

Siguiendo la huella espacio temporal del ion Calcio

María Francisca Cano-Abad.

Departamento de Farmacología. Instituto Teófilo Hernando. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

Las enfermedades neurológicas abarcan un gran número de patologías del sistema nervioso central, con una alta prevalencia y un gran coste social. En el espectro de las enfermedades neurológicas en nuestro grupo de investigación, buscamos tratamientos eficaces para enfermedades como el Alzheimer, el ictus y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Para ello, mediante técnicas de biología molecular e imagen, caracterizamos los mecanismos celulares que determinan la muerte neuronal, con el fin de identificar dianas terapéuticas, y proponer fármacos neuroprotectores que frenen la progresión de la enfermedad.

Las enfermedades neurodegenerativas e ictus cuentan con un factor común, un segundo mensajero universal, el ion Ca^{2+} . El Ca^{2+} participa múltiples procesos fisiológicos: en la fertilización, en el aprendizaje, la memoria, en la secreción de neurotransmisores, etc. Para llevar a cabo esta versatilidad de efectos fisiológicos, es necesario que exista un fino control en los patrones espacio-temporal, que gobiernan su difusión en el citosol celular. Sin embargo, si se exceden los límites espacio-temporal de la homeostasia del Ca^{2+} , resulta ser citotóxico causando muerte celular por necrosis o apoptosis (**Berridge and Bootman, 2000**). Es por ello, que nos hemos especializado en técnicas para la determinación de este ion a nivel intracelular. A su vez, desarrollamos distintos modelos celulares que imitan la muerte neuronal que se da en estas enfermedades. Gracias a estas herramientas hemos podido esclarecer

el mecanismo molecular de la muerte neuronal, así como encontrar algunas moléculas neuroprotectoras. Todo ello, gracias a las técnicas para la determinación de los transientes de Ca^{2+} a nivel intracelular.

Para entender cómo hemos ido especializándonos en las técnicas de determinación de Ca^{2+} intracelular haré un breve recorrido a través de las aportaciones científicas de nuestro laboratorio. En los años 80, el químico Roger Tsien junto al Profesor Tullio Pozzan describieron las propiedades de una sonda fluorescente para determinar los transientes de Ca^{2+} in vivo, las llamadas Fura-2 e Indo-1 (**Tsien y col., 1982**). Estas dos sondas sintéticas, las hemos usado ampliamente en nuestro laboratorio para esclarecer qué patrones desencadenan la muerte celular y establecer qué compuestos pueden interferir con estos transientes de Ca^{2+} patológicos.

Ictus cerebral. El modelo de sobrecarga de Ca²⁺ con el alcaloide veratridina.

Con el fin de mimetizar la sobrecarga de Ca²⁺ que acontece en un ictus cerebral, establecimos un protocolo de sobrecarga de Ca²⁺ intracelular, con el alcaloide veratridina (**Cano Abad y col., 1998**). El tratamiento de las células cromafines con veratridina inducía una muerte celular por necrosis, cuyo origen era la entrada recurrente y oscilatoria de Ca²⁺ en el citosol. Observamos que estas oscilaciones de Ca²⁺ citosólico, se bloqueaban con una molécula denominada Lubeluzol (bloqueante de amplio espectro de los canales de calcio dependientes de voltaje, CCDV). Propusimos que Lubeluzol, bloqueaba los CCDV y resultaba neuroprotector al mitigar las oscilaciones de Ca²⁺ creadas por veratridina. La determinación de Ca²⁺ citosólico se realizó con la sonda fluorescente Fura-2, en célula única.

Despolarización suave y entrada de Ca²⁺ a través del canal de Ca²⁺ del subtipo L

Estos hallazgos nos condujeron a investigar qué patrones de Ca²⁺ citosólico podían inducir una lesión celular y si existía una contribución diferencial a esta señalización de los CCDV, expresados en la célula cromafín. Con esta idea, sometimos a las células cromafines, a despolarizaciones suaves con potasio (30 mM), alternando dos gradientes de Ca²⁺ extracelular de 0,2 y 5 mM, en presencia de un agonista del canal de calcio del subtipo L, FPL64176 (3 μM). Con este nuevo abordaje experimental, observamos que la entrada sostenida en el tiempo de Ca²⁺ en el citosol inducía una muerte celular. En este trabajo, seguimos la entrada de Ca²⁺ a través del CCDV del subtipo L, a través del citosol mediante la sonda fluorescente Fura-2, y observamos que alteraba la red mitocondrial, es decir rompía la conexión mitocondrial y se liberaba un factor proapoptótico al

citosol, el citocromo C. (**Cano-Abad y col., 2001**).

Neurotoxicidad por beta-amiloide y depleción de retículo endoplásmico.

Otro modelo que nos ayudó a entender la fisiopatología del Alzheimer fue la depleción de Ca²⁺ procedente del retículo endoplásmico (RE) con Tapsigargina. Pudimos establecer que galantamina, fármaco destinado al tratamiento del Alzheimer, previene la muerte celular inducida por la depleción de Ca²⁺ del RE, por modular los receptores nicotínicos, del subtipo alfa7, y aumentar la proteína antiapoptótica Bcl2 (**Arias y col., 2004**).

Hasta este momento la medida de Ca²⁺ citosólico (con Fura-2) nos resultó informativa y propusimos que: (i) el alcaloide veratridina inducía una sobrecarga de Ca²⁺ citosólico; (ii) la activación sostenida del canal de Ca²⁺ del tipo L, incrementaba la entrada de Ca²⁺ en la célula y conducía a una desorganización de la red mitocondrial, muriendo la célula por apoptosis; (iii) el Ca²⁺ que se libera del depósito RE, induce una muerte celular por apoptosis, y la modulación de los receptores nicotínicos, por galantamina, promueve la neuroprotección. Sin embargo, no disponíamos de las herramientas para determinar la homeostasia de Ca²⁺ en organelas clave como la mitocondria o el retículo endoplásmico.

En el laboratorio del Profesor Tullio Pozzan (Universidad de Padua), habían desarrollado las proteínas genéticamente codificadas para determinar Ca²⁺ en organelas, las quimeras derivadas de la Green Fluorescent Protein (GFP) Pericam y CAMALEON, y las proteínas bioluminiscentes, Equorinas. En mi estancia postdoctoral en el laboratorio del Profesor Pozzan, pude familiarizarme con el manejo de estas novedosas técnicas para la determinación de la homeostasis del Ca²⁺ en la matriz mitocondria y retículo endoplásmico. En **Filippin y col., 2005**, mejoramos el direccionamiento de las

sondas genéticamente codificadas los PERICAM's, con los que monitorizar los cambios de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial. Además, desarrollamos una nueva sonda sensible a los cambios en el pH de la matriz mitocondrial, AlpHi (**Cano-Abad y col., 2004**).

Tras mi estancia postdoctoral en el laboratorio del Profesor Pozzan, regresé a Madrid, donde puse a punto técnicas de biología molecular e imagen que nos permitieron diseñar nuevas estrategias para la búsqueda de fármacos neuroprotectoros.

Determinación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial. La proteína bioluminiscente Aequorina

Las Ecuorinas, son proteínas bioluminiscentes que provienen de la medusa *Aequorea victoria*. En el laboratorio del Profesor Pozzan, hicieron la quimera siguiente: fusionaron la COX8 (proteína de la membrana interna mitocondrial) con el cDNA que codificaba para la Ecuorina (proteína bioluminiscente). Con esta maniobra se aseguraron de que, la Ecuorina iría direccionada a la matriz mitocondrial y se quedaría atrapada en su interior, este hecho, lo publicaron en **Rizzuto y col., 1992**. En este artículo, describieron que, tras la transfección de células con la quimera COX8-AEQ, se podía medir transientes de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, fue así como nacieron la "Saga de las Ecuorinas" dirigidas a distintos compartimentos celulares.

En nuestro laboratorio utilizamos las Ecuorinas para determinar transientes de Ca^{2+} en distintas organelas. Mediante la transfección de células PC12, con la sonda genéticamente codificada a la matriz mitocondrial, COX8-AEQ, propusimos que, células que sobreexpresan la proteína antiapoptótica Bcl2, los incrementos de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial eran significativamente menores versus a las células controles. Esta particularidad se debe a que Bcl2 modula el canal de

calcio del subtipo L, y la mitocondria capta menos Ca^{2+} que aquellas que no expresan la proteína antiapoptótica. Silenciando la proteína Bcl2, con la técnica de siRNA, demostramos que los niveles de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial eran significativamente mayores con respecto a aquellas células que permaneció Bcl2 sobreexpresada. (**Díaz Prieto, y col., 2008**).

Con la técnica de la Ecuorina, también demostramos que un canal de calcio denominado CALHM1 (Calcium Homeostasis Modulator 1) hacia aumentar los transientes de Ca^{2+} mitocondrial cuando este se activaba. Determinamos que este canal en su forma mutada era capaz de incrementar los niveles de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial en forma de meseta y que permanencia de forma persistente en esta organela (**Moreno Ortega y col., 2010**).

También, medimos los transientes de Ca^{2+} a nivel nuclear (expresando la Ecuorina en el núcleo) y observamos que CALHM1 era un canal que goteaba Ca^{2+} al núcleo, y que en su forma mutada hacia mas vulnerables a las células frente a estímulos tóxicos como el beta-amiloide. (**Moreno-Ortega y col., 2015**). Propusimos un compuesto orgánico el CGP37157, como potencial tratamiento para el Alzheimer ya que bloquea la entrada de Ca^{2+} a través de CALHM1 (**Moreno-Ortega y col., 2015**). Volviendo al ictus cerebral, hemos puesto a punto modelos de ictus in vitro, y describimos que los animales KO para CALHM1, son más resistentes a la privación de oxígeno y glucosa, es decir, la ablación de CALHM1 resulta neuroprotectora en la isquemia cerebral (**Garrosa y col., 2020**).

Más recientemente, retomando las técnicas más clásicas de medida de Ca^{2+} citosólico, hemos abierto una nueva línea de investigación en el campo de la Depresión. Una vez más la sonda fluorescente Fura-2 nos ha servido para descubrir que los pacientes que sufren depresión mayor, tienen alterada su homeostasia de Ca^{2+} y esto los lleva a tener un proceso

inflamatorio crónico que podría ser la causa de su enfermedad (**Garrosa y col., 2021**).

Los camaleones y el Ca²⁺ en el retículo endoplásmico

En la persecución del Ca²⁺ en la célula, también nos adentramos en el retículo endoplásmico, aquí pudimos determinar la homeostasis del Ca²⁺ con la sonda fluorescente denominada CAMALEON. Estas sondas fluorescentes, se basan, en la tecnología FRET (Fluorescent Energy Transfer). Los CAMALEONES se construyeron con la Cian Fluorescent Protein (fluoroforo donador) y la YFP (fluoroforo receptor), unidos con el sensor de Ca²⁺, la Calmodulina y el M13. Con esta sofisticada sonda genéticamente dirigida al RE, pudimos descubrir que la ancestral Ouabaina, estimulaba los receptores IP3 del retículo endoplásmico de las células cromafines y el RE, cooperaba así a la secreción de catecolaminas (**Milla y col., 2011**).

En **Guerra y col., 2015**, el CAMALEON, nos sirvió para dilucidar por qué, un agonista alostérico del receptor nicotínico alfa7, mediaba una señal citotóxica. Entendimos que la apertura persistente de los receptores nicotínicos alfa7, repercutía en la liberación de Ca²⁺ del RE mediante la estimulación de receptores de ryanodina.

Los Pericam's y el Ca²⁺ en la matriz mitocondrial

Los Pericam's pertenecen a las sondas fluorescentes sensibles a Ca²⁺ derivadas de las GFP (Green Fluorescent protein). En concreto el Pericam es una YFP permutada, es decir, se ha invertido circularmente la GFP, llevando la N-terminal a la cabeza y entorno al aminoácido 145, se ha insertado el sensor de Ca²⁺ la calmodulina y el M13. Con esto se ha conseguido una quimera fluorescente y de excitación dual, con un

gran rango dinámico de fluorescencia cuando se une a Ca²⁺.

Los PERICAM's nos sirvieron para establecer que el péptido gomensina permeabilizaba las células y podría alterar el tamponamiento de Ca²⁺ de la mitocondria (**Gamero-Paredes y col., 2012**). Estas proteínas también nos sirvieron para esclarecer el mecanismo de acción del fármaco antiepiléptico Pregabalina (**Hernandez-Vivanco y col., 2012**)

En resumen, hemos propuesto mecanismos de acción para distintas moléculas que actualmente se usan en la clínica: (i) flunaricina o dotaricina (antimigrañoso) (**Nobalvos y col., 1999; Ruiz-Nuño y col., 2001**); (ii) nimodipino (bloqueante de canal de calcio del subtipo L; **Cano-Abad y col., 2001**); (iii) ouabaina (antiarrítmico) (**Milla y col., 2011**); (iv) pregabalina (tratamiento de la epilepsia) (**Hernandez-Vivanco y col., 2012**); (v) galantamina (tratamiento del Alzheimer) (**Arias y col., 2004**). Y otras moléculas que esperamos se posicionen en la clínica como: (i) el compuesto ITH33/IQM9.21 para el tratamiento de la Esclerosis lateral Amiotrófica (**Moreno-Ortega y col., 2016; Mouhid Al-Achbili L y col., 2016**) y (ii) el compuesto CGP37157 para enfermedades relacionadas con el tráfico de calcio mitocondrial, (**Martinez-Sanz y col., 2015; 2016**).

El refinamiento de las técnicas de medidas de Ca²⁺ a nivel intracelular nos ha llevado a proponer nuevas teorías acerca de los mecanismos moleculares que acontecen en las enfermedades del sistema nervioso central y a poder proponer nuevas dianas para su tratamiento.

Quisiera terminar agradeciendo a mis maestros Profesores Manuela García López, Antonio García y Tullio Pozzan, sus enseñanzas y su apoyo a lo largo de mi carrera profesional. En memoria del Profesor Tullio Pozzan. DEP.

Referencias

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000. 1(1):11-21.
- Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol*. 1982. 94(2):325-34.
- Cano-Abad MF, López MG, Hernández-Guijo JM, Zapater P, Gandía L, Sánchez-García P, García AG. Effects of the neuroprotectant lubeluzole on the cytotoxic actions of veratridine, barium, ouabain and 6-hydroxydopamine in chromaffin cells. *Br J Pharmacol*. 1998. 124(6):1187-96.
- Cano-Abad MF, Villarroya M, García AG, Gabilan NH, López MG. Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J Biol Chem*. 2001. 276(43):39695-704.
- Arias E, Alés E, Gabilan NH, Cano-Abad MF, Villarroya M, García AG, López MG. Galantamine prevents apoptosis induced by beta-amyloid and thapsigargin: involvement of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*. 2004. 46(1):103-14.
- Filippin L, Cano-Abad MC, Gastaldello S, Magalhães PJ, Sandonà D, Pozzan T. Improved strategies for the delivery of GFP-based Ca²⁺ sensors into the mitochondrial matrix. *Cell Calcium*. 2005. 37(2):129-36.
- Cano-Abad MF, Di Benedetto G, Magalhães PJ, Filippin L, Pozzan T. Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant. *J Biol Chem*. 2004. 19;279(12):11521-9.
- R Rizzuto, A W Simpson, M Brini, T Pozzan. Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*. 1992. 23;358(6384):325-7.
- Díaz-Prieto N, Herrera-Peco I, de Diego AM, Ruiz-Nuño A, Gallego-Sandín S, López MG, García AG, Cano-Abad MF. Bcl2 mitigates Ca²⁺ entry and mitochondrial Ca²⁺ overload through downregulation of L-type Ca²⁺ channels in PC12 cells. *Cell Calcium*. 2008. 44(4):339-52.
- Moreno-Ortega AJ, Ruiz-Nuño A, García AG, Cano-Abad MF. Mitochondria sense with different kinetics the calcium entering into HeLa cells through calcium channels CALHM1 and mutated P86L-CALHM1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010. 1;391(1):722-6.
- Moreno-Ortega AJ, Buendía I, Mouhid L, Egea J, Lucea S, Ruiz-Nuño A, López MG, Cano-Abad MF. CALHM1 and its polymorphism P86L differentially control Ca²⁺ homeostasis, mitogen-activated protein kinase signalling, and cell vulnerability upon exposure to amyloid β . *Aging Cell*. 2015. 14(6):1094-102.
- Moreno-Ortega AJ, Martínez-Sanz FJ, Lajarín-Cuesta R, de los Ríos C, Cano-Abad MF. Benzothiazepine CGP37157 and its 2'-isopropyl analogue modulate Ca²⁺ entry through CALHM1. *Neuropharmacology*. 2015. 95:503-10.
- Garrosa J, Paredes I, Marambaud P, López MG, Cano-Abad MF. Molecular and Pharmacological Modulation of CALHM1 Promote Neuroprotection against Oxygen and Glucose Deprivation in a Model of Hippocampal Slices. *Cells*. 2020. 9;9(3):664.
- Garrosa-Jiménez J, Sánchez Carro Y, Ovejero-Benito MC, Del Sastre E, García AG, López MG, López-García P, Cano-Abad MF. Intracellular calcium and inflammatory markers, mediated by purinergic stimulation, are differentially regulated in monocytes of patients with major depressive disorder. *Neurosci Lett*. 2021. 20;765:136275.
- Milla J, Montesinos MS, Machado JD, Borges R, Alonso E, Moreno-Ortega AJ, Cano-Abad MF, García AG, Ruiz-Nuño A. Ouabain enhances exocytosis through the regulation of calcium handling by the endoplasmic reticulum of chromaffin cells. *Cell Calcium*. 2011;50(4):332-42.
- Guerra-Álvarez M, Moreno-Ortega AJ, Navarro E, Fernández-Morales JC, Egea J, López MG, Cano-Abad MF. Positive allosteric modulation of alpha-7 nicotinic receptors promotes cell death by inducing Ca(2+) release from the endoplasmic reticulum. *J Neurochem*. 2015;133(3):309-19.
- Novalbos J, Abad-Santos F, Zapater P, Cano-Abad MF, Moradiellos J, Sánchez-García P, García AG. Effects of dotarizine and flunarizine on chromaffin cell viability and cytosolic Ca²⁺. *Eur J Pharmacol*. 1999. 5;366(2-3):309-17.
- Ruiz-Nuño A, Villarroya M, Cano-Abad M, Rosado A, Balfagón G, López MG, García AG. Mechanisms of blockade by the novel migraine prophylactic agent, dotarizine, of various brain and peripheral vessel contractility. *Eur J Pharmacol*. 2001. 12;411(3):289-99.
- Edgar J Paredes-Gamero 1, Rafael L Casaes-Rodrigues, Gioconda E D D Moura, Tatiana M Domingues, Marcus V Buri, Victor H C Ferreira, Edvaldo S Trindade, Ana J Moreno-Ortega, Maria F Cano-Abad, Helena B Nader, Alice T Ferreira, Antonio Miranda, Giselle Z Justo, Ivarne L S Tersariol. Cell-permeable gomesin peptide promotes cell death by intracellular Ca(2+) overload. 2012. 4;9(9):2686-97.
- Hernández-Vivanco A, Pérez-Alvarez A, Caba-González JC, Alonso MT, Moreno-Ortega AJ, Cano-Abad M, Ruiz-Nuño A, Carmona-Hidalgo B, Albillos A. Selectivity of action of pregabalin on Ca(2+) channels but not on fusion pore, exocytotic machinery, or mitochondria in chromaffin cells of the adrenal gland. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;342(2):263-72.
- Moreno-Ortega AJ, Al-Achbili LM, Alonso E, de los Ríos C, García AG, Ruiz-Nuño A, Cano-Abad MF. Neuroprotective Effect of the Novel Compound ITH33/IQM9.21, Against Oxidative Stress and Na(+) and Ca(2+) Overload in Motor Neuron-like NSC-34 Cells. *Neurotox Res*. 2016;30(3):380-91.
- Mouhid Al-Achbili L, Moreno-Ortega AJ, Matías-Guiu J, Cano-Abad MF, Ruiz-Nuño A. ITH33/IQM9.21 provides neuroprotection in a novel ALS model based on TDP-43 and Na+/Ca²⁺ overload induced by VTD. *Neurosci Lett*. 2016. 28;633:28-32.
- Martínez-Sanz FJ, Lajarín-Cuesta R, Moreno-Ortega AJ, González-Lafuente L, Fernández-Morales JC, López-Arribas R, Cano-Abad MF, de los Ríos C. Benzothiazepine CGP37157 Analogues Exert Cytoprotection in Various in Vitro Models of Neurodegeneration. *ACS Chem Neurosci*. 2015. 16;6(9):1626-36.
- Martínez-Sanz FJ, Lajarín-Cuesta R, González-Lafuente L, Moreno-Ortega AJ, Punzón E, Cano-Abad MF, de los Ríos C. Neuroprotective profile of pyridothiazepines with blocking activity of the mitochondrial Na(+)/Ca(2+) exchanger. *Eur J Med Chem*. 2016. 15;109:114-23.