y de cómo varíe a lo largo de los microarrays), se conservarán las de interés que, en este caso, son todas aquellas relacionadas con el transporte de Ca^{2+} intracelular.

Posteriormente, se efectúa un análisis de patrones utilizando el ACP y, tanto de forma visual como con ayuda del algoritmo C5.0, se determinan las componentes principales (CP) que mejor diferencian las muestras según su condición experimental: Jóvenes vs. Envejecidas; tratadas vs. no tratadas... En cuanto al análisis de expresión diferencial, este se lleva a cabo mediante el método limma el cual está basado en la teoría de los modelos lineales cuya variable dependiente será cada una de las sondas y las observaciones cada uno de los microarrays. Para obtener resultados más precisos, se aplica un enfoque bayesiano, considerando la información de todos los genes simultáneamente para estimar el error aleatorio. Luego, para abordar las comparaciones múltiples, se ajusta el p valor usando el método de Benjamini y Hochberg; es decir, se obtiene el *False Discovery Rate (FDR)* el cual viene a decir que de entre todos los genes identificados como diferencialmente expresados, se espera un porcentaje de falsos positivos, y dicho porcentaje vendrá dado por el nivel de significación (0,05 en este caso).

Una vez obtenida la lista de genes diferencialmente expresados (DEG), el siguiente paso lógico es interpretar su significado biológico. Para ello, se realiza un análisis de enriquecimiento de conjunto de genes y se examinan los perfiles de expresión tanto de los genes como de las muestras. El análisis de enriquecimiento revela posibles asociaciones entre conjuntos de genes y las condiciones experimentales evaluadas, como las diferencias entre cultivos jóvenes y envejecidos. En particular, cabe destacar que estos conjuntos de genes se han generado a partir de información existente sobre grupos de genes con relevancia biológica, como rutas de señalización o genes asociados al cáncer, los cuales pueden consultarse en diferentes bases de datos tales como *KEGG PATHWAY*, *GO*. Al comparar la lista de DEG con estas bases, se puede deducir qué rutas de señalización o qué conjuntos de genes se ven afectadas o participan en ciertos fenotipos, como puede ser la neurodegeneración durante el envejecimiento.

2.11.2 RNA-Seq

La técnica de RNA-Seq es otra metodología de secuenciación de siguiente generación (NGS) que permite no solo analizar la expresión de cada transcrito o de sus isoformas, sino también conocer la secuencia de estos (a diferencia de los microarrays explicados anteriormente). Al comparar los datos de RNA-Seq en diferentes condiciones, se pueden identificar qué genes están siendo expresados y en qué niveles, lo que proporciona información sobre los procesos biológicos y patológicos que tienen lugar en las células de los tejidos estudiados.

En concreto, esta técnica RNA-Seq puede dividirse en cuatro pasos bien diferenciados unos de otros: 1) preparación de librerías. 2) amplificación, 3) secuenciación, 4) análisis bioinformático (Figura 65).

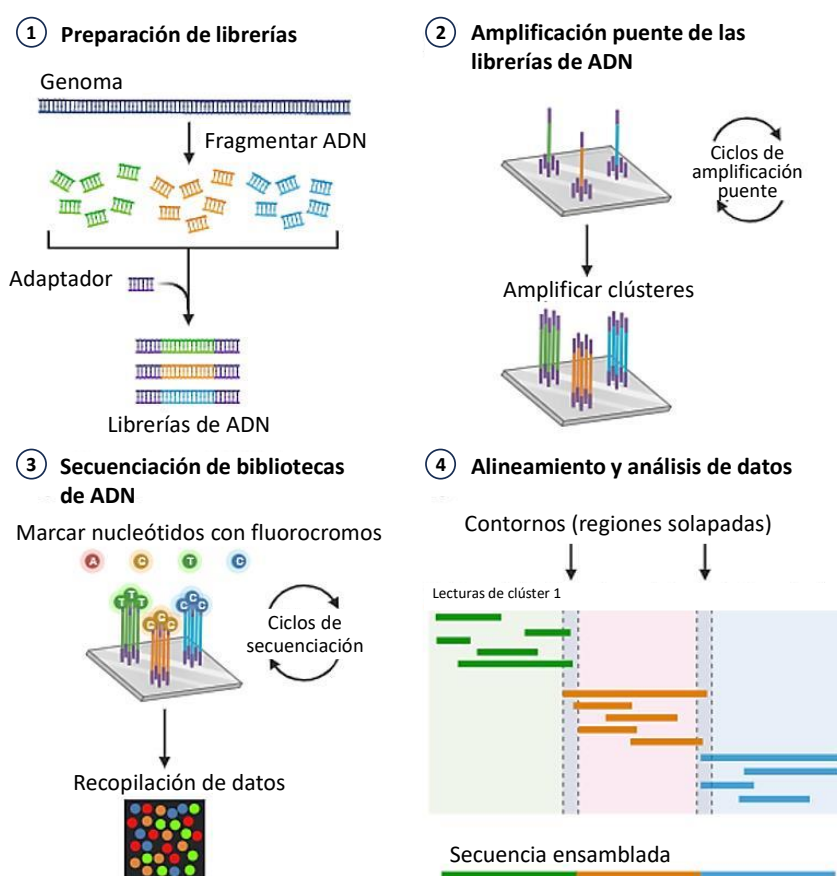


Figura 65. Esquema de la tecnología de secuenciación masiva RNA-Seq.

2.11.2.1 Preparación de las librerías

Tras la extracción del ARN (ver protocolo en apartado “ 2.9.2 Extracción de ARN a partir de muestras de tejido tumoral”) y evaluación de su calidad, el ARNm se aísla mediante una serie de bolitas o *beads* magnéticas las cuales tienen adheridas a su superficie diferentes oligonucleótidos capaces de hibridar con el ARNm para, posteriormente, fragmentarlo. A continuación, se sintetiza el ADNc de dichos fragmentos de ARNm para generar lo que se conoce como librería. Para ello, se añaden diferentes *primers* hexaméricos aleatorios y una transcriptasa reversa. Posteriormente, a partir del ADNc anteriormente generado, se sintetizan sus hebras complementarias y se elimina el ARN, obteniéndose así ADNc bicatenario purificado. Finalmente, con el fin de tener muchas copias de dichos ADNc, la librería se enriquece mediante PCR en la fase de amplificación.

2.11.2.2 Amplificación

La fase de amplificación suele ser propia de la tecnología empleada. En particular, en la tecnología Illumina se lleva a cabo la amplificación en fase sólida. Esta se basa en un soporte físico en el que, mediante fotopirólisis, se sintetizan una serie de *primers* directos e inversos de alta densidad y que, además, son complementarios a los adaptadores los cuales se ligan a ambos extremos de los fragmentos de ADNc sintetizado en la fase anterior. Posteriormente, estos se añaden sobre el soporte sólido de tal forma que en cada microespacio del soporte solo haya un fragmento. Esta amplificación por PCR en fase sólida permite obtener hasta un millón de copias idénticas de cada secuencia. Cada conjunto de secuencias idénticas obtenidas a partir de un mismo fragmento se denomina clúster.

A su vez, la hebra molde inmovilizada en el soporte se hibrida con el *primer* y con el complementario al adaptador del extremo libre. De esta forma, esta técnica es capaz de producir entre 100-200 millones de hebras molde espacialmente separadas en las que los extremos quedan libres para facilitar la unión de *primers* universales de secuenciación para iniciar la reacción NGS.

2.11.2.3 Secuenciación

Illumina emplea la secuenciación por síntesis con terminadores reversibles para determinar la secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADNc. Se basa en que en una misma mezcla de reacción se añaden los *primers*, la ADN polimerasa y los cuatro dNTP los cuales llevan ligado un fluoróforo diferente para cada nucleótido y, además, tienen inactivo su -OH 3'. En concreto, el uso de dNTPs modificados asegura que la adición de los nucleótidos sea únicamente uno cada vez. De esta manera, los *primers* se unen a las secuencias de cada clúster y, a continuación, la ADN polimerasa elonga la hebra de ADN a partir de los *primers* empleando los dNTP modificados. Tras la adición de cada dNTP, un láser excita a los clústeres para registrar el color del dNTP incorporado, el cual será detectado por una cámara con un dispositivo de carga acoplada (CCD) y, a través de un equipo informático, la señal de fluorescencia se traduce en la correspondiente secuencia. Posteriormente, se elimina el terminador fluorescente y se regenera el grupo -OH 3' para que comience de nuevo el ciclo de adición de dNTP-OH 3'.

2.12 Diseño experimental y análisis transcriptómico en neuronas de hipocampo: Microarrays

A continuación, se detallan los procedimientos experimentales llevados a cabo para el análisis transcriptómico de los modelos de envejecimiento neuronal y de Alzheimer.

2.12.1 Análisis transcriptómico en el envejecimiento neuronal *in vitro*

Para estudiar los cambios transcripcionales que se producen en el envejecimiento neuronal *in vitro* se ha recurrido a la técnica de Microarrays, en concreto los Microarrays de *Clariom D Rat*.

Dado que nuestro modelo de envejecimiento es un modelo mixto, es decir, está formado por neuronas y glías, y que nuestro interés se centra en el estudio de los cambios que se producen en las neuronas, se llevó a cabo el siguiente diseño experimental, diseño que permite, indirectamente, evaluar lo que sucede en las neuronas (Figura 66). En concreto, tras obtener los cultivos de células de hipocampo, aislar las glías de las neuronas de hipocampo (explicado en el apartado “2.10. Enriquecimiento de glías en cultivos de hipocampo”) y extraer el ARN de los distintos cultivos primarios (tal y cómo se describe en el apartado “2.9.1. Extracción de ARN de cultivos celulares de hipocampo de ratas neonatas”), tal y como se ha explicado en apartados

anteriores, se llevaron a cabo los microarrays y se analizaron los datos transcriptómicos crudos obtenidos, tal y como se explica en el apartado “2. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL REMODELADO DEL Ca^{2+} EN EL ENVEJECIMIENTO NEURONAL”.

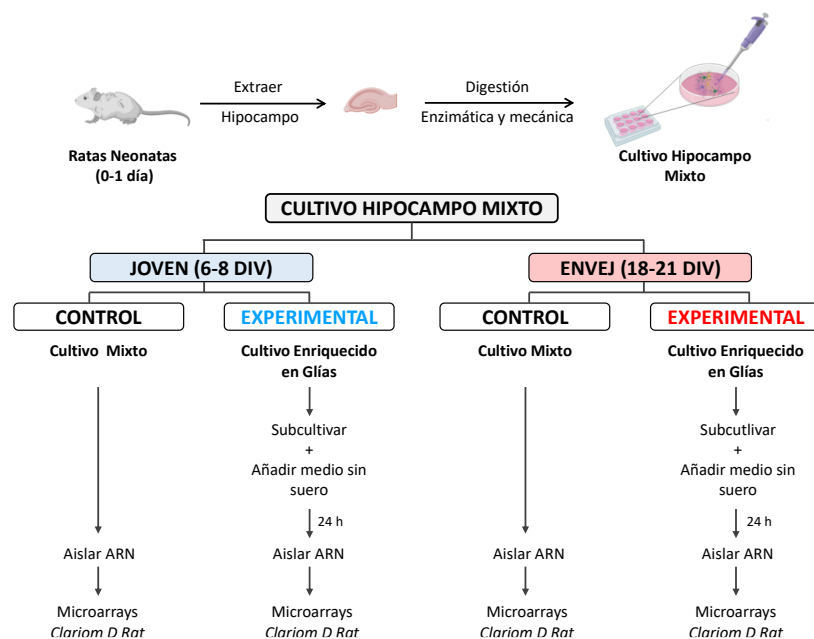


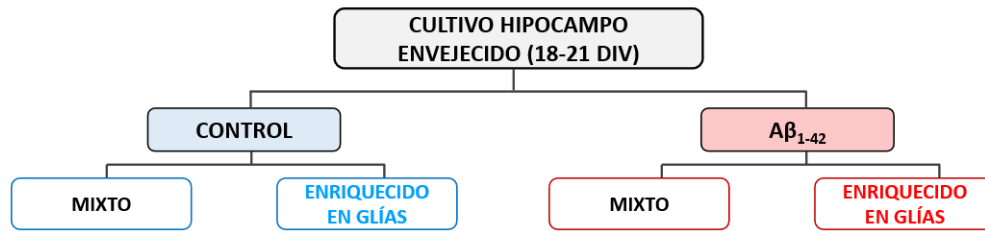
Figura 66. Diseño experimental del análisis transcriptómico en el envejecimiento neuronal *in vitro*. A partir de los cultivos de hipocampo mixto cultivados a diferentes DIV se eliminaron las neuronas obteniendo así cultivos enriquecidos en glías. Tras la obtención de las cuatro condiciones experimentales: joven mixto, joven enriquecido en glías, envejecido mixto y envejecido enriquecido en glías, se extrajo el ARN para la posterior realización de microarrays.

2.12.2 Análisis transcriptómico del efecto del $\text{A}\beta_{1-42}$ en neuronas envejecidas

Tras realizar el tratamiento de las células con $\text{A}\beta_{1-42}$ 1 μM y aislar las glías de las neuronas en los cultivos de hipocampo envejecidos, se extrajo el ARN y se realizaron microarrays *Clariom D Rat* de Affimetrix.

Para estudiar el efecto de $\text{A}\beta_{1-42}$ 1 μM en neuronas de hipocampo envejecidas (18-21 DIV) a nivel transcriptómico de los genes implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, se utilizaron, nuevamente, los microarrays *Clariom D Rat*. Por lo tanto, el procedimiento seguido es prácticamente idéntico al expuesto en el apartado “2.12.1. Análisis transcriptómico en el envejecimiento neuronal *in vitro*”. En primer lugar, se obtiene un cultivo de células de hipocampo el cual se deja envejecer *in vitro*. A los 17 DIV, la mitad del cultivo se somete a un tratamiento con $\text{A}\beta_{1-42}$ 1 μM durante 24 h (condición experimental) y la otra mitad al vehículo (control). Tras 24 h, en parte de los cubreobjetos experimentales y parte de la condición control se lleva a cabo el enriquecimiento de las glías para lo que se eliminan las neuronas. De esta manera, se obtiene un cultivo enriquecido en glías sobre el cual, de nuevo, se añade el tratamiento correspondiente según su condición experimental ($\text{A}\beta_{1-42}$ 1 μM) o control (vehículo -MEM) y se mantienen 24 h en el incubador. De esta forma, se obtienen las cuatro condiciones experimentales: cultivo envejecido mixto control, cultivo envejecido enriquecido en glía control, cultivo envejecido mixto $\text{A}\beta_{1-42}$, y cultivo enriquecido en glía $\text{A}\beta_{1-42}$. Como resultado, se tienen 2 variables independientes o factores: el tratamiento, con los niveles control y $\text{A}\beta_{1-42}$, y el tipo de cultivo, cuyos niveles son mixto o enriquecido en glía (Figura 67). A continuación, se lleva a cabo la extracción de ARN empleando el kit de extracción de ARN EURx (Ver protocolo en el apartado “2.9.1 Extracción de ARN de cultivos celulares de hipocampo de ratas neonatas”).

A



B

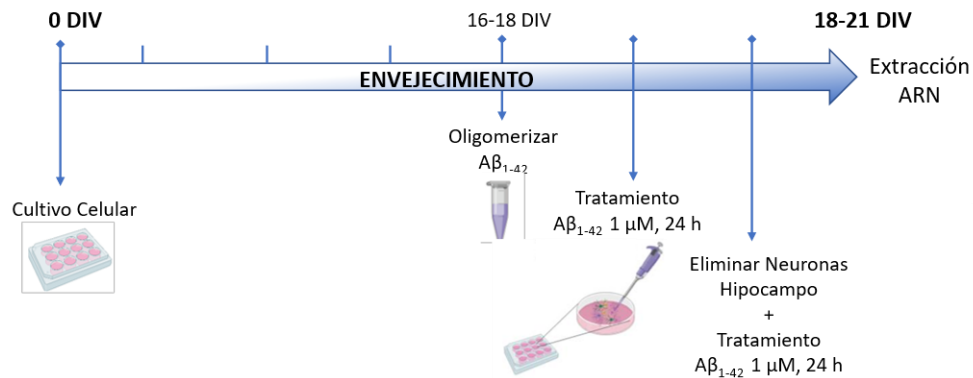


Figura 67. Diseño experimental para el estudio transcriptómico del efecto de $A\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo envejecidas. **A.** Esquema del diseño experimental. **B.** Línea temporal del diseño experimental para la realización de los microarrays en neuronas de hipocampo envejecidas (18-21 DIV) expuestas al tratamiento con $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 48 h).

2.13 Diseño experimental y análisis transcriptómico en GBM: RNA-seq

Con el objetivo de obtener los perfiles de expresión génica de muestras de glioblastoma y tejido peritumoral, se llevaron a cabo experimentos de secuenciación masiva con la tecnología RNA-Seq de Illumina. En concreto, se analizó el transcriptoma de 33 muestras de tejido tumoral cerebral procedentes de pacientes con diagnóstico clínico radiológico de tumor glial de alto grado (astrocitomas grado 4 y glioblastomas), todos ellos tratados en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario Río Hortega (HURH) de Valladolid. En concreto, se analizaron 9 muestras de glioblastoma y de 24 muestras pareadas de pacientes diagnosticados de glioblastoma o astrocitoma de grado 4.

Las muestras pareadas constan de 3 muestras ciegas por paciente: una muestra procedente del área tumoral (glioblastoma o astrocitoma de grado 4) y dos muestras de áreas peritumorales propensas a recidiva. De esta forma se pretende obtener los perfiles de expresión génica y realizar un análisis transcriptómico que establezca diferencias entre las distintas regiones de estudio.

Como ya se ha mencionado anteriormente, una de las características principales de este estudio es que es ciego. Es más, hasta la finalización del proyecto, la identidad de las muestras pareadas, tanto la tumoral como las peritumorales, será desconocida. Es decir, que, en todo momento, trabajamos de forma totalmente ciega, se ha realizado el análisis transcriptómico desconociendo la identidad de cada muestra más allá de que, para todos los pacientes, las muestras “ α ” se corresponden con un mismo fenotipo, y lo mismo para las muestras “ β ” y “ γ ”. Por lo tanto, todos y cada uno de los experimentos, preprocesamientos, extracción de ARN... se han realizado de forma paralela sobre las 3 muestras de cada paciente de igual forma y sin estar predispuesto a

tratarlas de forma diferente ya que se desconoce cuál es cuál; simplemente, de cada paciente se tienen 3 muestras pareadas para cada paciente. No hay que olvidar que, además, en este experimento también se han analizado 9 muestras de GBM de otros 9 pacientes diferentes con el fin de comparar las muestras GBM que presentan un fenotipo conocido con cada una de las 3 muestras pareadas.

2.13.1 Análisis de calidad y preparación de librerías

Los estudios transcriptómicos de secuenciación masiva de RNA-Seq fueron realizados por el CABIMER (Sevilla, España). En primer lugar, se extrajo el ARN total de las muestras de tejido tumoral y áreas peritumorales según el protocolo descrito en el apartado “2.9.2. Extracción de ARN a partir de muestras de tejido tumoral”. A continuación, ya en el CABIMER, se realizó un control previo de calidad/integridad de las muestras enviadas mediante el *Bioanalyzer* 2100 el cual puntúa la degradación del RNA extraído y le asigna una puntuación conocida como RIN. Las muestras mostraron valores de RIN comprometidos entre 8 y 10. En cuanto a la concentración exacta de las muestras, esta se determinó mediante *Qubit*, utilizando el ensayo *Qubit RNA HS Assay*.

La elaboración de las librerías de secuenciación se realizó siguiendo los pasos del protocolo *Illumina Stranded Total Prep with Ribo Zero Plus* y las recomendaciones del protocolo de dicho Kit. Esto permite elaborar una colección de fragmentos de forma que sean secuenciables por el equipo, que permita distinguir unas muestras de otras y la hebra *sense* de la *antisense*. Este proceso incluye la ligación de adaptadores y la amplificación por PCR. Durante todo el proceso, se van introduciendo controles internos que garantizan el éxito de cada paso en la elaboración de la librería.

Los adaptadores utilizados constan de un *Index* o “código de barras” específico para cada muestra/librería el cual permite combinar todas las librerías de la misma matriz (*Flow cell*) y, después, diferenciar las lecturas que pertenecen a cada una de ellas.

Por último, se lleva a cabo un control de calidad de las Librerías generadas en el que se evalúa la distribución de tamaños e integridad de las librerías mediante el *Bioanalyzer* 2100 (*DNA High sensitivity chip*) y la concentración (fluorimetría *Qubit DNA HS Assay*). El tamaño de las librerías estaba en torno a 300 pb, según lo esperado. Tras estas mediciones y comprobaciones, se normalizaron las muestras y se mezclaron de forma equimolar para hacer un único *pool*.

2.13.2 Secuenciación

El *pool* de las librerías se desnaturaliza y diluye a la concentración requerida, 0,9 nM. Junto con las muestras, se introduce una librería control (PhiX) en baja proporción la cual permite monitorizar la calidad de secuenciación, posibles problemas o imprevistos del equipo. A continuación, la secuenciación se lleva a cabo mediante la generación de *clusters* (amplificación monoclonal) sobre la *Flow Cell NovaSeq 6000 S1* a 200 ciclos y 2x100 pb de longitud de secuencia (*paired-end*).

2.13.3 Preprocesamiento de los datos de RNA-seq

Mediante el software *BaseSpace Seq Hub* de Illumina se analizó la calidad de la secuenciación. La calidad de los datos generados fue alta, pues más del 93,98 % de las secuencias mostraron un valor de Q igual o superior a 30. Los parámetros de calidad obtenidos se muestran a continuación en la siguiente tabla (Tabla 10):

Tabla 10. Parámetros de calidad de las muestras secuenciadas.

Nivel	Nº Total lecturas (M)	Reads PF (M)	% Muestras con Q _≥ 30	%PF	Longitud de lectura
RUN S1	2.553,34	2.177,96	93.98	85.30	2x100bp

La secuenciación de Illumina genera datos brutos en formato *.bcl (*binary case call*). A partir de estos, mediante la herramienta *Base Space FastQ Generation*, se realizó el filtrado (longitud, calidad, ...), el Trimming (eliminación de adaptadores, ...), y el De-multiplexing de dichos datos, lo cual permite identificar las lecturas correspondientes a cada muestra en base al index/código de barras asignado.

Esto permite la obtención de ficheros *.FASTQ (*contains sequence information and quality scores*) que contienen las lecturas no mapeadas en cada muestra. Además, la secuenciación paired-end de cada muestra genera:

- 1 archivo por cada línea/carril de la *Flow cell* o matriz de secuenciación. En este caso, dos carpetas por cada muestra que se identifican con el "ID_Unidad" y L001 y L002.
- Además, cada una de las carpetas anteriores, dado que se ha realizado secuenciación *paired-end*, consta de dos archivos: *.R1 (*forward*) y *.R2 (*reverse*) que se corresponde con la orientación de las lecturas.

A partir de estos archivos, se realizó el análisis secundario de los datos.

2.13.4 Análisis de datos de RNA-seq

A continuación, en los siguientes apartados se expondrá el análisis de datos llevado a cabo a partir de los datos transcriptómicos obtenidos para las muestras pareadas "α", "β" y "γ" y las 9 de GBM, datos que han sido previamente preprocesados según lo explicado en el apartado anterior.

2.13.4.1 Obtención de la matriz de expresión

Haciendo uso de la plataforma de Illumina *BaseSpace* y, en concreto, de la App *DRAGEN RNA*, se han procesado los datos .Fastq (obtenidos en el preprocesado anterior). De esta manera, se obtiene la matriz de cuentas (matriz de expresión), donde cada columna se corresponde con una muestra y cada fila con un gen.

2.13.4.2 Análisis de expresión relativa de los genes en muestras de GBM y áreas peritumorales

A partir de la matriz de cuentas, se estudiaron las expresiones relativas de diferentes genes de interés, tanto en las muestras "GBM" como en las muestras pareadas. El estudio se enfocó en la comparación de los genes que codifican para diferentes isoformas e, incluso, entre diferentes miembros de un mismo mecanismo de transporte. Por ejemplo, se estudió los niveles de expresión entre las diferentes isoformas de ORAI, entre las diferentes isoformas de IP₃R... Para ello, las lecturas obtenidas para cada gen se normalizaron frente a la longitud de cada gen y frente al total de lecturas de cada muestra, lo que se conoce como RPKM, por sus siglas en inglés *Read Per Kilobase Millón*. Además, puesto que las lecturas son datos discretos, los datos RPKM se transformaron para que los niveles de expresión relativos siguiesen una distribución normal; en concreto, se utilizó la variable $\log_2(\text{RPKM}+1)$ como medida de expresión relativa de cada gen. Así, con esta medida es posible estudiar la expresión relativa entre diferentes genes de interés dentro de una misma muestra. Esto se debe a la peculiaridad de la técnica, pues al tener un total

de lecturas que han de repartirse entre los diferentes genes expresados en la muestra, cuanto más se exprese un gen más lecturas se corresponderán con dicho gen. No obstante, puesto que a mayor longitud del gen más probable será que sea leído, normalizar estas lecturas frente a la longitud de dicho gen permitirá comparar genes con diferentes longitudes; y es, precisamente, en lo que se basa la variable RPKM.

Una vez decidida la variable que se emplea como medida de expresión, el siguiente paso fue decidir cómo contrastar la hipótesis nula de que los genes comparados se expresan igual frente a la alternativa de que, al menos uno de ellos, se expresan diferente. Para ello, se ajustó un modelo lineal, se comprobaron los supuestos del modelo, se eliminaron los *outliers* y se transformó la variable, en caso de ser necesario, mediante la familia de transformaciones de Box-Cox. A continuación, se realizó un ANOVA de dicho modelo y, en caso de rechazarse la hipótesis nula, se realizaron las comparaciones dos a dos entre los diferentes genes comparados cuyos p valores se corrigieron mediante el método de Tukey. Por último, a partir de las comparaciones dos a dos, los genes se agruparon en grupos homogéneos y a cada grupo se le asignó una letra, de tal manera que los genes agrupados en un mismo grupo (o que tienen la misma letra) se consideran genes que se expresan igual pero diferente a genes que estén en otro grupo o que se representen mediante una letra distinta.

2.13.4.3 *Análisis de expresión diferencial y de significación biológica*

Posteriormente, esta matriz de expresión se analizó mediante el software R. En concreto, se implementó el método limma (del inglés, *linear model for microarray and RNA-Seq data*) junto con la transformación voom (del inglés, *variance modelling at the observational level for RNA-seq*) de los datos para adecuar el análisis a los datos de RNA-Seq. No obstante, cabe destacar que se siguieron dos procedimientos distintos según las muestras comparadas: en primer lugar, sin considerar el factor aleatorio para comparar cada una de las muestras con las muestras “GBM” (control); en segundo lugar, considerando en el modelo, ahora sí, el factor aleatorio “Paciente” con el fin de considerar el apareamiento de las muestras “ α ”, “ β ” y “ γ ” comparar las 3 entre ellas.

Finalmente, se realizó un análisis de significación biológica mediante el método CAMERA, método que contrasta la hipótesis nula competitiva. En particular, este contraste permite inferir, en el caso de rechazar la hipótesis nula, si los genes del conjunto de genes considerado están diferencialmente expresados respecto a los genes que no pertenecen a dicho conjunto. Una vez realizado este análisis y, en consecuencia, obtener los p valores para cada conjunto de genes evaluado, dichos p valores obtenidos se ajustan mediante el FDR, considerando que un conjunto de genes estará relacionado con el fenotipo estudiado en el caso de que su FDR sea inferior a 0,25. En cuanto a las bases de datos consultadas, han sido KEGG, GO.

En cuanto a las librerías de R, se ha empleado affy (Gautier et al., 2004), affyPLM (B. Bolstad, 2003; B. M. Bolstad et al., 2005), (Brettschneider et al., 2007), affycoretools (MacDonald J. W. 2023), oligo (Carvalho y Irizarry 2010), oligoclases (Carvalho B. et al. 2023), AnnotationDbi (Godoy et al., 2021), (Todorov y Filzmoser 2010), genefilter (Gentleman R. et al. 2023), limma (Ritchie et al., 2015), EnrichmentBrowser (Geistlinger et al., 2016).

IV. RESULTADOS

1 ESTUDIO DEL REMODELADO DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO NEURONAL *IN VITRO*

Para estudiar el remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el envejecimiento neuronal *in vitro*, como modelo, se han utilizado cultivos primarios de neuronas de hipocampo cultivadas a largo plazo. En particular, se consideran neuronas jóvenes aquellas que estén entre 6-8 días *in vitro* (DIV), mientras que se consideran neuronas envejecidas a aquellas entre 18-21 DIV (Figura 68). Cabe destacar que este modelo ya ha sido descrito previamente por diferentes autores como un modelo aceptable para el estudio de diferentes aspectos relacionados con el envejecimiento neuronal. Ya, en 1977, Banker y Cowan describieron que, con el envejecimiento, los cultivos primarios de neuronas sufren una serie de cambios morfológicos tales como el agrandamiento de los cuerpos neuronales y la formación de extensas redes neuronales, tal y como puede observarse en la Figura 68 (Banker & Cowan, 1977). Es más, nuestro grupo también confirmó la presencia de signos o marcadores de envejecimiento en los cultivos a largo plazo de neuronas de hipocampo, entre los que destacan la autofluorescencia debida a la presencia de depósitos de lipofusina, “pigmento de la edad” (Gray & Woulfe, 2005); el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ con la edad (Hajieva et al., 2015), o la aparición de oscilaciones sincrónicas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ a partir de 8 DIV y su disminución gradual con el tiempo de cultivo (Leinekugel et al., 1997).

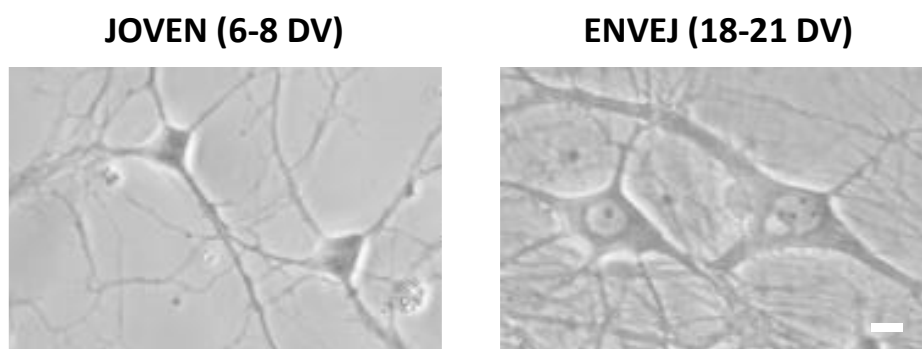


Figura 68. Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata. Imágenes de microscopía de campo claro representativas de un cultivo primario de neuronas de hipocampo. La barra blanca representa 10 μm .

Como ya se comentó anteriormente, el modelo de envejecimiento empleado es un modelo mixto, es decir, está formado por más de un tipo celular. En concreto, está formado por glías y neuronas. Dado que el interés de la presente tesis se centra en estudio del remodelado del Ca^{2+} intracelular en neuronas de hipocampo, se hace necesario identificar dichas neuronas en el cultivo mixto. Para ello, se lleva a cabo una doble inmunofluorescencia en la cual se utilizan anticuerpos específicos para cada tipo celular: α - β -tubulina III para las neuronas y α -GFAP para las glías. En la Figura 69 se muestra una imagen representativa de un cultivo primario mixto de hipocampo, donde el color verde se corresponde con las neuronas y el rojo con las glías. Cabe destacar que, en este caso, emplear esta técnica para diferenciar tipos celulares tiene un doble fin: identificar neuronas y glías en los cultivos tratados y entrenar al observador para discriminar entre ambos tipos celulares en cultivos mixtos sin la necesidad de emplear la inmunofluorescencia.

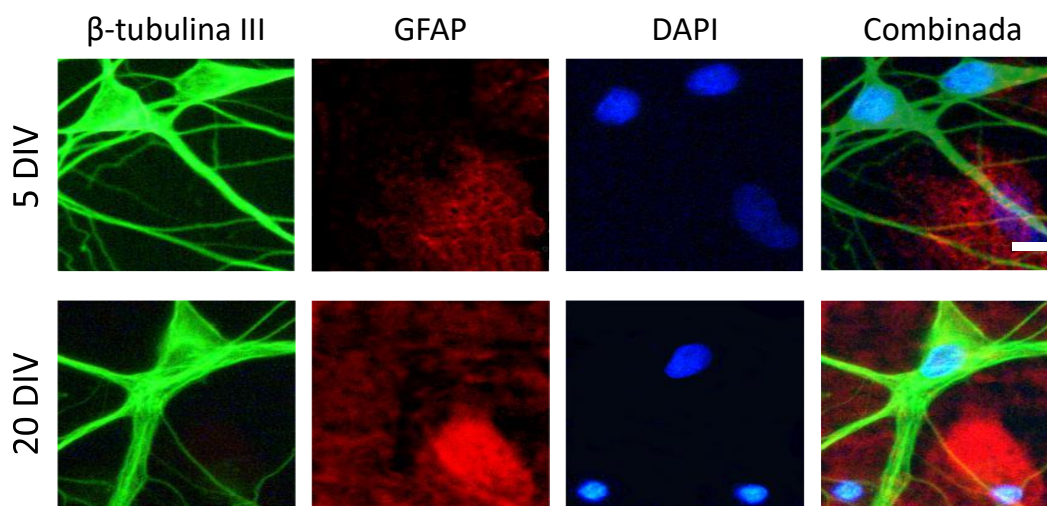


Figura 69. Identificación de neuronas y glías mediante inmunofluorescencia. Imágenes representativas de un cultivo primario mixto de células de hipocampo, en el cual se distinguen las neuronas, marcadas en verde con β -tubulina III, las glías marcadas en rojo con GFAP, y los núcleos en azul teñidos con DAPI. La barra blanca representa 10 μ m.

A pesar de que el estudio de SOCE se ha restringido generalmente a las células no excitables, recientemente se ha identificado SOCE en múltiples tejidos excitables, incluidos el corazón y el cerebro. En concreto, en las neuronas se ha implicado el papel de SOCE como un posible modulador de la fisiología neuronal tanto a nivel presináptico como postsináptico, desempeñando un papel en la regulación de la actividad neuronal y plasticidad. Además, se postula que SOCE podría ser un regulador de la excitabilidad neuronal. Por ello, no es de extrañar que alteraciones de SOCE y de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular se hayan relacionado con múltiples enfermedades del sistema nervioso tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington o el dolor crónico, entre otras.

El estudio de SOCE se llevó a cabo mediante imagen de fluorescencia en célula única empleando la sonda Fura-2/AM la cual permite monitorizar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Para ello, las neuronas de hipocampo, mantenidas en cultivo durante diferentes días, se incubaron con la sonda Fura-2/AM y después con tapsigargina (Tg) 1 μ M en medio libre de Ca^{2+} ($\text{Ca}0$) durante 15 minutos, lo que permite inhibir la ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA) y, en consecuencia, inducir el vaciado de los depósitos de Ca^{2+} . A continuación, estas células se colocaron en el sistema de imagen de Ca^{2+} para comenzar los diferentes registros.

Antes de comenzar con el estudio del remodelado del transporte de Ca^{2+} en el envejecimiento neuronal *in vitro*, se comprobó si el comportamiento del modelo empleado, cultivos de hipocampo de ratas neonatas, era el esperado. En concreto, se evaluó SOCE en función tanto de la edad del cultivo como del efecto de los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$. Así, los resultados mostraron que, efectivamente, el comportamiento de estos era el esperado; en concreto, una disminución de SOCE con el envejecimiento y, únicamente en neuronas envejecidas *in vitro*, una mayor disminución tras el tratamiento con $\text{A}\beta$ (Figura 70).

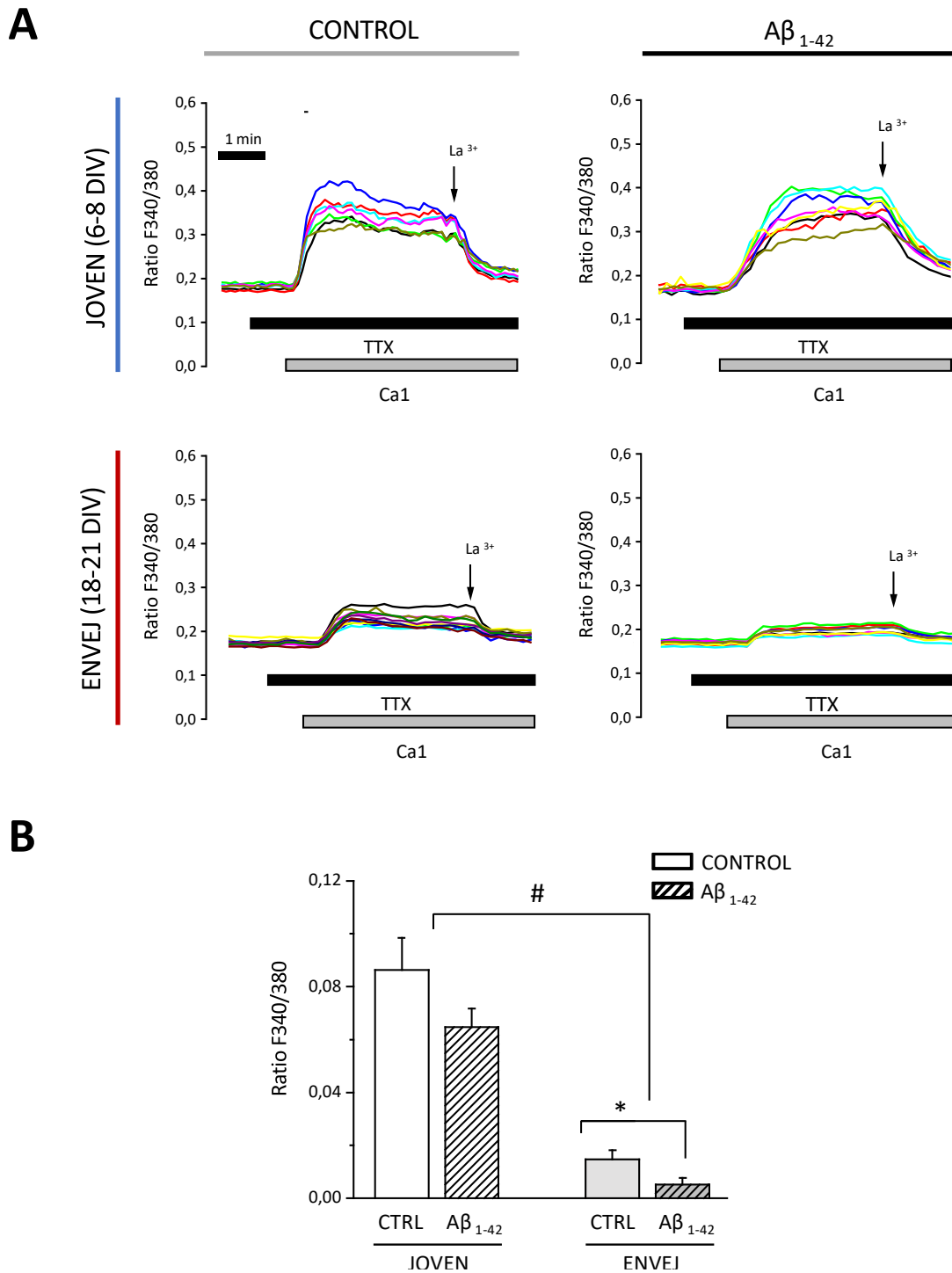


Figura 70. Efecto del envejecimiento y del tratamiento con Aβ sobre SOCE en cultivos primarios de hipocampo de rata neonata. Se monitorizó SOCE por imagen de fluorescencia de Ca^{2+} en neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas, previamente incubadas en Fura-2/AM 4 μM (1 h) y tratadas con Tg 1 μM en Ca^{2+} 15 min. La adición de Ca^{2+} 1 mM al medio en presencia de TTX reveló SOCE. La posterior adición de La^{3+} inhibe la entrada de Ca^{2+} . **A.** Registros representativo de SOCE en célula única y **B.** Gráfico de barras para las diferentes condiciones experimentales: Joven Control, Joven Aβ, Envejecido Control, Envejecido Aβ. El tamaño muestral para cada una de las condiciones es 65, 84, 35 y 45, respectivamente, en tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs grupo control. # $p < 0,05$ vs. neuronas jóvenes.

A partir de los registros obtenidos, se observa que, con el tiempo de cultivo, se produce una disminución de SOCE lo que, por un lado, corrobora la evidencia ya existente y, por otro lado, demuestra que los cultivos primarios utilizados en la presente tesis se comportan de acuerdo con lo descrito previamente (Calvo-Rodríguez et al., 2016b). Por lo tanto, tras comprobar que el comportamiento fue el esperado, se procedió con el resto de los estudios realizados en estos modelos.

1.1 Reversión de la pérdida de SOCE en neuronas envejecidas

En consecuencia, y dado que se ha sugerido que SOCE podría ser un modulador de la actividad neuronal y que, además, se ha comprobado que durante el envejecimiento tiene lugar una disminución de SOCE, nos planteamos estudiar la posibilidad de revertir dicho mecanismo en neuronas envejecidas. Para ello, nos propusimos estudiar el efecto del compuesto metil dietil borinato (MDEB), un modulador positivo de SOCE, sobre la entrada de Ca^{2+} en neuronas de hipocampo, nuevamente, mediante imagen de Ca^{2+} en célula única utilizando la sonda de Ca^{2+} Fura-2/AM. En concreto, en neuronas de hipocampo jóvenes (6-8 DIV) y envejecidas (18-21 DIV) en presencia del compuesto MDEB. Para ello, inicialmente, estas células se perfundieron con medio libre de Ca^{2+} en presencia del coctel de inhibidores de canales dependientes de voltaje (CIC)¹. Finalmente, tras 5 minutos, se readicionó Ca^{2+} al medio (Ca1), lo que produjo un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ el cual se corresponde con la activación de SOCE. Los resultados muestran cómo SOCE disminuye significativamente con el envejecimiento y que, además, el compuesto MDEB no tiene efecto sobre este mecanismo de entrada de Ca^{2+} en neuronas envejecidas, aunque sí lo tiene en neuronas de hipocampo jóvenes, pues esta entrada de Ca^{2+} está claramente aumentada (Figura 71).

¹ Este coctel está formado por una serie de antagonistas de canales de Ca^{2+} de la MP cuyo objetivo es bloquear la posible activación y entrada de Ca^{2+} a través de estos. En concreto, contiene: tetrodotoxina (TTX) 500 nM, antagonista de los canales de Na^{+} dependientes de voltaje; cianquixalina (CNQX) 10 μM , antagonista de los receptores AMPA; ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico (D-AP5) 10 μM , antagonista selectivo del NMDAR, y Nifedipina 5 μM , inhibidor de los canales de Ca^{2+} tipo dihidropiridina.

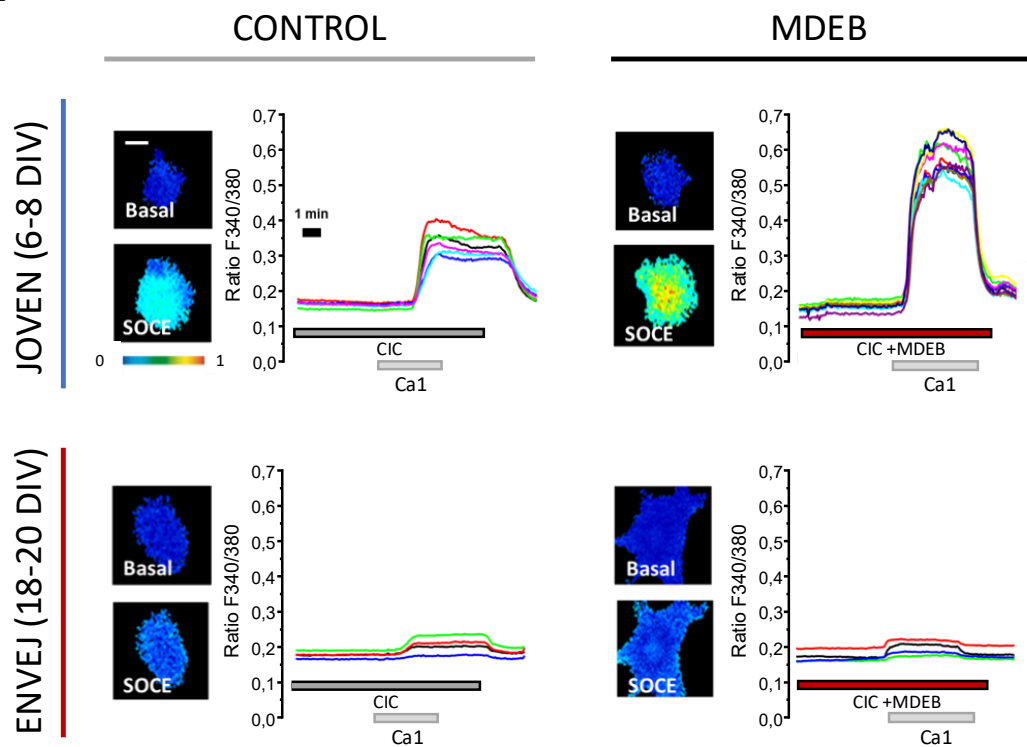
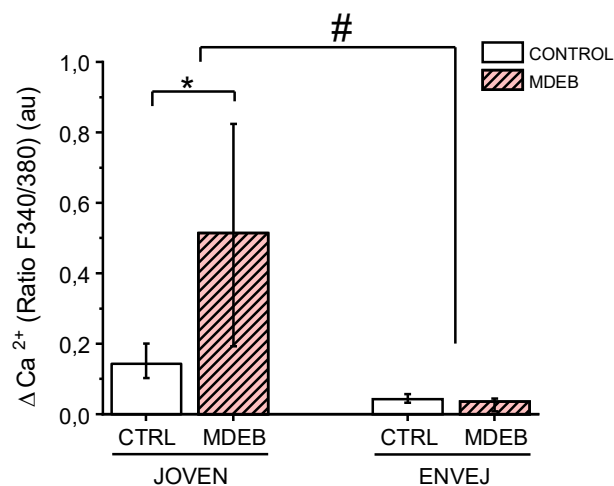
A**B**

Figura 71. Efecto del envejecimiento y del agonista MDEB sobre SOCE en cultivos de neuronas de hipocampo. Se registro SOCE mediante imagen de fluorescencia de Ca^{2+} en neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas, previamente incubadas con Fura-2/AM (1 h) y tratadas con Tg 1 μ M en medio libre de Ca^{2+} durante 15 min. La readición de Ca^{2+} 1 mM al medio en presencia del coctel de inhibidores (CIC) en condiciones control y además en presencia de MDEB en condiciones experimentales permite revelar SOCE. **A.** Trazos representativos del registro de SOCE en neuronas de hipocampo jóvenes (fila superior) y envejecidas (fila inferior) en condiciones control (columna izquierda) y en condiciones experimentales (columna derecha), tratamiento con el compuesto MDEB. **B.** Gráfico de barras donde se representan los valores medio de SOCE en neuronas jóvenes y envejecidas en presencia y ausencia de MDEB. El tamaño muestral para cada una de las condiciones es 60, 45, 48, 41, respectivamente, en cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs grupo control. # $p < 0,05$ vs. neuronas jóvenes.

1.2 Efecto del envejecimiento y los oligómeros de A β sobre el potencial mitocondrial en neuronas de hipocampo

Uno de los aspectos que pueden determinar SOCE es la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria que puede prevenir la inactivación de los canales de Ca^{2+} implicados en SOCE. La fuerza electromotriz para la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria es el potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mit}}$). Por ello, hemos estudiado si la pérdida de SOCE con el envejecimiento pudiera deberse a cambios en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$. Para evaluar el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ en neuronas de hipocampo y el efecto de A β_{1-42} sobre este, hemos utilizado la sonda éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM), una sonda catiónica fluorescente. Debido a su carga positiva, es capaz de acumularse en el interior de las mitocondrias de forma proporcional a su $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ según la ecuación de Nernst, por lo que una disminución de la fluorescencia emitida se corresponde con una pérdida del potencial mitocondrial. Así, las neuronas se trataron durante 24 h, bien con A β_{1-42} (1 μM) (condición experimental) en MEM o bien con MEM únicamente (condición control), pues este es el vehículo en el que los oligómeros fueron disueltos. Tras la incubación de las células con la sonda TMRM, los cubreobjetos se colocaron en un microscopio de fluorescencia con una cámara termostatzada y, tras ajustar los parámetros de excitación y emisión, se capturaron las imágenes de fluorescencia. Una vez completada la obtención de imágenes, se determinó la intensidad de la señal de fluorescencia mediante el software *imageJ*. Cabe destacar que el potencial mitocondrial en reposo se estimó a partir de la fluorescencia emitida por la sonda en condiciones de reposo en neuronas de hipocampo control y expuestas al tratamiento con los oligómeros de A β_{1-42} (1 μM , 24 h), tanto en los cultivos jóvenes como envejecidos. La Figura 72 muestra que tanto el tiempo de cultivo (envejecimiento) como los oligómeros de A β_{1-42} (1 μM , 24 h) inducen una disminución significativa del potencial mitocondrial, siendo el efecto mayor en las neuronas envejecidas.

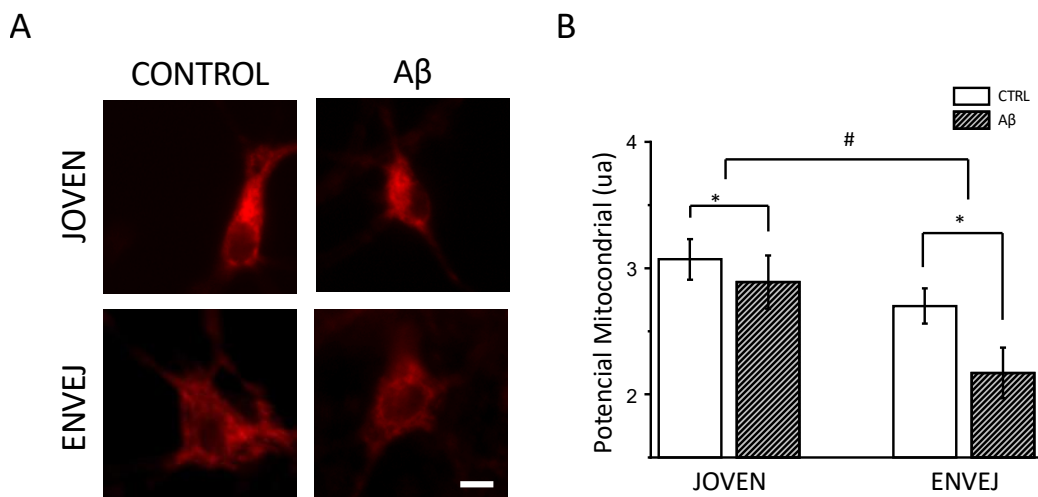


Figura 72. El potencial mitocondrial disminuye con el envejecimiento y con el tratamiento de A β_{1-42} en neuronas de hipocampo. Se evaluó el potencial de membrana mitocondrial en reposo en neuronas de hipocampo mantenidas a diferentes DIV y tras la exposición al tratamiento con A β_{1-42} 1 μM con la sonda fluorescente TMRM. Para ello, los cultivos se incuban con la sonda TMRM (10 nM, 45 min) y después mediante imagen de fluorescencia se capturan imágenes en las que se cuantifica el potencial mitocondrial en reposo. **A.** Imágenes representativas de fluorescencia de la sonda TMRM de neuronas jóvenes y envejecidas en presencia o ausencia del tratamiento con los oligómeros de A β . La barra blanca representa 10 μm . **B.** El gráfico de barras muestra la intensidad de fluorescencia en neuronas de hipocampo a diferentes DIV y tratadas con A β_{1-42} . El tamaño muestral para cada una de las condiciones es 96, 75, 55 y 40, respectivamente, en 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs. control. # $p < 0,05$ vs. neuronas jóvenes.

1.3 Efecto del tratamiento con los oligómeros de A β sobre la formación de especies reactivas de oxígeno en neuronas de hipocampo

Uno de los mecanismos implicados en la inactivación de SOCE es la oxidación de diversas cisteínas del canal Orai1 por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Holzmann et al., 2015). Por ello, a continuación, determinamos el efecto del envejecimiento y los oligómeros sobre la formación de ROS en cultivos de neuronas de hipocampo. La detección de ROS en neuronas de hipocampo se llevó a cabo con la sonda fluorescente CM-H2DCFDA. Para ello, las neuronas de hipocampo cultivadas a diferentes DIV fueron expuestas al tratamiento con A β_{1-42} (condición experimental) o únicamente a MEM, medio en el que se disuelven los oligómeros de A β (condición control), y se incubaron con la sonda CM-H2DCFDA 2 μ M durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después, se capturaron imágenes de fluorescencia y se analizó la densidad óptica. Los resultados mostraron cómo la formación de ROS aumenta de forma significativa con el tiempo de cultivo. Además, el tratamiento con A β_{1-42} aumenta aún más la formación de ROS, aunque este efecto solo se observa en neuronas envejecidas (Figura 73).

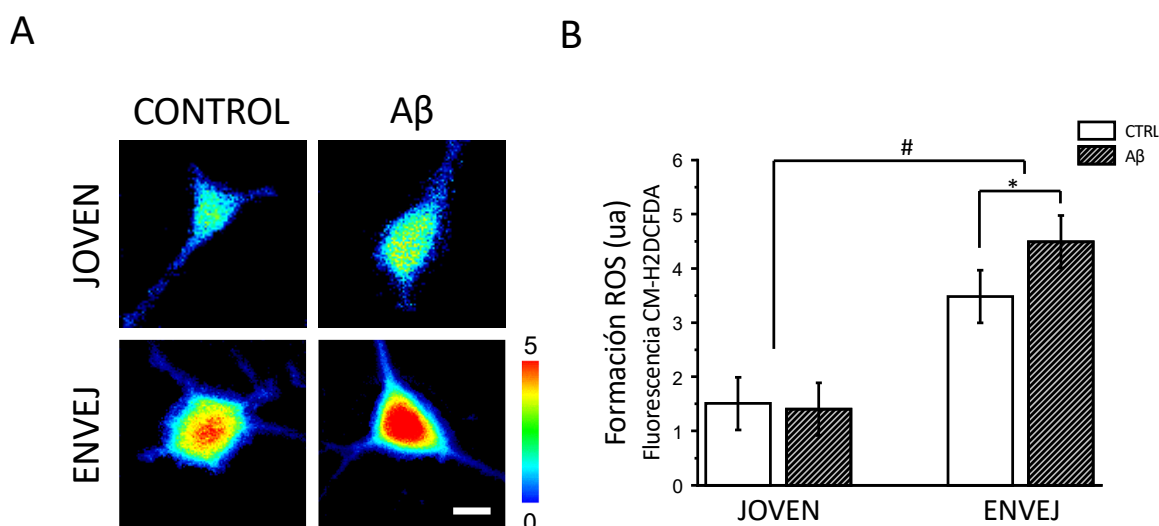


Figura 73. La formación de ROS aumenta con el envejecimiento y con el tratamiento con A β_{1-42} . Las neuronas jóvenes y envejecidas se tratan con A β_{1-42} (1 μ M, 24 h) y después, se incuban con la sonda CM-H2DCFDA 45 minutos y se detecta la formación de ROS en un microscopio de fluorescencia. **A.** Imágenes representativas de fluorescencia en escala *pseudocolor* de la formación de ROS en neuronas de hipocampo. La barra blanca representa 10 μ m. **B.** El gráfico de barras representa la intensidad de fluorescencia en neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas tratadas con A β_{1-42} o vehículo. El tamaño muestral para cada una de las condiciones es 85, 77, 61 y 52, respectivamente, en 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs grupo control. # $p < 0,05$ vs neuronas jóvenes.

1.4 El envejecimiento y el tratamiento con los oligómeros de A β aumenta la colocalización RE-Mitocondria en neuronas de hipocampo

Uno de los aspectos más relevantes de la homeostasis del calcio intracelular es el acoplamiento funcional entre el RE y la mitocondria que puede favorecer la actividad mitocondrial al permitir el flujo continuo de Ca $^{2+}$ entre estos orgánulos subcelulares, aunque también puede favorecer sobrecarga de Ca $^{2+}$ mitocondrial en casos de liberación masiva de Ca $^{2+}$ de los depósitos. Por ello, decidimos investigar el efecto del envejecimiento y de los oligómeros de A β_{1-42} sobre la colocalización entre RE y mitocondria en neuronas de hipocampo.

El estudio de colocalización RE-mitocondria se realizó mediante microscopia confocal. Las neuronas de hipocampo jóvenes y envejecidas tratadas con $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 24 h) se incubaron con las sondas *MitoTracker green* y *ER-Tracker red*. La Figura 74 muestra imágenes representativas de la superposición de la señal en los dos canales: en rojo se marca el retículo y en verde las mitocondrias. El análisis de la colocalización RE-Mitocondria se realizó mediante el análisis de las imágenes de fluorescencia mediante el software *ImageJ* utilizando los coeficientes de colocalización *Manders2* y *Pearson*. Los resultados muestran que la colocalización RE-mitocondria aumenta significativamente en neuronas envejecidas respecto de neuronas jóvenes. Además, el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ aumenta la colocalización tanto en neuronas jóvenes como en envejecidas.

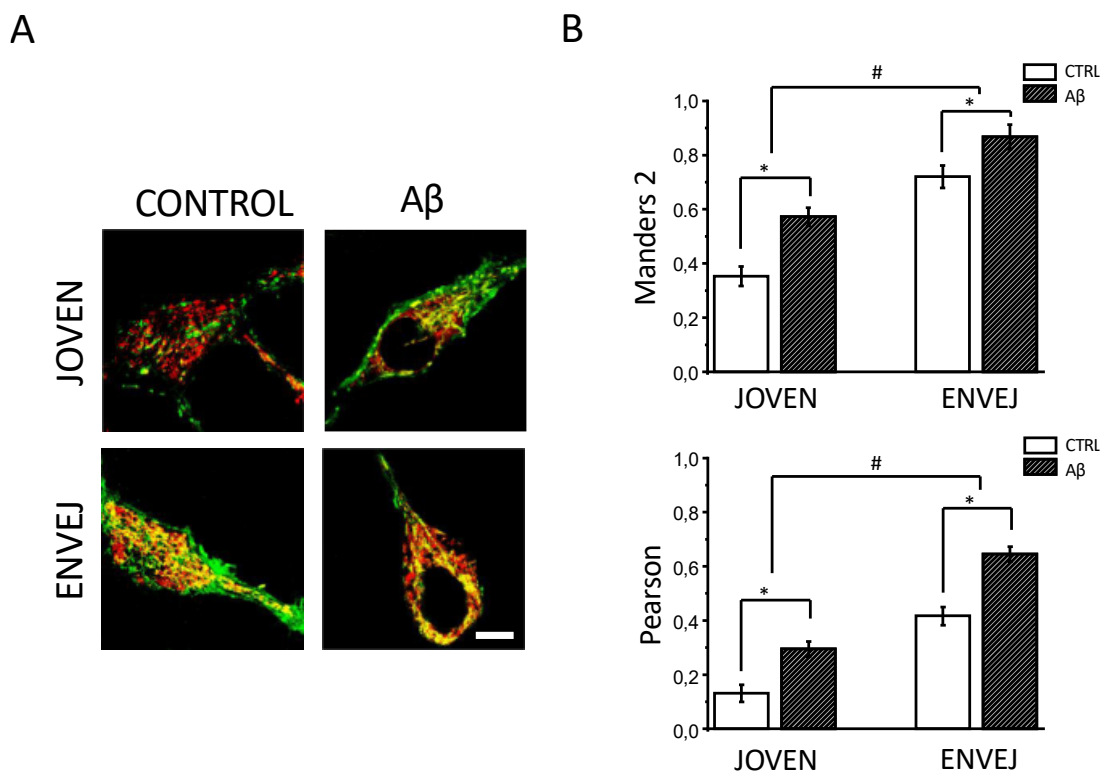


Figura 74. El envejecimiento y el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ aumenta la colocalización RE-Mitocondria en cultivos primarios neuronas de hipocampo. Las neuronas cultivadas a diferentes DIV y tratadas con $A\beta_{1-42}$ se incubaron con la sonda *Mito-Tracker green* y *ER-Tracker red* y después en un microscopio confocal se capturaron imágenes de fluorescencia en ambos canales. **A.** Imágenes representativas de la superposición del canal rojo y verde de neuronas jóvenes y envejecidas expuestas al tratamiento con $A\beta_{1-42}$. La barra blanca representa 10 μ m. **B.** Los gráficos de barras representan los coeficientes de colocalización de *Manders* (arriba) y *Pearson* (abajo) obtenidos mediante la cuantificación de las imágenes de fluorescencia. El tamaño muestral para cada una de las condiciones es 84, 81, 60 y 57, respectivamente, en 4 experimentos independientes. *p<0,05 vs grupo control. #p<0,05 vs. neuronas jóvenes.

1.5 Efecto del envejecimiento y los oligómeros de A β sobre la expresión de receptores de IP₃ en neuronas de hipocampo

Los IP₃R desempeñan un papel clave en numerosas funciones biológicas básicas tales como la división celular, la diferenciación, la fertilización y la muerte celular. Además, también participan en procesos del desarrollo que incluyen el aprendizaje, la memoria y el comportamiento. En mamíferos, se han descrito hasta 3 isoformas de IP₃R, siendo la isoforma IP₃R1 la más predominante. Por todo ello, no es de extrañar que alteraciones en la actividad de los IP₃R puedan contribuir en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Huntington y enfermedad de Alzheimer. En consecuencia, nos propusimos estudiar el posible papel del remodelado de los receptores de IP₃ en neuronas de hipocampo durante el envejecimiento y enfermedad de Alzheimer (Egorova & Bezprozvanny, 2018).

1.5.1 Efecto del envejecimiento sobre la expresión de isoformas del IP₃R

La Figura 75 muestra imágenes de fluorescencia de neuronas de hipocampo cultivadas a diferentes DIV, en las cuales se evaluó la expresión de IP₃R mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpos específicos para cada una de las isoformas (IP₃R1, IP₃R2 e IP₃R3). La cuantificación de la densidad óptica de las imágenes de fluorescencia permitió identificar un aumento significativo de la expresión de las tres isoformas del IP₃R durante el envejecimiento neuronal *in vitro*. Estos resultados podrían contribuir a explicar los resultados observados a nivel funcional en los cuales se observa una mayor entrada de Ca²⁺ al interior de la mitocondria tras la estimulación con ACh y la consiguiente mayor liberación de Ca²⁺ desde el RE. Además, también podrían explicar el mayor acoplamiento o, mejor dicho, colocalización RE-mitocondria en el envejecimiento (Calvo-Rodriguez et al., 2019).

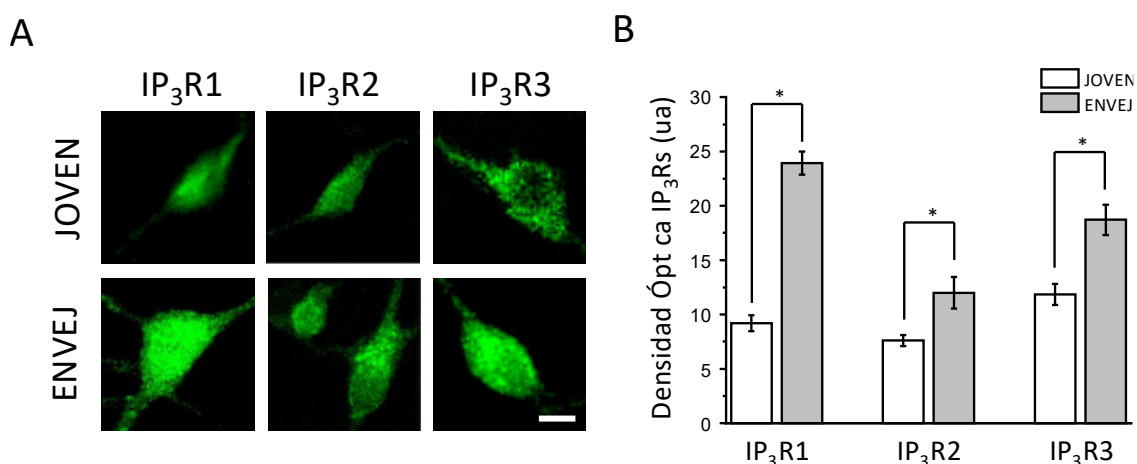


Figura 75. La expresión de las tres isoformas del IP₃R aumenta con el envejecimiento neuronal. A. Imágenes de fluorescencia representativas de la detección de las diferentes isoformas de IP₃R (IP₃R1, IP₃R2 e IP₃R3) en neuronas de hipocampo cultivadas entre 6-8 DIV (jóvenes) y 18-21 DIV (envejecidas). **B.** Los gráficos de barras muestran la densidad óptica para cada una de las isoformas en neuronas jóvenes y envejecidas. El tamaño muestral para cada una de las condiciones es 34, 15, 39, 10, 29, 14, respectivamente, en 4 experimentos independientes. *p<0,05 vs. neuronas jóvenes.

1.5.2 Efecto de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ sobre la expresión de los receptores de IP_3 en neuronas de hipocampo

Una vez comprobado que durante el envejecimiento aumenta la expresión de las tres isoformas del IP_3R , nos planteamos estudiar si el tratamiento de las neuronas con $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 24 h) es capaz de afectar sus niveles de expresión. Para ello, los cultivos de neuronas jóvenes y envejecidas se exponen al tratamiento con $A\beta_{1-42}$ 1 μ M en MEM durante 24 h (condición experimental) o únicamente con MEM (condición control). Posteriormente, se evaluó la expresión de las distintas isoformas del IP_3R mediante inmunofluorescencia en neuronas de hipocampo. Los resultados mostraron que el tratamiento de las neuronas con $A\beta_{1-42}$ no afectó a la expresión de IP_3R1 e IP_3R3 (datos no mostrados) y únicamente afectó a la expresión de la isoforma IP_3R2 , de tal manera que disminuye la expresión de esta en neuronas jóvenes expuestas al tratamiento con $A\beta_{1-42}$ (Figura 76).

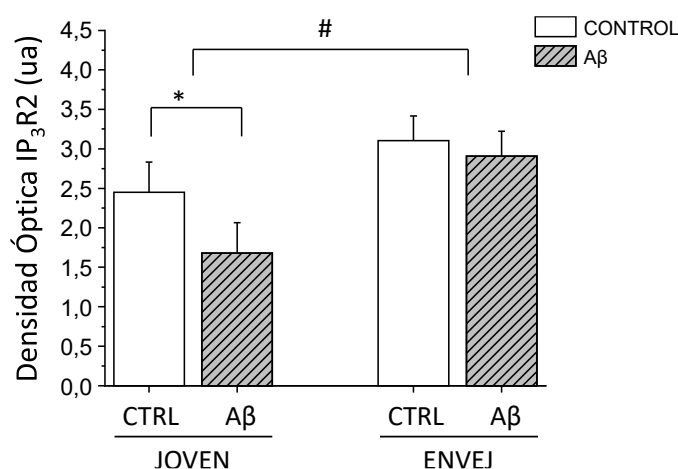


Figura 76. El tratamiento con $A\beta_{1-42}$ disminuye la expresión de IP_3R2 en neuronas de hipocampo jóvenes. El gráfico de barras muestra la cuantificación de la expresión del IP_3R2 en neuronas de hipocampo con el envejecimiento *in vitro* en presencia de $A\beta_{1-42}$. El tamaño muestral para cada una de las condiciones es 163, 121, 82, 92, respectivamente, en 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs grupo control. # $p < 0,05$ vs. neuronas jóvenes.

1.6 Efecto del envejecimiento sobre la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 enjaulado

En los apartados anteriores, observamos que la expresión de las tres isoformas del IP_3R aumenta con la edad del cultivo. Sin embargo, la exposición a los oligómeros de $A\beta$ sólo afecta a la expresión de la isoforma IP_3R2 en neuronas jóvenes. Además, anteriormente, nuestro grupo describió que el contenido de los depósitos de Ca^{2+} en reposo aumenta con el envejecimiento (Calvo-Rodríguez et al., 2020). Por ello, nos planteamos estudiar la funcionalidad de los IP_3R durante el envejecimiento y el efecto de $A\beta_{1-42}$.

Para estudiar la actividad de los IP_3R se analizó la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos de Ca^{2+} inducida por el compuesto *caged-IP₃* o IP_3 enjaulado, mediante microscopia confocal. La fotólisis de esta molécula por luz ultravioleta libera la molécula biológicamente activa, IP_3 , la cual se une a sus receptores, los IP_3R , provocando la liberación de Ca^{2+} desde el RE.

Las neuronas cultivadas a diferentes DIV se trataron durante 24 h con $A\beta_{1-42}$ 1 μ M en MEM (condición experimental) o sólo con MEM (condición control). A continuación, las células se incubaron durante 1 h con el compuesto *caged-IP₃* (3 μ M) y la sonda fluorescente de Ca^{2+} Fluo-4/AM (2 μ M), tras lo cual se registró la $[Ca^{2+}]_{cit}$ con un equipo de microscopía confocal el cual nos permitió controlar la intensidad y la duración de la excitación. Además, con el fin de monitorizar únicamente la liberación de Ca^{2+} desde el RE y eliminar posibles entradas de Ca^{2+} a través de otros canales de la MP durante el registro, se añadió a las células medio MEC junto con un coctel de inhibidores CIC (Figura 77). En la Figura 77 puede observarse como las neuronas de hipocampo se estimulan tras producirse la fotólisis del *caged-IP₃*, pues se registra un aumento del $[Ca^{2+}]_{cit}$ como consecuencia de la liberación de Ca^{2+} desde el RE. Sin embargo, se observó que no todas las células responden tras producirse la liberación de la molécula de IP_3 ; de hecho, se ha visto que el porcentaje de células que responde depende tanto de la edad del cultivo como del tratamiento con $A\beta_{1-42}$.

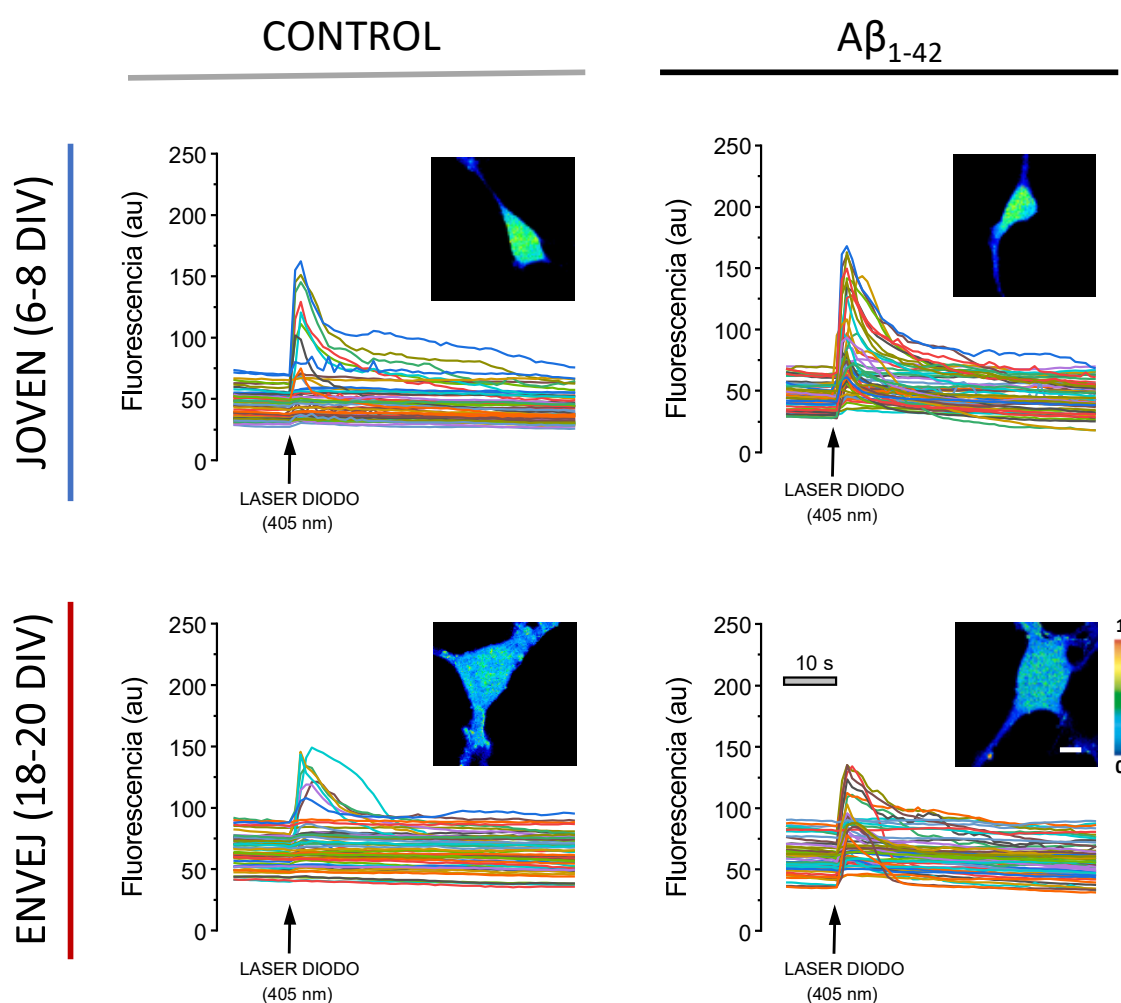


Figura 77. La liberación de Ca^{2+} a través de los IP_3R disminuye con el envejecimiento. Las neuronas cultivadas a diferentes días *in vitro* y expuestas al tratamiento con $A\beta_{1-42}$, se cargan con Fluo-4/AM y *caged IP₃*. La liberación del IP_3 enjaulado se produce al incidir con luz láser de 405 nm en el microscopio confocal **A**. Imágenes de fluorescencia codificadas en *pseudocolor* tras la fotólisis del IP_3 enjaulado. **B**. Registros representativo de fluorescencia de neuronas de hipocampo jóvenes (fila superior) y envejecidas (fila inferior) en condiciones control (columna izquierda) y tratadas con $A\beta_{1-42}$ (columna derecha).

Los resultados muestran que, por un lado, en cultivos jóvenes se observa que cerca del 70 % de neuronas responden al estímulo de IP_3 , mientras que el porcentaje de respuesta se reduce a la mitad en cultivos envejecidos. Por otro lado, el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ aumenta el porcentaje de células que responden tanto en neuronas jóvenes como en envejecidas (Figura 78A). El análisis del área bajo la curva y el incremento de Ca^{2+} producido durante 60 segundos tras la liberación de la molécula de IP_3 de las células que se activan reveló que la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de los IP_3R es menor en neuronas de hipocampo envejecidas y, además, que el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ no afecta a dicha liberación (Figura 78B, C).

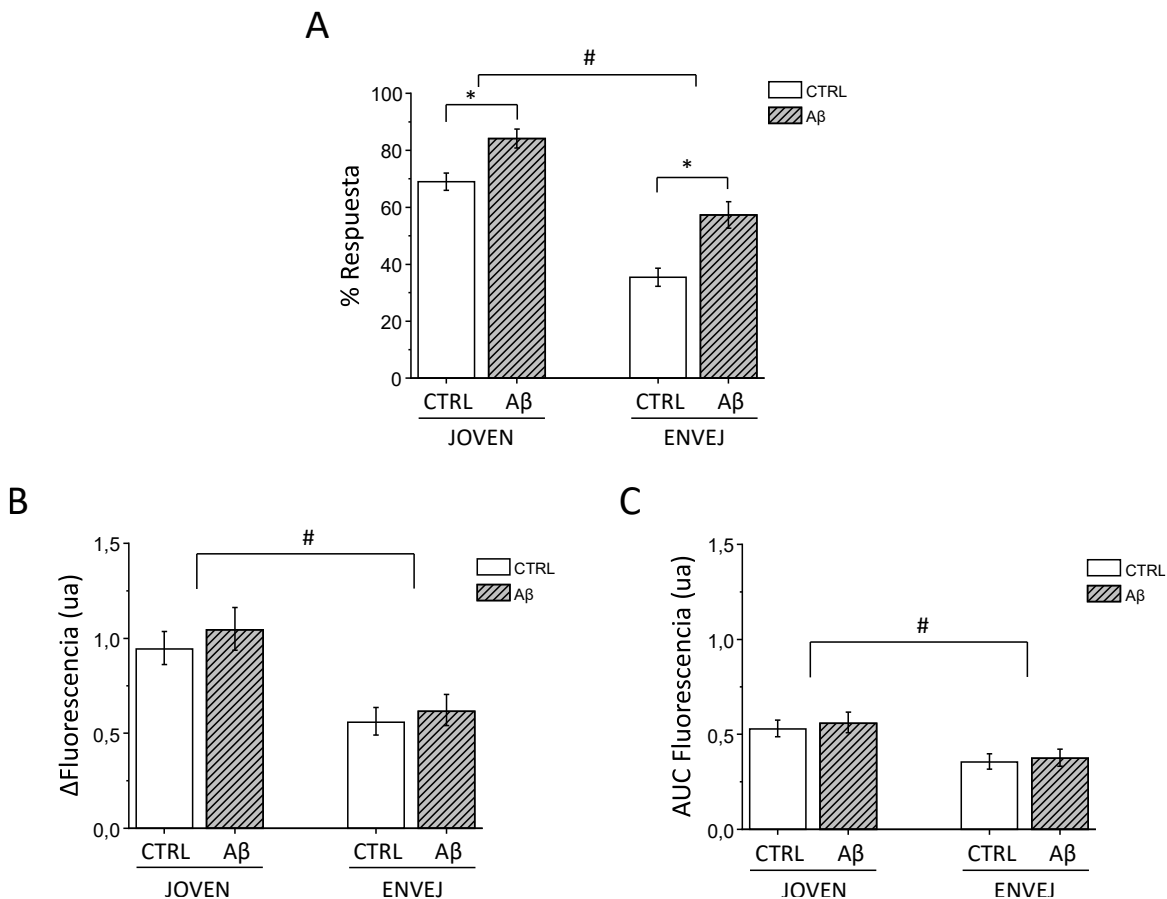


Figura 78. El porcentaje de células que responden a IP_3 cambia con el envejecimiento y con $A\beta_{1-42}$. A. Las barras muestran el porcentaje de neuronas jóvenes y envejecidas, control (barras blancas) y expuestas a $A\beta_{1-42}$ (barra en color gris) que responden a la molécula IP_3 . B y C. Las barras representan el área bajo la curva durante 60 segundos tras la liberación de IP_3 y el incremento máximo respectivamente en neuronas de hipocampo a diferentes DIV y expuestas a $A\beta_{1-42}$. El tamaño muestral para cada una de las condiciones es 253, 220, 141 y 114 células, respectivamente, en 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs grupo control. # $p < 0,05$ vs neuronas jóvenes.

Por tanto, en resumen, los resultados muestran que el tiempo de cultivo, un proceso que se ha asociado al envejecimiento neuronal en cultivos primarios de hipocampo de rata neonata, aumenta la expresión de receptores de IP_3 , la colocalización ER-mitocondria y la formación de ROS, pero disminuye la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE), la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 y el potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Los oligómeros de $A\beta$, la neurotoxina asociada a la enfermedad de Alzheimer, en general potencian los efectos del envejecimiento sobre todos los parámetros estudiados, excepto sobre la expresión y actividad de los receptores de IP_3 , donde los oligómeros producen los efectos contrarios al envejecimiento aumentando la liberación de Ca^{2+} de los depósitos, incluso en neuronas jóvenes.

2 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL REMODELADO DEL Ca^{2+} EN EL ENVEJECIMIENTO NEURONAL

El siguiente paso lógico que nos planteamos en esta línea de investigación fue estudiar si las alteraciones que observamos a nivel funcional en nuestro modelo de envejecimiento se correlacionan o pueden ser explicados con lo que ocurre a nivel transcriptómico. Para ello, decidimos estudiar todo el transcriptoma en nuestro modelo de envejecimiento. En particular, nos centramos en la expresión diferencial de genes entre neuronas envejecidas respecto de neuronas jóvenes mediante la técnica genómica de microarrays; en concreto, los microarrays *Clariom D Rat de Affimetrix*.

El diseño experimental seguido fue más complejo de lo esperado pues, tras muchos intentos, el aislamiento de las neuronas no fue posible. No obstante, sí que pudieron aislarse las glías, por lo que, de forma indirecta, se resolvió el problema de estudiar la expresión diferencial en neuronas. Así, el diseño experimental llevado a cabo es el mostrado en la Figura 79. Consta de dos factores fijos: el factor fijo *Edad*, con dos niveles (joven y envejecido), y el factor fijo *tipos celulares* presentes en el cultivo, con dos niveles (mixto y enriquecido en glías). Además, dado que se realizaron todas las combinaciones de los niveles de los factores fijos a partir de un mismo cultivo, la estructura de los datos pasó a ser jerárquica o multinivel, lo que hace que exista un factor aleatorio “*procedencia del cultivo*” (agrupa las muestras procedentes de un mismo cultivo), el cual hay que tener en cuenta en el análisis como tal ya que, de lo contrario, las inferencias obtenidas no serían fiables. Por ello, se emplearán modelos lineales mixtos para el análisis de los datos.

Las células de hipocampo de rata se sembraron sobre cubreobjetos y se cultivaron durante diferentes periodos o días *in vitro* (DIV), considerando cultivos jóvenes aquellos que se mantienen entre 6-8 DIV y cultivos envejecidos los de entre 18-21 DIV. Como ya se ha mencionado anteriormente, los cultivos de hipocampo son cultivos mixtos y, dado que nuestro interés se centra en el estudio de las neuronas, fue necesario asilar los tipos celulares. Además, como ya se ha dicho anteriormente, aislar las neuronas no fue una opción, pues no son viables sin las glías. Por ello, se siguió la siguiente estrategia: tanto en los cultivos mixtos jóvenes como en los envejecidos, el día previo a la extracción de ARN, en la mitad de los cubreobjetos del cultivo, se eliminaron las neuronas. De esta manera, ahora se tienen cultivos jóvenes y envejecidos, tanto enriquecido en glías como mixtos. En particular, esto se hace porque, para poder evaluar la expresión en las neuronas presentes en los cultivos mixtos, y ante la imposibilidad de eliminar las glías de los cultivos. Por lo tanto, por cada cultivo mixto se obtuvo, también, el correspondiente cultivo enriquecido en glías en las mismas condiciones. (Figura 79). La eliminación de las neuronas se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado “2.10. Enriquecimiento de glías en cultivos de hipocampo”. Posteriormente, mediante una doble inmunofluorescencia, se comprobó la eficacia de eliminación de neuronas a través del análisis del porcentaje de neuronas y glías presentes en cada cultivo.

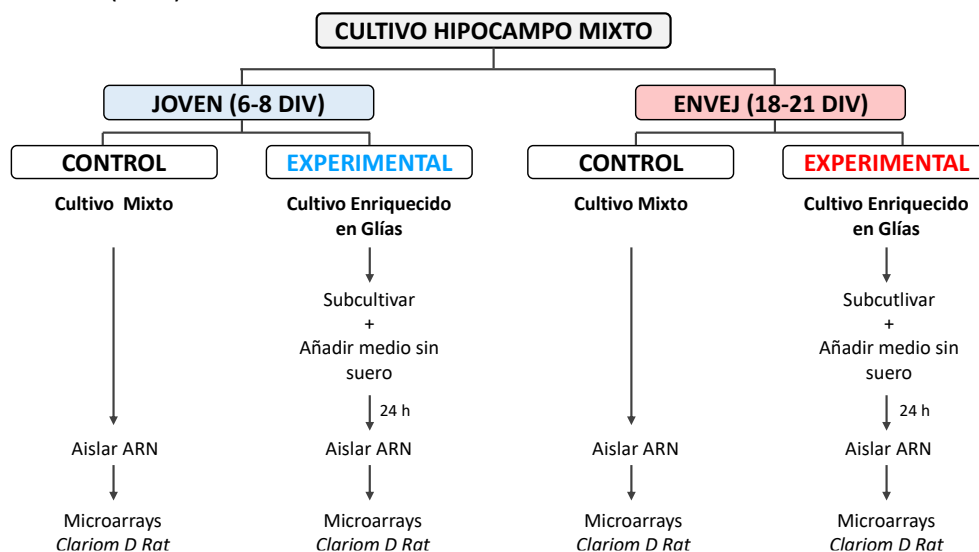


Figura 79. Diseño experimental del análisis transcriptómico del envejecimiento neuronal *in vitro*. A partir de los cultivos de hipocampo mixto cultivados a diferentes DIV, en parte de los cubreobjetos se eliminaron las neuronas obteniendo así cultivos enriquecidos en glías. Tras la obtención de las cuatro condiciones experimentales: joven mixto, joven enriquecido en glías, envejecido mixto y envejecido enriquecido en glías, se extrajo el ARN para la posterior realización de microarrays.

En la Figura 80 se muestra la cuantificación del porcentaje de neuronas presentes en los diferentes cultivos, confirmándose que la eliminación de las neuronas en los cultivos enriquecidos en glías es satisfactoria. De esta forma, se obtuvieron cuatro condiciones experimentales: cultivo joven mixto (JM), cultivo joven enriquecido en glías (JG), cultivo envejecido mixto (VM) y cultivo envejecido enriquecido en glías (VG). Por lo tanto, se tienen dos variables independientes fijas: i) la edad del cultivo: joven (6-8 DIV) y envejecido (18-21 DIV), ii) tipo celular: cultivo mixto (control) y cultivo enriquecido en glía (experimental). Tras extraer el ARN, cuantificar y analizar su calidad, las muestras se enviaron al Centro CABIMER, donde se realizaron los microarrays, el cual nos envió los datos crudos sin procesar en formato .CEL. Así, en el propio laboratorio se llevó a cabo el análisis completo de los datos. Cabe destacar que el tamaño muestral del experimento fue balanceado, $N_{JM}=N_{JG}=N_{VM}=N_{VG}=3$. Además, también es importante remarcar que las cuatro condiciones experimentales se obtienen del mismo cultivo.

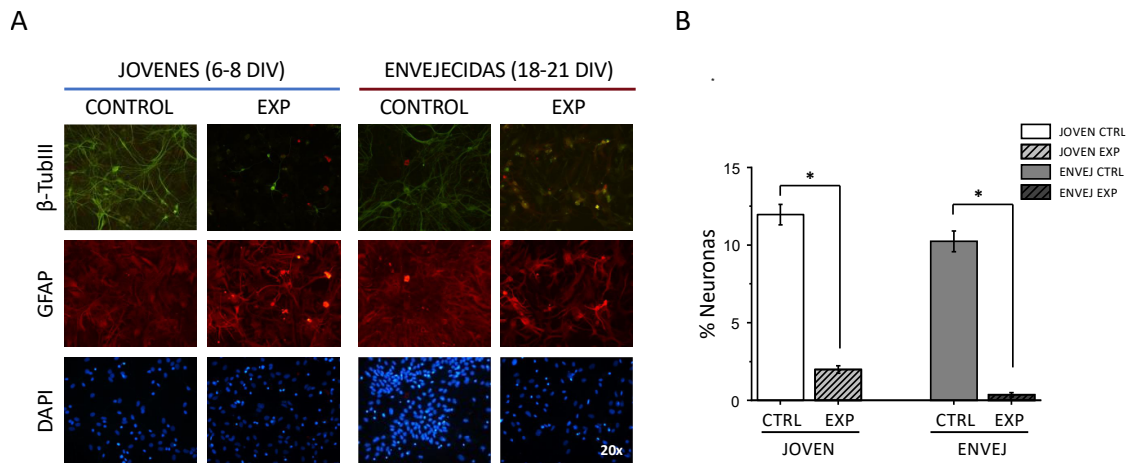


Figura 80. El porcentaje de neuronas disminuye significativamente en los cultivos enriquecidos en glías. A partir de cultivos de hipocampo mixtos jóvenes y envejecidos se eliminan las neuronas obteniendo así cultivos enriquecidos en glías. **A.** Imágenes representativas de una doble inmunofluorescencia en la que se marcan las neuronas con β -tubulina III (en verde) y las glías con GFAP (en rojo). Los núcleos se tiñen con DAPI (en azul). **B.** El gráfico de barras muestra la cuantificación del porcentaje de neuronas presente en cada condición experimental. * $p < 0,05$ vs grupo control. El número de experimentos en cada una de las condiciones es 6 para los cultivos jóvenes y 5 para los envejecidos, 4 de los cuales, para condición experimental, se corresponden con las muestras enviadas para el análisis transcriptómico. El número de células en cada condición es: 8684 para jóvenes mixto; 14218 para jóvenes enriquecidos en glías; 7845 para envejecidas mixto, y 7718 para envejecidas enriquecidas en glías.

El análisis de los datos comenzó con la lectura y preprocesado de los datos, por lo que, tras ser “leídos” por el *software R*, se sometieron a un control de calidad con el fin de identificar posibles *outliers* y, en el caso de que hubiera alguno, eliminarlos del análisis. Afortunadamente, no se identificó ningún *outliers*, tal y como puede observarse en el análisis de componentes principales (ACP) (Figura 81) ya que las muestras se agrupan en los 4 grupos esperados. En primer lugar, según el tipo celular presente en el cultivo (mixto o enriquecido en glías) y, en segundo lugar, según la edad (joven o envejecido).

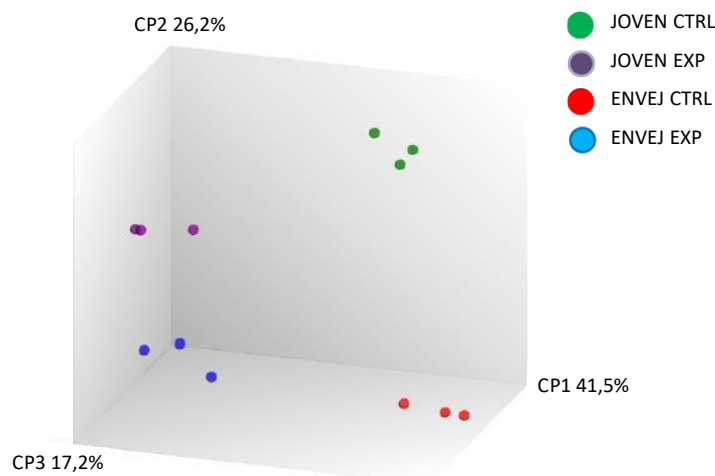


Figura 81. Análisis de componentes principales. El diagrama del ACP muestra como las muestras se agrupan en 4 grupos. La CP1 (eje X), la componente que mayor variabilidad explica agrupa a las muestras atendiendo al tipo celular presente en el cultivo (mixto o enriquecido en glías), la CP2 (eje y) lo hace según la edad del cultivo (joven o envejecido). En el diagrama se representan con círculos verdes las muestras de cultivo joven mixto, en morado los cultivos jóvenes enriquecidos en glías, en rojo los cultivos envejecidos mixtos y en azul los cultivos envejecidos enriquecidos en glías.

A continuación, se corrigió el ruido de fondo, se normalizaron los datos y se resumieron los valores de los conjuntos de sondas mediante el método RMA, obteniendo así la matriz de expresión del experimento. Una vez obtenida la matriz de expresión se realizó un filtrado no selectivo de los genes con el fin de descartar los genes que, o bien no se expresan, o bien no muestran variación suficiente a lo largo de las diferentes muestras como para considerar que haya una expresión diferencial. De esta forma se obtiene una nueva matriz de expresión sobre la que se ajustó un modelo lineal empleando el método limma con el fin de llevar a cabo el análisis de expresión diferencial de todos los genes presentes tras el filtrado. Posteriormente, también se realizó el análisis de significación biológica el cual puede dividirse en dos partes: por un lado, se analizaron los perfiles de expresión y, por otro lado, se realizó un análisis de enriquecimiento de genes.

2.1 Análisis de la expresión diferencial entre neuronas envejecidas y jóvenes

A partir de la matriz de expresión obtenida tras el filtrado, se realizó el análisis de expresión diferencial mediante el método limma, de tal forma que se consideraron como genes diferencialmente expresados (DEG) aquellos cuyo $FDR < 0,05$ (p valor ajustado). Así, se obtuvo que, de los 17.308 genes que quedaron tras el filtrado, 5.380 mostraron un cambio en su nivel de expresión con el tiempo de cultivo o envejecimiento neuronal (Tabla 11; Figura 82).

Tabla 11. Resumen de los DEG en neuronas de hipocampo envejecidas

	Genes Totales			Genes Homeostasis Ca^{2+}	
	Total	Post-filtrado	DEG	Total Post-filtrado	DEG
Nº genes	70.580	17.308	5.380	121	33

En cuanto a los genes relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, de los 121 que quedaron tras el filtrado, 33 de ellos mostraron expresión diferencial. En concreto, 18 vieron disminuida su expresión con el envejecimiento mientras que 15 la aumentaron (Figura 82).

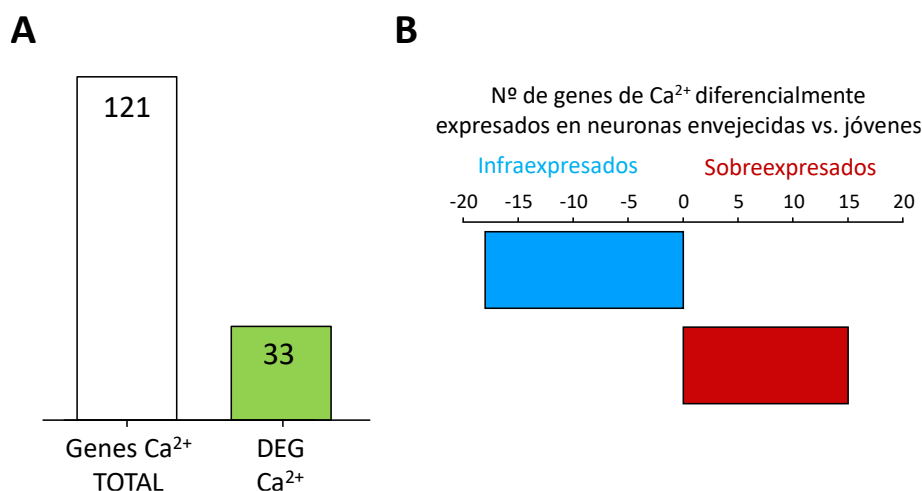


Figura 82. Número de genes diferencialmente expresados en neuronas de hipocampo envejecidas. A. El gráfico de barras muestra el número de genes diferencialmente expresados (DEG) en las neuronas de hipocampo envejecidas respecto de neuronas jóvenes (barra blanca) así como únicamente los relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} (verde). B. El gráfico muestra los genes implicados en el transporte del Ca^{2+} intracelular que están infraexpresados (en azul) y sobreexpresados (en rojo) en neuronas de hipocampo envejecidas vs. las jóvenes.

A continuación, dividida por familias, se muestra la expresión diferencial de los genes relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En la Figura 83 se muestra el análisis transcriptómico de la expresión diferencial de los genes que codifican para las familias de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCC) y bombas e intercambiadores de Ca^{2+} .

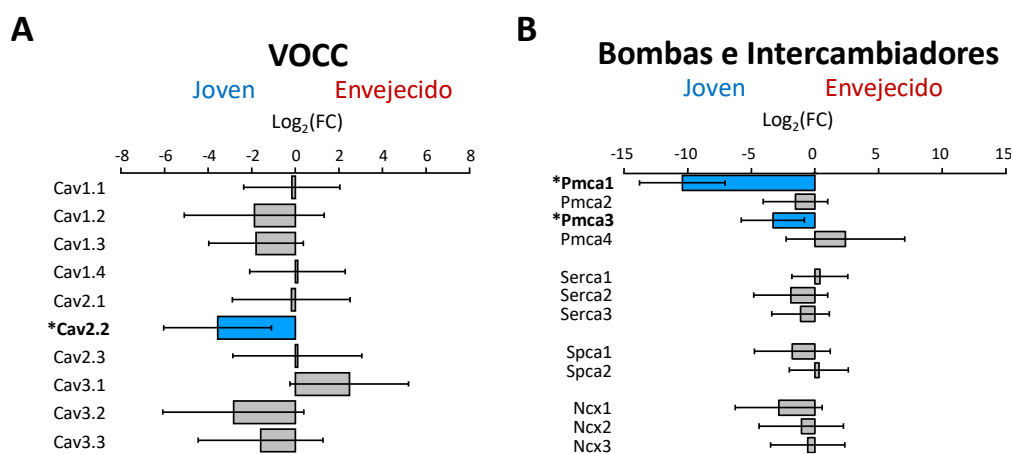


Figura 83. Expresión diferencial de los genes de la familia VOCC (A) y de bombas e intercambiadores de Ca^{2+} (B) en neuronas de hipocampo envejecidas vs. neuronas jóvenes. Los valores de expresión diferencial obtenidos mediante el método limma se representan en un diagrama de barras en horizontal. Las barras azules hacia la izquierda indican una menor expresión en neuronas de hipocampo envejecidas respecto de las neuronas jóvenes, mientras que en rojo hacia la derecha indican una mayor expresión. Los genes representados en barras grises no muestran expresión diferencial. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. neuronas jóvenes.

En particular, por un lado, de entre todos los genes que codifican para los VOCC, únicamente se observa infraexpresión del gen *Cav2.2* en neuronas envejecidas respecto de las neuronas jóvenes, el canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo N (Figura 83A). Por otro lado, únicamente se identifica la infraexpresión de los genes que codifican para las bombas *Pmca1* y 3 en neuronas envejecidas frente a neuronas de hipocampo jóvenes (Figura 83B).

En cuanto a los genes que codifican para los miembros de la familia de receptores de glutamato, tanto NMDA como No NMDA, se identificó la sobreexpresión del gen *GluK4*, el receptor de kainato tipo IV en neuronas de hipocampo envejecidas (Figura 84).

Receptores de glutamato

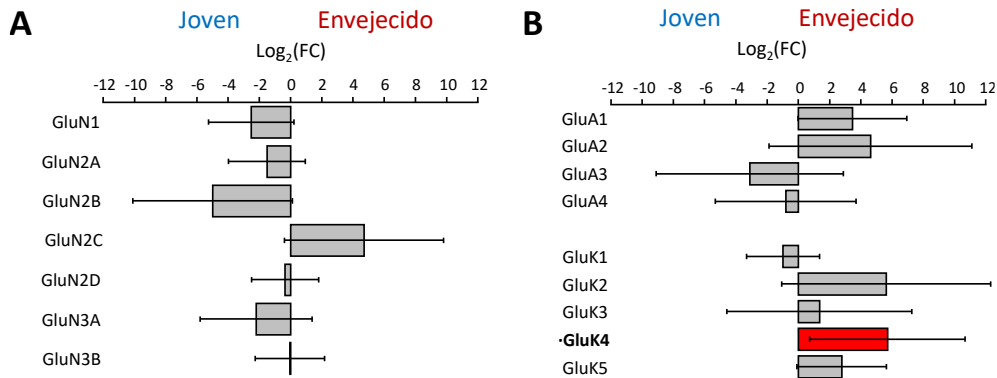


Figura 84. Expresión diferencial de los genes que codifican para los receptores de glutamato NMDA (A) y No NMDA (B) en neuronas de hipocampo envejecidas vs jóvenes. Los valores de expresión diferencial obtenidos mediante el método limma se representan en un diagrama de barras en horizontal. Las barras azules hacia la izquierda indican una menor expresión en neuronas de hipocampo envejecidas respecto de las neuronas jóvenes, mientras que en rojo hacia la derecha indican una mayor expresión. Los genes representados en barras grises no muestran expresión diferencial. * $p < 0,05$, $p < 0,01$ vs. neuronas jóvenes.

Respecto a los receptores de acetilcolina (ACh) y purinérgicos, se ha observado una mayor expresión de los genes que codifican para los receptores muscarínicos de ACh *Chrm1*, 2 y los receptores purinérgicos *P2X5* y *P2Y4*. Por el contrario, el envejecimiento disminuye la expresión de los genes que codifican para los receptores muscarínicos de ACh *Chrm3*, *Chrna7* y el receptor purinérgico *P2Y1* (Figura 85).

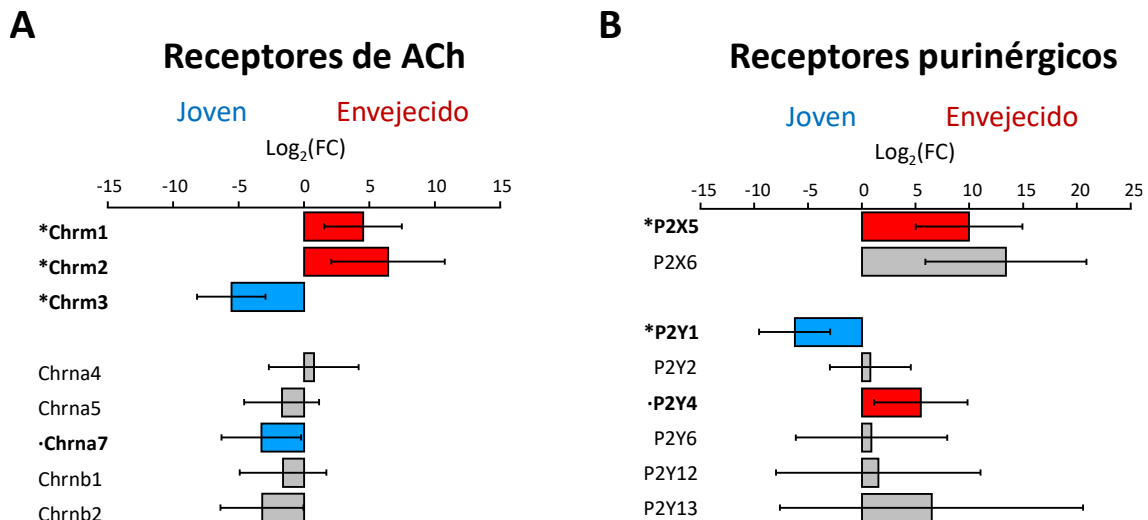


Figura 85. DEG de la familia de genes que codifican para los receptores de Ach (A) y los receptores purinérgicos (B) en neuronas de hipocampo envejecidas. Los valores de expresión diferencial obtenidos mediante el método limma se representan en un diagrama de barras en horizontal. Las barras azules hacia la izquierda indican una menor expresión en neuronas de hipocampo envejecidas respecto de las neuronas jóvenes, mientras que en rojo hacia la derecha indican una mayor expresión. Los genes representados en barras grises no muestran expresión diferencial. * $p < 0,05$, $p < 0,01$ vs. neuronas jóvenes.

En cuanto a los genes de la superfamilia de canales tipo *Transient Receptor Potential* (TRP), se ha detectado la sobreexpresión de 2 de ellos, *Trpm2* y *Trpm3*, de la familia de los canales tipo melastatina, canales relacionados con la sensibilidad a ROS y a la fatiga crónica respectivamente. Por otro lado, se observa una infraexpresión del gen *Trpm13* en neuronas envejecidas frente a neuronas jóvenes de hipocampo, un canal de la familia de las mucolipinas que se ha relacionado con la actividad lisosomal (Figura 86).

TRP

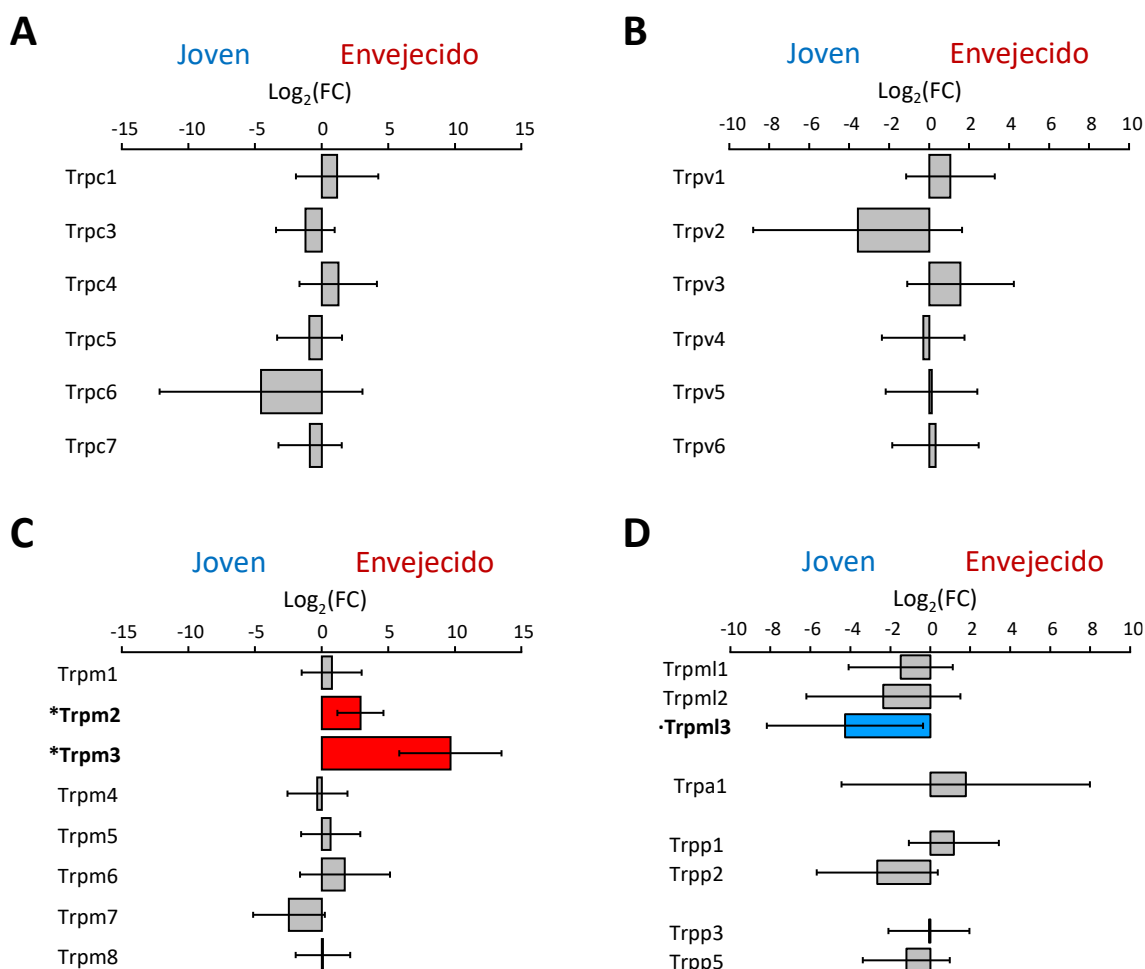


Figura 86. Expresión diferencial de la superfamilia de los TRP en neuronas de hipocampo envejecidas. Se muestran los diferentes genes divididos en las familias de los *Trpc* (A), *Trpv* (B), *Trpm* (C) y *Trpm1*, *Trpa* y *Trpp* (D). Los valores de expresión diferencial obtenidos mediante el método limma se representan en un diagrama de barras en horizontal. Las barras azules hacia la izquierda indican una menor expresión en neuronas de hipocampo envejecidas respecto de las neuronas jóvenes, mientras que en rojo hacia la derecha indican una mayor expresión. Los genes representados en barras grises no muestran expresión diferencial. * $p < 0,05$, $p < 0,01$ vs. neuronas jóvenes.

Respecto a los genes implicados en SOCE y sus reguladores, de los 22 genes estudiados, 10 de ellos muestran expresión diferencial. Por un lado, se identifica la sobreexpresión de los genes *Orai2* y *Stim1*, que codifican para las dos principales moléculas implicadas en SOCE en neuronas, así como de los reguladores *Saraf*, *Mbp* y la *Septin4* en neuronas de hipocampo envejecidas respecto de las neuronas jóvenes. Por otro lado, se detecta la infraexpresión de diferentes septinas consideradas moduladoras de SOCE, incluyendo las *Septin2*, *7*, *9*, *10* y *11* (Figura 87).

SOCE

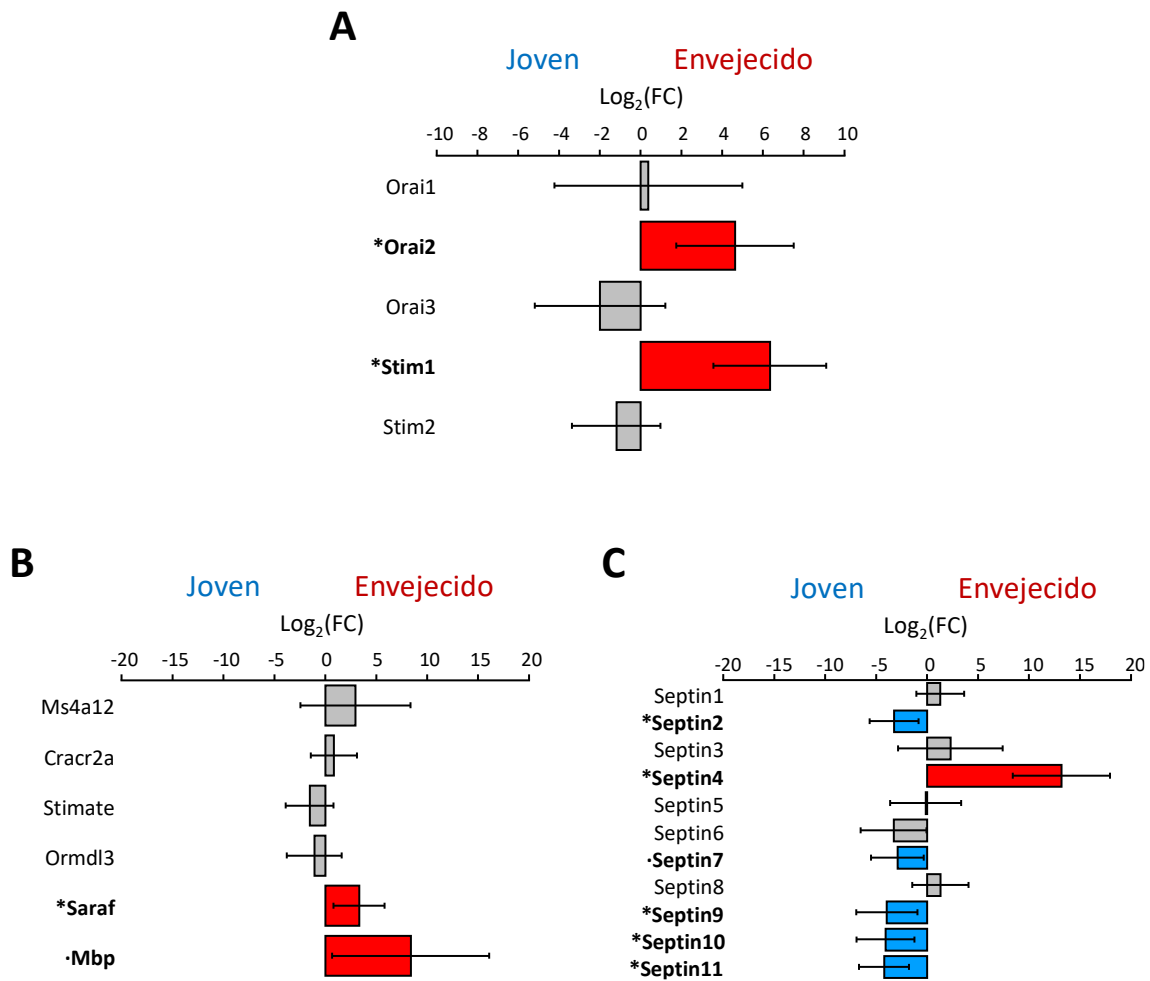


Figura 87. Expresión diferencial de los genes implicados en SOCE (A) y sus reguladores (B y C) en neuronas de hipocampo envejecidas frente a neuronas jóvenes. Los valores de expresión diferencial obtenidos mediante el método limma se representan en un diagrama de barras en horizontal. Las barras azules hacia la izquierda indican una menor expresión en neuronas de hipocampo envejecidas respecto de las neuronas jóvenes, mientras que en rojo hacia la derecha indican una mayor expresión. Los genes representados en barras grises no muestran expresión diferencial. * $p < 0,05$, $p < 0,01$ vs. neuronas jóvenes.

Respecto a la expresión diferencial de los genes implicados en el transporte de Ca^{2+} en orgánulos subcelulares como el RE y las mitocondrias, se puede observar un gran remodelado. Por un lado, en el RE se sobreexpresan dos isoformas del IP_3R , *Ip3r1* y 2, y de la isoforma 3 del RyR, *Ryr3*, mientras que se infraexpresa la isoforma 2 del receptor de RyR, *Ryr2*. Por otro lado, en la mitocondria se identifica la infraexpresión en 6 de los 11 genes estudiados: una disminución significativa de los genes *Mcu*, *Micu2*, y de las tres isoformas del canal *Vdac*, *Vdac1-3*, en neuronas de hipocampo envejecidas (Figura 88) que, colectivamente sugieren el aumento de los genes que codifican para canales de liberación de Ca^{2+} del RE y la disminución de genes que codifican para la captación de Ca^{2+} por la mitocondria.

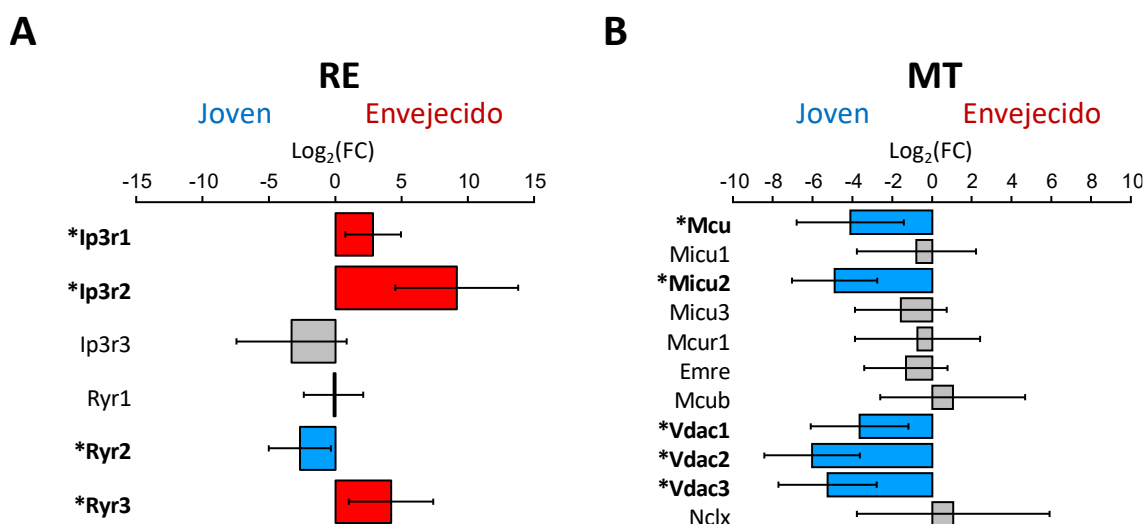


Figura 88. Expresión diferencial de los genes implicados en el transporte de Ca^{2+} del RE (A) y la mitocondria (B) en neuronas de hipocampo envejecidas. Los valores de expresión diferencial obtenidos mediante el método limma se representan en un diagrama de barras en horizontal. Las barras azules hacia la izquierda indican una menor expresión en neuronas de hipocampo envejecidas respecto de las neuronas jóvenes, mientras que en rojo hacia la derecha indican una mayor expresión. Los genes representados en barras grises no muestran expresión diferencial. * $p < 0,05$, $p < 0,01$ vs. neuronas jóvenes.

2.2 Análisis de significación biológica

Los datos mostrados en el apartado anterior sólo hacen referencia al análisis de expresión diferencial de los genes relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, evaluar gen a gen e interpretar el papel de cada uno de ellos puede ser tedioso, sobre todo cuando la lista de DEG es grande. Por ello, el siguiente paso lógico fue realizar un análisis de significación biológica; es decir, analizar de forma conjunta los genes diferencialmente expresados para encontrar un significado a los cambios transcriptómicos observados, no de forma individual, sino en su conjunto.

2.2.1 Perfiles de expresión de las muestras de cultivos de hipocampo

Una de las estrategias para encontrar un significado biológico a la gran lista de genes estudiados que presentan expresión diferencial estudiados en los análisis transcriptómicos es evaluar los perfiles de expresión de las diferentes muestras. De esta manera, es posible encontrar patrones en el comportamiento de las muestras, encontrar agrupaciones entre ellas que, por un lado, permitirán evaluar si se forman agrupaciones dentro de lo esperado (entre diferentes condiciones experimentales) y, por otro lado, encontrar agrupaciones inesperadas que puedan arrojar luz más allá de las hipótesis iniciales. Del mismo modo, también es posible encontrar agrupaciones entre los diferentes genes, lo cual puede aportar una información importante ya que, si varios genes se agrupan de algún modo, estos, en cierto modo, tienen un comportamiento similar en términos de expresión.

En concreto, a través de un mapa de calor de las expresiones normalizadas y transformadas de los diferentes genes en cada una de las muestras, junto con un análisis de clúster jerárquico (método de Ward) tanto a nivel de muestra como de genes como a nivel de muestra, se pueden encontrar agrupaciones entre las muestras y los genes según su mayor o menor similitud entre ellos. En la Figura 89, se observa cómo las muestras se agrupan en 4 grupos según lo esperado

(según las hipótesis iniciales): en primer lugar, las muestras se agrupan atendiendo al tipo celular presente en cada cultivo, y, a continuación, dentro de cada una de estas agrupaciones, aparece otro subgrupo según la edad del cultivo (joven o envejecido). Además, se ve que el factor aleatorio Día no influye en las agrupaciones, lo cual es buena señal ya que así podemos asegurar que no hay un efecto *batch* o factor de confusión debido al día. Este resultado, indica que la calidad de las muestras es buena y que la mayor variabilidad de las muestras viene dada en primer lugar por el tipo celular presente en el cultivo y, en segundo lugar, por la edad de este.

Si analizamos detenidamente los patrones encontrados, puede observarse que en el cultivo enriquecido en glías (condición experimental) hay una menor expresión de la mayoría de los genes. En cuanto al envejecimiento, no se observa un claro patrón de infraexpresión en los cultivos mixtos (control), pero sí en los enriquecidos en glías (experimental). Por otro lado, se observa un cierto patrón, no muy evidente, de infraexpresión de genes con el envejecimiento. En particular, en las neuronas envejecidas respecto de las jóvenes se han identificado 5.380 genes sobre/infraexpresados.

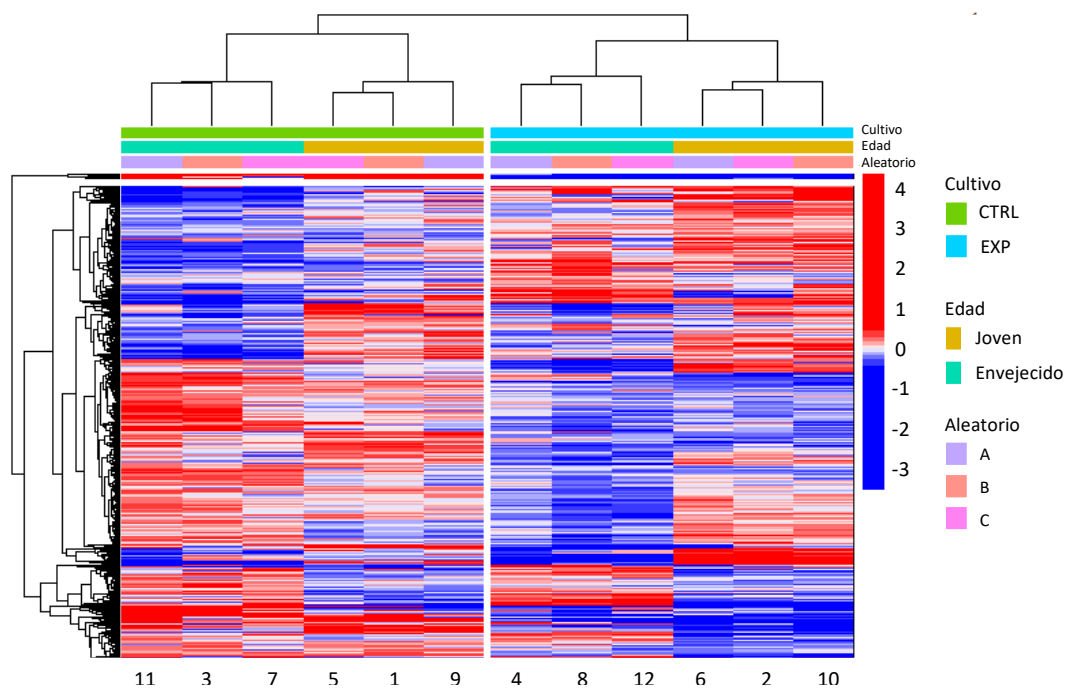


Figura 89. Perfiles de Expresión. El mapa de calor o *HeatMap* representa los valores centrados de la expresión en escala logarítmica. En el eje X se agrupan las diferentes muestras mediante el análisis de clúster jerárquico basado en el método *Ward*. Se observa como las muestras se agrupan en primer lugar atendiendo al tipo celular presente en el cultivo (mixto-control- o enriquecido en glías -experimental-) y en segundo lugar según la edad del cultivo (joven o envejecido). En el eje Y se representa los genes DEG, el color rojo indica sobreexpresión de un gen (filas) en una muestra dada (columna) respecto de la media de los valores de expresión (log de la expresión) de ese mismo gen en las distintas muestras. Por otro lado, en azul se indica la infraexpresión.

2.2.2 Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

Tras el análisis del perfil de expresión, se llevó a cabo el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes a partir de la lista de DEG y consultando diferentes bases de datos como KEGG PATHWAY y GO para encontrar así conjuntos de genes que podrían estar relacionados con el envejecimiento neuronal. De todos los posibles conjuntos de genes, centramos la búsqueda en aquellos que contienen la palabra de interés: *calcium*, *mitochondria*, *reticulum*, *aging*,

neurodegeneration, apoptosis, necrosis, alzheimer, synapsis, synaptic, plasticity, memory, short/long-term potentiation, senescence, transcriptional (Figura 90). De entre todos los conjuntos de genes de interés identificados por estar relacionados con el fenotipo estudiado, el envejecimiento neuronal, se encontraron algunos relacionados con los procesos de memoria, como “long-term potentiation”. También se han encontrado conjuntos de genes relacionados con la sinapsis y procesos de memoria, tales como “synaptic transmission, glutamatergic”, “positive regulation of excitatory postsynaptic potential”, “chemical synaptic transmission” o “regulation of postsynaptic membrane potential”. En relación con la piedra angular de la presente tesis, la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, se han identificado diferentes conjuntos de genes relacionados con el envejecimiento neuronal, tales como “voltage-gated calcium channel activity”, “calcium channel regulator activity”, “calcium ion transmembrane transport” o “regulation of calcium ion transport”. Incluso, conjuntos de genes que involucran tanto la regulación del transporte iónico con los procesos de sinapsis, como “transmitter-gated ion channel activity involved in regulation of postsynaptic membrane potential”.

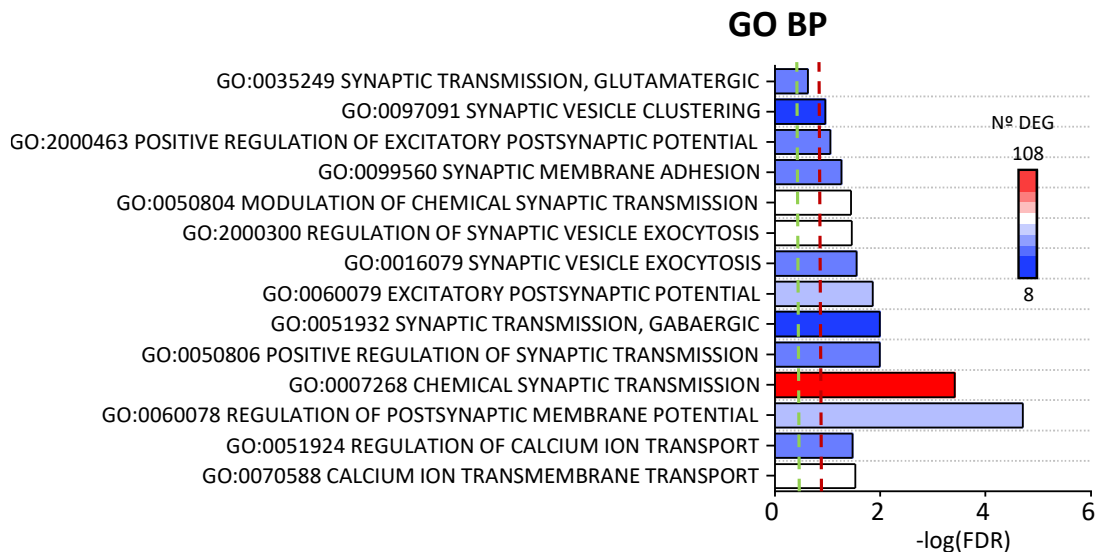
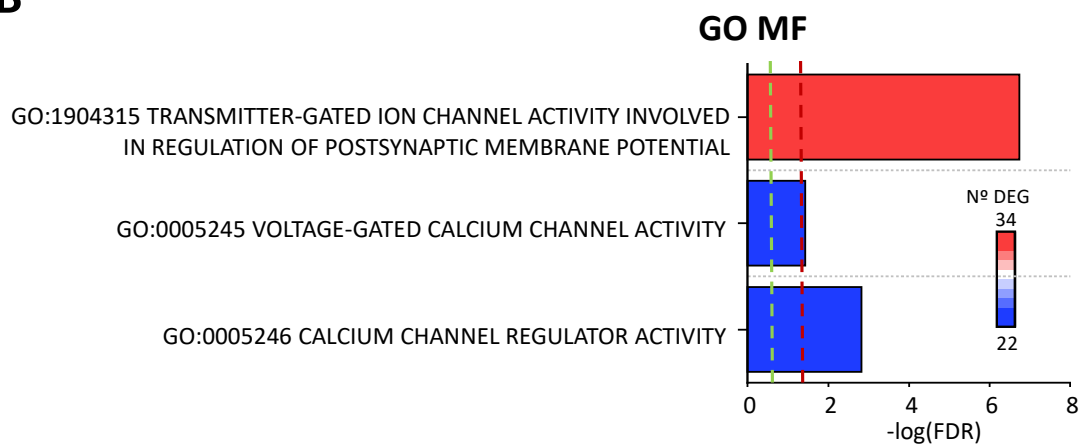
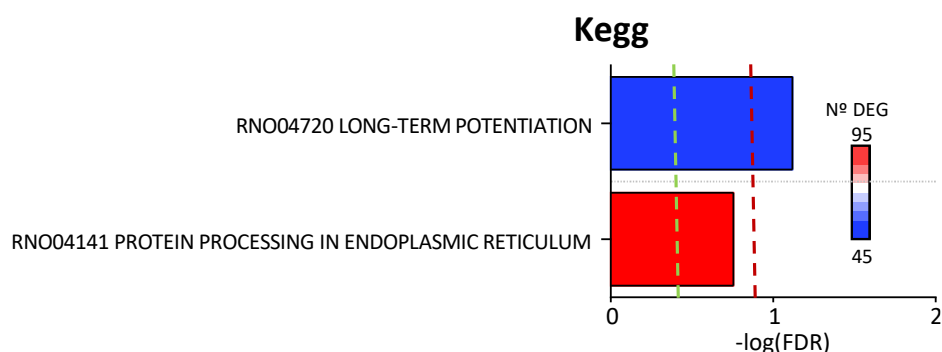
A**B****C**

Figura 90. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes. En los diagramas de barras se representan los conjuntos de genes que contienen las siguientes palabras clave: *synapse*, *calcium*, *aging*, *long-term*, *short-term*, *alzheimer*, *neurodegeneration*, *mitochondria*, *reticulum*. En el eje X se representa el $-\log(FDR)$ en base 10 del FDR A, por lo que, a mayor valor de este logaritmo negativo, mayor relación entre conjunto y fenotipo. El valor del eje X correspondiente al nivel de significación considerado, un FDR de 0,05 y 0,25 se indican mediante una línea punteada roja y verde, respectivamente. Además, las barras se han coloreado según la escala de *pseudocolor* mostrada en la leyenda la cual indica el número de genes que hay en cada conjunto. De entre los diferentes métodos de análisis de conjuntos de genes, se ha empleado el método CAMERA, pues considera la posible correlación entre los diferentes genes de cada conjunto. En cuanto a las bases de datos, se han utilizado *Gene Ontology* (A, B), y *Kegg* (C).

3 EFECTOS A NIVEL TRANSCRIPTÓMICO DE LOS OLIGÓMEROS DE $A\beta_{1-42}$ SOBRE NEURONAS DE HIPOCAMPO

El estudio a nivel funcional de la homeostasis del Ca^{2+} reveló que el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 24 h) afecta principalmente a las neuronas de hipocampo envejecidas (18-21 DIV) mientras que en neuronas jóvenes apenas tuvo efecto. Por ello, nos planteamos llevar a cabo a un análisis transcriptómico mediante microarrays en cultivos de hipocampo envejecidos (tanto mixtos como enriquecidos en glías) y expuestos a los oligómeros de $A\beta$. En la Figura 91 se muestra el diseño experimental, el cual consta de dos factores fijos: el factor fijo *tipos celulares* presentes en el cultivo con dos niveles (*mixto* y *enriquecido en glías*) y el factor fijo *Tratamiento* con dos niveles (*control* y *experimental - $A\beta_{1-42}$*). Además, existe un factor aleatorio “*Procedencia del Cultivo*”, el cual agrupa las muestras según la procedencia del cultivo (individuos).

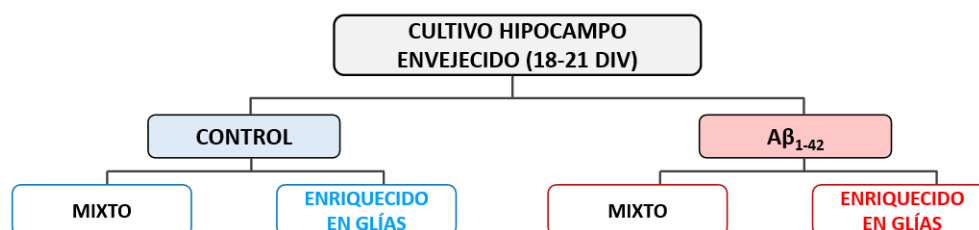


Figura 91. Diseño experimental para el estudio transcriptómico del efecto de $A\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo envejecidas.

Para llevar a cabo el estudio transcriptómico, se procedió de forma similar a la descrita en el apartado “2. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL REMODELADO DEL Ca^{2+} EN EL ENVEJECIMIENTO NEURONAL”. En primer lugar, se obtuvieron los cultivos de hipocampo mixtos, los cuales se cultivaron a largo plazo (18-21 DIV), pues estos son considerados cultivos envejecidos. A los 18 DIV, la mitad de los cubreobjetos del cultivo se trataron con $A\beta_{1-42}$ (1 μ M en MEM, 24 h; condición experimental) y la otra mitad con el vehículo (MEM; control). Tras 24 h, de cada grupo, Control y Experimental, se tomaron la mitad de los cubreobjetos y se crearon dos nuevos subgrupos: *Mixto* y *Enriquecido en Glía*. En los subgrupos enriquecidos en glías se eliminaron la mayor parte de las neuronas y, de nuevo, se añadió el tratamiento $A\beta_{1-42}$ o MEM, según correspondiera, y se mantuvieron 24 h en el incubador. Se comprobó la eficacia de eliminación de las neuronas mediante una doble inmunofluorescencia, mostrando unos resultados casi idénticos a los encontrados en el experimento del apartado anterior, es decir, se logra reducir de forma significativa el porcentaje de neuronas. Posteriormente, se extrajo el ARN, se cuantificó y se analizó su calidad para, finalmente, llevar a cabo el estudio transcriptómico mediante microarrays *Clariom D Rat* de Affimetrix (también por la empresa CABIMER).

Para el estudio transcriptómico del efecto de $A\beta_{1-42}$ en neuronas de hipocampo envejecidas se han empleado un total de 5 réplicas para cada condición experimental. Tras recibir los datos crudos, archivos .CEL, se llevó a cabo el análisis transcriptómico de igual forma que en el experimento del apartado anterior. Así, los datos crudos se sometieron a un control de calidad en el que no se detectó ningún microarray problemático y, después, se preprocesaron con el método RMA. Posteriormente, se sometieron a los análisis de expresión diferencial mediante el método limma y, por último, se realizó un análisis de significación biológica.

En el diagrama de ACP (Figura 92) se observó que las muestras no se agrupan formando los 4 grupos esperados, sino que únicamente se forman 2 grupos en función del tipo celular presente en el cultivo: mixto o enriquecido en glías. Es decir, que el factor tratamiento (control o $A\beta_{1-42}$) no genera o crea agrupaciones en las muestras, lo cual indicaría que la expresión genes en las muestras tratadas y sin tratar con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 48h) será similar o, en otras palabras, el tratamiento de 48 h con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ no tiene un efecto a nivel transcriptómico (pero sí a nivel funcional).

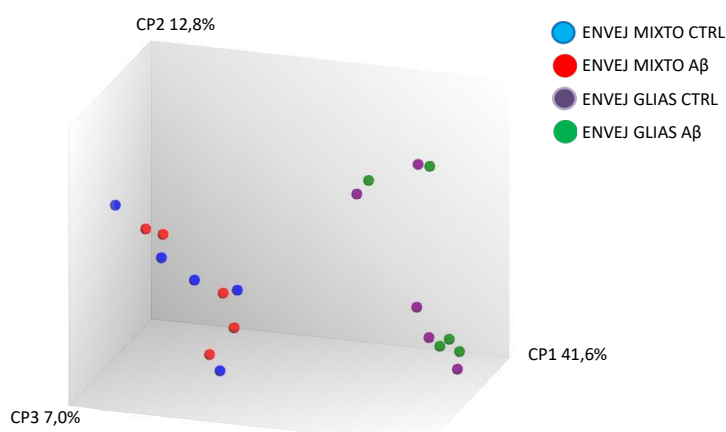


Figura 92. ACP de las muestras de cultivos de hipocampo envejecidas control y expuestas al tratamiento con los oligómeros de $A\beta$. En la figura se observa como las muestras solamente se agrupan en dos grupos, atendiendo al tipo celular presente en el cultivo, mixto o enriquecido en glías. En azul se representa las muestras de cultivos mixto control, en rojo mixto $A\beta$, en morado enriquecido en glías control y en verde enriquecido en glías $A\beta$.

3.1 Análisis de expresión diferencial del efecto de los oligómeros de $A\beta$ sobre neuronas de hipocampo envejecidas

Tras el control de calidad y preprocesado con el método RMA de los datos crudos obtenidos de los microarrays (archivos .CEL), se realizó un filtrado no específico de las sondas. Posteriormente, con la nueva matriz de expresión (sólo los genes que quedan tras el filtrado) se ajusta un modelo lineal (método limma) para evaluar la expresión diferencial debida al tratamiento de 48 horas con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. Así, para cada uno de los genes, se realizó un contraste de hipótesis para evaluar la expresión diferencial, de tal manera que se rechaza la hipótesis nula (H_0) de no expresión diferencial para aquellas sondas con un $FDR < 0,05$ (Tabla 12).

Tabla 12. Resumen del filtrado y del análisis de expresión diferencial general del efecto del $A\beta$ en neuronas envejecidas

	Genes Totales			Genes Homeostasis Ca^{2+}	
	Total	Post-filtrado	DEG	Total Post-filtrado	DEG
Nº genes	70.580	35.437	0	121	0

Como era de esperar tras observar el análisis de componentes principales, el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 48 h) no ejerce cambios en la expresión de ninguno de los genes evaluados en neuronas de hipocampo envejecidas. Sin embargo, cabe destacar que la expresión diferencial entre los diferentes tipos celulares es prácticamente la misma que la observada en el experimento del apartado anterior dentro de la condición “cultivos envejecidos”, lo cual nos sirvió como control para corroborar que todo había ido correctamente. Por lo tanto, estos datos indicaron que el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 48 h) no afecta a la expresión de los genes en neuronas de hipocampo envejecidas, así como tampoco a los genes de las glías.

A continuación, se recogen, en las figuras 93-95 (Figura 93, Figura 94, Figura 95), los resultados de expresión diferencial para las diferentes familias de genes relacionadas con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular donde, efectivamente, se observa que el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ (1 μ M, 48 h) no afecta a la expresión de ninguno de ellos en las neuronas de hipocampo envejecidas.

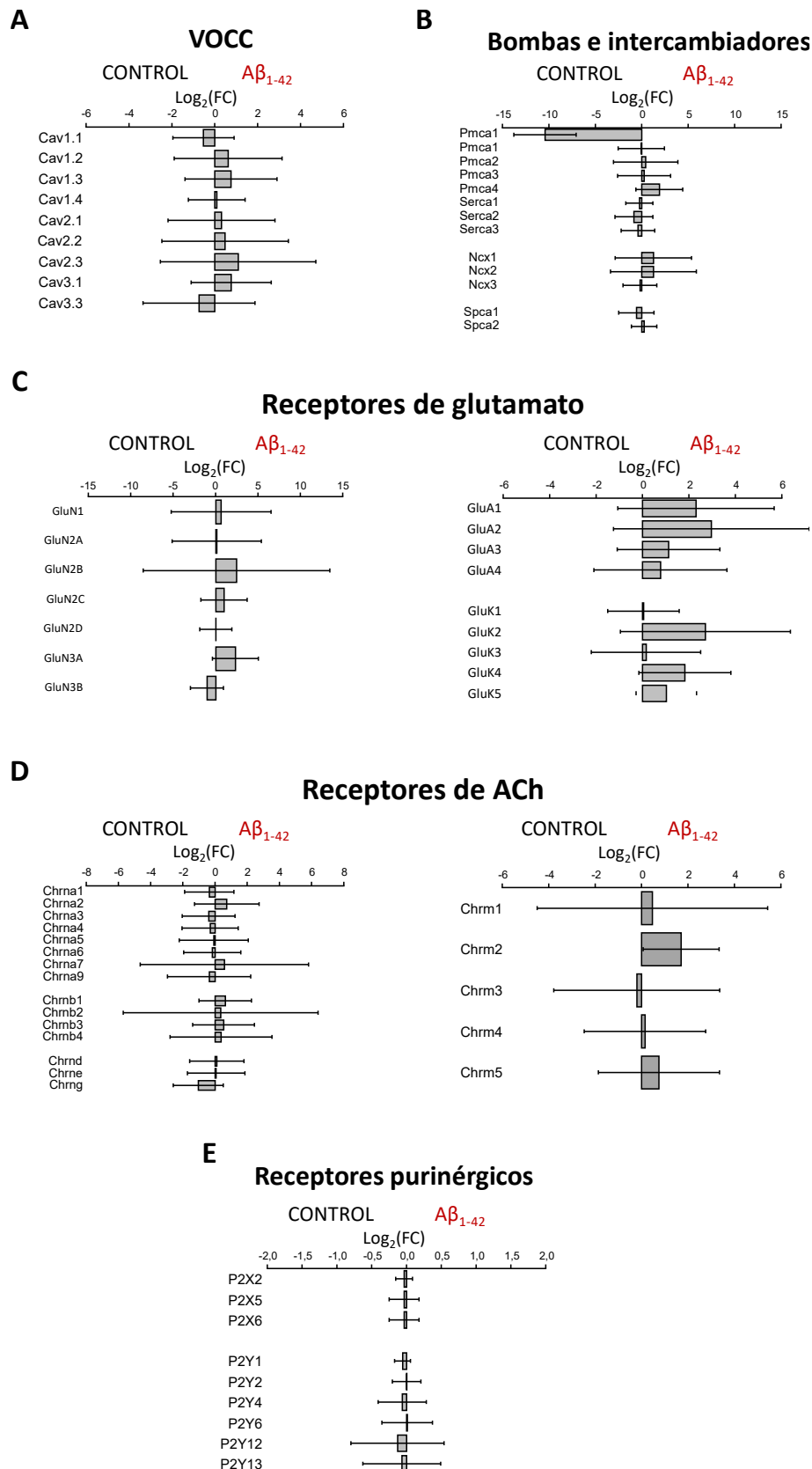


Figura 93. Expresión diferencial de los genes que codifican para los diferentes mecanismos de transporte de Ca^{2+} de la MP neuronas envejecidas de hipocampo tratadas con $A\beta_{1-42}$. A. VOCC, B. Bombas e intercambiadores C. Receptores de glutamato, D. Receptores de ACh, E. Receptores purinérgicos. Los gráficos de barras representan los valores de expresión diferencial, en concreto valores $\text{log}_2(\text{FC})$, estimados mediante el método limma.

TRP

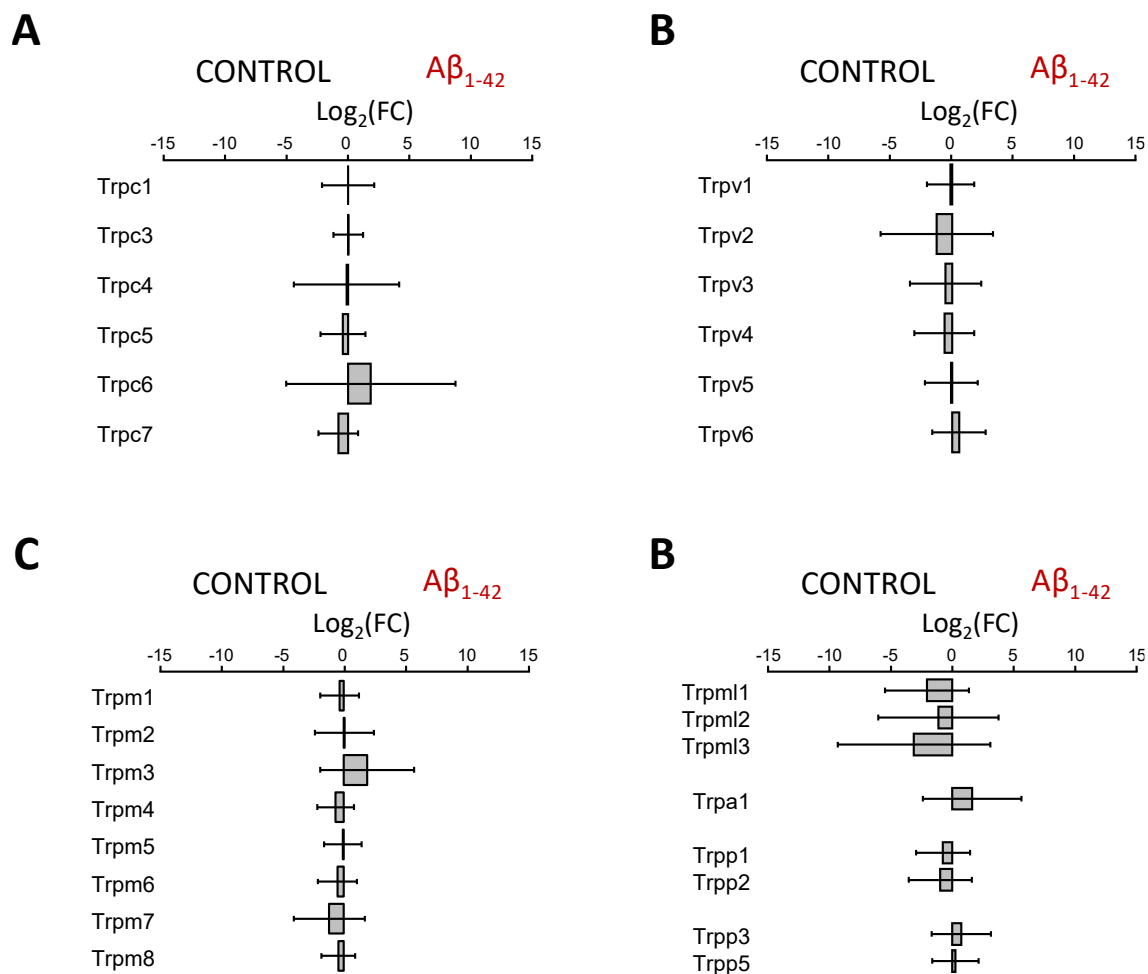


Figura 94. Expresión diferencial de los genes de la superfamilia de los TRP en neuronas envejecidas de hipocampo tratadas con $A\beta_{1-42}$. Se muestran los diferentes genes divididos en las familias de los Trpc (A), Trpv (B), Trpm (C) y Trpm1, Trpa y Trpp (D). Los gráficos de barras representan los valores de expresión diferencial, en concreto valores $\text{log}_2(\text{FC})$, estimados mediante el método limma.

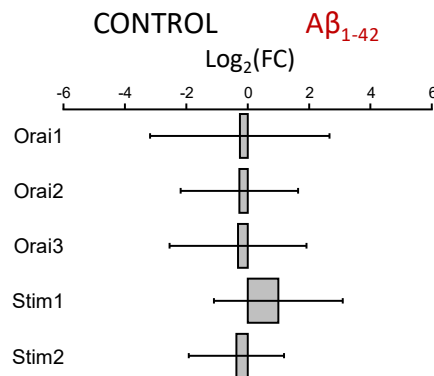
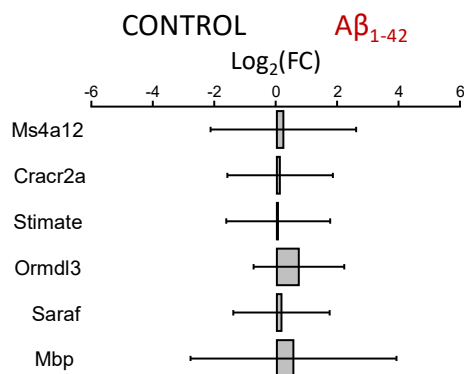
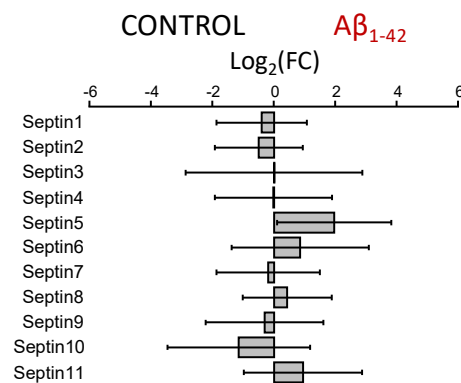
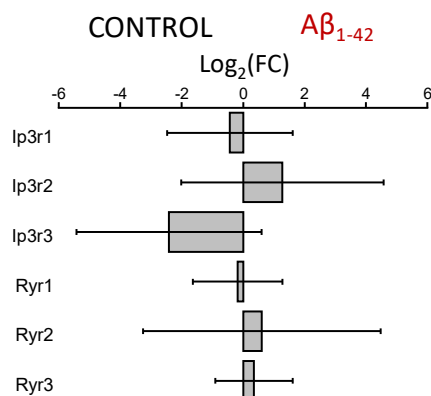
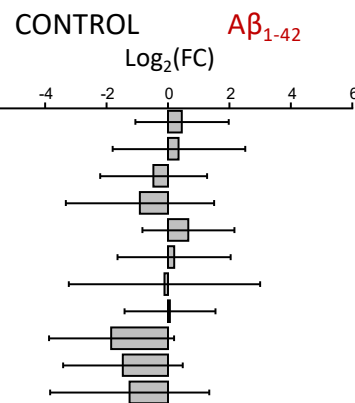
A**SOCE****B****C****D****RE****E****MT**

Figura 95. Expresión diferencial de los genes que codifican para proteínas implicadas en SOCE (A, B, C) y en el transporte de Ca^{2+} en el RE (D) y la Mitocondria (E) en neuronas envejecidas de hipocampo tratadas con $\text{A}\beta_{1-42}$. Los gráficos de barras representan los valores de expresión diferencial, en concreto valores $\text{log}_2(\text{FC})$, estimados mediante el método limma. No se observan genes diferencialmente expresados en este grupo.

Tras realizar el análisis de expresión diferencial, el siguiente paso sería llevar a cabo el análisis de significación biológica. Sin embargo, dado que no se detectó expresión diferencial para ningún

gen tras el tratamiento con $A\beta_{1-42}$, carece de sentido mostrarlo ya que el resultado será el mismo: ningún conjunto de genes está relacionado con el tratamiento.

4 REMODELADO DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMORES CEREBRALES

El estudio de la homeostasis y señal del Ca^{2+} intracelular en tumores cerebrales se ha llevado a cabo utilizando, como modelo de estudio, cultivos primarios obtenidos a partir de muestras de tejido tumoral humano. Las muestras se obtuvieron bajo un procedimiento de resección quirúrgica realizado en el área de neurocirugía del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid (HURH). Tanto el diagnóstico patológico, grado del tumor como la clasificación histopatológica se llevó a cabo por el servicio de anatomía patológica del HURH de acuerdo con la Clasificación *World Health Organization del 2016* (WHO 2016). Cabe destacar que, en todo momento, se han seguido las guías de buenas prácticas éticas y que todos los pacientes han firmado el consentimiento informado aprobado por el comité ético del HURH.

En una primera aproximación, se llevó a cabo un estudio funcional analizando distintos sistemas de transporte del Ca^{2+} en los diferentes cultivos primarios de tumores cerebrales, entre los que se incluyeron neurinomas (SW), meningiomas (MG), oligodendrogliomas (ODG), astrocitomas (AT), glioblastomas (GBM) y metástasis cerebrales (ME) de diferentes orígenes (metástasis de ovario- OM-, metástasis de pulmón -LM- y metástasis de mama – BM-). Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de muestras de tejido tumoral cerebral humano de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado “2.1.3. Modelos de tumores cerebrales humanos”, y se mantuvieron en el incubador a 37 °C y 10 % CO_2 hasta su uso. En concreto, se analizaron los niveles basales de Ca^{2+} intracelular, SOCE y se caracterizó la respuesta, en términos de Ca^{2+} , tras la activación de las células con distintos estímulos incluyendo el agonista del receptor de glutamato NMDA, el agonista purinérgico ATP y la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje mediante un medio con alta concentración de K^+ .

En segundo lugar, el interés se centró en los tumores cerebrales denominados gliomas, dentro de los cuales se incluyen los ODG, AT y GBM. A partir de los cultivos de los distintos gliomas, y en base a los estudios anteriores, nos propusimos estudiar el papel de la mitocondria en SOCE. Para ello, mediante imagen de Ca^{2+} en célula única, se evaluó SOCE en presencia de FCCP y/o en medio libre de Na^+ (Na0).

Por último, el interés se focalizó en los GBM, ya que estos son los tumores cerebrales con peor pronóstico. En concreto, de cada uno de los pacientes con GBM que accede a participar en el estudio, se recibieron tres muestras: una muestra procedente de la zona tumoral y dos muestras de zonas peritumorales resecadas por motivos clínicos. En concreto, puesto que la política del servicio de neurocirugía del HURH para la resección de gliomas consiste en la resección supra marginal o supra total, lo que incluye a las regiones peritumorales no captantes de contraste en los glioblastomas. Además, cabe destacar que estos pacientes fueron incluidos en un ensayo clínico en curso (Supramarginal Resection in Glioblastoma Guided by Artificial Intelligence - Tabular View - ClinicalTrials.Gov, 2023). Así, a partir de estas muestras se llevaron a cabo dos tipos de análisis. Por un lado, estudios funcionales de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y, por otro lado, estudios transcriptómicos mediante la técnica de RNA-Seq.

4.1 Análisis de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en tumores cerebrales

Para llevar a cabo el estudio funcional de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular se incluyeron muestras de 49 pacientes de entre 24 y 66 años (Tabla 13), entre los que se incluyen, 5 SW, 13 MG, 5 gliomas de bajo grado (ODG) y 18 gliomas de alto grado (grado 3, n=2 AT; grado 4, n=16 GBM).

Tabla 13. Resumen de las muestras de tumores cerebrales humanos.

Clasificación Tumor	ID	No. Tumores Analizados	Mujeres %	Edad Mediana Pacientes años
Neurinoma	SW	5	40	52,5
Meningioma	MG	13	92	58
Oligodendroglioma	ODG	5	40	42,5
Astrocitoma	AT	2	100	67,5
Glioblastoma	GBM	16	31	60
Metástasis Ovario	OM	2	100	59
Metástasis Mama	BM	2	100	53,5
Metástasis Pulmón	LM	4	50	66,5

A partir de la muestra de tejido tumoral y siguiendo el protocolo descrito en el apartado “2.1.3. Modelos de tumores cerebrales humanos”, se obtuvieron los diferentes cultivos primarios cuyo aspecto general se muestra en la Figura 96. Cabe destacar que, en todos los casos, los experimentos se realizaron en un periodo inferior a 48 h tras recibir y procesar la muestra. Con el fin de caracterizar la señal de Ca^{2+} en estos cultivos, se llevó a cabo un estudio en funcional mediante la técnica de imagen de Ca^{2+} . En concreto, se estudió el nivel basal de Ca^{2+} intracelular, SOCE y la respuesta del Ca^{2+} a diferentes agonistas: NMDA, K^+ y ATP.

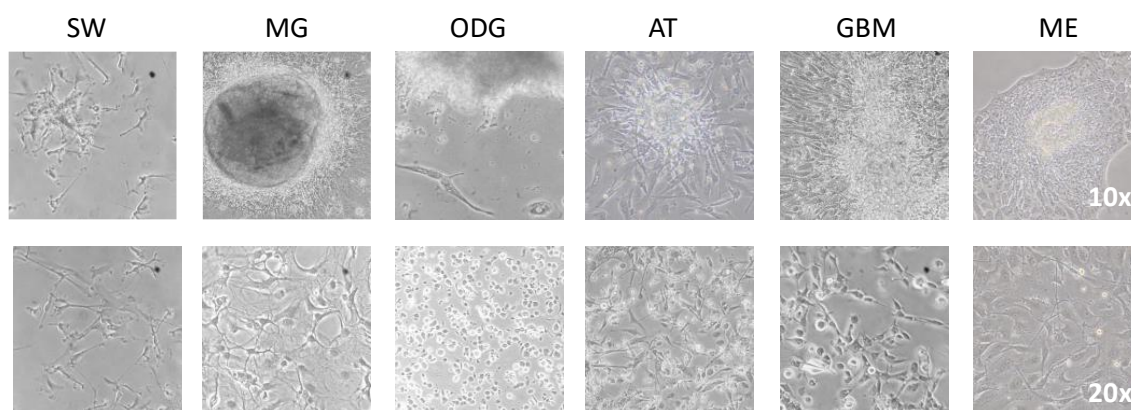


Figura 96. Cultivos primarios de tumores cerebrales humanos. Imágenes representativas de microscopía de campo claro de cultivos primarios de tumores cerebrales humanos, de izquierda a derecha: neurinoma (SW), meningioma (MG), oligodendroglioma (ODG), astrocitoma (AT), glioblastoma (GBM) y metástasis cerebral (ME).

La Figura 97 muestra una serie de registros representativos de los efectos de los distintos estímulos sobre la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en los cultivos primarios correspondientes a los diferentes tipos de tumores cerebrales. Como puede observarse, las células de SW apenas responden a ATP ni a alto K^+ . En cuanto a las células de MG, se observa un ligero incremento del Ca^{2+} intracelular en respuesta al ATP, pero no responden a NMDA ni a K^+ . Los cultivos de ODG no responden a glutamato, mientras que sí lo hacen a PDGF, agonista específico de ODG. Respecto a las células procedentes de AT, estas experimentan una gran entrada de Ca^{2+} intracelular tras ser estimuladas tanto con ATP como con alto K^+ , si bien es cierto que no responden al agonista NMDA. Por último, en el caso de las células de GBM, se observó que estas no responden a un medio con alto K^+ mientras que, en presencia de ATP, se registra un gran aumento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. En resumen, este análisis funcional reveló cómo la respuesta a los estímulos de ATP, alto K^+ y NMDA es muy diferente según el tipo tumoral del que procedan las células.

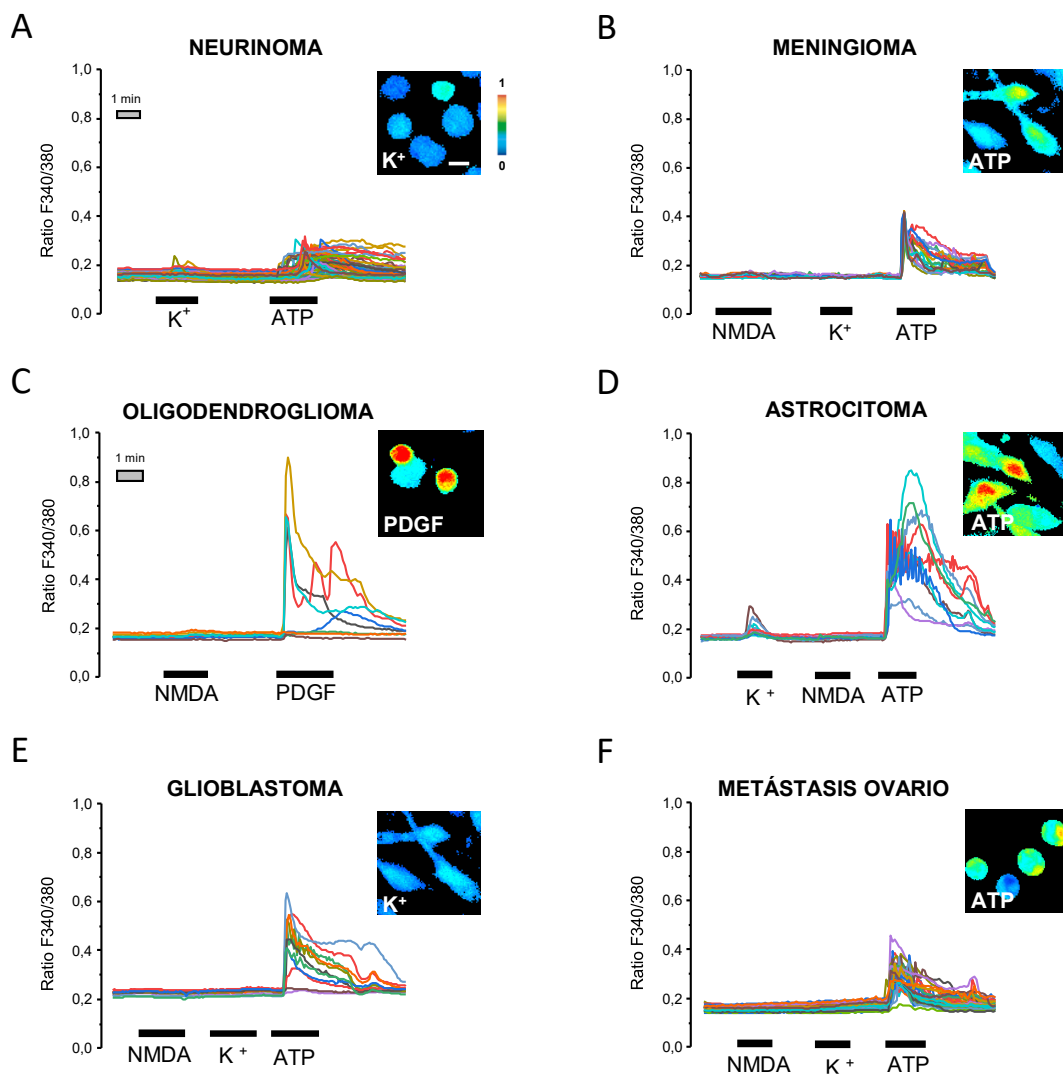


Figura 97. Respuesta del Ca^{2+} a diferentes agonistas en cultivos celulares de diferentes tumores cerebrales humanos. A las 24-48 h de la obtención del cultivo, las células se incubaron con la sonda Fura-2/AM y en un equipo de fluorescencia se registraron los cambios en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ ante diferentes estímulos. Los trazos muestran registros representativos de los cambios en $[Ca^{2+}]_{cit}$ expresada como ratio de F340/380 en célula única en respuesta a diferentes agonistas. Las barras horizontales indican los periodos de estimulación con los diferentes agonistas: K^+ 75 mM, ATP 100 μ M, NMDA 100 μ M o Factor derivado del crecimiento plaquetario (PDGF) 10 nM. Las imágenes de fluorescencia en escala *pseudocolor* se

capturaron durante la estimulación. La escala de color indica valores de ratio entre 0 y 1. La barra blanca indica 10 μm .

4.1.1 Análisis del nivel basal de Ca^{2+} en tumores cerebrales

Para caracterizar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en las células de estos tumores se analizó la intensidad de fluorescencia (ratio F340/380) en los primeros 30 segundos de los registros de los experimentos de Ca^{2+} de agonistas anteriores (Figura 98). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en los niveles basales de Ca^{2+} únicamente entre el AT (grado III, glioma maligno) y el MG (tumor benigno), siendo la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ mayor para el AT. Sin embargo, el resto de los tumores mostraron unos niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ intermedios entre los niveles de los otros dos tumores que no llegan a ser diferentes a ninguno de ellos.

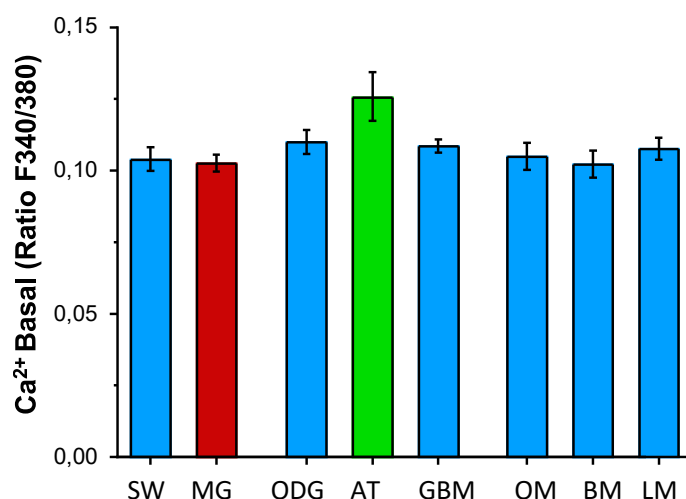


Figura 98. Niveles basales de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en cultivos primarios de tumores cerebrales. Los cultivos primarios se obtuvieron a partir de muestras de tumores cerebrales. Tras 24 h, las células se cargan con la sonda fluorescente Fura-2/AM para monitorizar los niveles basales de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Las barras representan la media $\pm$ ES de los niveles basales de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ expresados como Ratio F340/380. El ES fue estimado mediante modelos lineales mixtos y métodos de *bootstrapping*. De acuerdo con las comparaciones los tumores se agrupan en distintos grupos, donde los colores indican diferencias significativas entre ellos: el color rojo representa el grupo cuya variable presenta menor valor y en verde el grupo con mayor valor. Mientras, que el color azul representa el grupo que está entre medias de los dos anteriores, sin llegar a existir diferencias significativas entre ellos. Los datos provienen de (número de pacientes; experimentos; células); SW (2;4;110); MG (4;9;175); ODG (3;5;206); AT (1;2;48); GBM (7;20;404); OM (1;3;101); BM (1;3;60); LM (3;6;55).

4.1.2 Análisis de la señal de Ca^{2+} en respuesta a ATP

Se analizaron las posibles diferencias de la respuesta de Ca^{2+} tras la activación de los receptores purinérgicos con ATP 100 μM . Para ello, se cuantificó los cambios en el cociente de fluorescencias F340/380. En la Figura 99 se muestran los registros representativos. Los resultados muestran que los tumores no malignos (SW y MG) y los gliomas de bajo grado (ODG) apenas responden a ATP. Sin embargo, los gliomas de grado III y grado IV (AT y GBM) así como las metástasis mostraron una gran respuesta del Ca^{2+} tras la estimulación con ATP.

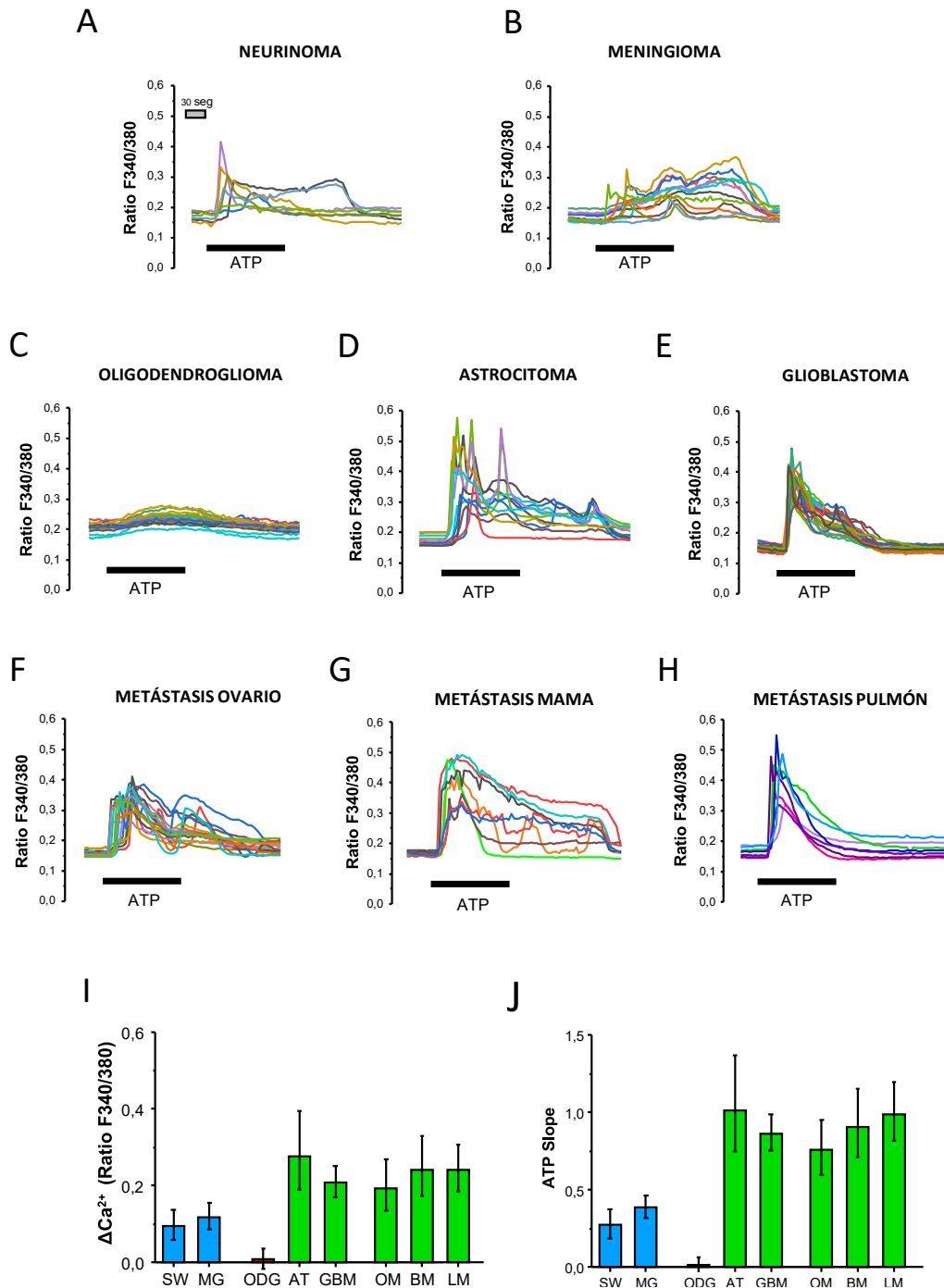


Figura 99. Efectos del agonista ATP sobre la señal de Ca^{2+} en células de diferentes tumores cerebrales humanos. La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ se registró en cultivos de distintos tipos tumores cerebrales humanos. Tras 24-48 h de la obtención del cultivo, las células se incuban con la sonda Fura-2/AM y se registra el Ca^{2+} mediante imagen de fluorescencia. **A-H.** Registros representativos en célula única de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducidos al estimular las células con ATP 100 μM . Las barras horizontales indican el momento en el que se perfundió el ATP. Los gráficos de barras muestran la media $\pm$ ES del incremento de Ca^{2+} (**I**) y de la pendiente (**J**) inducido por ATP en cada tipo de tumor. El ES fue estimado mediante modelos lineales mixtos y técnicas de *bootstrapping*. Las comparaciones dos a dos, tanto del incremento de Ca^{2+} como de la pendiente, agruparon a los tumores en grupos diferentes, donde los colores reflejan diferencias significativas entre los grupos: color rojo representa los tumores cuya respuesta del Ca^{2+} a ATP fue menor mientras que el verde la mayor. Sin embargo, el color azul, representa los tumores que tienen una respuesta intermedia entre ambos grupos. Los datos provienen de (número de pacientes; experimentos; células); SW (2;4;110); MG (4;9;175); ODG (3;5;206); AT (1;2;48); GBM (7;20;404); OM (1;3;101); BM (1;3;60); LM (3;6;55).

4.1.3 Efecto de la despolarización con medio con alta concentración de K^+

Otro mecanismo de interés que se estudió a nivel funcional fue la entrada de Ca^{2+} a través de los canales VOC inducida tras la estimulación con medio con alta concentración de K^+ . La Figura 100 muestra registros representativos de imagen de fluorescencia en célula única tras la estimulación con K^+ 75 mM para los distintos tipos de tumores estudiados. En ellos se puede observar cómo las células de ODG, glioma de bajo grado, y AT son las que mayor respuesta de Ca^{2+} mostraron. Para el resto de los tumores cerebrales la respuesta de Ca^{2+} inducida por medio alto K^+ fue muy pequeña o prácticamente inexistente, a excepción de las metástasis cerebrales de cáncer de pulmón (LM). Estos datos sugieren que posiblemente los VOCC o bien no son funcionales o bien no están presentes en los cultivos de estos tumores cerebrales estudiados, a excepción del ODG.

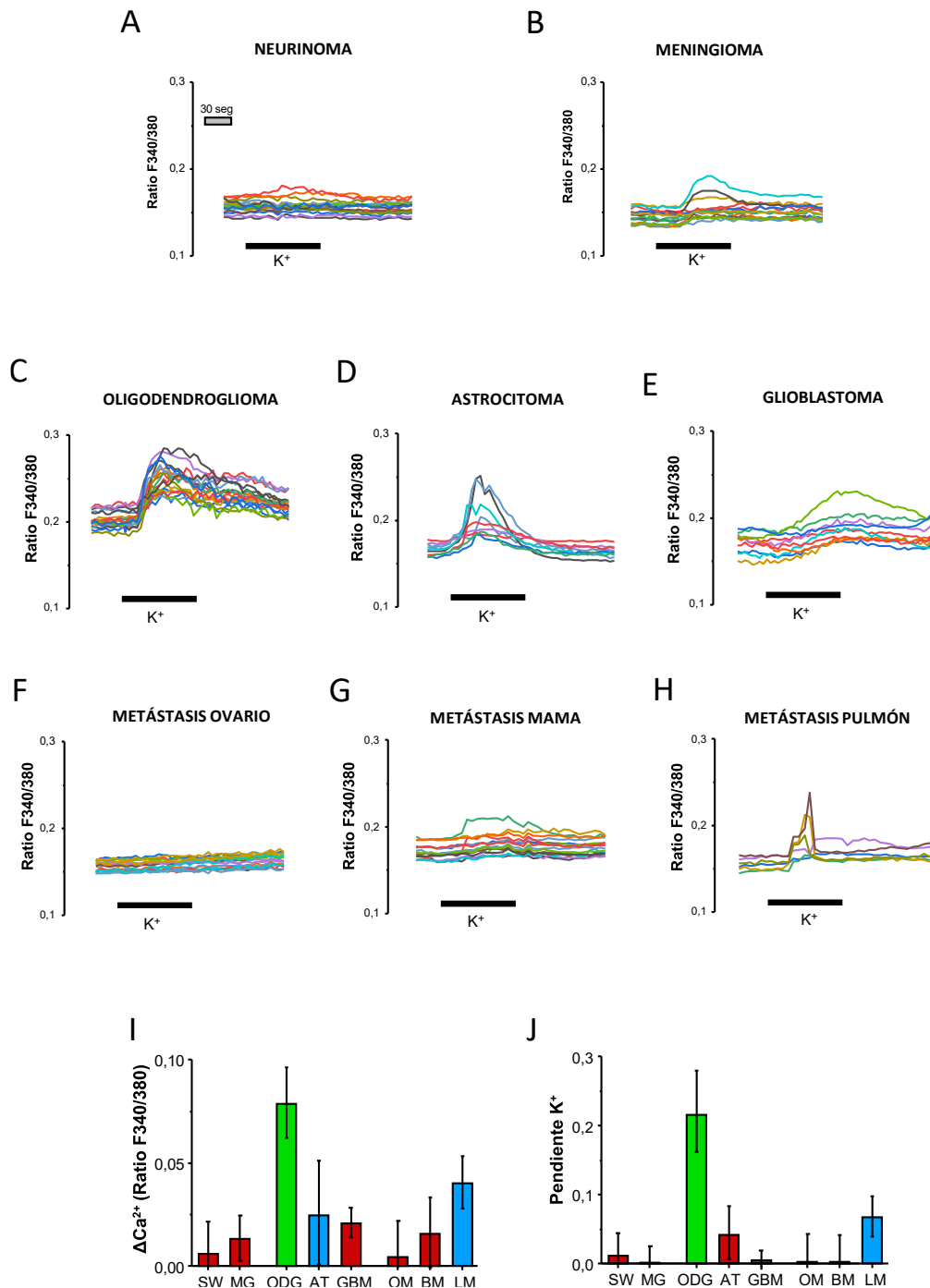
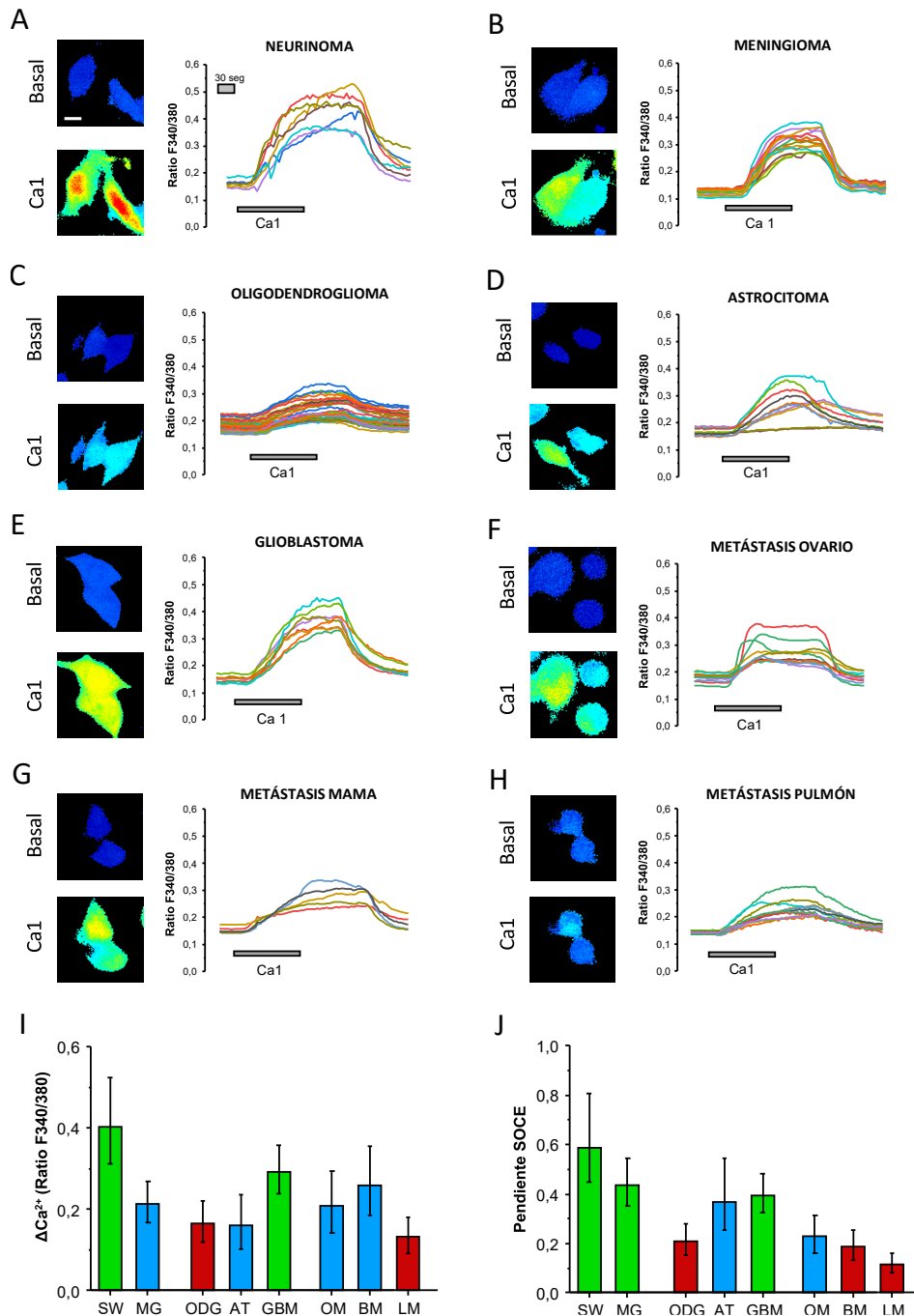


Figura 100. Entrada de Ca^{2+} a través de los VOCC en diferentes cultivos de tumores cerebrales humanos. Las células se cargan con la sonda de Ca^{2+} Fura-2/AM y se registra la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ mediante imagen de fluorescencia. **A-H.** Los trazos muestran los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ inducidos por la estimulación con medio alto K^+ (K^+ 75 mM). Cada registro se corresponde con un tipo de tumor cerebral. Las barras horizontales indican el momento y duración del estímulo de K^+ . Los diagramas de barras muestran la media $\pm$ ES del incremento (**I**) y la pendiente (**J**) de Ca^{2+} tras la estimulación con K^+ para cada tipo de tumor. El ES fue estimado mediante modelos lineales mixtos y técnicas de *bootstrapping*. De acuerdo con las comparaciones dos a dos los tumores se agrupan en diferentes grupos según su respuesta, donde los diferentes colores indican diferencias significativas entre los grupos. El color rojo representa los tumores con la menor respuesta registrada mientras que el verde la mayor. Mientras que, el color azul representa a los tumores cuya respuesta es intermedia entre los grupos anteriores, sin presentar diferencias significativas. Los datos provienen de (número de pacientes; experimentos; células); SW (2;4;110); MG (4;9;175); ODG (3;5;206); AT (1;2;48); GBM (7;20;404); OM (1;3;101); BM (1;3;60); LM (3;6;55).

4.1.4 Análisis de SOCE en cultivos primarios de tumores cerebrales

Para el análisis de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos o SOCE en los diferentes cultivos de tumores cerebrales humanos, las células, previamente cargadas con la sonda Fura-2/AM, se incubaron 15 minutos con tapsigargina, un inhibidor irreversible de SERCA, en medio libre de Ca^{2+} . De esta forma, se indujo el vaciado de Ca^{2+} de los depósitos. Después, en un equipo de imagen de fluorescencia de Ca^{2+} en célula única, las células fueron estimuladas con medio con Ca^{2+} 1 mM (Ca1), lo que permitió observar SOCE. La Figura 101 muestra registros representativos en célula única de SOCE para los distintos tipos de tumores. En ellos se puede observar cómo todos los cultivos de los diferentes tumores cerebrales experimentaron un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tras inducir el vaciado de los depósitos de Ca^{2+} y la posterior perfusión de Ca^{2+} . El análisis estadístico concluyó que los cultivos de SW y GBM presentaron una mayor SOCE, mientras que ODG y las metástasis, a excepción de la metástasis de ovario (OM), presentaron la menor SOCE.



4.2 Análisis de la Señal del Ca^{2+} en Gliomas: respuesta a ATP, K^+ y SOCE

Hay que señalar que en el análisis estadístico del apartado anterior se tuvo en cuenta muchas variables independientes (edad, sexo, tipo de tumor...) y quizás, para un número de muestras relativamente bajo y no balanceado, el análisis podría verse influenciado por aquellos tumores cuyo tamaño muestral fuera mayor. Por ello, decidimos centrar el estudio únicamente en los gliomas, grupo que incluye los ODG, AT y GBM, excluyendo así al resto de tumores cerebrales estudiados. El análisis de SOCE en los gliomas reveló que SOCE aumenta de forma significativa con el grado de malignidad. El GBM, glioma de peor pronóstico, presentó la mayor SOCE respecto del ODG, glioma de grado II. Sin embargo, el AT mostró un valor de SOCE intermedio entre los anteriores de tal manera que no llega a ser diferente a ninguno de ellos (con un tamaño muestral mayor podría identificarse a cuál de los dos se parece o, incluso, si llegase a ser significativamente diferente a los otros dos). Por el contrario, la entrada de Ca^{2+} a través de los VOCC inducida tras la estimulación con medio alto K^+ fue significativamente mayor para el glioma de bajo grado, mientras que, en los gliomas de alto grado, AT y GBM, es muy pequeña o prácticamente inexistente. Finalmente, la respuesta del Ca^{2+} a ATP no se detectó en ODG, mientras que sí aumenta significativamente en los gliomas de alto grado. Estos datos sugieren que la progresión de los gliomas está asociada con cambios en la entrada de Ca^{2+} a través de SOCE y los VOCC y la respuesta a ATP (Figura 102).

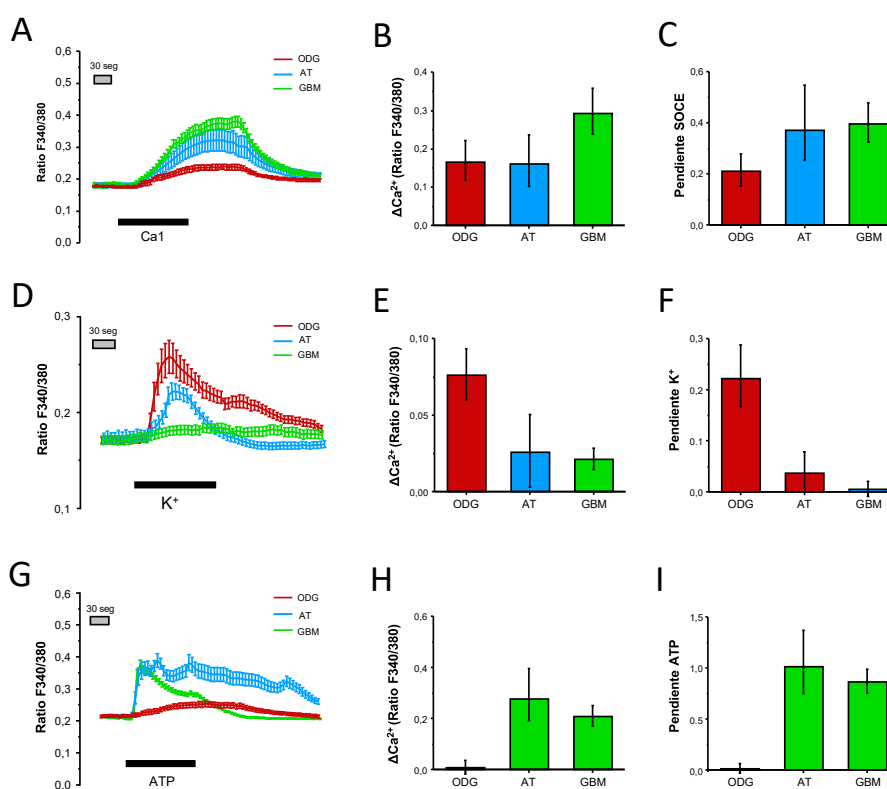


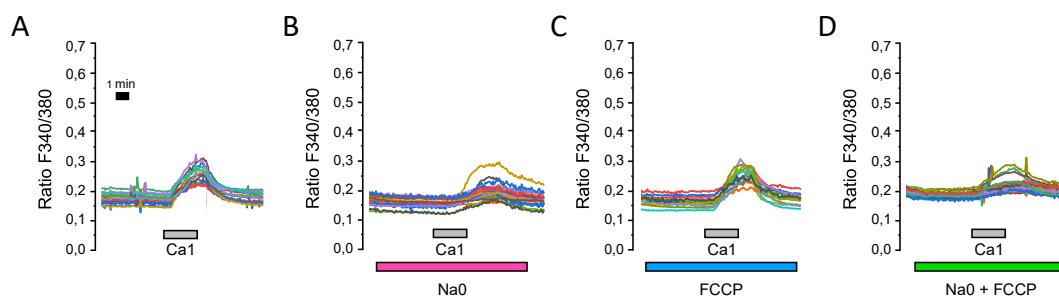
Figura 102. Respuesta del Ca^{2+} a ATP, K^+ y SOCE es diferente en los gliomas. A, D, G. Los trazos muestran la media $\pm$ ES de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de los gliomas de experimentos representativos. Los gráficos de barras muestran la media $\pm$ ES del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ (B, E, H) y la pendiente (C, F, I) inducido tras las distintas estimulaciones. El ES se estimó mediante modelos lineales mixtos y técnicas de *bootstrapping*. De acuerdo con las comparaciones dos a dos (tanto en el análisis de los incrementos de Ca^{2+} como de las pendientes de la señal), los tumores se agruparon en distintos grupos, donde los diferentes colores indican diferencias significativas entre los distintos grupos: en rojo se representa el grupo cuya señal es la menor y en verde la mayor. Mientras que en azul se representan los tumores cuya señal esta entre los dos grupos anteriores. Los datos provienen de (número de pacientes; experimentos; células): para SOCE ODG (4;9;303); AT (2;4;49); GBM (13;40;726); para K^+ y ATP ODG (3;5;206); AT (1;2;48); GBM (7;20;404).

4.3 Efecto de eliminar el Na⁺ extracelular sobre SOCE en gliomas

Dado que, anteriormente, se vio cómo la entrada de Ca²⁺ a través de SOCE aumenta con el grado de malignidad, se quiso estudiar la posible contribución de las mitocondrias sobre dicha entrada. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de imagen de Ca²⁺ en los cuales se evaluó el efecto de retirar el Na⁺ del medio extracelular sobre SOCE. Cabe destacar que, en ausencia del ión Na⁺, el intercambiador NCLX no funciona correctamente, luego se interrumpe el intercambio de iones Na⁺ por Ca²⁺ en la mitocondria. Esto provoca que el Ca²⁺ se acumule en el citosol, lo que podría conllevar la inactivación de SOCE.

En primer lugar, los cultivos primarios se incubaron con Fura-2/AM y se indujo el vaciado de los depósitos de Ca²⁺ con tapsigargina. Inicialmente, se perfundió medio libre de Ca²⁺ (Ca0) y, a continuación, se cambió a un medio libre de Ca²⁺ y de Na⁺ (Ca0 + Na0), por lo que se sustituye el NaCl por N-metil-D-glucamina (NMDG). Por último, para revelar SOCE, se perfundió medio con Ca²⁺ y libre de Na⁺. La Figura 103 muestra los resultados obtenidos para estos experimentos. Sorprendentemente, retirar el Na⁺ del medio no tuvo efecto alguno sobre SOCE en los cultivos de ODG, mientras que, en el caso los cultivos de GBM, sí se observó un efecto potenciador sobre SOCE. Es decir, al retirar el Na⁺ del medio se registró un aumento significativo de SOCE en las células de los GBM.

OLIGODENDROGLIOMAS



GLIOBLASTOMAS

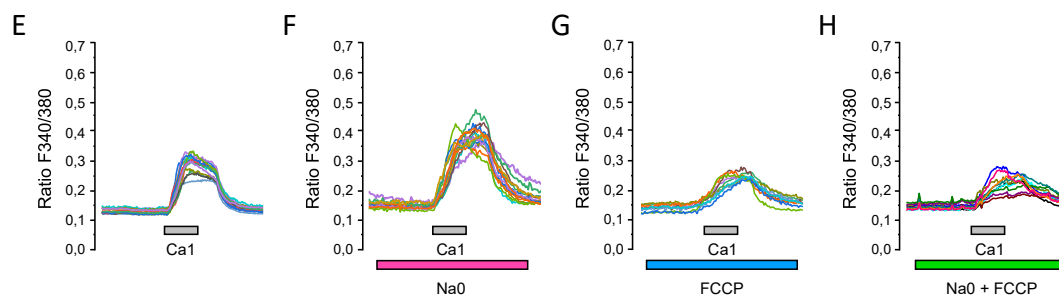
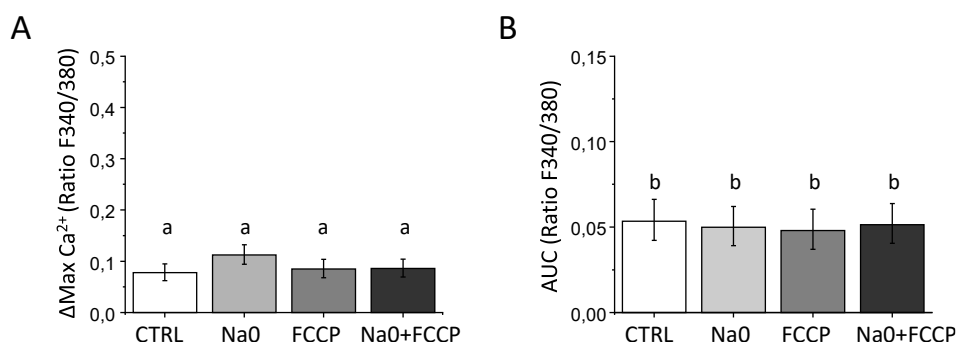


Figura 103. Efecto de eliminar el Na⁺ y el FCCP sobre SOCE en cultivos de ODG y GBM. Registros representativos SOCE en un medio libre de Na⁺ (Na0) y/o en presencia de FCCP en cultivos de ODG y GBM. A, E. SOCE control; B, F. SOCE en Na0. C, G. SOCE en presencia de FCCP; D, H. SOCE en medio Na0 + FCCCP.

A consecuencia de estos resultados, nos planteamos estudiar el efecto sobre SOCE de la despolarización mitocondrial con el desacoplante FCCP, solo o en combinación de medio libre de Na⁺ (Na0). Los resultados obtenidos indican que FCCP abole SOCE en los cultivos de gliomas de GBM, así como la combinación de FCCP y medio libre de Na⁺ (Figura 103).

Posteriormente, en los cultivos de ODG y GBM se cuantificó la señal de Ca^{2+} correspondiente a SOCE tanto en términos de incremento de Ca^{2+} como del área bajo la curva (AUC) para cada una de las condiciones experimentales (control, Na0, FCCP y Na0+FCCP). En el caso de los ODG, no se observaron diferencias significativas en la señal de SOCE para ninguna de las condiciones experimentales; es decir, retirar el Na^+ del medio y/o la abolición del potencial mitocondrial con FCCP no afecta a SOCE en las células de ODG. Sin embargo, el análisis de SOCE en cultivos de GBM reveló que, por un lado, retirar el Na^+ del medio induce un aumento significativo de SOCE, mientras que, por otro lado, la adición de FCCP al medio o la combinación de FCCP y medio libre de Na^+ reducen de forma significativa SOCE en los GBM (Figura 104). Los resultados sugieren que la mitocondria podría ser relevante en el control de SOCE en GBM, pero no en ODG.

OLIGODENDROGLIOMAS



GLIOBLASTOMAS

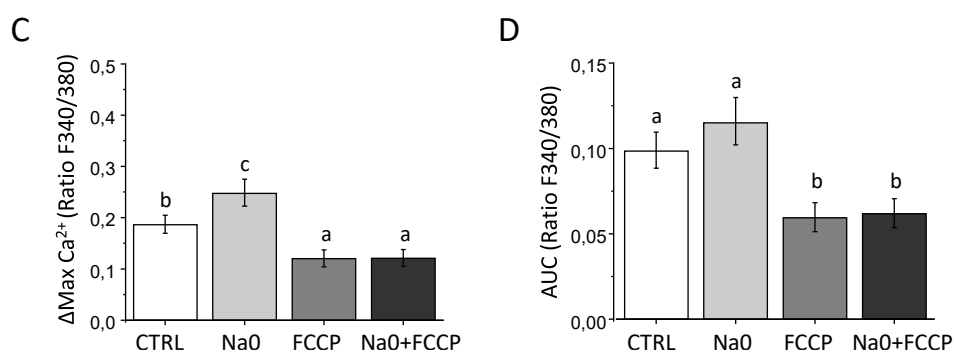


Figura 104. Incremento de Ca^{2+} y área bajo la curva de SOCE en un medio libre de Na^+ y/o FCCP. Las barras representan la cuantificación del incremento de Ca^{2+} (A, C) y el AUC (B, D) de SOCE en cultivos primarios de ODG y GBM. Las letras indican las diferencias significativas entre los distintos grupos para un nivel de significación de 0,05. El tamaño muestral, expresado como número de experimentos/células, para los OLT es: Control 5/290; Na0 5/292; FCCP 5/257; Na0+FCCP 5/298. Para los GBM, el tamaño muestral es: Control 17/306; Na0 14/267; FCCP 12/214; Na0+FCCP 11/178.

4.4 Efecto de la inhibición de SOCE sobre la proliferación de cultivos de GBM

La proliferación celular descontrolada es una de las huellas o *hallmarks* de las células cancerígenas. En este sentido, cabe destacar que el mecanismo de entrada de Ca^{2+} a través de SOCE se relaciona con la proliferación celular. Por ello, nos preguntamos si el efecto de la inhibición de SOCE mediante el FCCP se traduce en una disminución de la proliferación celular de los cultivos primarios de GBM. Para responder a esta pregunta, se realizaron estudios de proliferación analizando cómo afecta la inhibición de SOCE con BTP2 y/o a través del desacoplamiento mitocondrial con FCCP en células de GBM. El BTP2 actúa inhibiendo SOCE a través de la inhibición del canal ORAI1, uno de los principales integrantes de SOCE. Sin embargo, el efecto del FCCP, un inhibidor indirecto de SOCE a través del desacoplamiento de la mitocondria, provoca que la mitocondria no capte Ca^{2+} y es el propio Ca^{2+} quien inhibe o inactiva SOCE. Para llevar a cabo estos experimentos, las células se sembraron y mantuvieron en medio de cultivo (control) y en presencia de los distintos tratamientos propuestos (BTP2 y/o FCCP). En cuanto a la proliferación, esta se estima con un contador de celular a lo largo del tiempo (24, 96 y 148 h). La Figura 105 muestra imágenes representativas de células de GBM expuestas a los diferentes tratamientos y la cuantificación de los efectos sobre la proliferación celular.

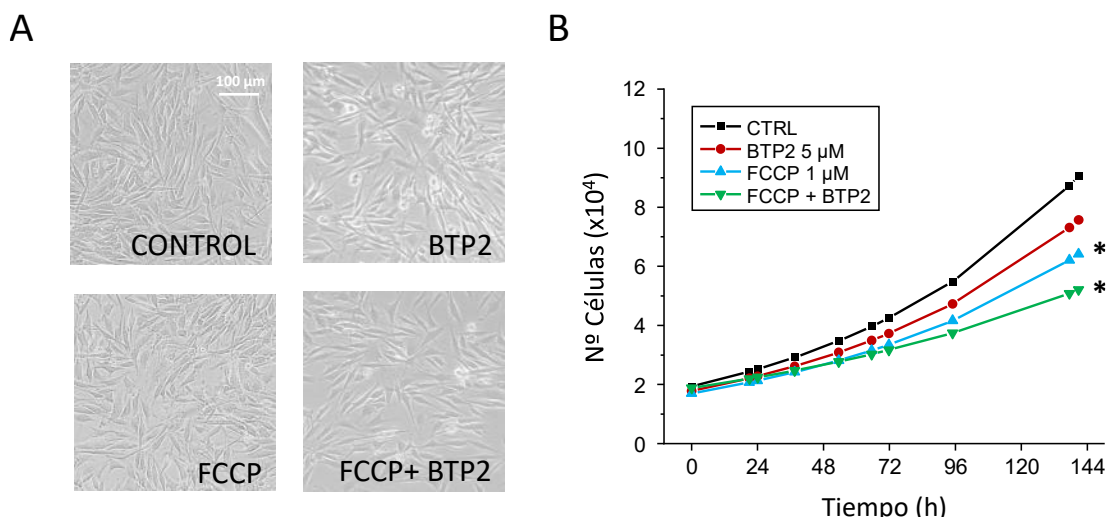


Figura 105. Efecto del BTP2 y el FCCP en la proliferación de células de GBM. Las células se siembran y se exponen al tratamiento con BTP2 (5 μM) y FCCP (1 μM) tras lo que se cuantifica el efecto de los diferentes tratamientos sobre el número de células a lo largo del tiempo (24, 96, 148 h). **A.** Imágenes representativas de los cultivos a las 96 h post-tratamiento. **B.** El gráfico representa el número de células frente al tiempo para cada uno de los tratamientos. El tratamiento con FCCP y la combinación de FCCP con BTP2 disminuye de forma significativa la proliferación de las células de GBM. El número de experimentos independientes fue de 4 para cada condición experimental. * $p < 0,05$ vs. control.

Los resultados mostraron cómo, en presencia de FCCP (1 μM) tiene lugar una disminución de la proliferación de los cultivos de GBM y que tal disminución se hace mayor al combinar FCCP (1 μM) con BTP2 (5 μM).

Una vez determinada la señal de Ca^{2+} en los diferentes tipos de tumores cerebrales, la correlación de SOCE y la malignidad de los gliomas, así como su papel en la proliferación de los glioblastomas, nos propusimos determinar el perfil transcriptómico a nivel de señal de Ca^{2+} para los glioblastomas, el tumor cerebral con peor pronóstico.

4.5 Perfil de expresión de los genes implicados en el transporte de Ca^{2+} intracelular en GBM.

A partir de los datos transcriptómicos obtenidos mediante RNA-Seq para las muestras de GBM, se evaluaron los niveles de expresión relativos entre diferentes genes de interés considerando $\log_2(\text{RPKM}+1)$ como variable respuesta, tal y como se explica en el apartado “2.13.4.2. Análisis de expresión relativa de los genes en muestras de GBM”. Así, se realizaron diferentes comparaciones de interés, desde comparaciones entre isoformas hasta comparaciones de ciertas proteínas y reguladores de estas.

La descripción de los resultados se va a dividir en función de la localización y/o familias de las proteínas para las cuales codifican los genes considerados. Comenzaremos la exposición con genes que codifican para sistemas de transporte de Ca^{2+} localizados en la MP. El análisis de la expresión de las distintas isoformas de los VOCC mostró que los *CAV1.1*, *CAV1.4*, *CAV2.2* y *CAV3.3* no se expresan, mientras que *CAV1.2*, *CAV1.3*, *CAV2.1* y *CAV3.1* presentan la mayor expresión, iguales todas ellas (figura 39). En cuanto a los receptores purinérgicos, se obtuvo, por un lado, que los receptores ionotrópicos *P2X1*, *P2X2* y *P2X3* no se expresan, mientras que el *P2X4* y *P2X7* son los que mayor expresión presentan. Por otro lado, de los receptores purinérgicos metabotrópicos, los *P2Y1* y *P2Y12* son los que mayor expresión mostraron, mientras que *P2Y2* no llegó a mostrar expresión, y *P2Y4* y *P2Y14* apenas llegan a expresarse (Figura 106).

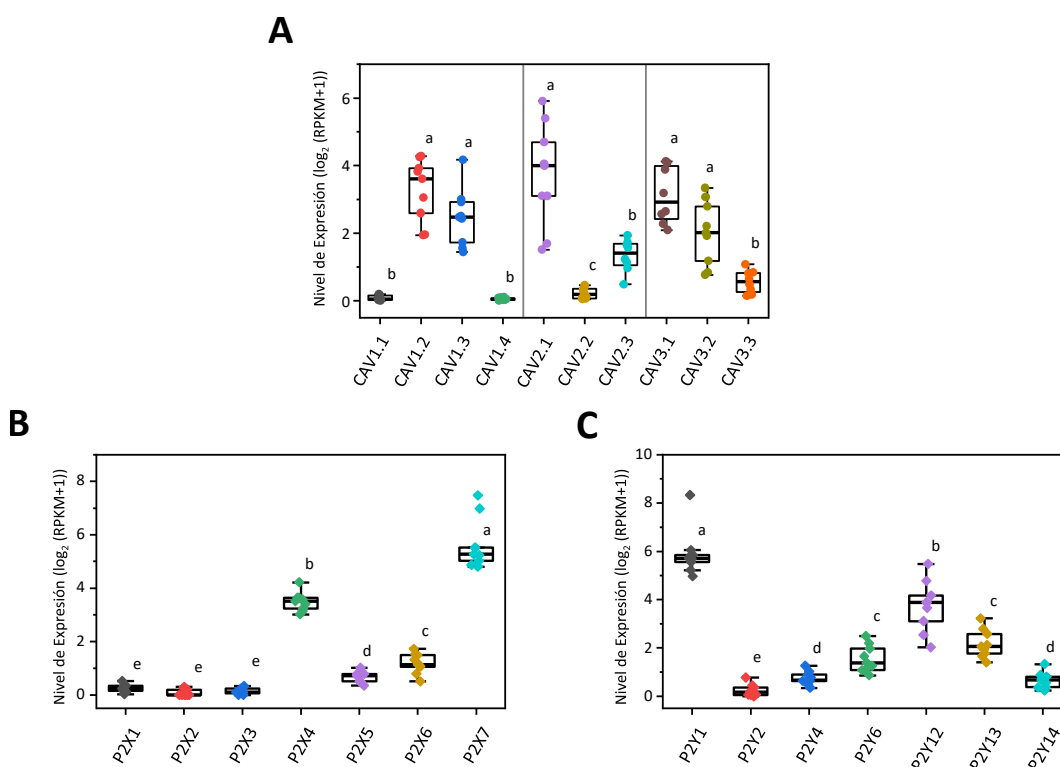


Figura 106. Nivel de expresión de los genes que codifican para proteínas localizadas en la MP e implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en cultivos primarios de GBM humanos. Los gráficos muestran los niveles de expresión de los diferentes genes relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular agrupados por familias: VOCC (**A**), receptores purinérgicos ionotrópicos (**B**) y receptores purinérgicos de carácter metabotrópico (**C**). El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Estas comparaciones se han realizado dos a dos tras un ANOVA previo del modelo. A partir de estas comparaciones dos a dos y de los p valores corregidos, se crean grupos homogéneos de genes donde dos o más genes con la misma letra indican que son iguales entre sí y diferentes a los genes con otra letra, dentro de una misma comparación. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

En cuanto a los genes que codifican para los miembros de la superfamilia de los TRP, es conveniente dividir estos resultados según la familia. Así, en primer lugar, se obtuvo que el *TRPC1*, de los 6 TRPC, es el que mayor expresión mostró, mientras que *TRPC5* y 7 apenas se detectaron (Figura 107A). Para los TRPV se puede observar cómo la expresión es mayor para las isoformas *TRPV1*, 2 y 3, mientras que es mínima para el TRPV5 (Figura 107B). En cuanto a los TRPM, destaca la expresión mucho mayor del TRPM2 respecto del resto de miembros, siendo prácticamente nula para el *TRPM1*, 5, 6 y 8 (Figura 107C). Por último, de entre los *TRPML*, *TRPA1* y *TRPP*, únicamente se detectó la expresión de *TRPML1*, *TRPP1* y *TRPP2* (Figura 107D). Los resultados sugieren que los canales TRP más expresados en GBM son *TRPC1*, *TRPV1-3*, *TRPM2*, *TRPML1* y *TRPP1,2*, destacando los elevadísimos niveles de expresión de *TRPM2*.

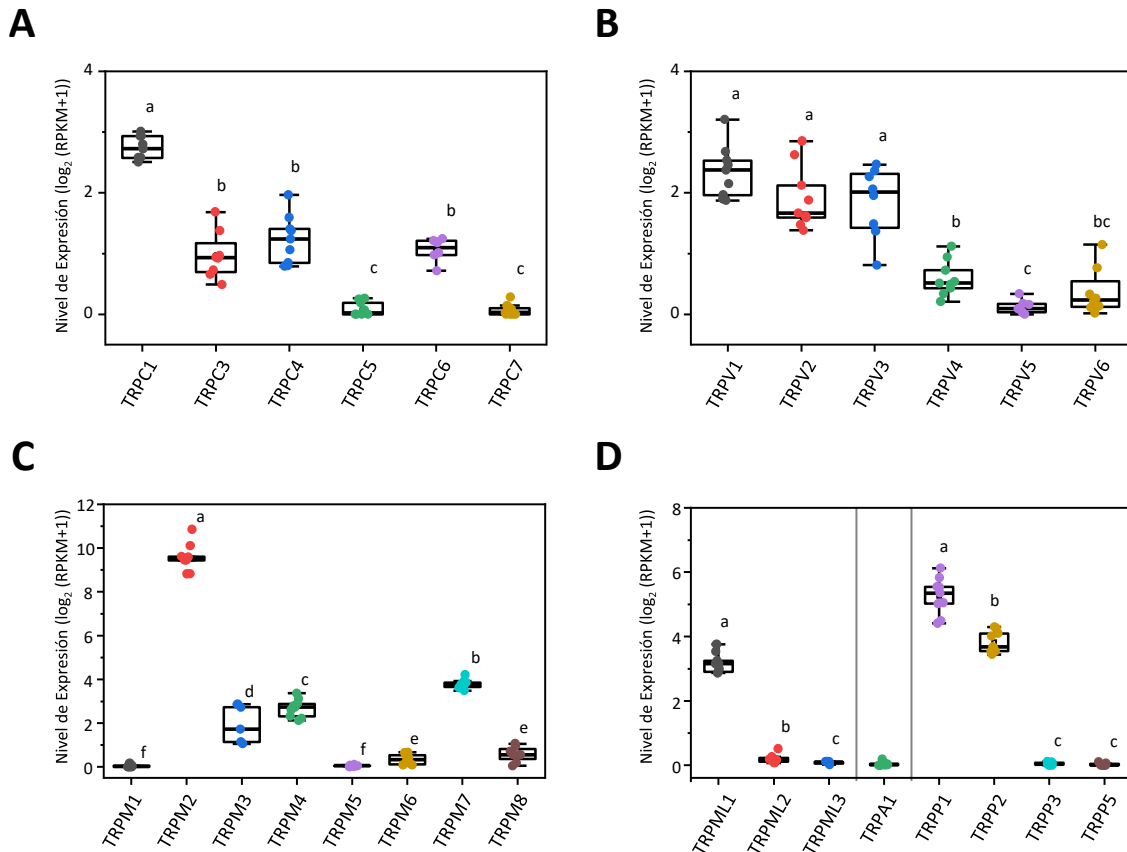


Figura 107. Nivel de expresión de los genes que codifican para los miembros de la superfamilia TRP en cultivos primarios de GBM humanos. Los gráficos muestran los niveles de expresión de los diferentes genes de la superfamilia de TRP: TRPC (A), TRPV (B), TRPM (C) y TRPML, TRPA y TRPP (D). El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Estas comparaciones se han realizado dos a dos tras un ANOVA previo del modelo. A partir de estas comparaciones dos a dos y de los p valores corregidos, se crean grupos homogéneos de genes donde dos o más genes con la misma letra indican que son iguales entre sí y diferentes a los genes con otra letra, dentro de una misma comparación. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

Respecto a las bombas de Ca^{2+} de la MP, RE y lisosomas, e intercambiadores NCX de la MP, se identificó la mayor expresión para la *PMCA4*, la *SERCA2*, la *SPCA1* y el *NCX1*, respectivamente. A su vez, también se observó una expresión prácticamente inexistente para la *PMCA3*, *SERCA1*, *SPCA2* y *NCX2*, respectivamente (Figura 108).

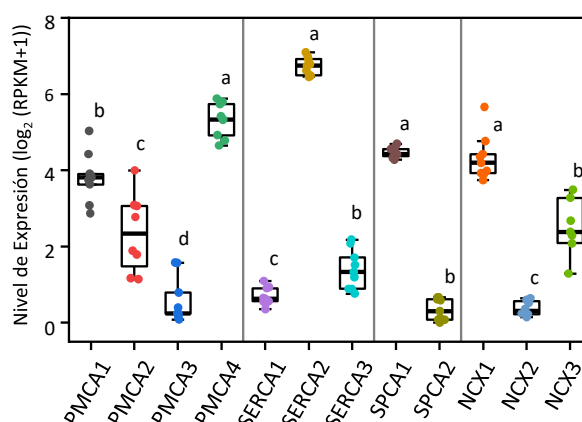


Figura 108. Nivel de expresión de los genes que codifican para las bombas de Ca^{2+} de la MP, RE y lisosomas, e intercambiadores NCX de la MP en cultivos primarios de GBM humanos. El gráfico muestra los niveles de expresión de las bombas e intercambiadores de interés. El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Estas comparaciones se han realizado dos a dos tras un ANOVA previo del modelo. A partir de estas comparaciones dos a dos y de los p valores corregidos, se crean grupos homogéneos de genes donde dos o más genes con la misma letra indican que son iguales entre sí y diferentes a los genes con otra letra, dentro de una misma comparación. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

En cuanto a los genes que codifican para los participantes de SOCE, se obtuvo prácticamente la misma expresión para las 3 isoformas de ORAI y las 2 de STIM, siendo las más altas para ORAI2 y STIM1. En cuanto a sus reguladores, hay una gran expresión de *SARAF*, *STIMATE* y *ORMDL3*, mientras que *MS4A12* y *MBP* no se expresaron; no obstante, si bien es cierto que el *CRACR2A* sí mostró expresión, esta fue baja. Respecto de las septinas, también reguladores de SOCE; su perfil de expresión es muy variopinto, destacando la expresión elevada de la *SEPTIN7* la cual regula SOCE de forma negativa, aunque el resto de ellas también muestran una gran expresión, siendo la mayor para la *SEPTIN2*, reguladora positiva de SOCE (Figura 109).

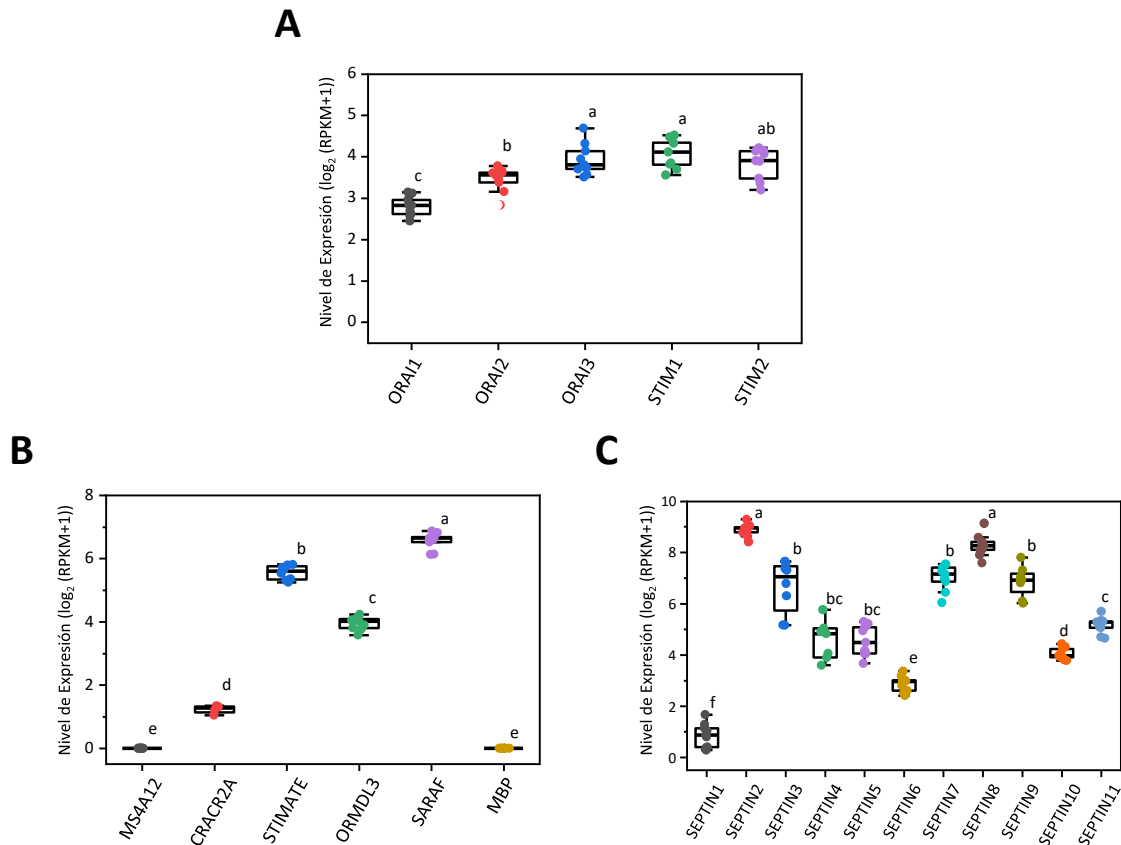


Figura 109. Nivel de expresión de los genes que codifican para proteínas implicadas en SOCE y sus reguladores en cultivos primarios de GBM humanos. El gráfico muestra los niveles de expresión de los genes que transcriben para los participantes de SOCE (A) y sus reguladores (B y C). El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Estas comparaciones se han realizado dos a dos tras un ANOVA previo del modelo. A partir de estas comparaciones dos a dos y de los p valores corregidos, se crean grupos homogéneos de genes donde dos o más genes con la misma letra indican que son iguales entre sí y diferentes a los genes con otra letra, dentro de una misma comparación. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

Por último, también se evaluó la expresión de genes que codifican para transportadores de Ca^{2+} localizados en orgánulos subcelulares; en concreto, el RE y la mitocondria. Respecto del RE, se observó cómo la expresión de la isoforma $\text{IP}_3\text{R2}$ es la mayor de las 3 isoformas de IP_3R , mientras que la isoforma RyR3 lo es de las 3 RyR , donde también destaca la nula expresión de la isoforma RyR2 . En cuanto a la mitocondria, se puede observar que todos los genes evaluados mostraron expresión. Por un lado, los genes del complejo MCU muestran una expresión bastante similar, si bien es cierto que MCU y MICU3 mostraron menor (regulación positiva de la entrada de Ca^{2+}), mientras que MCUB y MICU2 mayor (regulación negativa), siendo la mayor de todas para EMRE y MICU1 . En cuanto a los VDAC, la expresión es mayor para la isoforma 1 y menor para la isoforma 3. En cuanto al NCLX , mostró una expresión muy similar a la mostrada por el MCUB , MICU1 y MICU2 (Figura 110).

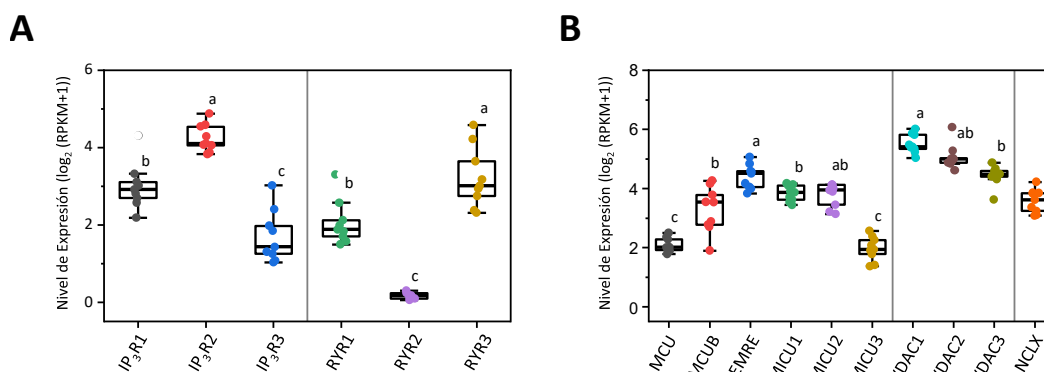


Figura 110. Nivel de expresión de los genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte de Ca^{2+} localizadas en el RE y la mitocondria en cultivos primarios de GBM humanos. El gráfico muestra los niveles de expresión de los genes que transcriben para los sistemas de transporte de Ca^{2+} del RE (A) y de la mitocondria (B). El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Estas comparaciones se han realizado dos a dos tras un ANOVA previo del modelo. A partir de estas comparaciones dos a dos y de los p valores corregidos, se crean grupos homogéneos de genes donde dos o más genes con la misma letra indican que son iguales entre sí y diferentes a los genes con otra letra, dentro de una misma comparación. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

4.6 Estudio del remodelado del Ca^{2+} en GBM y áreas peritumorales

A continuación, se ha procedido a analizar las posibles diferencias en la señal de Ca^{2+} entre las obtenidas del núcleo de la zona tumoral, glioblastoma y células obtenidas de áreas peritumorales. Las muestras se recogen y procesan de forma ciega; es decir desconocemos a que zona pertenece cada una de ellas. Se han recogido muestras de 8 pacientes (Tabla 14) de entre 51 y 77 años, de las cuales el 60 % de las muestras proceden de varones y el 40 % de mujeres.

Tabla 14. Características de las muestras de glioblastoma (y astrocitoma grado 4) y áreas peritumorales.

ID	Sexo	Edad	Diagnóstico Anatomía Patológica		
			IDH	ATRX	ki67
ID001	Hombre	56	Wild-type	Negativo	45
ID002	Hombre	77	Wild-type	Negativo	22
ID003	Mujer	58	Wild-type	Negativo	28
ID004	Hombre	70	Wild-type	Negativo	15
ID005	Hombre	51	Mutante	Negativo	25
ID006	Mujer	73	Mutante	Negativo	40
ID007	Hombre	61	Wild-type	Negativo	45
ID008	Mujer	63	Wild-type	Negativo	40

Cada una de las muestras recogidas, se divide en dos. Una parte se preserva en la solución *RNAlater* para la posterior realización de un análisis transcriptómico. La otra parte se procesa inmediatamente para la obtención de cultivos primarios. Las muestras procedentes de un mismo paciente (α , β , γ) se procesaron de forma paralela e independiente, por lo que, de cada paciente, se obtuvieron 3 cultivos primarios en los cuales se llevaron a cabo estudios de la señal del Ca^{2+} (Figura 111).

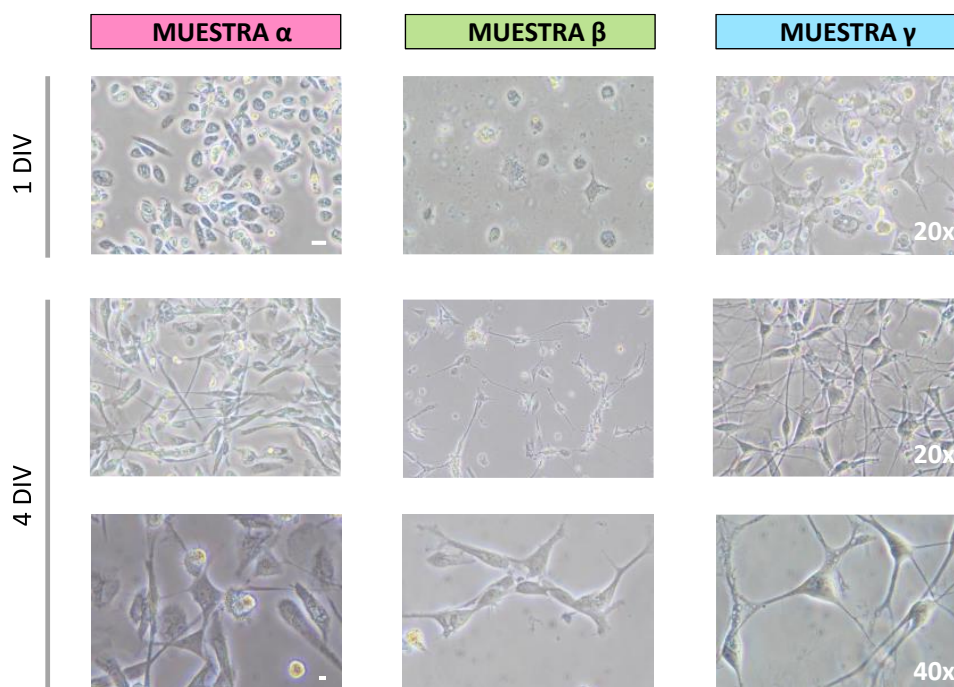


Figura 111. Imágenes representativas de cultivos primarios de GBM y áreas peritumorales. Las imágenes muestran cultivos primarios de las regiones α , β y γ a diferentes DIV (1 y 4 DIV). Las barras blancas indican una escala de 10 μm .

4.6.1 Análisis de la Señal de Ca^{2+} en GBM y regiones peritumorales

Dado que de cada paciente se recogieron 3 muestras, y que estas se procesan de forma independiente, se obtienen tres cultivos primarios (α , β , γ). Tras la obtención de los cultivos, las células se sembraron en cubreobjetos para llevar a cabo los experimentos de imagen de Ca^{2+} dentro de las primeras 48 h tras su obtención. En estos estudios se evaluaron, por un lado, la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos y SOCE y, por otro lado, la respuesta del Ca^{2+} intracelular tras estimular las células con ATP. Para facilitar la comprensión, a partir de ahora se va a identificar cada área tumoral/ peritumoral con un color: “ α ” en rosa, “ β ” en verde y “ γ ” en azul. Cabe destacar que los diferentes colores, en este caso, no indican que existan diferencias significativas entre las muestras con diferentes colores.

4.6.1.1 Estudio de la liberación de Ca^{2+} desde el RE y SOCE

Mediante la técnica de imagen de fluorescencia de Ca^{2+} se evaluó tanto el tamaño de los depósitos de Ca^{2+} como SOCE en los cultivos primarios de glioblastomas de las distintas áreas (muestras ciegas pareadas de GBM y peritumorales). El tamaño de los depósitos de Ca^{2+} se evaluó a partir de la liberación de Ca^{2+} desde el RE al citosol inducida por el inhibidor reversible de SERCA, CPA (Figura 112A). Una vez vaciados los depósitos intracelulares, se reveló SOCE mediante la adición de Ca^{2+} al medio (Figura 113A).

A partir de los registros obtenidos, se evaluó liberación de Ca^{2+} desde el RE (Figura 112B) y SOCE (Figura 113B) en los distintos cultivos. En ambos casos se analizó tanto el incremento máximo de la ratio F340/380 como el área bajo la curva (AUC). El análisis de los datos reveló que la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares es significativamente diferente entre los cultivos procedentes de las muestras “ α ” y las muestras “ γ ”, siendo estos últimos los que menor contenido de Ca^{2+} liberan (Figura 112B). Sin embargo, en la Figura 113B, el análisis de SOCE no mostró diferencias significativas entre los cultivos de las diferentes áreas estudiadas.

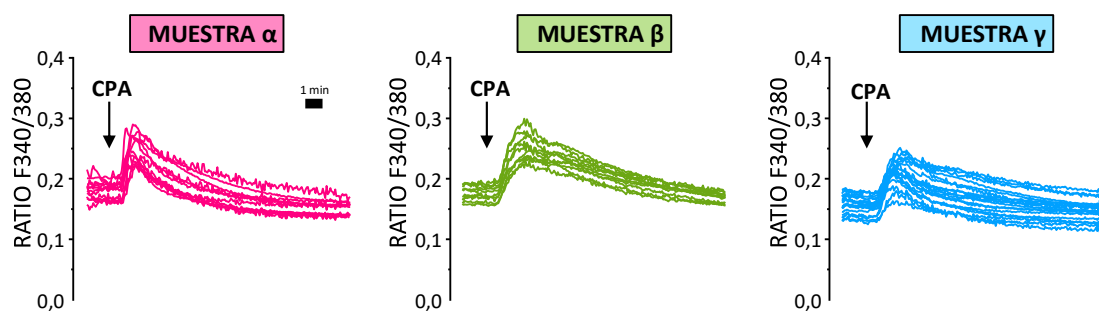
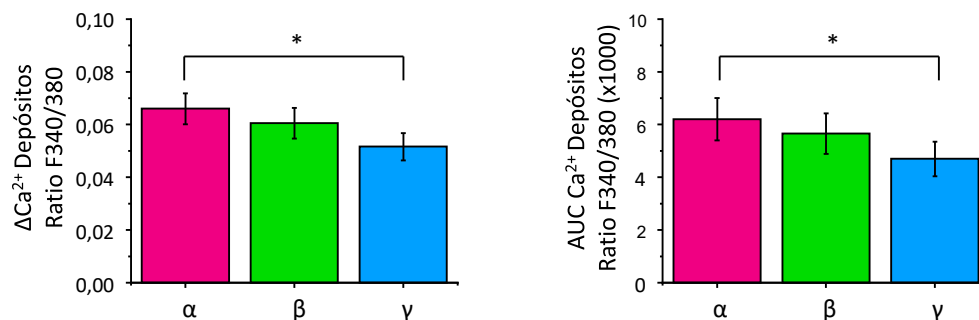
A**B**

Figura 112. Registro en célula única del tamaño de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} en cultivos primarios de GBM y áreas peritumorales. A. Se muestran registros representativos de imagen de Ca^{2+} en célula única para cada una de las áreas estudiadas: área “ α ”, área “ β ” y área “ γ ”. Las células se incuban con la sonda Fura-2/AM (4 μM , 1h), la cual permite monitorizar los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$. Se indujo el vaciado de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares con CPA (10 μM). **B.** Los gráficos de barras muestran los valores obtenidos del tamaño de los depósitos en términos de incremento de Ca^{2+} y el AUC para los cultivos de las diferentes áreas estudiadas y su Error Estándar (ES). El análisis mostró diferencias significativas en la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos entre las células del área “ α ” y el área “ γ ”, siendo esta última área donde las células presentan menor respuesta. El tamaño muestral fue de 494, 285 y 262 células, respectivamente, correspondiente a 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

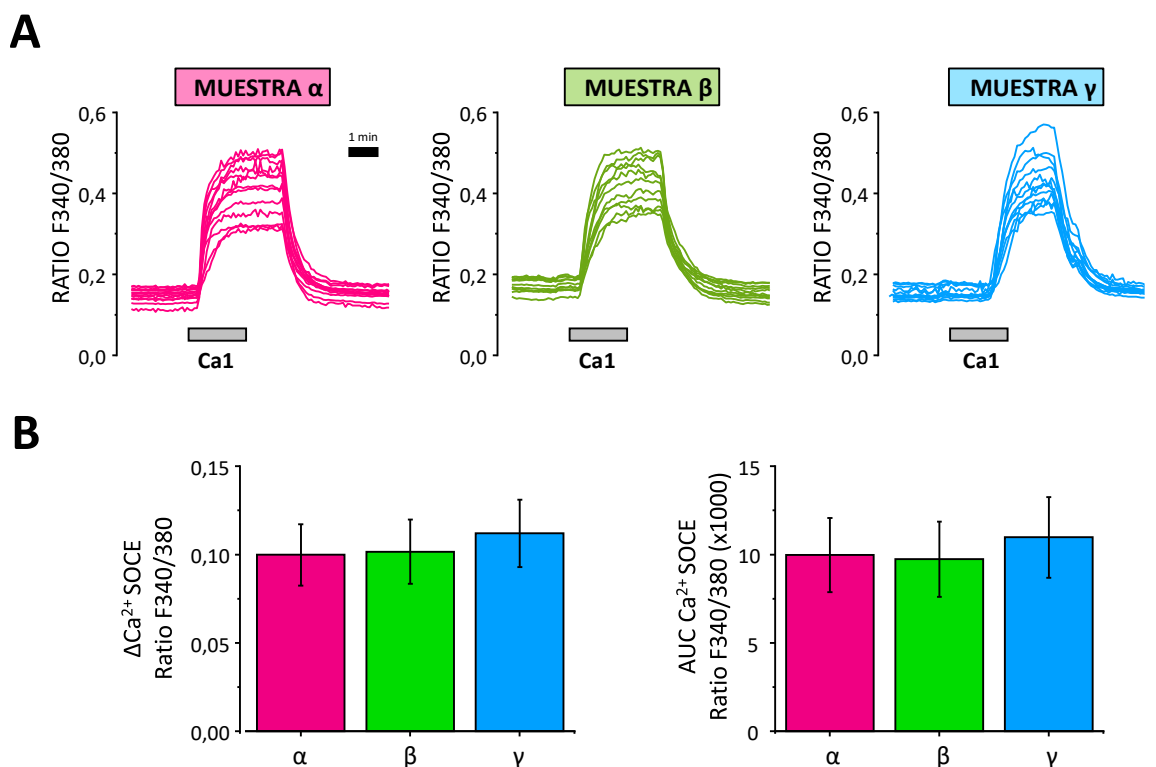


Figura 113. Registro en célula única de SOCE en cultivos primarios de GBM y áreas peritumorales. A. Se muestran registros representativos de imagen de Ca^{2+} en célula única para cada una de las áreas estudiadas: área α , área β y área γ . Las células se incuban con la sonda Fura-2/AM (4 μ M, 1h), la cual permite monitorizar los cambios en la $[Ca^{2+}]_{cit}$. Tras inducir el vaciado de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares con CPA (10 μ M), se reveló SOCE. B. Los gráficos de barras muestran los valores obtenidos de SOCE en términos de incremento de Ca^{2+} y el AUC para los cultivos de las diferentes áreas estudiadas y su Error Estándar (ES). El análisis no mostró diferencias significativas en la entrada de Ca^{2+} a través de SOCE entre las diferentes áreas. El tamaño muestral fue de 494, 285 y 262 células, respectivamente, correspondiente a 3 experimentos independientes.

4.6.1.2 Caracterización de la señal de Ca^{2+} en respuesta a ATP

En segundo lugar, nos planteamos caracterizar la respuesta del Ca^{2+} a diferentes agonistas en los cultivos obtenidos de las distintas áreas (Figura 114). Para ello, se analizó, mediante imagen de fluorescencia y con la sonda Fura-2/AM, como cambia la $[Ca^{2+}]_{cit}$ tras estimular las células con ATP (100 μ M). En la Figura 114 se observa cómo las células de las distintas áreas estudiadas experimentaron un cambio en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ tras perfundir ATP, y, por tanto, tras la activación de los receptores P2X.

El análisis, tanto del incremento máximo de Ca^{2+} como del área bajo la curva registrado tras la estimulación con ATP 100 μ M, reveló que el incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ registrado en cultivos procedentes del área “ α ” son los que experimentan una mayor entrada de Ca^{2+} , siendo esta significativamente mayor que la de las células del área “ β ”. No obstante, el área muestra valores intermedios entre la “ α ” y la “ β ”.

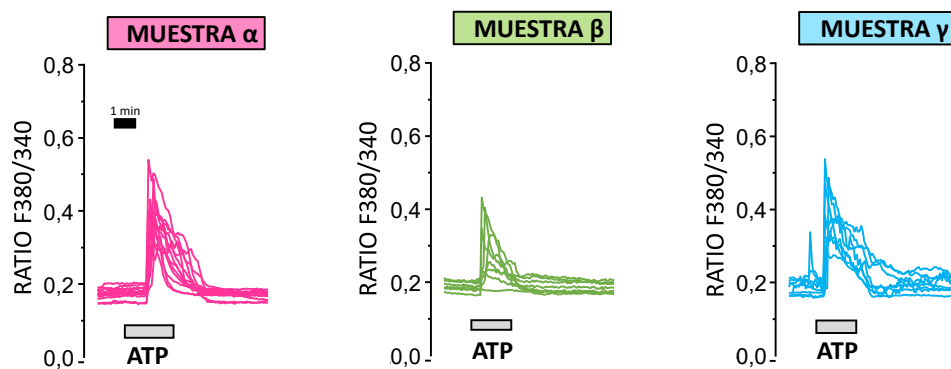
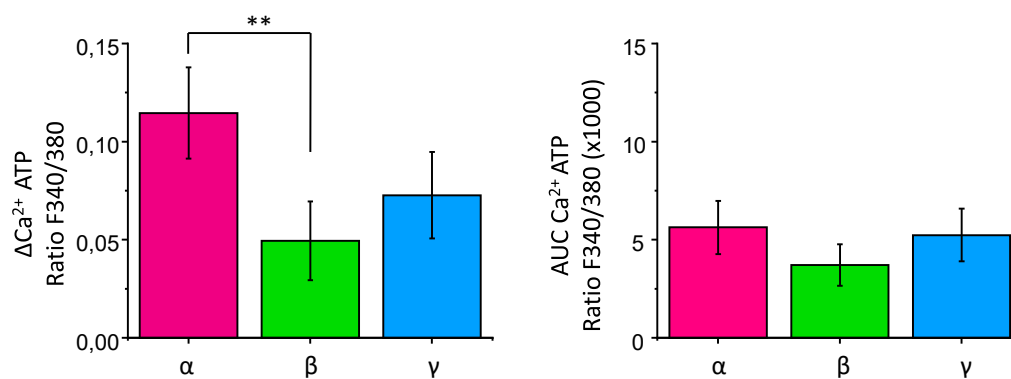
A**B**

Figura 114. Caracterización de la señal de Ca^{2+} en respuesta ATP en cultivos de GBM y áreas peritumorales. Las células se incuban con Fura-2/AM (4 μ M, 1 h) y a continuación, se registra la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en un equipo de imagen de fluorescencia. **A.** Registros representativos de la señal de Ca^{2+} tras estimular las células con ATP 100 μ M. **B.** Los gráficos de barras muestran el incremento de Ca^{2+} y el AUC tras la perfusión de ATP. La cuantificación de la señal reveló diferencias significativas entre las células del área “ α ” y el área “ β ”, siendo las células del área las que menor respuesta presentan. El tamaño muestral fue de 384, 296 y 256 células, respectivamente, correspondiente a 3 experimentos independientes. * $p < 0,01$.

4.6.2 Perfil de expresión de los genes implicados en el transporte de Ca^{2+} intracelular en muestras de GBM y peritumorales

Del mismo modo que en el caso del estudio de los niveles de expresión relativa de los genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} intracelular en las muestras de GBM, se ha estudiado el perfil de expresión relativa de esos mismos genes en las 24 muestras pareadas provenientes de 8 pacientes, 1 tumoral y 2 peritumorales por paciente. Por lo tanto, para cada conjunto de genes, se mostrará un gráfico de cajas y bigotes de los niveles de expresión relativa para cada gen del conjunto, expresada como $\log_2(\text{RPKM}+1)$. Además, en estos mismos gráficos se añadirán los niveles de expresión relativa de esos mismos genes, pero de las 9 muestras de GBM, pues, de esta manera, de forma visual e intuitiva, se podrá interpretar el patrón del perfil de expresión de cada tipo de muestra y relacionarlo con el perfil del GBM. No obstante, cabe destacar que la exposición de los perfiles de expresión relativa para las diferentes muestras, enfocada en los genes de interés, es meramente descriptiva, pues, por el momento, no se realizan contrastes de hipótesis sobre la expresión diferencial de estos genes entre los diferentes tipos de muestra. En particular, tal análisis de expresión diferencial se realizará más adelante.

En primer lugar, estudiamos los perfiles de expresión relativa de los VOCC. Observamos que algunos genes tienen un patrón de expresión bastante similar entre las 4 muestras, independientemente de que haya o no diferencias en tal expresión entre las muestras. Por un lado, ninguna de las muestras expresa ni el *CAV1.1* ni el *CAV1.4*, y apenas se expresa el *CAV3.3*. Por otro lado, están los genes que sí que se expresan en todas las muestras y que muestran un patrón de expresión similar en todas ellas como *CAV1.2*, *CAV1.3*, *CAV2.1* y *CAV2.3*. No obstante, algunos VOCC muestran un perfil de expresión diferente entre las diferentes muestras. Por ejemplo, *CAV2.2* apenas se expresa en las muestras “GBM” o “ α ”, mientras que en “ β ” y “ γ ” sí se observa cierta expresión, aunque muy baja. Al contrario, los genes *CAV3.1* y *CAV3.2* presentan expresión en las 4 muestras, pero esta parece disminuir desde la muestra GBM hasta la “ γ ” (Figura 115).

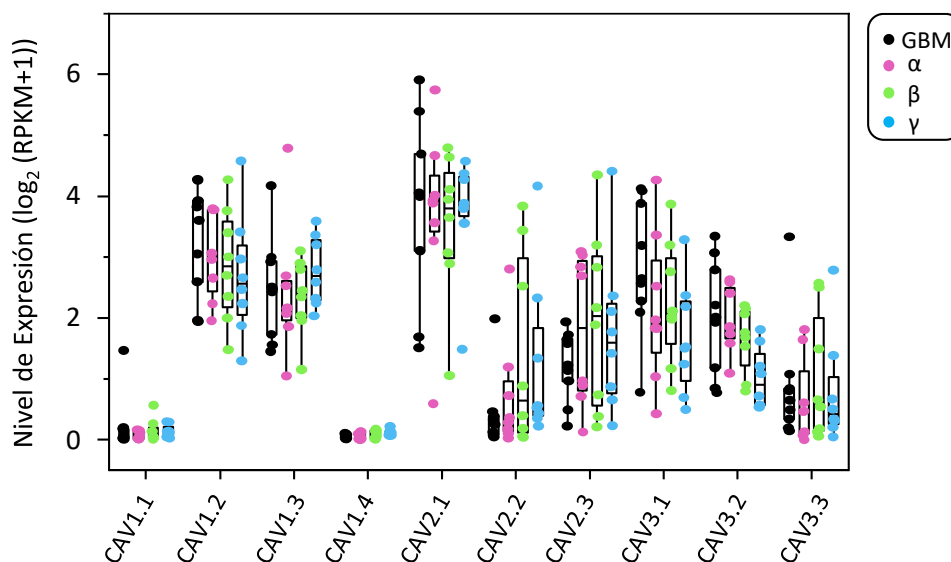


Figura 115. Nivel de expresión de los genes que codifican para VOCCs en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales. Los gráficos muestran los niveles de expresión para las diferentes muestras de los diferentes genes relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular agrupados por familias: VOCC. El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

En segundo lugar, estudiamos los receptores purinérgicos. Se observa un patrón muy similar en las 4 muestras para la mayoría de estos genes. Empezando por los receptores ionotrópicos, se observa que los genes *P2X1*, *P2X2* y *P2X3* no se expresan, que *P2X5* y *P2X6* tienen una muy baja expresión y que los que más se expresan son, de más a menos, el *P2X7* y el *P2X4*. No obstante, hay que destacar que, de todas ellas, el *P2X7* parece tener una expresión mayor en la muestra “ γ ” que en las demás. En cuanto a los receptores purinérgicos metabotrópicos, se puede observar cómo los *P2Y1*, *P2Y12* y *P2Y13* son los que mayor expresión relativa presentan, mientras que el *P2X2*, *P2X4* y *P2X14* la que menos. De todos ellos hay 3 que parecen tener un perfil de expresión diferente en las muestras “ γ ”, en concreto, estas muestras parecen una mayor expresión de los genes *P2X2*, *P2X12* y *P2X13* (Figura 116). Es curioso que una de estas isoformas tiene un patrón de expresión diferente, la *P2Y2*, prácticamente no se expresa en las muestras de “GBM”.

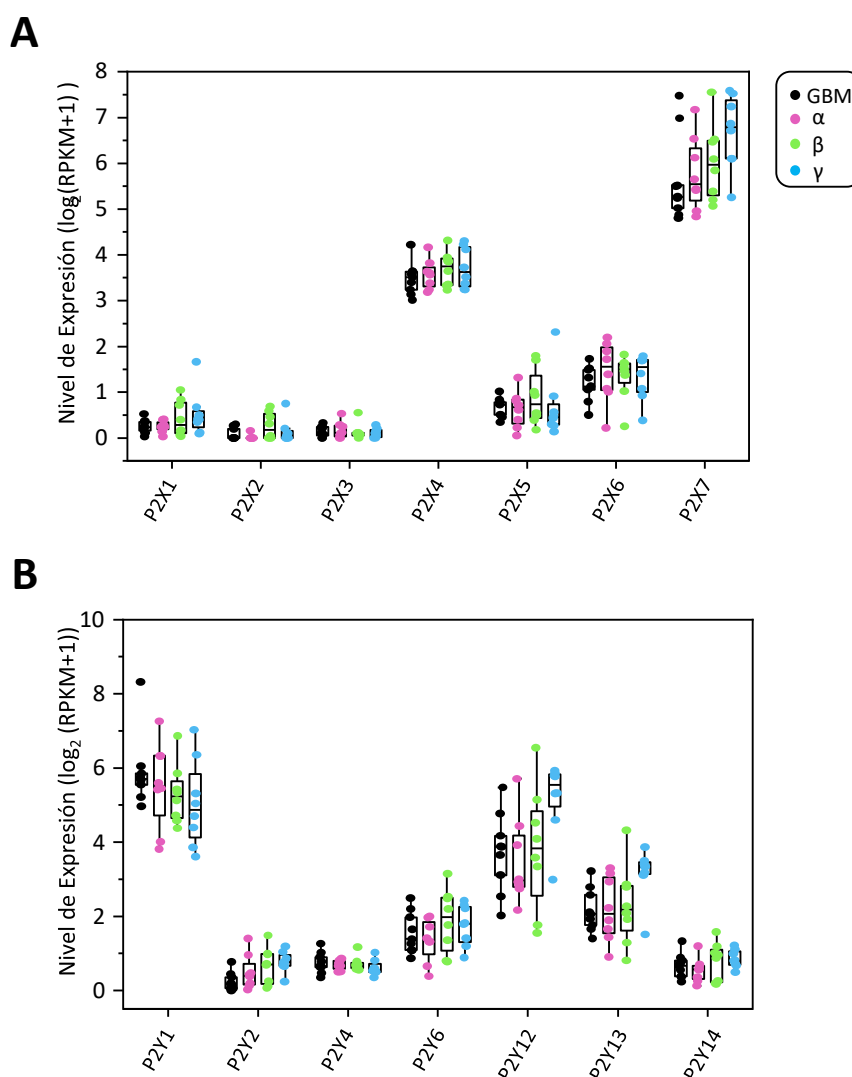


Figura 116. Nivel de expresión de los genes que codifican para receptores purinérgicos en cultivos primarios de GBM humanos y muestras pareadas tumorales y peritumorales. Los gráficos muestran los niveles de expresión para las diferentes muestras de los receptores purinérgicos ionotrópicos (A) y metabotrópicos (B). El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para los genes de la superfamilia de canales TRP. Se distinguen genes con una expresión relativa muy alta, tales como *TRPM2*, *TRPP1* y *TRPP2*; genes con una expresión relativa media, como *TRPC1*, *TRPV1*, *TRPV2*, *TRPV3*, *TRPM3*, *TRPM4*, *TRPM7* y *TRPML1*; genes con una expresión relativa baja, como *TRPC3*, *TRPC4*, *TRPC6*, *TRPV4*, *TRPV5*, *TRPV6*, *TRPM6*, *TRPM8*, *TRPML2*, *TRPML3*; y genes con una expresión nula o prácticamente nula, como *TRPC5*, *TRPC7*, *TRPM1*, *TRPM5*, *TRPP3* y *TRPP5*. Curiosamente, de todos estos genes, aquellos que parecen tener un patrón diferente de expresión relativa en alguna de las muestras son genes cuya expresión relativa es media. Por un lado, se observa perfil de expresión mayor en las muestras GBM para *TRPC6*, *TRPV4* y *TRPP1* y menor en *TRPV3*, *TRPV5*, *TRPV6* y *TRPM6*. En particular, el *TRPV5* y el *TRPM6* apenas tienen expresión en las muestras de “GBM” (Figura 117).

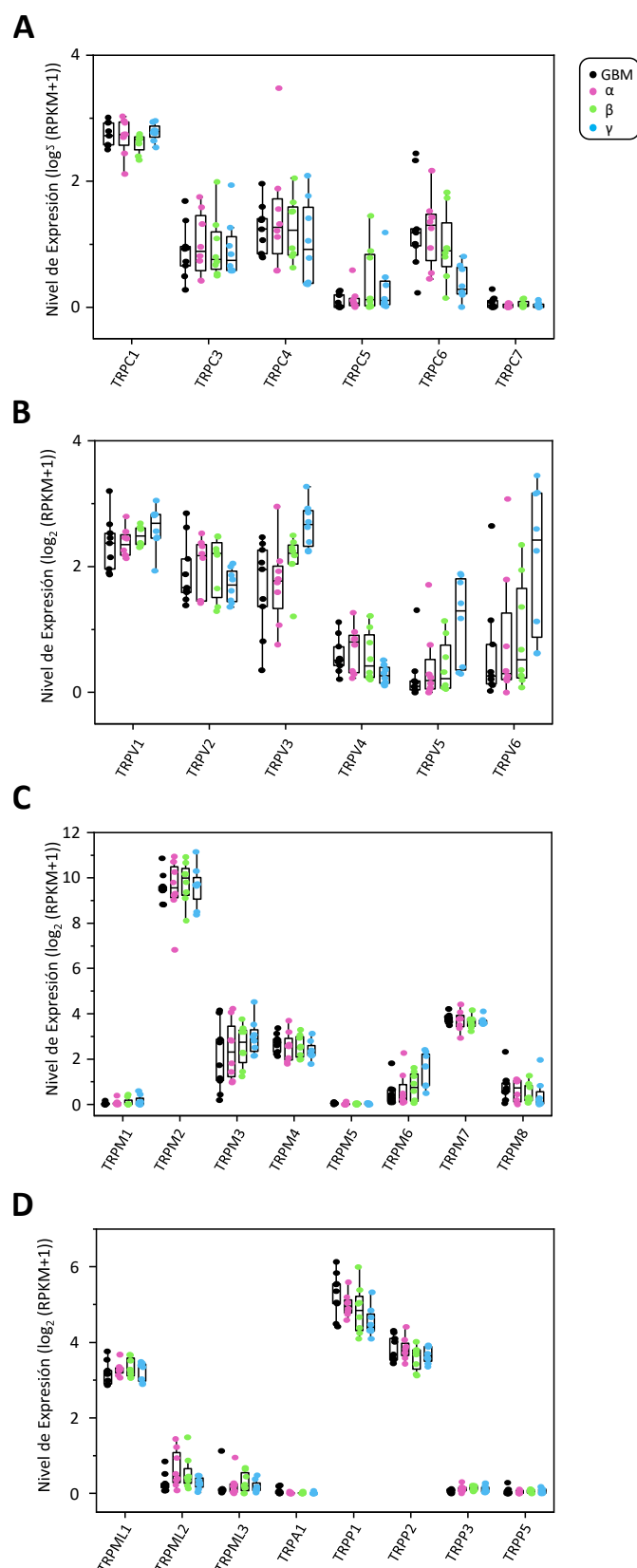


Figura 117. Nivel de expresión de la superfamilia de canales TRP en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales. Los gráficos muestran los niveles de expresión para las diferentes muestras de los diferentes genes de la superfamilia de TRP: TRPC (A), TRPV (B), TRPM (C) y TRPML, TRPA y TRPP (D). El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

En cuanto a los genes que codifican para las bombas de Ca^{2+} de la MP, RE y lisosomas, e intercambiadores NCX de la MP, se observa prácticamente el mismo patrón de expresión relativa en todas las muestras. En concreto, se puede observar una mayor expresión de los genes *PMCA4*, *SERCA2*, *SPCA1* y *NCX1*, respectivamente. A su vez, también se observó una expresión muy baja o prácticamente nula de los genes que codifican para la *PMCA3*, *SERCA1*, *SPCA2* y *NCX2*, respectivamente (Figura 118). Cabe destacar que, quizás, los únicos genes que podrían presentar una ligera expresión relativa diferente serían los de *SERCA1* y el *NCX2*, mostrando una ligera menor y mayor expresión relativa, respectivamente, en la muestra “ γ ” y, quizás, en “ β ”, respecto de “GBM” y “ α ” (Figura 118).

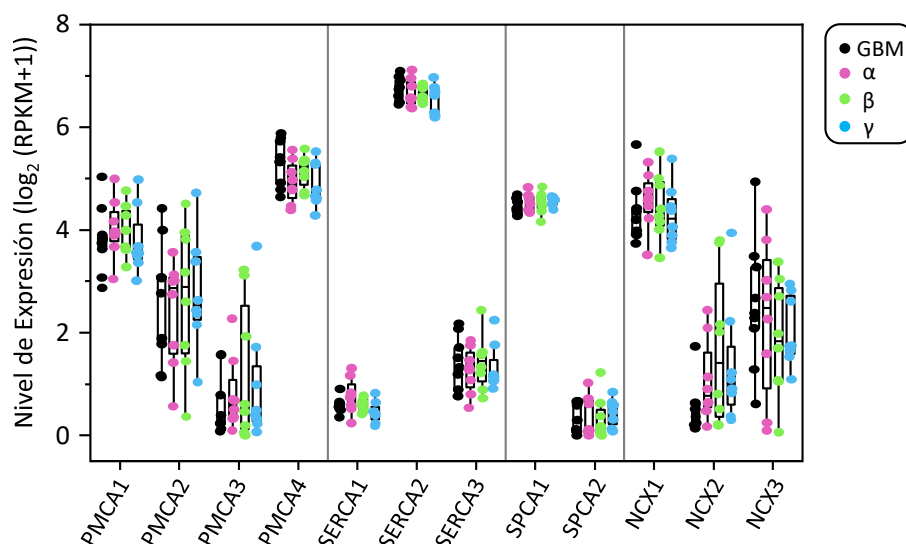


Figura 118. Nivel de expresión de los genes que codifican para las bombas de Ca^{2+} de la MP, RE y lisosomas, e intercambiadores NCX de la MP en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales. Los gráficos muestran los niveles de expresión para las diferentes muestras de expresión de las bombas e intercambiadores de interés. El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

Para los genes que codifican a miembros de SOCE, se observa una expresión relativa similar en las 3 isoformas de *ORAI* y de *STIM*, si bien es cierto que para *ORAI1* parece algo menor. En cuanto a sus reguladores, hay una gran expresión de las *SEPTIN2*, 6 y 7, así como de *SARAF*, *STIMATE* y *ORMDL3*, mientras que *MS4A12* y *MBP* no se expresan. También hay algunos genes, como la *SEPTIN1* y *CRACR2A* que, aunque sí muestran expresión, esta es muy baja. En cuanto al resto de *SEPTIN*, su expresión es relativamente alta, a excepción de las *SEPTIN5* y 9, cuya expresión es media en comparación con el resto de *SEPTIN* (Figura 119). De todos estos genes, algunos parecen comportarse de forma diferente en según qué muestras. En concreto, la expresión relativa de *ORAI2* y de la *SEPTIN9* parece ser menor en la muestra “ γ ”, mientras que la *SEPTIN4*, 7 y 8 parecen ser mayores (Figura 119).

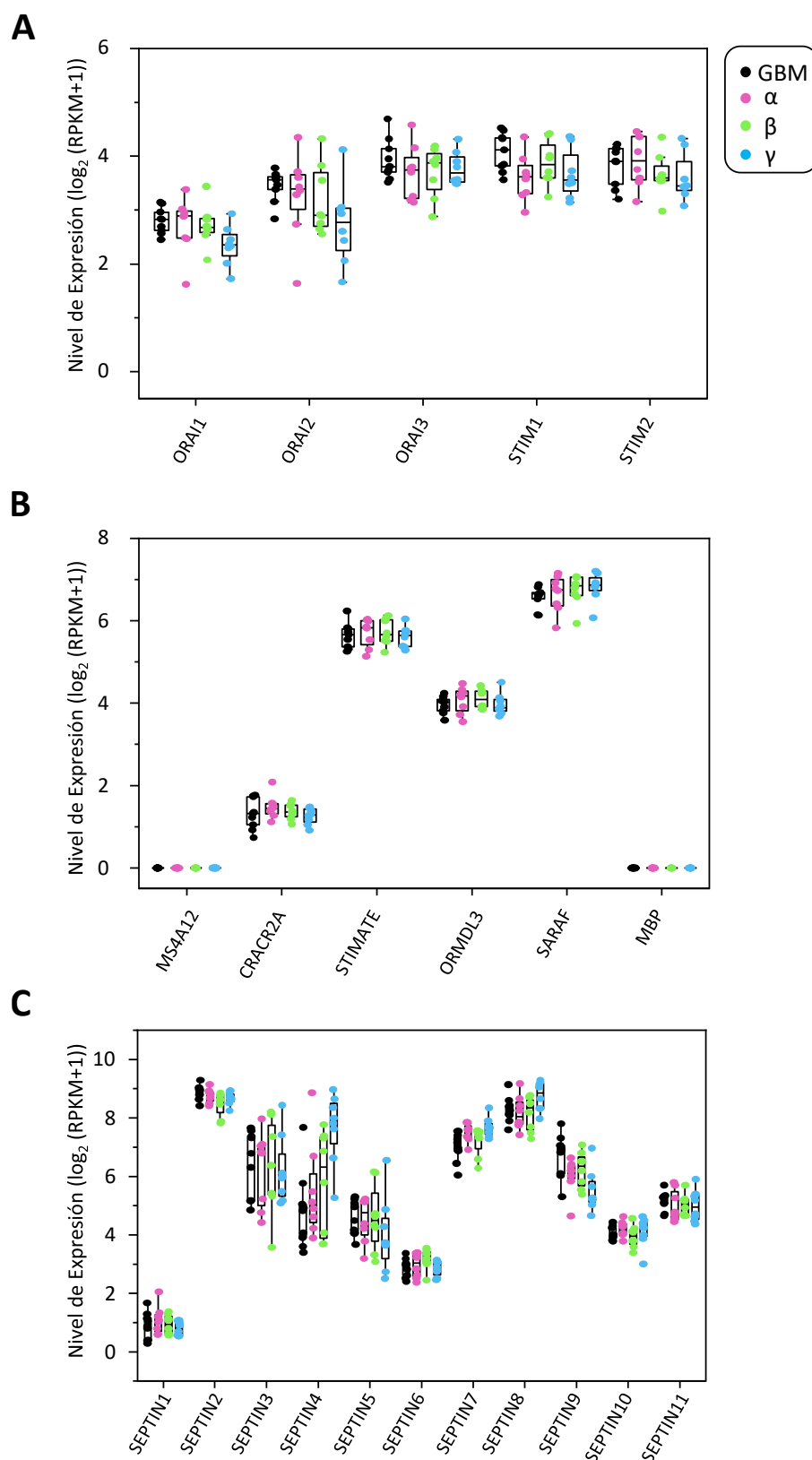


Figura 119. Nivel de expresión de los genes que codifican para proteínas implicadas en SOCE y sus reguladores en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales. Los gráficos muestran los niveles de expresión para las diferentes muestras de los genes que transcriben para los participantes de SOCE (A) y sus reguladores (B y C). El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

En último lugar, vamos a analizar los perfiles de expresión relativa de los genes que codifican para transportadores de Ca^{2+} localizados en orgánulos subcelulares. En el RE se observó expresión relativa media/elevada de las 3 isoformas de los genes *IP₃R* cuyo perfil de expresión es muy similar en los cuatro tipos de muestras. Sin embargo, aunque la expresión de las 3 isoformas de *RYR*, de forma general, también tiene una expresión similar, lo cierto es que el perfil de expresión difiere entre las 4 muestras para los 3 genes. En concreto, la muestra “ γ ” sería la que mayor expresión relativa tiene en todos los casos, a excepción de la isoforma 3 donde la muestra “GBM” también presenta la misma expresión que la muestra “ γ ”. Además, cabe destacar que la muestra de “GBM” apenas expresa la isoforma *RYR2* (Figura 120).

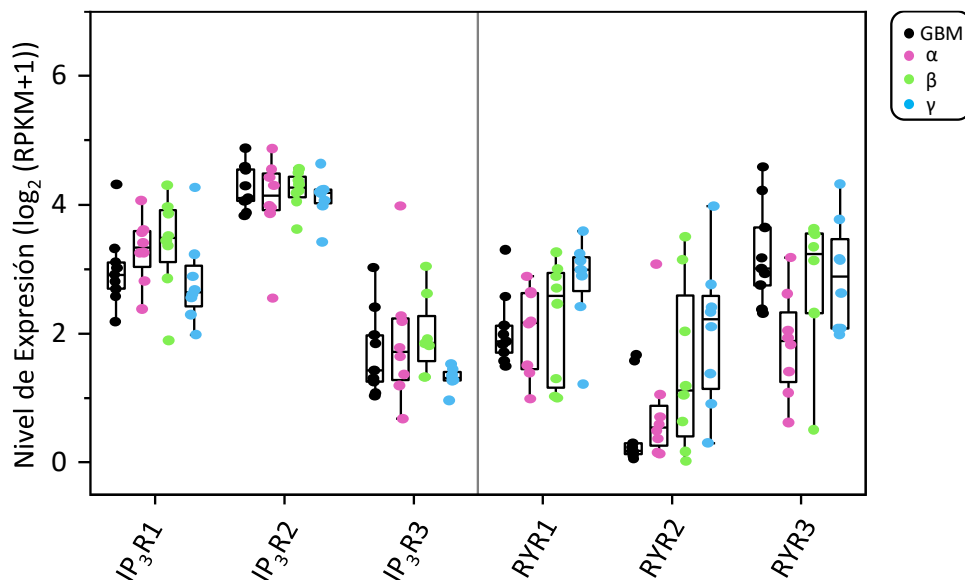


Figura 120. Nivel de expresión de los genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte de Ca^{2+} localizadas en el RE y la mitocondria en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales. Los gráficos muestran los niveles de expresión para las diferentes muestras de los genes que transcriben para los sistemas de transporte de Ca^{2+} del RE (A) y de la mitocondria (B). El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

En cuanto a la mitocondria, se puede observar cómo, en los cuatro tipos de muestra, todos los genes evaluados presentan expresión. Curiosamente, los resultados sugieren que hay una predominancia por la regulación negativa de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, pues de los reguladores del complejo MCU los que más expresión relativa presentan son *MCUB* y *MICU2*, reguladores negativos, y, además, *EMRE* y *MICU1*. En cuanto al *NCLX*, mostró una expresión muy similar a la mostrada por el *MCUB*, *MICU1* y *MICU2*. Además, a esto hay que sumarle que la expresión del regulador positivo *MICU3* es más baja en las 4 muestras, así como el propio *MCU*. Respecto de los *VDAC*, las tres isoformas muestran una gran expresión, siendo mayor, aparentemente, para la 1 y menor para la 3 (Figura 121). En cuanto a si los perfiles de expresión relativa son o no similares en los 4 tipos de muestras, el *MCU* y el *MCUB* parece ligeramente inferior en la muestra “ γ ”, mientras que el *MICU1* y *MICU3* parecen ligeramente superiores.

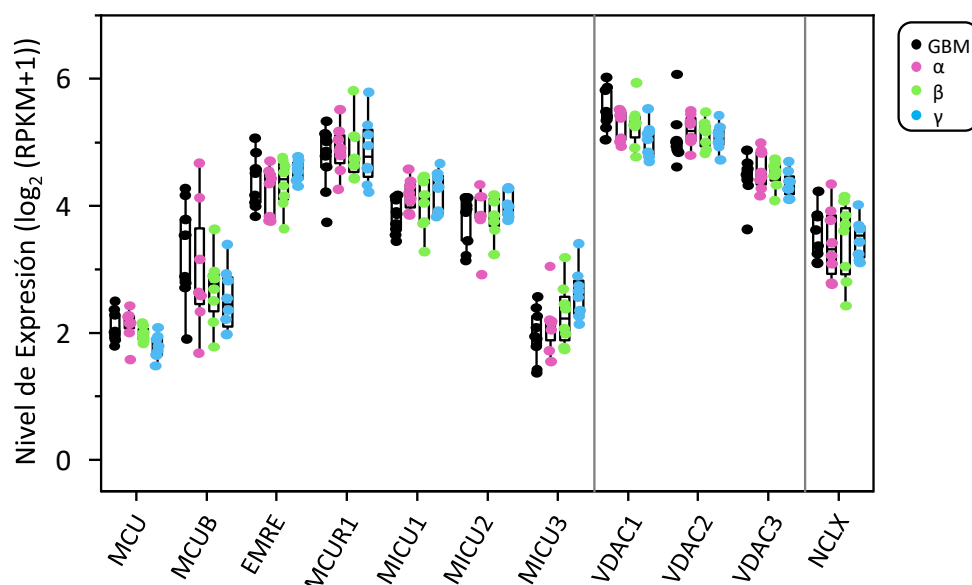


Figura 121. Nivel de expresión de los genes del transporte de Ca^{2+} mitocondrial en cultivos primarios de GBM humanos y en las muestras pareadas tumorales y peritumorales. Los gráficos muestran los niveles de expresión para las diferentes muestras de los genes que transcriben para los sistemas de transporte de la mitocondria. El análisis de los niveles de expresión se ha realizado entre los genes de un mismo gráfico o, en caso de que el gráfico esté dividido, entre los genes dentro de un mismo recuadro. Los niveles de expresión se expresan como $\log_2(\text{RPKM}+1)$.

Cabe destacar que el análisis de los perfiles de expresión anteriores es meramente descriptivo, no explicativos. Por ello, más adelante se realizarán los pertinentes contrastes de hipótesis para encontrar qué genes se expresan de forma diferente entre las diferentes muestras.

4.6.3 Análisis transcriptómico en GBM y regiones peritumorales

El análisis transcriptómico de las muestras de GBM y sus áreas peritumorales se llevó a cabo mediante estudios de RNA-Seq. A pesar de que se disponen de datos de todo el transcriptoma, en la presente tesis solo se hace referencia a los genes implicados en el transporte del Ca^{2+} intracelular. En este estudio se han procesado un total de 33 muestras: por un lado, 9 muestras de GBM no pareadas procedentes de 9 pacientes diagnosticados de GBM y, por otro lado, 24 muestras pareadas (α , β y γ) procedentes de otros 8 pacientes diferentes, también diagnosticados con GBM (Tabla 15). Además, respecto de las muestras pareadas para cada paciente, cabe destacar que cada una de ellas se corresponde con un fenotipo, si bien es cierto que, al tratarse de un estudio ciego, se desconoce qué muestra se corresponde a cada uno de dichos fenotipos.

Tabla 15. Resumen de las muestras incluidas en el estudio de RNA-seq.

Tipo de Muestra	ID	Sexo	Edad
Glioblastoma (GBM)	GB005	Mujer	56
	GB006	Mujer	66
	GB007	Hombre	65
	GB009	Hombre	60
	GB012	Hombre	52
	GB016	Hombre	53
	GB023	Mujer	63
	GB024	Hombre	54
	GB026	Mujer	54
Glioblastoma + Peritumorales (muestras pareadas α , β y γ)	ID001	Hombre	56
	ID002	Hombre	77
	ID003	Mujer	58
	ID004	Hombre	70
	ID005	Hombre	51
	ID006	Mujer	73
	ID007	Hombre	61
	ID008	Mujer	63

A partir de las muestras de tejido tumoral y/o áreas peritumorales, se extrajo el ARN utilizando el kit de extracción de ARN *PureLink Micro RNA* (Invitrogen) y se midió la cantidad y calidad de dicho ARN. El análisis transcriptómico realizado mediante la técnica de RNA-Seq se llevó a cabo en el centro de investigación CABIMER que, tras el procesamiento de las muestras, nos facilitó los datos crudos (FASTAQ) para su análisis. Los datos se procesaron utilizando la plataforma *BaseSpace* de Illumina con el fin de obtener la matriz de lecturas; es decir, la expresión de cada gen para cada muestra. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de expresión diferencial utilizando el *software R*, tal y como se describe en el apartado “2.13.4.3. Análisis de expresión diferencial y de significación biológica”.

El análisis de expresión diferencial reveló que, únicamente, hay genes diferencialmente expresados entre las muestras “ α ” y “ γ ” así como entre las muestras “GBM” y “ γ ”. Sin embargo, no hay diferencias entre las muestras de “GBM” con respecto a “ α ” o “ β ”, así como tampoco entre “ α ” y “ β ” (Figura 122). No obstante, cabe destacar que tampoco hay diferencias entre “ β ” y “ γ ”, si bien es cierto que p valor ajustado es más pequeño en este contraste (0,14), pues se acerca más al nivel de significación que el valor mínimo de FDR encontrado entre “ α ” y “ β ” (0,978). Por lo tanto, lo anterior indicaría que hay dos muestras que son iguales a los “GBM”, “ α ” y “ β ”, pero que hay otra que está a medio camino entre los “GBM” o “ α ” y “ γ ”, que sería “ β ”. En consecuencia, y sin ánimo de romper el ciego, los datos sugieren que la muestra tumoral podría ser “ α ” mientras que la “ β ” podría ser de mayor probabilidad de recidiva, por lo que “ γ ” podría ser de menor probabilidad de recidiva.

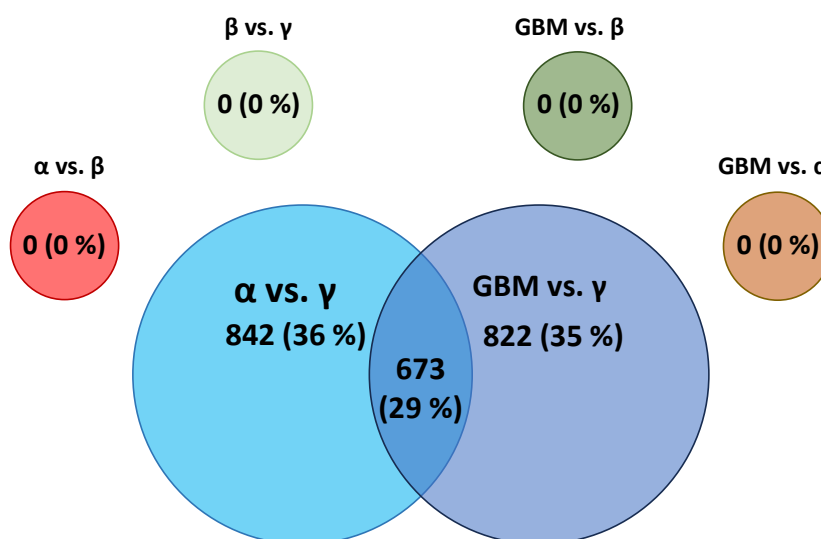


Figura 122. Diagramas de Venn de la expresión diferencial. En los diagramas de Venn se muestra la expresión diferencial (FDR < 0.05) entre las muestras, dos a dos, de los todos los genes expresados en las diferentes muestras. Cada círculo representa una comparación dos a dos y el número indica el número de genes diferencialmente expresados entre ambas muestras seguido del porcentaje que estos representan respecto del total de genes diferencialmente expresados. Se ha identificado la expresión diferencial de 1.515 genes entre las muestras “ α ” y “ γ ” (círculo azul) y 1.495 genes (círculo morado) entre las muestras “GBM” y “ γ ”, habiendo 673 genes diferencialmente expresados coincidentes en ambas comparaciones. No se observa expresión diferencial en el resto de las comparaciones.

Dado que sólo se obtuvieron diferencias significativas en la expresión diferencial de genes entre las muestras “ α ” vs. “ γ ” y “GBM” vs. “ γ ” junto a que el interés del presente trabajo se centra en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, a continuación, se muestran los genes diferencialmente expresados e implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular entre estas muestras. En la Figura 123 se muestra, por un lado, cómo, entre la muestra “ α ” y la muestra “ γ ”, existen 20 genes diferencialmente expresados que están implicados en la homeostasis del calcio intracelular, lo que supone más del 1 % del total de genes diferencialmente expresados entre “ α ” y “ γ ”. Por otro lado, en el caso de la expresión diferencial entre las muestras “GBM” vs. “ γ ” se han identificado 20 genes diferencialmente expresados y relacionados con el transporte y regulación del Ca^{2+} intracelular, lo que representa también más del 1 % respecto del total de genes DEG. Cabe destacar que, entre ambas comparaciones, hay 14 genes coincidentes relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En el resto de las comparaciones no se obtuvo expresión diferencial para ningún gen.

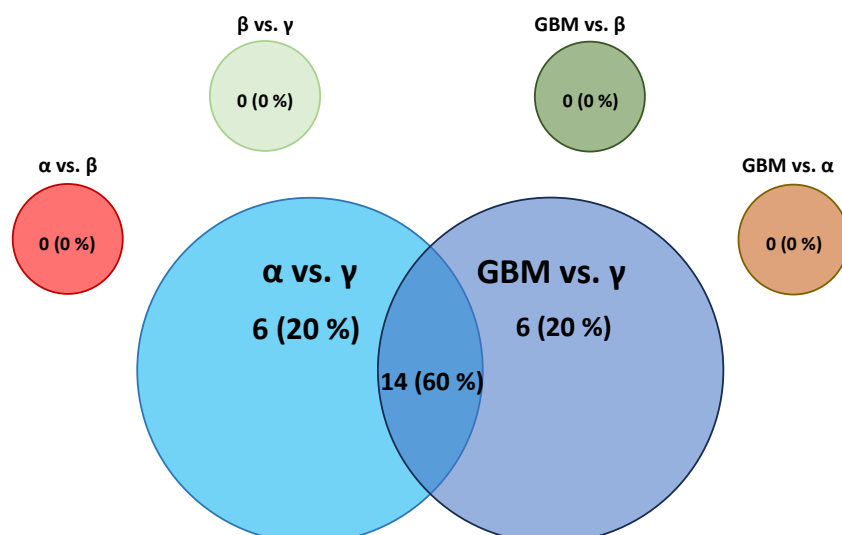


Figura 123. Diagrama de Veen de la expresión diferencial de los genes implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En los diagramas de Veen se muestra la expresión diferencial ($\text{FDR} < 0,1$) de los genes implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular entre las muestras dos a dos. Cada círculo, representa una comparación dos a dos y el número seguido del porcentaje indica el número de genes y el porcentaje que estos suponen respecto del total de genes diferencialmente expresados relacionados con el transporte de Ca^{2+} . Se observa que más del 1 % de los DEG están implicados en la homeostasis del Ca^{2+} tanto para “α” vs. “γ” como para “GBM” vs. “γ”.

A continuación, se muestra la expresión diferencial de los diferentes genes relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular para las dos comparaciones en las que sí hay diferencias. Además, este análisis se dividirá en los diferentes conjuntos de genes considerados. El esquema que se ha seguido a la hora de representar los datos es el siguiente: a la izquierda de la figura se muestra la comparación entre las muestras “α” vs. “γ” mientras que a la derecha la expresión diferencial entre las muestras “GBM” y “γ”. El código de colores elegido indica, por un lado, las barras horizontales en azul y hacia la izquierda indican que la expresión del gen está disminuida en las muestras de “GBM” y “α”, mientras que en rojo y hacia la derecha indican sobreexpresión del gen en las muestras de “GBM” y “α” sobre las muestras “γ”.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el estudio de la expresión diferencial de los genes que codifican para VOCC mostró que tanto las muestras “α” como las “GBM” presentan una infraexpresión del gen *CAV1.4* y una sobreexpresión del *CAV3.2* respecto de las muestras “γ” (Figura 124).

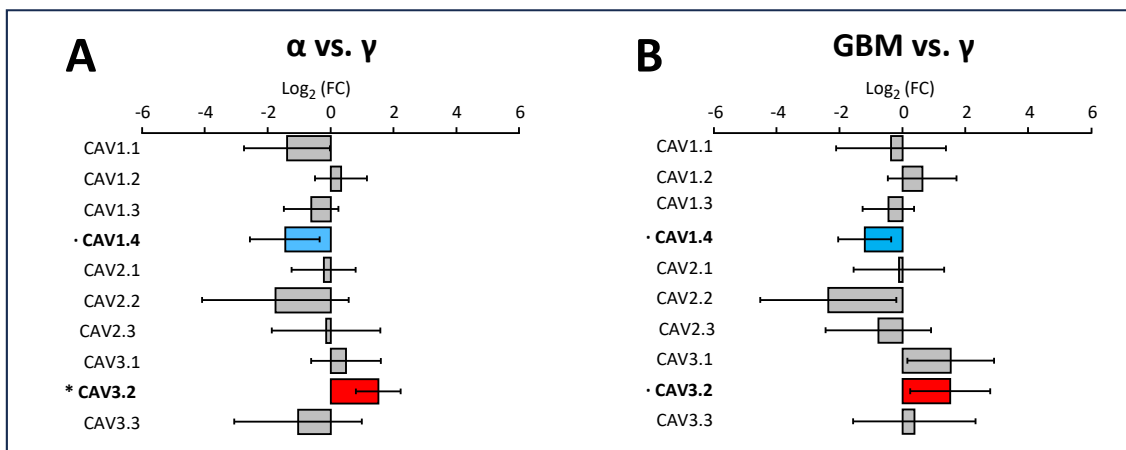


Figura 124. Expresión diferencial de los VOCC en muestras de GBM y peritumorales. Los gráficos de barras representan los valores de expresión diferencial, en concreto valores $\log_2(FC)$, estimados mediante el método limma. Las barras en gris representan los genes representan expresión diferencial entre las muestras “α” vs “γ” (A) y entre las muestras de “GBM” y “γ” (B). En azul y hacia la izquierda se muestran los genes infraexpresados mientras que en rojo y hacia la derecha los genes sobreexpresados. $\cdot p < 0,01$; $*p < 0,05$.

En lo referido a los sistemas de extrusión de Ca^{2+} e intercambiadores de la MP, así como de otros sistemas de transporte que retiran Ca^{2+} del citosol, únicamente se identificó sobreexpresión de *SERCA1* en la muestra “α” respecto de la muestra “γ” (Figura 125).

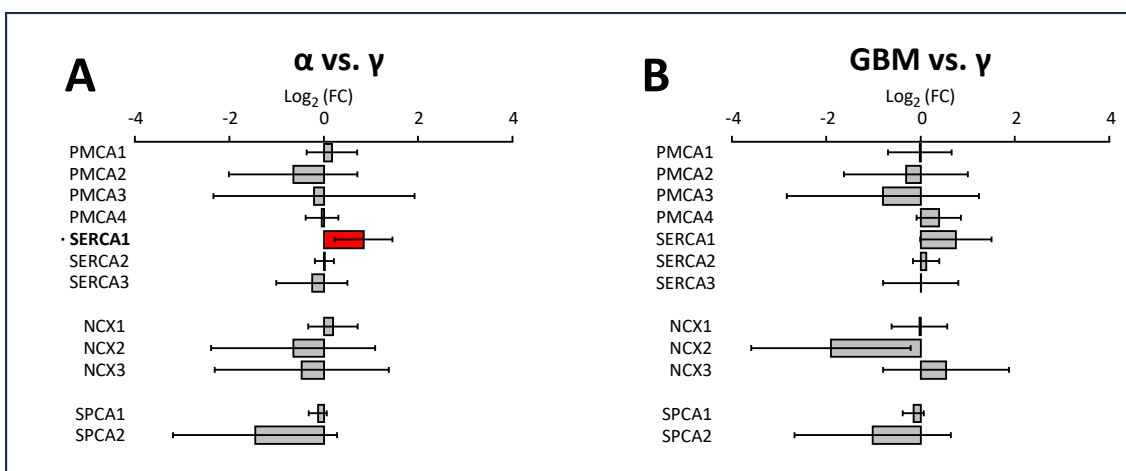


Figura 125. Expresión diferencial de bombas e intercambiadores en muestras de GBM y peritumorales. Los gráficos de barras representan los valores de expresión diferencial, en concreto valores del $\log_2(FC)$, estimados mediante el método limma. Las barras en gris representan los genes representan expresión diferencial entre las muestras “α” vs “γ” (A) y entre las muestras de “GBM” y “γ” (B). En azul y hacia la izquierda se muestran los genes infraexpresados mientras que en rojo y hacia la derecha los genes sobreexpresados. $\cdot p < 0,01$; $*p < 0,05$.

El análisis de expresión diferencial de los genes que codifican para los receptores purinérgicos, tanto de tipo ionotrópico como metabotrópico reveló el mismo perfil de expresión en la comparación “α” vs. “γ” que en muestras “GBM” vs. “γ”: una infraexpresión de los genes *P2X7*, *P2Y2*, *P2Y12* y *P2Y13* (Figura 126).

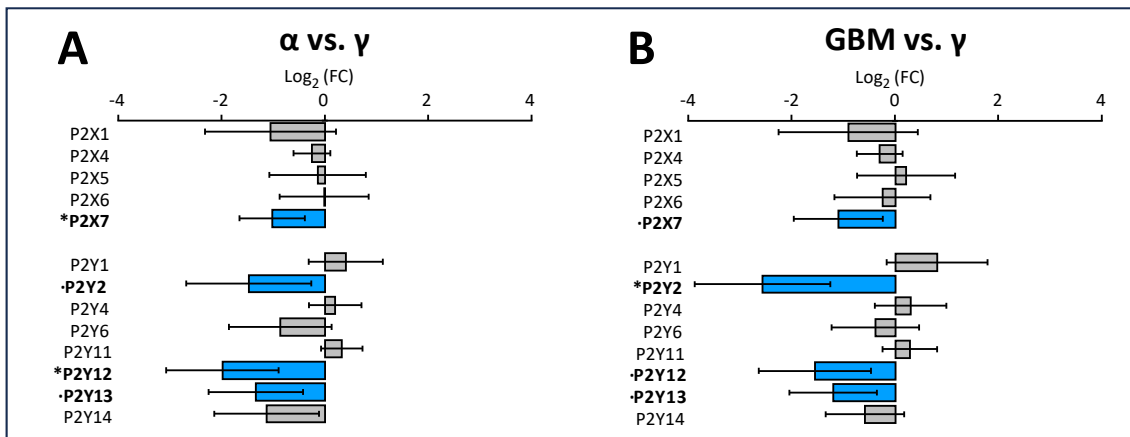


Figura 126. Expresión diferencial de los receptores purinérgicos en muestras de GBM y peritumorales. Los gráficos de barras representan los valores de expresión diferencial, en concreto valores $\log_2(FC)$, estimados mediante el método limma. Las barras en gris representan los genes representan expresión diferencial entre las muestras “α” vs “γ” (A) y entre las muestras de “GBM” y “γ” (B). En azul y hacia la izquierda se muestran los genes infraexpresados mientras que en rojo y hacia la derecha los genes sobreexpresados. • $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Por último, el análisis de la expresión diferencial de la superfamilia de los TRP reveló un patrón casi idéntico en ambas comparaciones, a excepción de una ligera sobreexpresión del *TRPP1* en “GBM” vs. “γ”. En concreto, en ambas comparaciones, tanto las muestras “α” como las “GBM” vs. “γ”, se ha identificado la infraexpresión de los genes *TRPV3*, *5* y *6* y del *TRPM6*, y la sobreexpresión de *TRPC6* y *TRPV4* (Figura 127).

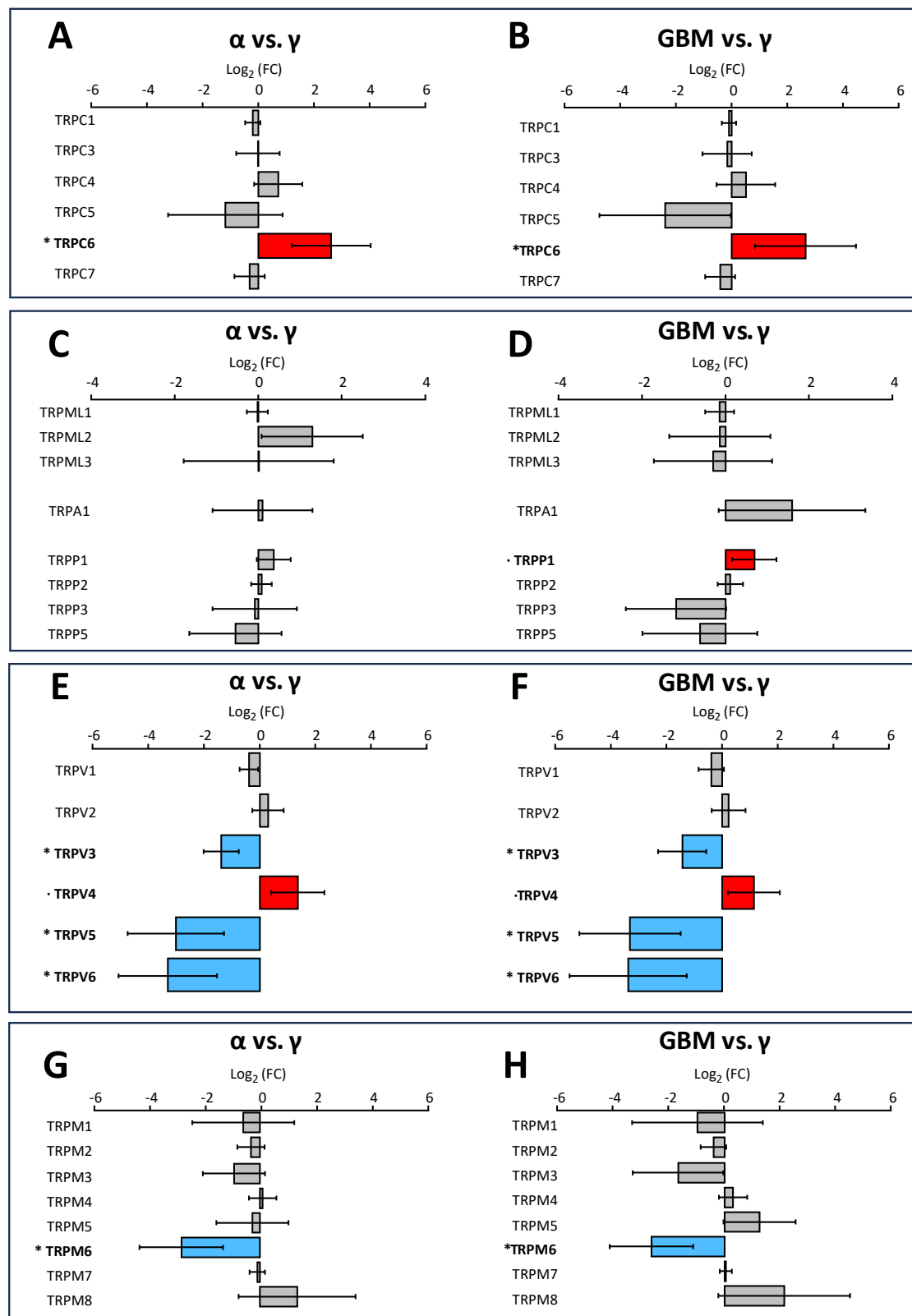


Figura 127. Expresión diferencial de genes que codifican para los canales TRP en muestras de GBM y peritumorales. Los gráficos de barras representan los valores de expresión diferencial, en concreto valores del $\text{Log}_2(\text{FC})$, estimados mediante el método limma. Las barras en gris representan los genes que muestran expresión diferencial entre las muestras “ α ” vs “ γ ” (A, C, E, G) y entre las muestras de “GBM” y “ γ ” (B, D, F, H). En azul y hacia la izquierda se muestran los genes infraexpresados mientras que en rojo y hacia la derecha los genes sobreexpresados. $\cdot p < 0,01$; $* p < 0,05$.

En cuanto a los genes implicados en SOCE (Figura 128A, B) y sus reguladores (Figura 128C y D), se obtuvo que las *SEPTIN4* está infraexpresada tanto en las muestras “ α ” como en las “GBM” en comparación con las “ γ ”. Además, se obtuvo que las muestras “ α ” muestran infraexpresión respecto de las muestras “ γ ” de la *SEPTIN8*. Mientras que entre “GBM” vs. “ γ ” se identificó infraexpresión de la *SEPTIN7*, así como la sobreexpresión de la *SEPTIN9* y del canal *Orai2*.

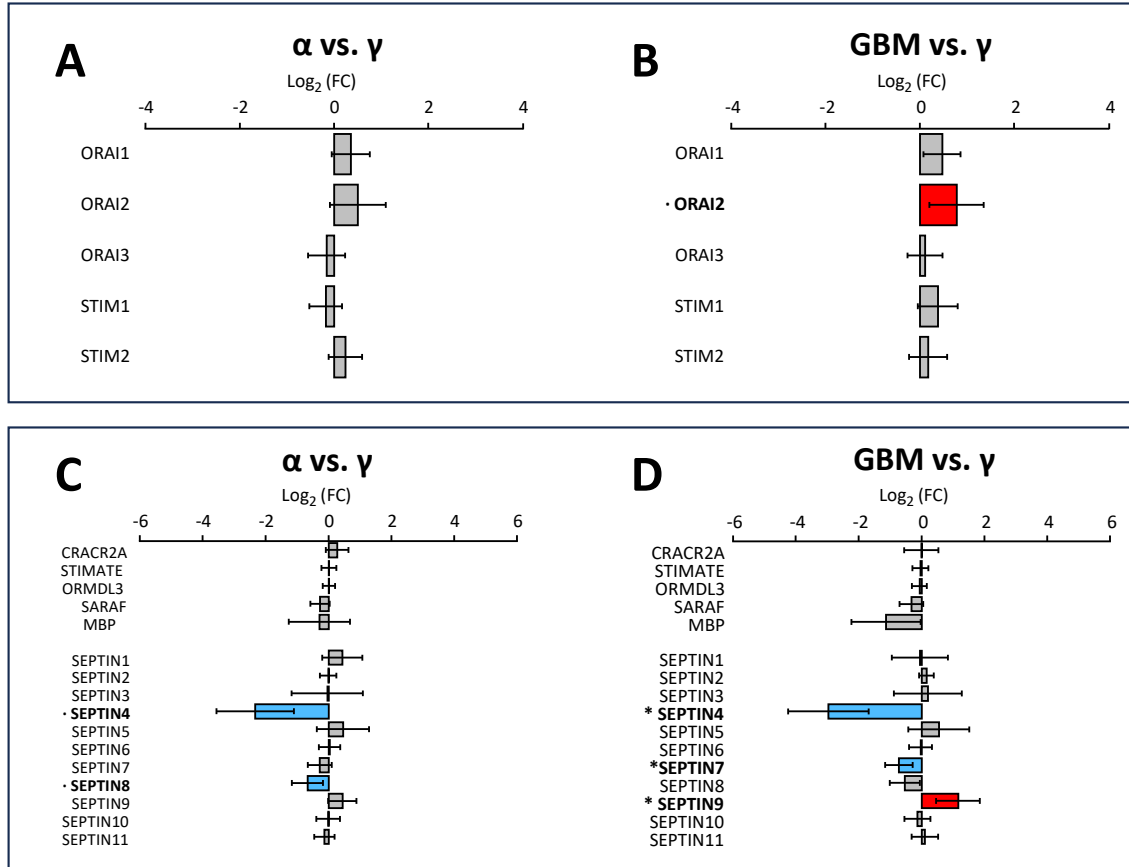


Figura 128. Expresión diferencial de genes implicados en SOCE y sus reguladores en muestras de GBM y peritumorales. Los gráficos de barras representan los valores de expresión diferencial, en concreto valores del $\log_2(FC)$, estimados mediante el método limma. Las barras en gris representan los genes que muestran expresión diferencial entre las muestras “ α ” vs “ γ ” (A, C) y entre las muestras de “GBM” y “ γ ” (B, D). En azul y hacia la izquierda se muestran los genes infraexpresados mientras que en rojo y hacia la derecha los genes sobreexpresados. $\cdot p < 0,01$; $* p < 0,05$.

Atendiendo a los genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte de Ca^{2+} localizadas en orgánulos subcelulares como el RE (Figura 129A, B) y la mitocondria (Figura 129C y D), se obtuvo que las muestras “ α ” muestran infraexpresión respecto de las muestras “ γ ” de los genes *RYR1* e *RYR3* (localizados en el RE), así como de *MICU3* y *EMRE* en la mitocondria. Además, las muestras “GBM” muestran infraexpresión respecto de las muestras “ γ ” del gen *RYR2* (en el RE) y de *MICU1* y *MICU3* (en la mitocondria).

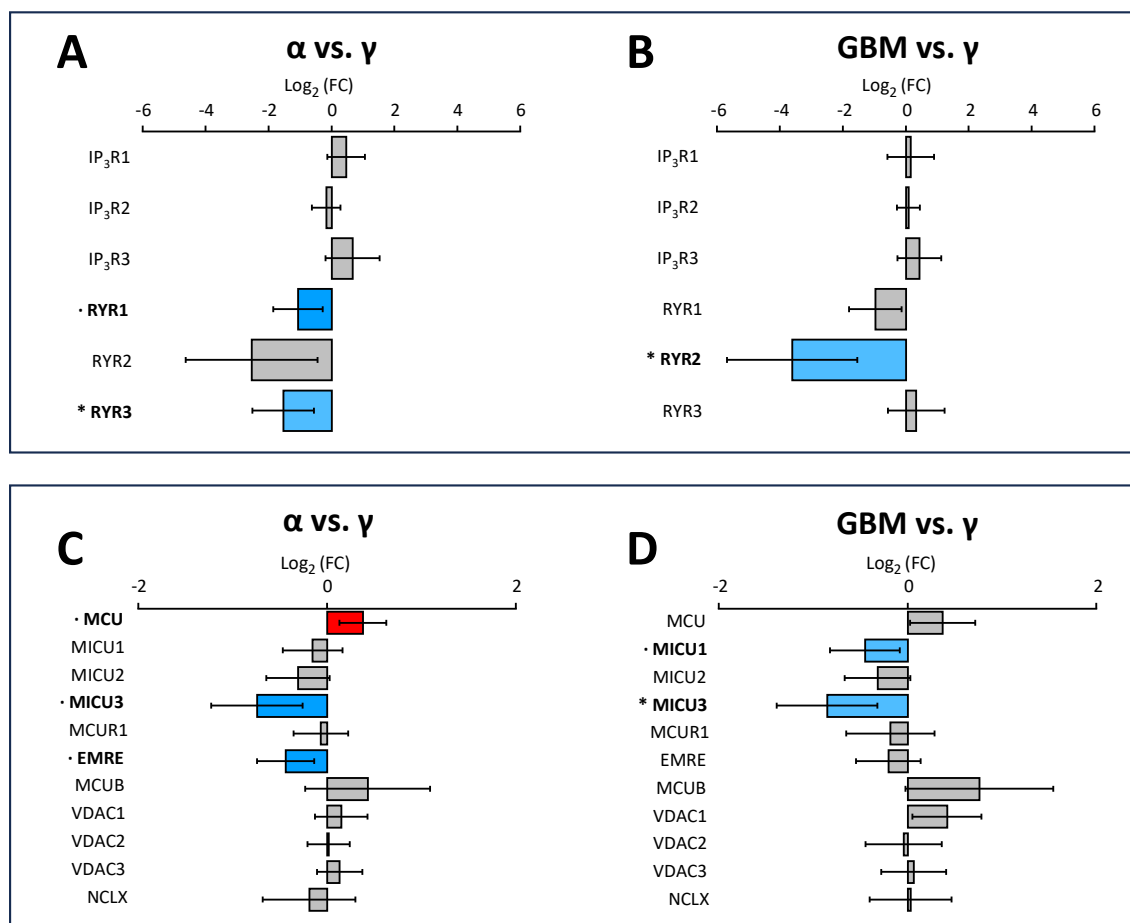


Figura 129. Expresión diferencial de genes implicados en el transporte de Ca^{2+} en la RE y la mitocondria en muestras de GBM y peritumorales. Los gráficos de barras representan los valores de expresión diferencial, en concreto valores del $\text{Log}_2(\text{FC})$, estimados mediante el método limma. Las barras en gris representan los genes que no muestran expresión diferencial entre las muestras “α” vs “γ” (A, C) y entre las muestras de “GBM” y “γ” (B, D). En azul y hacia la izquierda se muestran los genes infraexpresados mientras que en rojo y hacia la derecha los genes sobreexpresados. · $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

A continuación, se muestra una tabla (Tabla 16) con el resumen de genes implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular diferencialmente expresados entre las muestras “α” vs “γ” y las muestras “GBM” vs “γ”.

Tabla 16. Resumen de la expresión diferencial de los genes implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en muestras de GBM y peritumorales. Subrayado en color azul se muestran los genes infraexpresados y coincidentes entre ambas comparaciones, mientras que los sobreexpresados y coincidentes aparecen en rojo

	α vs. γ		GBM vs. γ	
DEG (Nº)	Infraexpresados (15)	Sobreexpresados (5)	Infraexpresados (14)	Sobreexpresados (6)
VOCC	CAV1.4 (-)	CAV3.2 (*)	CAV1.4 (-)	CAV3.2 (*)
Receptores purinérgicos	P2X7 (*); P2Y2 (-); P2Y12 (*); P2Y13 (-)	-	P2X7 (-); P2Y2 (*); P2Y12 (-); P2Y13 (-)	-
TRP	TRPV3, 5, 6 (*); TRPM6 (*)	TRPV4 (-); TRPC6 (*)	TRPV3, 5, 6 (*); TRPM6 (*)	TRPV4 (-); TRPC6 (-); TRPP1 (-);
SOCE	-	-	-	ORAI2 (-)
Reguladores SOCE	SEPTIN4 (*); SEPTIN8 (-)	-	SEPTIN4 (*); SEPTIN7 (*)	SEPTIN9 (*)
Retículo endoplasmático	RYR1 (-); RYR3 (*)	SERCA1 (-)	RYR2 (*)	-
Mitocondria	MICU3 (-); EMRE (-)	MCU (-)	MICU1 (-); MICU3 (*)	-

4.6.4 Análisis de significación biológica

Los datos mostrados en el apartado anterior sólo hacen referencia al análisis de expresión diferencial de los genes relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} . Sin embargo, evaluar gen a gen e interpretar el papel de cada uno de ellos puede ser muy complejo, sobre todo cuando la lista de DEG es grande. Por ello, el siguiente paso lógico fue realizar un análisis de significación biológica; es decir, analizar de forma conjunta los genes analizados y encontrar un significado a los cambios transcriptómicos observados, no de forma individual, sino en su conjunto. Para ello, se realizó lo que se conoce como enriquecimiento de conjunto de genes lo cual permite evaluar la relación de diferentes conjuntos de genes con el fenotipo estudiado. En este caso, los conjuntos de genes relacionados con las diferencias entre “GBM” y “ γ ” o entre “ α ” y “ γ ”. Para ello, se ha empleado el método CAMERA, método que contrasta la hipótesis nula competitiva - si los genes del conjunto de genes están diferencialmente expresados respecto a los genes que no pertenecen a dicho conjunto-; posteriormente, los p valores obtenidos se ajustan mediante el FDR. En cuanto a las bases de datos consultadas, han sido KEGG, GO y MsigDB. Además, puesto que se han analizado miles de conjuntos de genes, únicamente se muestran los conjuntos que contienen palabras clave y cuyo FDR es menor a 0,25. En concreto, estas palabras clave son: “calcium”, “mitochondria”, “reticulum”, “neurodegeneration”, “synapsis”, “synaptic”, “memory”, “plasticity”, “long-term”, “short-term”, “apoptosis”, “necrosis”, “glioma”, “glioblastoma”, “apoptosis”, “cancer”, “hallmarks”, “proliferation”. En las Figura 130 y Figura 131 se muestran los resultados de dicho análisis dividido en función del contraste realizado y de las diferentes bases de datos consultadas. Cabe señalar que solo se muestran los resultados de aquellas bases de datos en los que hay conjuntos de genes que contienen las palabras clave anteriormente mencionadas y que rechazan la hipótesis nula competitiva.

Por un lado, de entre todos los conjuntos de genes de interés identificados por estar alterados entre las muestras “GBM” y “ γ ”, se observó una gran cantidad relacionados con diferentes tipos de cáncer y, en particular, relacionados con los glioblastomas, tales como “*Yamanaka glioblastoma survival up*”, “*Colin pilocytic astrocytoma vs glioblastoma up*”, “*Verhaak glioblastoma mesenchymal*”, “*Verhaak glioblastoma neural*”, “*Ngo malignant glioma 1p loh*” o “*Johansson gliomagenesis by PDGFB up*” (Figura 130). Por otro lado, en cuanto a los conjuntos de genes alterados entre las muestras “ α ” y “ γ ”, el patrón observado es muy similar al observado en el caso anterior. Es más, los conjuntos alterados entre ambos tipos de muestra que están relacionados con los gliomas/glioblastomas son exactamente los mismos: “*Yamanaka glioblastoma survival up*”, “*Colin pilocytic astrocytoma vs glioblastoma up*”, “*Verhaak glioblastoma mesenchymal*”, “*Verhaak glioblastoma neural*”, “*Ngo malignant glioma 1p loh*” o “*Johansson gliomagenesis by PDGFB up*”.

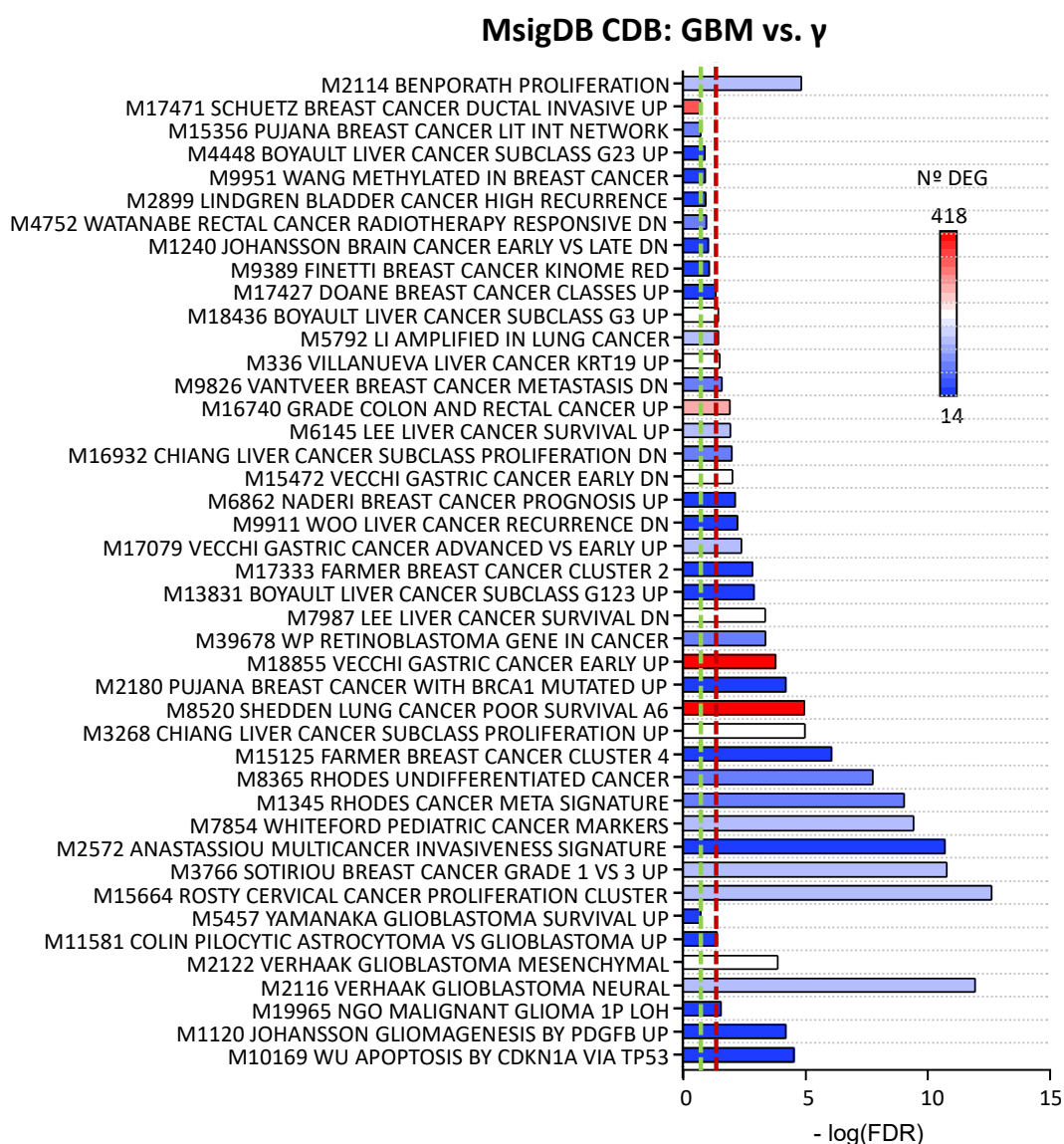


Figura 130. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes MsigDB CDB “GBM” vs. “ γ ”. Mediante el método CAMERA se ha contrastado la hipótesis nula competitiva, cuyos resultados de los conjuntos de genes que contienen las palabras clave se muestran en el diagrama de barras. Los dos niveles de significación considerados se muestran con una línea vertical verde para 0,25 y con una roja para 0,05. En cuanto al número de genes diferencialmente expresados en cada grupo, estos se muestran en escala de pseudocolor donde el valor más bajo se muestra en azul y el más alto en rojo.

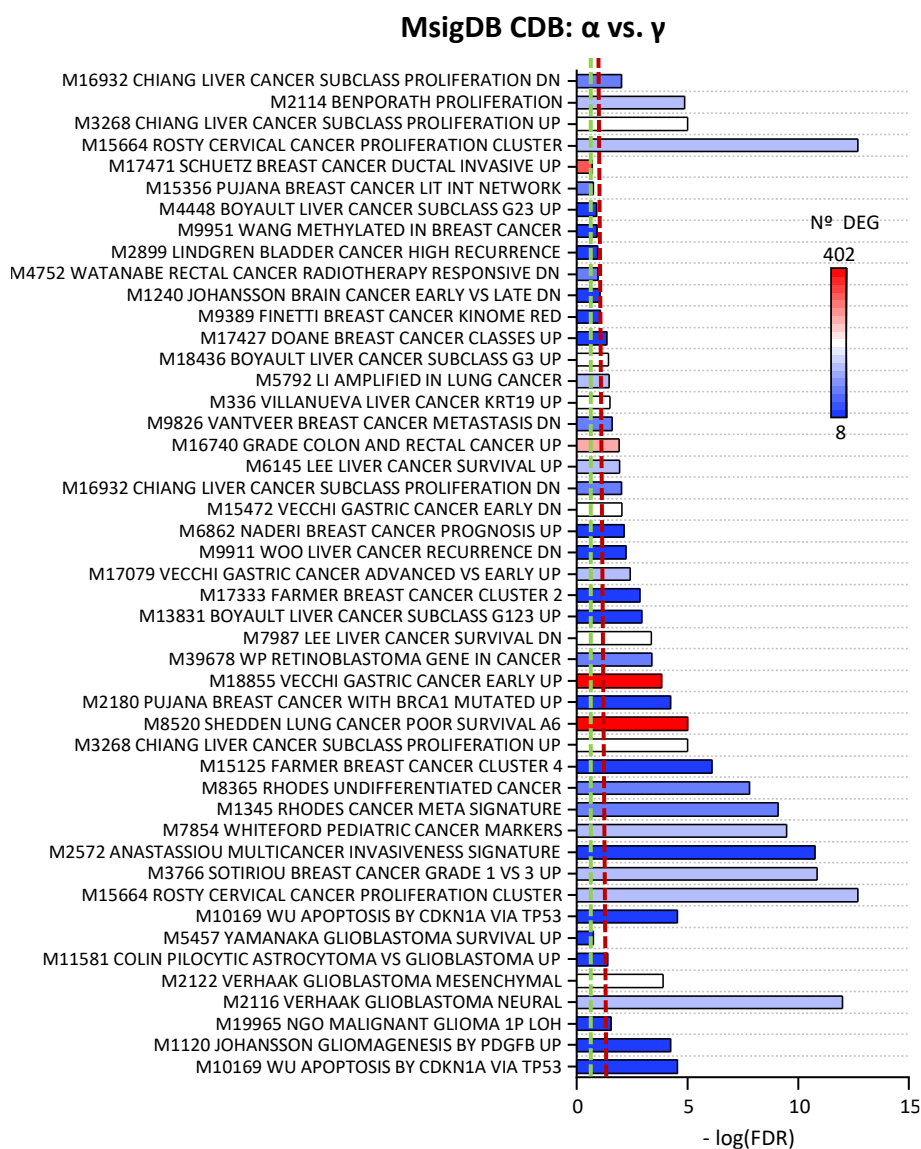


Figura 131. Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes MsigDB CDB “ α ” vs. “ γ ”. Mediante el método CAMERA se ha contrastado la hipótesis nula competitiva, cuyos resultados de los conjuntos de genes que contienen las palabras clave se muestran en el diagrama de barras. Los dos niveles de significación considerados se muestran con una línea vertical verde para 0,25 y con una roja para 0,05. En cuanto al número de genes diferencialmente expresados en cada grupo, estos se muestran en escala de *pseudocolor* donde el valor más bajo se muestra en azul y el más alto en rojo.

V. DISCUSIÓN

En la actualidad, existe una fuerte evidencia de la relación entre diferentes patologías y la alteración de los mecanismos de transporte de Ca^{2+} intracelular. En particular, se ha identificado una evidente alteración de estos mecanismos en la neurodegeneración, como sucede durante el envejecimiento neuronal y enfermedades del SNC, como el Alzheimer, y el cáncer, especialmente en los tumores cerebrales. Precisamente, es alrededor de estas tres situaciones fisiopatológicas que gira la presente tesis. Por ello, la discusión de los resultados se va a dividir en dos grandes grupos; en primer lugar, se discutirán los resultados correspondientes al envejecimiento neuronal y la enfermedad de Alzheimer (EA). En segundo lugar, se discutirán aquellos resultados relacionados con los tumores cerebrales, centrando el interés en los glioblastomas (GBM), los de peor pronóstico.

1 REMODELADO DE LA HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN MODELOS CELULARES DE ENVEJECIMIENTO NEURONAL Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Para el estudio del posible remodelado del Ca^{2+} intracelular en la neurodegeneración debido al envejecimiento neuronal se han empleado cultivos celulares de hipocampo de ratas neonatas, los cuales son de naturaleza mixta al contener tanto neuronas como células de la glía. Para estudiar este remodelado en la EA se han empleado estos cultivos tratados con oligómeros del péptido A β , la neurotoxina implicada en la EA. Este modelo ya fue introducido previamente por otros autores incluyendo nuestro propio grupo de investigación (Calvo-Rodríguez et al., 2015). El motivo principal de usar este modelo frente a otros es múltiple. En primer lugar, la imposibilidad de cultivar neuronas de hipocampo de ratas envejecidas. En segundo lugar, las células de hipocampo de rata cultivadas a largo plazo expresan varios marcadores típicos de envejecimiento, tales como los gránulos de lipofusina, la acumulación de ROS, la pérdida gradual de colesterol o cambios en la densidad de canales de Ca^{2+} (Sodero et al., 2011) consistentes con el envejecimiento. Finalmente, nuestros estudios previos sobre remodelado de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular durante el envejecimiento *in vitro*, los efectos de los oligómeros del péptido β -amiloide y los efectos de ambas situaciones sobre la susceptibilidad a la muerte neuronal inducida por diversas neurotoxinas, invitaban a profundizar en el análisis a nivel funcional y molecular.

En primer lugar, quisimos comprobar que los modelos celulares usados se comportaban según lo descrito en estudios previos del grupo. Para ello, se realizaron una serie de experimentos esperando observar un patrón similar al descrito por autores como Calvo-Rodríguez (Calvo-Rodríguez et al., 2016b), como así fue. En concreto, se identificó la composición celular de los cultivos mixtos mediante inmunofluorescencia y se comprobó el comportamiento funcional de las neuronas en estos cultivos mediante la técnica de imagen de Ca^{2+} . Los resultados mostraron porcentajes similares de neuronas y células de la glía en nuestros cultivos que los reportados previamente, permitieron además el entrenamiento para la identificación microscópica de la naturaleza de las células. Además, estos estudios permitieron comprobar que, durante el cultivo a largo plazo, una situación que remeda el envejecimiento neuronal, se reproducía la disminución o casi pérdida de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) en las neuronas presentes en el cultivo neuronal, una situación que se ha asociado a la incapacidad para estabilizar la formación de neuritas durante los procesos de memoria y aprendizaje. Finalmente, encontramos que los oligómeros del péptido β -amiloide eran capaces de reducir todavía más la SOCE en las neuronas envejecidas, consistentemente con los resultados previos del grupo.

1.1. La disminución de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) durante el envejecimiento *in vitro* no se revierte con potenciadores de esta vía.

SOCE es un mecanismo de entrada de Ca^{2+} a la célula inducido por el vaciado de los depósitos intracelulares implicado con diferentes procesos celulares tales como la supervivencia celular, la proliferación, la movilidad celular, etc. De hecho, juega un papel clave en la regulación transcripcional dependiente de Ca^{2+} . Además, STIM1 y Orai1 han mostrado contribuir en la regulación del metabolismo y función mitocondrial. Si bien es cierto que SOCE ha sido ampliamente caracterizado en células no excitables por ser uno de los mecanismos de entrada de Ca^{2+} más importantes en estas, su papel en las células excitables, especialmente las neuronas, es menos conocido (Collins et al., 2022; Moccia et al., 2015). En particular, diferentes evidencias sugieren que, en las neuronas, STIM/Orai actuarían como reguladores del crecimiento axonal, el mantenimiento de la plasticidad sináptica y la modulación de la formación de la memoria (Collins et al., 2022). No obstante, se ha visto que STIM1 y Orai1 son esenciales en la homeostasis celular y su alteración se ha relacionado con varias enfermedades asociadas con la edad tales como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Collins et al., 2022).

Puesto que SOCE disminuye con el envejecimiento en los modelos empleados, se planteó la posibilidad de revertir dicha disminución mediante el uso de algún tratamiento. En particular, se usó MDEB, molécula análoga a 2-APB que, en lugar de inhibidor, se ha propuesto como un potenciador de SOCE a través de Orai1 (Djillani et al., 2015). Los resultados muestran que MDEB potencia de modo significativo SOCE en neuronas jóvenes. Sin embargo, en neuronas envejecidas no aparece el efecto potenciador, precisamente en aquellas neuronas donde la entrada de Ca^{2+} está fuertemente impedida. Puesto que SOCE está mediado por diversos componentes moleculares, los posibles cambios en la expresión de los componentes moleculares de SOCE, incluyendo los niveles de expresión de Orai1 y sus moléculas reguladoras, podrían contribuir a la falta de eficacia de MDEB. Alternativamente, otros mecanismos reguladores negativos podrían activarse y/o potenciarse durante el proceso de envejecimiento impidiendo de algún modo la potenciación. Por este motivo, decidimos investigar posibles mecanismos implicados en la regulación negativa de SOCE incluyendo el potencial mitocondrial y la formación de ROS, además de llevar a cabo una profundización de estudio del remodelado del Ca^{2+} intracelular en el envejecimiento y un análisis transcripcional del proceso de envejecimiento.

1.2. Efectos del envejecimiento *in vitro* de las neuronas de hipocampo sobre el potencial mitocondrial, formación de ROS y expresión de genes implicados en SOCE

Se ha descrito previamente el papel de la mitocondria sobre los procesos de inactivación de los canales CRAC responsables de SOCE. En primer lugar, el propio Ca^{2+} entrante a través de canales Orai1 / Icrac es capaz de inactivar estos canales y así limitar la entrada de Ca^{2+} y el posible daño neuronal asociado. Sin embargo, en determinados tipos celulares, como los linfocitos T o las células epiteliales, la mitocondria juega un papel relevante. En el caso de los linfocitos T se sabe que mitocondrias cercanas a la zona de sinapsis inmunológica son capaces de captar ávidamente el Ca^{2+} entrante a través de Icrac impidiendo así la inactivación de los canales y permitiendo el mantenimiento de la señal de Ca^{2+} para la expresión de IL2 y la expansión clonal del linfocito T

activado. Un proceso similar ha sido descrito en células de epitelio de colon humano, aunque este proceso parece exacerbado en las células con fenotipo proliferativo y/o tumoral (Hernández-Morales et al., 2017b; Larriba et al., 2011). El control mitocondrial de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos no ha sido estudiado. Sin embargo, se sabe que la captación de Ca^{2+} por las mitocondrias depende fuertemente del potencial mitocondrial, la fuerza electromotriz para la entrada de Ca^{2+} . En este escenario, una posible pérdida de potencial mitocondrial asociada al envejecimiento descrita en la presente tesis disminuiría la captación de Ca^{2+} por la mitocondria lo que podría favorecer la inactivación de los canales CRAC y la disminución de SOCE.

Otra posibilidad moduladora sería la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que ocurre mayoritariamente en las mitocondrias. Se ha descrito que el exceso de ROS puede oxidar Orai1 a nivel de algún residuo de cisteína accesible inactivando del mismo modo CRAC y SOCE. Los resultados muestran que la producción de ROS en los cultivos neuronales aumentó significativamente durante el envejecimiento. Estos resultados son consistentes con una mayor inactivación dependiente de Ca^{2+} y de ROS de los canales CRAC, responsables de SOCE, durante el envejecimiento neuronal que podrían explicar la disminución de SOCE asociada al envejecimiento. Además, el tratamiento con los oligómeros del péptido β -amiloide potenciaba tanto la despolarización mitocondrial como la producción de ROS asociada al envejecimiento, por lo que podría contribuir a explicar también la mayor pérdida de SOCE observada en las neuronas envejecidas *in vitro* tratadas con oligómeros de A β . Estos datos podrían también contribuir a explicar la ausencia de potenciación por el agonista de SOCE en neuronas envejecidas.

Alternativamente, la disminución de SOCE y su falta de potenciación por el agonista en neuronas envejecidas podría deberse a que el complejo molecular responsable de SOCE en las neuronas envejecidas fuera diferente al de las neuronas jóvenes. Se ha descrito que, en las neuronas, STIM1 y ORAI1 son esenciales en la homeostasis celular y, además, participan en la regulación del crecimiento axonal, el mantenimiento de la plasticidad sináptica y la modulación de la formación de la memoria. Por lo tanto, no es de extrañar que su alteración se haya relacionado con varias enfermedades asociadas con la edad tales como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Collins et al., 2022). No obstante, en la literatura pueden encontrarse estudios contradictorios que podrían deberse a las diferentes isoformas de *splicing* alternativo que se han encontrado tanto para *Stim1* como para *Orai1*. En cuanto a la expresión de estas isoformas, en el cerebro de ratones adultos se ha descrito un aumento de *Stim1* (Moccia et al., 2015) y la presencia de las 3 isoformas de *Orai*, siendo la isoforma *Orai2* la predominante en el hipocampo (Lein et al., 2006). Nuestro estudio transcripcional indica un aumento de la expresión de *Orai2* y *Stim1* en los cultivos neuronales envejecidos *in vitro*. La mayor expresión de *Orai2* podría explicar, al menos en parte, la menor SOCE observada en las neuronas de hipocampo envejecidas, pues se ha visto que este actúa como un regulador negativo de SOCE (Scremin et al., 2020). En este sentido, (Scremin et al., 2020) observaron que la disminución de este canal en células humanas de neuroglioma es capaz de potenciar SOCE y de disminuir la acumulación de oligómero A β . En cuanto a *Stim1*, (Hou et al., 2015) han visto que su eliminación es capaz de mejorar la supervivencia neuronal a través de una regulación de los canales *GluR1*, inhibiendo la señalización de Ca^{2+} regulada por estos canales. Por lo tanto, la sobreexpresión observada en las neuronas envejecidas de hipocampo podría explicar la menor supervivencia de estas (Muñoz-Soriano & Paricio, 2007).

Sin embargo, aparte de Orai y Stim, otras moléculas reguladoras modulan la actividad de CRAC y SOCE. Los resultados muestran el aumento de la expresión los genes *Saraf*, *Mbp* y *Septin4* en el envejecimiento neuronal, así como una disminución de las *septinas* 2, 7, 9, 10 y 11. En consecuencia, puesto que tanto *Mbp* como *Saraf* son considerados reguladores negativos de SOCE, su sobreexpresión podría contribuir a explicar también la menor SOCE observada en las neuronas de hipocampo envejecidas. Por un lado, *Mbp* interacciona con los complejos Stim-Orai para inhibir SOCE; por otro lado, *Saraf* actúa como regulador negativo de SOCE evitando la oligomerización de *Stim*. En consecuencia, estos datos, junto con la sobreexpresión de *Orai2*, también regulador negativo de SOCE, podrían también explicar por qué, a pesar de una mayor expresión de *Stim1*, SOCE esta disminuida durante el envejecimiento neuronal. En cuanto a las septinas, cabe destacar que la *septin7* es la más abundante en el cerebro de las ratas adultas, la cual juega un papel clave en la morfogénesis de las espinas y en el crecimiento de las dendritas en las neuronas (X. Wang et al., 2018). Por lo tanto, su infraexpresión junto con la de otras septinas en las neuronas de hipocampo envejecidas podría explicar la pérdida del número de dendritas y su menor plasticidad neuronal. A esto habría que sumarle el efecto de la sobreexpresión de la *Septin4*, la cual ha mostrado promover la muerte celular por apoptosis en diferentes tipos celulares de cáncer humano (Jeon et al., 2016; Wu et al., 2021; Zhao et al., 2020). Otros estudios también en *Drosophila melanogaster* han mostrado que la *Septin4* es tóxica para las neuronas dopaminérgicas (Muñoz-Soriano & Paricio, 2007). Por lo tanto, la sobreexpresión de *Septin4* en las neuronas envejecidas de hipocampo podría ayudar a explicar la marcada disminución en la cantidad de estas. Los resultados indican por tanto que el remodelado de los complejos formadores de SOCE en el envejecimiento neuronal, así como los cambios en el potencial mitocondrial y la formación de ROS podrían contribuir colectivamente a la progresiva disminución de SOCE y la estabilidad de las dendritas durante el envejecimiento neuronal.

1.3. Efectos del envejecimiento *in vitro* de las neuronas de hipocampo sobre la colocalización RE-mitocondria, expresión de receptores de IP_3 y liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3

Los resultados anteriores nos llevaron a plantearnos cual podría ser el mecanismo implicado en la pérdida del potencial mitocondrial y la mayor formación de ROS durante el envejecimiento neuronal *in vitro*. La generación del potencial mitocondrial y la producción de ROS dependen inicialmente de la producción de equivalentes de reducción por el ciclo de Krebs. Es conocido que tres de las deshidrogenasas que participan en el ciclo de Krebs están moduladas por la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. Cárdenas y otros propusieron que el flujo continuo de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria a través de sitios específicos localizados en las membranas asociadas a mitocondrias era esencial para el mantenimiento del metabolismo energético aerobio. En este escenario, la pérdida del flujo activaba el proceso de autofagia en el RE para la obtención de energía a partir de componentes estructurales de la célula (Cárdenas et al., 2010). Por el contrario, el exceso de flujo podía precipitar la activación del mecanismo intrínseco de la apoptosis o el apoptosoma que podrían comprometer la supervivencia neuronal. Por tanto, en este trabajo abordamos el efecto del envejecimiento neuronal sobre la colocalización RE-mitocondria y la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 además de los posibles cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican para los sistemas de transporte de Ca^{2+} entre el RE y las mitocondrias. Además, hemos investigado el posible papel del tratamiento con oligómeros del péptido β -amiloide sobre alguna de estas variables.

Los resultados muestran que la colocalización entre el RE y las mitocondrias aumenta significativamente durante el envejecimiento neuronal y que este efecto, de nuevo, se ve potenciado por el tratamiento con los oligómeros de A β . Así pues, parecería que el envejecimiento neuronal podría verse favorecido seguramente el flujo de Ca²⁺ entre el RE y la mitocondria, y a ello podría contribuir no solo la mayor colocalización RE-mitocondria, sino también el mayor nivel de Ca²⁺ almacenado en el RE descrito previamente. Además, los resultados indican el aumento de la expresión de las diferentes isoformas de receptores de IP₃ tanto a nivel transcripcional como a nivel de proteínas detectadas por inmunofluorescencia. Sin embargo, cuando se mide directamente la liberación de Ca²⁺ inducida por IP₃ mediante el método del IP₃ enjaulado, se puede observar que el envejecimiento neuronal disminuye a la mitad el número de neuronas capaces de liberar Ca²⁺ del RE en respuesta a IP₃ enjaulado. En este escenario, aquellas neuronas incapaces de liberar Ca²⁺ verían comprometido el mantenimiento de un potencial mitocondrial normal. Además, la propia disminución del potencial podría aminorar aún más la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria lo que disminuiría aún más el potencial mitocondrial, creando así un círculo vicioso que favorecería la despolarización mitocondrial en el envejecimiento. En este escenario, los oligómeros de A β parecen ejercer un papel paradójicamente positivo al aumentar la liberación de Ca²⁺ via IP₃. Sin embargo, el análisis transcriptómico de los genes implicados en transporte de Ca²⁺ hacia la mitocondria revela que los genes que codifican para MCU, MICU2 y los tres VDAC1,2 y 3 disminuyen durante el envejecimiento neuronal. Aunque la disminución de *Mcu* y los 3 *Vdac* es consistente con la reducción de la captación mitocondrial de Ca²⁺, sin embargo, la disminución de *Micu2*, un modulador negativo de MCU, podría aumentar la captación de Ca²⁺ por la mitocondria. Se requieren estudios adicionales para determinar con más precisión el papel de la mitocondria y los cambios en el transcriptoma sobre la pérdida de SOCE depósitos en el envejecimiento neuronal.

1.4. Análisis transcriptómico del remodelado de otros sistemas de transporte de Ca²⁺ en el envejecimiento neuronal *in vitro* y efecto de los oligómeros del péptido β -amiloide

Aunque se han comentado parcialmente los resultados sobre la transcriptómica del remodelado del Ca²⁺ intracelular en el envejecimiento neuronal, hasta ahora nos hemos ceñido al remodelado de SOCE y el acoplamiento del retículo endoplasmático (RE) y las mitocondrias. Sin embargo, existen otros numerosos componentes relevantes en la señalización por Ca²⁺ susceptibles de sufrir un gran remodelado durante el envejecimiento neuronal y tras el tratamiento con oligómeros del péptido β -amiloide que se discuten a continuación.

En este trabajo se ha estudiado el transcriptoma completo en ambos modelos mediante microarrays *Clariom D Rat*. Hay que decir que estos estudios han supuesto un reto tecnológico, en primer lugar, por la limitación del material biológico de partida, con apenas unos cientos o miles de neuronas presentes en los cultivos primarios de células hipocámpales de rata. En segundo lugar, por la presencia de varios tipos celulares en el cultivo que complican el estudio de los cambios en cada tipo. Finalmente, por los cambios en la proporción relativa de neuronas a lo largo del cultivo. Estas dificultades han sido resueltas utilizando un método substractivo que permite aislar los cambios que se producen en una de las poblaciones, las neuronas. Para ello, se ha obtenido el transcriptoma completo de los cultivos celulares a corto y largo plazo representando cultivos jóvenes y cultivos envejecidos respectivamente. Además, se ha obtenido

el transcriptoma completo de cultivos enriquecidos en glías, que no son más que cultivos similares a los anteriores, a excepción de que a estos se ha eliminado las neuronas. Así, conociendo la expresión tanto en los cultivos mixtos como en los enriquecidos en glías, es posible, a través de un adecuado contraste de hipótesis, determinar los cambios que tienen lugar en las neuronas. Finalmente, se ha llevado a cabo un análisis similar en cultivos envejecidos tratados con oligómeros del péptido β -amiloide.

En condiciones normales, los iones Ca^{2+} entran mayoritariamente a las neuronas a través de receptores ionotrópicos de glutamato y los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCC), los cuales son esenciales para la liberación de las vesículas con los neurotransmisores que se liberarán a la brecha sináptica. En cuanto al Ca^{2+} citosólico basal, este es controlado por las bombas, intercambiadores y orgánulos intracelulares como el RE o la mitocondria. Por lo tanto, es evidente que estudiar los genes que participan en el transporte de Ca^{2+} intracelular en las neuronas puede arrojar luz sobre la disfunción neuronal asociada al envejecimiento y la susceptibilidad a las enfermedades neurodegenerativas. Por ello, en la presente tesis se compararon las diferencias entre el perfil transcriptómico de las neuronas hipocampales jóvenes y las envejecidas *in vitro* centrándonos en los genes que codifican para los sistemas de transporte Ca^{2+} . Los resultados muestran que de los 121 genes de transporte de Ca^{2+} estudiados, 33 de ellos (27 %) mostraron expresión diferencial con 15 genes sobreexpresados en las neuronas envejecidas y otros 18 infraexpresados.

Si hacemos un análisis más detallado por familias de genes, de los VOCC, únicamente se identificó cambios en un único canal, el *Cav2.2*, el canal tipo N específico de neuronas que disminuye su expresión con el envejecimiento. Los canales tipo N participan en la liberación de neurotransmisores como el glutamato. Por lo tanto, su infraexpresión, a nivel de ARNm, podría suponer un mecanismo de defensa de las neuronas envejecidas con el fin de evitar la excitotoxicidad asociada a la liberación de glutamato que puede contribuir a los déficits cognitivos observados en muchas enfermedades neurodegenerativas (Keimasi et al., 2023). En este sentido, se ha descrito que la excitotoxicidad podría deberse a una sobreactivación de los receptores de NMDA que, como se ha descrito en estudios previos de este grupo, muestran una mayor respuesta en las neuronas de hipocampo envejecidas respecto de las jóvenes. Además, los NMDAR son capaces de aumentar la actividad de los VOCC tipo N, como el *Cav2.2* (Keimasi et al., 2023; Lonchamp et al., 2009). También se ha descrito que el *Cav2.2* podría tener un papel relevante en la neuroinflamación relacionada con la edad (Huntula et al., 2019). Por lo tanto, la disminución de la expresión de los *Cav2.2* a nivel de ARNm podría ser un mecanismo de defensa para evitar esta citotoxicidad causante de los déficits cognitivos provocados por la sobreactivación de los NMDAR, así como de contrarrestar la neuroinflamación asociada a la edad.

Respecto a los canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCC), los resultados muestran aumentos de la expresión del receptor de glutamato tipo kainato codificado por *Gluk4*, el único de los 16 genes que codifican para receptores de glutamato que aparece diferencialmente expresado durante el envejecimiento neuronal *in vitro*. Autores como Lowry et al. han observado que *Gluk4* podría jugar un papel clave en la citotoxicidad (Lowry et al., 2013). Así, neuronas de hipocampo de ratones *Gluk4*-KO presentan una gran neuroprotección, sobre todo, en la región CA3 del hipocampo. Es más, otros autores como Koromina (Koromina et al., 2019) sugieren que la delección de este receptor podría usarse como terapia personalizada podría mejorar el rendimiento cognitivo. Por lo tanto, el aumento del *Gluk4* asociado al envejecimiento podría tener un papel relevante en la citotoxicidad observada en la neurodegeneración.

Por otro lado, los resultados muestran cambios significativos en la expresión de receptores muscarínicos de acetilcolina codificados por genes de la familia *Chrm* incluyendo las isoformas *Chrm1* y *Chrm2*. Esto no es de extrañar, pues se ha descrito que la disrupción de la señalización colinérgica tiene un papel fundamental en los déficits cognitivos observados en enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad, como se observa en la demencia o en la EA (Chen et al., 2022; Drachman & Leavitt, 1974; Reale et al., 2022). En este sentido, autores como Reale (Reale et al., 2022) observaron un aumento de *Chrm1* en enfermedades neurodegenerativas como en la demencia con cuerpos de Lewy o EA, lo que estaría en consonancia con nuestros resultados. En paralelo, se ha observado la disminución de *Chrm3* consistentemente con estudios previos como el de (Sanfilippo et al., 2023) en el que también observaron la disminución de *Chrm3* asociada a la edad en tejidos cerebrales humanos examinados *post-mortem*.

En cuanto a los receptores nicotínicos de acetilcolina neuronal, los resultados muestran la disminución de *Chrna7*, un resultado que ya se había observado en cerebros envejecidos sanos donde tiene lugar una disminución asociada a la edad de diferentes subunidades de los receptores nicotínicos en diferentes áreas del cerebro, como el hipocampo (Perry et al., 2001). Tal disminución ha mostrado predisponer a procesos neurodegenerativos asociados a la edad. De hecho, la pérdida de *Chrna7* se relaciona con la pérdida progresiva de las habilidades cognitivas (Conejero-Goldberg et al., 2007). Cabe destacar que también se ha observado que la modulación de estos canales podría tener un efecto neuroprotector frente a la muerte neuronal inducida por glutamato o A β (Suemaru et al., 2002).

En cuanto a los receptores purinérgicos ionotrópicos, P2X, se ha descrito que, en el SNC, la activación de los estos permite la entrada de Ca²⁺ al interior de las neuronas, lo que puede conllevar una respuesta neuromodulatoria más lenta, como por ejemplo en la movilidad de los receptores de glutamato (North, 2016.). Por lo tanto, la sobreexpresión del *P2X5* observada en las neuronas de hipocampo envejecidas podría tener un papel relevante en el aumento del Ca²⁺ en las neuronas envejecidas. En cuanto a los receptores purinérgicos metabotrópicos, P2Y, se sabe que tienen un papel relevante en enfermedades neurodegenerativas como la EA (Merighi et al., 2021). De hecho, se ha visto que, en numerosas enfermedades neurodegenerativas, el *P2Y1* está aumentado. No obstante, nuestros resultados muestran que esta isoforma disminuye con el envejecimiento en las neuronas de hipocampo de rata. Tal disminución podría tener lugar como respuesta a la neurodegeneración asociada al envejecimiento como un mecanismo neuroprotector, pues se ha visto que su inhibición reduce el daño neuronal y la disfunción sináptica, llegando a preservar la memoria y el aprendizaje espacial. Incluso, también se ha visto que, tras un daño cerebral indirecto, como el que tiene lugar a través de un exceso de ATP tras una ventilación mecánica en ratones, la inactivación del *P2Y1* de las neuronas del hipocampo podría aliviar dicho daño cerebral (W. Wei et al., 2022). En cuanto a *P2Y4*, (Cavaliere et al., 2005) observaron que la activación prolongada de *P2Y4* por su ligando UTP puede conllevar la muerte celular, por lo que la sobreexpresión de este receptor en las neuronas de hipocampo de ratas podría explicar la elevada muerte neuronal observada en estos cultivos. Otros estudios también han visto que este receptor juega un papel importante en la degradación de A β , por lo que el aumento observado en las neuronas de hipocampo envejecidas podría deberse a un afán por evitar una acumulación excesiva del oligómero A β con la edad (Merighi et al., 2021).

El análisis de la expresión diferencial de los canales de la superfamilia de canales TRP ha arrojado resultados muy interesantes. De los 28 canales de la superfamilia, solo tres se encuentran expresados diferencialmente en el envejecimiento neuronal, los canales *Trpm2* y *3* que aumentan su expresión, y el canal *Trpm13* que disminuye con el envejecimiento. Se sabe que el daño oxidativo es una característica de las enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad. En este sentido, el canal *Trpm2* ha ido cobrando gran importancia en los últimos años en la progresión y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, pues ha resultado ser un sensor de estrés oxidativo/ROS y de mediar el daño oxidativo (Jiang et al., 2018). La proteína codificada por este gen es un canal catiónico no selectivo permeable a Ca^{2+} y que forma parte de la superfamilia de canales TRP. El pariente más cercano es el canal iónico TRPM8 activado por frío y mentol. Si bien TRPM2 no es sensible al frío, se activa con el calor. El canal iónico TRPM2 se activa mediante la ADP-ribosa intracelular libre en sinergia con el Ca^{2+} intracelular libre. La ADP-ribosa es producida por la enzima PARP en respuesta al estrés oxidativo y confiere susceptibilidad a la muerte celular. Es muy revelador que tanto el A β como ROS activan este canal y, en consecuencia, tiene lugar una pérdida sináptica, muerte neuronal, activación de la microglía y neuroinflamación. De hecho, la supresión de la expresión de *Trpm2* es capaz de detener la neurodegeneración y el deterioro (Krogsaeter et al., 2022) cognitivo inducido por A β (Jiang et al., 2018). Todo ello estaría de acuerdo con nuestros resultados, pues se ha visto que en las neuronas envejecidas de hipocampo hay una mayor expresión de *Trpm2*. En cuanto a la isoforma *Trpm3*, no se ha encontrado en la bibliografía ninguna relación con la neurodegeneración. Sin embargo, sí se ha descrito que mutaciones de ganancia de función de *Trpm3* podrían causar desórdenes en el desarrollo neuronal (Burglen et al., 2023; Dymment et al., 2023; Kashio & Tominaga, 2023), lo que podría sugerir un papel para *Trpm3* durante el envejecimiento neuronal.

Otro punto importante en las enfermedades neurodegenerativas es la acumulación de agregados de proteínas, cuyos mecanismos encargados de eliminarlos son la ruta de la autofagia lisosomal y el sistema de ubiquitina-proteosoma. Es más, se ha visto que alteraciones en las rutas de transporte lisosomales y endosomales podrían favorecer las enfermedades neurodegenerativas, lo que conllevaría la acumulación de proteínas y orgánulos dañados en el interior de las células. En este contexto, se han identificado unos mediadores claves como reguladores de la exocitosis lisosomal y la autofagia, los Trpml (Krogsaeter et al., 2022). En particular, en el tejido cerebral, la expresión del *Trpm13* parece estar restringida al hipocampo, el córtex y el hipotálamo. Si bien es cierto que el papel de esta isoforma no se ha estudiado mucho en las enfermedades neurodegenerativas, sí que se ha hecho para la isoforma *Trpm11* (Krogsaeter et al., 2022). Esta ha mostrado influir en la autofagia y su activación parece mejorar algunos de los fenotipos de enfermedades neurodegenerativas como la EA (Krogsaeter et al., 2022; Tedeschi et al., 2021). Por lo tanto, suponiendo un papel similar de la isoforma *Trpm13*, la infraexpresión observada en las neuronas envejecidas de hipocampo podría estar de acuerdo con la neurodegeneración asociada al envejecimiento.

Junto a los diferentes canales de calcio tipo VOC, ROC y TRP, la homeostasis del Ca^{2+} intracelular depende fuertemente de los sistemas de extrusión de Ca^{2+} que incluyen las bombas y transportadores de la membrana plasmática (MP) y el RE, así como los sistemas de transporte mitocondrial ya comentados. Los resultados muestran la infraexpresión de las bombas *Pmca1* y *Pmca3* durante el envejecimiento, lo que podría favorecer el aumento de la concentración citosólica basal de Ca^{2+} y al daño neuronal asociado al envejecimiento.

La Figura 132 muestra un resumen de todos los genes diferencialmente expresados durante el envejecimiento neuronal y su posible contribución al daño neuronal asociado al envejecimiento neuronal.

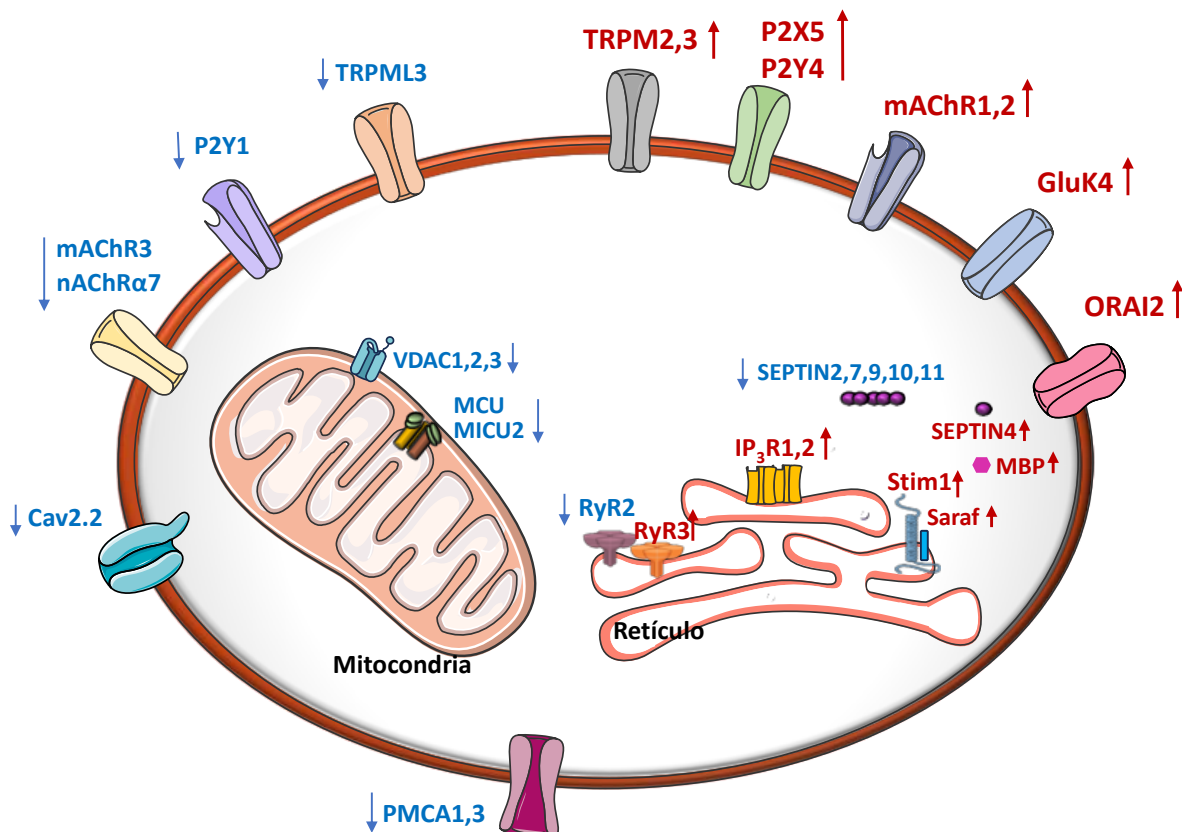


Figura 132. Expresión diferencial de los genes implicados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en neuronas de hipocampo envejecidas vs. neuronas jóvenes. La figura muestra, en azul, los genes cuya expresión diferencial disminuye en neuronas envejecidas, mientras que, en rojo, los genes cuya expresión es mayor.

Los resultados anteriores muestran que la compleja red de transporte de Ca^{2+} intracelular está notablemente alterada en las neuronas de hipocampo envejecidas, lo que apoyaría la evidencia existente que relaciona una disfunción mitocondrial y desregulación del Ca^{2+} intracelular con diferentes enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad (Johnson et al., 2023). Finalmente, hemos analizado los efectos del tratamiento de las neuronas envejecidas con los oligómeros del péptido β -amilode, la principal neurotoxina implicada en la enfermedad de Alzheimer. Sorprendentemente, los resultados muestran que el tratamiento con $\text{A}\beta$ en las neuronas envejecidas no induce diferencia alguna en la expresión de genes respecto de las neuronas envejecidas sin tratar con $\text{A}\beta$. Esto indicaría que los efectos observados a nivel funcional tras dicho tratamiento en las neuronas envejecidas no estarían relacionados con cambios en la expresión de genes, sino, más bien, con interacciones entre los oligómeros de $\text{A}\beta$ y diferentes proteínas. En este sentido, hay estudios, como el de (Kim & Rhim, 2011), en el que estudian la interacción entre péptidos $\text{A}\beta$ y los VOCC, encontrando una interacción directa entre la proteína precursora β -amilode (APP) y la subunidad β_3 de estos canales de Ca^{2+} . Otros autores, como (Small et al., 2009), también encontraron que $\text{A}\beta$ puede inducir la desregulación del Ca^{2+} intracelular aumentando la permeabilidad iónica en las membranas lipídicas, permeabilidad que estaría asociada a la formación de poros formados por oligómeros $\text{A}\beta$. Es más, estos oligómeros también han mostrado ser capaces de activar canales iónicos de la superficie celular.

Resulta enormemente sorprendente que ninguno de genes estudiados muestre expresión diferencial en las neuronas envejecidas tratados con oligómeros A β . Esto incluye no solo a los 131 genes implicados en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular, sino al resto del transcriptoma que incluye decenas de miles de genes. Una primera explicación podría ser que tal resultado fuera un artefacto experimental. Sin embargo, esta explicación se descartó tras comprobar que los genes diferencialmente expresados entre las células envejecidas mixtas vs. enriquecidas en glías observados durante nuestro primer estudio transcriptómico son prácticamente los mismos que los encontrados en este segundo estudio entre esas mismas condiciones experimentales. Alternativamente, cabe la posibilidad de que la maquinaria transcripcional de las neuronas envejecidas esté tan dañada y/o reprimida que sea incapaz de responder a dicho tratamiento. Finalmente, la tercera posibilidad podría ser que los efectos de los oligómeros del péptido β -amiloide sean fundamentalmente agudos, al menos en neuronas envejecidas. En este caso, sería conveniente el análisis de los efectos de los oligómeros en neuronas jóvenes para resolver esta tricotomía.

En resumen, los resultados sugieren que el envejecimiento neuronal *in vitro* remeda alguna de las características observadas *in vivo* y está asociado a una pérdida de la entrada de Ca²⁺ operada por depósitos relevante en la formación de nuevas sinopsis y en el proceso de memoria y aprendizaje. Este cambio podría explicarse por un remodelado del complejo molecular de los canales implicados con cambios relevantes en la expresión de *Orai2*, *Saraf* y diversas *Septinas* y en el control mitocondrial de esta vía debida a cambios en el potencial mitocondrial y la formación de ROS en los que podrían contribuir cambios en la liberación de Ca²⁺ desde el RE y en la captación de Ca²⁺ por las mitocondrias. Del mismo modo, los resultados muestran un aumento en la expresión de unos pocos canales, en concreto para el canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje tipo N, el canal receptor de kainato tipo IV, los canales *Trpm2* y *3* y el canal *Trpm13*, varios receptores de acetilcolina junto con la disminución de la expresión de las bombas de Ca²⁺ *Pmca1* y *3* que, colectivamente, podrían contribuir al daño neuronal durante el envejecimiento. Paradójicamente, los oligómeros del péptido β -amiloide no inducen cambio en la expresión de ningún gen relacionado con el Ca²⁺ intracelular.

2 REMODELADO DEL Ca^{2+} INTRACELULAR EN TUMORES CEREBRALES

A partir de muestras humanas de tumores cerebrales obtenidas en el momento de la cirugía se han llevado a cabo diferentes experimentos con el fin de encontrar qué mecanismos moleculares relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular pueden estar implicados con este fenotipo tumoral. Estos experimentos pueden dividirse en dos bloques; en primer lugar, la caracterización funcional de diferentes tumores cerebrales incluyendo muestras de meningiomas (MG), neurinomas (SW), oligodendrogliomas (ODG), astrocitomas (AT), glioblastomas (GBM), así como diferentes tipos de metástasis cerebrales (metástasis de ovario -OM-, metástasis de pulmón -LM- y metástasis de mama -BM-). En segundo lugar, se profundizó en el de los GBM, el tumor de peor pronóstico de la serie; en concreto, en el estudio de su transcriptoma y en cómo este varía respecto de muestras peritumorales de los mismos pacientes con el fin de estudiar qué genes están implicados en el desarrollo de los GBM.

2.1 Caracterización de la señal de Ca^{2+} en diferentes tumores cerebrales

Para llevar a cabo la caracterización funcional de los tumores cerebrales se empleó la técnica de imagen de Ca^{2+} en célula única. En primer lugar, se pretendió evaluar los niveles basales de Ca^{2+} citosólico, pues en la literatura se ha descrito que una mayor concentración de este podría estar relacionada con el fenotipo tumoral. Por ello, el interés fue evaluar si dicho parámetro tendría o no alguna relación con la malignidad de los tumores cerebrales. En concreto, se encontró que los niveles de Ca^{2+} basales eran prácticamente iguales en todos los tumores estudiados, a excepción del MG y el AT, que mostraron la menor y la mayor concentración de Ca^{2+} citosólico basal, respectivamente, quedando el resto de los tumores en un nivel intermedio. Por lo tanto, no parece que la concentración de Ca^{2+} guarde relación alguna con la malignidad, si bien es cierto que los AT son tumores de mayor malignidad que los MG.

Posteriormente, se evaluó la respuesta a diferentes estímulos; en concreto, el efecto del ATP y de un medio despolarizante con alta concentración de K^+ . En primer lugar, se evaluó el efecto del ATP en los diferentes tumores cerebrales, pues algunos autores han sugerido que la adquisición de ciertos receptores de ATP podría estar involucrada en la progresión tumoral. Por ejemplo, se ha propuesto que algunos de ellos, como el P2Y7 podría contribuir a la supervivencia celular en el microambiente tumoral (Matyśniak et al., 2020). Así, tras realizar los experimentos de respuesta a ATP, se encontró que dicha respuesta era capaz de dividir a los tumores en 3 grupos, siendo el AT, GBM y las metástasis (todos ellos de mayor malignidad) los que mayor respuesta mostraron a ATP, mientras que el ODG, el de menor malignidad, no mostró respuesta alguna. Por lo tanto, estas diferencias podrían deberse a posibles diferencias en la expresión de los receptores purinérgicos.

Por otro lado, se evaluó la función de los VOCC a través de la respuesta a K^+ , pues este tipo de canales es característico de células excitables como las neuronas. Los resultados de estos experimentos también clasificaron a los tumores en tres grupos, aunque estas agrupaciones fueron diferentes a las encontradas en función del comportamiento a ATP. En este caso, la mayor respuesta fue para el ODG, mientras que el SW, MG, AT, GBM, OM y BM fueron las que menos respondieron. De hecho, la entrada de Ca^{2+} a través de los VOCC es prácticamente inexistente salvo para el ODG si lo comparamos con la enorme entrada de Ca^{2+} que tiene lugar en las células excitables tras ser estimuladas con K^+ . Esto podría indicar que, a excepción de las células de los

ODG, las células de los tumores cerebrales pierden la expresión y/o funcionalidad de sus VOCC, lo que indicaría una pérdida del fenotipo excitable.

Por último, se estudió la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos o SOCE en todos estos tumores cerebrales, donde también se observó la formación de tres grupos bien diferenciados en cuanto a este mecanismo de transporte de Ca^{2+} . En concreto, SW, MG y los GBM fueron los tipos de tumores con mayor SOCE, mientras que ODG, BM y LM los de menor SOCE. No obstante, cabe destacar que el AT muestra una SOCE prácticamente similar a la del GBM. En este sentido, una mayor o menor SOCE no parece estar ligada, al menos por sí sola, a una menor o mayor malignidad, pues tanto GBM, tumor de gran malignidad, y SW, tumor benigno, presentan la misma SOCE. No obstante, centrando el análisis de los datos únicamente en gliomas con diferente grado de malignidad -ODG, AT, GBM-, se observó que SOCE aumentó a medida que lo hizo el grado de malignidad. Por lo tanto, en lo respectivo a SOCE y su papel en la malignidad de los gliomas, no todo es blanco o negro. En particular, en lo referente a los GBM, algunos autores sugieren que tanto STIM1 como ORAI1 son los principales participantes en SOCE y que, además, podrían ser necesarios para adquirir su capacidad invasiva; es más, experimentos de sobreexpresión de ORAI1 en modelos de GBM han mostrado potenciar su capacidad invasiva y, además, que SOCE podría regular tanto la migración como la capacidad de invasión celular (Motiani et al., 2013b; Vashisht et al., 2015; Zhu et al., 2014).

Así, poniendo todos estos resultados en común, todo apunta que el grado de malignidad tumoral podría estar relacionado con un patrón de comportamiento muy particular; en concreto, presentar, de forma simultánea, una mayor respuesta a ATP junto con una menor respuesta a K^+ y una mayor SOCE. En particular, este patrón lo muestran los GBM en comparación con los ODG, los gliomas de menor grado de malignidad, pues estos últimos presentan un comportamiento totalmente contrario: menor respuesta a ATP, mayor respuesta a K^+ y menor SOCE. De igual modo, los AT, gliomas con un grado de malignidad intermedio entre los GBM y ODG, muestran un comportamiento intermedio al de los otros dos: respuesta a ATP igual a la de los GBM; respuesta a K^+ entre la de los GBM y la de los ODG, y SOCE también a mitad de camino entre la de los GBM y la de los ODG.

Por último, tras inferir que SOCE está implicada o relacionada con el grado de malignidad de los gliomas, se quiso estudiar el papel de la mitocondria en la regulación de este mecanismo de transporte de Ca^{2+} . En concreto, se estudió en los ODG y GBM que, como ya se ha dicho anteriormente, son gliomas de bajo y alto grado de malignidad, respectivamente. Para ello, se estudió el efecto de la eliminación de Na^+ del medio extracelular y/o de la despolarización de la mitocondria con FCCP. Por un lado, el sentido de eliminar el Na^+ del medio extracelular es evitar el intercambio de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a través de la MP o su entrada al citosol a través de canales como el TRPC1. Como consecuencia de la eliminación del Na^+ y de la consecuente disminución en el citosol, el NCLX de la membrana mitocondrial no podrá utilizar Na^+ para intercambiarlo con el Ca^{2+} del interior mitocondrial, lo que podría conllevar una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, el posterior aumento de ROS que, a su vez, induciría la oxidación de la Cys195 de ORAI1 y, en consecuencia, la inhibición de SOCE. Por otro lado, el desacoplamiento mitocondrial conllevará una menor captación de Ca^{2+} por parte de este orgánulo y, en consecuencia, una elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico que inactivaría SOCE. En cuanto a los resultados obtenidos, se observó que ni la eliminación de Na^+ ni la despolarización de la mitocondria con FCCP tuvo efecto alguno sobre SOCE en los ODG. Por el contrario, sí que se encontró efecto sobre SOCE en los GBM. Por un lado, la eliminación de Na^+ del medio extracelular potenció SOCE, mientras que la despolarización de la mitocondria con FCCP la redujo. Por otro lado, la combinación de ambos

mostró el mismo efecto que el observado, únicamente, con FCCP. Esto podría indicar que la mitocondria participa de forma activa en la regulación de SOCE en GBM. Estos resultados estarían de acuerdo, al menos en parte, con resultados previos del laboratorio realizados en cáncer de colon, donde también se observó el efecto sobre SOCE del FCCP (Villalobos et al., 2019).

Del mismo modo, se quiso estudiar el papel de la mitocondria y de SOCE en la proliferación de los GBM. Para ello, se emplearon bajas concentraciones de FCCP, que, como hemos visto, desacopla la mitocondria y, en consecuencia, disminuye SOCE, y BTP2, un antagonista conocido de ORAI1, pero no de ORAI3. Los resultados muestran que el desacoplamiento mitocondrial con FCCP que inhibe SOCE es capaz de inhibir significativamente la proliferación de las células de GBM. Sin embargo, BTP2 no produce inhibición per se, aunque es capaz de potenciar significativamente los efectos antiproliferativos de FCCP. Esto sugiere un papel para ORAI1 y el control mitocondrial de SOCE en la proliferación de las células de GBM proporcionando así una posible diana terapéutica para el GBM. Los datos son consistentes con la controvertida literatura sobre este punto. Así, Li et. al. (G. Li et al., 2013) ha descrito que la disminución de STIM1 en células de glioma U251 es capaz de inhibir la proliferación celular. Sin embargo, otros autores indican que la inhibición de SOCE tiene efectos sobre la proliferación, aunque es muy significativo en la capacidad de invasión (Motiani et al., 2013b).

2.2. Transcriptoma del transporte de Ca^{2+} intracelular en glioblastomas humanos

Existe una amplia literatura que ha relacionado la dishomeostasis del Ca^{2+} intracelular con el cáncer. Por ello, estudiar en los GBM el perfil de expresión de los genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} intracelular podría ser revelador (Sakamoto & Frank, 2009; Tajada & Villalobos, 2020). Para facilitar la lectura, la discusión de los niveles de expresión se va a dividir en los diferentes grupos o familias de genes en las que se han dividido el estudio.

En primer lugar, discutiremos los resultados obtenidos sobre el transcriptoma de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. En los GBM no se detectó expresión de las isoformas *CAV1.1*, *CAV1.4* y *CAV2.2*, sí se detectó para el resto. En concreto, fueron las isoformas *CAV1.2*, *CAV1.3*, *CAV2.1*, *CAV3.1* y *CAV3.2* las más expresadas, seguidas de *CAV2.3* y *CAV3.3*. Analizando estos resultados, es interesante destacar la mayor expresión de las isoformas *CAV1.2* y *CAV1.3*, pues se ha descrito que la escisión de su extremo C-terminal puede contribuir a los *hallmarks* del cáncer a través de la modulación de la expresión de canales como TRPV4 o los canales de K^+ de corta conductancia, o de la entrada adicional de Ca^{2+} (Tajada & Villalobos, 2020). También, la isoforma *CAV3.2* ha mostrado tener un papel relevante en la proliferación celular en tumores como los GBM (Y. Zhang et al., 2017) o el cáncer de próstata (Gackière et al., 2008). De hecho, el bloqueo de los *CAV3* en los GBM conlleva una inhibición de la señalización mTORC2/Akt que, a su vez, conlleva una supresión del crecimiento y proliferación de las células tumorales, disminución de la viabilidad celular e inducción de la apoptosis (Valerie et al., 2013; Y. Zhang et al., 2017). En cuanto a la mayor presencia de isoformas de la familia *CAV1* frente a las de la familia *CAV2*, esto podría, en parte, explicar la resistencia a la muerte, pues el Ca^{2+} introducido por los *CAV2*, en comparación al introducido por los *CAV1*, es captado, preferiblemente por el RE y la mitocondria (Ma et al., 2012). Además, también se ha descrito que *CAV1*, a diferencia de *CAV2*, tiene una mayor capacidad de señalización hacia el núcleo e inducir la expresión de diferentes genes regulados por CREB, genes estrechamente relacionados con el cáncer (Sakamoto & Frank, 2009).

Otros receptores/canales relacionados con el desarrollo y la progresión tumoral son los receptores purinérgicos (Morrone et al., 2021; W. jun Zhang, 2021). En el caso de las muestras de GBM estudiadas, hemos identificado una expresión nula o prácticamente nula de los receptores *P2X1*, *P2X2*, *P2X3* y *P2Y2*, *P2X5*, *P2X6*, *P2Y4*, *P2Y6*, *P2Y13* y *P2Y14*. Por lo tanto, los receptores purinérgicos que se expresan en GBM son solo cuatro *P2X4*, *P2X7*, *P2Y1* y *P2Y12*. Este perfil de expresión relativa es bastante interesante, sobre todo por el papel de las *P2X4*, *P2X7*, *P2Y1* y *P2Y12* en el cáncer. En cuanto al *P2X4*, cabe destacar que este es ligeramente diferente al resto de *P2X*, pues presenta una mayor permeabilidad al Ca^{2+} y, además, permite la entrada a la célula de macromoléculas que pueden afectar a la actividad celular (W. jun Zhang, 2021). Se ha visto que este receptor puede regular indirectamente la progresión del tumor a través de mediar la inflamación y las células del sistema inmune en el microambiente tumoral. De hecho, se ha observado su sobreexpresión en gliomas, donde regularía a las células tumorales a través de macrófagos asociados al tumor y a la microglía (Guo et al., 2004). En cuanto al *P2X7*, este también presenta ciertas diferencias respecto al resto de *P2X*, como, por ejemplo, en su secuencia C-terminal. Se ha identificado su expresión en la mayoría de los tumores, como el de hígado, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, o neuroblastomas (W. jun Zhang, 2021). De hecho, su mayor expresión y/o activación podría jugar un papel clave en el desarrollo tumoral, pues promueve su crecimiento, proliferación, migración e invasión. No obstante, cuando hay una sobreexposición a ATP, se produce tal citotoxicidad que puede conllevar la inhibición del crecimiento tumoral; en este sentido, la activación del *P2X7* podría promover la apoptosis y muerte del tumor a través del incremento de la apertura de poros en la membrana (W. jun Zhang, 2021). Este receptor también ha mostrado ser capaz de activar células del sistema inmune, lo que da lugar a un incremento de citoquinas y quimioquinas, aumento de ROS y, en definitiva, regulando la progresión del tumor. Además, en células de glioma se ha descrito que la activación de este receptor aumenta la expresión de IL8 y VEGF y, en consecuencia, promueve el crecimiento tumoral (W. Wei et al., 2008). También, en otros tipos de cáncer se ha descrito el papel regulador de ciertos miRNA sobre estos receptores; en particular, en el cáncer de mama, el miR-216B es capaz de actuar directamente sobre *P2X7* y lo regula negativamente, pues disminuye la expresión de este mismo receptor a nivel de ARNm; además, también reduce la expresión de Bcl-2, aumenta la expresión de la caspasa-3 e inhibe la proliferación (W. jun Zhang, 2021). En consecuencia, la expresión elevada de estas dos isoformas, *P2X4* y *P2X7*, favorece activación de vías de diferentes vías de señalización asociadas con procesos inflamatorios, supervivencia, crecimiento y proliferación tumoral (Morrone et al., 2016).

En cuanto a los *P2Y*, la mayor expresión de *P2Y1* y *P2Y12* concuerda con la evidencia existente en tumores sólidos, como los glioblastomas, en los que la presencia de zonas hipóxicas es muy habitual. Así, en estas zonas se producen altos niveles de ATP y ADP, ambos agonistas de estos dos receptores, por lo que, en estas condiciones de hipoxia, el ADP sería capaz de activar estas células tumorales y favorecer aún más la progresión tumoral. No obstante, estos receptores también se expresan de forma abundante en las plaquetas del microambiente tumoral de estos tumores sólidos, por lo que el ADP generado en condiciones de hipoxia puede estimular a estas y, en consecuencia, favorecer la viabilidad, proliferación y progresión tumoral (Morrone et al., 2021; Vargas et al., 2022). De hecho, estos autores sugieren que una fuerte relación entre la activación de las plaquetas y la malignidad del tumor.

En cuanto al perfil de expresión de la superfamilia de los TRP, comenzaremos exponiendo los resultados para la familia de los TRPC. De entre todos sus miembros, destaca la mayor expresión del *TRPC1* sobre el resto de las isoformas, un canal previamente implicado en los llamados *hallmarks* (proliferación y migración celular, o la angiogénesis) en diferentes tipos de cáncer. De hecho, tiene un papel importante en la migración de gliomas tras ser estimulados por EGF (Bomben et al., 2011). Esta mayor expresión concuerda con otros estudios como el de (Alptekin et al., 2015). También se ha descrito que la pérdida de función del *TRPC1* en GBM podría dificultar el crecimiento y proliferación tumoral. Cabe destacar que también se le asocia con un peor pronóstico. Tras *TRPC1*, los canales *TRPC3*, *TRPC4* y *TRPC6* se expresan abundantemente en las muestras de GBM, lo que también estaría de acuerdo con la evidencia existente. En concreto, se ha descrito que, en los gliomas, hay unos niveles elevados de expresión de *TRPC3* y que, además, la esperanza de vida se reduce con la mayor expresión de esta isoforma (Chang et al., 2018; Lefranc, 2021). En cuanto al *TRPC4*, se ha descrito que, en algunos tipos de cáncer, como el de ovario, su sobreexpresión podría favorecer la proliferación celular (Zeng et al., 2013). Respecto del *TRPC6*, su mayor expresión relativa concuerda con estudios como el de (Alptekin et al., 2015). Su disfunción se ha relacionado con diferentes patologías, incluidos los glioblastomas (Alptekin et al., 2015). En este sentido, se ha descrito que tiene un papel fundamental en la tumorigénesis y en la progresión del glioma (X. Ding et al., 2010). De hecho, se ha visto que está sobreexpresado en pacientes con glioblastoma, y que su expresión aumenta con el grado del tumor (Lefranc, 2021). En cuanto a su inhibición en GBM y otros tipos de cáncer, se ha descrito que reduce el crecimiento celular y que induce el arresto del ciclo celular en la fase G2/M, induciendo un efecto antiproliferativo (X. Ding et al., 2010; Lefranc, 2021).

De la familia de los TRPV, se observa una mayor expresión, y prácticamente idéntica, de las isoformas *TRPV1*, *TRPV2* y *TRPV3*, mientras que las otras tres no se expresan. No obstante, si bien es cierto que en otros estudios también se ha encontrado una mayor expresión de *TRPV1* y *TRPV2* en GBM, se ha descrito que estos podrán ser supresores tumorales que actuarían inhibiendo el crecimiento celular e induciendo la apoptosis (Alptekin et al., 2015; Lefranc, 2021). Además, también se ha descrito que la expresión de estos disminuye la progresión y el grado del GBM. Algo similar ocurre con los miembros de la familia de los TRPM, pues, de entre los 8 miembros, destaca la mayor expresión relativa del *TRPM2*, también un supresor tumoral, lo que ya vieron otros autores como Alptekin (Alptekin et al., 2015). En cuanto a los demás miembros de esta familia, a excepción del *TRPM3*, *TRPM4* y *TRPM7*, el resto no se expresan (Rizopoulos & Assimakopoulou, 2021).

En cuanto a la expresión canales TRPML, hemos observado una gran expresión de *TRPML1*, un sensor de ROS capaz de activar la autofagia y, en consecuencia, la muerte celular. Por el contrario, las isoformas *TRPML2* y 3 no muestran expresión. No obstante, en la literatura los resultados sugieren que habría una menor expresión de *TRPML1* y mayor de *TRPML2* en líneas celulares de glioblastoma (Lefranc, 2021; Mesquita et al., 2021). Por último, en cuanto a los TRPP, se ha visto una mayor expresión de *TRPP1* y *TRPP2*, lo que, en otros tipos de cáncer, como el cáncer de colon, se relaciona con un peor pronóstico a través de la regulación de las rutas mTOR y JAK (Rizopoulos & Assimakopoulou, 2021).

Respecto al perfil de expresión de las bombas e intercambiadores de Ca^{2+} , vamos a dividir el análisis en función de la localización subcelular de estas. En primer lugar, nos referiremos a las bombas de la MP, cuya relación con el cáncer, según la evidencia, es muy variada y dependiente del tipo de tumor. Por un lado, en algunos tumores, como en cáncer oral o de colon, se ha observado una baja expresión de las bombas PMCA1 y PMCA4 (Naffa et al., 2023). Por otro lado, en otros tipos de cáncer, como el cáncer de mama y en el adenocarcinoma ductal pancreático, se ha observado una gran expresión de estas dos (Curry et al., 2012; Naffa et al., 2023; Sritangos et al., 2020). En estos casos, en los que estas bombas están sobreexpresadas, se ha observado una mayor capacidad metastásica y resistencia a la muerte de los tumores. En este sentido, en las muestras de GBM hemos encontrado que, de las 4 isoformas, son las PMCA1 y PMCA4 las más expresadas.

En segundo lugar, hablaremos de las bombas de Ca^{2+} del RE, las SERCA, cuya expresión difiere mucho según el tipo de cáncer. Por un lado, se ha encontrado que la SERCA2 está muy reducida en muestras de cáncer de pulmón (Endo et al., 2004) o de tiroides (Pacífico et al., 2003), donde podría tener un papel relevante en la resistencia a la muerte mediante una disminución de los depósitos de Ca^{2+} . Por otro lado, en cáncer de colon se ha identificado la sobreexpresión de esta isoforma, lo que podría favorecer su tasa proliferativa y la capacidad metastásica (Chung et al., 2006; Fan et al., 2014). En cuanto a las otras dos isoformas, se ha visto que la SERCA3 está disminuida en pacientes con cáncer de colon, de mama y de pulmón (Brouland et al., 2005). En particular, en las muestras de GBM hemos encontrado una mayor expresión de la isoforma SERCA2 respecto de las otras dos isoformas las cuales, de hecho, apenas se expresan (Dang & Rao, 2016; M. Feng et al., 2010).

En cuanto a las bombas de Ca^{2+} de la vía secretora, las SPCA, cabe destacar que su papel en el cáncer se ha estudiado, básicamente, en cáncer de mama. En concreto, se ha visto que tanto la expresión de SPCA1 como de SPCA2 tienen un papel importante en la proliferación o en el procesamiento del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, receptor muy correlacionado con un mal pronóstico de este tipo de cáncer (Dang & Rao, 2016; M. Feng et al., 2010). En nuestro caso, hemos visto una gran expresión de SPCA1 y una nula expresión de SPCA2. No obstante, mientras que SPCA1 se expresa de forma ubicua en todos los tejidos, SPCA2 lo hace, casi de forma exclusiva, en el tejido intestinal y secretorio (páncreas, glándulas mamarias y epitelial) (Dang & Rao, 2016). Por lo tanto, no es de extrañar que no se haya observado expresión de esta bomba en las muestras de GBM.

Por último, en relación con los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, está surgiendo evidencia muy reciente que habla sobre su implicación en diferentes tipos de cáncer; en concreto, en la progresión tumoral, capacidad invasiva y, en consecuencia, de su posible papel como diana terapéutica (Chovancova et al., 2020). No obstante, la mayoría de la evidencia se centra en la isoforma NCX1. La expresión de este canal puede regularse tras la estimulación de oncogenes, por la activación del TNF- α o por la luz UV. Como consecuencia, se induce la sobreexpresión de NCX1. Si bien es cierto que este canal puede actuar en sentido anverso (extruyen Ca^{2+} desde el medio extracelular) o reverso (introducen Ca^{2+} al citosol), la forma principal de actuación en los GBM es extruyendo Ca^{2+} (Chovancova et al., 2020). En este sentido, (Hu et al., 2019) han estudiado en células de GBM el efecto de bloquear estos intercambiadores en la dirección *forward* con *bepridil*, bloqueo que podría tener un efecto terapéutico en el tratamiento de GBM a través de un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular que, a su vez, conlleva un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 e induce la muerte celular. Además, otros autores también han descrito que el bloqueo de la extrusión de Ca^{2+} por estos canales en células de GBM empeora la

formación y mantenimiento de lamelopodios, así como la migración celular (Brandalise et al., 2023). Además, también se ha descrito que este canal es capaz de formar un complejo con TRPC6 que puede ser regulado por TGF (Chovancova et al., 2020). Por esa razón, se ha visto que el bloqueo de los canales TRPC podría inhibir la progresión de los GBM a través de un aumento del transporte en sentido *reverse* (introducir Ca^{2+}) de los NCX (Song et al., 2014). En cuanto a la isoforma *NCX3*, existe menor evidencia al respecto. No obstante, se ha descrito que tanto sus mayores niveles de expresión como su mayor actividad podrían inducir resistencia a la muerte y a agentes quimioterápicos en líneas celulares de cáncer de ovario, pues su inhibición mejoraría la sensibilidad a cisplatino en estos tumores y, además su silenciamiento potenciaría la apoptosis (Chovancova et al., 2020). Por lo tanto, parece evidente que la inhibición de *NCX1* y *NCX3* podría conllevar la inhibición la progresión de los GBM. En cuanto a la isoforma *NCX2*, a diferencia de las otras dos, es un candidato a supresor tumoral, pues inhibe la invasión, la angiogénesis y el crecimiento de los GBM, por lo que una menor expresión de esta isoforma junto con una mayor expresión de las otras dos podría suponer un caldo de cultivo perfecto para el desarrollo de gliomas (Qu et al., 2017). Toda esta evidencia existente relacionada con los NCX y su papel en el cáncer y, en particular, en los GBM, concuerdan perfectamente con nuestros resultados, pues hemos identificado una mayor expresión relativa de las isoformas *NCX1* y *NCX3* mientras que la isoforma *NCX2* no muestra expresión alguna.

En cuanto a los genes implicados en SOCE, se ha detectado una expresión relativa similar para todos ellos, tanto para las 3 isoformas de ORAI como para las dos de STIM. Por lo tanto, hacer suposiciones basadas, únicamente, en estos niveles de expresión relativa sería muy aventurado. No obstante, es cierto que estos resultados pueden sugerir que este mecanismo de entrada de Ca^{2+} está presente en los GBM, tal y como hemos mostrado en los experimentos funcionales, y que podría jugar un papel relevante en algunas de las características del cáncer, pues en otros tipos de cáncer se ha descrito que SOCE podría estar implicada en la capacidad de invasión, proliferación, migración e, incluso, a la resistencia a la muerte y agentes quimioterápicos. Es más, se ha visto que, en GBM, el tratamiento con *Rituximab*, que reduce SOCE, o directamente, el silenciamiento de *STIM1* o de *ORAI1* puede disminuir la proliferación celular, aumentar la apoptosis y reducir su resistencia a la muerte (H. Liu et al., 2011b). Por lo tanto, la entrada de Ca^{2+} a través de ORAI1 podría regular la proliferación y la apoptosis de las células de GBM. Otros autores como Yuan (Yuan et al., 2019b) también han descrito el papel de *ORAI2* en los GBM; en concreto, han visto que su expresión es mayor en GBM de alto grado respecto de los gliomas de bajo grado. Además, también se ha visto que mayores niveles de expresión de *ORAI2* están relacionados con un peor pronóstico de los pacientes. Así, han descrito que su activación en los subtipos clásico y mesenquimal de GBM jugaría un papel importante en la autorrenovación celular y en la transición epitelio-mesenquimal, actuando como un promotor tumoral (Yuan et al., 2019b). Además de los integrantes de SOCE debemos tener en cuenta los niveles de expresión de sus reguladores en los que sí que se observan distintos niveles de expresión relativos entre los distintos genes.

Por un lado, cabe destacar los niveles elevados detectados para *STIMATE*, *ORMDL3* y *SARAF*. De estos tres, *STIMATE* actúa como un regulador positivo de SOCE, mientras *SARAF* y *ORMDL3* lo harían como reguladores negativos (Lopez et al., 2016b). Además, este último es capaz de inhibir la *SERCA2b* a través de una interacción entre ambas. En cuanto a *SARAF*, este es un regulador negativo de SOCE, pero regula positivamente la entrada de Ca^{2+} independiente de depósitos a través de *ORAI1* y dependiente de ácido araquidónico. En particular, los canales de ácido araquidónico independientes de los depósitos (ARCC), consisten en un complejo formado por *ORAI1*, *ORAI3*, *STIM1* localizado en la membrana plasmática y *SARAF*, también localizado en la

MP (Lopez et al., 2016b). En este sentido, se ha visto que *SARAF* regula la supervivencia de las células de neuroblastoma. Es más, se ha visto que *SARAF* y *ORAI1* pueden contribuir al fenotipo tumoral, pues favorecen la activación de las células endoteliales y la angiogénesis y, en respuesta a VEGF, aumentan la concentración de Ca^{2+} citosólico (Galeano-Otero et al., 2021).

Por otro lado, no se ha detectado expresión de *MS4A12* ni de MBP, mientras que sí se ha detectado para *CRACR2A*, aunque a unos niveles relativos muy bajos. De estos, tanto *MS4A12* (J. W. Han et al., 2021) como *CRACR2A* actuarían reguladores positivos de SOCE, mientras que MBP sería un regulador negativo. En cuanto a su papel en cáncer, se ha descrito que *CRACR2A*, en cáncer de próstata, presenta una escasa expresión y que cuanto menor es más se relaciona con el desarrollo de metástasis y un peor pronóstico (Dai et al., 2019). Respecto del *MS4A12*, su menor expresión también se relaciona con un peor pronóstico en cáncer de colon, pues podría inhibir la diferenciación celular, algo característico en muchos tipos de cáncer (J. Han et al., 2020; He et al., 2017). En cuanto al MBP, (Golfinos et al., 1997) observó que, mientras su expresión es elevada en ODG, es mínima en GBM. Finalmente, en cuanto a las septinas, numerosos estudios han indicado su importancia en los tumores (Connolly et al., 2011). Las *SEPTIN2* y *9*, las cuales son reguladores positivos de SOCE; han mostrado tener un papel en el crecimiento tumoral de los GBM. De hecho, su supresión inhibe la capacidad invasiva, la proliferación y el crecimiento de estos tumores (D. Xu et al., 2018). En cuanto a la *SEPTIN4*, también reguladora positiva de SOCE, se ha visto que está infraexpresada en GBM (W. Ding et al., 2022). La *SEPTIN11* ha mostrado tener capacidad de supresor tumoral (Connolly et al., 2011). Por el contrario, la sobreexpresión de la *SEPTIN7*, reguladora negativa de SOCE, suprime el crecimiento de los gliomas (Jia et al., 2010).

El transporte de Ca^{2+} entre diferentes orgánulos celulares ha mostrado tener una fuerte relación con el cáncer. Por un lado, la mitocondria tiene un papel relevante en algunas de las características del cáncer, como la reprogramación metabólica o la resistencia a la muerte. Por otro lado, también se sabe que la liberación del Ca^{2+} desde el RE puede tener un papel importante en la adquisición de resistencia a la muerte por parte de las células tumorales, pues la mayor liberación de este catión desde el RE podría inducir la apoptosis. Por ello, el perfil de expresión de los transportadores de Ca^{2+} de estos orgánulos es de suma relevancia.

En cuanto al RE, se ha observado una expresión relativa muy parecida entre las 3 isoformas de IP_3R , siendo la *IP3R2* la más expresada. Esto concuerda, en parte, con la evidencia existente, pues se ha descrito que la isoforma *IP3R3* está aumentada en GBM. De hecho, esta isoforma podría favorecer su capacidad metastásica, aumentar su supervivencia y, en consecuencia, estaría relacionada con una mayor agresividad del tumor (S. S. Kang et al., 2010). Así, se ha visto que la inhibición de esta isoforma con cafeína disminuye la capacidad invasiva y la supervivencia de los GBM. Por el contrario, también se ha descrito que habría una menor expresión de la isoforma $\text{IP}_3\text{R1}$, lo cual no concuerda con lo que hemos observado en nuestras muestras de GBM. Respecto de los RyR, se ha detectado la expresión de las isoformas *RYR1* y *RYR3*, pero no de la *RYR2*. Curiosamente, se ha visto que, a diferencia del efecto inhibitorio que tiene sobre *IP3R3*, la cafeína activa los RyR, activación que ha mostrado tener un efecto antitumoral.

Por su parte, el análisis de la expresión relativa de los transportadores de Ca^{2+} en la mitocondria revela que todos ellos están expresados en mayor o menor medida. No obstante, podría destacar una menor expresión relativa de *MCU* y de su regulador positivo *MICU3* respecto de la expresión observada para *EMRE*, *MICU1* y los reguladores negativos de *MCU* *MICU1* y *MICU2*, pues están más expresados. A esto, habría que sumarle también una expresión similar de *NCLX* que, junto con la elevada expresión que se ha visto para *TRPC1*, podría indicar una menor sobrecarga de

Ca^{2+} mitocondrial al permitir un mayor intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a través del NCLX. Esto podría hacer pensar que la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria está disminuida, así como aumentada la salida de Ca^{2+} desde la mitocondria hacia el citosol a través del NCLX, lo que evitaría una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y una menor formación de ROS, lo que, por un lado, podría favorecer la resistencia a la muerte al evitar la sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial y, por otro lado, favorecería la proliferación al evitar la inactivación de SOCE a través de la oxidación de la Cys195 de *ORA1*. En cuanto a los VDAC, se observa una expresión relativa similar en todos ellos. Cabe destacar que estos se han relacionado con el cáncer. En particular, algunos estudios sugieren que *VDAC1* tendría un papel relevante en el proceso tumoral, pues se ha visto que su depleción podría tener propiedades antitumorales (Arif et al., 2017). Estudios en esta misma línea han visto que *VDAC1* es capaz de unirse a la enzima hexoquinasa (HK) con el fin de proteger a las células tumorales de la apoptosis y favorecer su proliferación (Camara et al., 2017).

2.3. Remodelado del transporte de Ca^{2+} en GBM respecto a áreas peritumorales

Para el estudio muestras de GBM y áreas peritumorales, tal y como ya se explicó anteriormente, se dispone de muestras pareadas para 8 pacientes. De cada uno de ellos, se ha extraído una muestra tumoral y otras dos correspondientes a áreas peritumorales con posibilidad de recidiva, extraídas por motivos clínicos. No obstante, este estudio es ciego, lo que significa que desconocemos la identidad de cada una de las tres muestras de cada paciente, por lo que todas ellas se estudiaron desconociendo su fenotipo, únicamente se identificaron como “ α ”, “ β ”, o “ γ ”. Evidentemente, para todos los pacientes esta numeración tiene el mismo significado; es decir, que la tumoral se le asignará a la misma letra para todos los pacientes, y lo mismo para cada una de las peritumorales.

En cuanto a los experimentos realizados, el estudio es doble. En primer lugar, se llevaron a cabo experimentos funcionales para evaluar el comportamiento de estos a nivel de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En concreto, se ha evaluado la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, RE, SOCE y la entrada de Ca^{2+} inducida por ATP. En segundo lugar, se realizó un análisis transcriptómico mediante la tecnología RNA-Seq donde, además de las muestras pareadas, también se incluyeron 9 muestras de GBM de otros 9 pacientes diferentes estudiados previamente, de las cuales sí que se conocía su fenotipo tumoral. A continuación, se discuten los resultados obtenidos en los dos tipos de análisis.

Los resultados funcionales obtenidos al comparar las muestras pareadas entre las diferentes áreas, tumoral y peritumorales, revelaron que la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares es significativamente diferente entre las muestras “ α ” y “ γ ”, siendo las muestras “ γ ” las que menor contenido de Ca^{2+} liberan. Esto podría indicar que las muestras “ α ” serían las tumorales, pues en muchos tipos de cáncer, se ha descrito una disminución de la *SERCA3* (Brouland et al., 2005). De hecho, en el análisis de los perfiles de expresión anterior, hemos visto que en las muestras de GBM únicamente se observa la expresión de la *SERCA2*, pero no de la *SERCA1* ni de la *SERCA3*, lo que podría explicar el menor contenido de Ca^{2+} en los depósitos.

En cuanto a SOCE, no se observaron diferencias entre las diferentes áreas; es decir, que, a pesar de que el contenido de Ca^{2+} de los depósitos en las 3 muestras es diferente, el vaciado de estos induce la misma respuesta en cuanto a la activación de SOCE. De hecho, si recordamos los resultados de expresión relativa de SOCE, al menos de los participantes más relevantes, se obtuvo una expresión casi idéntica tanto de las 3 isoformas de *ORA1* como de las 2 de *STIM*; es decir, no había ningún patrón de expresión llamativo que pudiera hacer pensar en que hay una

SOCE alterada en GBM y, en consecuencia, que será similar entre las muestras peritumorales y las tumorales.

En cuanto a la respuesta a ATP, se observó un mayor incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ en los cultivos procedentes del área “ α ” son los que experimentan una mayor entrada de Ca^{2+} , siendo diferente, únicamente, a la observada para el área “ β ”. No obstante, cabe destacar que el incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ observado en el área “ γ ” está a caballo entre la de “ α ” y “ β ”, lo que indica que sería necesario un mayor número de muestras para concluir hacia cuál de las dos se decanta o si, por el contrario, resultaría ser diferente a ambas. Esto podría indicar que en la muestra “ α ” hay una mayor cantidad y/o actividad de los receptores purinérgicos, lo que podría indicar que esta fuera la muestra tumoral, pues, como se ha descrito ya anteriormente, la mayor expresión de algunos de estos receptores, como son P2X4, P2X7, P2Y1 y P2Y12, puede tener un papel fundamental en el desarrollo y progresión tumoral (Morrone et al., 2021; W. jun Zhang, 2021).

A partir de las muestras pareadas, una tumoral y dos peritumorales para un total de 8 pacientes, junto con las muestras conocidas de GBM, se realizó el análisis transcriptómico de cada una de ellas y, posteriormente, el análisis de expresión diferencial, donde se compararon, dos a dos, los 4 tipos de muestras. De todas las comparaciones, únicamente hubo dos que mostraron diferencias en la expresión de algunos genes: entre “ α ” vs. “ γ ” y entre “GBM” vs. “ γ ”. Por un lado, entre “ α ” y “ γ ” se identificaron 1.515 genes expresados diferencialmente (DEG), de los cuales 20 se corresponden con genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} . Por otro lado, entre “GBM” vs. “ γ ” se identificaron 1.495 DEG, 20 correspondientes al transporte de Ca^{2+} intracelular. Además, entre ambas comparaciones coinciden 673 DEG, de los cuales 14 estarían relacionados con la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En concreto, estos 14 genes podrían indicar los genes de transporte de Ca^{2+} más relacionados con el fenotipo GBM incluyendo la subunidad α del canal tipo L (CAV1.4), el canal de Ca^{2+} tipo T CAV3.2, la SEPTIN4, los canales TRPC6, TRPV3, 4, 5, 6 y TRPM6, los receptores purinérgicos P2X7, P2Y2, P2Y12 y P2Y13 y, el modulador de MCU MICU3. A continuación se discuten los cambios en la expresión de los sistemas de transporte de Ca^{2+} entre las zonas peritumorales y las zonas tumorales.

En primer lugar, tanto en “GBM” como en “ α ” respecto de “ γ ”, se observa un aumento del gen que codifica para el canal tipo T CAV3.2 y una disminución de la subunidad α del tipo L CAV1.4. Esto es interesante de cara al fenotipo tumoral, pues se ha descrito que el aumento de CAV3.2 está relacionado con la proliferación de las células de glioblastoma (Y. Zhang et al., 2017), cuyo bloqueo suprime el crecimiento y proliferación de estas células y, además, induce la apoptosis (Valerie et al., 2013; Y. Zhang et al., 2017). En cuanto a la disminución observada del CAV1.4, cabe destacar que este canal ha mostrado sobreexpresión en algunos tipos de cáncer, como el de testículos (C. Y. Wang et al., 2015), mientras que en otros ha mostrado infraexpresión, como los linfomas (Phan et al., 2017). Por lo tanto, esto parece indicar que este canal podría tener un papel relevante en la fisiopatología del cáncer, independientemente del sentido del cambio.

Respecto a los receptores purinérgicos se observa una coincidencia total entre ambas comparaciones. De hecho, cabe destacar que hay una gran infraexpresión de 4 de ellos: P2X7, P2Y2, P2Y12 y P2Y13. En cuanto al P2X7, se ha descrito que este presenta un papel dual en el fenotipo tumoral. Por un lado, se ha descrito su sobreexpresión en diferentes tipos de cáncer, incluido los gliomas (W. Wei et al., 2008; W. jun Zhang, 2021), pues promueve el crecimiento, proliferación, migración e invasión de los tumores. Por el contrario, en condiciones en las que hay una elevada cantidad de ATP, la sobreactivación de este receptor puede inducir una elevada citotoxicidad e inhibir el crecimiento tumoral e inducir la apoptosis (W. jun Zhang, 2021). Por lo tanto, postulamos que su infraexpresión podría ser un mecanismo de protección que le confiere

resistencia a la muerte. En cuanto a los P2Y infraexpresados, la literatura, a día de hoy, no es muy clara sobre su papel en el cáncer y/o el sentido de la expresión diferencial. De hecho, en algunos tipos de cáncer estas isoformas muestran sobreexpresión mientras que en otros están infraexpresadas. Lo que sí que comparten diferentes autores es su papel en la regulación del sistema inmune del microambiente tumoral, pues su expresión está relacionada con el nivel de infiltración de células inmunes en el microambiente tumoral (Morrone et al., 2021; Vargas et al., 2022). No obstante, autores como Liu (C. Liu et al., 2023) han encontrado una menor expresión de las isoformas *P2Y2* y *P2Y12* y, además, sugieren que la menor expresión de *P2Y12* está relacionada con una menor supervivencia de los pacientes con glioblastoma (Rizopoulos & Assimakopoulou, 2021).

En lo referente a la superfamilia de canales TRP, se ha observado un perfil de expresión diferencial casi idéntico en ambas comparaciones, salvo por la ligera sobreexpresión de *TRPP1* en “GBM”. En concreto, se ha observado una mayor expresión en “ α ” y “GBM” de *TRPC6* y *TRPV4*, mientras que *TRPV3*, *TRPV5*, *TRPV6* y *TRPM6* están infraexpresados respecto de “ γ ”. Comenzando por los TRP sobreexpresados, el *TRPC6* se ha relacionado con diferentes patologías, incluidos los glioblastomas (Alptekin et al., 2015). En particular, se ha visto que está sobreexpresado en pacientes con glioblastoma, cuya expresión aumenta todavía más con el grado del tumor (Lefranc, 2021). Se ha observado que este canal tiene un papel fundamental en la tumorigénesis, pues afecta a la proliferación celular, al crecimiento tumoral, a la angiogénesis, a su capacidad invasiva y, en definitiva, a la progresión de los tumores, incluidos los gliomas (Chinigo et al., 2021b; X. Ding et al., 2010; Lefranc, 2021). En cuanto al *TRPV4*, se ha visto que promueve la migración y la invasión de las células de glioma a través de la señalización Akt/Rac1 (Ou-yang et al., 2018). Respecto de los infraexpresados, concuerda con lo observado en cáncer de colon (Sozucan et al., 2015), salvo para el *TRPV6*, cuya sobreexpresión se ha relacionado con la patogénesis de diferentes tumores (Rizopoulos & Assimakopoulou, 2021). Por último, la infraexpresión de *TRPM6* se ha relacionado con la proliferación y la quimiorresistencia a doxorrubicina en líneas celulares de cáncer de colon (Castiglioni et al., 2015).

En cuanto a los miembros de SOCE, únicamente se observa la infraexpresión de la *SEPTIN4* en ambas comparaciones, si bien es cierto que en “GBM” se observa la sobreexpresión de *ORA12* ($FDR > 0,05$), de la *SEPTIN9* e infraexpresión de la *SEPTIN7*, mientras que en “ α ” la *SEPTIN8* está infraexpresada ($FDR > 0,05$). Esto concuerda con los experimentos de imagen de Ca^{2+} , pues no se observaron diferencias en SOCE entre las 3 muestras pareadas. Además, si recordamos cómo es SOCE en las muestras de GBM, esta aumentaba con la malignidad de los gliomas, siendo mayor para GBM. En cuanto a la *SEPTIN4*, los resultados concuerdan con la evidencia existente, pues se ha visto que está infraexpresada en glioblastomas (W. Ding et al., 2022). En cuanto al perfil de expresión de las *SEPTIN7* y *9*, se ha visto que tanto la infraexpresión de la *SEPTIN7* (Jia et al., 2010) como la sobreexpresión de la *SEPTIN9* (Xu et al., 2018) promueve el crecimiento de los glioblastomas.

Respecto al RE, se observa un ligero aumento de la *SERCA1* en la muestra “ α ” vs. “ γ ”, pero no en “GBM” respecto de “ γ ”. Además, mientras que en la comparación “ α ” vs. “ γ ” se observa infraexpresión de las isoformas *RYR1* y *RYR3*, en la comparación “GBM” vs. “ γ ” se identifica una infraexpresión de la isoforma *RYR2*. Esto podría tener un efecto pro-tumoral, pues se ha descrito que la activación de los RyR por cafeína tendría un efecto antitumoral, por lo que una menor expresión de estos favorecería el fenotipo tumoral. En cuanto a la *SERCA*, no se ha encontrado en la literatura relación con los tumores cerebrales; sin embargo, para la isoforma *SERCA2* se ha encontrado evidencia de sobreexpresión en cáncer de colon donde podría favorecer su tasa

proliferativa y capacidad metastásica (Chung et al., 2006; Fan et al., 2014). También, en cáncer de mama y de colon, autores como Christodoulou (Christodoulou et al., 2021) han descrito la sobreexpresión de las tres isoformas. Cabe destacar que en los experimentos funcionales se observó que la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos de “ α ” es mayor que en “ γ ”, lo que podría explicarse por una sobreexpresión de la *SERCA1* y una menor expresión de los RyR, pues, por un lado, explicaría una mayor captación de Ca^{2+} por el RE y, por otro lado, un menor vaciado basal de estos, lo que conllevaría una mayor acumulación de este catión en el RE. Es decir, que, en condiciones basales, entra más Ca^{2+} al RE y sale menos en las muestras “ α ” que en las “ γ ”.

Por último, hablaremos de la mitocondria. Aquí podemos observar cómo, en ambas comparaciones, hay una disminución del *MICU3*, un regulador positivo de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. De hecho, en la muestra “ α ” también se observa un ligero incremento de *MCU*, que, junto con la disminución de *EMRE* y *MICU3* también podría pensarse en una menor entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. Respecto a la muestra “GBM”, también se observa la disminución de *MICU1*, lo que también indicaría una menor entrada de Ca^{2+} a la mitocondria. En resumen, que, en ambos casos, se observa un perfil de expresión diferencial que concuerda con una regulación negativa de la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, lo que implicaría una disminución la captación de Ca^{2+} por parte de este orgánulo y, en consecuencia, conferir cierta resistencia a la apoptosis inducida por una sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial.

Observando el perfil de expresión de ambas comparaciones proporcionan unos resultados muy similares en cuanto a perfil de expresión diferencial y de enriquecimiento de conjuntos de genes (estos últimos no discutidos, pero sí mostrados en resultados), junto con el conocimiento previo de que la muestra “GBM” es, como su propio nombre indica, tumoral, parece evidente que la muestra ciega “ α ” representa el mejor candidato a ser la muestra tumoral. Además, puesto que no hay diferencias entre “ α ” vs. “ β ” ni entre “GBM” vs. “ β ”, a la par que tampoco las hay entre “ β ” vs. “ γ ”, parece evidente que la muestra de menor probabilidad de recidiva sería “ γ ” y que, en consecuencia, la muestra extraída de un área peritumoral de alta probabilidad sería “ β ”.

En resumen, los resultados muestran diferencias funcionales y moleculares entre las células procedentes de glioblastomas y muestras peritumorales adyacentes. A nivel funcional, se observan marcadas diferencias en las respuestas a ATP y el nivel de llenado de los depósitos intracelular de Ca^{2+} . A nivel molecular se identifican unos 14 genes implicados en transporte de Ca^{2+} que están diferencialmente expresados en los glioblastomas respecto a las áreas peritumorales. Los genes sobreexpresados en “GBM” serían solo tres, el canal de Ca^{2+} tipo T *CAV3.2* y los canales *TRPC6* y *TRPV4*. En cambio, los infraexpresados serían la subunidad α del canal tipo L (*CAV1.4*), la *SEPTIN4*, los canales *TRPV3*, *5*, *6* y *TRPM6*, los receptores purinérgicos *P2X7*, *P2Y2*, *P2Y12* y *P2Y13* y *MICU3*, un modulador positivo de MCU (Figura 133).

Los resultados, por tanto, sugieren que la expresión diferencial de los genes mencionados arriba podría contribuir al desarrollo tumoral en glioblastomas y por tanto ser considerados potenciales nuevas dianas para la detección y el tratamiento de estos.

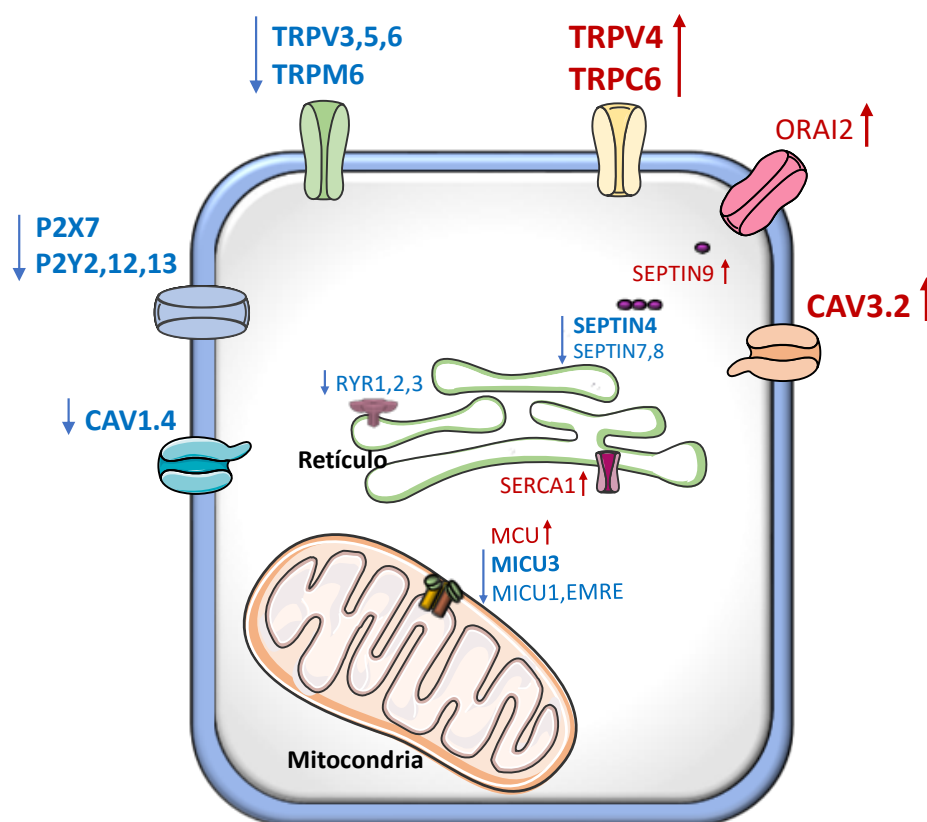
GBM/ α vs. γ 

Figura 133. Expresión diferencial, entre las muestras de tejido de glioblastoma y áreas peritumorales, de los genes relacionados con el transporte de Ca^{2+} intracelular. La figura muestra la expresión diferencial entre las muestras de tejido de “GBM” y el área “ α ” vs. el área “ γ ”. En azul se muestran los genes cuya expresión diferencial disminuye en las muestras tanto de “GBM” como en el área “ α ” respecto del área “ γ ”, mientras que, en rojo, los genes cuya expresión aumenta. Además, en negrita, se muestran los genes cuya expresión diferencial, en sentido y significación, es coincidente entre la comparación “GBM” vs. “ γ ” y el área “ α ” vs. el área “ γ ”.

Consistentemente, con estos resultados, recientemente se ha descrito que *mibefradil*, un inhibidor del canal de Ca^{2+} tipo T, *CAV3.2* o la atenuación de *CAV3.2* mediada por ARNi inhibe el crecimiento, la supervivencia y la estabilidad de células madre de glioblastoma y los sensibiliza a la quimioterapia con temozolomida (D. Zhang et al., 2018). *Mibefradil* inhibió el crecimiento de xenoinjertos murinos, prolongó la supervivencia del huésped y sensibilizó los tumores al tratamiento basado en quimioterapia. Respecto a *TRPC6*, la evidencia indica que *TRPC6* es necesario para el desarrollo del fenotipo agresivo de los glioblastomas porque la eliminación de la expresión de *TRPC6* inhibe el crecimiento, la invasión y la angiogénesis del glioma (Chigurupati et al., 2010). Funcionalmente, *TRPC6* provoca una elevación sostenida del Ca^{2+} intracelular que se acopla a la activación de la vía calcineurina-factor nuclear de células T activadas (NFAT). La inhibición farmacológica de la vía calcineurina-NFAT reduce sustancialmente el desarrollo de fenotipos malignos de GBM en condiciones de hipoxia. Clínicamente, la expresión de *TRPC6* fue elevada en muestras de GBM en comparación con los tejidos normales. En conjunto, los datos indican que *TRPC6* es un mediador clave del crecimiento tumoral de glioblastomas *in vitro* e *in vivo* y que *TRPC6* puede ser un objetivo terapéutico prometedor en el tratamiento del glioblastoma humano.

Finalmente, los datos son consistentes con un papel esencial de TRPV4 en glioblastoma. Se ha descrito que TRPV4 está significativamente elevada en el glioma maligno en comparación con el cerebro normal y el glioma de bajo grado, y la expresión de TRPV4 correlaciona negativamente con el pronóstico de los pacientes con glioma ((Yang et al., 2020). Funcionalmente, la estimulación de TRPV4 promueve la migración e invasión de células de glioblastoma, y la represión de TRPV4 obstaculiza la migración e invasión de células de glioblastoma *in vitro*. Así, TRPV4 podría servir también como factor pronóstico y objetivo terapéutico específico para pacientes con glioblastoma.

Finalmente, el análisis de grupos de genes sugiere similitudes del glioblastoma con otros tipos de tumores incluyendo el cáncer de colon, el cáncer de mama y, especialmente el cáncer de cérvix o cuello de útero lo que podría tener implicaciones en cuanto a la prevención y/o el tratamiento del glioblastoma, todavía uno de los tipos de cáncer de peor pronóstico.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) disminuye con el envejecimiento, especialmente en presencia de oligómeros del péptido amiloide (A β). El agonista de SOCE, MDEB aumenta SOCE en neuronas jóvenes, pero no en neuronas envejecidas.
2. El envejecimiento disminuye el potencial mitocondrial y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), ambos efectos son potenciados por los A β y podrían contribuir a explicar la pérdida de SOCE y la falta de potenciación por MDEB en neuronas envejecidas.
3. El envejecimiento aumenta la colocalización RE-mitocondria y la expresión de receptores de IP_3 , pero disminuye el porcentaje de neuronas que liberan Ca^{2+} en respuesta a IP_3 enjaulado. Paradójicamente, los A β aumentan el porcentaje neuronas que liberan Ca^{2+} en respuesta a IP_3 enjaulado tanto en neuronas jóvenes como envejecidas.
4. El envejecimiento aumenta la expresión de 15 genes asociados al Ca^{2+} intracelular incluyendo los receptores purinérgicos *P2X5* y *P2Y4*, los receptores muscarínicos de acetilcolina 1 y 2, el receptor de kainato *Gluk4*, los canales *TRPM2* y 3, las proteínas implicadas en SOCE *Stim1*, *Orai2*, *SARAF*, *MBP* y *SEPTIN4*, y los receptores intracelulares *IP3R1,2* y *RyR3*.
5. El envejecimiento disminuye la expresión de 18 genes asociados al Ca^{2+} incluyendo el canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo N (*Cav2.2*), el receptor purinérgico *P2Y1*, el receptor muscarínico de acetilcolina 3 y el receptor nicotínico 7, el canal *Trpm1/3*, las bombas de Ca^{2+} de la membrana plasmática *Pmca1* y 3, las septinas moduladores de SOCE 2,7,9,10 y 11, el receptor intracelular *RyR2* y los sistemas de transporte mitocondrial *Mcu*, *Micu2* y *Vdac1,2* y 3.
6. El tratamiento con los A β no produjo cambios significativos en el transcriptoma de las neuronas hipocampales envejecidas.
7. El ATP aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en células de tumores cerebrales humanos malignos y metástasis, pero muy escasamente en tumores benignos y oligodendrogliomas. La despolarización induce entrada de Ca^{2+} en glioblastomas, pero no en el resto de los tumores cerebrales.
8. La entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) es elevada en tumores benignos, intermedia en gliomas y pequeña en metástasis cerebrales. Sin embargo, en los gliomas, hay una correlación positiva entre malignidad y SOCE. La despolarización mitocondrial inhibe SOCE en gliomas, pero no en oligodendrogliomas. La inhibición de SOCE inhibe la proliferación de las células de glioblastoma.

9. Los glioblastomas expresan altos niveles de 5 tipos de VOCCs (*CAV1.2*, *CAV1.3*, *CAV2.1*, *CAV3.1*, *CAV3.2*), 4 receptores purinérgicos (*P2X4,7*, *P2Y1,12*), 8 canales TRP (*TRPC1*, *TRPV1*, *TRPM2,4,7*, *TRPML1* y *TRPP1,2*), 5 bombas de Ca^{2+} (*PMCA1,2,4*, *SERCA2*, *SPCA1*), 2 intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (*NCX1,3*), 5 proteínas responsables de SOCE (*ORAI1,2,3*, *STIM1,2*), 13 de sus moduladores (*STIMATE*, *ORMDL3*, *SARAF*, *Septin2,3,4,5,6,7,8,9,10,11*), 3 canales del RE (*IP₃R1,2* y *RYR3*) y TODOS los sistemas de transporte de Ca^{2+} de la mitocondria.
10. El estudio de la señal de Ca^{2+} en cultivos primarios de muestras ciegas pareadas de glioblastoma tumorales y peritumorales revela que el contenido de Ca^{2+} de los depósitos y la respuesta a ATP, pero no la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos, es diferente en las células de diferentes zonas estudiadas.
11. El análisis de expresión diferencial llevado a cabo entre muestras de glioblastoma humano y muestras ciegas pareadas de glioblastoma tumorales y peritumorales revela 14 genes diferencialmente expresados relacionados con Ca^{2+} intracelular incluyendo la sobreexpresión de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo T (*CAV3.2*), los canales *TRPC6* y los canales *TRPV4*, así como la infraexpresión de la subunidad $\alpha 1\text{F}$ del canal de Ca^{2+} tipo L de retina (*CAV1.4*), los receptores purinérgicos *P2X7* y *P2Y2,12,13*, los canales *TRPV3,5,6* y *TRPM6*, y los moduladores *SEPTIN4* y *MICU3*.
12. El análisis transcriptómico global de grupos de genes indica un fuerte parecido transcriptómico entre los glioblastomas, los tumores de pulmón, mama y cáncer de cuello de útero.

VII. REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Alder, J. K., & Armanios, M. (2022). TELOMERE-MEDIATED LUNG DISEASE. *Physiological Reviews*, 102(4), 1703–1720. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00046.2021>
- Alle, Q., Borgne, E. Le, Milhavet, O., & Lemaitre, J. M. (2021). Reprogramming: Emerging Strategies to Rejuvenate Aging Cells and Tissues. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3990, 22(8), 3990. <https://doi.org/10.3390/IJMS22083990>
- Alptekin, M., Eroglu, S., Tutar, E., Sencan, S., Geyik, M. A., Ulasli, M., Demiryurek, A. T., & Camci, C. (2015). Gene expressions of TRP channels in glioblastoma multiforme and relation with survival. *Tumor Biology*, 36(12), 9209–9213. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-3577-X/FIGURES/2>
- Amorim, J. A., Coppotelli, G., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., Ross, J. M., & Sinclair, D. A. (2022). Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nature Reviews Endocrinology* 2022 18:4, 18(4), 243–258. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00626-7>
- Arif, T., Krelm, Y., Nakdimon, I., Benharroch, D., Paul, A., Dadon-Klein, D., & Shoshan-Barmatz, V. (2017). VDAC1 is a molecular target in glioblastoma, with its depletion leading to reprogrammed metabolism and reversed oncogenic properties. *Neuro-Oncology*, 19(7), 951. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOW297>
- Arispe, N., Rojas, E., & Pollard, H. B. (1993). Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), 567–571. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.2.567>
- Arnsten, A. F. T., Datta, D., Del Tredici, K., & Braak, H. (2021). Hypothesis: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 17(1), 115. <https://doi.org/10.1002/ALZ.12192>
- Baker, M. R., Fan, G., Arige, V., Yule, D. I., & Serysheva, I. I. (2023). Understanding IP3R channels: From structural underpinnings to ligand-dependent conformational landscape. *Cell Calcium*, 114, 102770. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2023.102770>
- Banker, G. A., & Cowan, W. M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Research*, 126(3), 397–425. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)90594-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)90594-7)
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 52, 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2015.06.008>
- Bernabeu-Zornoza, A., Coronel, R., Palmer, C., Monteagudo, M., Zambrano, A., & Liste, I. (2019). Physiological and pathological effects of amyloid- β species in neural stem cell biology. *Neural Regeneration Research*, 14(12), 2035. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.262571>

- Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A. M., Ayuso, E., Bosch, F., & Blasco, M. A. (2012). Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Molecular Medicine*, 4(8), 691–704. <https://doi.org/10.1002/EMMM.201200245>
- Berridge, M. J. (2010a). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 459(3), 441–449. <https://doi.org/10.1007/S00424-009-0736-1/FIGURES/3>
- Berridge, M. J. (2010b). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 459(3), 441–449. <https://doi.org/10.1007/S00424-009-0736-1/FIGURES/3>
- Berridge, M. J., & Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984 312:5992, 312(5992), 315–321. <https://doi.org/10.1038/312315a0>
- Berrocal, M., Marcos, D., Sepúlveda, M. R., Pérez, M., Ávila, J., & Mata, A. M. (2009). Altered Ca²⁺ dependence of synaptosomal plasma membrane Ca²⁺-ATPase in human brain affected by Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 23(6), 1826–1834. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-121459>
- Bioconductor - *affycoretools*. (n.d.). Retrieved December 7, 2023, from <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/affycoretools.html>
- Bioconductor - *genefilter*. (n.d.). Retrieved December 7, 2023, from <https://bioconductor.riken.jp/packages/3.13/bioc/html/genefilter.html>
- Bioconductor - *oligoClasses*. (n.d.). Retrieved December 7, 2023, from <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/oligoClasses.html>
- Bliss, T. V. P., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31–39. <https://doi.org/10.1038/361031A0>
- Bobkova, N. V., Evgen'ev, M., Garbuz, D. G., Kulikov, A. M., Morozov, A., Samokhin, A., Velmeshev, D., Medvinskaya, N., Nesterova, I., Pollock, A., & Nudler, E. (2015). Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(52), 16006–16011. https://doi.org/10.1073/PNAS.1516131112/SUPPL_FILE/PNAS.201516131SI.PDF
- Boczek, T., Radzik, T., Ferenc, B., & Zylinska, L. (2019a). The Puzzling Role of Neuron-Specific PMCA Isoforms in the Aging Process. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 6338, 20(24), 6338. <https://doi.org/10.3390/IJMS20246338>
- Boczek, T., Radzik, T., Ferenc, B., & Zylinska, L. (2019b). The Puzzling Role of Neuron-Specific PMCA Isoforms in the Aging Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/IJMS20246338>
- Bolstad, B. (2003). *Low-level Analysis of High-density Oligonucleotide Array Data: Background, Normalization and Summarization*.

- Bolstad, B. (2008). Preprocessing and Normalization for Affymetrix GeneChip Expression Microarrays. *Methods in Microarray Normalization*, 41–59. <https://doi.org/10.1201/9781420052794.CH3>
- Bolstad, B. M., Collin, F., Brettschneider, J., Simpson, K., Cope, L., Irizarry, R. A., & Speed, T. P. (2005). Quality Assessment of Affymetrix GeneChip Data. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, 33–47. https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0_3
- Bomben, V. C., Turner, K. L., Barclay, T. T. C., & Sontheimer, H. (2011). Transient receptor potential canonical channels are essential for chemotactic migration of human malignant gliomas. *Journal of Cellular Physiology*, 226(7), 1879–1888. <https://doi.org/10.1002/jcp.22518>
- Bowen, D. M., Smith, C. B., White, P., & Davison, A. N. (1976). Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain : A Journal of Neurology*, 99(3), 459–496. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/99.3.459>
- Brandalise, F., Ramieri, M., Pastorelli, E., Priori, E. C., Ratto, D., Venuti, M. T., Roda, E., Talpo, F., & Rossi, P. (2023). Role of Na⁺/Ca²⁺ Exchanger (NCX) in Glioblastoma Cell Migration (In Vitro). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16). <https://doi.org/10.3390/IJMS241612673>
- Brettschneider, J., Bolstad, B., Collin, F., & Speed, T. (2007). Quality assessment for short oligonucleotide microarray data. *Technometrics*, 50(3), 241–264. <https://doi.org/10.1198/004017008000000334>
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., & Price, P. J. (1993). Rapid Communication Optimized Survival of Hippocampal Neurons in B27-Supplemented Neurobasalm, a New Serum-free Medium Combination. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 35567476).
- Britzolaki, A., Saurine, J., Klocke, B., & Pitychoutis, P. M. (2020). A Role for SERCA Pumps in the Neurobiology of Neuropsychiatric and Neurodegenerative Disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1131, 131–161. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_6/FIGURES/3
- Brouland, J. P., Gélébart, P., Kovács, T., Enouf, J., Grossmann, J., & Papp, B. (2005). The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *The American Journal of Pathology*, 167(1), 233–242. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62968-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62968-9)
- Burglen, L., Van Hoeymissen, E., Qebibo, L., Barth, M., Belnap, N., Boschann, F., Depienne, C., De Clercq, K., Douglas, A. G. L., Fitzgerald, M. P., Foulds, N., Garel, C., Helbig, I., Held, K., Horn, D., Janssen, A., Kaindle, A. M., Narayanan, V., Prager, C., ... Vriens, J. (2023). Gain-of-function variants in the ion channel gene TRPM3 underlie a spectrum of neurodevelopmental disorders. *ELife*, 12. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.81032>
- Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M., & Baker, D. J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 2018 562:7728, 562(7728), 578–582. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0543-y>

- Caballero, E., Calvo-Rodríguez, M., Gonzalo-Ruiz, A., Villalobos, C., & Núñez, L. (2016). A new procedure for amyloid β oligomers preparation enables the unambiguous testing of their effects on cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} entry and cell death in primary neurons. *Neuroscience Letters*, 612, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.11.041>
- Calvo, M., Sanz-Blasco, S., Caballero, E., Villalobos, C., & Núñez, L. (2015). Susceptibility to excitotoxicity in aged hippocampal cultures and neuroprotection by non-steroidal anti-inflammatory drugs: role of mitochondrial calcium. *Journal of Neurochemistry*, 132(4), 403–417. <https://doi.org/10.1111/JNC.13004>
- Calvo-Rodríguez, M., García-Durillo, M., Villalobos, C., & Núñez, L. (2016a). In vitro aging promotes endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria Ca^{2+} cross talk and loss of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in rat hippocampal neurons. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(11), 2637–2649. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.08.001>
- Calvo-Rodríguez, M., García-Durillo, M., Villalobos, C., & Núñez, L. (2016b). In vitro aging promotes endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria Ca^{2+} cross talk and loss of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in rat hippocampal neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(11), 2637–2649. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.08.001>
- Calvo-Rodriguez, M., Hernando-Pérez, E., López-Vázquez, S., Núñez, J., Villalobos, C., & Núñez, L. (2020). Remodeling of intracellular Ca^{2+} homeostasis in rat hippocampal neurons aged in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041549>
- Calvo-Rodriguez, M., Hernando-Perez, E., Nuñez, L., & Villalobos, C. (2019). Amyloid β oligomers increase ER-mitochondria Ca^{2+} cross talk in young hippocampal neurons and exacerbate aging-induced intracellular Ca^{2+} remodeling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00022>
- Calvo-Rodríguez, M., Villalobos, C., & Nuñez, L. (2015). Fluorescence and Bioluminescence Imaging of Subcellular Ca^{2+} in Aged Hippocampal Neurons. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2015(106). <https://doi.org/10.3791/53330>
- Camara, A. K. S., Zhou, Y. F., Wen, P. C., Tajkhorshid, E., & Kwok, W. M. (2017). Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *Frontiers in Physiology*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00460>
- Cárdenas, C., Miller, R. A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K. H., Yang, J., Parker, I., Thompson, C. B., Birnbaum, M. J., Hallows, K. R., & Foskett, J. K. (2010). Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP_3 receptor Ca^{2+} transfer to mitochondria. *Cell*, 142(2), 270–283. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.06.007>
- Carvalho, B. S., & Irizarry, R. A. (2010). A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(19), 2363–2367. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ431>
- Castiglioni, S., Cazzaniga, A., Trapani, V., Cappadone, C., Farruggia, G., Merolle, L., Wolf, F. I., Iotti, S., & Maier, J. A. M. (2015). Magnesium homeostasis in colon carcinoma LoVo

- cells sensitive or resistant to doxorubicin. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/SREP16538>
- Cavaliere, F., Nestola, V., Amadio, S., D'Ambrosi, N., Angelini, D. F., Sancesario, G., Bernardi, G., & Volonté, C. (2005). The metabotropic P2Y₄ receptor participates in the commitment to differentiation and cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurobiology of Disease*, 18(1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2004.09.001>
- Chandran, R., Kumar, M., Kesavan, L., Sarah Jacob, R., Gunasekaran, S., Lakshmi, S., & Sadasivan, C. (2017). *Cellular calcium signaling in the aging brain*. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.11.008>
- Chang, H. H., Cheng, Y. C., Tsai, W. C., Tsao, M. J., & Chen, Y. (2018). Pyr3 Induces Apoptosis and Inhibits Migration in Human Glioblastoma Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 48(4), 1694–1702. <https://doi.org/10.1159/000492293>
- Chen, Z. R., Huang, J. B., Yang, S. L., & Hong, F. F. (2022). Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 1816, 27(6), 1816. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27061816>
- Chigurupati, S., Venkataraman, R., Barrera, D., Naganathan, A., Madan, M., Paul, L., Pattisapu, J. V., Kyriazis, G. A., Sugaya, K., Bushnev, S., Lathia, J. D., Rich, J. N., & Chan, S. L. (2010). Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Research*, 70(1), 418–427. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2654>
- Chinigò, G., Castel, H., Chever, O., & Gkika, D. (2021a). TRP Channels in Brain Tumors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.617801>
- Chinigò, G., Castel, H., Chever, O., & Gkika, D. (2021b). TRP Channels in Brain Tumors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 617801. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.617801/BIBTEX>
- Chovancova, B., Liskova, V., Babula, P., & Krizanova, O. (2020). Role of Sodium/Calcium Exchangers in Tumors. *Biomolecules*, 10(9), 1–10. <https://doi.org/10.3390/BIOM10091257>
- Christodoulou, P., Yiallouris, A., Michail, A., Christodoulou, M. I., Politis, P. K., & Patrikios, I. (2021). Altered SERCA Expression in Breast Cancer. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(10). <https://doi.org/10.3390/MEDICINA57101074>
- Chung, F. Y., Lin, S. R., Lu, C. Y., Yeh, C. S., Chen, F. M., Hsieh, J. S., Huang, T. J., & Wang, J. Y. (2006). Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2 expression as a tumor marker in colorectal cancer. *The American Journal of Surgical Pathology*, 30(8), 969–974. <https://doi.org/10.1097/00000478-200608000-00006>
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2004 426:6966, 426(6966), 517–524. <https://doi.org/10.1038/nature02196>
- Collins, H. E., Zhang, D., & Chatham, J. C. (2022). STIM and Orai Mediated Regulation of Calcium Signaling in Age-Related Diseases. *Frontiers in Aging*, 3, 876785. <https://doi.org/10.3389/FRAGI.2022.876785/BIBTEX>

- Conejero-Goldberg, C., Davies, P., & Ulloa, L. (2007). *Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor: A link between inflammation and neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.10.007>
- Connolly, D., Abdesselam, I., Verdier-Pinard, P., & Montagna, C. (2011). Septin roles in tumorigenesis. *Biological Chemistry*, 392(8–9), 725–738. <https://doi.org/10.1515/BC.2011.073/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., & Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5123), 921–923. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8346443>
- Cuddapah, V. A., Turner, K. L., & Sontheimer, H. (2013). Calcium entry via TRPC1 channels activates chloride currents in human glioma cells. *Cell Calcium*, 53(3), 187–194. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2012.11.013>
- Curry, M. C., Luk, N. A., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2012). Distinct regulation of cytoplasmic calcium signals and cell death pathways by different plasma membrane calcium ATPase isoforms in MDA-MB-231 breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(34), 28598–28608. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.364737>
- Dai, J. Y., Wang, B., Wang, X., Cheng, A., Kolb, S., Stanford, J. L., & Wright, J. L. (2019). Vigorous Physical Activity Is Associated with Lower Risk of Metastatic-Lethal Progression in Prostate Cancer and Hypomethylation in the CRACR2A Gene. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 28(2), 258–264. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-0622>
- Dang, D., & Rao, R. (2016). Calcium-ATPases: Gene disorders and dysregulation in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1344–1350. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2015.11.016>
- D'Angelo, D., & Rizzuto, R. (2023a). The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): Molecular Identity and Role in Human Diseases. *Biomolecules*, 13(9), 1304. <https://doi.org/10.3390/BIOM13091304>
- D'Angelo, D., & Rizzuto, R. (2023b). The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): Molecular Identity and Role in Human Diseases. *Biomolecules* 2023, Vol. 13, Page 1304, 13(9), 1304. <https://doi.org/10.3390/BIOM13091304>
- Davies, P., & Maloney, A. J. F. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 2(8000), 1403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91936-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91936-X)
- Deak, F., & Sonntag, W. E. (2012). Aging, Synaptic Dysfunction, and Insulin-Like Growth Factor (IGF)-1. *The Journals of Gerontology: Series A*, 67A(6), 611–625. <https://doi.org/10.1093/GERONA/GLS118>
- Delierneux, C., Kouba, S., Shanmughapriya, S., Potier-Cartereau, M., Trebak, M., & Hempel, N. (2020). Mitochondrial Calcium Regulation of Redox Signaling in Cancer. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/CELLS9020432>

- Demuro, A., Mina, E., Kayed, R., Milton, S. C., Parker, I., & Glabe, C. G. (2005). Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17294–17300. <https://doi.org/10.1074/JBC.M500997200>
- Deretic, V., & Kroemer, G. (2022). Autophagy in metabolism and quality control: opposing, complementary or interlinked functions? *Autophagy*, 18(2), 283–292. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1933742>
- Dhillon, S. (2021). Aducanumab: First Approval. *Drugs*, 81(12), 1437–1443. <https://doi.org/10.1007/S40265-021-01569-Z>
- Diering, G. H., & Huganir, R. L. (2018). The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron*, 100(2), 314–329. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.10.018>
- Ding, W., Zhou, X., Jiang, G., Xu, W., Long, S., Xiao, F., Liao, Y., & Liu, J. (2022). Identification of Prognostic Biomarkers of Glioblastoma Based on Multidatabase Integration and Its Correlation with Immune-Infiltration Cells. *Journal of Oncology*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3909030>
- Ding, X., He, Z., Zhou, K., Cheng, J., Yao, H., Lu, D., Cai, R., Jin, Y., Dong, B., Xu, Y., & Wang, Y. (2010). Essential role of TRPC6 channels in G2/M phase transition and development of human glioma. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(14), 1052–1068. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJQ217>
- Djillani, A., Doignon, I., Luyten, T., Lamkhioued, B., Gangloff, S. C., Parys, J. B., Nüße, O., Chomienne, C., & Dellis, O. (2015). Potentiation of the store-operated calcium entry (SOCE) induces phytohemagglutinin-activated Jurkat T cell apoptosis. *Cell Calcium*, 58(2), 171–185. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2015.04.005>
- Drachman, D. A., & Leavitt, J. (1974). Human Memory and the Cholinergic System: A Relationship to Aging? *Archives of Neurology*, 30(2), 113–121. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.1974.00490320001001>
- Dreses-Werringloer, U., Lambert, J. C., Vingtdoux, V., Zhao, H., Vais, H., Siebert, A., Jain, A., Koppel, J., Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Pasquier, F., Galimberti, D., Scarpini, E., Mann, D., Lendon, C., Campion, D., Amouyel, P., Davies, P., Fosskett, J. K., ... Marambaud, P. (2008). A polymorphism in CALHM1 influences Ca²⁺ homeostasis, Abeta levels, and Alzheimer's disease risk. *Cell*, 133(7), 1149–1161. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.05.048>
- Dyment, D., Lines, M., & Innes, A. M. (2023). TRPM3-Related Neurodevelopmental Disorder. *GeneReviews*®. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589387/>
- Egan, M. F., Kost, J., Voss, T., Mukai, Y., Aisen, P. S., Cummings, J. L., Tariot, P. N., Vellas, B., van Dyck, C. H., Boada, M., Zhang, Y., Li, W., Furtek, C., Mahoney, E., Harper Mozley, L., Mo, Y., Sur, C., & Michelson, D. (2019). Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 380(15), 1408–1420. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1812840/SUPPL_FILE/NEJMOA1812840_DATA-SHARING.PDF

- Egorova, P. A., & Bezprozvanny, I. B. (2018). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and neurodegenerative disorders. *The FEBS Journal*, 285(19), 3547–3565. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14366>
- Ehsani, S., & Ehsani, S. (2022). *New Horizons in Studying the Cellular Mechanisms of Alzheimer's Disease*. 51–88. https://doi.org/10.1007/978-3-030-99838-7_4
- Endo, Y., Uzawa, K., Mochida, Y., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., & Tanzawa, H. (2004). Sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase type 2 downregulated in human oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 110(2), 225–231. <https://doi.org/10.1002/IJC.20118>
- Fa, M., Orozco, I. J., Francis, Y. I., Saeed, F., Gong, Y., & Arancio, O. (2010). Preparation of oligomeric beta-amyloid 1-42 and induction of synaptic plasticity impairment on hippocampal slices. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 41. <https://doi.org/10.3791/1884>
- Fan, L., Li, A., Li, W., Cai, P., Yang, B., Zhang, M., Gu, Y., Shu, Y., Sun, Y., Shen, Y., Wu, X., Hu, G., Wu, X., & Xu, Q. (2014). Novel role of Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 in development of colorectal cancer and its regulation by F36, a curcumin analog. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 68(8), 1141–1148. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2014.10.014>
- Feng, J. M., Hu, Y. K., Xie, L. H., Colwell, C. S., Shao, X. M., Sun, X. P., Chen, B., Tang, H., & Campagnoni, A. T. (2006). Golli Protein Negatively Regulates Store Depletion-Induced Calcium Influx in T Cells. *Immunity*, 24(6), 717–727. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2006.04.007>
- Feng, M., Grice, D. M., Faddy, H. M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., Muend, S., Kenny, P. A., Sukumar, S., Roberts-Thomson, S. J., Monteith, G. R., & Rao, R. (2010). Store-Independent Activation of Orai1 by SPCA2 in Mammary Tumors. *Cell*, 143(1), 84. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.08.040>
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J. M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C. M., Herbig, U., Longhese, M. P., & Di Fagagna, F. D. A. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology*, 14(4), 355–365. <https://doi.org/10.1038/NCB2466>
- Gackière, F., Bidaux, G., Delcourt, P., Van Coppenolle, F., Katsogiannou, M., Dewailly, E., Bavencoffe, A., Van Chuoi-Mariot, M. T., Mauroy, B., Prevarskaya, N., & Mariot, P. (2008). CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 10162–10173. <https://doi.org/10.1074/JBC.M707159200>
- Galeano-Otero, I., Del Toro, R., Khatib, A. M., Rosado, J. A., Ordóñez-Fernández, A., & Smani, T. (2021). SARAF and Orai1 Contribute to Endothelial Cell Activation and Angiogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.639952>

- Gallardo, G., & Holtzman, D. M. (2019). Amyloid- β and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1184, 187–203. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_16/FIGURES/1
- García-Gaytán, A. C., Hernández-Abrego, A., Díaz-Muñoz, M., & Méndez, I. (2022). Glutamatergic system components as potential biomarkers and therapeutic targets in cancer in non-neural organs. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1029210. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2022.1029210/BIBTEX>
- Gardam, B., Gargett, T., Brown, M. P., & Ebert, L. M. (2023). Targeting the dendritic cell-T cell axis to develop effective immunotherapies for glioblastoma. *Frontiers in Immunology*, 14, 1261257. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1261257>
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M., & Irizarry, R. A. (2004). affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20(3), 307–315. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTG405>
- Geistlinger, L., Csaba, G., & Zimmer, R. (2016). Bioconductor's EnrichmentBrowser: seamless navigation through combined results of set- & network-based enrichment analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S12859-016-0884-1>
- Gerriets, V., & Kasi, A. (2022). Bevacizumab. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482126/>
- Giorgi, C., Baldassari, F., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Rimessi, A., Suski, J. M., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2012). Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis. *Cell Calcium*, 52(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2012.02.008>
- Godoy, J. A., Rios, J. A., Picón-Pagès, P., Herrera-Fernández, V., Swaby, B., Crepin, G., Vicente, R., Fernández-Fernández, J. M., & Muñoz, F. J. (2021). Mitostasis, Calcium and Free Radicals in Health, Aging and Neurodegeneration. *Biomolecules*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/BIOM11071012>
- Gomez, W., Morales, R., Maracaja-Coutinho, V., Parra, V., & Nassif, M. (2020). Down syndrome and Alzheimer's disease: common molecular traits beyond the amyloid precursor protein. *Aging*, 12(1), 1011–1033. <https://doi.org/10.18632/AGING.102677>
- Gray, D. A., & Woulfe, J. (2005). *Lipofuscin and Aging: A Matter of Toxic Waste*. <http://sageke.sciencemag.org/cgi/content/full/2005/5/re1>
- Green, K. N., Demuro, A., Akbari, Y., Hitt, B. D., Smith, I. F., Parker, I., & LaFerla, F. M. (2008). SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid β production. *Journal of Cell Biology*, 181(7), 1107–1116. <https://doi.org/10.1083/JCB.200706171/VIDEO-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. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83641-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83641-4)
- Guo, L. H., Trautmann, K., & Schluesener, H. J. (2004). Expression of P2X₄ receptor in rat C6 glioma by tumor-associated macrophages and activated microglia. *Journal of*

- Neuroimmunology*, 152(1–2), 67–72.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.04.005>
- Gurkoff, G., Shahlaie, K., Lyeth, B., & Berman, R. (2013). Voltage-Gated Calcium Channel Antagonists and Traumatic Brain Injury. *Pharmaceuticals* 2013, Vol. 6, Pages 788–812, 6(7), 788–812. <https://doi.org/10.3390/PH6070788>
- 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 the United States of America*, 94(7), 3064–3069. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.7.3064>
- Hajieva, P., Bayatti, N., Granold, M., Behl, C., & Moosmann, B. (2015). Membrane protein oxidation determines neuronal degeneration. *Journal of Neurochemistry*, 133(3), 352–367. <https://doi.org/10.1111/jnc.12987>
- Hampel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer’s disease. *Brain*, 141(7), 1917–1933. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWY132>
- Han, J. W., Heo, W., Lee, D., Kang, C., Kim, H. Y., Jun, I., So, I., Hur, H., Lee, M. G., Jung, M., & Kim, J. Y. (2021). Plasma membrane localized gcamp-ms4a12 by orai1 co-expression shows thapsigargin-and ca2+-dependent fluorescence increases. *Molecules and Cells*, 44(4), 223–232. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2021.2031>
- Han, J., Zhang, X., Liu, Y., Jing, L., Liu, Y. B., & Feng, L. (2020). CLCA4 and MS4A12 as the significant gene biomarkers of primary colorectal cancer. *Bioscience Reports*, 40(8). <https://doi.org/10.1042/BSR20200963>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer’s disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184–185. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1566067/ASSET/74A758CB-215F-4A8E-9AAA-05F4D89DA62A/ASSETS/SCIENCE.1566067.FP.PNG>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- He, L., Deng, H. Y., & Wang, X. C. (2017). Decreased expression of MS4A12 inhibits differentiation and predicts early stage survival in colon cancer. *Neoplasma*, 64(1), 65–73. https://doi.org/10.4149/NEO_2017_108
- Hernández-Morales, M., Sobradillo, D., Valero, R. A., Muñoz, E., Ubierna, D., Moyer, M. P., Núñez, L., & Villalobos, C. (2017a). Mitochondria sustain store-operated currents in colon cancer cells but not in normal colonic cells: reversal by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Oncotarget*, 8(33), 55332. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.19430>

- Hernández-Morales, M., Sobradillo, D., Valero, R. A., Muñoz, E., Ubierna, D., Moyer, M. P., Núñez, L., & Villalobos, C. (2017b). Mitochondria sustain store-operated currents in colon cancer cells but not in normal colonic cells: reversal by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Oncotarget*, 8(33), 55332. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.19430>
- Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F. D. M., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J., & Passos, J. F. (2012). Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nature Communications*, 3. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS1708>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA0804615>
- Holzmann, C., Kilch, T., Kappel, S., Dörr, K., Jung, V., Stöckle, M., Bogen, I., & Peinelt, C. (2015). Differential Redox Regulation of Ca^{2+} Signaling and Viability in Normal and Malignant Prostate Cells. *Biophysical Journal*, 109(7), 1410–1419. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2015.08.006>
- Hou, P. F., Liu, Z. H., Li, N., Cheng, W. J., & Guo, S. W. (2015). Knockdown of STIM1 improves neuronal survival after traumatic neuronal injury through regulating mGluR1-dependent Ca^{2+} signaling in mouse cortical neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(2), 283–292. <https://doi.org/10.1007/S10571-014-0123-0>
- Hu, H. J., Wang, S. S., Wang, Y. X., Liu, Y., Feng, X. M., Shen, Y., Zhu, L., Chen, H. Z., & Song, M. (2019). Blockade of the forward $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger suppresses the growth of glioblastoma cells through Ca^{2+} -mediated cell death. *British Journal of Pharmacology*, 176(15), 2691–2707. <https://doi.org/10.1111/BPH.14692>
- Huang, J., Liu, F., Liu, Z., Tang, H., Wu, H., Gong, Q., & Chen, J. (2017). Immune Checkpoint in Glioblastoma: Promising and Challenging. *Frontiers in Pharmacology*, 8(MAY), 242. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00242>
- Huntula, S., Saegusa, H., Wang, X., Zong, S., & Tanabe, T. (2019). Involvement of N-type Ca^{2+} channel in microglial activation and its implications to aging-induced exaggerated cytokine response. *Cell Calcium*, 82, 102059. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2019.102059>
- Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B., & Speed, T. P. (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Research*, 31(4), e15. <https://doi.org/10.1093/NAR/GNG015>
- Ishiuchi, S., Yoshida, Y., Sugawara, K., Aihara, M., Ohtani, T., Watanabe, T., Saito, N., Tsuzuki, K., Okado, H., Miwa, A., Nakazato, Y., & Ozawa, S. (2007). Ca^{2+} -permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation. *Soc NeuroscienceS Ishiuchi, Y Yoshida, K Sugawara, M Aihara, T Ohtani, T Watanabe, N Saito, K TsuzukiJournal of Neuroscience, 2007•Soc Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2180-07.2007>
- Itkin, A., Dupres, V., Dufrêne, Y. F., Bechinger, B., Ruysschaert, J. M., & Raussens, V. (2011). Calcium ions promote formation of amyloid β -peptide (1-40) oligomers causally

- implicated in neuronal toxicity of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0018250>
- Jadiya, P., Kolmetzky, D. W., Tomar, D., Di Meco, A., Lombardi, A. A., Lambert, J. P., Luongo, T. S., Ludtmann, M. H., Praticò, D., & Elrod, J. W. (2019). Impaired mitochondrial calcium efflux contributes to disease progression in models of Alzheimer's disease. *Nature Communications* 2019 10:1, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11813-6>
- Jaskelioff, M., Muller, F. L., Paik, J. H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A. C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., Horner, J. W., Maratos-Flier, E., & Depinho, R. A. (2010). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 2010 469:7328, 469(7328), 102–106. <https://doi.org/10.1038/nature09603>
- Jeon, T. W., Yang, H., Lee, C. G., Oh, S. T., Seo, D., Baik, I. H., Lee, E. H., Yun, I., Park, K. R., & Lee, Y. H. (2016). Electro-hyperthermia up-regulates tumour suppressor Septin 4 to induce apoptotic cell death in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Hyperthermia*, 32(6), 648–656. <https://doi.org/10.1080/02656736.2016.1186290>
- Ji, Z., Xie, Y., Guan, Y., Zhang, Y., Cho, K. S., Ji, M., & You, Y. (2018). Involvement of P2X7 Receptor in Proliferation and Migration of Human Glioma Cells. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8591397>
- Jia, Z. F., Huang, Q., Kang, C. S., Yang, W. D., Wang, G. X., Yu, S. Z., Jiang, H., & Pu, P. Y. (2010). Overexpression of septin 7 suppresses glioma cell growth. *Journal of Neuro-Oncology*, 98(3), 329–340. <https://doi.org/10.1007/S11060-009-0092-1/FIGURES/7>
- Jiang, L. H., Li, X., Syed Mortadza, S. A., Lovatt, M., & Yang, W. (2018). The TRPM2 channel nexus from oxidative damage to Alzheimer's pathologies: An emerging novel intervention target for age-related dementia. *Ageing Research Reviews*, 47, 67–79. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2018.07.002>
- Johnson, G. A., Krishnamoorthy, R. R., & Stankowska, D. L. (2023). Modulating mitochondrial calcium channels (TRPM2/MCU/NCX) as a therapeutic strategy for neurodegenerative disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 1202167. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2023.1202167/BIBTEX>
- Jones, C. K., Byun, N., & Bubser, M. (2011). Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2011 37:1, 37(1), 16–42. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.199>
- Kadavath, H., Hofele, R. V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24), 7501–7506. https://doi.org/10.1073/PNAS.1504081112/SUPPL_FILE/PNAS.1504081112.SAPP.PDF
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478).

- https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAU6977/ASSET/F5050DD7-9124-4A75-9FBE-2BCDF3F27CD8/ASSETS/GRAPHIC/367_AAU6977_F6.JPEG
- Kang, S., Hong, J., Lee, J. M., Moon, H. E., Jeon, B., Choi, J., Yoon, N. A., Paek, S. H., Roh, E. J., Lee, C. J., & Kang, S. S. (2017). Trifluoperazine, a well-known antipsychotic, inhibits glioblastoma invasion by binding to calmodulin and disinhibiting calcium release channel IP3R. *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(1), 217–227. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0169-T/86670/AM/TRIFLUOPERAZINE-A-WELL-KNOWN-ANTIPSYCHOTIC>
- Kang, S. S., Han, K. S., Ku, B. M., Lee, Y. K., Hong, J., Shin, H. Y., Almonte, A. G., Woo, D. H., Brat, D. J., Hwang, E. M., Yoo, S. H., Chung, C. K., Park, S. H., Paek, S. H., Roh, E. J., Lee, S. J., Park, J. Y., Traynelis, S. F., & Lee, C. J. (2010). Caffeine-mediated inhibition of calcium release channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype 3 blocks glioblastoma invasion and extends survival. *Cancer Research*, 70(3), 1173–1183. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2886/655723/P/CAFFEINE-MEDIATED-INHIBITION-OF-CALCIUM-RELEASE>
- Kashio, M., & Tominaga, M. (2023). Role of novel de novo gain-of-function TRPM3 mutations in a spectrum of neurodevelopmental disorders. *Cell Calcium*, 110, 102704. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2023.102704>
- Katoshevski, T., Ben-Kasus Nissim, T., & Sekler, I. (2021). Recent studies on NCLX in health and diseases. *Cell Calcium*, 94, 102345. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2020.102345>
- Keimasi, M., Salehifard, K., Keimasi, M., Amirsadri, M., Esfahani, N. M. J., Moradmand, M., Esmaeili, F., & Mofid, M. R. (2023). Alleviation of cognitive deficits in a rat model of glutamate-induced excitotoxicity, using an N-type voltage-gated calcium channel ligand, extracted from Agelena labyrinthica crude venom. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16, 1123343. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2023.1123343>
- Kerkhofs, M., Seitaj, B., Ivanova, H., Monaco, G., Bultynck, G., & Parys, J. B. (2018). Pathophysiological consequences of isoform-specific IP3 receptor mutations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(11), 1707–1717. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.06.004>
- Khachaturian, Z. S. (1987). Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. *Neurobiology of Aging*, 8(4), 345–346. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(87\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0197-4580(87)90073-X)
- Khachaturian, Z. S. (1989). The role of calcium regulation in brain aging: reexamination of a hypothesis. *Aging (Milan, Italy)*, 1(1), 17–34. <https://doi.org/10.1007/BF03323872>
- Kim, S., & Rhim, H. (2011). Effects of Amyloid- β Peptides on Voltage-Gated L-Type Ca V 1.2 and Ca V 1.3 Ca²⁺ Channels. *Mol. Cells*, 32, 289–294. <https://doi.org/10.1007/s10059-011-0075-x>
- Kjonigsen, L. J., Leergaard, T. B., Witter, M. P., & Bjaalie, J. G. (2011). Digital atlas of anatomical subdivisions and boundaries of the rat hippocampal region. *Frontiers in Neuroinformatics*, 5, 8910. <https://doi.org/10.3389/FNINF.2011.00002/BIBTEX>

- Klein, W. L. (2002). A β toxicity in Alzheimer's disease: Globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochemistry International*, 41(5), 345–352. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00050-5)
- Klionsky, D. J., Petroni, G., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cadwell, K., Cecconi, F., Choi, A. M. K., Choi, M. E., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Deretic, V., Dikic, I., Elazar, Z., Eskelinen, E., ... Pietrocola, F. (2021). Autophagy in major human diseases. *The EMBO Journal*, 40(19). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108863>
- Klumpp, D., Frank, S. C., Klumpp, L., Sezgin, E. C., Eckert, M., Edalat, L., Bastmeyer, M., Zips, D., Ruth, P., & Huber, S. M. (2017). TRPM8 is required for survival and radioresistance of glioblastoma cells. *Oncotarget*, 8(56), 95896–95913. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.21436>
- Knopman, D. S. (2019). Lowering of Amyloid-Beta by β -Secretase Inhibitors - Some Informative Failures. *The New England Journal of Medicine*, 380(15), 1476–1478. <https://doi.org/10.1056/NEJME1903193>
- Komori, T. (2022). The 2021 WHO classification of tumors, 5th edition, central nervous system tumors: the 10 basic principles. *Brain Tumor Pathology*, 39(2), 47–50. <https://doi.org/10.1007/S10014-022-00428-3/TABLES/2>
- Koromina, M., Flitton, M., Mellor, I. R., & Knight, H. M. (2019). A kainate receptor GluK4 deletion, protective against bipolar disorder, is associated with enhanced cognitive performance across diagnoses in the TwinsUK cohort. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 20(5), 393–401. <https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1417637>
- Krogsaeter, E., Rosato, A. S., & Grimm, C. (2022). TRPMLs and TPCs: Targets for lysosomal storage and neurodegenerative disease therapy? *Cell Calcium*, 103, 102553. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2022.102553>
- Kukreja, L., Li, C. J., Ezhilan, S., Iyer, V. R., & Kuo, J. S. (2022). Emerging Epigenetic Therapies for Brain Tumors. *NeuroMolecular Medicine*, 24(1), 41–49. <https://doi.org/10.1007/S12017-021-08691-X/TABLES/1>
- Land, C. A., Musich, P. R., Haydar, D., Krenciute, G., & Xie, Q. (2020). Chimeric antigen receptor T-cell therapy in glioblastoma: charging the T cells to fight. *Journal of Translational Medicine* 2020 18:1, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12967-020-02598-0>
- Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., & Hamilton, S. L. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11), a003996. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A003996>
- Larriba, M. J., Ordóñez-Morán, P., Chicote, I., Martín-Fernández, G., Puig, I., Muñoz, A., & Palmer, H. G. (2011). Vitamin D receptor deficiency enhances Wnt/ β -catenin signaling and tumor burden in colon cancer. *PloS One*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0023524>
- Laurén, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., & Strittmatter, S. M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*, 457(7233), 1128–1132. <https://doi.org/10.1038/NATURE07761>

- Leclerc, C., Haeich, J., Aulestia, F. J., Kilhoffer, M. C., Miller, A. L., Néant, I., Webb, S. E., Schaeffer, E., Junier, M. P., Chneiweiss, H., & Moreau, M. (2016). Calcium signaling orchestrates glioblastoma development: Facts and conjunctures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1447–1459. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.01.018>
- Lefranc, F. (2021). Transient Receptor Potential (TRP) Ion Channels Involved in Malignant Glioma Cell Death and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.618961>
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., ... Jones, A. R. (2006). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 2006 445:7124, 445(7124), 168–176. <https://doi.org/10.1038/nature05453>
- Leinekugel, X., Medina, I., Khalilov, I., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (1997). Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron*, 18(2), 243–255. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80265-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80265-2)
- Li, G., Zhang, Z., Wang, R., Ma, W., Yang, Y., Wei, J., & Wei, Y. (2013). Suppression of STIM1 inhibits human glioblastoma cell proliferation and induces G0/G1 phase arrest. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 32(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-20/FIGURES/5>
- Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N. E., Shankar, G. M., & Selkoe, D. J. (2011). Soluble Aβ Oligomers Inhibit Long-Term Potentiation through a Mechanism Involving Excessive Activation of Extrasynaptic NR2B-Containing NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 31(18), 6627. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0203-11.2011>
- Li, S., Wang, J., Wei, Y., Liu, Y., Ding, X., Dong, B., Xu, Y., & Wang, Y. (2015). Crucial role of TRPC6 in maintaining the stability of HIF-1α in glioma cells under hypoxia. *Journal of Cell Science*, 128(17), 3317–3329. <https://doi.org/10.1242/JCS.173161>
- Liu, C., Wang, X., Wang, S., Xiang, J., Xie, H., Tan, Z., Li, X., Zhang, J., & Dong, W. (2023). Comprehensive analysis of P2Y family genes expression, immune characteristics, and prognosis in pan-cancer. *Translational Oncology*, 37. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2023.101776>
- Liu, H., Hughes, J. D., Rollins, S., Chen, B., & Perkins, E. (2011a). Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Experimental and Molecular Pathology*, 91(3), 753–760. <https://doi.org/10.1016/J.YEXMP.2011.09.005>
- Liu, H., Hughes, J. D., Rollins, S., Chen, B., & Perkins, E. (2011b). Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Experimental and Molecular Pathology*, 91(3), 753–760. <https://doi.org/10.1016/J.YEXMP.2011.09.005>
- Liu, M., Inoue, K., Leng, T., Guo, S., & Xiong, Z. gang. (2014). TRPM7 channels regulate glioma stem cell through STAT3 and Notch signaling pathways. *Cellular Signalling*, 26(12), 2773–2781. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2014.08.020>

- Llinas, R., & Moreno, H. (2017). Perspective on calcium and Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 13(2), 196–197. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2017.01.004>
- Lonchamp, E., Dupont, J. L., Doussau, F., Shin, H. S., Poulain, B., & Bossu, J. L. (2009). Deletion of Cav2.1(α 1A) subunit of Ca²⁺-channels impairs synaptic GABA and glutamate release in the mouse cerebellar cortex in cultured slices. *European Journal of Neuroscience*, 30(12), 2293–2307. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2009.07023.X>
- Lopez, J. J., Albarran, L., Gómez, L. J., Smani, T., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2016a). Molecular modulators of store-operated calcium entry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(8), 2037–2043. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.04.024>
- Lopez, J. J., Albarran, L., Gómez, L. J., Smani, T., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2016b). Molecular modulators of store-operated calcium entry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(8), 2037–2043. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.04.024>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2013.05.039>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023a). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243–278. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.11.001>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023b). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243–278. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.11.001>
- López-Otín, C., & Kroemer, G. (2021). Hallmarks of Health. *Cell*, 184(1), 33–63. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.11.034>
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/S00401-016-1545-1/TABLES/5>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Lowry, E. R., Kruyer, A., Norris, E. H., Cederroth, C. R., & Strickland, S. (2013). The GluK4 kainate receptor subunit regulates memory, mood, and excitotoxic neurodegeneration. *Neuroscience*, 235, 215–225. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.01.029>
- Ma, H., Cohen, S., Li, B., & Tsien, R. W. (2012). Exploring the dominant role of Cav1 channels in signalling to the nucleus. *Bioscience Reports*, 33(1), 97–101. <https://doi.org/10.1042/BSR20120099>

- MacNee, W., Rabinovich, R. A., Choudhury, G., Fabbri, M., Drazen, J., & Respir, E. (2014). Ageing and the border between health and disease. *European Respiratory Journal*, 44(5), 1332–1352. <https://doi.org/10.1183/09031936.00134014>
- Maklad, A., Sharma, A., & Azimi, I. (2019). Calcium Signaling in Brain Cancers: Roles and Therapeutic Targeting. *Cancers* 2019, Vol. 11, Page 145, 11(2), 145. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11020145>
- Mark, R. J., Pang, Z., Geddes, J. W., Uchida, K., & Mattson, M. P. (1997). Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(3), 1046–1054. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-03-01046.1997>
- Masson, B., Montani, D., Humbert, M., Capuano, V., & Antigny, F. (2021). Role of Store-Operated Ca²⁺ Entry in the Pulmonary Vascular Remodeling Occurring in Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 1781, 11(12), 1781. <https://doi.org/10.3390/BIOM11121781>
- Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000), 631–639. <https://doi.org/10.1038/NATURE02621>
- Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I., & Rydel, R. E. (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(2), 376–389. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-02-00376.1992>
- Matyśniak, D., Nowak, N., Chumak, V., & Pomorski, P. (2020). P2X7 receptor activity landscape in rat and human glioma cell lines. *Acta Biochimica Polonica*, 67(1), 7–14. https://doi.org/10.18388/ABP.2020_2848
- Menzies, R. I., Tam, F. W., Unwin, R. J., & Bailey, M. A. (2017). Purinergic signaling in kidney disease. *Kidney International*, 91(2), 315–323. <https://doi.org/10.1016/J.KINT.2016.08.029>
- Merighi, S., Poloni, T. E., Terrazzan, A., Moretti, E., Gessi, S., & Ferrari, D. (2021). Alzheimer and Purinergic Signaling: Just a Matter of Inflammation? *Cells* 2021, Vol. 10, Page 1267, 10(5), 1267. <https://doi.org/10.3390/CELLS10051267>
- Mesquita, G., Prevarskaya, N., Schwab, A., & Lehen'kyi, V. (2021). Role of the TRP Channels in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Development and Progression. *Cells*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/CELLS10051021>
- Meyer, K., López-Domínguez, J. A., Maus, M., Kovatcheva, M., & Serrano, M. (2022). Senescence as a therapeutic target: current state and future challenges. *Cellular Senescence in Disease*, 425–442. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822514-1.00014-6>
- Mishra, S., Knupp, A., Szabo, M. P., Williams, C. A., Kinoshita, C., Hailey, D. W., Wang, Y., Andersen, O. M., & Young, J. E. (2022). The Alzheimer's gene SORL1 is a regulator of endosomal traffic and recycling in human neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 79(3). <https://doi.org/10.1007/S00018-022-04182-9>

- Moccia, F., Zuccolo, E., Soda, T., Tanzi, F., Guerra, G., Mapelli, L., Lodola, F., & D'angelo, E. (2015). Stim and Orai proteins in neuronal Ca²⁺ signaling and excitability. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2015.00153>
- Modesti, L., Danese, A., Vitto, V. A. M., Ramaccini, D., Aguiari, G., Gafà, R., Lanza, G., Giorgi, C., & Pinton, P. (2021). Mitochondrial Ca²⁺ Signaling in Health, Disease and Therapy. *Cells* 2021, Vol. 10, Page 1317, 10(6), 1317. <https://doi.org/10.3390/CELLS10061317>
- Møller, H. G., Rasmussen, A. P., Andersen, H. H., Johnsen, K. B., Henriksen, M., & Duroux, M. (2012). A Systematic Review of MicroRNA in Glioblastoma Multiforme: Micro-modulators in the Mesenchymal Mode of Migration and Invasion. *Molecular Neurobiology* 2012 47:1, 47(1), 131–144. <https://doi.org/10.1007/S12035-012-8349-7>
- Moore, S. J., & Murphy, G. G. (2020). The role of L-type calcium channels in neuronal excitability and aging. *Neurobiology of Learning and Memory*, 173, 107230. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2020.107230>
- Morrone, F. B., Gehring, M. P., & Nicoletti, N. F. (2016). Calcium channels and associated receptors in malignant brain tumor therapy. *Molecular Pharmacology*, 90(3), 403–409. <https://doi.org/10.1124/MOL.116.103770>
- Morrone, F. B., Vargas, P., Rockenbach, L., & Scheffel, T. B. (2021). P2Y₁₂ Purinergic Receptor and Brain Tumors: Implications on Glioma Microenvironment. *Molecules*, 26(20). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26206146>
- Motiani, R. K., Hyzinski-García, M. C., Zhang, X., Henkel, M. M., Abdullaev, I. F., Kuo, Y. H., Matrougui, K., Mongin, A. A., & Trebak, M. (2013a). STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, 465(9), 1249–1260. <https://doi.org/10.1007/S00424-013-1254-8>
- Motiani, R. K., Hyzinski-García, M. C., Zhang, X., Henkel, M. M., Abdullaev, I. F., Kuo, Y. H., Matrougui, K., Mongin, A. A., & Trebak, M. (2013b). STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 465(9), 1249–1260. <https://doi.org/10.1007/S00424-013-1254-8/FIGURES/8>
- Muñoz-Soriano, V., & Paricio, N. (2007). Overexpression of Septin 4, the Drosophila homologue of human CDCrel-1, is toxic for dopaminergic neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 26(11), 3150–3158. <https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2007.05937.X>
- Musi, N., Valentine, J. M., Sickora, K. R., Baeuerle, E., Thompson, C. S., Shen, Q., & Orr, M. E. (2018). Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell*, 17(6). <https://doi.org/10.1111/ACEL.12840>
- Naffa, R., Hegedűs, L., Hegedűs, T., Tóth, S., Papp, B., Tordai, A., & Enyedi, Á. (2023). Plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4 function in cell migration and cancer metastasis. *The Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/JP284179>
- Nelson, O., Tu, H., Lei, T., Bentahir, M., De Strooper, B., & Bezprozvanny, I. (2007). Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of

- presenilin 1. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1230–1239. <https://doi.org/10.1172/JCI30447>
- Nicoletti, N. F., Erig, T. C., Zanin, R. F., Roxo, M. R., Ferreira, N. P., Gomez, M. V., Morrone, F. B., & Campos, M. M. (2017). Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel blockers derived from the spider *P. nigriventer* in glioma progression. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 129, 58–67. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2017.02.001>
- Nishizawa, T., Kita, S., Maturana, A. D., Furuya, N., Hirata, K., Kasuya, G., Ogasawara, S., Dohmae, N., Iwamoto, T., Ishitani, R., & Nureki, O. (2013). Structural basis for the counter-transport mechanism of a H^+ / Ca^{2+} exchanger. *Science*, 341(6142), 168–172. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1239002/SUPPL_FILE/NISHIZAWA.SM.PDF
- Nissim, T. B.-K., Zhang, X., Elazar, A., Roy, S., Stolwijk, J. A., Zhou, Y., Motiani, R. K., Gueguinou, M., Hempel, N., Hershinkel, M., Gill, D. L., Trebak, M., & Sekler, I. (2017). Mitochondria control store-operated Ca^{2+} entry through Na^+ and redox signals. *The EMBO Journal*, 36(6), 797–815. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201592481>
- Norat, P., Soldozy, S., Sokolowski, J. D., Gorick, C. M., Kumar, J. S., Chae, Y., Yağmurlu, K., Prada, F., Walker, M., Levitt, M. R., Price, R. J., Tvrdik, P., & Kalani, M. Y. S. (2020). Mitochondrial dysfunction in neurological disorders: Exploring mitochondrial transplantation. *Npj Regenerative Medicine* 2020 5:1, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00107-x>
- North, R. A. (n.d.). *P2X receptors*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0427>
- Novorolsky, R. J., Kasheke, G. D. S., Hakim, A., Foldvari, M., Dorighello, G. G., Sekler, I., Vuligonda, V., Sanders, M. E., Renden, R. B., Wilson, J. J., & Robertson, G. S. (2023). Preserving and enhancing mitochondrial function after stroke to protect and repair the neurovascular unit: novel opportunities for nanoparticle-based drug delivery. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, 1226630. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2023.1226630/BIBTEX>
- Orellana, J. A., Von Bernhardt, R., Giaume, C., & Sáez, J. C. (2012). Glial hemichannels and their involvement in aging and neurodegenerative diseases. *Reviews in the Neurosciences*, 23(2), 163–177. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO-2011-0065/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Ou-yang, Q., Li, B., Xu, M., & Liang, H. (2018). TRPV4 promotes the migration and invasion of glioma cells via AKT/Rac1 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(2), 876–881. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.06.090>
- Pacifico, F., Ulianich, L., De Micheli, S., Treglia, S., Leonardi, A., Vito, P., Formisano, S., Consiglio, E., & Di Jeso, B. (2003). The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30(3), 399–409. <https://doi.org/10.1677/JME.0.0300399>
- Pannaccione, A., Piccialli, I., Secondo, A., Ciccone, R., Molinaro, P., Boscia, F., & Annunziato, L. (2020). The Na^+/Ca^{2+} -exchanger in Alzheimer's disease. *Cell Calcium*, 87, 102190. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2020.102190>

- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C. H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., ... Kinzler, K. W. (2008). An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897), 1807. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1164382>
- Parys, J. B., & De Smedt, H. (2012). Inositol 1,4,5-trisphosphate and its receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 740, 255–279. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_11/FIGURES/4_11
- Pathak, T., Gueguinou, M., Walter, V., Delierneux, C., Johnson, M. T., Zhang, X., Xin, P., Yoast, R. E., Emrich, S. M., Yochum, G. S., Sekler, I., Koltun, W. A., Gill, D. L., Hempel, N., & Trebak, M. (2020). Dichotomous role of the human mitochondrial na⁺ /ca²⁺ /li⁺ exchanger nclx in colorectal cancer growth and metastasis. *ELife*, 9, 1–41. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.59686>
- Pchitskaya, E., Popugaeva, E., & Bezprozvanny, I. (2018). Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. *Cell Calcium*, 70, 87–94. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2017.06.008>
- Penna, E., Espino, J., De Stefani, D., & Rizzuto, R. (2018). The MCU complex in cell death. *Cell Calcium*, 69, 73–80. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2017.08.008>
- Pérez-Otaño, I., Luján, 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. <https://doi.org/10.1038/nn1680>
- Perry, E. K., Martin-Ruiz, C. M., & Court, J. A. (2001). Nicotinic receptor subtypes in human brain related to aging and dementia. *Alcohol*, 24(2), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(01\)00130-6](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(01)00130-6)
- Phan, N. N., Wang, C. Y., Chen, C. F., Sun, Z., Lai, M. D., & Lin, Y. C. (2017). Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncology Letters*, 14(2), 2059. <https://doi.org/10.3892/OL.2017.6457>
- 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. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2680.2000.00194.X>
- Putney, J. W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6)
- Pyo, J.-O., Yoo, S.-M., Ahn, H.-H., Nah, J., Hong, S.-H., Kam, T.-I., Jung, S., & Jung, Y.-K. (2013). *ARTICLE Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan.* <https://doi.org/10.1038/ncomms3300>
- Qu, M., Yu, J., Liu, H., Ren, Y., Ma, C., Bu, X., & Lan, Q. (2017). The Candidate Tumor Suppressor Gene SLC8A2 Inhibits Invasion, Angiogenesis and Growth of Glioblastoma. *Molecules and Cells*, 40(10), 761. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2017.0104>

- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–344. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA0909142>
- Reale, M., Carrarini, C., Russo, M., Dono, F., Ferri, L., Di Pietro, M., Costantini, E., Porreca, A., Di Nicola, M., Onofri, M., & Bonanni, L. (2022). Muscarinic Receptors Expression in the Peripheral Blood Cells Differentiate Dementia with Lewy Bodies from Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 85(1), 323–330. <https://doi.org/10.3233/JAD-215285>
- Ribeiro-Rodrigues, T. M., Kelly, G., Korolchuk, V. I., & Girao, H. (2023). Intercellular communication and aging. *Aging: From Fundamental Biology to Societal Impact*, 257–274. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823761-8.00005-7>
- Ristori, E., Donnini, S., & Ziche, M. (2020). New Insights Into Blood-Brain Barrier Maintenance: The Homeostatic Role of β -Amyloid Precursor Protein in Cerebral Vasculature. *Frontiers in Physiology*, 11, 548739. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.01056/BIBTEX>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV007>
- Rizopoulos, T., & Assimakopoulou, M. (2021). Transient receptor potential (TRP) channels in human colorectal cancer: evidence and perspectives. *Histology and Histopathology*, 36(5), 515–526. <https://doi.org/10.14670/HH-18-308>
- Robinson, M., Lee, B. Y., & Hane, F. T. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(2), 317–330. <https://doi.org/10.3233/JAD-161149>
- Roder, C., Bisdas, S., Ebner, F. H., Honegger, J., Naegle, T., Ernemann, U., & Tatagiba, M. (2014). Maximizing the extent of resection and survival benefit of patients in glioblastoma surgery: high-field iMRI versus conventional and 5-ALA-assisted surgery. *European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, 40(3), 297–304. <https://doi.org/10.1016/J.EJSO.2013.11.022>
- Rong, L., Li, N., & Zhang, Z. (2022). Emerging therapies for glioblastoma: current state and future directions. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 41(1), 142. <https://doi.org/10.1186/S13046-022-02349-7>
- Rosencrans, W. M., Rajendran, M., Bezrukov, S. M., & Rostovtseva, T. K. (2021). VDAC Regulation of Mitochondrial Calcium Flux: From Channel Biophysics to Disease. *Cell Calcium*, 94, 102356. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2021.102356>
- Rostovtseva, T. K., & Bezrukov, S. M. (2008). VDAC regulation: Role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(3), 163–170. <https://doi.org/10.1007/S10863-008-9145-Y/METRICS>
- Sakamoto, K. M., & Frank, D. A. (2009). CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(8), 2583–2587. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1137>

- Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (1999). Can molecules explain long-term potentiation? *Nature Neuroscience* 1999 2:7, 2(7), 597–604. <https://doi.org/10.1038/10154>
- Sanfilippo, C., Giuliano, L., Castrogiovanni, P., Imbesi, R., Olivieri, M., Fazio, F., Blennow, K., Zetterberg, H., & Di Rosa, M. (2023). Current Neuropharmacology SCIENCE BENTHAM Impact Factor: 7.70 Sex, Age, and Regional Differences in CHRM1 and CHRM3 Genes Expression Levels in the Human Brain Biopsies: Potential Targets for Alzheimer's Disease-related Sleep Disturbances. *Current Neuropharmacology*, 21, 740–760. <https://doi.org/10.2174/1570159X21666221207091209>
- Sanz-Blasco, S., Valero, R. A., Rodríguez-Crespo, I., Villalobos, C., & Núñez, L. (2008). Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. *PloS One*, 3(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0002718>
- Sattler, R., & Tymianski, M. (2001). Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Molecular Neurobiology*, 24(1–3), 107–129. <https://doi.org/10.1385/MN:24:1-3:107>
- Scremin, E., Agostini, M., Leparulo, A., Pozzan, T., Greotti, E., & Fasolato, C. (2020). ORAI2 Down-Regulation Potentiates SOCE and Decreases Aβ₄₂ Accumulation in Human Neuroglioma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 1–18. <https://doi.org/10.3390/IJMS21155288>
- Serwach, K., & Gruszczynska-Biegala, J. (2020). Target Molecules of STIM Proteins in the Central Nervous System. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 617422. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2020.617422/BIBTEX>
- Sharma, A., Ramena, G. T., & Elble, R. C. (2021). Advances in Intracellular Calcium Signaling Reveal Untapped Targets for Cancer Therapy. *Biomedicines* 2021, Vol. 9, Page 1077, 9(9), 1077. <https://doi.org/10.3390/BIMEDICINES9091077>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 21(6), 349–353. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2011.10.001>
- Shenouda, S. K., & Alahari, S. K. (2009). MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(3–4), 369–378. <https://doi.org/10.1007/S10555-009-9188-5/TABLES/1>
- Shi, M., Chu, F., Zhu, F., & Zhu, J. (2022). Impact of Anti-amyloid-β Monoclonal Antibodies on the Pathology and Clinical Profile of Alzheimer's Disease: A Focus on Aducanumab and Lecanemab. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 870517. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2022.870517/BIBTEX>
- Simakova, O., & Arispe, N. J. (2006). Early and late cytotoxic effects of external application of the Alzheimer's Abeta result from the initial formation and function of Abeta ion channels. *Biochemistry*, 45(18), 5907–5915. <https://doi.org/10.1021/BI060148G>
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W. (2014). Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron*, 82(1), 24–45. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2014.03.016>

- Small, D. H., Gasperini, R., Vincent, A. J., Hung, A. C., & Foa, L. (2009). The role of Abeta-induced calcium dysregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 16(2), 225–233. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-0951>
- So, J. S., Kim, H., & Han, K. S. (2021). Mechanisms of Invasion in Glioblastoma: Extracellular Matrix, Ca²⁺ Signaling, and Glutamate. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 663092. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2021.663092/BIBTEX>
- Sobradillo, D., Hernández-Morales, M., Ubierna, D., Moyer, M. P., Núñez, L., & Villalobos, C. (2014). A Reciprocal Shift in Transient Receptor Potential Channel 1 (TRPC1) and Stromal Interaction Molecule 2 (STIM2) Contributes to Ca²⁺ Remodeling and Cancer Hallmarks in Colorectal Carcinoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(42), 28765. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.581678>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2010.06.001>
- Song, M., Chen, D., & Yu, S. P. (2014). The TRPC channel blocker SKF 96365 inhibits glioblastoma cell growth by enhancing reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger and increasing intracellular Ca²⁺. *British Journal of Pharmacology*, 171(14), 3432. <https://doi.org/10.1111/BPH.12691>
- Soria Lopez, J. A., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 167, 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>
- Sritangos, P., Alarcon, E. P., James, A. D., Sultan, A., Richardson, D. A., & Bruce, J. I. E. (2020). Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase Isoform 4 (PMCA4) Has an Important Role in Numerous Hallmarks of Pancreatic Cancer. *Cancers*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/CANCERS12010218>
- 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. <https://doi.org/10.1124/PR.110.003814>
- Suemaru, K., Araki, H., & Gomita, Y. (2002). [Involvement of neuronal nicotinic receptor in psychiatric disorders]. *Nihon Yakurigaku Zasshi. Folia Pharmacologica Japonica*, 119(5), 295–300. <https://doi.org/10.1254/FPJ.119.295>
- Supnet, C., Grant, J., Kong, H., Westaway, D., & Mayne, M. (2006). Amyloid-β-(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function in neurons of TgCRND8 mice. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38440–38447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606736200>
- Supramarginal Resection in Glioblastoma Guided by Artificial Intelligence - Tabular View - ClinicalTrials.gov.* (n.d.). Retrieved February 15, 2024, from <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT05735171?view=record>
- Swenson, B. L., Meyer, C. F., Bussian, T. J., & Baker, D. J. (2019). Senescence in aging and disorders of the central nervous system. *Translational Medicine of Aging*, 3, 17–25. <https://doi.org/10.1016/J.TMA.2019.01.002>

- Tajada, S., & Villalobos, C. (2020). Calcium Permeable Channels in Cancer Hallmarks. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.00968>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.07.024>
- Tamtaji, O. R., Heidari-soureshjani, R., Mirhosseini, N., Kouchaki, E., Bahmani, F., Aghadavod, E., Tajabadi-Ebrahimi, M., & Asemi, Z. (2019). Probiotic and selenium co-supplementation, and the effects on clinical, metabolic and genetic status in Alzheimer’s disease: A randomized, double-blind, controlled trial. *Clinical Nutrition*, 38(6), 2569–2575. <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2018.11.034>
- Tedeschi, V., Sisalli, M. J., Petrozziello, T., Canzoniero, L. M. T., & Secondo, A. (2021). Lysosomal calcium is modulated by STIM1/TRPML1 interaction which participates to neuronal survival during ischemic preconditioning. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(2). <https://doi.org/10.1096/FJ.202001886R>
- Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration. (n.d.-a). Retrieved November 9, 2023, from <https://www.teresewinslow.com/>
- Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration. (n.d.-b). Retrieved December 2, 2023, from <https://www.teresewinslow.com/#/cellular-scientific/>
- Thakkar, J. P., Dolecek, T. A., Horbinski, C., Ostrom, Q. T., Lightner, D. D., Barnholtz-Sloan, J. S., & Villano, J. L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 23(10), 1985–1996. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0275/68016/AM/EPIDEMIOLOGIC-AND-MOLECULAR-PROGNOSTIC-REVIEW-OF>
- Thévenin, A. F., Kowal, T. J., Fong, J. T., Kells, R. M., Fisher, C. G., & Falk, M. M. (2013). Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. *Physiology*, 28(2), 93–116. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00038.2012/ASSET/IMAGES/LARGE/PHY0011301430006.JPEG>
- 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. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2007.00295.X>
- Thibault, O., & Landfield, P. W. (1996). Increase in Single L-Type Calcium Channels in Hippocampal Neurons During Aging. *Science*, 272(5264), 1017–1020. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5264.1017>
- Todorov, V., & Filzmoser, P. (2010). An Object-Oriented Framework for Robust Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 32(3), 1–47. <https://doi.org/10.18637/JSS.V032.I03>
- Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P. J., Cayuela, M. L., Maraver, A., Tejera, A., Borrás, C., Matheu, A., Klatt, P., Flores, J. M., Viña, J., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*, 135(4), 609–622. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.09.034>

- Torp, S. H., Solheim, O., & Skjulsvik, A. J. (2022). The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know—a minireview. *Acta Neurochirurgica*, 164(9), 2453–2464. <https://doi.org/10.1007/S00701-022-05301-Y/TABLES/11>
- TRP genes family expression in colorectal cancer - PubMed*. (n.d.). Retrieved December 18, 2023, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26422106/>
- Tsakiri, E. N., Iliaki, K. K., Höhn, A., Grimm, S., Papassideri, I. S., Grune, T., & Trougakos, I. P. (2013). Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces life span in *Drosophila melanogaster*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.186>
- Valerie, N. C. K., Dziegielewska, B., Hosing, A. S., Augustin, E., Gray, L. S., Brautigan, D. L., Larner, J. M., & Dziegielewski, J. (2013). Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 85(7), 888–897. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2012.12.017>
- Vargas, P., Scheffel, T. B., Diz, F. M., Rockenbach, L., Grave, N., Cappellari, A. R., Kist, L. W., Bogo, M. R., Thomé, M. P., Leal, G. F., de Fraga Dias, A., Figueiró, F., Filippi-Chiela, E. C., Lenz, G., & Morrone, F. B. (2022). P2Y12 receptor antagonism inhibits proliferation, migration and leads to autophagy of glioblastoma cells. *Purinergic Signalling*, 18(4), 481–494. <https://doi.org/10.1007/S11302-022-09888-W/FIGURES/6>
- Vashisht, A., Trebak, M., & Motiani, R. K. (2015). STIM and orai proteins as novel targets for cancer therapy. A review in the theme: Cell and molecular processes in cancer metastasis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 309(7), C457–C469. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00064.2015>
- Veng, L. M., & Browning, M. D. (2002). Regionally selective alterations in expression of the $\alpha 1D$ subunit (Cav1.3) of L-type calcium channels in the hippocampus of aged rats. *Molecular Brain Research*, 107(2), 120–127. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00453-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00453-9)
- Villalobos, C., Hernández-Morales, M., Gutiérrez, L. G., & Núñez, L. (2019). TRPC1 and ORAI1 channels in colon cancer. *Cell Calcium*, 81, 59–66. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2019.06.003>
- Villalobos, C., Sobradillo, D., Hernández-Morales, M., & Núñez, L. (2016). Remodeling of Calcium Entry Pathways in Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 898, 449–466. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26974-0_19
- Wang, C. Y., Lai, M. D., Phan, N. N., Sun, Z., & Lin, Y. C. (2015). Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0125766>
- Wang, R., & Reddy, P. H. (2017). Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 57(4), 1041. <https://doi.org/10.3233/JAD-160763>
- Wang, X., Fei, F., Qu, J., Li, C., Li, Y., & Zhang, S. (2018). The role of septin 7 in physiology and pathological disease: A systematic review of current status. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(7), 3298–3307. <https://doi.org/10.1111/JCMM.13623>

- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Tang, X. D., & Gill, D. L. (2010). The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6000), 105–109. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1191086>
- Warburg, O. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Die Naturwissenschaften*, 12(50), 1131–1137. <https://doi.org/10.1007/BF01504608/METRICS>
- Wei, P. C., Chang, A. N., Kao, J., Du, Z., Meyers, R. M., Alt, F. W., & Schwer, B. (2016). Long Neural Genes Harbor Recurrent DNA Break Clusters in Neural Stem/Progenitor Cells. *Cell*, 164(4), 644. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.12.039>
- Wei, W., Ryu, J. K., Choi, H. B., & McLarnon, J. G. (2008). Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells. *Cancer Letters*, 260(1–2), 79–87. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2007.10.025>
- Wei, W., Sun, Z., He, S., Zhang, W., Chen, S., Cao, Y. N., & Wang, N. (2022). Mechanical ventilation induces lung and brain injury through ATP production, P2Y1 receptor activation and dopamine release. *Bioengineered*, 13(2), 2346–2359. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2022269>
- Weilner, S., Keider, V., Winter, M., Harreither, E., Salzer, B., Weiss, F., Schraml, E., Messner, P., Pietschmann, P., Hildner, F., Gabriel, C., Redl, H., Grillari-Voglauer, R., & Grillari, J. (2016). Vesicular Galectin-3 levels decrease with donor age and contribute to the reduced osteo-inductive potential of human plasma derived extracellular vesicles. *Aging*, 8(1), 16–33. <https://doi.org/10.18632/AGING.100865>
- Wilcox, J. A., Ramakrishna, R., & Magge, R. (2018). Immunotherapy in Glioblastoma. *World Neurosurgery*, 116, 518–528. <https://doi.org/10.1016/J.WNEU.2018.04.020>
- Wisniewski, M. L., Hwang, J., & Bahr, B. A. (2011). Submicromolar Aβ42 reduces hippocampal glutamate receptors and presynaptic markers in an aggregation-dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(12), 1664–1674. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2011.09.011>
- Wissler Gerdes, E. O., Misra, A., Netto, J. M. E., Tchkonja, T., & Kirkland, J. L. (2021). Strategies for late phase preclinical and early clinical trials of senolytics. *Mechanisms of Ageing and Development*, 200, 111591. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2021.111591>
- Woods, J. J., Nemani, N., Shanmughapriya, S., Kumar, A., Zhang, M., Nathan, S. R., Thomas, M., Carvalho, E., Ramachandran, K., Srikantan, S., Stathopoulos, P. B., Wilson, J. J., & Madesh, M. (2019). A Selective and Cell-Permeable Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU) Inhibitor Preserves Mitochondrial Bioenergetics after Hypoxia/Reoxygenation Injury. *ACS Central Science*, 5(1), 153–166. https://doi.org/10.1021/ACSCENTSCI.8B00773/SUPPL_FILE/OC8B00773_SI_001.PDF
- Wu, S., Zhang, Y., You, S., Lu, S., Zhang, N., & Sun, Y. (2021). Septin4 promotes cardiomyocytes apoptosis by enhancing the VHL-mediated degradation of HIF-1α. *Cell Death Discovery* 2021 7:1, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00563-4>
- Xie, J., Pan, H., Yao, J., Zhou, Y., & Han, W. (2016). SOCE and cancer: Recent progress and new perspectives. *International Journal of Cancer*, 138(9), 2067–2077. <https://doi.org/10.1002/IJC.29840>

- Xu, D., Liu, A., Wang, X., Chen, Y., Shen, Y., Tan, Z., & Qiu, M. (2018). Repression of Septin9 and Septin2 suppresses tumor growth of human glioblastoma cells. *Cell Death & Disease*, 9(5). <https://doi.org/10.1038/S41419-018-0547-4>
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., Inman, C. L., Ogrodnik, M. B., Hachfeld, C. M., Fraser, D. G., Onken, J. L., Johnson, K. O., Verzosa, G. C., Langhi, L. G. P., Weigl, M., Giorgadze, N., LeBrasseur, N. K., Miller, J. D., Jurk, D., ... Kirkland, J. L. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature Medicine* 2018 24:8, 24(8), 1246–1256. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9>
- Yang, W., Wu, P. fei, Ma, J. xing, Liao, M. jun, Xu, L. shan, & Yi, L. (2020). TRPV4 activates the Cdc42/N-wasp pathway to promote glioblastoma invasion by altering cellular protrusions. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-70822-4>
- Ye, Z. C., Rothstein, J. D., & Sontheimer, H. (1999). Compromised glutamate transport in human glioma cells: Reduction- mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *Journal of Neuroscience*, 19(24), 10767–10777. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-24-10767.1999>
- Yuan, F., Yi, L., Hai, L., Wang, Y., Yang, Y., Li, T., Tong, L., Ma, H., Liu, P., Ming, H., Ren, B., Yu, S., Lin, Y., & Yang, X. (2019a). Identification of Key Pathways and Genes in the Orai2 Mediated Classical and Mesenchymal Subtype of Glioblastoma by Bioinformatic Analyses. *Disease Markers*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7049294>
- Yuan, F., Yi, L., Hai, L., Wang, Y., Yang, Y., Li, T., Tong, L., Ma, H., Liu, P., Ming, H., Ren, B., Yu, S., Lin, Y., & Yang, X. (2019b). Identification of Key Pathways and Genes in the Orai2 Mediated Classical and Mesenchymal Subtype of Glioblastoma by Bioinformatic Analyses. *Disease Markers*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7049294>
- Zeng, B., Yuan, C., Yang, X., L. Atkin, S., & Xu, S.-Z. (2013). TRPC Channels and Their Splice Variants are Essential for Promoting Human Ovarian Cancer Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Current Cancer Drug Targets*, 13(1), 103–116. <https://doi.org/10.2174/1568009611309010103>
- Zhang, D., Dai, D., Zhou, M., Li, Z., Wang, C., Lu, Y., Li, Y., & Wang, J. (2018). Inhibition of Cyclin D1 Expression in Human Glioblastoma Cells is Associated with Increased Temozolomide Chemosensitivity. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 51(6), 2496–2508. <https://doi.org/10.1159/000495920>
- Zhang, P., Kishimoto, Y., Grammatikakis, I., Gottimukkala, K., Cutler, R. G., Zhang, S., Abdelmohsen, K., Bohr, V. A., Misra Sen, J., Gorospe, M., & Mattson, M. P. (2019). Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience*, 22(5), 719–728. <https://doi.org/10.1038/S41593-019-0372-9>
- Zhang, W. jun. (2021). Effect of P2X purinergic receptors in tumor progression and as a potential target for anti-tumor therapy. *Purinergic Signalling*, 17(1), 151–162. <https://doi.org/10.1007/S11302-020-09761-8>

- Zhang, Y., Cruickshanks, N., Yuan, F., Wang, B., Pahuski, M., Wulfschlegel, J., Gallagher, I., Koeppe, A. F., Hatef, S., Papanicolaou, C., Lee, J., Bar, E. E., Schiff, D., Turner, S. D., Petricoin, E. F., Gray, L. S., & Abounader, R. (2017). Targetable T-type calcium channels drive glioblastoma. *Cancer Research*, 77(13), 3479–3490. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2347/652667/AM/TARGETABLE-T-TYPE-CALCIUM-CHANNELS-DRIVE>
- Zhao, X., Feng, H., Wang, Y., Wu, Y., Guo, Q., Feng, Y., Ma, M., Guo, W., Song, X., Zhang, Y., Han, S., & Cao, L. (2020). Septin4 promotes cell death in human colon cancer cells by interacting with BAX. *International Journal of Biological Sciences*, 16(11), 1917–1928. <https://doi.org/10.7150/IJBS.44429>
- Zhu, M., Chen, L., Zhao, P., Zhou, H., Zhang, C., Yu, S., Lin, Y., & Yang, X. (2014). Store-operated Ca²⁺ entry regulates glioma cell migration and invasion via modulation of Pyk2 phosphorylation. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 33(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13046-014-0098-1/FIGURES/5>
- Zmora, N., Soffer, E., & Elinav, E. (2019). Transforming medicine with the microbiome. *Science Translational Medicine*, 11(477). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAW1815>

