

Calcio, neurodegeneración y bombas de calcio en el Alzheimer

Ana M. Mata, María Berrocal

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética.
Instituto de Biomarcadores de Patologías Moleculares.
Universidad de Extremadura, Badajoz, España

El ion calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero de importancia vital para la célula, ya que interviene en numerosas vías de señalización. En el sistema nervioso, las neuronas dependen del Ca^{2+} para el control de procesos que no son comunes a todas las células eucariotas, como la liberación de neurotransmisores, el desarrollo neuronal, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y memoria. Este hecho hace que el calcio sea especialmente importante para las neuronas. En las terminales presinápticas, la entrada de Ca^{2+} al citosol desencadena la exocitosis de las vesículas sinápticas que contienen los neurotransmisores. A nivel postsináptico, es necesario que se produzca un aumento transitorio de los niveles de Ca^{2+} en las espinas dendríticas para inducir la plasticidad sináptica. Es de destacar que las señales de Ca^{2+} intracelular regulan procesos tan rápidos como la liberación de neurotransmisores (microsegundos) hasta otros, como la transcripción de genes, que pueden durar desde segundos hasta horas. La consecución de estos procesos requiere unas concentraciones muy específicas de calcio y diferentes para cada uno de ellos. En reposo, la concentración de Ca^{2+} intracelular permanece alrededor de 100 nM y fuera de la célula es de 1-2 mM. Esta diferencia de concentraciones permite que las células usen Ca^{2+} como un potente señalizador intracelular, para responder y adaptarse a cambios rápidos en los entornos extracelulares e intracelulares. Cuando las neuronas son incapaces de mantener ese gradiente se producen efectos negativos extremos en el funcionamiento de orgánulos intracelulares como el retículo endoplásmico y la mitocondria, dando lugar a efectos metabólicos adversos, desórdenes neurológicos y a muerte celular. Por lo tanto, es preciso que se mantenga ese gradiente y, para ello, la célula dispone de mecanismos moleculares (herramientas de señalización) que expulsan el exceso del Ca^{2+} citosólico hacia fuera de la célula o al interior de orgánulos intracelulares.

La señalización por Ca^{2+} implica un aumento transitorio de su concentración en el citosol, mediante

la activación de canales de calcio que permiten su entrada de la célula a favor de su gradiente y son operados por voltaje (VOCs), por receptores (ROC), por vaciamiento de depósitos intracelulares (SOCs), por segundos mensajeros (SMOCs) y receptores de potencial transitorio (TRPs). Otros canales de calcio lo liberan al citosol desde el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, son los receptores de inositol-trifosfato (IP3R) y de rianodina (RyR). Por otra parte, la salida del exceso de Ca^{2+} citosólico al exterior celular la llevan a cabo las ATPasas o bombas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La entrada de Ca^{2+} a orgánulos intracelulares como el retículo sarco/endoplasmático y el aparato de Golgi tiene lugar, también mediante transporte activo, por acción de las Ca^{2+} -ATPasas del retículo sarco/endoplasmático (SERCA) y de las vías secretoras (SPCA). En la mitocondria se encuentra el uniportador mitocondrial de calcio (MCU), que permite la entrada de Ca^{2+} citosólico, y los intercambiadores mitocondriales $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$, que lo liberan al citosol. Es de destacar la función que ejercen en el citosol otras proteínas tamponadoras y sensoras que se activan por unión a Ca^{2+} , como la calmodulina, muy abundante en mamíferos, la calsequestrina y calreticulina, que abundan en los retículos sarco y endoplásmico, respectivamente y la proteína S100, que se encuentran en el citosol y en el núcleo, o la proteína DREAM o calsenilina, que actúan como regulador transcripcional. Estas proteínas constituyen las herramientas del calcio que contribuyen, junto a receptores acoplados a la proteína G, receptores iónicos, quinasas y fosfatasa dependientes de Ca^{2+} y efectores transcripcionales, a la maquinaria celular que dirige los procesos neuronales regulados por calcio. La disponibilidad de sensores de alta afinidad por calcio (quin-2, fura-2, fluo-3, fluo-4, Oregon Green BAPTA) que cambian sus intensidades de fluorescencia tras unir Ca^{2+} , e indicadores de Ca^{2+} codificados genéticamente, ha permitido visualizar las señales del Ca^{2+} citosólico y cuantificar con precisión variaciones de su concentración en las células, e *in vivo*, en respuesta a determinadas situaciones.

NEURODEGENERACIÓN ASOCIADA A LA ALTERACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO

Considerando el amplio espectro de actividades neuronales reguladas por Ca^{2+} no es de extrañar que la alteración de su homeostasis intracelular esté implicada en la etiología de enfermedades neuronales. Numerosas evidencias relacionan la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} que conduce a un aumento sostenido de la concentración de Ca^{2+} intracelular, con el envejecimiento cerebral y con diversas patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), las ataxias cerebelosas, la enfermedad de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. Esto ha llevado a establecer la hipótesis del calcio en la neurodegeneración. El conocimiento de los mecanismos por los cuales la señalización del Ca^{2+} contribuye a la progresión de estas enfermedades es de una importancia clave para el desarrollo de terapias efectivas para combatirlas. En este dossier se describe brevemente la conexión del calcio con tres de ellas (*Figura 1*).

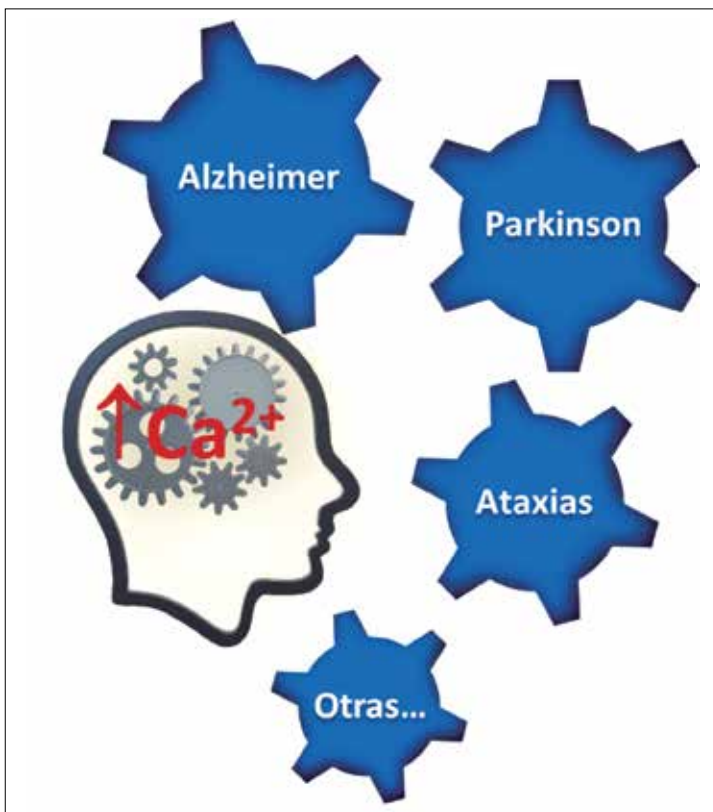


Figura 1

Alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, un factor clave en el mecanismo molecular de numerosas enfermedades neurodegenerativas.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la más común de las enfermedades neurodegenerativas, y constituye el 60-80% de todos los casos de demencia. El aumento en los índices de prevalencia, asociados a la mayor longevidad, la falta de tratamientos efectivos y la dependencia que suponen los pacientes lleva a enormes costes para la sociedad. Por ello, existe un interés creciente y urgente por encontrar fármacos más eficaces que eviten el progreso de la EA. Se caracteriza por la disminución progresiva de la función cognitiva y muerte de las células neuronales, que lleva a problemas de comunicación, confusión, cambios de comportamiento y pérdida de memoria, entre otros factores. Es una enfermedad multifactorial, pero el mayor factor de riesgo de padecerla es la edad, especialmente en la EA esporádica que supone la mayoría de los casos, pues en la EA familiar (EAf) se presenta a edades más tempranas. A nivel morfológico, las principales características histopatológicas son la presencia de agregados en forma de placas seniles extracelulares constituidas por péptidos β -amiloides (βA) y de ovillos neurofibrilares intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada. Los péptidos βA se obtienen a partir de la proteína precursora de

amiloide (PPA), mediante la acción de las β - y γ -secretasas. La EAf se caracteriza por mutaciones en los genes que codifican para la PPA y las presenilinas, que forman parte del complejo enzimático de la γ -secretasa. Por ello, las investigaciones sobre la patogénesis de la EA se han centrado, desde el principio, en analizar los mecanismos de acción de estas biomoléculas. Otros marcadores bioquímicos de la EA incluyen la neurotoxicidad provocada por la sobre activación de receptores de glutamato, principalmente el NMDA, en la membrana plasmática, inflamación, estrés oxidativo y factores genéticos. Diversos estudios funcionales y genéticos utilizando modelos celulares y animales respaldan la desregulación del Ca^{2+} como un evento temprano en la EA, y muestran un aumento sostenido del Ca^{2+} intracelular. Se ha propuesto que oligómeros βA se insertan en la membrana neuronal formando un poro o canal de Ca^{2+} . Pero también se unen a los receptores NMDA, directamente y mediante su asociación con priones, activándolos y ocasionando un aumento de los niveles citosólicos de Ca^{2+} . Otro mecanismo que se ha propuesto se basa en la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, por acción de la presenilina, mediante formación de un canal de calcio o interfiriendo con la actividad de los

receptores sensibles a calcio, como el de IP3 y el de rianodina.

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por un deterioro motor progresivo debido a la pérdida masiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. En la gran mayoría de los casos estas neuronas muestran también inclusiones de proteínas citoplasmáticas típicas llamadas cuerpos de Lewy, que contienen agregados de α -sinucleína. Una característica patológica clave emergente causada por la agregación de α -sinucleína es la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} . Se ha propuesto que estos agregados aumentan la permeabilidad de la membrana plasmática a la entrada de Ca^{2+} , induciendo una sobrecarga intracelular de Ca^{2+} y la consiguiente toxicidad neuronal. A su vez, el aumento de Ca^{2+} intracelular puede promover la agregación de α -sinucleína, provocando en las células un círculo vicioso cuyo resultado es un incremento progresivo del Ca^{2+} intracelular. Otros estudios han revelado que la α -sinucleína se asocia con las mitocondrias y que su acumulación dentro del orgánulo está directamente relacionada con un aumento de los niveles intramitocondriales de Ca^{2+} y el consiguiente daño oxidativo y nitrosativo que lleva a la apoptosis neuronal.

Las ataxias son un grupo de trastornos neurológicos caracterizados por la incapacidad para controlar la actividad muscular durante el movimiento voluntario. Son causados principalmente por trastornos del cerebelo. La desregulación de la homeostasis del calcio en ataxias se ha asociado a la pérdida funcional de proteínas de unión a Ca^{2+} , como la calbindina,

o mutaciones en genes de canales de Ca^{2+} , como la subunidad Cav2.1 del canal de Ca^{2+} sensible al voltaje P/Q, que se expresan abundantemente en las neuronas de Purkinje. Hallazgos recientes han revelado que otro regulador de la homeostasis del Ca^{2+} celular, la ATPasa PMCA, está involucrada en ataxias. Concretamente se han identificado, en pacientes con ataxia cerebelosa ligada al cromosoma X, diversas mutaciones en el gen de la isoforma PMCA3, que se acumula en la región del cerebelo implicada en el control del movimiento y percepción sensorial y muy rica en neuronas de Purkinje. Estas mutaciones afectan al dominio de unión a calmodulina de la Ca^{2+} -ATPasa.

BOMBAS DE CALCIO EN EL ALZHEIMER

Las ATPasas transportadoras de Ca^{2+} desempeñan un papel central en el control de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular debido a su alta afinidad por el ion. En el apartado anterior se ha descrito la participación de la isoforma PMCA3 en ataxia cerebelosa. Por lo tanto, no es de extrañar que también puedan contribuir a la alteración de los niveles de calcio intracelular que se produce en la EA.

Los primeros estudios funcionales realizados en nuestro laboratorio con membranas preparadas a partir de cerebro humano *post mortem* revelaron una desregulación en la dependencia de Ca^{2+} de la actividad PMCA en cerebros afectados por Alzheimer, pero no en el cerebelo, un área que no se ve significativamente afectada en pacientes con la EA. Sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre las actividades de las Ca^{2+} -ATPasas intracelulares, SERCA y SPCA. Por otra



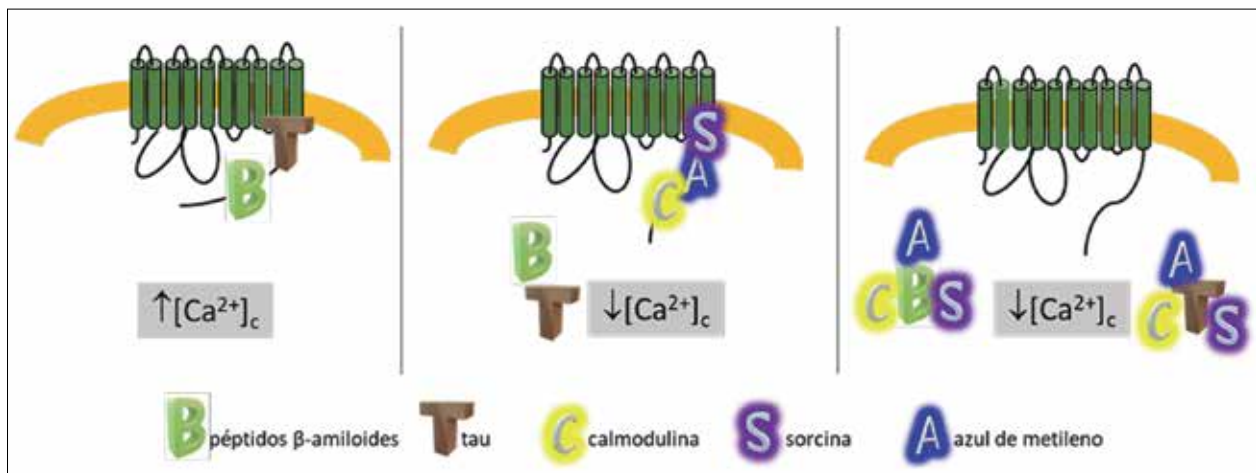


Figura 2

Interacciones de péptidos β -amiloides y de tau con la PMCA inhiben su actividad y provocan el aumento del Ca^{2+} citosólico. Estos efectos inhibitorios son bloqueados por unión de las proteínas calmodulina y sorcina y del azul de metileno a la PMCA, o bien a los péptidos β -amiloides y a tau.

parte, solo la PMCA se inhibe por péptidos βA y por la proteína tau, los dos principales componentes de las marcas histopatológicas de la EA. Los péptidos βA y tau muestran diferencias en sus efectos inhibitorios sobre PMCA: βA no inhibe la isoforma PMCA2b, muy abundante en el cerebelo, pero si inhibe las otras isoformas, especialmente a la PMCA4b. En cambio, tau inhibe todas las isoformas de PMCA. Por otra parte, los efectos de tau, pero no los de βA , dependen en gran medida de la naturaleza iónica de los fosfolípidos de membrana, ya que solo inhibe a la PMCA en presencia de fosfolípidos ácidos. El análisis funcional con isoformas truncadas y ensayos de interacción muestran que el efecto inhibitorio de $\text{A}\beta$ se produce por su interacción con residuos del dominio de unión a calmodulina de la PMCA, localizado en el extremo C-terminal citosólico de la bomba, mientras que tau también interacciona con este extremo de la PMCA, pero en un sitio más próximo al último dominio transmembranal. Por lo tanto, es lógico que βA y tau no inhiban a las ATPasas intracelulares SERCA y SPCA, que carecen de esos residuos. Otro componente importante, que probablemente relaciona el βA y tau con la alteración funcional de la PMCA, es la posible oxidación de PMCA causada por βA y tau, lo que puede conducir a una disminución de la actividad ATPasa.

Esta modulación permite considerar a esta proteína como un eslabón importante en la cadena de eventos moleculares que intervienen en la desregulación del Ca^{2+} en la EA, una enfermedad multifactorial muy compleja. Por ello, es de esperar que el hallazgo de agentes que interfieran con los efectos inhibitorios de βA y tau en el funcionamiento de esta bomba de

Ca^{2+} también ofrezca protección frente a los daños cerebrales dependientes del Ca^{2+} en la EA. En concreto, hemos encontrado que la calmodulina y la sorcina (dos proteínas de unión a Ca^{2+}) interaccionan con la PMCA activándola, y también la protegen de su inhibición por βA y tau y revierten sus efectos inhibitorios. Además, interaccionan con βA y con tau, de forma que esta asociación también contribuye a bloquear sus efectos inhibitorios. Efectos e interacciones similares los produce el azul de metileno, un colorante ampliamente utilizado en química, medicina o como un agente antibacteriano y antifúngico, y que atrajo nuestra atención a causa de las evidencias sobre sus funciones neuroprotectoras en animales y en pacientes con EA leve. De hecho, el azul de leucometileno actúa como un inhibidor selectivo de la agregación de tau, tanto *in vitro* como en modelos de ratones transgénicos, y se ha utilizado en ensayos clínicos en pacientes con EA de leve a moderada (Figura 2). ■

PARA LEER MÁS

- Alzheimer's Association. 2023 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement* (2023) 19(4). DOI 10.1002/alz.13016.
- Berrocal M, Corbacho I, Gutierrez-Merino C, Mata AM. Methylene blue activates the PMCA activity and cross-interacts with amyloid b-peptide, blocking $\text{A}\beta$ -mediated PMCA inhibition. *Neuropharmacology* (2018) 139:163-72.
- Berrocal M, Mata AM. The Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase, a Molecular Target for Tau-induced Cytosolic Calcium Dysregulation. *Neuroscience* (2023) 518:112-18.
- Callens M, Loncke J, Bultynck G. Dysregulated Ca^{2+} Homeostasis as a Central Theme in Neurodegeneration: Lessons from Alzheimer's Disease and Wolfram Syndrome. *Cells* (2022) 11:1963.