



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**“PAPEL DE LOS MECANISMOS DE EXTRUSION DE
CALCIO EN EL MODELO DE PILOCARPINA DE LA
EPILEPSIA DEL LOBULO TEMPORAL”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA**

M. en C. JORGE GERARDO BRAVO MARTINEZ

Director de tesis: Dr. Jaime Mas Oliva

Ciudad Universitaria, México D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



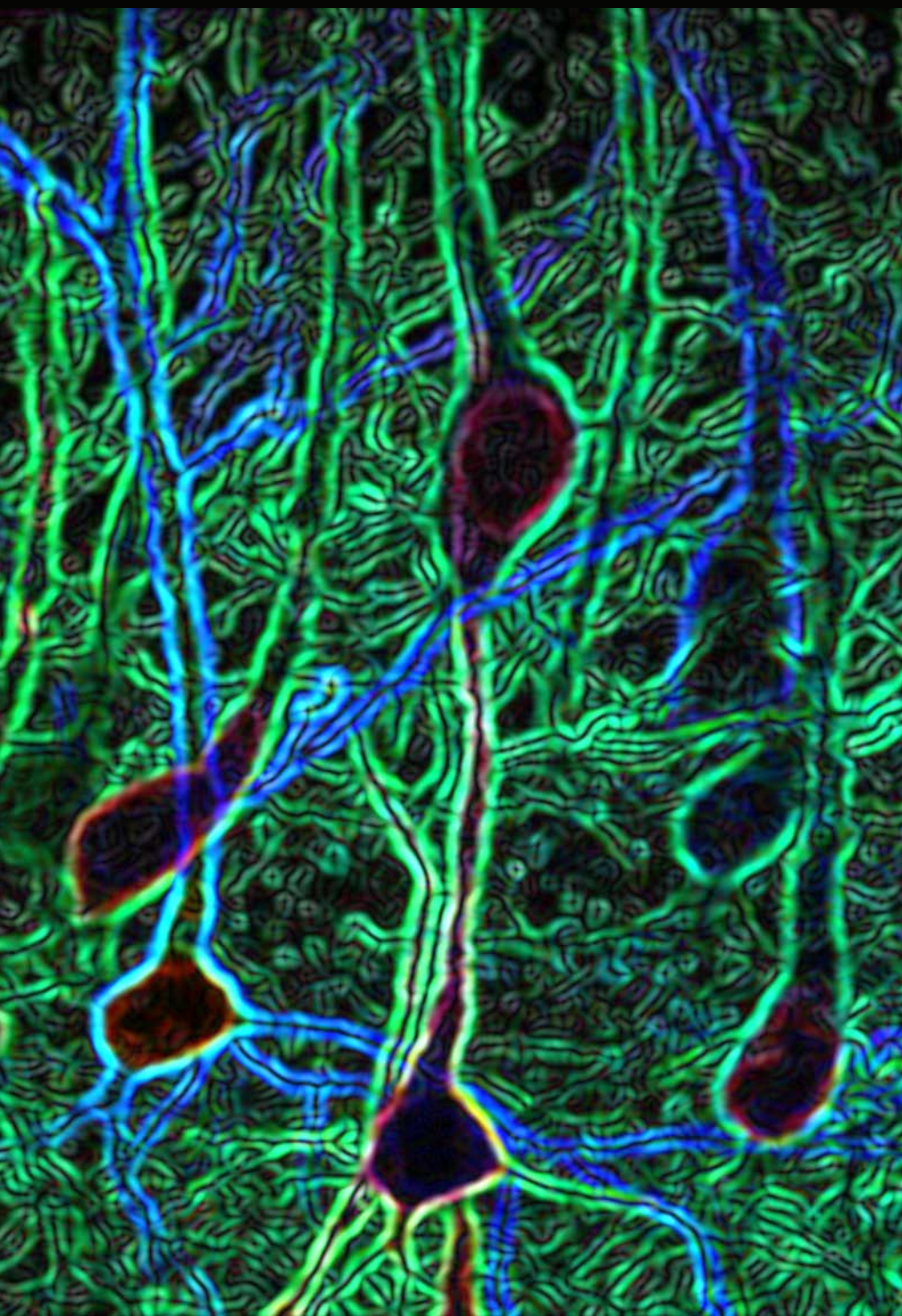
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAPEL DE LOS MECANISMOS DE EXTRUSION DE CALCIO EN EL MODELO DE PILOCARPINA DE LA EPILEPSIA DEL LOBULO TEMPORAL



M. en C. Jorge
Gerardo
Bravo Martínez



2011

DOCTORADO en CIENCIAS BIOMÉDICAS



Este trabajo fué realizado en el Laboratorio del Dr. Jaime Mas Oliva del Instituto de Fisiología Celular. La electrofisiología se realizó en el laboratorio del Dr. David García.

El trabajo fué financiado por los apoyos de CONACyT (47333/A-1) y DGAPA-UNAM (IN228607/20).

Agradecimientos

Esta tesis la dedico a Blanca y Rodrigo. A Blanca por el gran amor que nos tenemos, por ser uno de los motores de mi vida, por empujarme a hacer el doctorado, por toda su comprensión y su ayuda. A Rodrigo por ser el otro motor de mi vida, por el gran cariño que nos tenemos, por enseñarme a ser mejor persona.

- Jaime Mas Oliva** Por ayudarme en el momento que más lo necesitaba, Por la orientación y apoyo en el desarrollo de este trabajo y por la formación académica que me ha dado durante estos años.
- David García Díaz** Por ayudarme también en el momento que más lo necesitaba, por estar plenamente involucrado tanto en este trabajo como en mi formación académica.
- Lourdes Massieu Trigo** Por su ayuda y comentarios para mejorar este trabajo y estar involucrada en mi formación profesional.
- Rocío Salceda Sacanelles,
Alicia Ortega Aguilar,
Hugo Merchant Nancy y
Froylan Gómez Lagunas** Por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, su valiosa contribución y asesoría.
- Blanca Alicia Delgado
Coello** Por su valiosa asesoría técnica y en el diseño experimental de este trabajo.
- Isabel Arenas Reyes** Por el apoyo técnico durante la realización de este trabajo.
- Laura Ongay Larios,
Ma. Guadalupe Códiz
Huerta y Minerva Mora
Cabrerá** Por su apoyo y asesoría técnica en el uso de equipos de la Unidad de Biología Molecular.
- Ing. Ascención Ortíz
Espinoza** Por su apoyo en el diseño y fabricación de equipo necesario para este proyecto de investigación.
- Héctor Malagón** Por su apoyo en el cuidado y monitoreo de los animales experimentales.

ABREVIATURAS

ALG-2	Alpha-1,3-manosiltransferasa.
AMPA	Receptor ionotrópico del glutamato (2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2 oxazol-4-yl) ácido propanoico).
ANT	Translocasa de adenina.
BK	Canales de potasio activados por calcio de gran conductancia.
CA1, 2 y 3	Areas en que se divide el cuerno de Amón del hipocampo.
CaM	Calmodulina.
CaM-B	Dominio de unión a calmodulina de la PMCA.
CAMII	Cinasa dependiente de calcio-calmodulina II.
CAMKIV	Cinasa IV dependiente de calcio-calmodulina.
CARRE	Elemento de RNA reactivo a CAMKIV.
CASK	Serina proteincinasa dependiente de calcio calmodulina.
CBD1	Dominio de unión a calcio del NCX.
CSA	Ciclosporina A.
CyP-D	Ciclofilina-D.
DAG	Diacil glicerol.
DEPC	Dietil-pirocarbonato.
DIC	Optica de contraste diferencial de interferencia.
ECV	Enfermedad cerebro-vascular.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
EN	Envoltura nuclear.
ERO	Especies reactivas al oxígeno.
GABA	Acido gama-amino-butírico.
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.
IMR32	Células de neuroblastoma humano.
IP3	Inositol-3-fosfato.
Kv1.4	Canales de potasio dependientes de voltaje.
LCEA	Líquido cerebro-espinal artificial.
MAGUK	Membrane associated guanilato cinasa.

mAKAP	A-kinase anchoring protein.
NCX	Intercambiador Sodio/calcio.
NHERF2	Factor regulador 2 del intercambiador Na ⁺ /H ⁺ .
NMDA	Receptor ionotrópico del glutamato (ácido N-Methyl-D-aspartic).
NOS-1	Oxido nitroso sintetasa 1.
NR2	Subunidad del receptor NMDA.
PA	Potencial de acción.
PDZ	p5D95/DlgA/zonula occludens-1.
PHr	Postpotencial hiperpolarizante rápido.
PIP₂	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PKA	Proteína Cinasa A.
PKC	Proteína Cinasa C.
PMCA	ATPasa de calcio de la membrana plasmática.
PMR	Potencial de membrana en reposo.
RASSDF	1Ras effector protein.
RBM22	Factor de edición alternativa pre-mRNA.
RE	Retículo Endoplásmico.
Rs	Resistencia de la membrana plasmática.
RT-PCR	Reacción en cadena de DNA polimerasa junto con reverso transcripción.
RyR	Canales de rianodina.
SE	status epilepticus.
SERCA	ATPasa de calcio del retículo sarco-endoplásmico.
SPCA	Secretory pathway Ca ²⁺ ATPase.
TCE	Traumatismo craneoencefálico.
TM	Dominio transmembranal.
VDAC	Canal de aniones dependiente de voltaje.
WHO	Organización Mundial de la Salud.
XIP	Péptido inhibidor del NCX.

Tabla de Contenidos

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	10
SUMMARY	11
ANTECEDENTES	12
EPILEPSIA	13
CONCEPTOS GENERALES	13
FISIOPATOLOGÍA DE LAS PRINCIPALES CAUSAS DE EPILEPSIA EN EL HUMANO	14
Status epilepticus	14
Enfermedad Cerebro-Vascular (ECV)	16
Traumatismo Cráneo-Encefálico	17
PAPEL DEL CALCIO DE LA NEURONA EN LA EPILEPSIA	18
MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA CONCENTRACION DE CALCIO INTRACELULAR	24
PROTEÍNAS QUELANTES DE CALCIO EN NEURONAS	24
MEMBRANA PLASMÁTICA EN NEURONAS	24
ATPasa de calcio de la membrana plasmática	25
ISOFORMAS	26
Sitio A:	26
Sitio B:	27
Sitio C:	27
Participación del calcio en la regulación de la edición alternativa:	28
Localización:	30
Estructura:	30
Ciclo catalítico:	32
Regulación:	32
PMCA y enfermedad:	37
Intercambiador Na⁺/Ca²⁺	39
NCX y la epilepsia:	41
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN NEURONAS	42

ATPasa de calcio del retículo sarcoendoplásmico	42
Genes e isoformas:	42
Estructura:	43
Distribución de la SERCA en los tejidos:	43
Ciclo catalítico de la SERCA:	44
SERCA y epilepsia:	46
MITOCONDRIA EN NEURONAS	46
Entrada de calcio a la mitocondria	46
Modelo del manejo de calcio por la mitocondria	48
ENVOLTURA NUCLEAR EN NEURONAS	50
HIPOTESIS Y OBJETIVO	58
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	58
HIPOTESIS	58
OBJETIVO	59
OBJETIVOS PARTICULARES	59
METODO y MATERIALES	60
MATERIALES	60
PREPARACIÓN Y MANEJO DEL MATERIAL Y SOLUCIONES	60
MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA	61
REGISTRO ELECTROFISIOLOGICO	62
RT-PCR CUANTITATIVA DE CELULA UNICA	63
ANALISIS ESTADISTICO	64
RESULTADOS Y DISCUSION	66
ELECTROFISIOLOGIA	66
RT-PCR CUANTITATIVA DE CELULA	71
CONCLUSIONES	76
PERSPECTIVAS	76
BIBLIOGRAFIA	78
APENDICE	114

RESUMEN

En la literatura se han descrito ampliamente los cambios en la homeostasis del calcio observados en células epileptiformes a corto y largo plazo, consistentes en el aumento de los niveles de calcio citoplasmático. En las células excitables, el intercambiador sodio/calcio, junto con la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) desempeñan un papel importante en el control de los niveles de calcio. La participación en particular de PMCA se ha estudiado en períodos cercanos al estímulo epileptogénico aunque su papel no es bien conocido. El objetivo de esta tesis es investigar si la expresión de PMCA se altera de alguna forma en los estadios crónicos de la epilepsia en células piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas. Mediante un enfoque interdisciplinario utilizando registros de célula completa y RT-PCR cuantitativa demostramos consistentemente en la fase crónica de la epilepsia, cambios en las propiedades eléctricas tales como frecuencia de espigas, potencial de reposo de membrana y cambios en las propiedades pasivas de membrana. Una vez demostrada la excitabilidad alterada de las células de animales epilépticos, se estudiaron los transcritos de PMCA en las mismas células. Se encontró que los transcritos de la isoforma PMCA1 aumentaron significativamente un mes posterior al estímulo epileptogénico dado por pilocarpina. PMCA3 que es una isoforma relevante en tejidos excitables, disminuyó significativamente. La isoforma PMCA4 no mostró cambios importantes. Estos hallazgos sugieren que en el largo plazo, PMCA1 que es una isoforma lenta, tiene relevancia en el re-establecimiento de un equilibrio nuevo en el control de calcio en las células de animales epilépticos. En conjunto, este fenómeno sugiere que en los desórdenes convulsivantes ocurren cambios en el balance de isoformas que mantienen la homeostasis neuronal del calcio y que son fundamentales para la sobrevivencia de las células.

SUMMARY

Disruption of calcium homeostasis in epileptic cells is characterized by both short- and long-term perturbations of Ca^{2+} buffering systems observed as increases in intracellular calcium levels. Along with the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) plays an important role in excitable cells. The involvement of PMCA in epileptogenesis has primarily been studied in brief intervals after various stimuli; however, the specific contribution of this molecule to epileptogenesis is not yet fully understood. Our aim has been to investigate whether PMCA expression in the chronic stages of epilepsy is altered. Through an interdisciplinary approach, involving whole-cell recordings and real-time RT-PCR, we have shown that epileptic neurons in our preparation consistently show changes in electrical properties during the period of chronic epilepsy. These changes included increased spike frequency, altered resting membrane potential, and changes in passive membrane properties. Following these observations, which indicate an altered excitability in the epileptic cells studied, PMCA mRNA transcripts were studied. It was found that while *PMCA1* transcripts are significantly increased one month following the pilocarpine epileptogenic stimulus, *PMCA3* an isoform important in excitable tissues, was significantly decreased. These findings suggest that, in the long-term, a slow PMCA (*PMCA1*) plays a role in the reestablishment of a new calcium homeostasis attained by epileptic cells. Overall, this phenomenon points out to the fact that in seizure disorders, changes that take place in the balance of the different molecules and their isoforms in charge of maintaining neuronal calcium homeostasis, are fundamental in the survival of affected cells.

ANTECEDENTES

La epilepsia a pesar de conocerse desde hace 3000 años, no se entiende completamente. La batalla entre el prejuicio y la aceptación, la ignorancia y el conocimiento, el mito y la verdad, la charlatanería y la terapia racional ha sido un camino difícil para la ciencia. El entendimiento de la epilepsia ha evolucionado desde su primera descripción en Mesopotamia (3000 AC) donde se atribuía las crisis al dios de la luna. Otras culturas también la habían reconocido como una enfermedad derivada de un castigo divino, por ejemplo en: China (1700 AC), Egipto (1600 AC), India (1000 AC) y Babilonia (500 AC). Sin embargo, no es sino hasta las contribuciones de Hipócrates (400 AC) que la Medicina dio un salto muy importante en la concepción de la epilepsia. Hipócrates atribuía la epilepsia a un mal cerebral que requería tratamiento con dietas y drogas. Otro avance importante fué en el siglo diecisiete cuando se experimentó con el magnetismo y los fenómenos eléctricos, lo que inspiró a Descartes para proponer que la epilepsia se relaciona con fenómenos eléctricos en el cerebro. Leopoldo Caldani en la Universidad de Bologna trabajó con la electricidad friccional aplicada a animales causándoles crisis convulsivas. Pero fue Luigi Galvani (1791) quien al descubrir la electricidad animal y fundar la electrofisiología provocó un salto monumental en el entendimiento de la epilepsia. Sus trabajos sirvieron para el desarrollo de técnicas como la electroencefalografía que se utiliza ampliamente para el diagnóstico de la epilepsia; la cual fué desarrollada por el investigador inglés Richar Caton (1872) y aplicada en el humano por Hans Berger (1929). En esta época se empezó el estudio sistemático de la epilepsia y fueron los neurólogos Hughling Jakson, Williams Gowers y el neurocirujano David Ferrier quienes contribuyeron de manera muy importante. A partir de entonces el desarrollo de otras áreas de la ciencia son las que han hecho evolucionar al entendimiento de la epilepsia. Por ejemplo, el desarrollo de la biología molecular ha permitido comprender que las epilepsias históricamente reconocidas como ideopáticas tienen en realidad un sustento genético. A pesar de todos estos avances aún hoy en día persisten muchas incógnitas por dilucidar sobre la epilepsia que requieren de un trabajo interdisciplinario extenso (Goldensohn 2997).

EPILEPSIA

CONCEPTOS GENERALES

A lo largo de la historia la epilepsia se ha definido de distintas maneras, sin embargo, los distintos autores coinciden en definirla como un desorden neurológico caracterizado por crisis recurrentes y espontáneas. Esta crisis es la manifestación conductual sintomática de la descarga de alta frecuencia en forma anormal, espontánea y sincrónica de una población de neuronas (Lothman 1991; McNamara 1994, 1999). El origen anatómico de estas neuronas y su función determina en gran medida las manifestaciones clínicas que pueden ser muy diversas. A pesar de esta gran diversidad, todos los tipos de epilepsia comparten la característica de un aumento persistente en la excitabilidad de las neuronas y que se manifiesta esporádicamente como crisis (Lothman 1991; McNamara 1994, 1999).

Desde un punto de vista epidemiológico, la epilepsia afecta al 1-2% de la población mundial (Hauser&Hesdorffer 1990; McNamara 1999). Estudios hechos en Estados Unidos, Europa, China y Africa reportan una prevalencia de 5 a 8 /1000 habitantes (Dowzendo & Zielinski 1971; Hauser & Kurland 1975; Li 1985; Haerer 1986; Osontokun 1987; Hauser & Hesdorffer 1990). Su incidencia es ligeramente mayor en hombres que en mujeres (Annegers 1993) y la mayoría de las epilepsias se manifiestan en la infancia y en la tercera edad (Kramer 2001). La epilepsia es el tercer desorden neurológico más frecuente en ancianos después del accidente cerebrovascular y la demencia (Kramer 2001). Cabe señalar que el *status epilepticus* (SE) tiene una mayor incidencia de la que se suponía anteriormente, es más frecuente en la infancia y en el 30% (aprox.) de los casos se presenta como el primer evento (DeLorenzo 1997). Por otro lado, se ha estimado que el 50% de los casos nuevos de epilepsia son de tipo sintomático o adquirido (DeLorenzo 1989, 1991; Hauser & Hesdorffer, 1990) el otro 50% son idiopáticas ahora conocidas como genéticas (Frazen 2000). El tipo más frecuente de epilepsia es la del sistema límbico (o lóbulo temporal) que representa el 40% de todos los tipos (McNamara et al., 2006) y representa aproximadamente el 50% de los casos de epilepsia refractaria al tratamiento médico y cuando se generaliza al quirúrgico también (Hauser & Hesdorffer 1990).

Avances en la medicina molecular han permitido encontrar las etiologías que subyacen en algunas de las epilepsias idiopáticas como son: anormalidades en la migración celular (Rakic 2000) y numerosas mutaciones genéticas. En contraste, en las epilepsias de tipo adquirido hay una causa conocida que produce los cambios plásticos permanentes (Lohman et al. 1991; McNamara 1999), aún cuando hay causas genéticas que aumentan la probabilidad de que esto ocurra. En las epilepsias

adquiridas, el proceso de epileptogénesis puede ser iniciado por varios tipos de lesiones cerebrales (Herman 2002). De estas, las tres más frecuentes en países industrializados son la enfermedad cerebrovascular (ECV), el traumatismo craneoencefálico (TCE) y las causas que provocan SE como son: alcohol, cetoacidosis diabética, kernicterus, entre otras muchas más. En países no industrializados, las etiologías más frecuentes son el TCE, infecciones cerebrales y accidentes perinatales. En México, las etiologías tradicionalmente han sido la mismas de los países no industrializados,

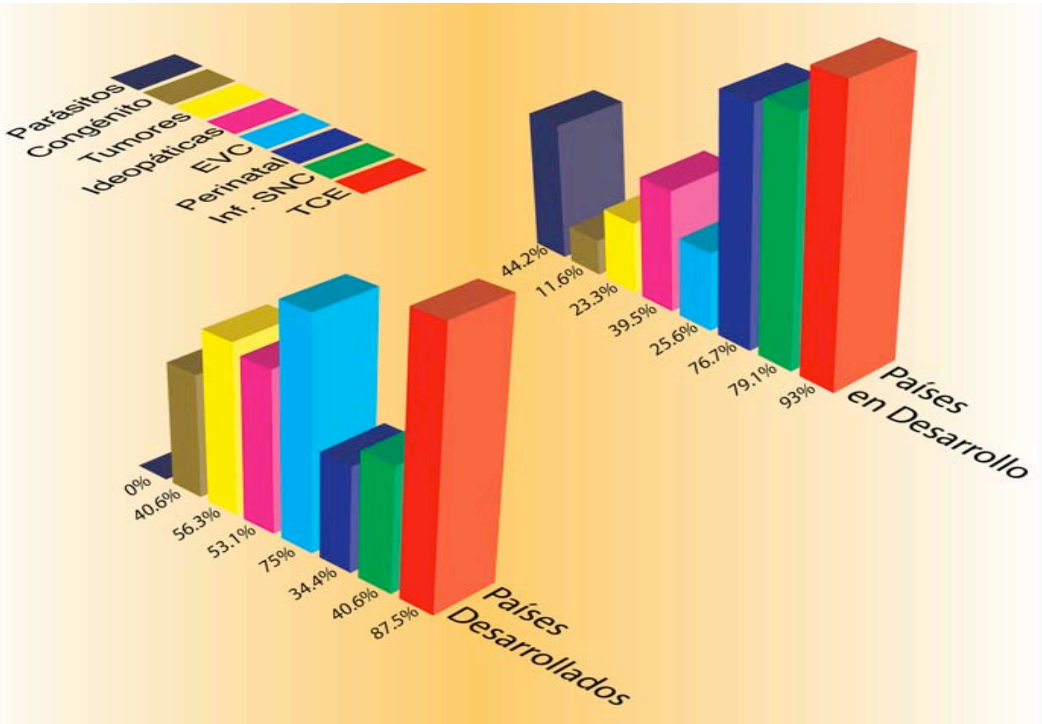


Figura 1.- Etiologías más frecuentes de epilepsia en países industrializados en comparación con los no industrializados. Modificado de Nadir EB, 2005.

pero su tendencia es seguir las mismas de los países industrializados (Epilepsy Atlas, WHO 2005) (1). EVC (enfermedad vascular cerebral), TCE (traumatismo craneo encefálico)

FISIOPATOLOGÍA DE LAS PRINCIPALES CAUSAS DE EPILEPSIA EN EL HUMANO

Status epilepticus

14

La liga internacional contra la epilepsia define al SE como una crisis que persiste por lo menos 30 min o son varias con un intervalo entre ellas tan corto que no permite recuperar la conciencia durante al menos 30

min. De manera interesante, aproximadamente 30% de los nuevos casos de epilepsia son provocados por SE (Aminoff et al. 1980; Bleck 1995). Solamente en los Estados Unidos de Norteamérica hay entre 102 mil a 152 mil casos de SE al año de los cuales, 55 mil mueren (DeLorenzo 1995). Hay dos grupos de causas del SE: por causas epilépticas y no epilepticas. Ejemplos del primer caso son: una epilepsia preexistente complicada por dejar el tratamiento, por alcoholismo, etc. Ejemplos del segundo caso que representan el 50% de los casos de SE (Phillips et al. 1989; Maytal et al., 1989) se encuentran: alteraciones metabólicas (alteraciones en los electrolitos, insuficiencia renal, cetoacidosis diabética, insuficiencia hepática), infecciones del sistema nervioso (como la cisticercosis), TCE, ECV y sustancias tóxicas.

El tipo de epilepsia más frecuente es la del lóbulo temporal (ELT), sus principales características son: 1) la localización de un foco epiléptico en el sistema límbico, particularmente en el hipocampo, corteza entorrinal y amígdala (Bartolomei et al., 2005); 2) La asociación frecuente a eventos que precepitan el desarrollo de la epilepsia por ejemplo traumatismos, periodos de isquemia-anoxia, etc. (Mathern et al., 2002); 3) un intervalo de tiempo en donde no hay crisis epilépticas y al cual se le llama epileptogénesis; y 4) una alta incidencia de alteraciones por muerte neuronal, secundarias a las crisis como la esclerosis hipocampal o mesial (Mathern et al., 1997b).

La mayor parte de estas características pueden ser reproducidas en modelos animales de ELT crónico, como el "Kindling" (McIntyre et al. 1982; Brandt et al 2003) y el status epilepticus (Morimoto et al., 2004; Ben-Ari et al. 1980; Cavalheiro et al, 1982; Turski et al 1983). Uno de los modelos de *status epilepticus* involucra el uso de pilocarpina que es un agonista del receptor muscarínico M1 y ha sido ampliamente utilizado desde su primera descripción en la década de los ochentas por Turski y colaboradores (1983a,b). Las características más importantes de este modelo son: La inducción del SE es mucho más rápido que con otras sustancias inductoras de SE como son: ácido kaínico, 4-amino piridina y pilocarpina. La presencia de un periodo de latencia o epileptogénesis seguido de la aparición de crisis espontáneas y recurrentes (fase crónica) (Laité et al., 1990; Cavalheiro et al., 1991). La aparición de lesiones cerebrales por muerte neuronal y otras por una reorganización de la red neuronal el llamado fenómeno de "sprouting" (Weiser, 2004). Controlando la duración del SE a 1 hr en ratas se produce una pérdida neuronal de aproximadamente el 10% en la región de CA1 (Rice et al 1996) lo que es muy parecido en el ser humano. Este daño neuronal secundario al SE, se debe principalmente a la aparición de radicales libres a consecuencia de un agotamiento de la energía metabólica por una excesiva excitabilidad y a un aumento significativo del glutamato extracelular que promueve una entrada de calcio citotóxico (Wasterlain et al 1993; Heinemann et al 2002a, 2000b; Sherwin 1999). Por último, la dificultad para contener las

crisis epilépticas tanto en pacientes con ELT como en animales tratados con pilocarpina (Glien et al., 2002). Estas características las comparte con la ELT.

La inducción de *status epilepticus* por parte de la pilocarpina depende de la activación del receptor muscarínico M1, lo cual se ha demostrado en ratones deficientes (Knockout) ya que no desarrollan el SE en respuesta a la pilocarpina (Hamilton et al., 1997). Otras sustancias colinérgicas como el carbacol y la oxotremorina también tienen la posibilidad de inducir SE (Olney et al., 1983; Turski et al., 1983b). Por el contrario, antagonistas muscarínicos como la atropina pueden bloquear el desarrollo de SE (Clifford et al., 1987). Se ha demostrado en pacientes epilépticos, mediante la técnica de microdiálisis previa a cirugía de epilepsia, que el glutamato extracelular está elevado a niveles tóxicos (During & Spencer 1993; Wilson et al. 1996). Lo mismo se ha demostrado en modelos experimentales (Liu et al. 1997; Smolders et al 1997; Peña & Tapia 1999; Ueda et al 2002). Este incremento en el glutamato extracelular se ha implicado en la muerte celular dado que los antagonistas específicos de glutamato (en particular el NMDA) protegen de este daño (Meldrum 1997; Rice & De Lorenzo 1998; Hort et al 1999; Ebert et al 2002; Smolders et al, 1997). Más aún, existen evidencias que sugieren que una vez iniciada la SE, ésta se mantiene por la activación del receptor NMDA para el glutamato (Nagao et al., 1996; Smolders et al., 1997).

La lesión inicial es análoga a las crisis febriles, a la enfermedad cerebral-vascular, a las infecciones del SNC o al traumatismo craneoencefálico que se presentan en el humano. Se ha demostrado que cuando no se interrumpe la SE con medicamentos, se producen las mismas alteraciones anatómicas que la ELT en humanos. Por todas estas características, el modelo experimental de la pilocarpina representa una herramienta adecuada para investigar los mecanismos fisiopatológicos de la epilepsia del lóbulo temporal.

Enfermedad Cerebro-Vascular (ECV)

La ECV se define como el daño cerebral causado por una reducción transitoria o permanente del riego sanguíneo a una región del sistema nervioso central. Es la tercera causa de muerte en los Estados Unidos (Wolf & D'Agostino 1998). El National Institute of Neurological Disorder and Stroke incluye en la definición de ECV al infarto cerebral, hemorragia cerebral y subaracnoidea (Vaughan & Bullock 1999), secundario a esto se desarrolla una lesión isquémica en regiones irrigadas por el vaso sanguíneo afectado (Lee et al 1999). El 85% de la ECV ocurre por oclusión trombótica o embólica de un vaso sanguíneo (Wolf & D'Agostino 1998) que genera una región de isquemia-anoxia severa en la región irrigada por el vaso.

Eventualmente, tanto células gliales como neuronas mueren creando una región de infarto cerebral pan-necrótico (Dietrich 1998). Alrededor de esta zona se forma una región que sufre una isquemia parcial conocida como penumbra isquémica (Astrup et al 1981), la cual recibe irrigación por vasos colaterales que impide se extienda el infarto pan-necrótico pero sufre una isquemia transitoria (Vaughan & Bullok 1999). De manera muy importante, al disminuir el flujo de sangre oxigenada al tejido cerebral disminuye la producción de substratos de alta energía como el ATP y la fosfocreatina (Lipton 1999). Produciendo a su vez la falla de sistemas de transporte como la ATPasa de Na^+/K^+ , lo que altera los gradientes de concentración de estos iones resultando en una despolarización de la membrana. Esta despolarización llamada anóxica (Katsura et al. 1994) está acoplada a un flujo de calcio a través de canales voltaje-dependientes lo que induce la liberación masiva de neurotransmisores como el glutamato, GABA y acetilcolina (Lipton 1999). Se ha documentado en varios trabajos una elevación importante del glutamato extracelular en el humano (Bullock et al. 1995; Davalos et al. 1997). En la región pan-necrótica, el glutamato se eleva desde niveles fisiológicos de 5 mM hasta 100 mM inclusive a 10 mM (Graham et al. 1990; Wahl et al. 1994; Rusakov and Kullmann 1998). Esto provoca la activación del receptor para el glutamato NMDA y por lo tanto una entrada de calcio cuyos valores oscilan entre 200 nM y 30 mM (Lipton 1999); en la región de la penumbra isquémica, el glutamato extracelular alcanza niveles menos críticos (30 a 50 mM) (Shimada et al. 1990; Wahl et al., 1994; Morimoto et al., 1996). Por lo tanto, la entrada de calcio no es tan severa y la muerte celular es menor, lo que explica que esta región de penumbra isquémica sea el substrato de la epileptogénesis. A pesar de ello la entrada de calcio también contribuye a generar una despolarización anóxica; la mayor parte mediada por el receptor al glutamato NMDA ya que al ser bloqueado inhibe también la despolarización anóxica (Gill et al. 1992).

Traumatismo Cráneo-Encefálico

El traumatismo cráneo encefálico (TCE), es una causa frecuente de morbi-mortalidad en el mundo (Ghajar, 2000) y en adultos jóvenes es una causa muy frecuente de epilepsia (Negers 1993). Los principales factores de riesgo de epilepsia postraumática son: el TCE severo, heridas penetrantes como heridas por arma de fuego, contusiones con hematoma y coma asociado a fracturas de cráneo (Asikainem et al. 1999; Angeleri et al. 1999; Walker 1989; Annegers and Coan 2000; Herman, 2002).

La lesión se inicia por una fuerza mecánica que se distribuye hacia el cerebro. La lesión primaria ocurre al momento del impacto e inicia una segunda lesión que se extiende por mecanismos como son: alteración del

subministro de sangre oxigenada, ruptura de la barrera hematoencefálica e inflamación. Como consecuencia, en el lugar del impacto mecánico y área circunvecina ocurren fenómenos de apoptosis y necrosis neuronal (Golding et al. 1999; Lenzlinger et al., 2001; Raghupathi, 2004). Se ha demostrado en el humano que en las regiones circunvecinas, donde las neuronas sobreviven, hay un aumento del glutamato extracelular (Yamamoto et al. 1999; Gopinath et al. 2000) que también se ha descrito en modelos experimentales animales (Laurer and McIntosh 1999). Esta liberación de glutamato, entre otros neurotransmisores, al igual que en la ECV se debe a una alteración en el mantenimiento de los gradientes de concentración iónicos con la consiguiente despolarización celular (Katayama et al. 1990). Al igual que en la ECV, al bloquear los receptores NMDA también se evita la despolarización celular y por lo tanto la liberación de glutamato (Maeda et al. 1998).

Es importante señalar que el TCE, la ECV y el SE son provocados por lesiones diferentes, pero comparten mecanismos comunes para la producción de la lesión cerebral. Consistentemente hay un incremento patológico del glutamato extracelular y por lo tanto, un incremento en el calcio intracelular.

PAPEL DEL CALCIO DE LA NEURONA EN LA EPILEPSIA

Para su estudio, la epilepsia de tipo adquirido puede dividirse en tres fases: La primera es la de lesión. En esta fase se da el estímulo patológico (traumatismo cráneo-encefálico, enfermedad cerebrovascular, *status epilepticus*, etc) que dispara los mecanismos que llevan al animal u hombre a la epilepsia. La segunda fase es la de inducción o epileptogénesis la cual consiste en un periodo de tiempo variable donde se inician los fenómenos que traen como consecuencia los cambios plásticos para producir la epilepsia. La tercera fase es la de epilepsia crónica la cual se inicia cuando los fenómenos plásticos se vuelven permanentes y desde el punto de vista clínico hay crisis epilépticas de manera espontánea.

La entrada de calcio a la célula nerviosa es mediada por varios mecanismos de los cuales los sinápticos, mediados por el receptor a glutamato son unos de los más importantes. En consecuencia, durante la epileptogénesis la liberación de este neurotransmisor aumenta notablemente. Un segundo mecanismo involucra a los canales de calcio dependientes de voltaje que también se activan durante la crisis epiléptica (McNamara et al 2006). Otros mecanismos involucrados en el fenómeno pero de manera más limitada son los reservorios internos presentes en el retículo endoplásmico y la mitocondria.

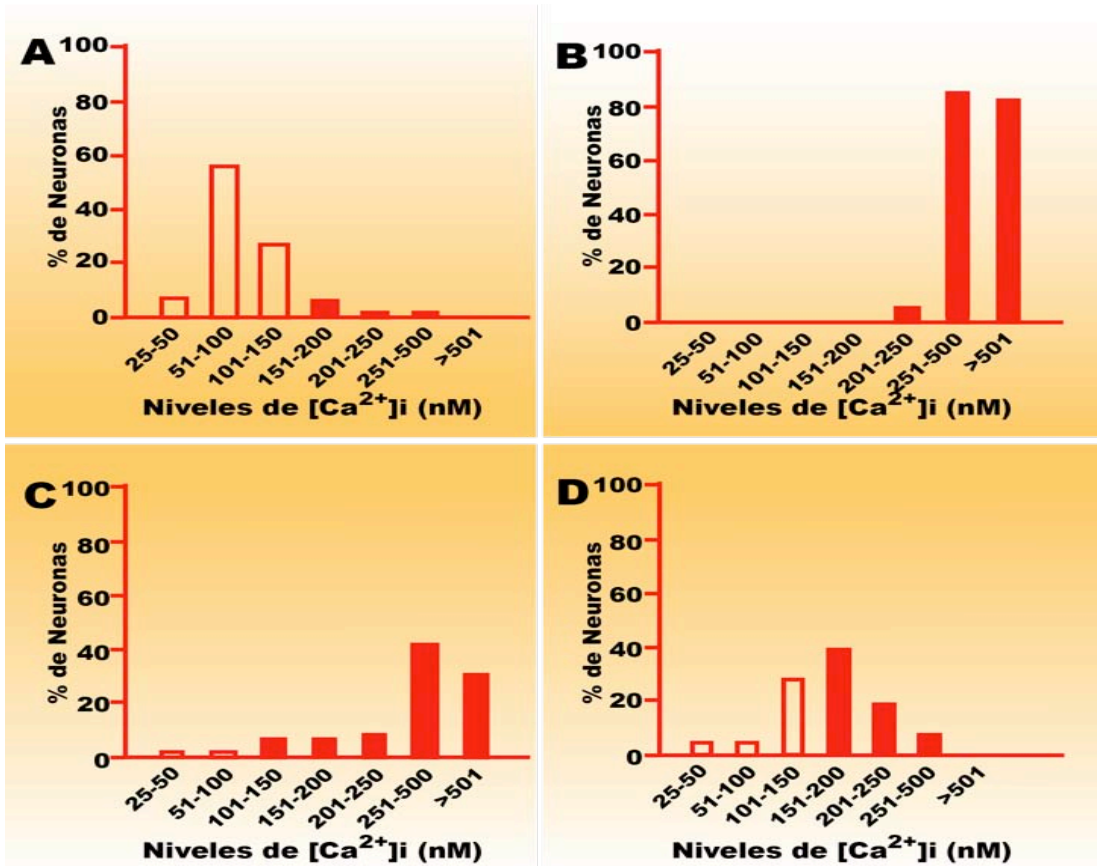
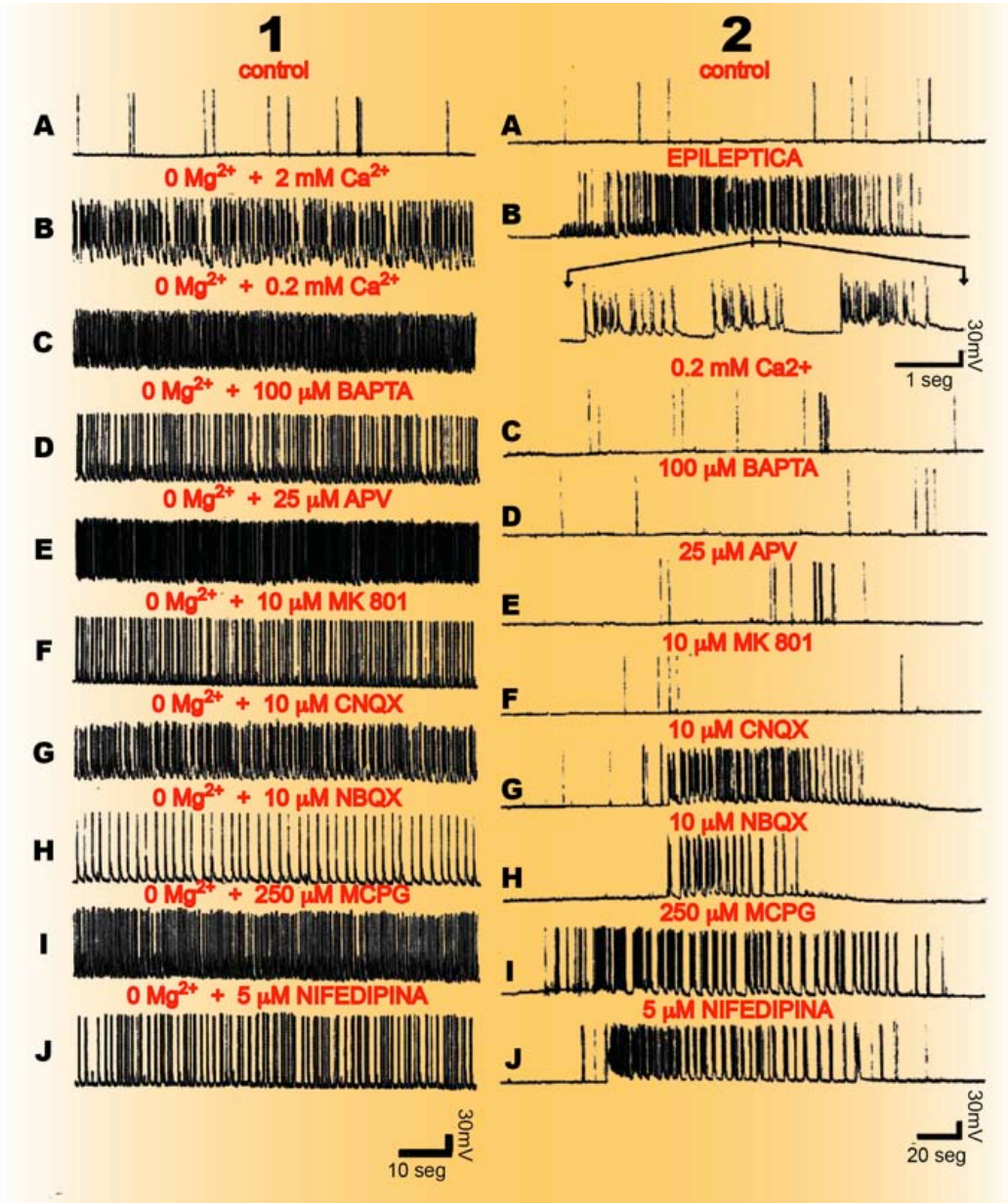


Figura 2.- Distribución de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas de hipocampo de animales. A los animales se les indujo *status epilepticus* mediante la aplicación de pilocarpina para posteriormente analizar los niveles de calcio basal en células del hipocampo mediante microfluorometría con Fura-2. En A se muestran los datos para animales control ($n=21$), en B animales en la etapa aguda (1 día), en C de latencia (6 días) y en D crónica (30 días) después del *status epilepticus*. Los datos representan la distribución de los niveles de calcio como el porcentaje de neuronas en cada rango de concentración. Los rangos normales (25-150 nM) son representados con barras vacías y los rangos anormales con barras rellenas. Tomada de Raza et al., 2004.

La entrada normal del calcio tiene un papel muy importante en la función de las células (Berridge 1998), pequeños cambios en los niveles de calcio intracelular tienen varios efectos fisiológicos en las células. Estos efectos fisiológicos incluyen la diferenciación celular (Spitzer, 1994), actividad sináptica (Brose et al., 1992; Llinas et al., 1992), mantenimiento del citoesqueleto (Trifaro y Vitale, 1993), expresión genética (Santella y Carafoli 1997), entre otras. La concentración basal intracelular de calcio en neuronas es de 100 nM en promedio (Mody y MacDonald, 1995) en tanto que la concentración extracelular de calcio es de 1 mM. Para mantener la concentración basal, la célula cuenta con varios mecanismos homeostáticos como son: las proteínas amortiguadoras de calcio (calbindina, calmodulina, etc.), el secuestro en pozas internas (retículo



endoplásmico, mitocondrias, membrana nuclear), y las proteínas que conforman el sistema de extrusión de calcio (intercambiador sodio/calcio NCX y la ATPasa de calcio de la membrana plasmática PMCA). El papel de estos sistemas de regulación del calcio durante la epileptogénesis lo hemos descrito recientemente (Bravo-Martínez et al., 2010).

Figura 3.- Registro de la actividad epileptiforme continua en células piramidales del hipocampo de ratas en cultivo (panel 1) y posterior a la actividad epileptiforme (panel 2). En el Panel 1 se obtuvieron registros intracelulares en células piramidales de hipocampo antes, durante y después de un tratamiento de 3-horas con una solución de bajo magnesio usando protocolos ya establecidos, con lo cual se indujo la actividad epileptiforme continua. Los registros son muestras representativas de más de 10 experimentos independientes para cada condición. (A) Registro representativo de una neurona control mostrando potenciales de acción espontáneos de baja frecuencia. (B-J) registros intracelulares representativos durante un tratamiento con una solución experimental: B, con bajo magnesio y calcio normal (2 mM), C con bajo calcio (0.2 mM) o diversos agentes farmacológicos (D-J). Durante el tratamiento con bajo magnesio, las células desarrollan potenciales sinápticos de mayor duración y múltiples potenciales de acción que evolucionan a ráfagas tónicas de alta frecuencia (4-20 Hz). La frecuencia de estas ráfagas varía de célula a célula. Los tratamientos con bajo calcio (0.2 mM; C), APV 25 μ M (E), y MK801 10 μ M (F), consistentemente mostraron descargas de mayor frecuencia. El tratamiento con NBQX 10 μ M y nifedipina 5 μ M (J) produce descargas de una frecuencia ligeramente menor y después de restaurar los niveles de magnesio normal, todas las descargas espontáneas continuas se atenuaron. Tomado de DeLorenzo et al., 2005.

En el Panel 2, se muestran los registros de la actividad epileptiforme espontánea y recurrente en neuronas cultivadas de hipocampo 2 días después de un tratamiento como el mostrado en el Panel 1. Al igual que en el panel 1, los registros mostrados son representativos de 10 experimentos independientes para cada condición. Se puede observar actividad epileptiforme espontánea después del tratamiento estándar, 2 mM de calcio (B), 10 μ M CNQX (G), 10 μ M NBQX (H), 250 μ M MCPG (I), y 5 μ M nifedipina (J). El tratamiento con bajo calcio (C) o un quelante de calcio (100 μ M; D) como el BAPTA y sobre todo los que bloquean los receptores NMDA (E, F) impiden completamente el desarrollo de crisis epileptiformes espontáneas. Tomada de DeLorenzo 2005.

CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) Antagonista competitivo del receptor AMPA/Kainato del glutamato.
 NBQX (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione) antagonista del receptor AMPA.
 AP5 o APV ((2R)-amino-5-fosfonovaleric acid; (2R)-amino-5-fosfonopentanoate) antagonista competitivo selectivo del receptor NMDA para el glutamato.

MK-801, antagonista no competitivo del receptor NMDA.

(efecto citotóxico). Sin embargo, cuando esta entrada no es tan severa se activan fenómenos que inducen cambios plásticos en la neurona como la potenciación a largo plazo, mecanismo propuesto para explicar la memoria (Abel y Lattal, 2001; Huang y Hsu, 2001; Davies et al., 2002; Lynch 2004). Uno de estos cambios plásticos y que quizá sea el más dramático y de largo plazo, es el desarrollo de la epilepsia adquirida. Después de ser expuesto a una lesión (fase de lesión), en el tejido cerebral se inicia una fase en donde se activan mecanismos que provocan cambios plásticos permanentes (fase de inducción). La consecuencia final de dichos cambios es el desarrollo de la epilepsia adquirida (epileptogénesis) y una vez que estos cambios se vuelven permanentes se inicia la fase crónica.

Existe amplia evidencia de que la alteración de los niveles de calcio intracelular juega un papel muy importante en el desarrollo de la epilepsia adquirida, y que se mantiene en las tres fases (DeLorenzo et al., 1998; Rice y DeLorenzo, 1998; Pal et al., 2000, 2001; Sun et al., 2002, 2004). En un estudio de epilepsia adquirida inducida con pilocarpina, se demostró que en células de la región de CA1 del hipocampo de rata el calcio intracelular se eleva de 100 nM a aproximadamente 900 nM inmediatamente después del *status epilepticus* (DeLorenzo et al., 1998). Estos niveles bajaron hasta llegar a una meseta (de 300 nM) aproximadamente 6 días después los cuales se mantuvieron así permanentemente (Figura 2 y 4A) .

Como ya se ha mencionado la entrada de calcio a la célula se puede llevar a cabo principalmente a través de los canales de calcio dependientes de voltaje y los receptores para el glutamato como, el NMDA y en ciertas condiciones el AMPA. Una evidencia de esto, es el hecho de que en modelos experimentales de epilepsia *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que el bloqueo del receptor NMDA, en la fase de lesión, es efectivo en impedir la pérdida neuronal y el fenómeno de “sprouting” (McNamara y Routtenbeg, 1995). Sin embargo, esto no impide la descarga neuronal excesiva del SE pero sí el desarrollo de la epilepsia adquirida (Stafstrom et al., 1993; Rice y DeLorenzo, 1998; Anderson et al., 1987). En contraste, es muy interesante el hecho de que el bloqueo de los receptores al glutamato AMPA, kainato y metabotrópicos al igual que canales de calcio dependientes de voltaje, no impiden el desarrollo de la epilepsia (DeLorenzo et al., 1998; Sun et al. 2002) (Figura 3).

En las fases de lesión e inducción, el bloqueo solamente del receptor NMDA es capaz de impedir el desarrollo de la epilepsia (Pal et al., 1999). De la misma manera, si en estas fases se altera la fuerza electromotriz que impulsa al ion calcio a cruzar por el receptor NMDA reduciendo la concentración de calcio intracelular, tampoco impide las descargas excesivas de la neurona pero si el desarrollo de la epilepsia (DeLorenzo, 1998). Lo anterior sugiere que el calcio no es el responsable de las descargas neuronales, sino del desarrollo de la epilepsia. Más aún, si se substituye el calcio por el ion bario en la solución de registro, también se impide el desarrollo de la epilepsia (DeLorenzo, 1998; Sun et al., 2002) (Figura 3), lo que indica que es el calcio como segundo mensajero y no como acarreador de cargas el que induce la epilepsia. Un dato importante que se comprobó en estos modelos experimentales, corresponde a que estadísticamente es más significativa para el desarrollo de la epilepsia, la duración de la entrada de calcio que la intensidad con la que entra este ion (Sun et al., 2002). Este dato ahora, nos permite entender porque los pacientes que presentan una crisis epiléptica por primera vez, tienen muy pocas probabilidades de desarrollar epilepsia debido a que la crisis no dura el tiempo suficiente. Sin embargo, los que presentan *status epilepticus* sí desarrollan la epilepsia, ya que la crisis dura 30 min o más.

El incremento en el calcio intracelular basal también es evidente en la fase crónica, los niveles quizá son menores a los de las otras fases, sin embargo, son significativamente más elevadas que el control (Figura 2). Se ha encontrado que estos niveles alterados perduran hasta un año después del *status epilepticus* (Raza et al., 2004) (Figura 4A). Un dato muy importante es que en experimentos con cultivos agudos (se utilizan las neuronas al poco tiempo de disociar el tejido) de neuronas piramidales de CA1 del hipocampo de ratas tratadas con pilocarpina y en fase crónica, se demostró que al retarlas con pulsos de glutamato de distinta concentración, entra la misma cantidad de calcio que las células control (Raza et al., 2001)

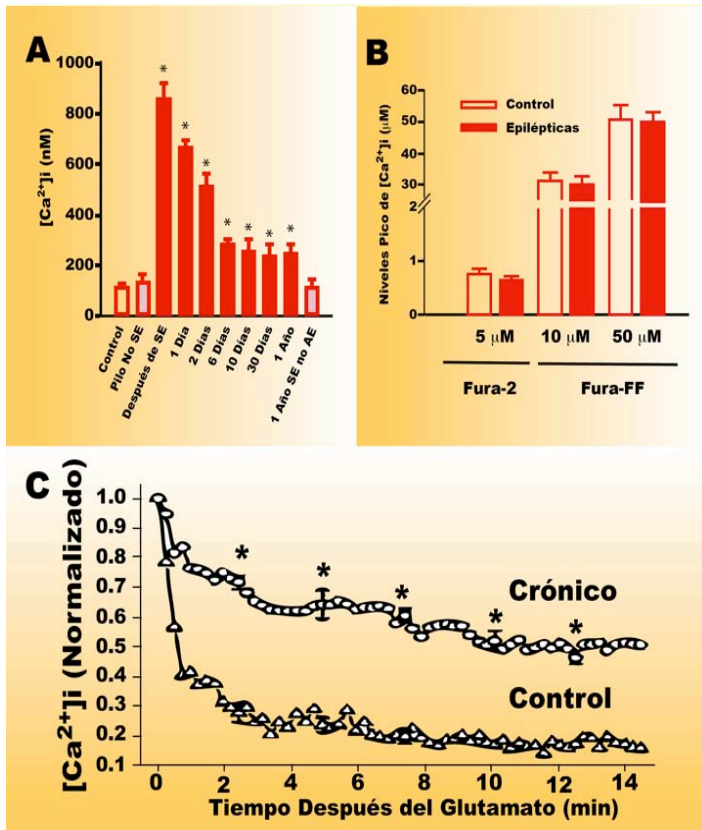


Figura 4 .- (A) Medición del calcio intracelular por microfluorimetría con fura-2 en las fases de lesión, epileptogénesis y crónica de la epilepsia adquirida. Las neuronas se obtuvieron a distintos tiempos después de haberles inducido el *status epilepticus* con pilocarpina. Los datos indican un incremento significativo inmediatamente después del *status epilepticus* y permanecen elevados hasta un año después. Aún cuando los niveles de calcio disminuyen con el tiempo, estos nunca llegan a los de las células control.

(B) Niveles máximos de calcio intracelular en neuronas control y epilépticas en respuesta a varios aumentos de calcio intracelular por glutamato. Se determinaron valores absolutos de calcio intracelular en respuesta

a concentraciones de glutamato bajo (5 μM) y alto (10 y 50 μM) con Fura-2 y Fura-FF respectivamente. Los niveles máximos de calcio en neuronas control y epilépticas no son estadísticamente diferentes para ningún tratamiento.

(C) Curva de aclaramiento de calcio intracelular de neuronas en fase crónica de epilepsia inducida por pilocarpina. A cada neurona se le estimuló con glutamato a fin de que entre calcio a la célula. Posteriormente se determinó la concentración intracelular de calcio mediante microfluorimetría con fura-2 y cada curva fue generada calculando la concentración promedio a intervalos de 15 seg para posteriormente normalizarlos al valor máximo obtenido. Después del tratamiento las células se recuperaron y no presentaron apoptosis. Las células control presentaron una caída inicial más rápida que en las crónicas. En ningún caso el calcio llegó a los valores basales de las células control.

Tomadas de Raza et al., 2001,2004.

(Figura 4B). El curso temporal del aclaramiento de calcio intracelular en estas mismas células muestra claramente que en las células de animales epilépticos crónicos los niveles de calcio bajan, sin embargo nunca llegan al nivel de las células control. El mismo comportamiento se observa en las

tres fases del desarrollo de la epilepsia (Raza et al., 2004) (Figura 4C). Al parecer en la fase crónica de la epilepsia, la entrada de calcio a las células es normal pero los mecanismos homeostáticos que regulan los niveles basales de calcio intracelular están alterados.

MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA CONCENTRACION DE CALCIO INTRACELULAR

Existen tres grupos de mecanismos especializados para remover el calcio del citoplasma. Un grupo corresponde a los mecanismos que se encuentran en el citoplasma como las proteínas de amortiguamiento del calcio. Un segundo grupo lo constituye aquellos mecanismos localizados en compartimentos intracelulares como el retículo sarco-endoplásmico, la mitocondria y la membrana nuclear y que secuestran el calcio citoplasmático (Strehler et al, 2001; Minelli et al, 2007). El tercer grupo se encuentra en la membrana plasmática que permite la extrusión de calcio por la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador sodio/calcio (NCX). Ambas proteínas trabajan en contra de un importante gradiente de calcio y son dependientes de forma directa e indirecta de la producción de ATP (Tymianski et al., 1996).

PROTEÍNAS QUELANTES DE CALCIO EN NEURONAS

Un factor importante en el control espacio-temporal de las señales de calcio es la presencia de amortiguadores de calcio móviles como son la parvoalbúmina, la calbindina y la calmodulina entre otras (Neher, E., 1998). La parvoalbúmina se encuentra en neuronas que descargan rápidamente (por ejemplo en interneuronas de la región del hilio en el hipocampo), mientras que la calbindina se encuentra principalmente en las células excitadoras grandes como son las piramidales del hipocampo y corteza cerebral (Baimbridge et.al., 1992). Sin embargo, debido a su reducida capacidad de retener calcio, su función probablemente incide más como modulador de las señales de calcio que en el de control de su concentración basal.

MEMBRANA PLASMÁTICA EN NEURONAS

24

Dado que en las neuronas la SERCA es poco abundante, los mecanismos de extrusión de calcio localizados en la membrana plasmática tienen una mayor importancia (Misquitta et al., 1999). Estos mecanismos

de extrusión de la membrana plasmática son dos, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA). El intercambiador es electrogénico ya que transporta tres iones de sodio por cada ion de calcio. Su afinidad por el calcio es de 1-2 μM y transporta 50-250 nM/mg de proteína por segundo. La PMCA tiene una afinidad por el calcio de alrededor de 100-200 μM y transporta 0.5 nM/ mg de proteína por segundo. Así, en las neuronas estas dos proteínas son principalmente las responsables de modular las señales de calcio en su concentración máxima y su curso temporal al igual que la regulación de la concentración basal del calcio.

ATPasa de calcio de la membrana plasmática

La ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) pertenece a la familia de ATPasas tipo-P y a la subfamilia IIB y comparte las propiedades esenciales con la SERCA, incluyendo la formación del aspartil fosfato en su ciclo y la alta afinidad por el calcio (K_m 0.2-0.5mM) (Lutsenko et al., 1995; Møller et al., 1996). La reacción de hidrólisis del ATP que cataliza la PMCA para transportar calcio de un lugar a otro, se ha considerado como un mecanismo de bombeo del calcio del interior al exterior de la célula.

Hay tres familias de genes que codifican varios tipos de bombas de calcio: la ATP2A, ATP2B y ATP2C que codifican para la SERCA, PMCA y SPCA (secretory pathway Ca^{2+} ATPase), respectivamente (Wuytack et al., 2002). En los mamíferos la PMCA es el producto de cuatro genes distintos (*ATP2B1-4*) que se localizan en el loci cromosomal humano 12q21.3-q23, 3p25.3-p26, Xq28 y 1q32.1-q25 (Strehler et al., 2001). El ATP2B1 tiene 22 exones (100kb) (Hilfiker et al., 1993), ATP2B2 tiene 23 exones (350kb), ATP2B3 tiene 21 exones (60kb) y el ATP2B4 que tiene 24 exones (70kb) (Burk et al., 1992).

En el humano la bomba muestra un 99% (96% en rata) de homología entre las isoformas excepto en el extremo C-terminal, debido a la edición alternativa que genera una gran cantidad de variantes. El número y tamaño de los exones se conservan entre los cuatro genes, en el humano los tamaños varían de 60kb a 350kb (Brandt et al., 1992; Strehler et al., 2001). Los transcritos de la PMCA tienen un proceso de edición alternativa (splicing) en dos sitios principales, el sitio A en la primera asa intracelular y en el sitio C ubicado en el extremo C-terminal, lo que en teoría daría muchas variantes; sin embargo, solo se han encontrado 20 de estas variantes (Strehler et al., 2001; Figura 5). Un tercer sitio, el sitio B es motivo de controversia como se discute más adelante.

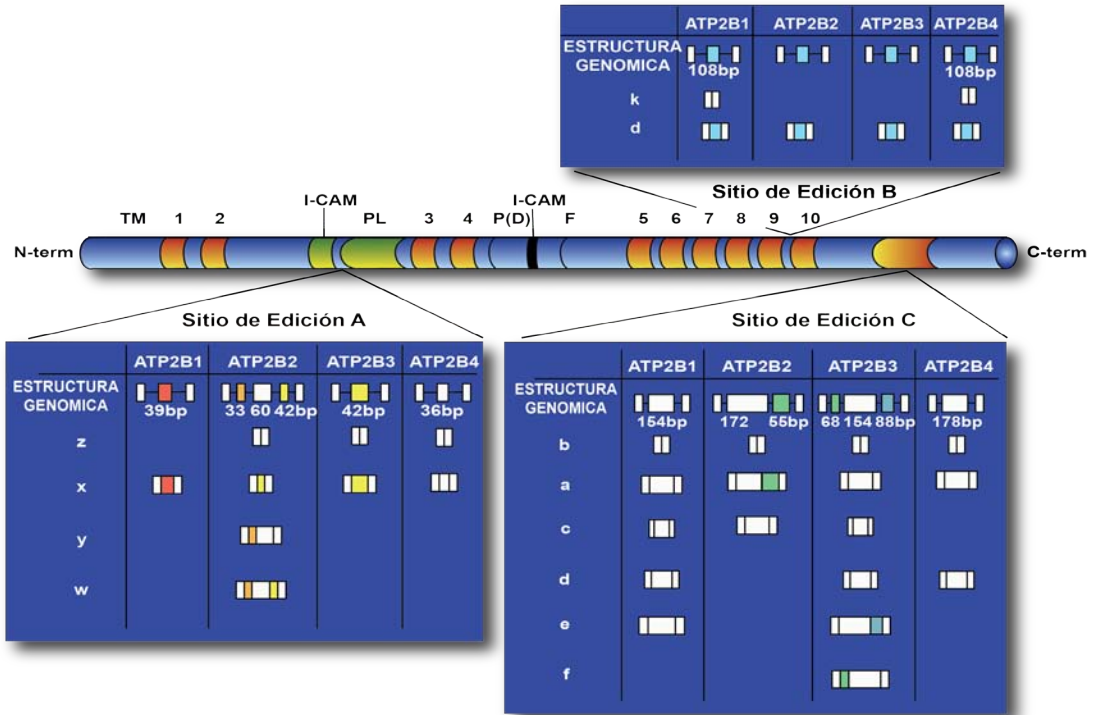


Figura 5.- Sitios de edición alternativa de los genes que codifican la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA). El sitio A se localiza muy cercano al dominio sensible a fosfolípidos e involucra a diferentes exones. El sitio C se localiza en el dominio de unión a calcio-calmodulina, involucra un patrón de edición muy complejo ya que hay varios exones con sitios donadores internos. El sitio B que se encuentra entre los dominios transmembranales 9 y 10, es controvertido ya que no se ha encontrado aún su significado fisiológico. Modificada de Zacharias et al., 1995; Kamagate et al., 2000.

ISOFORMAS

Sitio A:

Aún cuando la edición alternativa del sitio A (Figura 5) pudiera en teoría generar muchas variantes solo se han encontrado algunas para cada gene. La edición alternativa de este sitio involucra un exón pequeño de 36-42nt, que en la PMCA1 siempre está presente (PMCA1x) (Carafoli 1994; Bobe et al., 2005). En tanto que en la PMCA3 y PMCA4 la edición de este exón (de 42nt y 36nt respectivamente) da dos variante, la x que lo incluyen y la z en donde está ausente. En el caso de la PMCA2, estan involucrados tres exones de 33, 60, y 42nt, por lo tanto se producen más variantes (Heim et al., 1992), donde todas están presentes (w), todas ausentes (z), solo con un exón de 42nt (x) o solo con dos exones de 33 y 60nt (y) (Adamo et al., 1992). La edición alternativa de este sitio puede altera el sitio de unión a fosfolípidos en la primera asa, esto desde luego afecta la regulación de la PMCA por fosfolípidos. De la misma forma también cambia la accesibilidad

de la región donde se ubica el receptor para la autoinhibición y por lo tanto afectando a este mecanismo (Strehler et al., 2001).

Sitio B:

Las características de organización molecular del sitio B (Figura 5) aún están en discusión y al parecer solo se han encontrado variantes de la PMCA1 y 4 en el humano y en hígado de rata (Delgado-Coello, et al., 2003; Santiago-García, et al., 1996; Howard et al., 1994, 1994). Se propone que se removería un segmento de 108nt que afecta al dominio TM 10 lo que implicaría una reestructuración de la topografía de la proteína (Burk et al., 1992; Hilfiker et al., 1993).

Sitio C:

El sitio de edición alternativa C (Figura 5) involucra el sitio de unión a la calmodulina (CaM-BD) y afecta su afinidad. Todas las isoformas tienen edición alternativa del sitio C con varios grados de complejidad ya que también involucra varios sitios donadores internos (Figura 6). Esta edición alternativa afecta a la mitad C-terminal del CaM-BD (Stauffer et al., 1993; Keeton et al., 1993; Santiago-García et al., 1996). En el caso de la PMCA1, se generan cinco variantes, en la PMCA2 tres; en la PMCA3 seis o siete; y en la PMCA4 tres. En general las variantes "a" tienen baja afinidad por la calmodulina (CaM), su activación depende de otras moléculas no así la variante "b" que principalmente se activa por calmodulina, esto hace que las variantes "a" sean mucho más rápidas que las "b". En PMCA1, la secuencia de amino ácidos (IQTQ) de esta región varía dependiendo de si se conserva el exon de 154 ó 175 nt en las isoformas "a" o se excluye en las "b". La inclusión en la variante "a" afecta al resto del extremo C-terminal ya que cambia el marco de lectura de la secuencia y se establece un codón de paro que se traduce en una proteína con 5kDa menos que la isoforma "b". Las isoformas "c y d" tienen una longitud igual que la "b" en tanto que la "e" es igual a la "a" (Strehler et al., 2001), por lo que esta diferencia afecta la sensibilidad de las PMCA's a calmodulina. El CaM-BD está localizado en la extremo C-terminal 18 aminoácidos río arriba del sitio de edición alternativa y 10 aminoácidos río abajo. En el caso de las isoformas "a" estos residuos quedan separados y no se forma el CaM-BD, en tanto que en las isoformas "b" se eliminan los exones del sitio de edición alternativa y estos aminoácidos quedan contiguos formando el CaM-BD. Esto hace a la isoforma "a" menos dependiente de calmodulina y tener mayor actividad basal de bombeo de calcio (Strehler et al., 2001).

La edición alternativa de esta región implica tres (en PMCA1 y 4) o cuatro (en PMCA2 y 3) exones. El primero de estos exones codifica una región constante del CaM-BD y es equivalente en cada gen. El sitio donador para la edición alternativa es idéntico en los cuatro genes, pero en los distintos genes puede ser unido a 2 ó 3 sitios donadores (Keeton et al.

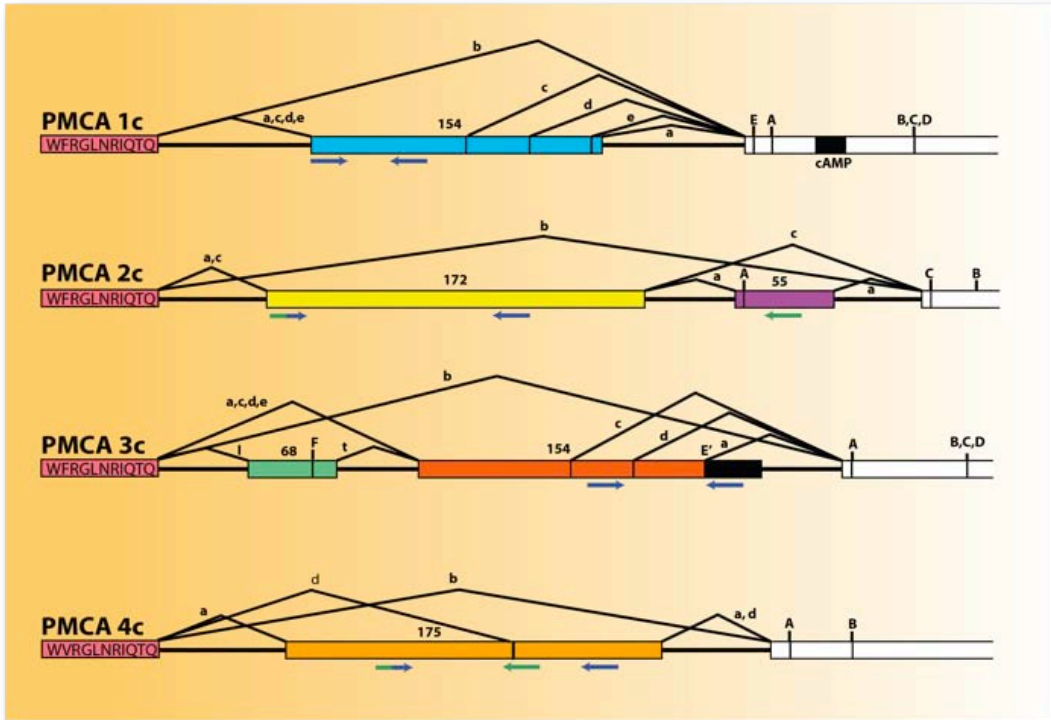


Figura 6.- Esquema representativo de la edición alternativa del sitio C de la PMCA. Tomado de Delgado-Coello B et al., 2010.

1993). El último exón, también es equivalente en los cuatro genes y tiene un solo sitio aceptor el cual puede ser unido a uno de 2 ó 3 sitios donadores en los cuatro genes. Si el sitio donador del primer exón se une al donador del último exón se establece la variante “e”. Cada gene tiene un exón que codifica la región más ácida y variable del CaM-BD (154, 172, 154 y 175nt de las PMCA1-4 respectivamente) (Keeton et al., 1993). En PMCA1 y 3 este exón contiene múltiples sitios internos de donación. En el caso específico de la PMCA3e y “3f” el potencial sitio donador en el extremo 3’ del exón de 154nt no se utiliza por lo que se incluye al intrón. Las isoformas PMCA2 y PMCA3 contienen otro exón de 55 y 68 nt, respectivamente que no tienen las otras (Keeton et al., 1993) (Figura 6).

Participación del calcio en la regulación de la edición alternativa:

En la actualidad está bien documentado el hecho de que una de las consecuencias de un aumento en el calcio intracelular, en particular en el núcleo, es la inducción a la expresión de genes (Sheng et al., 1990). Este proceso se lleva a cabo mediante factores de transcripción dependientes de calcio como son: CREB, CREMt, ATF-1, SRF, ETS-1, entre otros (Matthews et al., 1994; Enslén et al., 1994; Sheng et al., 1991; Sun et al.,

1995; Sun et al., 1996; Miranti et al., 1995; Pognonec et al., 1988; Fisher et al., 1991), que a su vez son substrato de la Cinasa IV dependiente de calcio-calmodulina (CAMKIV) (Jensen et al., 1991; Bito et al., 1996). De la misma manera, el calcio está involucrado en la regulación de la edición de los transcritos.

Black y su grupo han aportado evidencias de que la CAMKIV también esta involucrada en la edición de transcritos de canales de potasio activados por calcio (Xie et al., 2001; Xie et al., 2005; Lee et al., 2007). Xie y Black demostraron que solo la CAMKIV y no la I o la II está involucrada en este proceso, encontraron también a un elemento de RNA reactivo a CAMKIV (CARRE) y que medía la edición alternativa de los pre-mRNAs (Xie J et al., 2001). Ellos también encontraron una secuencia consenso (CACATNRTTAT) en varios genes que responden a la CAMKIV incluyendo a los de la PMCA (Xie et al., 2005).

En varios trabajos se ha documentado que el patrón de expresión de las distintas PMCA's varía en los distintos tejidos y que la expresión de algunas variantes están aumentadas en el proceso de desarrollo neuronal. El sistema nervioso tiene la mayor diversidad de variantes, sin embargo, los mecanismos de regulación de la edición alternativa no se conocen completamente. Zacharias y Strehler en 1996 demostraron en células IMR32 de neuroblastoma que la edición alternativa ocurría en el sitio A de la PMCA2 en respuesta a un incremento de calcio intracelular por despolarización mediante KCl (Zacharias et al. 1996). Ellos encontraron que en células normales se expresan las variantes 2x y 2w en tanto que en células tratadas solo la 2w. Este efecto es revertido por quelantes de calcio como el BAPTA. Por otro lado, Guerini y colaboradores encontraron en el proceso de diferenciación en células granulosas de cerebelo que no hay edición alternativa en el sitio A, pero sí en el sitio C por la despolarización prolongada incubando las células con KCl (Guerini et al. 1999). Los autores encontraron que la PMCA1a, 2 y 3 aumentaba su expresión en tanto que la 4 disminuye cuando aumenta la entrada de calcio inducida por KCl. Sin embargo, cuando el calcio aumenta considerablemente al activar también los receptores NMDA con glutamato, la PMCA1a aumenta y las 2, 3 y 4 disminuyen casi hasta desaparecer. Parece ser que la secuencia consenso para la CARRE coincide con el segundo sitio donador del exon 21 de la PMCA1 y al pegarse por acción de la CAMKIV (activada por calcio), en la edición alternativa se genera la variante 1a en lugar de otras (Strehler et al. 1989). Otra forma de incidir en la edición alternativa es a través de la ALG-2 que es una proteína unidora de calcio la cual se encontró que interactúa con la RBM22 que a su vez es una proteína que se une al RNA. La RBM22 se encontró como proteína auxiliar del splicesosoma cuya función no se conoce aún (Vito et al. 1997; Krebs et al. 2000, 2002; Kitaura et al. 2001).

Localización:

Los genes presentan diferentes patrones de expresión dependiendo del tejido, así la PMCA1 y 4 se expresan en todas las células (Strehler et al., 2001; Stauffer et al. 1995). Sin embargo, la PMCA1 es más abundante en cerebro, pulmones e intestino (Greeb et al. 1989; De Jaegere et al. 1990; Howard et al. 1993), en tanto que la isoforma 4 es más abundante en riñón, eritrocitos, músculo estriado, estómago, intestino, cerebro y espermatozoides (Howard et al. 1993; Brandt et al. 1992; Okunade et al. 2004). La PMCA2 y PMCA3 se restringen a tejidos específicos, la isoforma 2 en tejido nervioso y glándula mamaria (Stauffer et al. 1995; Reinhardt et al. 2000) y la isoforma 3 en cerebro y músculo esquelético (Stauffer et al. 1995; Brown et al. 1996; De Jaegere et al. 1990). También hay la posibilidad de que la transcripción de estos genes esté regulada por calcio, como lo sugieren experimentos en células de Purkinje del cerebelo donde el incremento en calcio intracelular provoca una sobre-expresión de la isoformas 2 y 3 en tanto que la isoforma 4 desaparece y la tres cambia a una forma truncada (Guerini et al. 1999).

Estructura:

El modelo topológico de la PMCA está basado en la estructura predicha y ahora ya confirmada de SERCA (McLennan., 1985; Toyoshima., 2000). PMCA es una cadena polipeptídica organizada en 10 dominios transmembranales (TM) y cuatro dominios citoplasmáticos. Estos dominios citoplasmáticos son: El extremo N-terminal, dominio transductor, dominio catalítico, y el extremo C-terminal o dominio regulador. El extremo N-terminal consta de 80-90 aminoácidos y es la región más variable de las cuatro isoformas básicas (Di Leva et al., 2008; Figura 7). Esta región puede interactuar con otras proteínas y su efecto en general es inhibitorio. El asa intracelular entre TM2 y 3 forma el dominio transductor el cual juega un importante papel en transmitir los cambios conformacionales que ocurren en el ciclo de la bomba. Contiene el sitio de interacción con los fosfolípidos (Zvaritch et al., 1990; Brodin et al., 1992), el sitio A de edición alternativa (Chicka et al., 2003; Grati et al., 2006; Hill et al., 2006) y uno de los dos sitios de unión para el extremo C-terminal (Falchetto et al., 1992). En un lado del sitio A (río arriba), se encuentra una secuencia de aminoácidos de alta homología con el sitio de unión a las subunidades $\beta\gamma$ (de proteínas G) de otras proteínas que unen proteínas-G. Este sitio está involucrado en la migración de la PMCA a las regiones apicales de la célula (Chen et al., 1995). El asa intracelular entre TM4 y 5 (de 400 residuos) contiene el centro catalítico de la bomba, tiene un aspártico fosforilado (D) y un residuo conservado de lisina (K). Ambos son parte del dominio de unión de ATP (Di Leva et al., 2008). Tiene también uno de los dos sitios de unión para el extremo C-terminal (Falcheto et al., 1991) formando junto con el de la otra asa el receptor para el extremo C-terminal (en su configuración

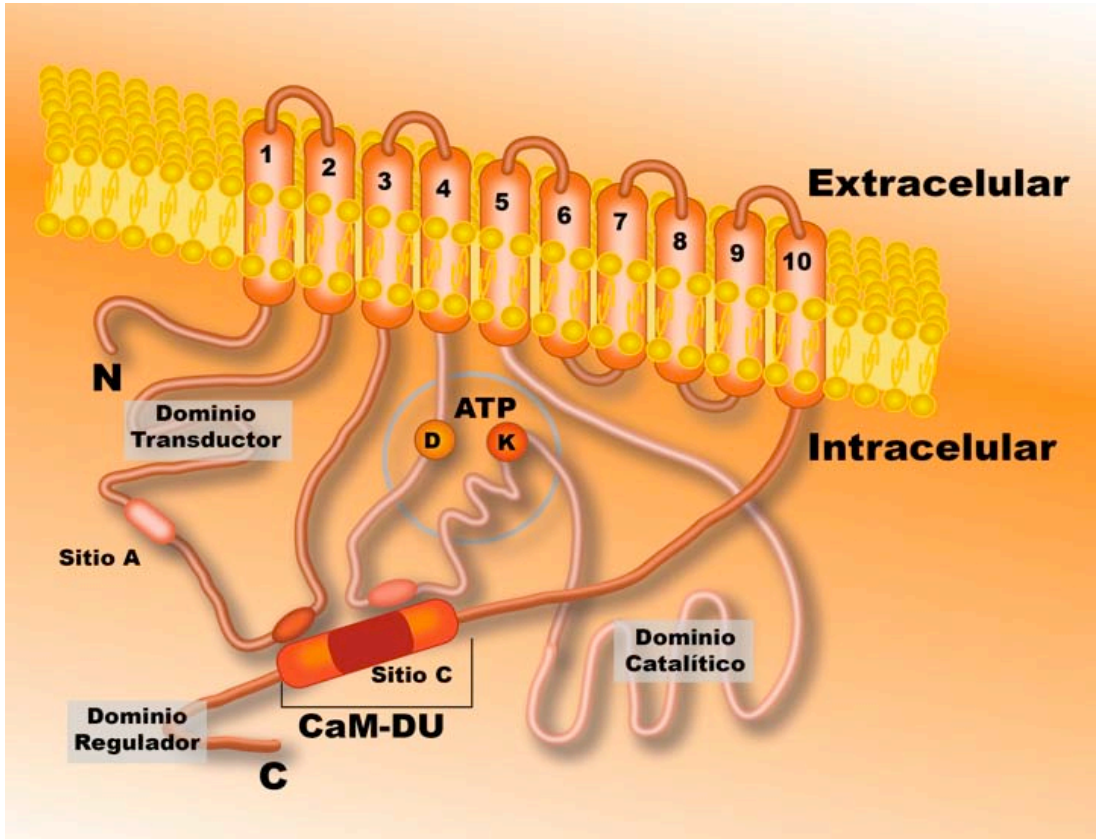


Figura 7.- Esquema topológico de la PMCA. Los diez dominios transmembranales (DT) están simbolizados como cilindros numerados 1-10. El dominio autoinhibitorio de la calmodulina (CaM-DU) se encuentra unido a sus sitios receptores en la primera (entre DT2 y DT3) y segunda (entre DT4 y DT5) asas intracelulares. El dominio transductor contiene el sitio de edición alternativa A. Se muestran las posiciones aproximadas del fosforil-aspartato (D) y la lisina (K) que forman el sitio de unión para el ATP en el dominio catalítico. El sitio de edición alternativa C se encuentra en el dominio transductor (en el CaM-DU). Modificada de Di Leva F et al., 2008.

autoinhibitoria) (Figura 7). El extremo C-terminal de la PMCA de mayor longitud que en la otras ATPasas (70-200 residuos), contiene el sitio de unión para la calmodulina (CaM-BD, con cargas positivas) el cual actúa como una secuencia autoinhibitoria al unirse a los dos sitios de las dos asas intracelulares (James et al., 1988). La unión de la CaM se piensa que remueve la CaM-BD de sus sitios de unión inhibitorios. El extremo C-terminal también contiene sitios de fosforilación para las proteínas cinasas A y C (Monteith et al., 1995; Penniston et al., 1998), y en el caso de la PMCA2b y PMCA4b, el sitio de unión para otro número de proteínas reguladoras como el p5D95/DlgA/zonula occludens-1 (PDZ) (Vorherr et al., 1991), así como también otro sitio de regulación por fosfolípidos. La cola tiene aproximadamente 10 residuos en las isoformas "a" y aproximadamente 150 en las "b". En esta última los cuatro últimos residuos conforman la

secuencia consenso mínima para la unión del dominio de interacción PDZ de algunas proteínas.

Ciclo catalítico:

El ciclo catalítico de la PMCA es similar al descrito para la SERCA, el cual muestra dos estados conformacionales llamados E1 y E2 (Krebs et al., 1987). En el estado conformacional E1, la enzima expone un sitio de unión de alta afinidad hacia el citoplasma y la fosforilación de un residuo de aspartato por la hidrólisis de un ATP promueve un cambio de conformación y la transición de E1~P ® E2-P. En la conformación E2, la enzima expone

el calcio unido a la cara extracelular de la membrana y disminuye la afinidad por el ion. Una vez liberado el ion calcio, el intermediario E2-P se rompe y la enzima regresa a su conformación E1 (Di Leva et al., 2008; Figura 8).

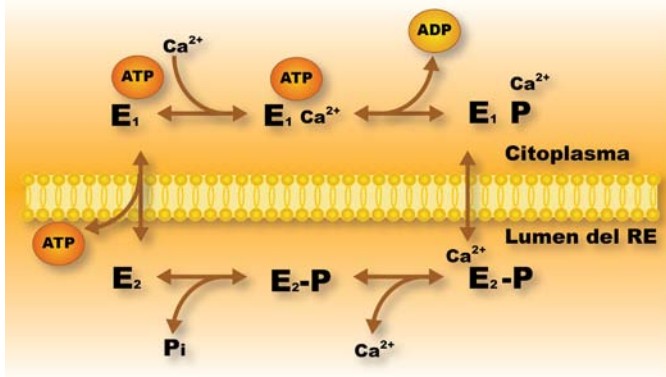


Figura 8.- Ciclo Catalítico de la PMCA. Este ciclo catalítico esta basado en el de la SERCA. La proteína tiene dos estados conformacionales el E1 y el E2, en el E1 la proteína expone sus sitios de unión de alta afinidad a calcio hacia el citoplasma (a diferencia de la SERCA la PMCA solo tiene un sitio de unión). La hidrólisis del ATP y la fosforilación de la proteína provoca el cambio conformacional (E2, de baja afinidad) para la translocación de los iones de calcio hacia el espacio extracelular. La salida del Pi provoca que los sitios de unión de calcio disminuya su afinidad liberando el calcio y el cambio conformacional a E1. Modificado de Di Leva F et al. 2008.

A diferencia de SERCA que transporta 2 Ca²⁺ por 1 ATP, la estequiometría de PMCA es de 1 (Niggli et al., 1982). PMCA solo tiene un sitio de unión al calcio que se asume corresponde al segundo sitio de unión de la SERCA (Toyoshima et al., 2000 y 2002). La PMCA intercambia 1 Ca²⁺ por 1 H⁺ por lo que es parcialmente electrogénica (Hao et al., 1994). Todas las bombas tipo P son inhibidas por el ortovanadato VO₃(HO)²⁻ y por

La³⁺. Este último, a diferencia de las demás bombas tipo P, aumenta el estado-estable del intermediario fosforilado (Luterbacher et al., 1983). El consumo de energía por las bombas de calcio se calcula en un 20-50% de la energía total en músculo esquelético, 15-30% en músculo cardiaco y hasta el 70% en tejido nervioso.

Regulación:

La bomba sin estimulación tiene una baja afinidad por el calcio (Kd hasta 10-20mM) y en teoría estaría inactiva a concentraciones fisiológicas de calcio. Hay varios mecanismos que aumentan la afinidad, bajando la

Kd hasta valores de 100 a 200nM (Falcheto et al, 1991 y 1992). Uno de ellos es el activador tradicional, la calmodulina (Gopinath 1977; Jarrett et al., 1977), en ausencia de ella el sitio de unión está unido a un receptor intramolecular compuesto de dos regiones; la primera cercana al sitio alcalino que une fosfolípidos ácidos en el asa entre TM2-3, el segundo se encuentra cerca del sitio activo en el asa entre TM4-5, lo que la mantiene inhibida. En general las isoformas “a” tienen menor afinidad por la calmodulina que las isoformas “b”. La edición alternativa de la PMCA1 le confiere a la unión de la calmodulina sensibilidad al pH, de esta manera a la isoforma 1b se le une calcio-calmodulina a pH de 7.2 y 5.9 con igual afinidad, en tanto que las isoformas 1a, 1c y 1d unen calmodulina a pH más bajos (Di Leva et al., 2008).

La bomba también puede ser regulada por la influencia de la composición de fosfolípidos de la membrana plasmática (en particular los fosfatidilinositolfosfatos y fosfatidilserina) que la rodea (Pang et al., 2005; Tang et al., 2006). En particular, los fosfolípidos ácidos y los poliinsaturados pueden activar a la bomba uniéndose a dos regiones: una en el sitio de unión de CaM (Brodin et al., 1992) y el otro en la primera asa (Pinto et al., 2002). La activación por fosfolípidos puede ser aún más importante que la calmodulina ya que puede bajar la Kd hasta 100nM (Enyedi et al., 1987). La fosfatidilserina puede activar hasta 50% de la activación máxima y el PIP2 que también es un potente activador, interesantemente es el único fosfolípido ácido que puede cambiar su concentración en forma drástica en respuesta a una señal extracelular (Carafoli et al., 1982; Choquette, et al., 1984). Sin embargo, los productos de la hidrólisis del PIP2, el IP3 y el DAG no tienen efecto en la bomba (Carafoli 1991). Dado que estos fosfolípidos se encuentran en la membrana rodeando la bomba, se piensa que esta puede estar permanentemente activada hasta 50%. Los fosfolípidos ácidos se unen a la PMCA en dos sitios: el primero se encuentra en el sitio A de edición alternativa y el otro se encuentra en el sitio de unión del CaM.

La bomba también puede ser regulada por la fosforilación de residuos de serina/treonina por la PKA y la PKC, la primera lo hace en un sitio consenso (KRNSS) encontrado solo en la PMCA1b y 2b río abajo de CaM-BD. Esto incrementa la Vmax y la afinidad por el calcio (James, et al., 1989). La PKC fosforila un residuo de treonina ubicado en el CaM-BD y actúa en las isoformas 2a, 3a, 4a y 4b. La fosforilación de los residuos de serina/treonina activa a la bomba, en tanto que la fosforilación de tirosina inhibe a la bomba (Dean et al., 1997; Wan et al., 2003). Por otro lado, la Cinasa Src fosforila la tirosina de la PMCA4 y la cinasa de adhesión focal (Focal adhesión kinasa, FAK) fosforila el mismo residuo en la PMCA4 durante la activación plaquetaria (Dean et al., 1997).

La PMCA puede ser escindida por la calpaina y las caspasas 1 y 3 en los aminoácidos ubicados río arriba de la CaM-BD, lo que eliminaría

el mecanismo de autoinhibición manteniendo a la bomba constitutiva e irreversiblemente activa. Cabe señalar que de alguna manera la PMCA1 es más sensible a la calpaina que las demás (James, et al., 1989; Dean, WL., et al., 1997; Wan, TC., et al., 2003; Eang, KK., et al., 1992).

La PMCA puede asociarse en dímeros mediado por la CaM-BD, lo que produce una activación (Cavieres, et al., 1984; Minocherhomjee, et al., 1983; Kosk-Kosicka, 1988). Este mecanismo se considera como protección contra la desnaturalización, sin embargo, se necesita una concentración de la proteína de 10-20 mM y dado que PMCA representa solo 0.1-0.01% de las proteínas de membrana, este mecanismo parece improbable en la célula. Donde es probable que ocurra la dimerización es en las caveolas debido a que en ellas hay muchos fosfolípidos ácidos, calmodulina y colesterol y se agrupan algunas isoformas de PMCA (aun que algunos tipos celulares no tienen caveolas) (Fujimoto, 1993; Schmitzer, et al., 1995).

La bomba puede ser regulada por proteínas G heterotriméricas ya que ha visto que inmediatamente antes del sitio de edición alternativa A hay una secuencia de amino ácidos similar a los sitios de unión de las subunidades $\beta\gamma$ en otras proteínas efectoras (Chen, et al., 1996; Lambright, et al., 1996).

El colesterol también es un modulador importante de la cinética de PMCA, en sarcolema y membrana de eritrocitos, que a bajas concentraciones de colesterol la actividad de la PMCA aumenta (Ortega et al., 1984; Ortega et al., 1986). El colesterol también le confiere termoestabilidad a la PMCA en sarcolema y membrana de eritrocitos (Mas-Oliva et al., 1990; Ortega et al., 1996; Santiago-Garcia et al., 2000).

La PMCA interactúa con otras proteínas que aun cuando no se ha visto que tengan una función directa de modulación, si tienen otras funciones. Por ejemplo: algunas de ellas involucradas en el reclutamiento y mantenimiento de una isoforma en particular, ubicar a la PMCA en regiones particulares de la membrana plasmática, otras regulan la habilidad de exportar calcio (DeMarco, et al., 2001) (Figura 9). Otra función importante proviene de su interacción con moléculas involucradas con vías de señalización, lo que sugiere que puede jugar un papel como modulador en la transducción de señales (Armesilla, et al., 2004). La proteína 14-3-3e interactúa con el extremo N-terminal de las isoformas 1, 3 y 4 pero no con la isoforma 2. Esta proteína inhibe la translocación del calcio por la PMCA (Linde et al. 2008; Rimessi et al., 2005). Hasta la fecha no se ha encontrado otra proteína que interactúe directamente con este dominio. Dado que la isoforma PMCA2w es dirigida directamente a la parte apical de las células ciliadas cocleares, se piensa que esta debe interactuar con proteínas que medien su migración (Reinhardt et al., 2000).

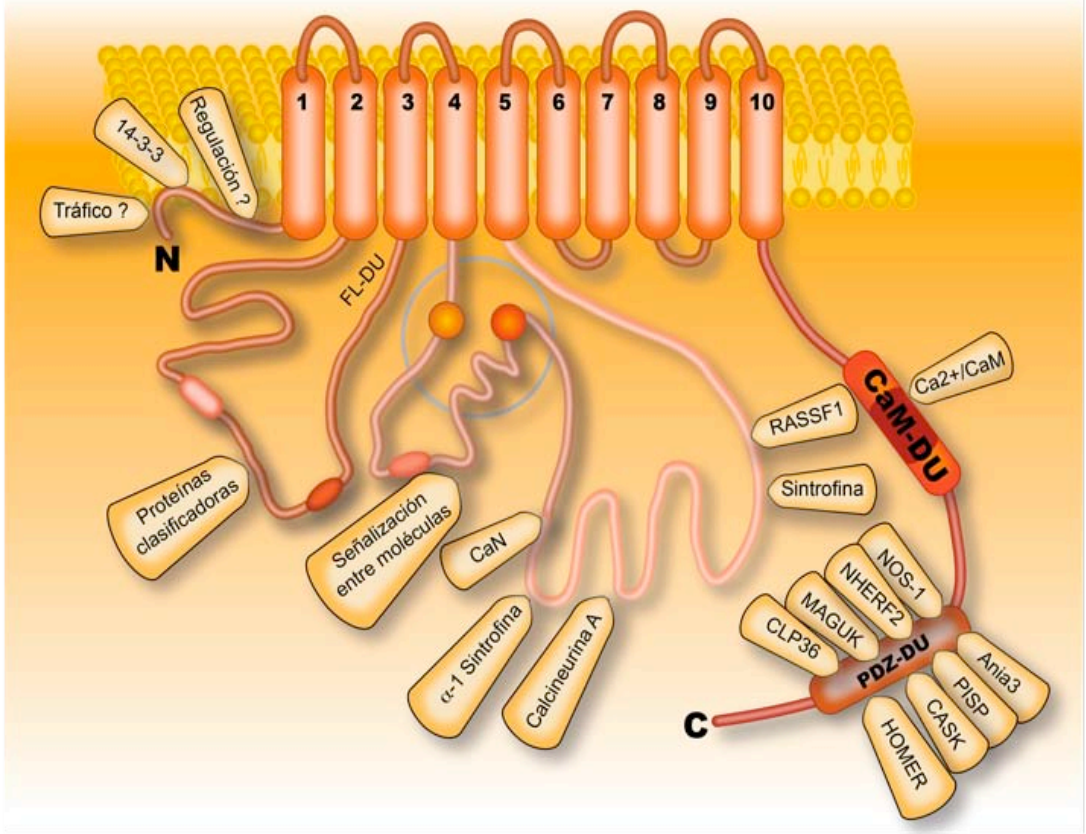


Figura 9.- Esquema topológico de la PMCA junto con las proteínas con las que interactúa pero no modifican su actividad. Modificada de Di Leva f et al. 2008 y Strehler EE et al., 2007.

Otras moléculas interactúan con el asa entre TM4 y 5 y son: Ras effector protein (RASSDF1), α -1sintrofin, calcineurina (Armesilla et al., 2004; Figura 9). La PMCA4b es un modulador negativo para la vía de señalización de la calcineurina. La α -1 sintrofina se une a la PMCA1 y 4, se piensa que forman complejos de señalización terciarios con la PMCA y la oxido nitroso sintetasa 1 (NOS-1). La RASSF1 interactúa con la isoforma 4b e inhibe la vía de señalización mediada por Ras del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF)(Williams et al., 2006). La proteína Ania-3, es una proteína de la familia Homer que se acopla a los receptores NMDA y metabotrópico del glutamato. Esta asociación liga a las señales extracelulares de calcio con su liberación de las pozas internas; más aún, puede hacer que se junten las PMCAs en los dominios cercanos a los sistemas de entrada de calcio en las neuronas, lo que hace más eficiente la regulación de este ion (Sgambato-Faure et al., 2006; Figura 9).

Muchas moléculas interactúan con el dominio de unión PDZ en el extremo C-terminal de la PMCA2b y 4b por ejemplo, la subunidad NR2 del receptor NMDA y el canal de potasio Kv1.4 (Kim et al., 1995; Kornau et al., 1995; Songyang et al., 1997). También interactúan con los miembros de la familia de cinasas MAGUK (membrane associated guanilato cinasa, SAP) a través del dominio PDZ. Las MAGUK están asociadas al citoesqueleto celular por lo que se sugiere que actúan como andamiaje o agrupadoras para varios receptores membranales y transportadores, posiblemente estas cinasas anclen a la PMCA en el citoesqueleto y la mantienen agrupada en dominios específicos membranales para controlar mejor el calcio regional. Las MAGUK tienen varios dominios PDZ y tiene la capacidad de asociar varias cinasas (PKA y PKC) a blancos específicos como el receptor NMDA o las PMCA (Figura 9).

Otras proteínas pueden agrupar a las PMCA en las caveolas (Fujimoto 1993), membranas basolaterales de los epitelios; la PSD-25 por ejemplo las agrupa en las espinas sinápticas y estereocilios de células ciliadas.

La proteína NHERF2 (factor regulador 2 del intercambiador Na⁺/H⁺) que contiene el dominio PDZ interactúa con la isoforma PMCA2b en forma específica, probablemente manteniéndola en un microdominio específico de la membrana (DeMarco et al., 2001; Figura 9). La PMCA4b interactúa con el dominio PDZ de la óxido nitroso sintetasa I (NOS-I), así la sobre expresión de la PMCA4b reduce la actividad de la NOS-I la cual es inducida por una depleción de calcio en la proximidad de la enzima (Schuh, et al., 2001). La proteína PISP (PMCA interacting single PDZ domain) interactúa con todas las PMCA, se expresa en forma ubicua y puede intervenir en su ubicación en la membrana plasmática (Goellner et al., 2003). La serina proteincinasa dependiente de calcio calmodulina (CASK) es otra cinasa de la familia MAGUK y es un coactivador de los promotores, también actúa con la PMCA4b (Schuh et al., 2003).

La proteína CLP36 actúa con la actina del citoesqueleto y también interactúa con la PMCA4b (en el dominio PDZ), está involucrada en la translocación durante la activación plaquetaria (Boxulic et al., 2007).

Todos estas moléculas se han estudiado más en otros tipos celulares como fibras musculares y hepatocitos, pero en neuronas se sabe muy poco. La idea general que se tiene en la actualidad (en particular en neuronas) es que el intercambiador y la PMCA actúan junto con los mecanismos intracelulares de regulación de calcio (proteínas amortiguadoras de calcio y el secuestro en pozas internas) para moldear temporal y espacialmente las señales de calcio (Thayer et al., 2002). La célula genera las isoformas necesarias conformando un grupo de herramientas que son ubicadas en los compartimentos celulares requeridos para regular de manera adecuada las necesidades específicas del calcio intracelular (Thomas et al., 1996;

Berridge et al., 2000; Bootman et al., 2001). También, las células poseen mecanismos para establecer microdominios específicos para la regulación de calcio. Ya que es de suma importancia la organización subcelular de los organelos involucrados en la regulación de calcio y su relación espacial con la membrana plasmática. Datos recientes en la literatura muestran que receptores específicos, transportadores y moléculas de señalización se agrupan en complejos multiprotéicos de señalización por calcio y se ubican en sitios estratégicos de la célula (Blackstone et al., 1999, 2002; Fanning, et al., 1999; Garner et al., 2000). Hay evidencia importante de que la PMCA participa en la localización y dinámica de las señales de calcio tanto en células excitables como en las que no lo son (Bautista, et al., 2002 ; Pottorf et al., 2002; Garner, et al., 2000)

PMCA y enfermedad:

La expresión diferencial entre los tejidos, la localización subcelular, la variedad de isoformas básicas y sus variantes y la expresión regulada de las isoformas apoyan la idea de que cada una de ellas tiene una importancia funcional específica (Domi et al., 2007). La generación de ratones knockout ha sido una herramienta importante que ha dado luz sobre el papel que juegan estas isoformas.

Mutantes nulos homocigotos de la PMCA1 ($pmca1^{-/-}$) solo llegan a 8.5 días de desarrollo por lo que se considera constitutiva y su papel en la embriogénesis es fundamental (Prasad et al., 2004). En células del músculo liso vascular, los mutantes nulos heterocigotos se les afecta la salida de calcio durante la contracción y se favorece la apoptosis (Okunade, et al., 2004). La isoforma PMCA1 es la primera en detectarse durante el desarrollo embrionario lo cual reafirma la noción de su papel constitutivo.

Como la isoforma PMCA2 se expresa en células ciliadas del oído, células de Purkinje del cerebelo y en las glándulas mamarias (Dumont et al., 2001; Stahl et al., 1992; Reinhardt et al., 2000). En ratones mutantes carentes de PMCA2 se observa un fenotipo característico en el que se presenta sordera y ataxia (Zheng et al., 2001). La variante PMCA2w/a a diferencia de las otras, se caracteriza por una activación lenta pero tiene la capacidad de regular bien los niveles basales. En las células epiteliales mamarias la isoforma presente es la 2wb y es necesaria para incorporar calcio a la leche sintetizada (Reinhardt et al., 1992). Concordantemente, en ratones deficientes (knockout) de la PMCA2 se reduce la cantidad de leche sintetizada. Además esto provoca un sobre-regulación de la isoforma SERCA2b que no logra compensar la pérdida de la PMCA2 (Reinhardt et al., 1992). Por otro lado, también se ha documentado la ausencia de la PMCA2 en la enfermedad de Huntington (Kuhn et al., 2007).

La PMCA4 se expresa en forma ubicua pero principalmente en testículos (Okunade GW. Et al., 2004). Los ratones deficientes (knockout)

PMCA4^{-/-} sobreviven pero provoca infertilidad en los machos debido a que se afecta la movilidad de los espermatozoides pero no la capacidad de fertilizar (Schuh et al., 2004). También provoca problemas de contracción y propensión a la apoptosis en fibras musculares lisas (Okunade et al., 2004).

Actualmente se sabe poco sobre el papel que juegan las distintas PMCA's en el control de las crisis epilépticas y sus consecuencias. En estudios hechos con hibridización *in situ* (Garcia et al., 1997) se ha observado cambios en la expresión de las distintas isoformas en el cerebro de rata. Los autores encontraron que en el caso de la isoforma 1, en las células piramidales de CA1 y CA3 no hay cambios apreciables durante 1-4 hrs después de la inyección de ácido kaínico. A las 12 hrs hay una disminución significativa (del 47%) que se mantiene hasta las 72 hrs después de la inyección. En el giro dentado se aprecia una leve disminución en las primeras horas para luego recuperarse e incluso hay un ligero incremento con respecto al control. En las células de CA1 y CA3 inicialmente se ha observado que no hay ningún cambio, para luego disminuir. La máxima disminución se da hasta las 12 hrs post-inyección llegando a niveles del 41% del control. La disminución se mantiene hasta 72 hrs pero ya no es estadísticamente significativa con respecto al control. En el caso del giro dentado, la disminución máxima se da a las 4 hrs llegando al 34% del control. A las 12 hrs empieza a incrementarse, a las 24 hrs los niveles son significativamente mayores a los de las 4 primeras horas. A las 48 hrs los niveles son mayores a los del control. La disminución que se aprecia de la isoforma 3 no es significativa en todo el hipocampo y persiste durante todo el tiempo sin cambios (Garcia et al., 1997).

Hay evidencias de que la edición alternativa de la PMCA2 es regulada directamente por señalizaciones mediadas por calcio. En células de neuroblastoma humano IMR32 al incrementar el calcio intracelular por despolarización con alto potasio, se indujo la expresión de PMCA2x además de la PMCA2w, en tanto que en células control solo se expresó PMCA2w (Zacharias y Strehler, 1996). Por otro lado, Guerini y colaboradores demostraron que en el proceso de diferenciación en células granulosas de cerebelo no ocurre edición alternativa en el sitio A pero si en el sitio C mediante experimentos a concentraciones crecientes de KCl (Guerini et al., 1999). Asimismo, demostraron que la PMCA1a, 2 y 3 aumentan su expresión en tanto que la isoforma 4 disminuye. Sin embargo, cuando el calcio aumenta considerablemente al activarse los receptores NMDA con glutamato la PMCA1a aumenta y la 2, 3 y 4 disminuyen hasta casi desaparecer (ver la sección "Participación del calcio en la regulación de la edición alternativa").

una alteración de la función de las PMCA's mediada por enzimas proteolíticas como son las caspasas (estas tienen preferencia por las PMCA's 2 y 4) y la calpaina (tiene preferencia por el dominio regulatorio carboxilo terminal). También se observó la internalización de las PMCA's probablemente mediada por la calpaina (Pottrof et al., 2006; Ketelaars, et al., 2004).

Intercambiador Na⁺/Ca²⁺

El intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX) se activa cuando hay un incremento de calcio intracelular, mueve un ion de calcio hacia el exterior por cada dos o tres de sodio hacia el interior celular y su funcionamiento depende del gradiente de sodio (Tymianski et al., 1996). Hasta el momento se han clonado y caracterizado cuatro isoformas del NCX; NCX1 fue clonada en 1990 (Nicoll et al., 1990; Ruknudin et al., 2007a); más tarde, las isoformas NCX2 y 3 fueron clonadas en mamíferos. La isoforma NCX4 se encontró en teleosteos, anfibios y reptiles pero no se ha encontrado en aves ni en mamíferos (Marxhal et al., 2005; On et al., 2008, Bravo-Martínez et al., 2010).

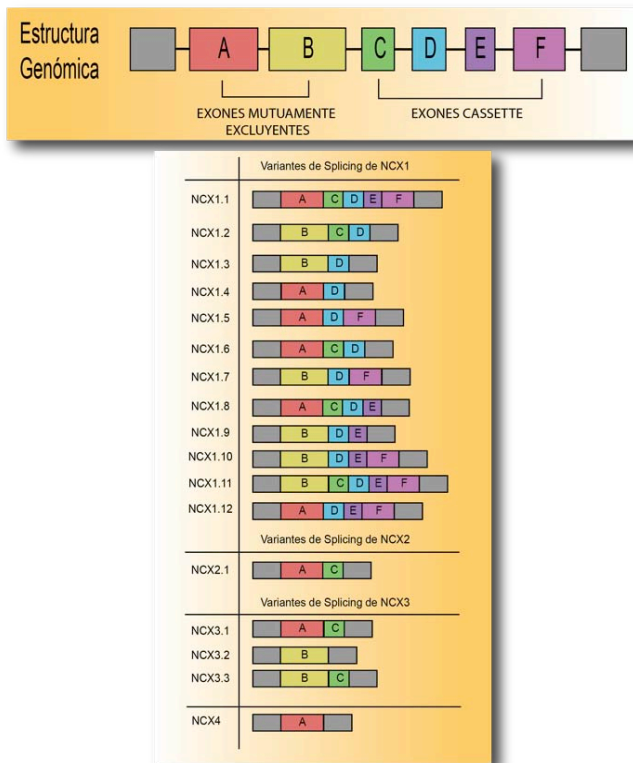


Figura 10.- Estructura genómica de las isoformas del intercambiador sodio/calcio (NCX1-4). Se muestran las distintas variantes por edición alternativa. Tomada de Quednau BD et al., 1997.

Estos genes tienen todos o solamente algunos de los seis exones; por ejemplo, el NCX1 los tiene todos mientras que el NCX2 solo contiene dos de ellos (B-C) y el NCX3 contiene cuatro (A, B, C, E) (Quednau et al., 2004; Lytton J., 2007; Figura 10). Los niveles de expresión de estos genes se correlacionan con la actividad de los distintos tipos celulares y su necesidad de extruir el calcio. En el caso de las células cardiacas, neuronas y células del riñón la expresión de estos genes es alta en tanto que en los hepatocitos es baja. Se han encontrado variantes por edición alternativa de cada una de las isoformas básicas, así del NCX1 se han encontrado las variantes 1.1-1.12 y la 1.41 (Li et al., 2007). En el caso del

NCX3 se han encontrado las variantes 3.1-3.3 y la del NCX2 solamente la 2.1. La diferencia entre estas variantes consiste en cambios en el asa intracelular orientada hacia el extremo C-terminal (Quednau et al., 1997) (Figura 10).

El intercambiador tiene nueve dominios transmembranales, los cruces 1-5 están separados de los cruces 6-9 por una asa intracelular que representa más de la mitad de la proteína (Philipson et al., 2000). Existen dos regiones conservadas en el asa intracelular; los dominios de unión a Ca^{2+} CBD1 y el CBD2 (Hilge et al., 2007). Estas regiones transmembranales son las responsables del transporte de los iones de sodio y calcio a través de la membrana (Matsuoka et al., 1993). También existen otras dos regiones conservadas llamadas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, la primera se encuentra entre los dominios transmembranales 2 y 3, mientras que $\alpha 2$ es intracelular (Philipson et al., 2000) (Figura 11).

El NCX1 transporta en direcciones opuestas tres iones de sodio por cada ion de calcio y dependiendo del gradiente de sodio, puede extruir o incorporar el calcio a la célula (Ruknudin et al., 2007a). Es el gradiente de sodio el que determina la dirección y la velocidad de acarreo de los iones de calcio. El NCX posee dos mecanismos para modular su actividad; la primera depende de un factor no protéico aún desconocido que al interactuar con el asa intracelular modula su actividad. De esta manera al aumentar la concentración de sodio intracelular puede inhibir al NCX. El segundo es la interacción de esta asa con otras proteínas que modulan su actividad. Hay varias proteínas que al asociarse al asa intracelular pueden modificar la función del NCX entre ellas están: la proteína cinasa A (PKA) y C (PKC) (Schulse et al., 2003; Ryan et al., 2007; Shigekawa et al., 2007). También se ha encontrado que las fosfatasas PP1 Y 2A se asocian en particular con la isoforma NCX1. Se piensa que la asociación de cinasas y fosfatasas es a través de otra proteína de tipo andamiaje (scaffolding), la mAkap. La calcineurina se asocia con todas las isoformas del NCX mediante el dominio de unión a calcio (CBD1) (Ruknudin et al., 2007a). Otros factores reguladores de esta proteína incluyen pH, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), ATP, la fosforilación y el péptido inhibidor del intercambiador (XIP) (Ruknudin et al., 2007b). Este último inhibe la actividad del intercambiador cuando interactúa con el segmento N-terminal de la asa intracelular grande (Matsuoka et al., 1993). La remoción del asa intracelular mediante alfa-quimotripsina elimina este efecto inhibitorio del XIP (Ruknudin et al., 2007a). Por otro lado, se ha encontrado una relación funcional entre el NCX y el receptor a glutamato (mGluR1) (Kim et al., 2007) cuyo significado fisiológico aún no se conoce.

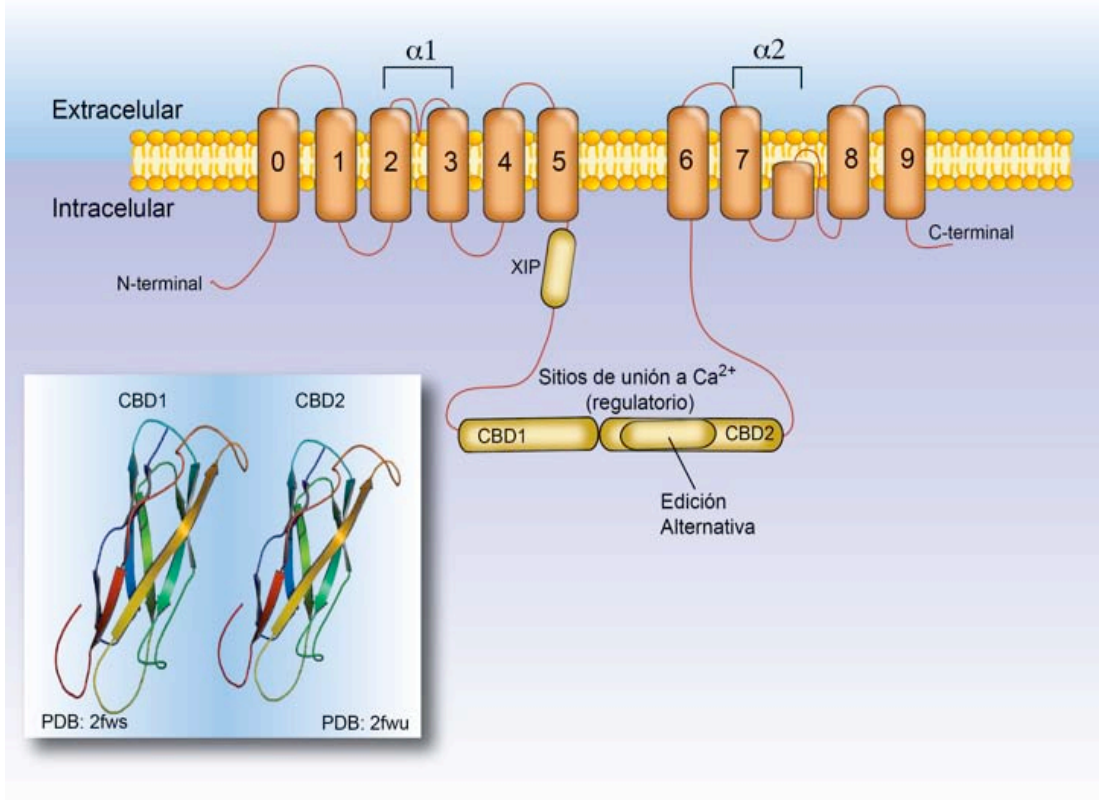


Figura 11.- Representación topológica del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX1). Los dos segmentos que contienen los dominios transmembranales 1-5 y 6-9 están separados por una larga asa citoplasmática. Esta asa incluye dos dominios de unión al calcio CBD1 y CBD2. Hay otras dos regiones conservadas, la α-1 y -2. La primera se encuentra entre las regiones transmembranales 2 y 3 y la segunda entre la 7 y 8. Estas regiones son consideradas responsables de la unión sodio-calcio y el transporte de estos iones. En el NCX1 la región α-1 es extracelular y la α-2 intracelular. Modificado de Lytton et al., 2007 y Hilge et al., 2007.

estas isoformas se expresan en áreas como son la neocorteza, la corteza cerebelar, hipocampo e hipotálamo (Minelli et al., 2007). De las isoformas que se expresan en la neocorteza e hipocampo la mayoría se expresan en las dendritas y muy poco en el axón (Lörincz et al., 2007), lo que sugiere un papel para regular el calcio intracelular en los sitios postsinápticos.

NCX y la epilepsia:

El conocimiento que se tiene sobre la participación del NCX en la epilepsia también es limitado. Ketelaars y colaboradores en 2004, demostraron mediante inmunohistoquímica en hipocampos de ratas

epileptizadas con ácido kaínico que la isoforma NCX1 disminuyó en la capa molecular interna del hipocampo al igual que en la capa III de la corteza entorrinal (probablemente debido a muerte celular más que una disminución en su expresión genética). La isoforma NCX2 aumentó pero principalmente en astrocitos y no en las neuronas. La isoforma NCX3 disminuyó en las fibras musgosas promoviendo probablemente el fenómeno de sprouting ya que se necesita un aumento del calcio intracelular para este proceso.

RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN NEURONAS

Las neuronas tienen una red extensa de retículo endoplásmico (RE) que contribuye a regular los niveles de calcio intracelular, al secuestrar calcio. Este calcio puede volver a ser liberado hacia el citoplasma al activarse los receptores de IP3 y rianodina que se encuentran en la membrana del RE. El retículo también tiene un mecanismo importante de secuestro de calcio mediante la ATPasa de calcio del retículo sarcoendoplásmico (SERCA). Esta proteína aunque no es tan abundante en las neuronas como en las fibras musculares, también interviene en la regulación del calcio intracelular. Se le da el nombre de SERCA debido a que no solo existe en el retículo endoplásmico de las células, sino que es muy abundante en el retículo sarcoplásmico del músculo estriado. El balance entre estos dos sistemas de secuestro y liberación de calcio es muy importante para mantener los niveles de calcio normales. Esto se evidencia por el desbalance que hay entre estos procesos en la epilepsia (Jim et al., 2000; Nagarkatti et al., 2008; Cataldi et al., 2005).

ATPasa de calcio del retículo sarcoendoplásmico

La ATPasa de calcio del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) fue descubierta en 1961 por Hasselbach y Makinose (Hasselbach et al., 1961), y representa el 70% de las proteínas en el retículo sarcoplásmico y el 40% del endoplásmico en neuronas (McLennan et al., 1970).

Genes e isoformas:

Son tres genes los que codifican para las tres isoformas básicas de la SERCA llamadas la SERCA 1, 2 y 3 o ATP2A1, 2 y 3 (Burk et al, 1989; Dode et al., 1998; Grover et al., 1992). SERCA1 tiene en el hombre 26 kb (Korczak et al., 1988) y contiene 23 exones. La transcripción de este gen se realiza 185 pb río arriba del codón ATG y 30 pb río abajo del elemento parecido a TATA que es el CATAA (Zhang et al 1995). La estructura del promotor sugiere que la transcripción es regulada por la hormona tiroidea (Thelenet et al., 1998). Por edición alternativa la SERCA1 produce dos variantes; la 1a y la 1b (Brandl et al., 1987). Estas variantes difieren en la falta del exón 22 en la isoforma 1b lo que afecta la longitud del extremo

C-terminal y al parecer no afecta su funcionamiento (Lytton et al., 1992). Las isoformas SERCA2 y 3 también tienen edición alternativa (Grover et al., 1992; De Jaegers et al., 1993; Martin et al. 2002; Dode et al., 1996; Eggermont et al., 1991; Guntjeski-Hamblin et al., 1988; Lytton et al., 1988; Lyton et al., 1989; Wuytack et al., 1994). La SERCA2 ha sido parcialmente caracterizada y se estima que tiene 25 exones de los cuales los últimos cuatro intervienen en su edición alternativa (Lytton et al., 1989) produciendo las isoformas 2a y 2b, en tanto que la SERCA3 produce tres variantes, 3a, 3b y 3c (Dode et al., 1998; Anger et al., 1994; Anger et al., 1993; Papp et al., 1991; Poch et al., 1998).

Estructura:

La estructura de la SERCA se ha investigado más en la isoforma SERCA1 que está presente en abundancia en el músculo esquelético de sacudidas rápidas; sin embargo, la gran homología entre las isoformas sugiere conformaciones similares para las otras variantes (Brandl et al., 1987). La estructura cristalográfica de SERCA fue reportada en una resolución de 2.6 angstroms por Toyoshima y colaboradores en 2000.

Esta proteína consiste en una cabeza citoplasmática grande con un tallo pequeño y flexible, un dominio transmembranal y uno luminal (Figura 12). La cabeza citoplasmática contiene un dominio de transducción y otro catalítico en donde el ATP se une. Tiene diez cruces transmembranales, de los cuales, los que están en relación a la unión del ion calcio y su translocación son los TM 4-6 y 8 (Inesi et al., 1995; Toyoshima et al., 1993; MacLennan et al., 1997; MacLennan et al., 1997). Sin embargo, La isoforma 2b tiene 11 cruces transmembranales a diferencia de las otras (Lytton et al., 1988).

Distribución de la SERCA en los tejidos:

SERCA1 representa la isoforma más abundante en el músculo esquelético de ratas (Zhang et al., 1995), la variante 1a en músculo de ratas adultas en tanto que la 1b en músculo de ratas recién nacidas (Korczak et al., 1988; Zhang et al., 1995; Brandl et al., 1987). La isoforma 2a es más abundante en el músculo cardiaco y esquelético de sacudidas lentas, la 2b es ubicua y se considera como constitutiva (Lytton et al., 1992, 1988, 1989; Eggermont et al., 1991). La isoforma 3a abunda en plaquetas, células linfoides, cerebelo, páncreas, glándulas salivales. La 3b en riñón, páncreas y células endoteliales y la 3c en riñón y páncreas (Burk et al. 1989; Dode et al., 1996; Anger et al, 1994, 1993).

En general SERCA es menos abundante en las neuronas que en las células musculares por lo que las proteínas encargadas de la extrusión de calcio tienen un papel más importante en la regulación del calcio de estas células (Misquitta et al., 1999). En el sistema nervioso, la

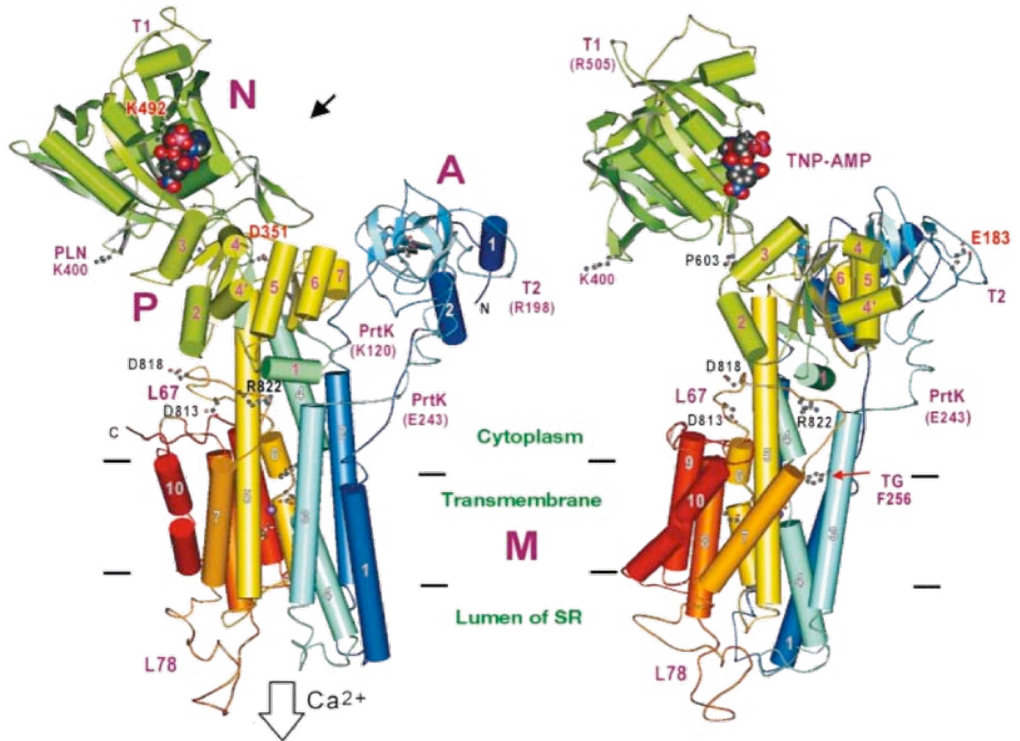


Figura 12.- Arquitectura de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico. Las alfa-hélices están representadas por cilindros y las láminas beta por flechas. El color cambia gradualmente desde el extremo N-terminal (azul) hasta el C-terminal (rojo). Los dominios citoplasmáticos fueron etiquetados (A, N y P), las hélices transmembrales (M1-M10) y aquellas en los dominios A y P fueron numeradas. Tomado de Toyoshima et al., 2000.

isoforma 2b está presente en el cuerpo celular y dendritas proximales en prácticamente todas las neuronas. Su expresión es la más alta en células de Purkinje, piramidales del hipocampo y corteza cerebral (Baba-Aissa et al., 1996a, 1996b; Wu KD et al., 1995). Las isoformas 2b y 3a se localizan exclusivamente en células de Purkinje y núcleo reticular (Baba-Aissa et al., 1998).

Ciclo catalítico de la SERCA:

La SERCA tiene 100 kDa, una calcio con mucha afinidad (0.5mM en promedio) en el lado citoplasmático en un paso que no requiere de ATP (Inesi et al., 1992).

La proteína tiene un cambio de conformación de E1 en donde el sitio de unión para calcio está expuesto al lado citoplasmático que en estas condiciones es de alta afinidad, al E2 en donde el sitio de unión a

calcio esta expuesto al lado luminal del retículo endoplásmico y es de baja afinidad (RE). En cada ciclo se hidroliza un ATP en presencia de calcio y magnesio y utiliza la energía para transportar dos iones de calcio desde el citoplasma al retículo endoplásmico (Inesi et al., 1992; Vilsen B et al., 1995). El sitio de alta afinidad cambia a baja afinidad cuando se despega el ADP (Figura 13) De todas las variantes la isoforma 2b tiene mayor afinidad por el calcio pero también es la más lenta de todas (Lytton et al., 1992) y las tres variantes de SERCA3 tienen menor afinidad por el calcio (Dode et al., 1998; Lompre et al., 1998).

A diferencia de la PMCA su función no depende de calmodulina sino que es modulada por fosfolamban (Treiman et.al., 1998); acarrea 2 iones de calcio por cada ATP hidrolizado (Tymianski, 1996). Una característica común a todas las SERCAs es que pueden ser inhibidas por la tapsigargina (Lytton et al., 1991) y el ácido ciclopiazónico.

Desde el punto de vista de su regulación, se han descrito dos proteínas de peso molecular bajo que pueden regular a la SERCA: el fosfolamban y la sarcolipina. El fosfolamban inhibe a la SERCA 1 y 2 pero no a la isoforma 3 dado que las primeras isoformas contienen una secuencia de aminoácidos que reconoce el fosfolamban (Toyofuku et al., 1994).

Su mecanismo de acción es bajar la afinidad de la SERCA por el calcio y la fosforilación del fosfolamban impide su acción inhibitoria (Koss et al., 1996; Kadmbi et al., 1997).

Por otro lado, la sarcolipina es un péptido de 31 aminoácidos que se expresa en músculo esquelético rápido (Odermatt et al., 1998) e inhibe a las isoformas 1 y 2. Su actividad es controlada por el calcio intracelular lo que produce dos tipos de efectos, por un lado disminuye la afinidad por el calcio a bajas concentraciones de calcio intracelular y por el otro aumenta la Vmax a concentraciones saturantes de calcio intracelular (Odermatt et

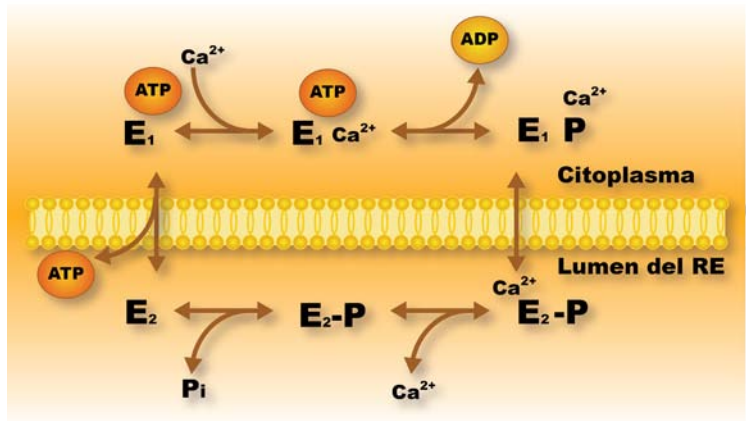


Figura 13.- Ciclo Catalítico de la SERCA. La proteína tiene dos estados conformacionales el E1 y el E2, en el E1 la proteína expone sus sitios de unión de alta afinidad a calcio hacia el citoplasma. La hidrólisis del ATP y la fosforilación de la proteína (E1-P) provoca el cambio conformacional (E2-P, de baja afinidad) para la translocación de los iones de calcio hacia el lumen del retículo endoplásmico. La salida del P_i provoca que los sitios de unión de calcio disminuya su afinidad liberando el calcio y el cambio conformacional a E1.

al., 1997).

Otros mecanismos de regulación dependen de la fosforilación de la SERCA por la cinasa dependiente de calcio-calmodulina II (CAMII) (Xu et al., 1993; Toyofuku et al., 1994). Esta enzima tiene efecto sobre la isoforma 1 pero no en la 2 y no se conoce su efecto en la 3. Otras proteínas reguladoras de SERCA son el substrato del receptor a insulina 1 y 2 (IRS1 y 2) el cual se une al extremo carboxilo terminal de la isoforma 1 y 2. La insulina estimula esta asociación dado que IRS1 y 2 son fosforilados por la tirosincinasa (Algenstaedt et al., 1997).

En neuronas no es claro cómo se regula SERCA dado que el fosfolamban no se expresa en estas células. Una posibilidad es la CAMII o bien la calreticulina que colocaliza en el axón con la SERCA (Johnson et al., 1993).

SERCA y epilepsia:

Se ha demostrado en microsomas de células epilépticas una disminución en la actividad de la SERCA inmediatamente después de inducir el *status epilepticus* con pilocarpina y que dura hasta un año después (Parsons et al., 2000, 2001). No se sabe si hay cambios en la expresión de sus distintas isoformas.

MITOCONDRIA EN NEURONAS

La mitocondria es un organelo que desempeña un papel muy importante en la regulación de la concentración de iones que están en relación con señales, en particular la del calcio. La capacidad de este organelo para secuestrar el calcio le hace tener un papel importante en la regulación del calcio intracelular. Por otro lado la capacidad que también tiene la mitocondria para liberar el calcio que secuestró, le permite modular las señales de calcio ya sea disminuyendo o aumentando tanto su intensidad como su curso temporal y espacial. Esta modulación de las señales la lleva a cabo mediante tres procesos: la entrada de calcio desde el citoplasma; la capacidad de amortiguar el calcio en la matriz mitocondrial; y desde luego, la extrusión del calcio hacia el citoplasma. Dado que la función de regular la concentración de calcio intracelular es importante y especialmente crítica en células epilépticas, centraremos la descripción de la mitocondria en torno a esta función.

Entrada de calcio a la mitocondria

46

En la mitocondria el calcio tiene que cruzar dos membranas para llegar hasta la matriz mitocondrial. Está bien establecido que la membrana

interna es una barrera de calcio selectiva, sin embargo, no es sino hasta los últimos años que se ha establecido el papel de la membrana externa como una barrera regulada. En la membrana externa existe un canal voltaje-dependiente permeable a aniones y muy poco selectivo por donde se propone pasa el calcio. En experimentos donde se sobre expresan estos canales, también aumenta el flujo de calcio hacia la matriz mitocondrial (Rapizzi et al., 2002), por el contrario, el rojo de rutenio que bloquea estos canales impide la acumulación de calcio en la matriz (Zaid et al., 2005). De manera muy interesante, este canal también es activado por el mismo calcio (Bathori et al., 2006; Tan et al., 2007) (Figura 14). Por otro lado, en estudios con ratones deficientes (Knockout) de las isoformas 1-3 de estos canales muestran evidencia de que pudieran existir en la membrana externa otros canales de calcio (Baines et al., 2003).

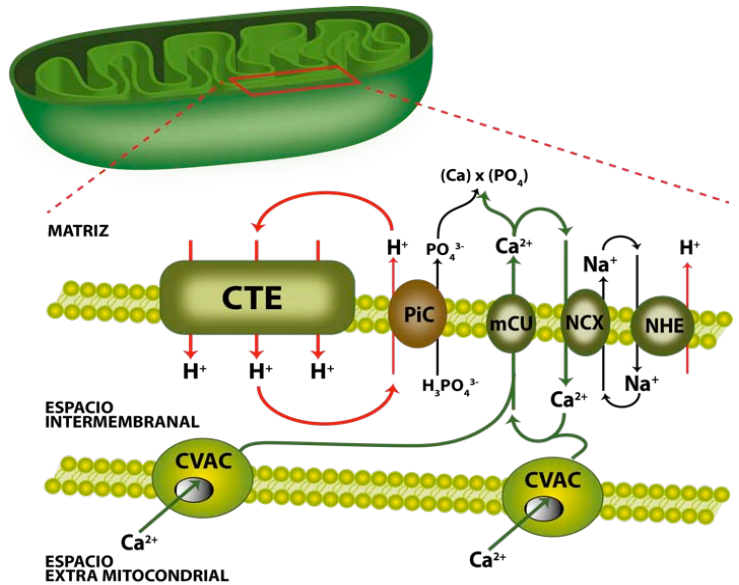


Figura 14.- Flujo de calcio entre el citoplasma y la matriz mitocondrial. Tanto la entrada como la extrusión de calcio de la mitocondria está acoplada al flujo de H⁺ y de Na⁺ mantenida por la cadena de transporte de electrones. La formación reversible de precipitados insolubles (xCa²⁺-xPO₄^{x-}-xOH) depende del Pi acumulado y por lo tanto del gradiente de H⁺. CTE- cadena transportadora de electrones; mCU- uniportador membranar de calcio; NCX- intercambiador sodio/calcio; NHE- intercambiador sodio/hidrogeniones; CVAC- canal de aniones dependiente de voltaje. Modificado de Szabadkai G et al., 2008.

En la membrana interna, el calcio es transportado mediante un uniportador cuya identidad molecular no se conoce bien, sin embargo, sus propiedades están razonablemente bien caracterizadas. El flujo de calcio a través del uniportador es equivalente a canales iónicos con cinéticas rápidas pero más lentas que la mayoría de los canales (Baines et al., 2000). Un dato importante es el hecho de que la cinética del uniportador tiene muy poca dependencia a la temperatura y presenta una gran selectividad por cationes, se comporta más como un canal que como un uniportador. Otro dato que apoya esta idea es que el rojo de rutenio bloquea al uniportador al igual que a varios canales iónicos de calcio (Duchen et al., 1992) (Figura 14). Alternativamente se ha descrito otro mecanismo de entrada en la membrana interna llamado entrada rápida (rapid uptake mode, RaM) con

propiedades distintas a las del uniportador (Buntinas et al., 2001; Saris et al., 2005). Este mecanismo tiene la capacidad de transferir muy rápido el calcio a la mitocondria durante un aumento del calcio citoplasmático, pero aún no se conocen bien sus características, su identidad molecular y su importancia funcional.

Trataremos muy brevemente la principal ruta para la salida del calcio hacia el citoplasma, que es en realidad un intercambio de calcio por sodio a través de la membrana interna (Figura 14). Este intercambiador tiene pequeñas diferencias farmacológicas respecto al intercambiador sodio/calcio (NCX) de la membrana plasmática, pero su identidad molecular no se conoce. Asimismo la estequiometría de este intercambiador está aún en controversia, tradicionalmente se ha pensado que se intercambian dos sodios por cada calcio y que por lo tanto es electroneutra (Brand, 1985). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que se intercambian 3 sodios por cada calcio lo que lo hace dependiente del gradiente electroquímico de la mitocondria (Jung et al., 1995). Más aún, este gradiente provoca que la mitocondria se despolarice con la entrada de sodio hacia el citoplasma lo que inhibe al intercambiador (Bernardi et al., 1982; Montero et al., 2001). En todo caso, el intercambiador depende del gradiente de sodio generado por el antiportador Na^+/H^+ para transportar al calcio, de manera que el sodio que entra por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sale mediante el antiportador restableciendo el gradiente de sodio (Figura 14).

Modelo del manejo de calcio por la mitocondria

En condiciones normales, el calcio mitocondrial se mantiene en equilibrio con el citoplasmático siempre y cuando la extrusión del calcio mitocondrial mediante el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ esté en equilibrio con la entrada de calcio, lo cual sucede en concentraciones de calcio citoplasmático por debajo de los 500 nM.

Si el calcio citoplasmático se eleva moderadamente por arriba de los 500 nM (hasta 1 mM), como por ejemplo en una señal de calcio, la entrada de calcio excede la capacidad del intercambiador y el calcio tiende a acumularse en la matriz mitocondrial (Crompton 1999). En estas condiciones el sistema de amortiguamiento del calcio por fosfatos trata de contrarrestar esta entrada (Nicholls et al., 2004). Desde luego, la entrada de fosfatos a la matriz junto con el calcio es de suma importancia ya que mantiene la concentración del calcio mitocondrial constante al formarse un complejo muy parecido a la hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) (Chalmers et al., 2003). La acumulación de este complejo tiene consecuencias ya que su solubilidad depende del pH de la matriz. Una entrada moderada de calcio a la matriz no elevaría la concentración de calcio debido a la acumulación de estos precipitados, sin embargo, una entrada mayor causaría una elevación cuantificable de calcio. De esta manera, un flujo de

calcio no necesariamente se traduce en una elevación de calcio libre en la matriz, lo cual es importante ya que el uniportador de calcio depende del gradiente electroquímico del calcio.

Si la entrada de calcio a la matriz mitocondrial excede la capacidad de amortiguamiento (alrededor de 1-3 mM de calcio citoplasmático) (Crompton 1999), como es el caso en situaciones de emergencia (traumatismo cerebral, isquemia-anoxia cerebral, *status epilepticus*, etc.), la concentración del calcio aumenta rápidamente provocando la apertura de un canal no selectivo. A esta concentración umbral de calcio citoplasmático se le llama “set point” (Nicholls et al., 1978; Nicholls et al., 1980). De este modo llegar a esta concentración de calcio trae como consecuencia la hinchazón de la mitocondria, el desacople de los procesos en la membrana interna y matriz y el inicio del proceso de apoptosis.

Una pregunta importante a discutir y a investigar es: ¿Qué determina, que ante una entrada importante de calcio a la célula, se inicien en ésta los cambios plásticos de la epilepsia o bien se inicie el proceso de muerte celular? La respuesta parece residir en el llamado “set point” ya que este determina la apertura de un poro grande e inespecífico llamado el poro de transición.

El poro es un complejo multiprotéico que contiene básicamente tres proteínas: la translocasa de adenina (ANT), la ciclofilina-D (CyP-D) y un canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC). Este complejo multiprotéico se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y funciona como un poro con compuerta el cual puede ser modulado por ligando como ADP y ATP. Este poro normalmente es selectivo pero pierde su selectividad con concentraciones altas de calcio (Lohret et al., 1996). El canal de aniones VDAC se encuentra en la membrana externa de la mitocondria y se une a la ANT para formar el complejo del poro (Crompton et al., 1994) que cruza ambas membranas comunicando la matriz mitocondrial con el citoplasma. Por último, la CyP-D es una enzima ubicada en la matriz mitocondrial cuyo papel es el de catalizar la isomerización cis-trans de proteínas (Lin et al., 1988; Crompton 1999) y que está acoplada a la ANT de la membrana interna. Esta enzima tiene un sitio de unión para la ciclosporina A (CSA) que también se encuentra en la matriz mitocondrial. En tanto la CSA se encuentre unida a la CyP-D se mantiene el estado conformacional del canal que lo mantiene cerrado. El activador más importante para la apertura del poro es el calcio y en menor medida las especies reactivas al oxígeno (ERO) (Crompton 1999; Xiao-Hong et al. 2011). La apertura del poro se produce cuando el calcio citoplasmático llega a 1-3 mM, que es el valor del “set point”. Cuando el calcio mitocondrial aumenta substancialmente, la CSA se desprende de la CyP-D creando un cambio conformacional que abre el poro de transición. Normalmente este poro se abre y cierra brevemente pero a concentraciones altas de calcio

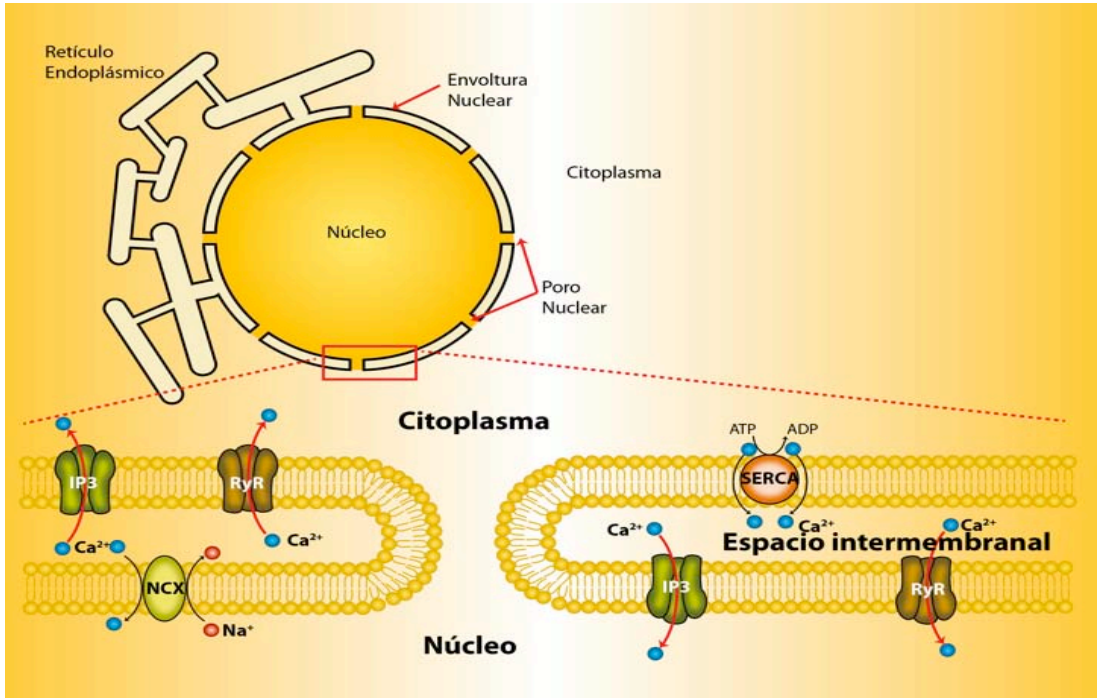


Figura15.- Esquema de la envoltura nuclear. Muchos autores consideran que la membrana externa de la envoltura nuclear es una extensión del retículo endoplásmico. Los canales intracelulares de inositol 3-fosfato (IP3) al igual que los de calcio sensibles a rianodina (RyR) se encuentran tanto en la membrana externa como en la interna. A diferencia de la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico (SERCA) que se encuentra exclusivamente en la externa y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} que se encuentra en la interna.

se abre y cierra constantemente estando más tiempo en su estado abierto que en el cerrado (Al Nasser et al. 1986; Halestrap et al., 2002).

ENVOLTURA NUCLEAR EN NEURONAS

En el núcleo celular las señales de calcio son de gran relevancia ya que regulan la transcripción de genes y la edición alternativa de los transcritos. Hoy en día no se conocen a detalle cómo el calcio llega al nucleoplasma, inclusive es controvertido el tema de la autonomía del núcleo para controlar la concentración de calcio en el nucleoplasma (Bezin et al., 2006). Estas señales de calcio pueden originarse por la entrada pasiva del calcio a través de los poros de la membrana nuclear (Eder et al., 2007). Otros mecanismos pueden ser la propagación de las ondas de calcio generadas por la célula y la movilización de calcio secuestrado en el lumen de la envoltura nuclear (EN) por varios mensajeros intracelulares (Alonso et al., 2006; Berridge et al., 2003; Gerasimenko et al., 2003). Aquí

me ocuparé de este último mecanismo ya que funciona como un reservorio que puede regular el calcio citoplasmático.

El núcleo está delimitado por una doble membrana y varios estudios han demostrado que tanto la membrana externa como la interna tienen la maquinaria necesaria para generar señales de calcio (Alonso et al., 2006). La mayoría de los investigadores proponen que la membrana externa se continúa con la membrana del retículo endoplásmico y comparten muchas de sus características (Gilchrist and Pierce 1993; Echevarria et al., 2003; Lui et al., 2003, 1998; Marius et al., 2006; Bezin et al., 2008). La membrana nuclear interna tiene propiedades distintas de la membrana externa pero ambas membranas se fusionan en el poro nuclear y están asociadas con el complejo del poro que consiste en un grupo multiprotéico de 1000 polipéptidos (Figura 15).

Las señales de calcio en el nucleoplasma están dadas por la entrada pasiva de calcio a través del poro aun cuando también se ha descrito que puede pasar asociado a otras proteínas como la calmodulina, parece ser que este mecanismo es el más importante sobre todo en células excitables, en particular las neuronas (Bootman et al., 2009) (Figura 16). Sin embargo, las señales de calcio también pueden ser mediadas por la apertura de los canales nucleares de calcio sensibles a IP₃ y RyR. En las membrana externa e interna también existen receptores de inositol-3-fosfato (IP₃) y de rianodina (RyR) cuyos canales permiten el paso de calcio hacia el núcleo (Bootman et al., 2009; Duncan et al., 2007; Alonso et al., 2006; Marchenko et al., 2005) (Figura 15 y 16). Hay evidencia de que tanto la fosfolipasa C como sus substratos pueden cruzar a través del poro nuclear, de esta manera se genera IP₃ en el nucleoplasma y por lo consiguiente ocurre la apertura de estos canales (Bootman et al., 2009). Es importante considerar que estos canales también están presentes en la membrana externa por lo que el calcio almacenado en el lumen de la envoltura nuclear puede salir hacia el citoplasma, dependiendo de dónde se genere específicamente IP₃ en ese momento. Otro mecanismo para que el calcio salga del lumen es el NCX que de acuerdo al gradiente de sodio puede transportar el calcio hacia el nucleoplasma o hacia el lumen de la EN (Figura 15 y 16). En la membrana nuclear se ha demostrado mediante experimentos de inmunocitoquímica de toda la célula y de núcleos aislados, la presencia del intercambiador de Na⁺ / Ca²⁺ (NCX) muy parecido al de la membrana plasmática (Xie et al., 2002). Gilchrist y colaboradores en 1993 utilizando preparaciones de membrana interna demostraron que el NCX se encuentra en la membrana interna y que también tiene 3 isoformas. El hecho de que el NCX se encuentre en la membrana interna refuerza la idea de que el calcio se puede almacenar en la envoltura nuclear y que puede generar señales de calcio para regular la transcripción y edición alternativa.

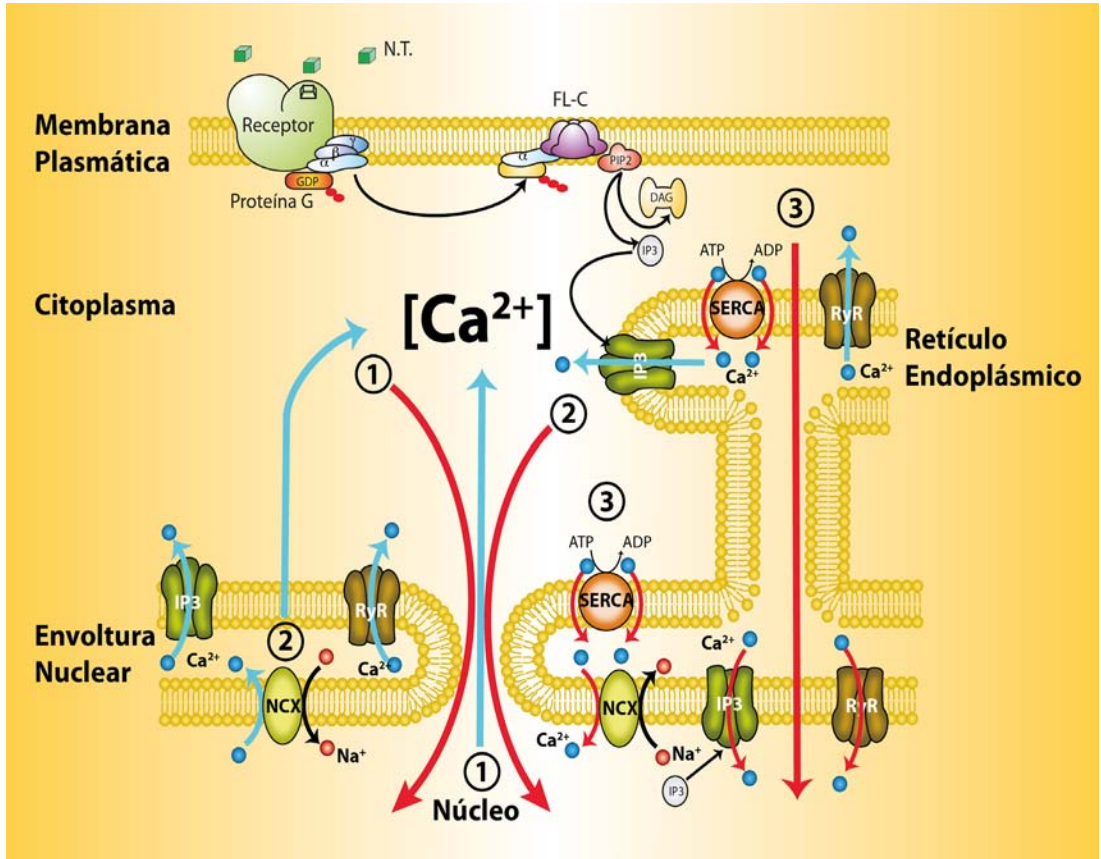


Figura 16.- Esquema representativo del flujo de calcio hacia (flechas en rojo) y desde (flechas en azul) el núcleo celular. La entrada de calcio hacia el núcleo (flechas en rojo) ocurre mediante tres mecanismos (1) difusión simple a través del poro nuclear, (2) difusión acoplado a otra proteína como la calmodulina. (3) El calcio entra al espacio que hay entre las membranas de la envoltura nuclear a través del retículo endoplásmico y/o la membrana externa de la envoltura nuclear mediante la SERCA, y liberado al núcleo mediante los canales de IP₃ y RyR. La salida del calcio hacia el citoplasma (flechas en azul) tiene básicamente dos vías: la primera (1) es por difusión a través del núcleo y la segunda (2) es el acarreo del nucleoplásmo al espacio intermembranal de la envoltura nuclear mediante el NCX y de este hacia el citoplasma mediante los canales IP₃ y RyR.

En neuronas, el aclaramiento de calcio del nucleoplásmo es mucho más lento que en el citoplasma debido a que la membrana interna no tiene SERCA a diferencia de la externa y que el gradiente de sodio se invierte obligando al NCX a incorporar el calcio hacia el lumen de la EN (Bootman et al., 2009). (Figura 15 y 16). La membrana externa al estar comunicada con la del RE contiene muchas de las proteínas que tiene este, como por ejemplo los receptores a IP₃, los de rianodina y la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA). Esta última transporta calcio del citoplasma hacia el espacio intermembranal (Gerasimienko et al., 1995; Gernsburger et al., 2003; Santilla, L., & Carafoli E., 1997).

La incorporación del calcio al lumen de la EN puede tener dos orígenes: por un lado el calcio del citoplasma es transportado hacia el lumen mediante la SERCA que se encuentra en la membrana externa. Por el otro, el calcio puede provenir del mismo lumen del retículo endoplásmico y al comunicarse con el lumen de la EN difunde hacia este último (Bootman et al., 2009) (Figura 16).

HIPOCAMPO

El hipocampo es una estructura ampliamente estudiada y presenta ciertas ventajas para llevar a cabo estudios electrofisiológicos encaminados a entender los cambios neuronales que se presentan en la epilepsia. Dentro de estas ventajas están las siguientes: 1) el hipocampo tiene una estructura laminar la cual ofrece la posibilidad de identificar, con precisión razonable, los distintos tipos celulares; 2) las propiedades de las células y la fisiología básica de los circuitos neuronales del hipocampo de la rata son ampliamente conocidas.

La formación hipocampal consta de cuatro regiones. Estas incluyen 1) al giro dentado, 2) al hipocampo propiamente dicho (que a su vez se compone de tres regiones: CA1, CA2, CA3), 3) el complejo subicular (que se subdivide en tres regiones: el subiculum, presubiculum y parasubiculum) y 4) la corteza entorrinal que en los roedores se divide en medial y lateral (Figura 18). La estructura tridimensional de la formación hipocampal de los roedores, a grosso modo, parece como una estructura elongada cuyo eje longitudinal se dobla formando una C desde el núcleo septal rostro-dorsal a el lóbulo temporal caudo-ventral. El eje longitudinal generalmente se llama septotemporal y el eje ortogonal se llama transversal (Figura 17)

Corteza Entorrinal y la Vía Perforante

Los estudios con la técnica de Golgi realizados por Ramón y Cajal en 1892, Lorente de No en 1933 y 1934 y por otra parte en los estudios con la técnica de degeneración realizados por Blackstad en 1956 y 1958, y Raisman y colaboradores en 1965, demostraron que la corteza entorrinal es el origen de las proyecciones al giro dentado e hipocampo (la vía perforante). Ambas técnicas demostraron que las fibras que emergen de la corteza entorrinal, continúan en la sustancia blanca y forma un paquete relativamente compacto, que Ramón y Cajal llamó "haz angular". Las fibras de la vía perforante, viajan dorsalmente y se doblan en el plano transversal, perforando la capa piramidal del subiculum a lo largo de su eje longitudinal y finalmente entran al giro dentado. Las fibras de la vía perforante se distribuyen a lo largo de la capa molecular del giro dentado, el striatum lacunosum-moleculare del hipocampo y la capa molecular del

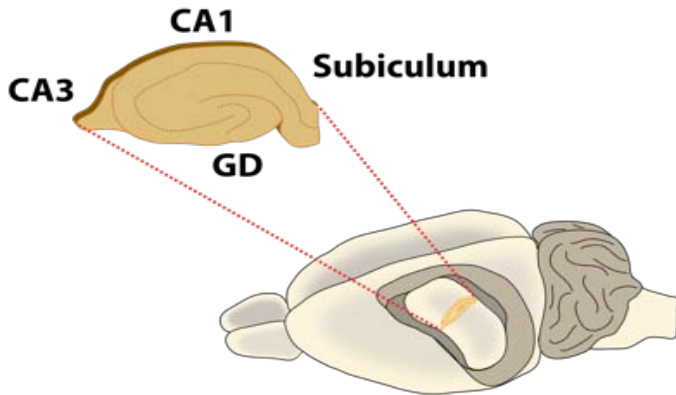


Figura 17.- Posición del hipocampo en el cerebro de la rata. El hipocampo es una estructura elongada en forma de C. El eje longitudinal o septotemporal va desde el núcleo septal (sep.) a la corteza temporal (CT). El eje transversal está orientado perpendicular al eje septotemporal. Figura modificada de Amaral 1989.

subiculum (Figura 18 y 19; Hjorth-Simonsen et al. 1972; Nafstad 1965; Steward 1976; Witter et al. 1988).

Existen varias nomenclaturas para las porciones del giro dentado. De acuerdo a la nomenclatura de Lorente de No, designaremos a la porción adyacente a la fisura hipocampal como sección subpiramidal; a la porción opuesta como sección infrapiramidal y a la parte donde se conectan, la cresta. En los estudios con la técnica de Golgi, es evidente que las fibras de la vía perforante cruzan la fisura

hipocampal en la región de la cresta, se bifurca y se extiende ramificándose en las secciones supra e infrapiramidal de la capa molecular (Figura 18). El 10% de la corteza entorrinal proyecta a un 25% del giro dentado en forma divergente. Experimentos en hipocampo de mono, indican que las células de la corteza entorrinal tienen colaterales que se dirigen hacia niveles septotemporales distantes del giro dentado.

Giro Dentado y las Fibras Musgosas

El giro dentado es el receptor mayor de las proyecciones de la vía perforante provenientes de la corteza entorrinal. A su vez, es una importante referencia a la región CA3 del hipocampo. El giro dentado se divide en tres capas: la molecular, en la cual terminan las fibras de la vía perforante; la capa granular, la cual está poblada por las células granulares; y una capa profunda o polimórfica, la cual está poblada de una variedad de tipos neuronales (Figura 18). Las células granulares dan origen a haces de axones, llamadas fibras musgosas, que se ramifican en la capa polimórfica antes de entrar a la región de CA3, en donde forman sinapsis en las dendritas proximales de células piramidales (Blackstad et al. 1970; Claiborne et al. 1986; Gaarskjaer 1978, 1986). Las células granulosas tienen dos patrones de distribución: un plexo difuso de colaterales que proyectan hacia la capa polimórfica del giro dentado, y otro con una mayor cantidad de fibras que ocupan el stratum lucidum y se localiza superficial a la capa de células piramidales a las cuales proyectan. La región polimórfica del giro dentado está compuesta de una gran variedad de tipos neuronales. Estas células forman plexos axonales que se ramifican localmente (Amaral 1978). Este

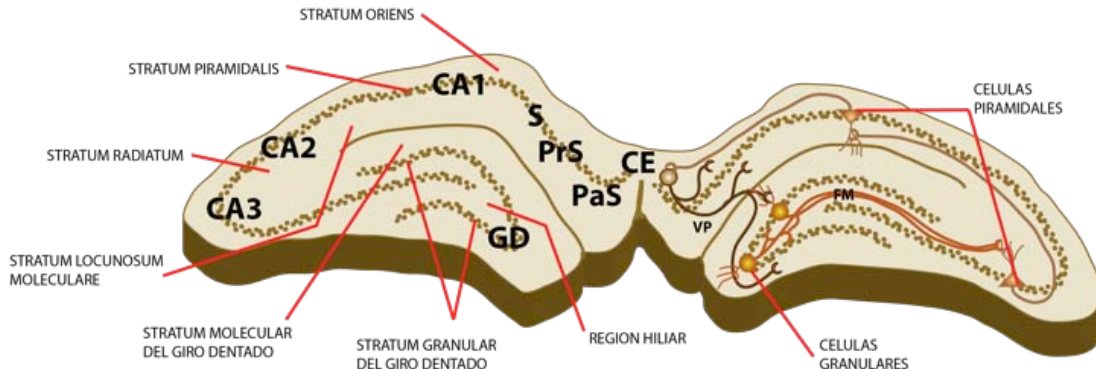


Figura 18.- Regiones de la formación hipocampal. 1) el giro dentado (GD); 2) el hipocampo propiamente dicho, el cual se subdivide en tres campos CA1, CA2 y CA3; 3) el complejo subicular que también se subdivide en: subiculum (S), presubiculum (PrS), y parasubiculum (PaS); 4) y por último la corteza entorrinal (CE). En esta figura, también se muestran las distintas capas histológicas del hipocampo y giro dentado (lado izquierdo), así como sus circuitos neuronales (lado derecho). La corteza entorrinal (CE) manda sus fibras a través de la vía perforante (VP) hacia las células granulosas. Estas a su vez hacen contacto con las células piramidales de CA3, a estas fibras se les llama musgosas (FM). Las células piramidales de CA3 mandan sus fibras a CA2 y CA1 mediante las colaterales de Schaffer (CS).

plexo axonal termina en muchas de estas mismas neuronas (Figura 19; Claiborne et al. 1986; Gaarskjaer 1978, 1986; Ribak et al. 1985).

Conexiones de CA1 y CA3

El hipocampo se subdivide generalmente en tres regiones (CA1, CA2 y CA3) de acuerdo a la nomenclatura sugerida por Lorente de No. El principal tipo celular, la célula piramidal, es el mayor componente de la capa celular piramidal. Superficial a esta capa está el stratum oriens, en el cual se encuentran las dendritas basales de las células piramidales, y que también contienen células no piramidales. La región acelular, donde se localizan las dendritas apicales de las células piramidales se divide en stratum radiatum superficial y stratum lacunosum-moleculares profundo. En CA3, en stratum lucidum, se localizan las fibras musgosas provenientes del giro dentado (Figura 18).

Las células piramidales de CA3 tienen axones muy ramificados que contribuyen a las proyecciones de asociación que terminan ahí mismo, y además son la mayor referencia a CA1, (las llamadas colaterales de Schaffer; Swanson et al. 1980, 1981). Las proyecciones de CA3 a sí misma y de CA3 a CA1 ya se habían apreciado en los estudios de Ramón y Cajal y Lorente de No con la técnica de Golgi. En cuanto a las proyecciones de CA3 a sí misma, son también divergentes. Las fibras que se originan en células de CA3 localizadas cerca del giro dentado, se distribuyen preferentemente en la parte distal de CA1, por ejemplo cerca del borde subicular, donde terminan en la porción superficial del stratum radiatum. Las células de CA3 localizadas progresivamente cerca del borde

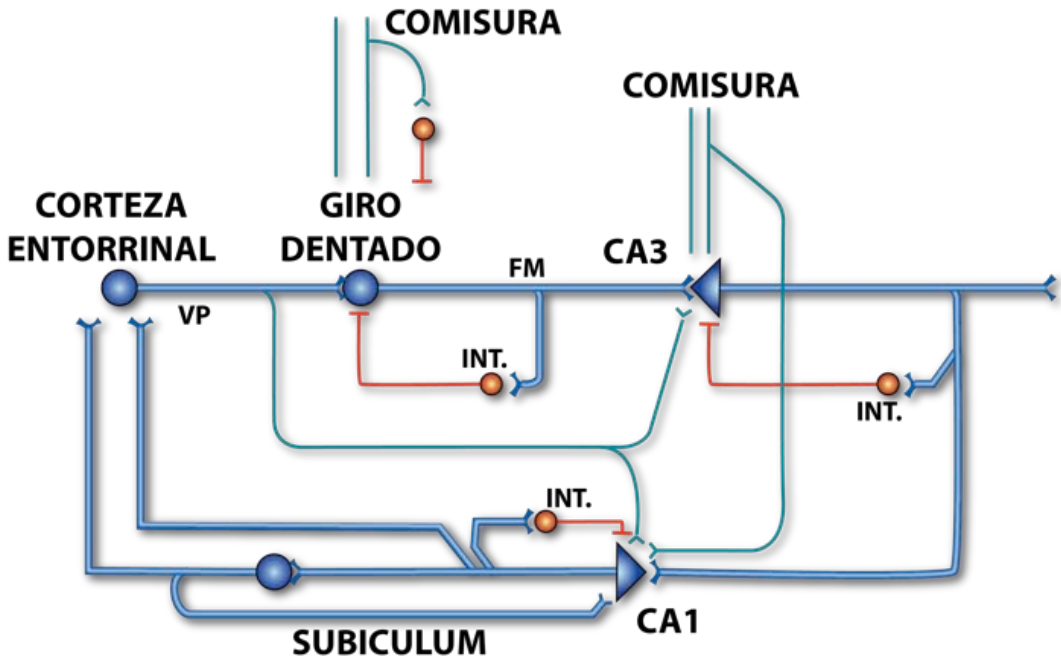


Figura 19.- Representación esquemática de algunos circuitos intrínsecos de la formación hipocámpal. Las líneas gruesas representan las vías que ejercen fuerte influencia sináptica y las punteadas la vías que ejercen un influencia débil. Los axones que forman la vía perforante (VP) son la aferencia principal a las células granulosas del giro dentado, y muy escasa a las células piramidales de CA1 y CA3. La aferencia principal de CA3 son los axones de las células granulosas que forman las fibras musgosas (FM) y la de CA1, son los axones de las células piramidales de CA3 que forman las colaterales de Schaffer. De la región CA1 salen fibras directamente a la corteza entorrinal o bien haciendo un relevo en el subiculum. En las regiones del giro dentado, CA3 y CA1, existen circuitos locales de inhibición recurrente. En éstos, un fibra colateral de las células granulosas o piramidales, conectan a una inteneurona inhibitoria (int.) posiblemente GABAérgica, la cual a su vez hace sinapsis a la misma célula granulosa o piramidal.

de CA1, proyectan preferentemente a partes de CA1 cercanas a CA3 y a porciones profundas del stratum radiatum. Células de CA3 localizadas cerca del giro dentado, tienden a proyectar más en dirección septal. En tanto que células localizadas cerca del borde de CA1, tienden a proyectar más en dirección temporal (Figura 19).

A diferencia de CA3, las células piramidales de CA1 no originan proyecciones a otros niveles de CA1 sino que proyectan en forma columnar al subiculum. Una proyección poco abundante de CA1 se dirige a capas profundas de la corteza entorrinal. El subiculum proyecta hacia el pre y parasubiculum además de la corteza entorrinal. El pre y parasubiculum, originan proyecciones hacia la corteza entorrinal, que terminan en las capas III y II respectivamente. Finalmente, parece haber proyecciones intrínsecas en la corteza entorrinal que unen varias partes de la región y unen capas profundas con capas más superficiales (Figura 19).

En resumen, la formación hipocampal consiste de una serie organizada de circuitos cerrados. Las fibras de la corteza entorrinal que forman la vía perforante terminan en una forma laminada en los dos tercios externos de las dendritas de las células granulares en el giro dentado. Las proyecciones de las células granulosas terminan en las dendritas apicales y basales de neuronas piramidales de la región inferior (neuronas de CA3), que se proyectan además a neuronas piramidales de la región superior (neuronas de CA1). El grupo celular de CA1 hace contacto en la corteza subicular adyacente y tanto la región superior y el subiculum envían axones a la corteza entorrinal, cerrando de esta forma, un circuito de retroalimentación a las células de origen de la vía perforante. Existen numerosos circuitos pequeños de retroalimentación y de alimentación anterógrada positiva en cada circuito largo de retroalimentación formando un red compleja.

HIPOTESIS Y OBJETIVO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que las células de animales epilépticos mantienen sus niveles basales de calcio elevados en comparación con las células normales hasta en la etapa crónica de la epilepsia y por toda la vida de la célula. También se ha demostrado en células de animales epilépticos crónicos que la entrada de calcio es normal. Por lo que es probable que los mecanismos de regulación del calcio sean uno o varios de los que estén alterados en la epilepsia crónica. Es importante señalar que tanto en las células normales como en las de animales epilépticos la entrada de calcio es igual ante el mismo estímulo; es decir, que las señales de calcio suceden de la misma manera en ambas células. La diferencia entre esta dos células es la concentración de calcio intracelular basal siendo el de las células de animales epilépticos más del doble de las normales (Pal et al., 200, 2001; Sun et al., 2002, 2004). Los mecanismos de regulación del calcio se vuelven ineficientes para regresar el calcio a niveles basales normales.

Con base en la experiencia de nuestro grupo, durante el desarrollo del presente trabajo nos hemos propuesto estudiar el papel específico que PMCA desempeña en la epilepsia. En la literatura, poco se conoce del papel de la PMCA en los procesos de la epilepsia, más aún en su etapa crónica que es justamente la que se investiga en este trabajo.

HIPOTESIS

Conociendo que los niveles de calcio basal citoplasmático están elevados en las células de animales epilépticos crónicos, creemos que un nuevo equilibrio diferenciado en la expresión genética de las distintas isoformas de la PMCA permitirá a las células piramidales de CA1 manejar de mejor manera el calcio citoplasmático para sus supervivencia.

OBJETIVO

El objetivo es evaluar la expresión diferencial de las diferentes isoformas de la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) como resultado de la inducción de ratas a la epilepsia, con técnicas avanzadas de análisis como son el "Whole Cell" y la RT-PCR cuantitativa en célula única.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Conjuntar las técnicas electrofisiológicas con la extracción de RNAm y RT-PCR en célula única.
- 2) Documentar electrofisiológicamente los cambios de excitabilidad en las células de ratas tratadas con pilocarpina (inductor de la epilepsia) respecto a controles.
- 3) Evaluar cuantitativamente los cambios a nivel de la expresión de los RNAm específicos de las PMCA con la técnica de RT-PCR cuantitativa en células únicas con cambios en su excitabilidad.

METODO y MATERIALES

MATERIALES

Todas las sustancias utilizadas son grado biología molecular; los amortiguadores, metilescopolamina y pilocarpina se obtuvieron de Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). El dimethyl-diclorosilano es de Supelco (Bellefonte, PA, USA). Los iniciadores y las sondas Taqman se diseñaron y sintetizaron por Primer Design Ltd (Southampton, UK). El kit SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX es de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). El agua utilizada para las soluciones fue ultra purificada en un sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC), y esterilizada. Los experimentos de PCR cuantitativa (qPCR) fueron realizados en el sistema de detección ABI Prism 7000 detection system de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). El Valium (Diazepam) es de Hoffmann-La Roche Ltd.

PREPARACIÓN Y MANEJO DEL MATERIAL Y SOLUCIONES

La preparación y el manejo del material y soluciones es muy importante ya que el mRNA es muy sensible a las enzimas que lo degradan y que se encuentran en el sudor de la piel y por lo tanto en todas las partes que toca la piel. Por ello se deben de tener en cuenta las siguiente precauciones:

- 1) Se debe manejar el material biológico e instrumentos con un ambiente libre de RNAsas.
- 2) Se tiene que usar guantes (limpiarlos constantemente con alcohol o bien cambiarlos periódicamente).
- 3) Se tiene que usar material y agua, tratados con dietilpirocarbonato (DEPC) para todas las soluciones (inclusive las de electrofisiología). El DEPC se disuelve al 0.1% en agua y se deja el material remojando durante 12 hrs. mínimo con agitación, posteriormente se deja escurrir el material y se esteriliza. El agua se trata de igual manera con el DEPC y se deja 12hrs. en agitación y posteriormente se esteriliza.
- 4) Usar viales y tubos capilares (micropipetas) siliconizados. Para ello se utiliza el dimetil diclorosilano al 5% disuelto en cloroformo. Se deja el

Tabla 1 CLASIFICACIÓN CONDUCTUAL DE LA EPILEPSIA DE RACINE

Estadio	Características
1	Movimiento del hocico y de la cara.
2	Movimientos oscilatorios de la cabeza (nodding).
3	Sacudidas clónicas de las patas anteriores.
4	El animal se yergue y se sostiene con sus patas posteriores (erección).
5	Erección y caída al suelo. Crisis generalizada con pérdida del control de la postura.

material remojando durante 15 a 20 min., se escurre y se deja que se evapore el resto.

MODELO EXPERIMENTAL DE EPILEPSIA

Los animales de laboratorio fueron tratados según la Norma Mexicana Oficial sobre uso, cuidado y reproducción de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Se utilizaron ratas Wistar macho de 20-25 días de edad, las cuales fueron mantenidas en un ciclo luz/obscuridad estándar de 12:12, el acceso a la comida y agua fue ad libitum. Se utilizó el modelo experimental de pilocarpina para la inducción de la epilepsia (Mello et al. 1993). Este modelo experimental reproduce las características principales de la epilepsia del lóbulo temporal en humanos. La pilocarpina aplicada a las ratas produce manifestaciones electroencefalográficas y conductuales de las crisis límbicas y *status epilepticus* que puede durar hasta 18h continuas. El paradigma de este modelo consiste en la inyección intraperitoneal (i.p.) de metilescopolamina (1 mg/kg) 30 minutos antes de la inyección de pilocarpina (350 mg/kg, i.p.) para minimizar los efectos colinérgicos de la pilocarpina (secreción salival etc.). Los animales control fueron tratados únicamente con solución salina. La pilocarpina induce en las ratas un *status epilepticus* después de 20 a 40 min de la inyección intraperitoneal, el cual se define como una crisis epiléptica con duración de 30 minutos o más, continua y con pérdida de conocimiento o bien como crisis epilépticas consecutivas que en total duran más de 30 min sin que el animal recobre el conocimiento. La intensidad del *status epilepticus* se califica según la escala conductual de Racine (Tabla 1; Racine 1972). Los animales mantuvieron el *status epilepticus* por 1 hora, posteriormente se aplicó diazepam (4 mg/kg, i.p.) para terminar el *status epilepticus* y evitar una alta mortalidad. Se aplicaron dosis subsecuentes de diazepam según fue necesario.

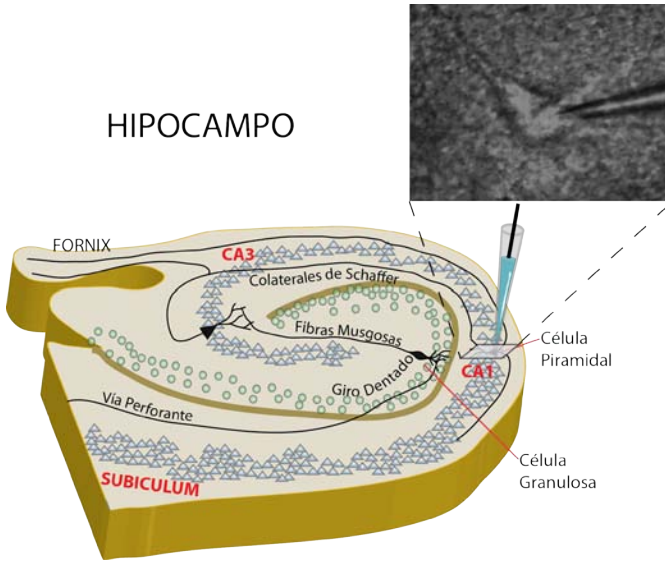


Figura 20.- Esquema de una rebanada de hipocampo de rata. Se registraron las células piramidales de CA1 que mantuvieron su forma, la membrana no se observara lustrosa y no se observe el núcleo (recuadro). Se cosecharon aquellas células con un potencial de membrana estable y la resistencia del sello entre la membrana y el electrodo se conservara en el orden de los giga ohms durante el registro.

La pilocarpina es un alcaloide parasimpaticomimético obtenido de las hojas de un arbusto americano del género *Pilocarpus*. Es un agonista muscarínico (M1 principalmente) que al activar al receptor, actúa sobre la proteína Gq la cual opera sobre la fosfolipasa C. Esta enzima degrada al PIP2 en Diacilglicerol e IP3, este último abre canales intracelulares de calcio del retículo endoplásmico liberando calcio al citoplasma. Por otro lado, el diacilglicerol activa a la enzima proteínkinasa C que fosforila canales iónicos principalmente de potasio (Scorza et al., 2009; Nagarkatti et al., 2009; Reina et al., 2009).

En dosis bajas la pilocarpina se ha utilizado en el tratamiento de glaucoma y para evitar efectos secundarios del tratamiento para el cáncer. En dosis altas se ha utilizado desde la década de los ochentas como inductor de la epilepsia. En breve, en la rata se caracteriza por presentar de manera progresiva: hipoactividad, temblores, reflejo del rascado, movimiento lateral de la cabeza, movimiento mioclónicos de las extremidades hasta llegar a crisis mioclónicas con parado en dos patas, salivación y caída hacia atrás. Estos signos persisten por varios minutos hasta llegar al *status epilepticus* (Morimoto et al., 2004; Scorza et al., 2009; Curia et al., 2008).

REGISTRO ELECTROFISIOLOGICO

Para documentar los cambios en el comportamiento eléctrico de las células de animales tratados con pilocarpina, en paralelo con animales control, se hicieron registros electrofisiológicos un mes después del inicio del *status epilepticus*. Se utilizaron solamente ratas que mostraron una o dos crisis epilépticas a la semana lo que indica que se encontraron en la fase crónica de la epilepsia. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación bajo anestesia con éter y su cerebro se extrajo. Se obtuvieron rebanadas de 400 µm con un vibratomo (Campden Instruments LTD mod. 752M) en

un líquido cerebro-espinal artificial (LCEA) enfriado a 4°C. Posteriormente fueron incubadas en LCEA a temperatura ambiente (24- 26°C). El LCEA contiene (en mM): 126 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 1.25 Na₂HPO₄, 10 glucosa (equilibrado con 95% O₂/5% CO₂, pH 7.4).

Para el registro electrofisiológico las rebanadas fueron colocadas en una cámara de registro con LCEA a 34°C. Se visualizaron las células piramidales de la región de CA1 del hipocampo mediante un microscopio (FN1, Nikon) el cual cuenta con una óptica de contraste diferencial de interferencia (DIC) usando un objetivo de 40X/1.0 y video microscopía infrarroja (Figura 20). Las células seleccionadas para el registro electrofisiológico deben verse con la morfología adecuada, la membrana no debe estar lustrosa ni debe verse el núcleo celular.

Los microelectrodos fueron fabricados con tubos de borosilicato y llenados con una solución que contiene (en mM): 145 KCl, 5 HEPES, 5 EGTA, pH 7.3, con una resistencia de 4-5 MΩ. Los registros fueron hechos con un amplificador EPC7 en fijación de corriente (current clamp) con una configuración de “whole-cell”, y con un sello de 1 GΩ de resistencia.

Antes de aplicar la fijación de corriente, se midió el potencial de membrana en reposo de las células (Figura 21A). Uno de los cambios que son característicos de las células epilépticas es un aumento en la descarga de potenciales de acción. Para caracterizar estos cambios, se utilizó un protocolo de estimulación el cual consiste en pulsos de corriente de 20 ms de duración cuya intensidad varía desde -800 hasta 800 pA en pasos de 100 pA (Figura 22). Con los registros obtenidos con este mismo protocolo también se construyó la curva duración-intensidad, con la que evaluamos cambios de excitabilidad (Figura 23). Otro de los cambios que suceden en las células cuando se vuelven hiperexcitables es un aumento de la resistencia membranar (R_s), para medirla se utilizaron pulsos de 100 ms cuya intensidad varía de 100 mV hasta 800 pA en pasos de 100 pA. Con este protocolo la membrana alcanza el estado estable antes del final del pulso y se puede evaluar la resistencia de la membrana (Figura 21B). Otro parámetro que refleja la resistencia de la membrana es la constante de tiempo de la membrana (τ), para calcularla se ajustó una doble exponencial a la cola de las respuestas al protocolo de estimulación (Figura 21C).

RT-PCR CUANTITATIVA DE CELULA UNICA

Antes de recolectar las células, los microelectrodos y los tubos de PCR fueron tratados con una solución de dimetildiclorosilano/ cloroformo al 5% (v/v) (Sucher et al, 2000; Delgado-Coello et al., 2009). Solamente aquellas células control y de animales tratados con pilocarpina que tuvieron

un aumento en su excitabilidad, un potencial de membrana estable y un sello entre el microelectrodo y la membrana plasmática estable y de alta resistencia fueron usadas para el análisis de la expresión de la PMCA. Una vez terminado el registro electrofisiológico, el contenido de la célula seleccionada se aspiró y colocó en tubos de PCR en presencia de inhibidores de RNAsas. Las células fueron colocadas de inmediato en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a -80°C (Delgado-Coello et al., 2009). Las secuencias de los iniciadores y sondas Taqman para cada isoforma se muestran en la Tabla 2.

Para hacer las curvas estándar se hicieron ocho diluciones con el control positivo para cada par de iniciadores. Las diluciones fueron: 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 y 1×10^1 moléculas/ $5\mu\text{l}$. La RT-PCR de las curvas estándar se realizaron junto con los experimentales y se graficaron Ct (ciclo umbral) contra log de las concentraciones y se ajustó a una recta. Con los parámetros obtenidos se calcula el número de moléculas encontradas por cada célula mediante la ecuación: $y = m \times x + b$, donde $y = \text{Ct}$, $m =$ pendiente, $x = \log_{10}$ de la cantidad de templado y $b =$ intercepto en el eje de las Ys.

Para evitar la contaminación con DNA genómico, las células cosechadas fueron incubadas con deoxiribonucleasa I (Deoxyribonuclease I, grado amplificación de Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. La RT-PCR cuantitativa de un solo paso y en un volumen final de $20\mu\text{l}$ con el kit SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX (Invitrogen Corporation). Se utilizó un termociclador ABI prism 7000 programado con el siguiente protocolo: $50^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$; $95^{\circ}\text{C}/2\text{ min}$; 40 ciclos: $95^{\circ}\text{C}/15\text{ s}$; $60^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$.

Para estos experimentos se utilizaron como controles negativos: a) el contenido del microelectrodo habiéndola colocado dentro del tejido sin cosechar la célula. b) Control sin RT. Se utilizaron como controles positivos: a) Controles para cada par de iniciadores del fabricante que son oligonucleótidos (secuencias específicas), b) Amplificación de GAPDH.

ANALISIS ESTADISTICO

Para la estadística y los procedimientos de ajuste de curvas se utilizó el programa Microcal Origin versión 8.0 (microcal Software). Para comparar la medias entre dos poblaciones de células se utilizó la prueba T de Student no direccional. El valor de significancia se fijó en $\alpha=0.05$ y el valor crítico fue de 95%. Todos los valores fueron expresados como media \pm error estándar y la $p < 0.05$ fue considerada como significativa.

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos usados como cebadores y sondas para la PCR en tiempo real.

rPMCA	Primer	POSICION N	Tm Primers	ΔTm Primers	Tamaño y Tm productos
PMCA 1 Atp2b1 MN_05331 1 4,228pb	Fwd 5'- ATGACATTGTGAAGACG GTGAT-3'	2,153	56.6	0	118pb Tm 75.7
	Rev 5'- TCGTTCTCGTTATCCCAC TCT-3'	2,270	56.6		
PMCA 2 Atp2b2 MN_01250 8 7,019pb	Fwd 5'- CATAGATACTGCTGACAT ACTGGAT-3'	5,490	57	1.7	119pb Tm 70.8
	Rev 5'- CACATCATAAGGTTTCATT CGGATC	5,608	56.7		
PMCA 3 Atp2b3 MN_13328 8 5,084pb	Fwd 5'- GCAGATGTTGTGGGTGA ACT-3'	3,299	56.4	0.3	123pb Tm 77.4
	REV 5'- CGTGAGATGAGAGGCTT GTC-3'	3,421	56.1		
PMCA 4 Atp2b4 MN_00100 5871 4,102pb	Fwd 5'- AGCAGTTGCGTCAGTCA GA-3'	3,587	57	1.8	101pb Tm 74.7
SONDAS:	Atp2b1: ATGCCTAGCGTTCAGAGACTTCCCCG Atp2b2: CCGAAAGCAGCAAGCCGTACCAACC Atp2b3: CTTCCGCAGCAGCAGTGACTCAGTTG Atp2b4: CTCCACCTCTCTGCCGTTACACCTCC				

RESULTADOS Y DISCUSION

ELECTROFISIOLOGIA

Una serie de estudios sugieren que la alteración de los procesos eléctricos celulares traen como consecuencia la descarga aumentada y sincrónica de las neuronas epilépticas (Bauzano-Poley et al., 2001; Ferrie 2005). Sin embargo, muy pocos trabajos han investigado cómo se alteran de manera constitutiva las propiedades eléctricas básicas de la neurona. Para llevar a cabo este análisis, se hizo el registro electrofisiológico de las células control y experimentales que posteriormente se usaron en el análisis de expresión de la PMCA. Se inyectaron siete ratas con solución salina para el grupo control en tanto que 14 ratas se trataron con el protocolo pilocarpina-diazepam. Después de un mes posterior a la inyección y presentar una o dos crisis epilépticas espontáneas a la semana, se registraron un total de 127 células. De 52 células control, solo 46 se analizaron ya que presentaron un potencial de membrana en reposo (PMR) estable entre -60 y -70 mV, el sello de la membrana fue estable todo el tiempo. Un total de 75 células provenientes de ratas tratadas con pilocarpina se registraron y solamente 63 de ellas reunieron los requisitos para el análisis de la expresión de la PMCA.

Mediante registros en fijación de corriente en la configuración de "whole-cell", se determinó en las 63 células experimentales tienen un potencial de membrana más despolarizado (-55 ± 2.4 mV; Figura 21A) que en las control (-60 ± 1.97 mV, $P < 0.05$). Otro parámetro importante de medir, y que refleja la excitabilidad de la célula, es la resistencia de la membrana. Para documentar cambios en la resistencia de la membrana, se utilizó un protocolo de estimulación el cual consiste en pulsos de corriente de 100 a 800 pA y 100 ms de duración. En estas condiciones las células llegan al estado estable antes de que el pulso termine y se puede medir este parámetro con precisión. De esta manera, las células experimentales mostraron un resistencia en serie (162.48 MW \pm 17.89) significativamente mayor que las control (108 MW \pm 16.7; $P < 0.05$; Figura 21B). Otro parámetro que refleja la resistencia de la membrana es la constante de tiempo de la membrana y para poder calcularla se ajustó una doble exponencial a la cola de las respuestas celulares ante el protocolo de estimulación. Las células control mostraron una τ_1 de 2.99 ± 1.2 ms y una τ_2 de 3.31 ± 1.95 ms. En tanto que, las células de animales epilépticos mostraron una τ_1 de 8.16 ± 0.9 ms y una τ_2 de 4.7 ± 3.0 ms. Como se puede observar las células tratadas mostraron una τ_1 mayor que las control ($P < 0.05$) en tanto que la τ_2 no mostró ningún cambio (Figura 21C). Este dato refleja un cambio en la resistencia de la membrana.

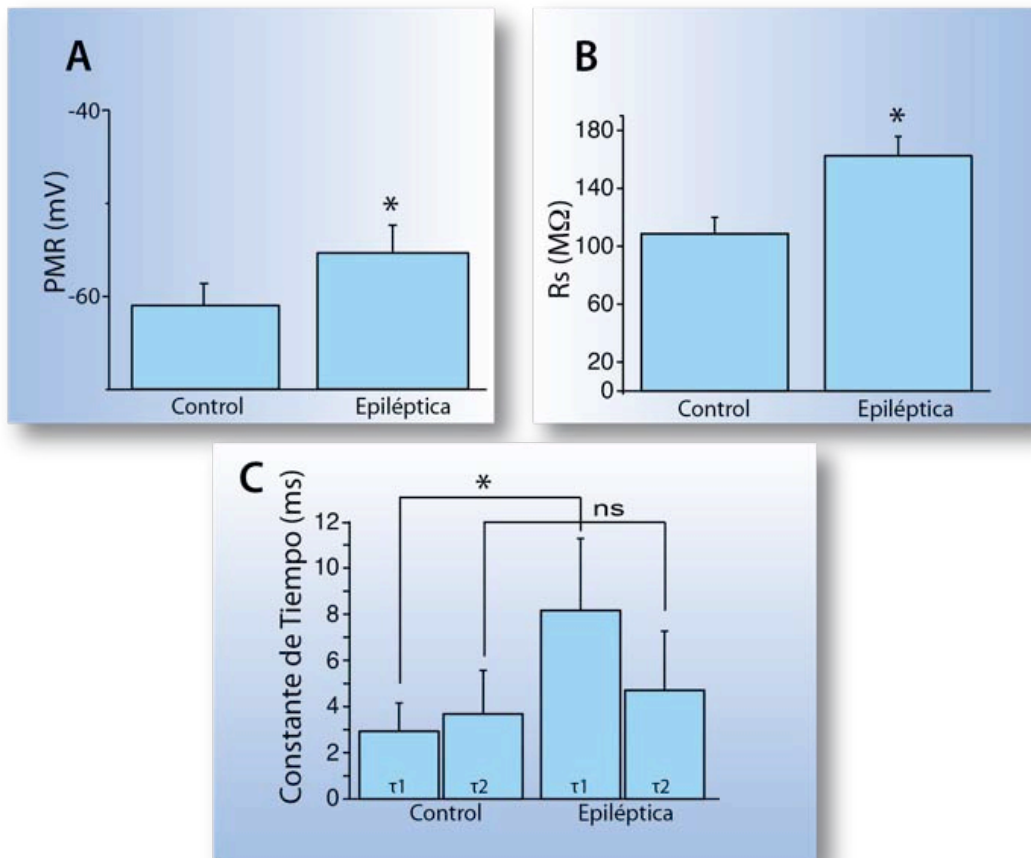


Figura 21.- Parámetros electrofisiológicos analizados en las células piramidales de CA1. (A) Potencial de membrana en reposo (PMR) promedio de células control y de animales epilépticos. La PMR en células control fué de -61 ± 1.97 mV y en las tratadas de -55 ± 2.4 mV. (B) Resistencia de membrana (R_s) promedio durante un pulso de 100 ms en células control y tratadas. Las células control presentaron una resistencia de $108 \text{ M}\Omega \pm 16.7$ en tanto que las tratadas de $162.48 \text{ M}\Omega \pm 17.89$. (D) La respuesta de cola para cada estímulo fué ajustada a una doble exponencial y se graficaron las constantes de tiempo (τ_1 and τ_2). Las células control ($n = 7$) mostraron una τ_1 de 2.99 ± 1.2 ms y la τ_2 de 3.31 ± 1.95 ms. Las células de animales epilépticos mostraron una τ_1 de 8.16 ± 0.9 ms y la τ_2 de 4.7 ± 3.0 ms. La τ_1 de células de animales epilépticos fue mayor que las control mientras que la τ_2 no mostró ninguna diferencia significativa. Los valores se muestran en promedio \pm error estándar, $* = P < 0.05$.

Un aumento en la frecuencia de descarga de las neuronas epilépticas sugiere un aumento en la excitabilidad, la cual también, puede ser caracterizada por las respuestas neuronales subumbrales y pasivas de la membrana (Kiernan et al., 2005). Para medir el número de potenciales de acción (PAs) por cada pulso de estimulación se utilizó un protocolo con pulsos de corriente de 20 ms de duración y de -800 hasta 800 pA de intensidad en pasos de 100 pA. Las células control siempre generaron un PA en cada pulso a diferencia de las epilépticas que mostraron dos o tres PAs por pulso (Figuras 19A, B, C). Una pregunta importante aún sin

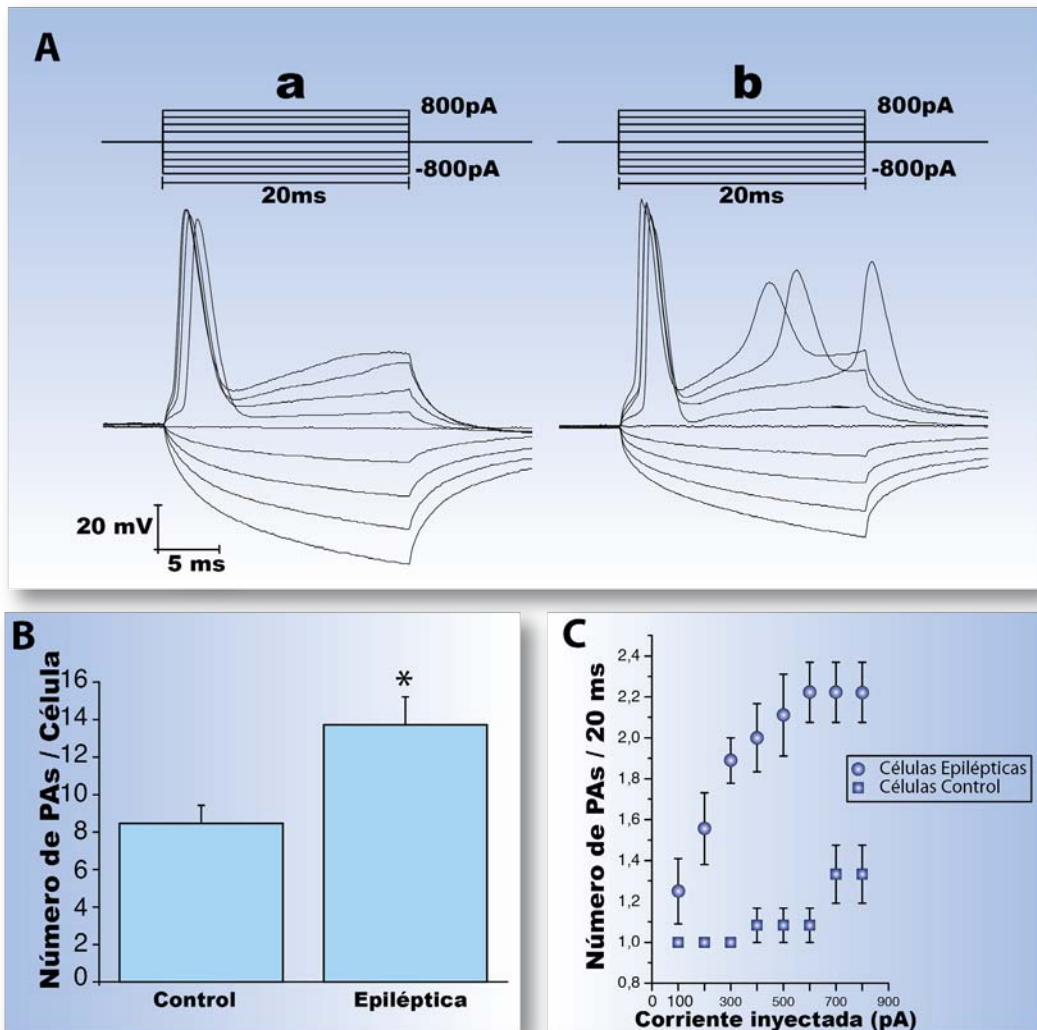
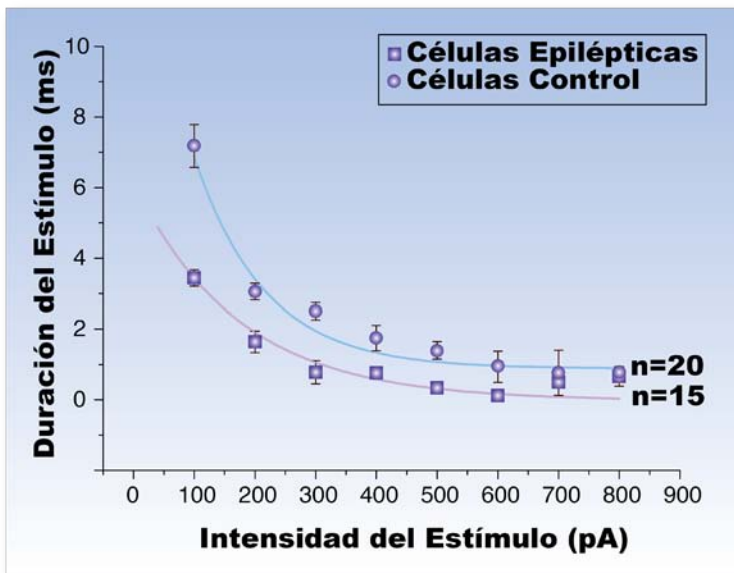


Figura 22.- Respuestas de las células piramidales de CA1 ante pulsos de estimulación. (A) Se muestra el protocolo de estimulación en la parte superior de los paneles (a) y (b). El protocolo consiste en pulsos cuadrados de corriente desde -800 a 800 pA en pasos de 100 pA. (a) las células control producen un potencial de acción por cada estímulo despolarizante, (b) Las neuronas de animales epilépticos producen de 2 a 3 potenciales de acción por cada pulso despolarizante. Para mayor claridad en la figura se muestran 8 trazos de los 16 obtenidos. (B) número de potenciales de acción por célula en todo el protocolo de estimulación en células control (8 ± 0.96 ; $n = 13$) y de animales epilépticos (13 ± 1.48 ; $n = 11$). (C) número de potenciales de acción en función de la corriente de estimulación inyectada desde 100 hasta 800 pA en células control ($n=9$) y de animales epilépticos ($n=12$).

resolver, es de qué manera un aumento en la frecuencia de descarga se asocia a cambios de excitabilidad en la célula. Nosotros, en el presente trabajo mostramos que este aumento en la frecuencia de descarga se acompaña con cambios en las respuestas subumbrales (Figuras 18 y 19),

lo que sugiere un aumento en la excitabilidad de las neuronas de animales epilépticos.

Estos resultados nos llevaron a examinar la relación estímulo-respuesta siguiendo un protocolo clásico (Crozier et al., 1936) para estudiar el comportamiento de las neuronas ante estímulos de intensidad y duración variable (Figura 23). Nosotros definimos como I_R a la intensidad del estímulo a la cual se obtiene un potencial de acción en células control y tratadas expuestas a la misma duración. De esta manera para una duración de estímulo de 1 ms, la I_R para las células control es de 600 pA en tanto que para las tratadas es de 320 pA (Figura 23). En términos generales, las células provenientes de animales epilépticos necesitan una menor intensidad de estímulo que las células control para generar un potencial de acción ($P < 0.05$).



T a m b i é n medimos la duración mínima (t_{min}) del estímulo para obtener un PA (Figura 23). Las células tratadas tuvieron un t_{min} de 0.1 ms en tanto que las control de 1 ms, las células de animales epilépticos necesitan una duración más corta del estímulo que las control ($P < 0.05$).

Figura 23.- Respuesta obtenida de células obtenidas de animales control (círculos llenos) y tratados con pilocarpina (cuadrados llenos) ante estímulos de intensidad creciente. Se graficó la duración del estímulo en función de su intensidad al potencial umbral de acción para cada célula. Se define I_R como la intensidad del estímulo a la cual se obtiene un potencial de acción en neuronas control y de animales epilépticos con una duración del estímulo equivalente. A una duración de 1 ms, las células control muestran una $I_R = 600$ pA mientras que las epilépticas de 320 pA. Definimos como t_{min} a la mínima duración para obtener un potencial de acción. Para neuronas de animales tratados con pilocarpina la t_{min} fué de 0.1 ms en tanto que las control de 1 ms.

Con este protocolo observamos que en neuronas de animales tratados con pilocarpina respondieron significativamente más a estímulos más cortos y menos intensos (Figura 23). Estos resultados son consistentes

con cambios en el potencial umbral y por lo tanto con un aumento en la excitabilidad de las células piramidales de CA1 de animales tratados. Más aún, este aumento en la frecuencia de descarga está relacionado con el ya conocido fenómeno de anti-acomodación observado en neuronas simpáticas de rata (Figura 22). Este fenómeno puede explicarse por cambios en la dependencia del voltaje de conductancias no inactivantes que están presentes alrededor del potencial umbral de la célula (Quintero et al., 2005) por ejemplo la corriente M. En donde la modulación de esta corriente cobra relevancia debido que determina en gran medida

la excitabilidad de la célula. Se necesita explorar en mayor detalle los mecanismos de regulación de esta corriente en las células tratadas, trabajos que estamos iniciando. De esta manera, los cambios en las conductancias iónicas y pasivas de la membrana pueden estar implicadas en las alteraciones eléctricas observadas en las neuronas de animales epilépticos.

Se sabe que la concentración intracelular de calcio está elevada significativamente en varios modelos experimentales de epilepsia y se

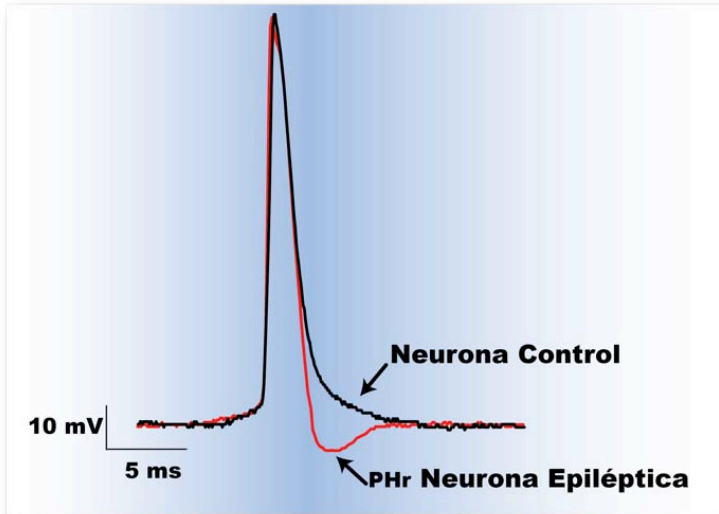


Figura 24.- Postpotenciales hiperpolarizantes rápidos (PHr) de neuronas piramidales de CA1 control y de animales tratados con pilocarpina. El PHr depende principalmente de canales de potasio dependientes de calcio en particular los llamados BK. Un aumento en el calcio intracelular aumentaría la amplitud de los PHr como se puede apreciar en las células de animales epilépticos. Esto constituye una prueba indirecta de que las células de animales epilépticos experimentales mantienen de manera crónica los niveles basales de calcio intracelular altos.

mantiene elevada inclusive hasta un año después. Las neuronas tienen en condiciones basales una concentración de calcio intracelular de 100-200 nM en tanto que inmediatamente después del SE inducido con pilocarpina alcanza niveles por arriba de 800 nM (DeLorenzo 2005). Después de 30 días post SE, los niveles de calcio permanecen elevados (>300) y se mantienen permanentemente (DeLorenzo et al., 2005; Sun DA et al., 2004; Raza M et al., 2001, 2004; Pal S et al., 2000, 2001).

También se sabe que el postpotencial hiperpolarizante rápido (PHr) sucede inmediatamente después de la repolarización, dura 2-5 ms y está determinado por los canales BK (Storm JF., 1987). Estos canales son de

la familia de canales de potasio activados por calcio y dado que tienen una gran conductancia se les llamo BK (big potassium conductance). Por lo tanto, la amplitud del PHr depende de la concentración intracelular de calcio de las células. En la figura 24 se puede observar que nuestras células epilépticas tienen un PHr de mayor amplitud que las control que prácticamente no lo tienen (Figura 24). Dado que estos postpotenciales son mediados por los canales BK de potasio sensibles a calcio (Storm JF, 1987), esto constituye una evidencia indirecta de que estas células mantienen en la fase crónica un nivel de calcio intracelular por arriba de lo normal.

RT-PCR CUANTITATIVA DE CELULA

UNICA

En estudios previos sobre la expresión de las distintas isoformas de PMCA se demostró que este grupo de proteínas juegan un papel no sólo como regulador de la concentración intracelular de calcio, sino también como un regulador de las señales de calcio (Brini, 2009). En el sistema nervioso, las PMCA's son muy importantes ya que hay muchos procesos complejos que requiere de vías altamente especializadas de regulación de señales de calcio. Se ha reportado que en células del hipocampo hay una sobre-expresión de estas proteínas en respuesta a elevaciones moderadas de calcio para mantener su homeostasis (Pottorf et al., 2006).

Un estudio sobre la expresión de las PMCA's en las fases tempranas de la epileptogénesis (1-4 hrs) inducida por ácido kaínico, se observó que no hay cambios significativos en la expresión de la PMCA1 en células de CA1 del hipocampo de ratas (García ML., et al., 1997). Sin embargo, en el mismo trabajo se observó una disminución de esta isoforma después de 12-72 hrs. De esta manera, el presente trabajo lo hemos enfocado a la fase crónica de la epilepsia donde la expresión de la PMCA puede reflejar un nuevo estado de equilibrio para el calcio intracelular en células del CA1 del hipocampo de rata.

Una vez que documentamos que las células de animales epilépticos son hiperexcitables, cuantificamos la expresión de la PMCA en célula única. Se hicieron las curvas estándar para cada isoforma de la PMCA utilizando los controles positivos y sondas Taqman correspondientes (Liss B., 2002). Se analizaron un total de 127 células, 52 controles y 75 experimentales. Del grupo control, sólo 46 y 63 células provenientes de animales tratados con pilocarpina reunieron los requisitos para su análisis y las últimas mostraron cambios de excitabilidad. De las 63 células experimentales, doce de ellas tuvieron una expresión muy pobre del GAPDH probablemente por problemas en su cosecha (7 células) o tuvieron un fenotipo electrofisiológico

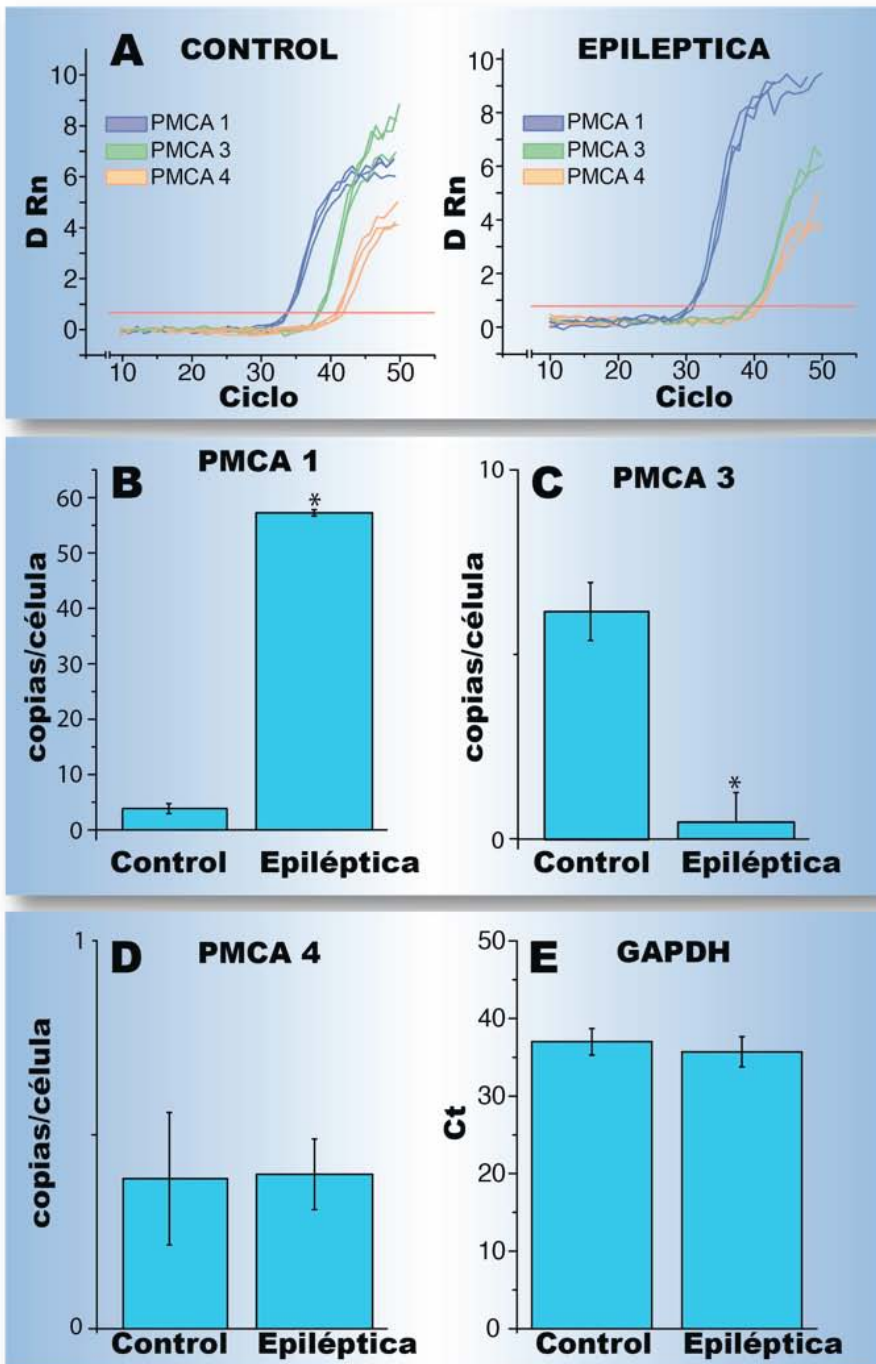


Figura 25.- PCR cuantitativa en célula única de los transcritos de PMCA expresados en neurona piramidal de CA1 de animales control y tratados con pilocarpina. (A) curvas de amplificación representativas de PMCA1, 3 y 4 en neuronas control (izquierda) y tratadas (derecha). La línea horizontal representa el corte para determinar el ciclo umbral (Ct). (B) PMCA1, células control (n = 13, 3.85 copias/célula); tratadas (n = 12, 57 copias/célula). La expresión de PMCA1 en células de animales epilépticos está significativamente aumentada (15 veces; $p < 0.05$) (C) PMCA3, células control (n = 11, ~6 copias/célula); células tratadas (n = 11, 0.6 copias/célula). La expresión de PMCA3 está significativamente disminuida (>13 veces; $p < 0.05$). (D) PMCA4, células control (n = 12, 0.2 copias/célula); tratadas (n = 10, 0.18 copias/célula). La expresión de PMCA4 en neuronas de CA1 no mostraron diferencias entre células control y de animales epilépticos. (E) GAPDH, células control (n = 10) tratadas (n = 9) mostraron una expresión similar. Los valores demuestran en promedio \pm error estándar, * = $P < 0.05$.

normal y una expresión normal de las PMCA y GAPDH (5 células). Por lo que solamente 42 células de animales tratados con pilocarpina fueron utilizadas para el análisis de expresión de las PMCA.

Encontramos que los niveles de expresión de GAPDH son muy homogéneos en las células de CA1 independientemente de si la célula es tratada o no, lo que sugiere una estricta regulación transcripcional (Figura 25E) y podría representar un buen control de referencia como gen constitutivo. La expresión de la PMCA1 es baja (3.85 copias/célula) en células control en tanto que de manera muy interesante en células tratadas se sobre-expresa (15 veces; $P < 0.05$; Figura 25B). En contraste, la PMCA3 en células control se expresa ligeramente más que PMCA1 (~6 copias/célula) y en las células tratadas hay un decremento significativo (>13 veces; $P < 0.05$; Figura 25C). La expresión de la PMCA4 se mantuvo muy baja tanto en células control como tratadas (0.2 copias/célula; Figura 25D).

La posibilidad de detectar la isoforma PMCA2 fue muy limitada dado que la curva estándar mostró que la reacción de RT-PCR con los iniciadores y sonda Taqman tenía baja eficiencia (pendiente de 1.93) y sensibilidad (intercepto 43.89). Es decir, los iniciadores de la PMCA2 no resultaron aptos para el nivel de detección en célula única. Dada la relevancia de la PMCA2 en el sistema nervioso, exploramos la expresión de esta isoforma utilizando RNA total de hipocampo de ratas control y tratadas con pilocarpina (datos no mostrados). La expresión no es significativamente diferente ($P > 0.05$) entre hipocampos control (3,980,082.2 mRNA copias/5 μ l \pm 1,876,228.6) y epilépticos (2,939,450.4 mRNA copias/5 μ l \pm 385,395.1). Debido a que en el hipocampo hay distintos tipos celulares, no podemos saber si estos resultados están sesgados por las células gliales ni pueden compararse con los resultados obtenidos para la expresión de las demás isoformas en célula única.

Estudios previos han mostrado que la isoforma más abundante del hipocampo es la PMCA1 seguida de la PMCA2 y PMCA3. Estos estudios también muestran que la PMCA4 tiene una baja expresión (Stahl et al.,

1992; Burette et al., 2003). Nuestros resultados concuerdan en que la PMCA4 tiene en general una baja expresión en el hipocampo. Sin embargo, nosotros encontramos que la PMCA3 tiene una mayor expresión que la PMCA1 en células piramidales. Las evidencias apuntan a que la PMCA1a es la más abundante en humano y rata en la región de CA1 del hipocampo (Zacharias et al., 1995; Kenyon et al., 2010). Dado que nuestras sondas no distinguen entre las distintas opciones de edición alternativa, es muy probable que estamos detectando principalmente a esta isoforma. Los cambios en la expresión de la PMCA1 observados en la epileptogénesis sostiene la idea de un papel predominantemente constitutivo a diferencia del papel que puede jugar la isoforma PMCA4 (Okunade et al., 2004). Se ha encontrado recientemente que la PMCA1a es la isoforma más abundante en el sistema nervioso y tiene un papel más especializado en neuronas ya que se localiza en la membrana plasmática del soma, dendritas y espinas dendríticas (Kenyon et al., 2010). La relevancia fisiológica de nuestros hallazgos puede ser analizada en el contexto de las propiedades cinéticas de isoformas específicas previamente analizadas por nuestro grupo de trabajo (Bravo-Martínez et al., 2010; Delgado-Coello et al., 2006). La mayoría de los estudios que analizan las propiedades de extrusión de calcio de las distintas isoformas de la PMCA se han centrado en las isoformas derivadas de la edición alternativa del sitio C, donde se encuentra el dominio de unión a calmodulina (CaM). A pesar de las limitaciones metodológicas, ahora es posible distinguir las isoformas rápidas que corresponden a las variantes "a" cuya afinidad por la CaM es baja y las lentas que corresponden a las variantes "b" cuya afinidad por la CaM es alta (Elwess et al., 1997; Caride 2001). En estudios donde se hace una expresión celular heteróloga de las isoformas, se demostró una mayor eficiencia para extruir calcio por parte de las isoformas PMCA2 y PMCA3 las cuales reducen el calcio citoplasmático un 30 y 35% respectivamente (Brini et al., 2003). Por el contrario, la isoforma PMCA4 solamente reduce el calcio un 15% y en estos estudios la PMCA1 fue incapaz de reducir la concentración de calcio.

De esta manera, a pesar de que la extrusión de calcio por parte de la PMCA1 es baja, la notable sobre expresión de esta isoforma representa una respuesta adaptativa para disminuir el calcio citoplasmático permitiendo a las células de animales epilépticos adquirir un nuevo equilibrio para el calcio. A pesar de que los niveles de calcio se decrementaron substancialmente, este nuevo equilibrio se mantiene por arriba del de las células normales (alrededor de 500 nM). Probablemente este nuevo nivel en el calcio citoplasmático esté encaminado a reducir la fuerza impulsora del ion calcio que lo induce a entrar a la célula cuando las compuertas de los canales dependientes de ligando y voltaje se abren. Dicho mecanismo permite que las corrientes entrantes de calcio sean de menor amplitud y por lo tanto la célula se protege de que su entrada vuelva a ser muy importante y la ponga en riesgo de morir.

Varios estudios han encontrado que la distribución de la PMCA1 y PMCA4 es ubicua entre los distintos tejidos del organismo (Brandt et al., 1992; Stauffer et al., 1993; Stauffer et al., 1995). Sin embargo, en términos generales la PMCA1 es la isoforma más abundante del organismo (Stauffer et al., 1993) seguido por PMCA4, en tanto que la PMCA2 y PMCA3 son más abundantes en tejidos excitables (Gerini et al., 1998; Stauffer et al., 1995; Filoteo et al., 1997; Strehler et al., 2004). Por otro lado, en trabajos donde se utilizan ratones deficientes (knockout) *pmca1* y *pmca4*^{-/-} apuntan a que la PMCA1 juega un papel de esencial para la vida dado que los ratones *pmca1*^{-/-} no sobreviven (Okunade et al., 2004). Los ratones hembra con deficiencia de *pmca4* parecen ser normales en tanto que los machos son infértiles (Okunade et al., 2004). Por lo tanto, a la luz de esta evidencia la PMCA1 puede representar una variante indispensable necesaria para extruir calcio en prácticamente todas las etapas del desarrollo en mamíferos (Stauffer et al., 1995; Filoteo et al., 1997; Strehler et al., 2004; Zacharias et al., 1999). Aún cuando todas las variantes de la PMCA influyen sobre la homeostasis del calcio, cuando se reta a las células con diferentes estímulos que incrementan el calcio, la PMCA1 adopta un papel relevante (Figura 25B). Una vez que el calcio intracelular alcanza niveles que no puede manejar la isoforma PMCA3, una isoforma lenta como es la PMCA1 adquiere gran relevancia para extruir el calcio y preservar la viabilidad.

PMCA3 es una isoforma rápida que tiene alta afinidad por el calcio (Brini et al., 2003), por lo que proponemos que en condiciones control o en las primeras etapas de la epileptogénesis PMCA3 juega un papel muy importante en detectar cambios leves del calcio intracelular y extruirlo en periodos cortos de tiempo (Figura 25C). En contraste, la PMCA1 que tiene menor afinidad por el calcio pero puede mantener la extrusión de calcio por periodos prolongados, se sobre-expresa en respuesta a incrementos importantes de calcio intracelular como en la epileptogénesis. La sobre-expresión de la PMCA1 parece ser un respuesta fisiológica que protege a la célula al disminuir los niveles de calcio. Estos niveles basales de calcio intracelular no llegan a los de las células normales probablemente para reducir la fuerza impulsora del calcio cuya consecuencia es disminuir las corrientes entrantes de calcio por los canales dependientes de ligando y voltaje pero sin que el calcio se eleve a niveles tóxicos.

CONCLUSIONES

En este trabajo por primera vez se analiza la expresión de las distintas isoformas de la PMCA en célula única piramidal de la región CA1 del hipocampo de ratas epilépticas en fase crónica. Se utilizó un enfoque novedoso al combinar registros de “whole-cell” con el propósito de documentar que las células utilizadas son hiperexcitables y PCR de tiempo real en célula única. Esto nos permitió correlacionar los cambios en la expresión de los distintos RNAm con la fase crónica de la epilepsia. En el presente trabajo, documentamos cambios moleculares en la neurona que implican a la proteína PMCA como un mecanismo de respuesta adaptativa a la epileptogénesis.

Las células obtenidas de animales experimentales mostraron cambios de excitabilidad de manera permanente dado que mostraron un aumento en la resistencia membranal y el bloqueo del fenómeno de acomodación que normalmente está presente en estas células. Este fenómeno de antiacomodación hace que la célula responda más ante los mismos estímulos que las células control. Estos cambios son consistentes con el desarrollo de la epilepsia en estos animales.

De la misma manera que en otros modelos experimentales, nuestras células de animales epilépticos mostraron también que tienen niveles elevados de calcio intracelular, evidenciado por un aumento en los postpotenciales hiperpolarizantes rápidos.

Uno de los cambios plásticos en estas células de animales epilépticos es la de cambiar los niveles de expresión de las isoformas de la PMCA. En donde hay una disminución significativa de la isoforma 3 y un aumento importante en la isoforma 1. Esto representa un cambio adaptativo para reducir los niveles intracelulares de calcio y mantener a largo plazo un nuevo estado de equilibrio en el manejo del calcio citoplasmático.

PERSPECTIVAS

76

Considerando la relevancia de la isoforma 2 de PMCA en el sistema nervioso y que se ha mostrado la expresión preferencial de una variante de la PMCA2 en respuesta a una despolarización (Zacharias 1996), será prioritario explorar los cambios en la expresión de esta isoforma, usando

sondas que la detecten a nivel de célula única. Además deberá explorarse la posibilidad de la inducción de nuevas isoformas de PMCA en este modelo. Por último, es de nuestro interés explorar cambios en la expresión de las isoformas del NCX y SERCA con la idea de comprender de forma integral la contribución de estos sistemas en la homeostasis de células inducidas a epilepsia crónica.

Uno de los cambios fundamentales que sufren las células de animales epilépticos es un aumento en su excitabilidad. Esta excitabilidad depende de corrientes iónicas subyacentes cuya actividad la pueden aumentar o disminuir. De esta manera, desde el punto de vista electrofisiológico consideramos importante analizar los aspectos biofísicos y los mecanismos que regulan a estas corrientes en las células de animales epilépticos.

El aumento intracelular de calcio por un aumento en la actividad glutamatérgica a nivel post-sináptico en células de animales epilépticos tiene por consecuencia el desarrollo de estrés oxidativo. Esto se ha visto tanto en pacientes con *status epilepticus* como en modelos experimentales de epilepsia, por ejemplo el de la pilocarpina (Tomé et al., 2010). De la misma forma, la reperfüción de tejidos en los modelos de isquemia-anoxia promueven la liberación de especies reactivas (Belly McDermott, 2008). En un modelo experimental de estrés oxidativo se encontró que la actividad de la PMCA es inhibida significativamente por la producción de especies reactiva en tanto que la SERCA en mucho menor proporción (Souza dos Santos, et al., 2007). En dicho trabajo se sugiere que la PMCA podría ser el blanco principal de las especies reactivas y que esto altera los mecanismos de homeostasis del calcio. Tomando en consideración que el estrés oxidativo es un fenómeno muy importante en la epilepsia, resulta relevante investigar sus alcances en la epilepsia y de que manera afectan a la PMCA y la regulación del calcio citoplasmático basal.

BIBLIOGRAFIA

Abel T, Lattal KM (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval *Curr Opin Neurobiol* 11:180-187

Adamo Hp, Penniston Jt (1992) New Ca²⁺ pump isoforms generated by alternative splicing of rPMCA2 mRNA *Biochem J* 283: 355–359,

Algenstaedt P, Antonetti DA, Yaffe MB, Kahn CR (1997) Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca²⁺-ATPases in muscle and heart *J Biol Chem* 272: 23696–23702

Al Nasser, I. and Crompton, M. (1986) The reversible Ca²⁺-induced permeabilization of rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 239: 19-29.

Alonso MT, Villalobos C, Chamero P, Alvarez J, Garcia-Sancho J (2006) Calcium microdomains in mitochondria and nucleus *Cell Calcium* 40:513–525

Amaral DG (1978) A Golgi study of the cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Com. Neurol.* 182:851-914.

Aminoff MJ, Simon RR (1989) Status epilepticus: Causes, clinical features and consequences in 98 patients *Am J Med* 69:657-666

Anderson WW, Swartzwelder HS, Eilso WA (1987) the NMDA receptor antagonist 2-amino-5-phosphoovaleate blocks stimulus train-induced epileptogenesis but not epileptiform bursting in the rat hippocampal slice *J Neurophysiol* 57:1-21

Angeleri F, Majkowski J, Cacchio G, Sobieszck A, D'Acunto S, Gesuita R, et al (1999) Posttraumatic epilepsy risk factors: one-year prospective study after head injury *Epilepsia* 40:1222-1230

Anger M, Samuel JL, Marotte F, Wuytack F, Rappaport L, Lompre AM (1994) In situ mRNA distribution of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoforms during ontogeny in the rat *J Mol Cell Cardiol* 26: 539–550

Anger M, Samuel JL, Marotte F, Wuytack F, Rappaport L, Lompre AM (1993) The sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase mRNA isoform, SERCA 3, is expressed in endothelial and epithelial cells in various organs *FEBS Lett* 334: 45–48

- Annegers J F, Coan SP (2000) The risks of epilepsy alter traumatic brain injury *Seizure* 9:453-457
- Annegers JF (1993) The epidemiology of epilepsy In E Wyllie (eds), *The Treatment of Epilepsy*, pp 157-164 Philadelphia, Lea and Febiger
- Armesilla AL, Williams JC, Buch MH, Pickard A, Emerson M, Cartwright EJ, et al (2004) Novel functional interaction between the plasma membrane Ca²⁺ pump 4b and the proapoptotic tumor suppressor Ras-associated factor 1 (RASSF1). *J Biol Chem* 279: 31318–31328
- Asikainen I, Kaste M, Sarna S (1999) Early and late posttraumatic seizures in traumatic brain injury rehabilitation patients: brain injury factors Rausing late seizures and influence of seizures on long-term outcome *Epilepsia* 40:584-589
- Astrup J, Siesjo BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia- the ischemic penumbra *Stroke* 12:723-725
- Baba-Aissa F, Raeymaekers L, Wuytack F et al (1996a) Purkinje neurons express the SERCA3 isoform of the organellar type Ca(2+)-transport ATPase *Brain Res Mol Brain Res*: 41:169–174
- Baba-Aissa F, Raeymaekers L, Wuytack F, De Greef C, Missiaen L, Casteels R (1996b) Distribution of the organellar Ca²⁺ transport ATPase SERCA2 isoforms in the cat brain *Brain Res* 743: 141–153
- Baba-Aissa F, Van Den Bosch L, Wuytack F, Raeymaekers L, Casteels R (1998) Regulation of the sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase (SERCA) 2 gene transcript in neuronal cells *Brain Res Mol Brain Res* 55: 92–100
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system *Trends Neurosci* 15:303–308
- Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkenin JD (2000) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death *Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions Cell Calcium* 28: 285–296.
- Bartolomei F, Khalil M, Wendling F, Sontheimer A, Regis J, Ranjeva JP, et al. (2005) Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia*. 46:677–87.
- Bathori G, Csordas G, Garcia-Perez C, Davies E, Hajnoczky G (2006) Ca²⁺-dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) *J Biol Chem* 281:17347–17358,

Bautista DM, Hoth M, Lewis RS (2002) Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells. *J Physiol* 541:877-894

Bauzano-Poley EA, Rodríguez-Barrionuevo C (2001) Electroencephalographic diagnosis of the idiopathic generalized epilepsies of childhood *Rev Neurol* 32:365-372

Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP (1980) Injections of kainic acid into the amygdaloid comoles of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy *Neuroscience* 5:515-528

Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition *Physiol Rev*, 79:1127-1155

Bernardi P, Azzone GF (1982) A membrane potentialmodulated pathway for Ca²⁺ efflux in rat liver mitochondria *FEBS Lett* 139: 13–16,

Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling *Neuron* 21:13-26

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517–529

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 1: 11-21

Bezin S, Charpentier G, Fossier P, Cancela JM (2006) The Ca(2+)-releasing messenger NAADP, a new player in the nervous system *J Physiol Paris* 99(2–3):111–118

Bezin S, Fossier P Cancela J-M, (2009) Nucleoplasmic reticulum is not essential in nuclear calcium signalling mediated by cyclic ADPrribose in primary neurons *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2008) 456:581–586

Bharucha NE (2005) Epidemiology, In: *Epilepsy Atlas*, pp 22-25, WHO

Bito H, Deisseroth K, Tsien RW, (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression, *Cell* 87: 1203–1214

Blackstad TW (1956) Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.* 105:417-537.

Blackstad TW (1958) On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata. An experimental study in the rat. *Acta Anat.* 35:202-214.

Blackstad TW, Brink K, Hem J, Jeune B (1970) Distribution of hippocampal

- mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J Compl Neurol*. 138:433-450.
- Blackstone C, Sheng M (1999) Protein targeting and calcium signaling microdomains in neuronal cells. *Cell Calcium* 26: 181-192
- Blackstone C, Sheng M (2002) Postsynaptic calcium signaling microdomains in neurons. *Front Biosci* 7: d872-885
- Bleck T (1995) Seizures in the Critically ill patient In: Parrillo JE, Bone RC Principles of diagnosis and management St Louis, Missouri Mosby Year Book: 65:1217-1233
- Bliss TVP, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path *J Physiol* 232:331-356
- Bobbe R, Bredoux R, Corvazier E, Lacabaratz-Porret C, Martin V, Kovacs T, Enouf J, (2005) How many Ca²⁺-ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets. *Platelets* 16:133–150
- Bobbe R, Bredoux R, Wuytack F et al (1994) 'The rat platelet 97-kDa Ca²⁺-ATPase isoform is the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 3 protein' *J BiolChem* 269: 1417–1424
- Bootman MD, Fearnley C, Smyrniak L, MacDonald F and Roderick HL, (2009) An update on nuclear calcium signaling, *Journal of Cell Science* 122, 2337-2350
- Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ (2001) The organisation and functions of local Ca²⁺ signals. *J Cell Sci* 114: 2213-2222
- Bozulic LD, Malik MT, Powell DW, Nanez A, Link AJ, Ramos KS, Dean WL, (2007) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase associates with CLP36, alpha-actinin and actin in human platelets. *Thromb Haemost* 97: 587–597
- Brand MD (1985) The stoichiometry of the exchange catalysed by the mitochondrial calcium/sodium antiporter *Biochem J* 229: 161–166,
- Brand MD, (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction, *Biochem Soc Trans* 33: 897–904
- Brandl C, Green N, Korczak B et al (1986) 'Two Ca²⁺-ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences' *Cell* 44: 597–607
- Brandl CJ, deLeon S, Martin DR et al (1987) 'Adult forms of the Ca²⁺

ATPase of sarcoplasmic reticulum' J Biol Chem 262: 3768–3774

Brandl CJ, deLeon S, Martin DR, MacLennan DH (1987) Adult forms of the Ca²⁺ATPase of sarcoplasmic reticulum Expression in developing skeletal muscle J Biol Chem 262: 3768–3774

Brandt C, Glien M, Potschka H, Volk H, Loscher W (2003) Epileptogenesis and neuropathology alter different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats Epilepsy Res 55:83-103

Brandt P, Ibrahim E, Bruns GA, Neve RL, (1992) Determination of the nucleotide sequence and chromosomal localization of the ATP2B2 gene encoding human Ca(2+)-pumping ATPase isoform PMCA2. Genomics 14: 484–487

Brandt P, Neve RL, Kammesheidt A, Rhoads RE, Vanaman TC (1992) Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels J Biol Chem 267:4376-4385

Brandt P, Neve RL, Kammesheidt A, Rhoads RE, Vanaman TC, (1992) Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels. J Biol Chem 267: 4376–4385

Bravo-Martínez J, Delgado-Coello B, Mas-Oliva J (2010) Cell calcium extrusion systems and their role in epileptogenesis Open Neurosci J 4:1-12

Brini M (2009) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase: from a housekeeping function to a versatile signaling role Pflugers Arch 457:657-664

Brini M, Bano D, Manni S, Rizzuto R, Carafoli E (2000) Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca²⁺ signalling EMBO 19:4926-4935

Brini M, Coletto L, Pierobon NN, Kraev N, Guerini D, Carafoli E (2003) A comparative functional analysis of plasma membrane Ca²⁺pump isoforms in intact cells J Biol Chem 278:24500-24508

Brodin P, Falchetto R, Vorherr T, Carafoli E (1992) Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca²⁺ pump Eur J Biochem 204:939–946

Brose N, Petrenko AG, Sudhof TC, Jahn R (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface Science 256:1021-1025

Brown BJ, Hilfiker H, DeMarco SJ, Zacharias DA, Greenwood TM, Guerini D, Strehler EE, (1996) Primary structure of human plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 3. *Biochim Biophys Acta* 1283: 10–13

Bullock R, Aauner A, Woodward J, Young HF (1995) Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke *Stroke* 26:2187-2189

Buntinas L, Gunter KK, Sparagna GC, Gunter TE (2001) The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria *Biochim Biophys Acta* 1504: 248–261,

Burette A, Rockwood JM, Strehler EE, Weinberg RJ (2003) Isoform-specific distribution of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in the rat brain *J Comp Neurol* 4567:464-476

Burk Se, Shull Ge (1992) Structure Of The Rat Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products *J Biol Chem* 267: 19683–19690,

Burk SE, Lytton J, MacLennan DH, Shull GE (1989) cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump *J Biol Chem* 264: 18561–18568

Burk SE, Shull GE (1992) Structure of the rat plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products. Skeletal muscle-specific splicing results in a plasma membrane Ca(2+)-ATPase with a novel calmodulin-binding domain. *J Biol Chem* 267: 19683-19690

Carafoli E, (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev* 71: 129–153

Carafoli E, (1994) Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J* 8: 993–1002

Carafoli E, Nicotera P, Santilla L (1997) Calcium signalling in the cell nucleus *Cell Calcium* 22:313-319

Carafoli E, Zurini M, (1982) The Ca²⁺-pumping ATPase of plasma membranes. Purification, reconstitution and properties. *Biochim Biophys Acta* 683: 279–301

Caride, AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Pászty K, Enyedi A, Penniston JT (2001) Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca²⁺: fast pumps reside in fast cells *Cell Calcium* 30:49-57

Cataldi M, Lariccia V, Secondo A, di Renzo G, annunziato L. (2005) The antiepileptic drug levetiracetam decreases the inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent calcium increase induced by ATP and bradykinin in PC12 cells. *J. Pharmacol. Exp Ther* 313:720-730.

Cavalheiro EA, Riche DA, Le Gal La Salle G (1982) Long-Term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 53:581-589

Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. (1991) Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 32:778–82.

Cavieses JD, (1984) Calmodulin and the target size of the (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase of human red-cell ghosts. *Biochim Biophys Acta* 771: 241–244

Chalmers S, Nicholls DG (2003) The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria *J Biol Chem* 278: 19062–19070,

Chan DC, (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development, *Cell* 125: 1241–1252

Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC, (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development, *J Cell Biol* 160: 189–200

Chen J, Devivo M, Dingus J, Harry A, Li J, et al (1995) A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein β subunits *Science* 268: 1166–1169,

Chen J, Devivo M, Dingus J, Harry A, Li J, Sui J, Carty Dj, et al (1995) A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein β subunits *Science* 268: 1166–1169,

Chicka MC, Strehler EE (2003) Alternative splicing of the first intracellular loop of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 alters its membrane targeting *J Biol Chem* 278:18464–18470

Choquette D, Hakim G, Filoteo AG, Plishker GA, Bostwick JR, Penniston JT, (1984) Regulation of plasma membrane Ca²⁺ ATPases by lipids of the phosphatidylinositol cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 125:908–915

Cipolat S, Martins O, Brito, Dal Zilio B, Scorrano L, (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15927–15932

Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. . J Compl Neurol. 246: 435-458

Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. (1987) The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. Neuroscience. 23:953-68

Crompton, M., Virji, S. and Ward, J. M. (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. Eur. J. Biochem. 258: 729-735.

Crompton M (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem. J. 341: 233-249.

Crozier WJ (1936) On the sensory discrimination of intensities Proc Natl Acad Sci USA 22:412-416

Curia G, Longob D, Biaginib G, Jonesc RSG, Avoli M (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. J Neuroci Meth 172:143-157.

Davalos A, Castillo J, Serena J, Noya M (1997) Duration of glutamate release alter acute ischemic stroke Stroke 28:708-710

David G, Barrett JN, Barrett EF, (1998) Evidence that mitochondria buffer physiological Ca²⁺ loads in lizard motor nerve terminals, J Physiol 509: (Pt 1) 59-65

Davies SM, Petrwee RG, Riedel G (2002) Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus Neuropharmacology 42:993-1007

De Jaegere S, Wuytack F, De Smedt H, Van Den Bosch L, Casteels R (1993) Alternative processing of the gene transcripts encoding a plasma-membrane and a sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump during differentiation of BC3H1 muscle cells Biochim Biophys Acta 1173: 188-194

De Jaegere S, Wuytack F, Eggermont JA, Verboomen H, Casteels R, (1990) Molecular cloning and sequencing of the plasma-membrane Ca²⁺ pump of pig smooth muscle. Biochem J 271: 655-660

Dean WL, Chen D, Brandt PC, Vanaman TC, (1997) Regulation of platelet plasma membrane Ca²⁺-ATPase by cAMP-dependent and tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 272: 15113-15119

Delgado-Coello B, Santiago-García J, Zarain-Herzberg A, Mas-Oliva J (2003) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase mRNA expression in murine hepatocarcinoma and regenerating liver cells. Mol Cell Biochem 247:177-

Delgado-Coello B, Bravo-Martínez J, Mas-Oliva J (2009) Promega Technical Reports Detecting PMCA transcripts in single hippocampal neurons (http://www.promegacom/pubs/tpub_010htm)

Delgado-Coello B, Bravo-Martínez J, Sosa-Garrocho M, Briones-Orta MA, Macías-Silva M, Mas-Oliva J (2010) Plasma membrane calcium ATPase isoform 3 expression in single cells isolated from rat liver *Mol Cell Biochem* 344:117–124

Delgado-Coello B, Trejo R, Mas-Oliva J (2006) Is there a specific role for the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in the hepatocyte? *Mol Cell Biochem* 285:1-15

DeLorenzo RJ (1997) *Clinical and Epidemiological Study of Status Epilepticus in the Elderly* Newton, MA: Butterworth-Heinemann

DeLorenzo RJ, (1989) *The epilepsias*, In: WG Bradley, RB Daroff, GM Fenichel CD Marsden (eds), *Neurology in Clinical Practice*, Stoneham, MA: Butterworth Publishers

DeLorenzo RJ, (1991) The challenging genetics of epilepsy *Epilepsy Res Suppl* 4:3-17

DeLorenzo RJ, Pal S, Sombati S (1998) Prolonged activation of the N-methyl-D-aspartate receptor- Ca^{2+} transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14482-14487

DeLorenzo RJ, Pellock JM, Towne AR, Boggs JG (1995) Epidemiology of status epilepticus *J Clin Neurophysiol* 12:316-325

DeMarco SJ, Strehler EE, (2001) Plasma membrane Ca^{2+} -atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins. *J Biol Chem* 276: 21594–21600

Demaurex N, Poburko D, Frieden M, (2009) Regulation of plasma membrane calcium fluxes by mitochondria *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 1383–1394

Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E, (2008) The plasma membrane Ca^{2+} ATPase of animal cells: Structure, function and regulation *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476: 65–74

Dietrich WD (1998) Neurobiology of stroke *Int Rev Neurobiol* 42:55-101

Dode L, De Greef C, Mountain I et al (1998) Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA J Biol Chem 273: 13982–13994

Dode L, Wuytack F, Kools PF et al (1996) cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3 gene [published erratum appears in Biochem J 318 (Pt 2): 689–699

Domi T, Di Leva F, Fedrizzi L, Rimessi A, Brini M, (2007) Functional specificity of PMCA isoforms? Ann NY Acad Sci 1099:237–246

Dowzendo A, Zielinski JJ (1971) Problems of epilepsy in Poland Epilepsia 12:173-177

Duchen MR (1992) Ca²⁺-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons Biochem J 283: 41–50,

Dumont RA, Lins U, Filoteo AG, Penniston JT, Kachar B, Gillespie PG, (2001) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2a is the PMCA of hair bundles. J Neurosci 21: 5066–5078

Duncan RS, Hwang SY, Koulen P (2007) Differential inositol 1,4,5-trisphosphate receptor signaling in a neuronal cell line Int J Biochem Cell Biol 39(10):1852-62

During MJ, Spencer DD (1993) Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain Lancet 341:1607-1610

Ebert U, Brandt C, Loscher W (2002) Delayed sclerosis, neuroprotection, and limbic epileptogenesis after status epilepticus in the rat Epilepsia 43:86-95

Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, Nathanson MH (2003) Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum Nat Cell Biol 5:440–446

Eder A, Bading H (2007) Calcium signals can freely cross the nuclear envelope in hippocampal neurons: somatic calcium increases generate nuclear calcium transients BMC Neurosci 30:8:57

Eggermont JA, Wuytack F, Casteels R (1991) Characterization of the 3' end of the pig sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump gene 2Biochim Biophys Acta 1088:448-451

Eggermont JA, Wuytack F, Casteels R (1991) Characterization of the 3'

- end of the pig sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca^{2+} pump gene 2
Biochem Biophys Acta 1088: 448–451
- Elwess NL, Filoteo AG, Enyedi A, Penniston JT (1997) Plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca^{2+} *J Biol Chem* 272:17981-1798
- Enslén H, Sun P, Brickey D, Soderling SH, Klamo E, Soderling TR, (1994) Characterization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV Role in transcriptional regulation, *J Biol Chem* 269: 15520–15527
- Enyedi A, Flura M, Sarkadi B, Gardos G, Carafoli E, (1987) The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J Biol Chem* 262: 6425–6430
- Falchetto R, Vorherr T, Brunner J, Carafoli E (1991) The plasma membrane Ca^{2+} pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain *J Biol Chem* 266:2930–2936
- Falchetto R, Vorherr T, Brunner J, Carafoli E, (1991) The plasma membrane Ca^{2+} pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *J Biol Chem* 266: 2930–2936
- Falchetto R, Vorherr T, Carafoli E (1992) The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme *Protein Sci* 1:1613–1621
- Falchetto R, Vorherr T, Carafoli E, (1992) The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci* 1: 1613–1621
- Fanning AS, Anderson JM (1999) Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Op Cell Biol* 11: 432-439
- Ferrie CD (2005) Idiopathic generalized epilepsies imitating focal epilepsies *Epilepsia* 46:91-95
- Fierro L, DiPolo, R, Llano, I (1998) Intracellular calcium clearance in Purkinje cell somata from rat cerebellar slices *J Physiol* 510:499-512
- Filoteo AG, Elwess NL, Enyedi A, Caride A, Aung HH, Penniston JT (1997) Plasma membrane Ca^{2+} pump in rat brain Patterns of alternative splices seen by isoform-specific antibodies *J Biol Chem* 272:23741-23747
- Fisher CL, Ghysdael J, (1991) Cambier JC, Ligation of membrane Ig leads to calciummediated phosphorylation of the proto-oncogene, *Ets-1*, *J Immunol* 146 : 1743–1749

Fransson A, Ruusala A, Aspenstrom P, (2003) Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis, *J Biol Chem* 278: 6495–6502

Frazen N (2000) *Seizures and Epilepsy: Hope through research* Bethesda, MD: NINDS

Frederick RL, Shaw JM, (2007) Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle, *Traffic* 8: 1668–1675

Fujimoto T (1993) Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae *J Cell Biol* 120: 1147–1157,

Gaarskjaer FB (1978) Organization of the mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi, I. Tereminal area related to number of granule and piramidal cells. *J Compl Neurol.* 178: 49-72.

Gaarskjaer FB (1986) The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res.* 392:335-357.

Garcia ML, Murray KD, Garcia VB, Strehler EE, Isackson PJ (1997) Seizure-induced alterations of plasma membrane calcium ATPase isoforms 1, 2 and 3 mRNA and protein in rat hippocampus *Mol Brain Res* 45:230-238

Garner CC, Nash J, Haganir RL (2000) PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol* 10: 274-280

Gensburger C, Freyermuth S, Klein C and Malviya AN, (2003) In vivo nuclear Ca^{2+} -ATPase phosphorylation triggers intermediate size molecular transport to the nucleus *BBRC* 303:1225-1228

Gerasimenko JV, Maruyama Y, Yano K, Dolman NJ, Tepikin AV, Petersen OH, Gerasimenko OV (2003) NAADP mobilizes Ca^{2+} from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors *J Cell Biol* 163:271–282

Gerasimenko O V, Gerasimenko J V, Tepikin A V and Petersen O H (1995) ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope *Cell* 80: 439–444

Ghajar J (2000) Traumatic brain injury *Lancet* 356:923-929

Gilchrist J C and Pierce G N (1993), Identification and purification of a calcium-binding protein in hepatic nuclear membranes *J BiolChem* 268: 4291–4299

Gill R, Andine P Hillered L, Persson L, Hagberg H (1992) The effect of MK-

- 801 on cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischaemia in the rat *J Cereb Blood Flow Metab* 12:371-379
- Glien M, Brandt C, Potschka H, L Oscher W. (2002) Effects of the novel antiepileptic drug levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 43:350–7.
- Gloveli T, Egorov AV, Schmitz D, Heinemann U Muller W (1999) Carbachol-induced changes in excitability and $[Ca^{2+}]_i$ signalling in projection cells of medial entorhinal cortex layers II and III *Eur J Neurosci*, 11:3626-3636
- Goellner GM, DeMarco SJ, Strehler EE, (2003) Characterization of PISP, a novel single-PDZ protein that binds to all plasma membrane Ca^{2+} -ATPase b-splice variants. *Ann NY Acad Sci* 986: 461–471
- Golding EM, Robertson CS, Bryan RMJ (1999) The consequences of traumatic brain injury on cerebral blood flow and autoregulation: a review *Clin Exp Hypertens* 21:299-332
- Goldensohn ES, Historical Perspectives, En: *Epilepsy: A Comprehensive Textbook*, EDs. Engels J y Pedley TA, Edit. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, 1997.
- Gopinath RM, Vincenzi FF, (1977) Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of $(Ca^{2+}$ - Mg^{2+})ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 77: 1203–1209
- Gopinath SP, Valadka AB, Goodman JC, Robertson CS (2000) Extraellular glutamate and aspartate in head injured patients *Acta Neurochir Suppl* 76:437-438
- Graham SH, Shiraishi K, Panter SS, Simon RP, Faden AI (1990) Changes in extraellular amino acid neurotransmitters produced by focal cerebral ischemia *Neurosci Lett* 110:124-130
- Grati M, Aggarwal N, Strehler EE, Wenthold RJ (2006) Molecular determinants for differential membrane trafficking of PMCA1 and PMCA2 in mammalian hair cells *J Cell Sci* 119:2995–3007
- Greeb J, Shull GE, (1989) Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem* 264: 18569–18576
- Grover AK and Khan I (1992) 'Calcium pump isoforms, diversity, selectivity and plasticity' *Cell Calcium* 13:9–17
- Guerini D (1998) The significance of the isoforms of plasma membrane

calcium ATPase Cell Tissue Res 292:191-197

Guerini D, Garcia-Martin E, Gerber A, Volbracht C, Leist M, Gutiérrez-Merino C, Carafoli E, (1999) The expression of plasma membrane Ca²⁺ pump in cerebellar granule neurons is modulated by Ca²⁺, J Biol Chem 274: 1667–1676

Gunter TE, Buntinas L, Sparagna GC Gunter KK (1998) The Ca²⁺ transport mechanisms of mitochondria and Ca²⁺ uptake from physiological type Ca²⁺ transients Biochim Biophys Acta, 1366:5-15

Gunteski-Hamblin AM, Greeb J, Shull GE (1988) A novel Ca²⁺ pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene Identification of cDNAs encoding Ca²⁺ and other cation-transporting ATPase using an oligonucleotide probe derived from the ATP-binding site J Biol Chem 263: 15032–15040

Haerer AF, Anderson DW, Schoenberg BS (1986) Prevalence and clinical features of epilepsy in a biracial United States population Epilepsia 27:66-75

Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ (2002) The permeability transition pore complex: another view. Biochimie 84 (2002) 153–166

Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, et al. (1997) Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 94:13311–6.

Hao L, Rigaud JL, Inesi G, (1994) Ca²⁺/H⁺ countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids. J Biol Chem 269: 14268–14275

Hasselbach W, Makinose M (1961) 'Die Calciumpumpe der 'Erschlaffungsgrana' des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-spaltung' Biochem Z 333:518–528

Hauser WA, Hesdorffer DC (1990) Epilepsy: Frequency causes and consequences, New York: Demos

Hauser WA, Kurland LT (1975) The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 Trough 1967 Epilepsia 16:1-66

Heim R, Hug M, Iwata T, Strehler Ee, And Carafoli E (1992) Microdiversity of human-plasma-membrane calcium-pump isoform 2 generated by alternative RNA splicing in the N-terminal coding region Eur J Biochem

205: 333–340,

Heinemann U, Buchheim K, Gabriel S, Kann O, Kovacs R, Schuhmann S (2002a) Cell death and metabolic activity during epileptiform discharges and status epilepticus in the hippocampus *Prog Brain Res* 135:197-210

Heinemann U, Buchheim K, Gabriel S, Kann O, Kovacs R, Schuhmann S (2002b) Coupling of electrical and metabolic activity during epileptiform discharges *Epilepsia* 43:168-173

Herman ST (2002) Epilepsy after brain insult: targeting epileptogenesis *Neurology* 59:S21-S26

Hilfiker H, Strehler-Page Ma, Stauffer Tp, Carafoli E, And Strehler Ee (1993) Structure of the gene encoding the human plasma membrane calcium pump isoform 1 *J Biol Chem* 268: 19717–19725,

Hilge M, Aelen J, Perrakis A, Vuister GW (2007) Structural Basis for Ca²⁺ Regulation in the Na⁺/Ca²⁺ Ann NY Acad Sci 1099: 7-15

Hill JK, Williams DE, LeMasurier M, Dumont RA, Strehler EE, Gillespie PG (2006) Splice-site A choice targets plasmamembrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 to hair bundles *J Neurosci* 26:6172–6180

Hjorth-Simonsen A and Jeune B (1972) Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J. Com. Pneurol.* 144:215-231.

Hort J, Brozek G, Mares P, Langmeier M, Komarck V (1999) Cognitive functions alter pilocarpine-induced status epilepticus: changes during silent period precede appearance of spontaneous recurrent seizures *Epilepsia* 40:1177-1183

Howard A, Barley Nf, Legon S, Walters Jrf (1994) Plasma-membrane calcium-pump isoforms in human and rat liver *Biochem J* 303: 275–279,

Howard A, Legon S, Walters JRF (1993) Human And Rat Intestinal Plasma membrane calcium pump isoforms *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 265: G917–G925,

Hunag CC, Hsu KS (2001) Progress in understanding the factors regulating reversibility of long-term potentiation *Rev Neurosci* 12:51-68

Inesi G, Cantilina T, Yu X et al (1992) 'Long-range intramolecular linked functions in activation and inhibition of SERCA ATPases' *AnnNYAcadSci* 671: 32–48

Inesi G, Chen L, Sumbilla C, Lewis D, Kirtley ME (1995) Ca²⁺ binding

and translocation by the sarcoplasmic reticulum ATPase: functional and structural considerations *Biosci Rep* 15:327–339

James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC, (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery, *J Biol Chem* 278: 36373–36379

James P, Maeda M, Fischer R, Verma AK, Krebs J, Penniston JT, Carafoli E (1988) Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes *J Biol Chem* 263:2905–2910

James PH, Pruschy M, Vorherr TE, Penniston JT, Carafoli E, (1989) Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry* 28: 4253–4258

Jarrett HW, Penniston JT, (1977) Partial purification of the Ca²⁺-Mg²⁺ ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator of 3':5' - cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 77:1210–1216

Jensen KF, Ohmstede CA, Fisher RS, Sahyoun N, (1991) Nuclear and axonal localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type Gr in rat cerebellar cortex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2850–2853

Jim W, Sugaya A, Tsuda T, Ohguchi H, Sugaya E. (2000) Relationship between large conductance calcium-activated potassium channel and bursting activity. *Brain Res* 860: 21-28.

Johnson RJ, Pyun HY, Lytton J, Fine RE (1993) Differences in the subcellular localization of calreticulin and organellar Ca(2+)-ATPase in neurons *Brain Res Mol Brain Res* 17: 9–16

Jung DW, Baysal K, Brierley GP (1995) The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral *J Biol Chem* 270: 672–678,

Kadambi VJ, Kranias EG (1997) Phospholamban: a protein coming of age *Biochem Biophys Res Commun* 239: 1–5

Kamagate A, Herchuelz A, Bollen A, Van Eylen F (2000) Expression of multiple plasma membrane Ca²⁺-ATPases in rat pancreatic islet cells *Cell Calcium* 27: 231-46

Katayama Y, Becker DP, Tamura T, Hovda DA (1990) Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury *J Neurosurg* 73:889-900

Katsura K, Kristian, T, Siesjo, BK (1994) Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain, *Biochem Soc Trans* 22:991-996

Keeton TP, Burk SE, Shull GE (1993) Alternative Splicing of Exons Encoding the Calmodulin-binding Domains and C Termini of Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase Isoforms 1,2,3, and 4 THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 268 :2740-2746,

Kenyon KA, Bushong EA, Mauer AS, Strehler EE, Weinberg RJ, Burette AC (2010) Cellular and subcellular localization of the neuron-specific plasma membrane calcium ATPase PMCA1a in the rat brain J Comp Neurol 518: 3169-3183

Kiernan MC, Krishnan AV, Lin CSY, Burke D, Berkovic SF (2005) Mutation in the Na⁺ channel subunit SCN1B produces paradoxical changes in peripheral nerve excitability Brain 128:1841-1846

Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan Yn, And Sheng M (1995) Clustering of Shaker-type K1 channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases Nature 378: 85–88,

Kim YT, Namkung YL, Kwak J, Suh CK (2007) Involvement of Na⁺–Ca²⁺ exchanger on metabotropic glutamate receptor 1-mediated [Ca²⁺]_i transients in rat cerebellar Purkinje neurons Neuroscience 146: 170-77

Kitaura Y, Matsumoto S, Satoh H, Hitomi K, Maki M, Peflin (2001) ALG-2, members of the penta-EF-hand protein family, form a heterodimer that dissociates in a Ca²⁺-dependent manner, J Biol Chem 276: 14053–14058

Korczak B, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, Ingles CJ, Green NM, MacLennan DH (1988) Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca²⁺-ATPase gene J Biol Chem 263: 4813–4819

Kornau Hc, Schenker Lt, Kennedy Mb, And Seeburg Ph (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95 Science 269: 1737–1740,

Kosk-Kosicka D, Bzdega T, (1988) Activation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. J Biol Chem 263:18184–18189

Koss KL, Kranias EG (1996) Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility Circ Res 79: 1059–1063

Kramer G (2001) Epilepsy in the elderly: some clinical and pharmacotherapeutic aspects Epilepsia 42:55-59

Krebs J, (2009) The influence of calcium signaling on the regulation of alternative splicing, Biochim Biophys Acta 1793(6): 979-84.

Krebs J, Klemenz R, (2000) The ALG-2/AIP-complex, a modulator at the

- interface between cell proliferation and cell death? A hypothesis, *Biochim Biophys Acta* 1498: 153–161
- Krebs J, Saremaslani P, Caduff R, (2002) ALG-2: a Ca²⁺-binding modulator protein involved in cell proliferation and in cell death, *Biochim Biophys Acta* 1600: 68–73
- Krebs J, Vasak M, Scarpa A, Carafoli E (1987) Conformational differences between the E1 and E2 states of the calcium adenosinetriphosphatase of the erythrocyte plasma membrane as revealed by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 26: 3921–3926
- Kuhn A, Goldstein DR, Hodges A, Strand AD, Sengstag T, Kooperberg C, Becanovic K, et al (2007) Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet* 16: 1845–1861
- Lambright Dg, Sondek J, Bohm A, Skiba Np, Hamm He, And Sigler Pb (1996) The 20 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein *Nature* 379: 311–319,
- Laurer HL, McIntosh TK (1999) Experimental models of brain trauma *Curr Opin Neurol* 12:715-721
- Lee JA, Xing Y, Nguyen D, Xie J, Lee CJ, Black DL, (2007) Depolarization and CaMKinase IV modulate NMDA receptor splicing through two essential RNA elements, *PLoS Biol* 5 e40:101-371
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms *Nature* 399:A7-A14
- Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. (1990) Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* 14:511–7
- Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA (2002) New insights from the use of pilocarpine and kainate models *Epilepsy Res* 50:93-103
- Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK, (2001) The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury *Mol Neurobiol* 24:169-181
- Li JP, Kajija H, Okamoto F, Nakao A, Iwamoto T, Okabe K (2007) Three Na⁺/Ca²⁺ Exchanger (NCX) Variants Are Expressed in Mouse Osteoclasts and Mediate Calcium Transport during Bone Resorption *Endocrinology* 148: 2116-25

Li SC, Schoenberg BS, Wang CC, Cheng XM, Zhou SS, Bolis CL (1985) Epidemiology of epilepsy in urbana reas of thePeople's Republico f China *Epilepsia* 26:391-394

Lin, L., Hasumi, H. and Brandts, J. F. (1988) Catalysis of proline isomerization during protein-folding reactions. *Biochim. Biophys. Acta* 956: 256-266.

Linde C, Di Leva F, Domi T, Tosatto SCE, Brini M, Carafoli (2008) E Inhibitory interaction of the 14-3-3 proteins with ubiquitous (PMCA1) and tissue-specific (PMCA3) isoforms of the plasma membrane Ca²⁺ pump *Cell Calcium* 43(6):550-61

Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons *Physiol Rev* 79:1431-1568

Liss B (2002) Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells *Nucleic Acids Res* 30:e89

Liu Z, Stafstrom CE, Srkisian MR, Yang Y, Hori A, Tandon P, et al (1997) Swizure-induced glutamate release in mature and immature animals: an in vivo microdialysis study *Neuroreport* 8:2019-2023

Llinas, R, Sugimori, M, Silver, RB (1992) Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal *Science* 256:677-679

Lompre AM, Ozog A, and Vallot, O (1998) Control of Expression of SERCA2 and SERCA 3 Spliced Variants Conference Proceeding at www.mcmaster.ca/inabis98/

Lörincz A, Rózsa B, Katona G, Vizi ES, Tamás G (2007) Differential distribution of NCX1 contributes to spine–dendrite compartmentalization in CA1 pyramidal cells *Proc Natl Acad Sci* 104: 1033-38

Lorente de No R (1933) Studies on the structure of the cerebral cortex I. The área entorhinalis. *J Psychol Neurol* 45:381-438.

Lorente de No R (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 46:113-177.

Lothman EW, Bertram EH, Stringer JL (1991) Funtional anatomy of hippocampal seizure *Prog Neurobiol* 37:1-82

Lui PP, Chan FL, Suen YK, Kwok TT, Kong SK (2003) The nucleus of HeLa cells contains tubular structures for Ca²⁺ signaling with the involvement of mitochondria *Biochem Biophys Res Commun* 308:826–833

Lui PP, Lee CY, Tsang D, Kong SK (1998) Ca²⁺ is released from the nuclear

- tubular structure into nucleoplasm in C6 glioma cells after stimulation with phorbol ester FEBS Lett 432:82–87
- Luterbacher S, Schatzmann HJ, (1983) The site of action of La^{3+} in the reaction cycle of the human red cell membrane Ca^{2+} -pump ATPase. *Experientia* 39:311–312
- Lutsenko S, Kaplan JH (1995) Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity *Biochemistry* 34: 15608–15613,
- Lux HD, Heinemann U, Dietzel I (1986) Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity *Adv Neurol*, 44:619-639
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory *Physiol Rev* 84:87-136
- Lytton J (2007) $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchangers: three mammalian gene families control Ca^{2+} transport *Biochem J* 406: 365–82
- Lytton J, MacLennan DH (1988) Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca^{2+} -ATPase gene *J Biol Chem* 263:15024–15031
- Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps *J Biol Chem* 267: 14483–14489
- Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca -ATPase family of calcium pumps *J Biol Chem* 266: 17067–17071
- Lytton J, Zarain-Herzberg A, (1989) Periasamy M, MacLennan DH Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase *J Biol Chem* 264: 7059–7065
- MacLennan DH (1970) Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum *J Biol Chem* 245: 4508-4518
- MacLennan DH, Brandl CJ, Korczak B, Green NM (1985) Amino-acid sequence of a Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence *Nature* 316: 696–700
- MacLennan DH, Rice WJ, Green NM (1997) The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases *J Biol Chem* 272: 28815–28818

Maeda T, Katayama Y, Kawamata T, Yamamoto T (1998) Mechanisms of excitatory amino acid release in ontused brain tissue: effects of hypothermia an in sity aministration of Co^{2+} on extracellular levels of glutamate J Neurotrauma 15:655-664

Marchenko SM, Yarotskyy VV, Kovalenko TN, Kostyuk PG, Thomas RC (2005) Spontaneously active and $InsP_3$ -activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones J Physiol 565:897–910

Marius P, Guerra MT, Nathanson MH, Ehrlich BE, Leite MF (2006) Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum Cell Calcium 39:65–73

Marshall CR, Fox JA, Butland SL, Ouellette BF, Brinkman FS, Tibbits GF (2005) Phylogeny of Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX) genes from genomic data identifies new gene duplications and a new family member in fish species Physiol Genomics 21: 161-73

Martin V, Bredoux R, Corvazier E, van Gorp R, Kovacs T, Gelebart P, Enouf J (2002) Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 3 isoforms Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family J Biol Chem 277:24442-24452

Mas-Oliva J, Santiago-García J (1990) Cholesterol effect on thermostability of the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase from cardiac muscle sarcolemma Biochem Intl 21:233-241,

Matsuoka S, Nicoll DA, Reilly RF (1993) Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} exchanger Proc Natl Acad Sci 90: 3870–74

Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP. (2002) Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. Prog Brain Res.135:237–51.

Mathern GW, Kuhlman PA, Mendoza D, Pretorius JK. (1997) Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. J Neuropathol Exp Neurol. 56:199–212.

Mathews RP, Guthrie CR, Wailes LM, Zhao X, Means AR, McKnight GS, (1994) Calcium/calmodulin-dependent kinas types II and IV differentially regulate CREBdependent gene expression, Mol Cell Biol 14: 6107–6116

Maytal J, Shinnar S, Moshe SL et al (1989) Low morbidity and mortality of status epilepticus i children Pediatrics 83:323-331

McIntyre DC, Nathanson D, Edson N (1982) A new modelo f parcial status

epilepticus base don kindling Brain Res 250: 53-63

McNamara JO (1994) Cellular and molecular basis of epilepsy J Neurosci 14: 3413-3425

McNamara JO (1999) Emerging insights into the genesis of epilepsy Nature 399: A15-A22

McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS (2006) Molecular Signaling Mechanisms Underlying Epileptogenesis Sci STKE 356:re12

McNamara JO, Routtenberg A (1995) NMDA receptor blokde prevents kainate induction of proteína F1/GAP-43 mRNA in hippocampal granule cells and subsequent mossy fiber sprouting in the rat Brain Res Mol Brain Res 33:22-28

Meldrum BS (1997) First Alfred Meyer Memorial Lecture, Epileptic brain damage: a consequence and a cause of seizures Neurphathol Appl Neurobiol 23:183-201

Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting Epilepsia 34:985-995

Meric P, Barrere B, Peres M, Gillet B, Berenger G, Beloeil JC Seylaz J (1994) Effects of kainate-induced seizures on cerebral metabolism: a combined ¹H and ³¹P NMR study in rat Brain Res, 638:53-60

Minelli A, Castaldo P, Gobbi P, Salucci S, Magi S, Amoroso S (2007) Cellular and subcellular localization of Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat Cell Calcium 41: 221-34

Minocherhomjee AM, Beauregard G, Potier M, Roufogalis BD, (1983) The molecular weight of the calcium-transport-ATPase of the human red blood cell determined by radiation inactivation. Biochem Biophys Res Commun 116:895-900

Miranti CK, Ginty DD, Huang G, Chatila T, Greenberg ME, (1995) Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a ras- and elk-1-independent mechanism that involves a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase, Mol Cell Biol 15:3672-3684

Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M (2002) Nitric oxidemediated Ca²⁺-influx in neuronal nuclei and cortical synaptosomes of normoxic and hypoxic newborn piglets Neurosci Lett 318:93-97

Misquitta CM, Mack DP, Grover AK, (1999) Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves *Cell Calcium* 25 (4): 277–290

Mody I, McDonald JF (1995) NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release *Transds Pharmacol Sci* 16:356-359

Møller Jv, Juul B, Le Maire M (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases *Biochim Biophys Acta* 1286: 1–51

Monteith GR, Roufogalis BD (1995) The plasma membrane calcium pump—a physiological perspective on its regulation *Cell Calcium* 18:459–470

Montero M, Alonso MT, Albillos A, Garcia-Sancho J, Alvarez J (2001) Mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mediated by the Ca²⁺ uniporter *Mol Biol Cell* 12: 63–71.

Morimoto K, Fahnstock M, Racine RJ (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol.* 73:1-60.

Morimoto T, Globus MY, Busto R, Martinez E, Ginsberg MD (1996) Simultaneous measurement of salicylate hydroxylation and glutamate release in the penumbral cortex following transient middle cerebral artery occlusion in rats *J Cereb Blood Flow Metab* 16:92-99

Nadir EB, (2005) Aetiology of epilepsy-Reported frequency, en: *Epilepsy Atlas*, World Health Organization , USA

Nafstad PHJ (1965) An electron microscope study on the termination of the perforant path fibers in the hippocampus and the fascia dentata. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 76:532-542.

Nagao T, Alonso A, Avoli M. (1996) Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience.* 72:399–408.

Nagarkatti N, Deshpande LS, DeLorenzo RJ. (2008) Levitracetam inhibits both ryanodine and IP3 receptor activated calcium induced calcium release in hippocampal neurons in culture. *Neurosci. Lett.* 436:289-293.

Nagarkatti N, Deshpande LS, DeLorenzo RJ (2009) Development of the calcium plateau following status epilepticus: role of calcium in epileptogenesis. *Expert Rev. Neurother.* 9:813-824.

- Nicholls DG (1978) The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria *Biochem J* 176: 463–474,
- Nicholls DG, Chalmers S (2004) The integration of mitochondrial calcium transport and storage *J Bioenerg Biomembr* 36: 277–281,
- Nicholls DG, Crompton M (1980) Mitochondrial calcium transport *FEBS Lett* 111: 261–268,
- Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD (1990) Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger *Science* 250: 562–65
- Niggli V, Sigel E, Carafoli E (1982) The purified Ca²⁺ pump of human erythrocyte membranes catalyzes an electroneutral Ca²⁺-H⁺ exchange in reconstituted liposomal systems. *J Biol Chem* 257: 2350–2356
- Odermatt A, Becker S, Khanna VK et al (1998) Sarcolipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase *J Biol Chem* 273:12360–12369
- Odermatt A, Taschner PE, Scherer SW et al (1997) Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease *Genomics* 45: 541–553
- Okunade, GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, et al (2004) Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4 *J Biol Chem* 279:33742-33750
- Olney JW, de Gubareff T, Labruyere J. (1983) Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. *Nature*. 301:520–2
- On C, Marshall CR, Chen N, Moyes CD, Tibbits GF (2008) Gene structure evolution of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger (NCX) family *BMC Evol Biol* 8: 127
- Ortega A, Mas-Oliva J (1984) Cholesterol effect on enzyme activity of the sarcolemmal (Ca²⁺+ Mg²⁺)-ATPase from cardiac muscle *Biochim Biophys Acta* 773:231-236,
- Ortega A, Mas-Oliva J (1986) Direct regulatory effect of cholesterol on the calmodulin stimulated calcium pump of cardiac sarcolemma *Biochem Biophys Res Comm* 139:868-874,
- Ortega A, Santiago-García J, Mas-Oliva J, Lepock JR (1996) Cholesterol increases the thermal stability of the Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase of cardiac

microsomes Biochim Biophys Acta 1283:45-50,

Osontokun BO, Adeuja AO, Nottidge VA, Bademosi O, Olumide A, Ige O, et al (1987) Prevalence of the epilepsias in Nigerian Agricans: a community based study Epilepsia 28:272-279

Pal S, Limbrick Jr DD, Rafiq A, DeLorenzo RJ (2000) Induction of spontaneous recurrent epileptiforme discharges causes long-term changes in intracellular calcium homoeostatic mechanisms Cell Calcium 28:181-193

Pal S, Sombati S, Limbrick Jr DD, DeLorenzo RJ (1999) In Vitro status epilepticus causes sustained elevationof intracellular calcium levels in hippocampal neurons Brain Res 851:20-31

Pal S, Sun DA, Limbrick DD Jr, Rafiq A, DeLorenzo RJ (2001) Epileptogenesis induces long-term alterations in intracellular calcium release and sequestration mechanisms in the hippocampal neuronal culture model of epilepsy Cell Calcium 30:285-296

Pang Y, Zhu H, Wu P, J Chen, (2005) The characterization of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains. FEBS Lett 579: 2397–2403

Papa M, Canitano A, Boscia F, Castaldo P, Sellitti S, Porzig H, et al (2003) Differential Expression of the Na^{+} - Ca^{2+} Exchanger Transcripts and Proteins in Rat Brain Regions J Comp Neurol 461: 31-48

Papp B, Enyedi A, Kovacs T et al (1991) Demonstration of two forms of calcium pumps by thapsigargin inhibition and radioimmunoblotting in platelet membrane vesicles J Biol Chem 266: 14593–14596

Papp B, Enyedi A, Paszty K et al Simultaneous presence of two distinct endoplasmic-reticulum-type calcium-pump isoforms in human cells Characterization by radio-immunoblotting and inhibition by 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone Biochem J 288: (Pt I), 297–302

Parsons JT, Churn SB, Kochan LD DeLorenzo RJ (2000a) Persistent inhibition of Ca^{2+} uptake by rat cortex microsomes in the pilocarpine model of epilepsy, Soc Neurosci Abstr 26:1777

Parsons JT, Churn SB, Kochan LD, DeLorenzo RJ (2000b) Pilocarpine-induced status epilepticus causes N-methyl-D-aspartate receptor-dependent inhibition of microsomal Mg^{2+} / Ca^{2+} ATPase-mediated Ca^{2+} uptake J Neurochem 75(3):1209-1218

Parsons JT, Churn SB, DeLorenzo RJ (2001) Chronic inhibition of cortex microsomal Mg^{2+} / Ca^{2+} ATPase- mediated Ca^{2+} uptake in the rat pilocarpine model following epileptogenesis J Neurochem 79(2): 319-327

Payraastre B, Nievers M, B oonstra J, Breton M, Verkleii A J, Van Bergen In: Menegouwen, PM (1992) A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase , and phospholipase C in the nuclear matriz J Biol Chem 267:5078-5084

Penniston JT, Enyedi A (1998) Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump J Membr Biol 165:101–109

Peña F, Tapia R (1999) Relationships hmong seizures, extracellular amino acid changes, and neurodegeneration induced by 4-amino-pyridine in rat hippocampus: a microdialysis and eletroencephalographic study J Neurochem 72:2006-2014

Philipson KD, Nicoll DA (2000) Sodium-calcium exchange: a molecular perspective Annu Rev Physiol 62: 111–33

Phillips SA, Shanahan RJ (1989) Etiology and mortality of status epilepticus in children Arch Neurol 46:74-76

Pinto Fde T, Adamo HP, (2002) Deletions in the acidic lipid-binding region of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A mutant with high affinity for Ca²⁺ resembling the acidic lipid-activated enzyme. J Biol Chem 277:12784–12789

Poch E, Leach S, Snape S, Cacic T, MacLennan DH, Lytton J (1998) Functional characterization of alternatively spliced human SERCA3 transcripts Am J Physiol 275: C1449–C1458

Pognonec P, Boulukos KE, Gesquiere J, Stehelin D, Ghysdael J, (1988) Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium-dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins, EMBO J 7: 977–983

Pottorf II WJ, Thayer SA (2002) Transient rise in intracellular calcium produces a long-lasting increase in plasma membrane calcium pump activity in rat sensory neurons. J Neurochem 83: 1002-1008

Pottorf WJ, Johanns TM, Derrington SM, Strehler EE, Enyedi A, Thayer SA (2006) Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca²⁺ pump activity in rat hippocampal neurons J Neurochem 98:1646-1656

Prasad V, Okunade GW, Miller ML, Shull GE, (2004) Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. Biochem Biophys Res Commun 322: 1192–1203

Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD (1997) Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat Am J Physiol Cell Physiol 272: C1250-61

- Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD (2004) The sodium/calcium exchanger family-SLC8 Pflugers Arch 447: 543–48
- Quintero JL, Arenas MI, García DE (2005) The antidepressant imipramine inhibits M current by activating a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-dependent pathway in rat sympathetic neurones Br J Pharmacol 145:837-843
- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation: II Motor seizure Electroencephalogr Clin Neurophysiol 32:281-294
- Raghupathi R (2004) Cell death mechanisms following traumatic brain injury Brain Pathol 14:215-222
- Raisman G, Cowan WM and Powell TPS (1965) The extrinsic afferent, commissural and association fibers of the hippocampus. Brain 88:963-997.
- Rakic P (2000) Molecular and cellular mechanisms of neuronal migration: relevante to cortical epilepsias Adv Neurol 84:1-14
- Rapizzi E, Pinton P, Szabadkai G, Wieckowski MR, Vandecasteele G, Baird G, Tuft RA, Fogarty KE, Rizzuto R (2002) Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria J Cell Biol 159: 613–624,
- Raza M Pal S, Rafiq SA, DeLorenzo RJ (2001) Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy Brain Res 903:1-12
- Raza M, Blair RE, Sombati S, Carter DS, Deshpande LS, DeLorenzo RJ (2004) Evidence that injury-induced changes in hippocampal neuronal calcium dynamics during epileptogenesis cause acquired epilepsy Proc Natl Acad Sci 101:17522-17527
- Reina S, Sterin-Borda L, Passafaro D, Borda E (2009) Muscarinic cholinergic activation by pilocarpine triggers apoptosis in human skin fibroblast cells. J Cellular Physiology 222:640-647.
- Reinhardt TA, Filoteo AG, Penniston JT, Horst RL, (2000) Ca²⁺-ATPase protein expression in mammary tissue. Am J Physiol Cell Physiol 279:C1595–C1602
- Ribak CE, Seress L, Amaral DG (1985) Development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. J Neurocytol. 14:835-857.

- receptor subunit mRNA expresión in a modelo f temporal lobe epilepsy
Proc Natl Acad Sci U S A 93:9665-9669
- Rice AC, DeLorenzo RJ (1998) NMDA receptor activation Turing status epilepticus is required for the development of epilepsy Brain Res 78:240-247
- Rimessi A, Coletto L, Pinton P, Rizzuto R, Brini M, Carafoli E, (2005) Inhibitory interaction of the 14-3-3{epsilon} protein with isoform 4 of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase pump. J Biol Chem 280: 37195–37203
- Ruknudin AM, Lakatta EG, (2007a) The Regulation of the Na/Ca Exchanger and Plasmalemmal Ca²⁺ ATPase by other Proteins Ann NY Acad Sci 1099: 86–102
- Ruknudin AM, Wei S, Haigney MC (2007b) Phosphorylation and other conundrums of Na/Ca Exchanger, NCX1 Ann NY Acad Sci 1099: 103–18
- Rusakov DA, Kullmann DM (1998) Extrasynaptic glutamate difusión in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation J Neurosci 18:3158-3170
- Ryan C, Shaw G, Hardwicke PMD (2007) Effect of Ca²⁺ on Protein Kinase A-Mediated Phosphorylation of a Specific Serine Residue in an Expressed Peptide Containing the Ca²⁺-Regulatory Domain of Scallop Muscle Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Ann NY Acad Sci 1099: 43–52
- Santella, Carafoli, E (1997) Calcium signaling in the cell nucleus FASEB J 11:1091-1109
- Santiago-García J, Delgado-Coello BA, Mas-Oliva J (2000) Thermal analysis of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase Mol Cell Biochem 209:105-112,
- Santiago-Garcia J, Mas-Oliva J, Saavedra D, Zarain-Herzberg A, (1996) Analysis of mRNA expression and cloning of a novel plasma membrane Ca(2+)-ATPase splice variant in human heart. Mol Cell Biochem 155 :173–182
- Santilla L, Careafoli E (1997) Calcium signaling in the cell nucleus FASEB j 11: 1091-1109
- Saris NEL, Carafoli E (2005) A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria Biochemistry (Mosc) 70: 187–194,
- Schnitzer JE, Oh P, Jacobson BS, Dvorak AM, (1995) Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca(2+)-ATPase, and inositol trisphosphate receptor. Proc Natl

Acad Sci USA 92: 1759–1763

Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, et al (2004) Plasma membrane Ca^{2+} ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem* 279: 28220–28226

Schuh K, Uldrijan S, Gambaryan S, Roethlein N, Neyses L, (2003) Interaction of the plasma membrane Ca^{2+} pump 4b/CI with the Ca^{2+} /calmodulin-dependent membrane-associated kinase CASK. *J Biol Chem* 278: 9778–9783

Schuh K, Uldrijan S, Telkamp M, Rothlein N, Neyses L, (2001) The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. *J Cell Biol* 155: 201–205

Schulse DH, Muqhal M, Lederer WJ, Ruknudin AM (2003) Sodium/calcium exchanger (NCX1) macromolecular complex *J Biol Chem* 278: 28849–55

Schwarz EM, Benzer S Calx A, (1997) Na-Ca exchanger gene of *Drosophila melanogaster* *Proc Natl Acad Sci* 94: 10249–254

Scorza FA, Arida, Naffah-Mazzacoratti M, Scernida, Calderazo L, Cavalheiro EA (2009) The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *Ana Acad Bras Cien.* 81:345-365.

Sgambato-Faure V, Xiong Y, Berke JD, Hyman SE, Strehler EE, (2006) The Homer-1 protein Ania-3 interacts with the plasma membrane calcium pump. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 630–637

Sheng M, McFadden G, Greenberg ME, (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB, *Neuron*: 4 571–582

Sheng M, Thompson ME, Greenberg ME, (1991) CREB: a Ca^{2+} -regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases, *Science* 252: 1427–1430

Sherwin AL (1999) Neuroactive amino acids in focally epileptic human brain: a review *Neurochem Res* 24:1387-1395

Shigekawa M, Katanosaka Y, Wakabayashi S (2007) Regulation of the Cardiac $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger by Calcineurin and Protein Kinase C *Ann NY Acad Sci* 10: 53–63

Shimada N, Graf R, Rosner G, Heiss, WD (1990) Differences in ischemia-induced accumulation of amino acids in the cat cortex *Stroke* 21:1445-1451

Siesjo BK, Elmer E, Janelidze S, Keep M, Kristian T, Ouyang YB Uchino

- H (1999) Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure *Acta Neurochir Suppl*, 73:7–13
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM, (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells, *Mol Biol Cell* 12: 2245–2256
- Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y (1997) NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis- *Br J Pharmacol* 121:1171-1179
- Songyang Z, Fanning As, Fu C, Xu J, Marfatia Sm, Chishti Ah, Crompton A, Chan Ac, Anderson Jm, And Cantley Lc (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains *Science* 275: 73–77,
- Spitzer, NC (1994) Spontaneous Ca²⁺ spikes and waves in embryonic neurons: signaling Systems for differetiation *Trands Neurosci* 17:115-118
- Stafstrom CE, Holmes GI, Thompson JL (1993) MK801 pretreatment reduces kainic acid-induced spontaneous seizures in prepubescent rats *Epilpsy Re* 14:41-48
- Stahl WL, Eakin TJ, Owens JWJr, Breininger JF, Filuk PE, Anderson WR (1992) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by in situ hybridization *Brain Res Mol Brain Res* 16:223-231
- Stauffer T, Guerini D, Carafoli E (1995) Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump A study using specific antibodies *J Biol Chem* 270:12184–12190
- Stauffer TP, Guerini, D Carafoli E (1995) Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump A study using specific antibodies *J Biol Chem* 270:12184-12190
- Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE (1993) Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes *J Biol Chem* 268:25993-26003
- Steward O (1976) Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.* 167:285-314.
- Storm JF (1987) Action potential repolarization and a fast afterhyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells *J Physiol* 385:733-759
- Strehler EE, Caride J, Filoteo G, Xiong Y, Penniston JT, Enyedia A, (2007) Plasma Membrane Ca²⁺ ATPases as Dynamic Regulators of Cellular

Calcium Handling Ann NY Acad Sci 1099: 226–236

Strehler EE, Strehler-Page MA, Vogel G, Carafoli E, (1989) mRNAs for plasma membrane calcium pump isoforms differing in their regulatory domain are generated by alternative splicing that involves two internal donor sites in a single exon, Proc Natl Acad Sci U S A 86:6908–6912

Strehler EE, Treiman M (2004) Calcium pumps of plasma membrane and cell interior Curr Mol Med 4: 323-35

Strehler EE, Zacharias DA (2001) Role Of Alternative Splicing in Generating Isoform Diversity Among Plasma Membrane Calcium Pumps 81:21-50

Sucher NJ, Deitcher DL, Baro DJ, Warrick RM, Guenther E (2000) Genes and channels: patch/voltage-clamp analysis and single cell RT-PCR Cell Tissue Res 302:295-307

Sun DA, Sombati S (2001) Glutamate injury-induced epileptogenesis in hippocampal neurons: an in Vitro modelo f stroke-induced “epilepsy” Epilepsia 43:1296-1305

Sun DA, Sombati S, Blair RE, DeLorenzo RJ (2002) Calcium-dependent epileptogenesis in an in Vitro modelo f stroke-induced “epilepsy” Epilepsia 43:1296-1305

Sun DA, Sombati S, Blair RE, DeLorenzo RJ (2004) Long-lasting alterations in neuronal calcium homeostasis in an in vitro model of stroke-induced epilepsy Cell Calcium 35:155-163

Sun P, Lou L, Maurer RA, (1996) Regulation of activating transcription factor 1 and the camp response element-binding protein by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type I, II, and IV, J Biol Chem 271: 3066–3073

Sun Z, Sassone-Corsi P, Means AR, (1995) Calspermin gene transcription is regulated by two cyclic AMP response elements contained in an alternative promoter in the calmodulin kinase IV gene, Mol Cell Biol 15: 561–571

Swanson LW, Sawchenko PE, Cowan WM (1980) Evidence that the commissural, associational and septal projections of the región inferior of the hippocampus arise from the ell neurons. Brain Res. 197:207-212.

Swanson LW, Sawchenko PE, Cowan WM (1981) Evidence for colateral projections by neurons in Ammon’s horn, the dentate gyrus and the subiculum: a multiple retrograde labeling study in the rat. J Neurocit. 1:548-559.

Szabadkai G and Duche MR, (2008) Mitochondria: The Hub of Cellular Ca²⁺ Signaling Physiol 23:84-94

- Tan W, Colombini M (2007) VDAC closure increases calcium ion flux
Biochim Biophys Acta 1768:2510–2515,
- Tang D, Dean WL, Borchman D, Paterson CA (2006) The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity.
Cell Calcium 39: 209–216
- Tang Y, Zucker RS, (1997) Mitochondrial involvement in post-tetanic potentiation of synaptic transmission, *Neuron* 18: 483–491
- Thayer SA, Usachev YM, Pottorf II WJ (2002) Modulating Ca²⁺ clearance from neurons. *Front Biosci* 7: d1255-1279
- Thelen MH, Simonides WS, Muller A, van Hardeveld C (1998) Crosstalk between transcriptional regulation by thyroid hormone and myogenin: new aspects of the Ca²⁺-dependent expression of the fast-type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase *Biochem J* 329 (Pt 1): 131–136
- Thomas AP, Bird GSJ, Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Putney JW Jr (1996) Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J* 10: 1505-1517
- Toyofuku T, Curotto KK, Narayanan N, MacLennan DH (1994) Identification of Ser38 as the site in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase that is phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase *J Biol Chem* 269: 26492–26496
- Toyofuku T, Kurzydowski K, Tada M, MacLennan DH (1994) Amino acids Lys-Asp-Asp-Lys-Pro-Val402 in the Ca(2+)-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum are critical for functional association with phospholamban *J Biol Chem* 269:22929–22932
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H, (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647–655
- Toyoshima C, Nomura H, (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* 418: 605–611
- Toyoshima C, Sasabe H, Stokes DL (1993) Three-dimensional cryoelectron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane [published erratum appears in *Nature* 1993 May 20;363(6426):286] *Nature* 362: 467–471
- Keeton TP, Burk SE, Shull GE, *J Biol Chem* 268 (1993) Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4. 2740–2748

Treiman M, Caspersen C, Christensen SB, (1998) A tool comino of ege: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases *Trens Pharmacol Sci* 19:131-135

Turski WA, Cavalheiro EA, Sxhwarz M, Czuezwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study *Behav Brain Res* 9:315-335

TurskiWA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. (1983b) Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia*. 39:1408–11.

Tymianski M (1996) Cytosolic calcium concentrations and cell death in vitro *Adv Neurol* 71: 85-105

Ueda Y, Yokoyama H, Kikajim A, Tokumanu J, Doi T, Mitsuyama Y (2002) Glutamate excess and free radical formation Turing and following kainic acid-induced status epilepticus *Exp Brain Res* 147:219-226

Usachev YM, DeMarco SJ, Campbell C, Strehler EE, Thayer SA (2002) Bradykinin and ATP accelerate Ca^{2+} efflux from rat sensory neurons via protein kinase C and the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4. *Neuron* 33: 113-122

Valencia I, Om P, Mishra Fritz K, Zubrow A, Katsetos CD, Delivoria-Papadopoulos M, Legido A (2006) Increased Neuronal Nuclear Calcium Influx in Neonatal Seizures *Neurochem Res* 31:1231–1237

Vaughan J, Bullock R (1999) Cellular and vascular pathophysiology of stroke In Miller LP (Ed) *Stroke Therapy: Basic, Preclinical and Clinical Directrions*, pp 3-38 New York: Wiley-Liss

Vilsen B (1995) 'Structure-function relationships in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum studied by use of the substrate analogue CrATP and by side-directed mutagenesis Comparison with the Na^{+} , K^{+} -ATPase' *Acta Physiol Scand* 154(624): 1–146

Vito P, Lacana E, D'Adamio L, I (1997) nterfering with apoptosis: Ca^{2+} -binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3, *Science* 271 (1996) 521–525 [61] M Maki, SVL Narayana, K Hitomi, A growing family of the Ca^{2+} -binding proteins with five EF-hand motifs, *Biochem J* 328:718–720

Vorherr T, Kessler T, Hofmann F, Carafoli E (1991) The calmodulin-binding domain mediates the self-association of the plasma membrane Ca^{2+} pump *J Biol Chem* 266:22–27

Wahl F, Obernovitch TP, Hardy AM, Plokine M, Boulu R, Symon L (1994)

Extracelular glutamate Turing focal cerebral ischaemia in rats: time course and calcium dependency *J Neurochem* 63:1003-1011

Walker AE (1989) Posttraumatic epilepsy in World War II veterans *Surg Neurol* 32:235-236

Wan TC, Zabe M, Dean WL, (2003) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4b is phosphorylated on tyrosine 1176 in activated human platelets. *Thromb Haemost* 89: 122– 131

Wang KK, Villalobo A, Roufogalis BD, (1992) The plasma membrane calcium pump: a multiregulated transporter. *Trends Cell Biol* 2: 46–52

Wasterlaine CG, Fujikawa DG, Penix L, Samkar R (1993) Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus *Epilepsia* 34:S37-S53

Wieser HG. (2004) ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 45:695–714.

Williams JC, Armesilla AL, Mohamed TM, Hagarty CL, McIntyre FH, et al (2006) The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. *J Biol Chem* 281: 23341–23348

Wilson CL, Maidment NT, Shomer Mh, Behnke EJ, Ackenson L, Fried I, et al (1996) Comparison of seizure related amino acid release in human epileptic hippocampus versus a chronic, kainate rat modelo f hippocampal epilepsy *Epilepsy Res* 26:245-254

Witter MP, Griffioen AW, Jorritsma-Byham B and Krijnen JLM (1988) Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: An underestimated pathway. *Neurosci. Lett.* 85:193-198.

Wolf PA, D'Agostino RB (1998) Epidemiology of stroke In Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM (Eds), *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis, and Managment*, pp3-28 Philadelphia: Churchill Livingstone

Wu KD, Lee WS, Wey J, Bungard D, Lytton J (1995) Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca (2+)-ATPase isoform transcripts *Am J Physiol* 269: C775–C784

Wuytack F, Papp B, Verboomen H et al (1994) A sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3-type Ca²⁺ pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells [published erratum appears in *J Biol Chem* 1994 Apr 29;269(17): 13056] *J Biol Chem* 269: 1410–1416

Wuytack F, Raeymaekers L and Missiaen L (2002) Molecular physiology of

the SERCA and SPCA pumps. *CellCalcium* 32: 279-305

Xiao-hong Cao, Si-si Zhao, Dong-yue Liu, Zhuo Wang, Li-li Niu, Li-hua Hou, Chun-ling Wang (2011) ROS-Ca²⁺ is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis. *Chemico-Biological Interactions* 190:16–27.

Xie J, Black DL, (2001) A CaMKIV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing in ion channels, *Nature* 410: 936– 939

Xie J, Jan C, Stoilov P, Park J, Black DL, (2005) A consensus CaMKIV-responsive RNA sequence mediates regulation of alternative exons in neurons, *RNA* 11: 1825–1834

Xie X, Wu G, Lu Z-H and Ledeen R W (2002) Potentiation of a sodium-calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside *J Neurochem* 81: 1185–1195

Xu A, Hawkins C, Narayanan N (1993) Phosphorylation and activation of the Ca(2⁺)-pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase *J Biol Chem* 268: 8394–8397

Yamamoto T, Rossi S, Stiefel M, Doppenberg E, Zauner A, Bullock R, et al (1999) CSF and ECF glutamate concentrations in head injured patients *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 75:17-19

Zacharias DA, Strehler EE, (1996) Change in plasma membrane Ca²⁺-ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca²⁺, *Current Biology*, 6:1642-1652

Zacharias DA, Dalrymple SJ, Strehler EE (1995) Transcript distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms and splice variants in the human brain *Mol Brain Res* 28:263-272

Zacharias DA, Kappen C (1999) Developmental expression of the four plasma membrane calcium ATPase (Pmca) genes in the mouse *Biochim Biophys Acta* 1428:397-405

Zacharias DA, Strehler EE (1996) Change in plasma membrane Ca²⁺ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca²⁺ *Curr Biol* 6:1642-1652

Zaid H, Abu-Hamad S, Israelson A, Nathan I, Shoshan-Barmatz V (2005) The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death *Cell Death Differ* 12: 751–760,

Zhang Y, Fujii J, Phillips MS et al (1995) Characterization of cDNA and

genomic DNA encoding SERCA1, the Ca(2+)-ATPase of human fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, and its elimination as a candidate gene for Brody disease *Genomics* 30: 415–424

Zhang Y, Fujii J, Phillips MS, Chen HS, Karpati G, Yee WC, Schrank B, et al (1995) Characterization of cDNA and genomic DNA encoding SERCA1, the Ca(2+)-ATPase of human fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, and its elimination as a candidate gene for Brody disease *Genomics* 30:415-424

Zheng QY, Johnson KR, (2001) Hearing loss associated with the modifier of deaf waddler (mdfw) locus corresponds with age-related hearing loss in 12 inbred strains of mice. *Hear Res* 154: 45–53

Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, et al (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A, *Nat Genet* 36: 449–451

Zukin RS Bennett MV (1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit *Trends Neurosci* 18:306-313

Zvaritch E, James P, Vorherr T, Falchetto R, Modyanov N, Carafoli E (1990) Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca²⁺ pump using trypsin proteolysis *Biochemistry* 29:8070–8076

APENDICE

- A** Bravo-Martínez J., Delgado-Coello B., García E. D., Mas-Olva J. (2011) Analysis of plasma membrane Ca²⁺-ATPase gene expression during epileptogenesis employing single hippocampal CA1 neurons. *Exp Biol & Med* 236:409-17.
- B** Bravo-Martínez J., Delgado-Coello B., Mas-Oliva J., (2010) Cell calcium extrusion systems and their role in epileptogenesis. *Open Neurosci J.*, 4:1-12.
- C** Delgado-Coello B, Bravo-Martínez J, Mas-Oliva J (2009) Promega Technical Reports Detecting PMCA transcripts in single hippocampal neurons ([http://www-promegacom/pubs/tpub_010htm](http://www.promegacom/pubs/tpub_010htm)).

Analysis of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene expression during epileptogenesis employing single hippocampal CA1 neurons

Jorge Bravo-Martínez^{1,2}, Blanca Delgado-Coello², David E García¹ and Jaime Mas-Oliva²

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina; ²Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF México

Corresponding author: Jaime Mas-Oliva, Apdo. Postal 70-243, C.P. 04510 México, DF México. Email: jmas@ifc.unam.mx

Abstract

Disruption of calcium homeostasis in epileptic cells is characterized by both short- and long-term perturbations of Ca^{2+} buffering systems. Along with the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) plays an important role in excitable cells. The involvement of PMCAs in epileptogenesis has primarily been studied in brief intervals after various stimuli; however, the specific contribution of this molecule to epileptogenesis is not yet fully understood. Our aim has been to investigate whether PMCA expression in the chronic stages of epilepsy is altered. Through an interdisciplinary approach, involving whole-cell recordings and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, we have shown that epileptic neurons in our preparation consistently show changes in electrical properties during the period of chronic epilepsy. These changes included increased spike frequency, altered resting membrane potential and changes in passive membrane properties. Following these observations, which indicate an altered excitability in the epileptic cells studied, PMCA mRNA transcripts were studied. It was found that while *PMCA1* transcripts are significantly increased one month following the pilocarpine epileptogenic stimulus, *PMCA3*, an isoform important in excitable tissues, was significantly decreased. These findings suggest that, in the long-term, a slow PMCA (*PMCA1*) plays a role in the reestablishment of a new calcium homeostasis attained by epileptic cells. Overall, this phenomenon points out the fact that in seizure disorders, changes that take place in the balance of the different molecules and their isoforms in charge of maintaining neuronal calcium homeostasis, are fundamental in the survival of affected cells.

Keywords: plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, calcium homeostasis, epileptogenesis, hippocampal neurones, single-cell quantitative-polymerase chain reaction

Experimental Biology and Medicine 2011; **236**: 409–417. DOI: 10.1258/ebm.2011.010342

Introduction

Intracellular Ca^{2+} concentrations are regulated by a sophisticated battery of proteins. This degree of fine tuning is necessary for the maintenance of calcium homeostasis in eukaryotic cells. In the nervous system, diverse processes are dependent on the regulation of this critical cation. It has become clear that imbalances of calcium homeostasis in neurons underlie several neurodegenerative disorders.

Epilepsy can be a debilitating disorder that undoubtedly merits exhaustive examination of its underlying molecular mechanisms. It is known that the concentration of intracellular calcium is significantly elevated during *status epilepticus* in several models of epileptogenesis, and remains elevated in the chronic phase of epilepsy.^{1–5} Control levels of Ca^{2+} in hippocampal neurons correspond to 100–200 nmol/L,

whereas after initialization of the *status epilepticus* in the pilocarpine model, the concentration reaches >800 nmol/L.³ After 30 days, Ca^{2+} levels are still high (>300 nmol/L) and sustained up to one year.³

In the initial phases of experimental epileptogenesis, increased intracellular levels of calcium are mediated via the entry of calcium through the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. In the chronic phase, when recurrent seizures are evident, this increase is likely due to an alteration in the equilibrium between several homeostatic mechanisms, including the aberrant extrusion of ions.²

In the process of epileptogenesis, the affected calcium machinery in the cell includes cytoplasmic buffering proteins,^{6,7} the sarco/endoplasmic Ca^{2+} -ATPase (SERCA),^{8,9} the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX)¹⁰ and the plasma membrane

Ca²⁺-ATPase (PMCA).¹¹ At the cell membrane, the PMCA is involved in the fine regulation of intracellular calcium via its high affinity for this cation, and therefore plays a critical role when sudden changes in intracellular calcium occur.¹² The PMCA family consists of four genes (PMCA1–4), which undergo complex alternative splicing to produce at least 20 different isoforms, each one displaying kinetic properties related to its cellular localization and function. Interestingly, the brain expresses a wide variety of these PMCA isoforms with varying patterns depending on the developmental stages examined.¹³

Knowledge gathered to date concerning the participation of the PMCA in epileptogenesis is limited. We have recently reviewed the role of cell calcium extrusion systems in the development of epilepsy.¹⁴ In the hippocampus, the basic isoforms of PMCA^{1–4} have been detected with some variability depending on the specific technique employed.^{15,16} In the rat, *PMCA1* and *PMCA3* are the most abundant transcripts,¹¹ whereas in the human, *PMCA2* and *PMCA4* mRNAs follow a differential distribution.¹⁷ In early stages of kainic acid (KA)-induced epilepsy, a diminished expression of *PMCA1* and *PMCA2* mRNA, together with an unaltered expression of *PMCA3*, measured by *in situ* hybridization has been reported.¹¹ Other groups have reported no significant changes in PMCA mRNA expression when examined at a longer interval following KA treatment.¹⁰ Changes in total PMCA protein have been detected 4–12 h after the epileptogenic stimulus.¹¹

We have hypothesized that homeostatic calcium extrusion mechanisms may be altered in the chronic phase of epilepsy. Therefore, as an initial approach, we decided to study the expression of PMCA following pilocarpine-induced epileptogenesis. Considering the heterogeneity of cells forming the nervous tissue, we studied the expression of different PMCA isoforms in single epileptic neurons of the hippocampus through an approach involving both electrophysiological and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) techniques. Upon isolating well-characterized epileptic neurons, as documented by electrophysiological analysis, we found that, while *PMCA1* expression increases significantly following epileptogenesis, *PMCA3* expression decreases and the expression of *PMCA4* presents minor changes. These data suggest that *PMCA1* plays a critical role in chronic stages of epileptogenesis.

Together, these results strongly support the hypothesis that, in neurons, an altered calcium extrusion process, which results in changes that modify intracellular calcium equilibrium, correlates with the onset of chronic epilepsy associated with an altered neuronal excitability. The newer calcium equilibrium achieved by the expression of different PMCA allows for the management of chronically elevated calcium levels that would otherwise lead to cell death.

Methods

Materials

All reagents were of molecular biology grade; buffers, methylscopolamine and pilocarpine hydrochloride were

obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Dimethyl-dichlorosilane was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Primers and Taqman probes were from Primer Design Ltd (Southampton, UK). The SuperScriptTM III Platinum[®] One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX was from Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). The water used for all the solutions was ultrapurified in a Milli-Q system (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated and sterilized. For qPCR experiments, an ABI Prism 7000 detection system from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) was used. Valium (Diazepam) was kindly provided by Hoffmann-La Roche Ltd.

Epilepsy model

Experimental animals were handled according to Mexican Official Norm for use, care and reproduction of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999). Male Wistar rats of 20–25 days old were used, which were maintained under a standard 12:12 light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water. All drugs were administered via intraperitoneal (i.p.) injection. Prior to pilocarpine treatment (30 min), experimental animals were administered methylscopolamine (1 mg/kg) and *status epilepticus* was then induced by a single dose of pilocarpine (350 mg/kg). Control animals were injected only with saline solution. Behavioral seizures were observed and the *status epilepticus* onset was defined as the time when seizure activity became sustained. Rats were allowed to seize for one hour and, in order to avoid high mortality, animals were treated with diazepam (4 mg/kg). Subsequent doses were administered as needed.¹⁸ Rats were left in a nursing facility until spontaneous seizures occurred twice per week; seizures were evaluated according to Racine's scale.¹⁹

Patch-clamp recordings

To document changes in the electrical behavior of cells from pilocarpine-treated animals, we carried out electrophysiological recordings one month after treatment. Only rats showing spontaneous seizures once or twice per week were used. Under ether anesthesia, rats were killed by decapitation and the brains were extracted. Slices of 400 μ m were obtained with a vibratome and were incubated at room temperature (24–26°C) for one hour in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mmol/L): 126 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 1.25 Na₂HPO₄, 10 glucose (equilibrated with 95% O₂/5% CO₂, pH 7.4). Brain slices were transferred to a recording chamber and continuously superfused at 34°C with ACSF. Hippocampal CA1 pyramidal cells were visualized by infrared differential interference contrast (DIC) video microscopy using a 40 \times /1.0 objective in an upright microscope (FN1, Nikon Inc, Melville, NY, USA). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass and filled with a solution containing (in mmol/L): 145 KCl, 5 HEPES, 5 EGTA, pH 7.3, with tip resistances of 4–5 M Ω . Recordings were made with current clamp in a whole-cell configuration with seal resistances over 1 G Ω ,

using an EPC7 amplifier. To observe changes in the excitability of cells from control and pilocarpine-treated animals, a stimulation protocol was applied consisting of current pulses of 20 ms ranging from -800 to 800 pA (in 100 pA steps, Figure 2D). During a 100 ms pulse the membrane reaches the steady state before the end of the pulse. Under these conditions we evaluated membrane resistance. Cell potentials and the stimulus duration were used to plot every action potential as a function of its intensity.

Single-cell quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Prior to cell collection, patch electrodes and PCR tubes were soaked in a 5% (v/v) dimethyl-dichlorosilane/chloroform solution for 20 min, and then were sterilized.²⁰ To analyze PMCA expression after epileptogenic stimuli, only those neurons showing an increased excitability, a stable membrane potential and a high-resistant patch seal were considered. Following whole-cell recording, the contents of single cells were aspirated, placed in PCR tubes containing RNase inhibitors, frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C until use.²¹ Specific primers for rat PMCA_s spliced at site C were as follows: PMCA1 (NM_053311): Fwd 5'-ATGACATTGTGAAGACGGTGAT-3', Rev 5'-TCGTTCTCGTTATCCCACTCT-3'; PMCA2 (NM_012508): Fwd 5'-CATAGATACTGCTGACATACTGGAT-3', Rev 5'-CACATGATAAGTTTCATTCCGATC-3'; PMCA3 (NM_133288): Fwd 5'-GCAGATGTTGTGGGTGAACT-3', Rev 5'-CGTGAATGATGAGAGGCTTGTC-3'; PMCA4 (NM_001005871): Fwd 5'-AGCAGTTGCGTCAAGTCAAG-3', Rev 5'-TCTCGGAAAATGAAATACTTTGA-3'. Taqman probes sequences were: Atp2b1: ATGCTAGCGTTCAGAGACTTCCCG; Atp2b2: CCGAAAGCAGCAAGCCGTACCAACC; Atp2b3: CTCCGCAGCAGTACTCAGTTG; Atp2b4: CTCCACCTCTTCTGCCGTTACACCTCC, for PMCA1-PMCA4, respectively. To avoid genomic DNA contamination, collected cell contents were incubated with deoxyribonuclease I. One-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction reactions for control or experimental single cells were carried out in 20 μL final volumes according to the following protocol: $50^{\circ}\text{C}/15$ min; $95^{\circ}\text{C}/2$ min; 40 cycles: $95^{\circ}\text{C}/15$ s; $60^{\circ}\text{C}/30$ s.

Statistical analyses

For all statistical and curve-fitting procedures, a Microcal Origin program 8.0 (Microcal Software) was employed. A no directional Student's *t*-test was used in comparisons of mean values between two populations of cells. The significance value was $\alpha = 0.05$ and the critic value was 95%. Values are expressed as mean \pm SEM and $P < 0.05$ considered significant.

Results

Electrophysiology

Prior to employing single-cell quantitative-PCR, it was crucial to characterize the electrophysiological changes in

cells isolated from pilocarpine-treated animals. As described in Methods, seven control rats were injected i.p. with saline solution, and 14 experimental rats treated with the pilocarpine-diazepam protocol. Recordings were made in current clamp in a whole-cell configuration employing pyramidal cells from the CA1 region of rat hippocampus.

One month following injection, recordings were made from a total of 127 cells; 52 control cells, of which 46 presented a stable resting membrane potential (RMP) between -60 and -70 mV and had action potentials with amplitudes between 90 and 100 mV. Rats treated with pilocarpine were sacrificed after they had exhibited one or two spontaneous seizures per week. Recordings were made from 75 experimental cells; 63 fulfilled the criteria of altered excitability, that had a more depolarized RMP (mean value = -55 mV; Figure 1C) than controls ($P < 0.05$). In control cells, each depolarizing stimulus produced only one or two action potentials, while cells from pilocarpine-treated animals exhibited two or three spikes per stimulus, suggesting an increased excitability (Figures 1A and B). This is in accordance with previous observations that mechanisms underlying epileptogenesis might alter neuronal excitability.²²

To document the electrical properties of these cells, a region of 0–800 pA was screened under current-clamp conditions. Increased spike discharges in neurons from epileptic animals (Figure 2D) were accompanied by increased membrane resistance ($P < 0.05$; Figure 1B), suggesting changes in underlying ion currents or passive membrane properties. In agreement with the latter, the mean time constant of the tail response was significantly altered ($P < 0.05$) in neurons from epileptic rats (Figure 1D).

To evaluate possible differences in the excitability of neurons from control and pilocarpine-treated animals, we analyzed the neuronal response to increasing stimuli intensity. We define I_R as the intensity of the stimulus at which we obtain an action potential in neurons from control or pilocarpine-treated animals exposed to equivalent stimulus duration. For example, at stimulus durations of 1 ms, $I_R = 600$ pA in control neurons and $I_R = 320$ pA in neurons from epileptic animals (Figure 2A). In general, neurons from epileptic animals required a minimal stimulus intensity to evoke action potentials in comparison with neurons from saline-injected animals ($P < 0.05$). We also measured t_{\min} , the minimal duration (in ms) to obtain an action potential. We found $t_{\min} = 0.1$ ms for neurons from epileptic animals, while $t_{\min} = 1$ ms for controls (Figure 2A). Neurons from epileptic animals required a shorter stimulus duration to trigger an action potential, indicating an increased excitability in these neurons compared with controls ($P < 0.05$; Figure 2A). Therefore, enhanced excitability may account for the altered electrical phenotype of epileptic neurons.

It is known that the fast after hyperpolarization (fAHP) lasts 2–5 ms following the repolarization face of action potential and is carried by the calcium and voltage-dependent BK channels.²³ Its amplitude is dependent on the intracellular calcium levels. Figure 2C shows that epileptic neurons have a higher amplitude fAHP than control cells. These results can be taken as indirect evidence that

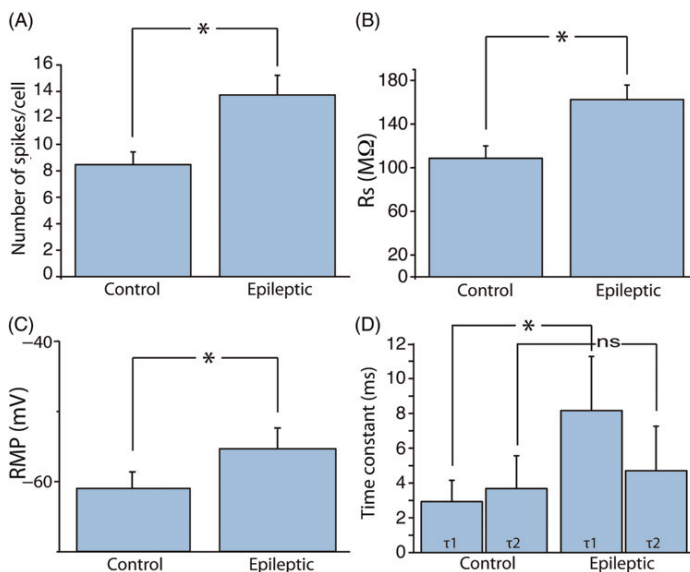


Figure 1 Stimulus response properties of CA1 pyramidal neurons recorded in a whole-cell configuration. (A) Number of action potentials per cell at all depolarizing stimuli in control and epileptic cells. The mean number in control cells was 8 ± 0.96 ($n = 13$) and in epileptic cells was 13 ± 1.48 ($n = 11$). (B) Mean membrane series resistance during a 100 ms pulse in control and epileptic cells. Control and epileptic cells presented membrane resistance of 108 ± 16.7 MΩ and 162.48 ± 17.89 MΩ, respectively. (C) Mean resting membrane potential (RMP) of control and epileptic cells. The RMP in control cells was -61 ± 2.4 mV and in epileptic cells -55 ± 2.4 mV. (D) Tail currents for every stimulus were fitted to a double exponential function and time constants plotted (τ_1 and τ_2). Control cells ($n = 7$) show a τ_1 of 2.99 ± 1.2 ms and a τ_2 of 3.31 ± 1.95 ms. Epileptic cells show a τ_1 of 8.16 ± 0.9 ms and a τ_2 of 4.7 ± 3.0 ms. τ_1 from epileptic cells is higher than control while τ_2 do not show any differences. Average values \pm SEM are indicated, * $P < 0.05$

epileptic neurons maintain a chronic increased intracellular calcium level.

Single-cell quantitative-PCR

Standard curves were constructed for each set of *PMCA* primers using the corresponding positive controls and Taqman probes.²⁴ A total of 109 neurons were analyzed; 46 of these cells were for control while 63 obtained from pilocarpine-treated animals fulfilled the criteria of altered excitability for qPCR analysis. Twelve of the 63 cells had poor expression of GAPDH probably because problems in the harvesting of these cells (7 cells) or had normal electrophysiological phenotype and normal expression of *PMCA*s and GAPDH (5 cells). Only 42 cells of the pilocarpine-treated rats were analyzed. In general, we noticed a high homogeneity in the expression levels of transcripts from the CA1 neurons analyzed, suggesting a strict transcriptional regulation (Figure 3).

We found the ubiquitous *PMCA1* isoform to be expressed at low levels (3.85 copies/cell) under control conditions in CA1 pyramidal neurons (Figure 3B). Interestingly, *PMCA1* was highly over-expressed (15-fold) in neurons from pilocarpine-treated animals ($P < 0.05$; Figure 3B). In contrast, under basal conditions, *PMCA3* shows only a slightly higher level of expression (~ 6 copies/cell) than *PMCA1* while, in

neurons from epileptic animals, *PMCA3* expression is significantly decreased (>13 -fold, $P < 0.05$; Figure 3C). Expression of *PMCA4* was relatively low (0.2 copies/cell) in CA1 neurons, and did not differ between neurons from control and epileptic neurons (Figure 3D). We observed that *GAPDH* levels show stable expression levels independent of pilocarpine treatment (Figure 3E).

Our ability to detect *PMCA2* transcripts at the single-cell level was limited, since this set of primers showed a low efficiency (1.93) and sensitivity (intercept 43.89) standard curve. Given the relevance of *PMCA2* to the nervous system, we then explored *PMCA2* expression in total hippocampal RNA isolated from control ($n = 3$) and pilocarpine-treated rats ($n = 3$). Hippocampal *PMCA2* expression levels were not significantly different ($P > 0.05$, data not shown) between control (3980082.2 mRNA copies/ $5 \mu\text{L} \pm$ SEM 1876228.6) and pilocarpine-treated animals (2939450.4 mRNA copies/ $5 \mu\text{L} \pm$ SEM 385395.1). However, considering the level of cell heterogeneity in the hippocampus, these measurements did not approach the sensitivity obtainable with single cells.

Discussion

For the first time we have incorporated a novel approach that allows us to examine the electric behavior and the

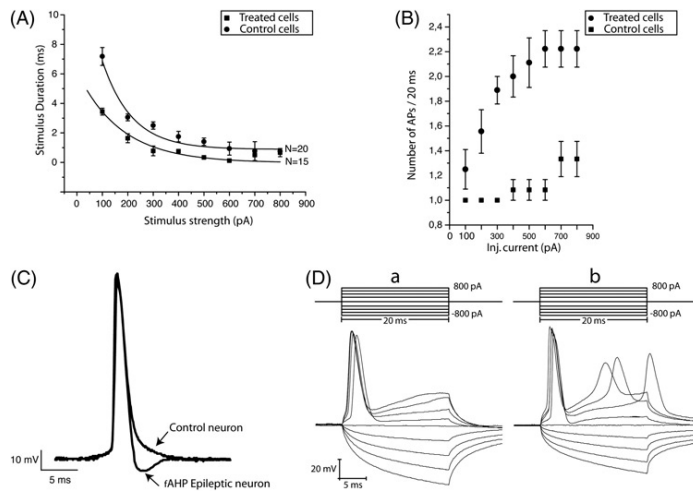


Figure 2 (A) Responses of neurons obtained from control (full circles) and pilocarpine-treated animals (full squares) to increasing stimuli intensity. The stimulus duration is plotted as a function of its intensity at the action potential threshold for each cell. I_{th} is defined as the intensity of the stimulus at which we obtained an action potential in neurons from control or pilocarpine-treated animals with equivalent stimulus duration. At a duration of 1 ms, control cells exhibited responses with an $I_{th} = 600$ pA, while cells from pilocarpine-treated animals with an $I_{th} = 320$ pA. We defined t_{min} as the minimal duration to obtain an action potential. For neurons from pilocarpine-treated animals $t_{min} = 0.1$ ms, while for control cells $t_{min} = 1$ ms. (B) Number of action potentials as a function of the injected current stimulus from 100 to 800 pA in control ($n = 9$) and epileptic cells ($n = 12$). (C) Comparison of the fast after-hyperpolarization amplitude in control and epileptic CA1 neurons. (D) Stimulus protocol for control and epileptic cells is shown on top at left (a) and right (b) side of panel. Stimulus protocol consists of square current stimulus from -800 to 800 pA in steps of 100 pA. (a) control neurons produced one action potential for every depolarizing stimulus and (b) neurons from epileptic animals produced 2–3 action potentials for every depolarizing stimulus. For clarity we show only eight of the 16 traces

expression of *PMCA* isoforms in single hippocampal neurons during the chronic phase of experimental epilepsy. Using a combination of whole-cell patch recording and single-cell real-time PCR, we were able to correlate the electrical phenotypes of individual CA1 neurons with changes in the specific expression of different *PMCA* mRNAs during epileptogenesis.

A number of studies have suggested that altered electrical processes lead to changes in synchronic action potential discharges in epileptic neurons.^{25,26} However, few studies have addressed the fundamental question of whether or not the basic electrical properties of the neuron are constitutively altered after long-term adaptive responses are established. In the current work, we have documented concomitant electrical and molecular changes in neurons that implicate the *PMCA* proteins in mechanisms underlying the adaptive response to epileptogenesis.

Increased action potential frequencies in epileptic neurons suggest an enhanced excitability, which can be characterized by the neuron's sub-threshold and passive responses in measures of stimulus-response properties.²⁷ The most striking, yet unsolved, question is whether increased epileptiform discharges are associated with changes in cell excitability. In the current study, an augmented spike frequency is accompanied by changes in sub-threshold responses (Figures 1, 2B and D), suggesting an increased basal excitability in the epileptic neuron. These results prompted us to examine the stimulus-response relationship following a

classical protocol²⁸ that examined the behavior of the neuron following stimuli that varied in both intensity and duration. With this protocol, we observed that neurons from pilocarpine-treated animals responded to stimuli of a significantly shorter duration and lower intensity than control neurons (Figure 2A). Together, these results are consistent with underlying changes in the firing threshold, and thus excitability, of CA1 neurons from epileptic animals. Furthermore, the increased firing responses (Figure 1) can be readily related to the already known antiaccommodation effect observed in rat sympathetic neurons. This effect can be ascribed to changes in voltage-dependent, non-inactivating ionic conductance that are active at the action potential firing threshold.²⁹ Therefore, changes in both ionic and passive membrane conductances may underlie the electrical alterations observed in neurons from epileptic animals.

Previous studies of the expression patterns of the different *PMCA* isoforms demonstrate that this group of proteins plays a role not only as regulators of homeostatic intracellular calcium concentrations, but also as regulators of dynamic calcium signaling.³⁰ In the brain, where complex neural functions need a diverse range of highly specialized and regulated transduction signals, the *PMCA*s are notable for their regional and cellular heterogeneity. In the hippocampus, reports have shown *PMCA*s to upregulate extrusion in response to even minor calcium elevations to maintain calcium homeostasis, showing an important role for these proteins in calcium clearance.³¹

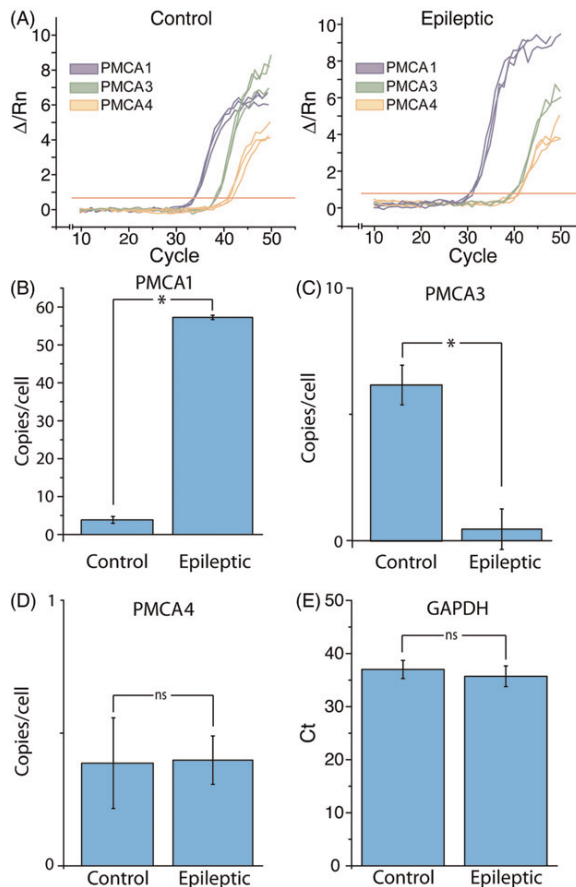


Figure 3 Single-cell PCR quantification of *PMCA* transcripts expressed in single CA1 pyramidal neurons from control and pilocarpine-treated animals. (A) Amplification plots of *PMCA1*, 3 and 4 in control (left) and epileptic (right) neurons. The horizontal line represents the threshold. (B) *PMCA1*, control cells ($n = 13$, 3.85 copies/cell); epileptic cells ($n = 12$, 57 copies/cell). *PMCA1* was highly over-expressed (15-fold) in neurons from pilocarpine-treated animals. (C) *PMCA3*, control cells ($n = 11$, ~6 copies/cell); epileptic cells ($n = 11$, 0.6 copies/cell). *PMCA3* expression is significantly decreased (>13-fold). (D) *PMCA4* control cells ($n = 12$, 0.2 copies/cell); epileptic cells ($n = 10$, 0.18 copies/cell). Expression of *PMCA4* in CA1 neurons did not differ between neurons from control and epileptic rats. (E) *GAPDH* (control cells, $n = 10$; epileptic cells, $n = 9$) showing a similar expression in control and experimental groups. Ct average values \pm SEM are plotted, * $P < 0.05$

Previous studies on the early (1–4 h) stages of epileptogenesis following seizure induction with KA injections report no significant changes in *PMCA1* expression in the CA1 region of the rat hippocampus.¹¹ However, a significant decrease was observed from 12–72 h after seizure induction.¹¹ Therefore, the present study has focused on the chronic phase of epilepsy, at which time stable *PMCA* expression levels may reflect a newer calcium homeostasis.

Due to the complexity of the hippocampus, we quantified *PMCA* expression at the single-neuron level. Our results show that, one month after the epileptogenic stimulus, the expression of *PMCA1* in epileptic neurons increases nearly

15-fold over control levels (Figure 3B) while, in contrast, *PMCA3* shows a significant, but less pronounced decrease (Figure 3C). *PMCA4* expression remains relatively low and is unaffected by epileptogenesis (Figure 3D). Previous reports have shown that *PMCA1* is the most abundant form in the hippocampus, followed by *PMCA2* and *PMCA3*. These studies also showed *PMCA4* to have the lowest expression of the hippocampal *PMCA*s.^{15,16} In agreement with these findings, we confirmed low *PMCA4* expression in the pyramidal cell population of CA1. However, in this cell population, we found *PMCA3* to be more abundant than *PMCA1*. Based on available evidence,

PMCA1a is the most abundant isoform in human and rat in the CA1 region of hippocampus.^{32,33} Since our *PMCA1* probes do not distinguish among the different splicing options, we are mainly detecting abundance of the *PMCA1a* isoform. Therefore, changes in *PMCA1* expression levels observed in epileptogenesis support a prominent housekeeping role for this isoform in CA1 neurons, in comparison to the role played by *PMCA4*.³⁴ Recent evidence found for the *PMCA1a* isoform, the most abundant in brain, shows a specialized role in neurones since it is located in the plasma membrane of somata, dendrites and spines.³³

The physiological relevance of our findings can be analyzed in the context of the known kinetic properties of specific PMCA isoforms, previously reviewed by our group.^{14,35} The majority of studies analyzing the calcium-extrusion properties of different PMCA isoforms have focused on PMCA isoforms that are spliced at site C, where the calmodulin (CaM)-binding domain is located. In spite of methodological limitations, it is now possible to distinguish fast isoforms, corresponding to 'a' variants, whose CaM affinity is low, from slow isoforms, or 'b' variants, which display a high affinity for CaM.^{36,37} Previous studies using heterologous cells expressing different PMCA isoforms have demonstrated a higher calcium extrusion efficiency for *PMCA2* and *PMCA3*, which reduced cytoplasmic calcium levels 30 and 35%, respectively.¹² In contrast, the actions of *PMCA4* lead to only a 15% decrease in intracellular calcium. In these studies, *PMCA1* was unable to reduce the concentration of calcium.¹² Therefore, it appears that, although the calcium extrusion activity of the *PMCA1* isoform is relatively low at baseline, the upregulation of this isoform in response to an insult such as epileptogenesis represents an efficient adaptive response to increases in cytoplasmic calcium, allowing epileptic cells to achieve a new equilibrium and calcium homeostasis.

Several studies analyzing the distribution of different PMCA isoforms have shown that apparently *PMCA1* and *PMCA4* follow a ubiquitous location in cells from different tissues.³⁸⁻⁴⁰ However, in general the most abundant isoform in different cell types is precisely the *PMCA1* isoform,³⁹ while in contrast *PMCA2* and *PMCA3* are enriched in cells from excitable tissues.^{13,40-42} On the other hand, studies using *pmca1* and *pmca4*^{-/-} deficient mice have strongly pointed to the fact that *PMCA1* is indeed a housekeeping isoform, since *pmca1*^{-/-} mice cannot survive.³⁴ *pmca4* deficient female mice seem to be normal, whereas male *pmca4*^{-/-} mice are infertile.³⁴ Therefore, considering this body of evidence, *PMCA1* might represent an indispensable housekeeping variant needed to extrude calcium in almost every developmental stage in mammals.^{40,43} Although undoubtedly all PMCA variants influence the homeostasis of calcium, when cells are challenged by different stimuli, *PMCA1* seems to adopt a relevant role (Figure 3). In order to preserve cell viability, once the intracellular calcium concentration reaches levels that *PMCA3* is not able to handle, a slow isoform such as *PMCA1* becomes critical to extrude calcium.

PMCA3 has been found to be a fast PMCA isoform, with a high affinity for calcium;¹² therefore we suggest that,

under control conditions or in early stages of epileptogenesis with moderate calcium levels, *PMCA3* has an important function in sensing small changes in cytoplasmic calcium concentrations and extruding calcium in short periods of time (Figure 3C). In contrast, *PMCA1*, which has a much lower affinity for calcium but can maintain the extrusion for longer periods, may be upregulated with a sustained increase in calcium concentration, such as occur following epileptogenesis. The over-expression of *PMCA1* seems to be a physiological response attempting to counteract the important calcium increase through the sustained extrusion maintaining the viability of the epileptiform neuron.

Disturbances in the homeostasis of calcium in different models of animal epilepsy have been well described^{1,2,44-46} and the resulting changes in the expression patterns of channels and membrane proteins involved in calcium mobilization have been documented.⁴⁷ Considering that previous studies have shown that specific transcripts of *PMCA2* are induced as a result of depolarization,⁴⁸ it will be interesting to explore not only the specific temporal expression of different PMCA variants, but also the possibility of new isoforms being induced, or 'turned on,' during the process of epileptogenesis. In the near future, the study of temporal changes in the expression of the various PMCA isoforms, and their interactions with other calcium extrusion systems in hippocampal neurons, will be of critical importance.

In the context of the whole battery of proteins devoted to modulate cell Ca²⁺ homeostasis, a large body of evidence points to the fact that every component of the system represents a physiological relevance on demand during a specific time and space. Accordingly, cells where calcium homeostasis has been disturbed, plasma membrane fast PMCA sense and promptly extrude calcium followed by the activation of slow PMCA. In parallel, the intervention of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger present in the plasma membrane become also relevant for cell survival. Although these coordinated intracellular systems are known to be functioning in neurones, further experiments are being carried out in our laboratory in order to understand the specific contribution of each of the components that control all calcium homeostasis in the chronic phase of epilepsy at the single-neuron level.

Author contributions: All authors participated in the design of the experimental strategy. JB-M and BD-C carried out the experiments. JB-M and DEG analyzed electrophysiological data. All authors contributed in the preparation and review of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Molecular Biology Unit at IFC, Ascension Ortiz Espinosa and Ma. Isabel Arenas Reyes for excellent technical support, and also Héctor Malagón for care of experimental animals. We appreciate the excellent editorial work by Alison Munge. This research was supported by CONACyT (Grant 47333/A-1) and DGAPA-UNAM (Grant

IN228607/20) awarded to JM-O. This study was performed in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree in Biomedical Sciences of JB-M at Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCES

- Raza M, Pal S, Rafiq SA, DeLorenzo RJ. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 2001;903:1–12
- Raza M, Blair RE, Sombati S, Carter DS, Deshpande LS, DeLorenzo RJ. Evidence that injury-induced changes in hippocampal neuronal calcium dynamics during epileptogenesis cause acquired epilepsy. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:17522–7
- DeLorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther* 2005;105:229–66
- DeLorenzo RJ, Sun DA, Blair RE, Sombati S. An *in vitro* model of stroke-induced epilepsy: elucidation of the roles of glutamate and calcium in the induction and maintenance of stroke-induced epileptogenesis. *Int Rev Neurobiol* 2007;81:59–84
- Pal S, Sun DA, Limbrick DD Jr, Rafiq A, DeLorenzo RJ. Epileptogenesis induces long-term alterations in intracellular calcium release and sequestration mechanisms in the hippocampal neuronal culture model of epilepsy. *Cell Calcium* 2001;30:285–96
- Baimbridge KG, Mody I, Miller JJ. Reduction of rat hippocampal calcium-binding protein following commissural, amygdala, septal, perforant path, and olfactory bulb kindling. *Epilepsia* 1985;26:460–5
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 1992;15:303–8
- Parsons JT, Churn SB, Kochan LD, DeLorenzo RJ. Persistent inhibition of Ca²⁺ uptake by rat cortex microsome in the pilocarpine model of epilepsy. *Soc Neurosci Abstr* 2000;26:1777
- Parsons JT, Churn SB, DeLorenzo RJ. Chronic inhibition of cortex microsome Mg⁽²⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ATPase-mediated Ca⁽²⁺⁾ uptake in the rat pilocarpine model following epileptogenesis. *Neurochem* 2001;79:319–27
- Ketelaars SO, Gorter JA, Aronica E, Wadman WJ. Calcium extrusion protein expression in the hippocampal formation of chronic epileptic rats after kainate-induced status epilepticus. *Epilepsia* 2004;45:1189–201
- Garcia ML, Murray KD, Garcia VB, Strehler EE, Isackson PJ. Seizure-induced alterations of plasma membrane calcium ATPase isoforms 1, 2 and 3 mRNA and protein in rat hippocampus. *Mol Brain Res* 1997;45:230–8
- Brini M, Coletto L, Pierobon NN, Kraev N, Guerini D, Carafoli E. A comparative functional analysis of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms in intact cells. *J Biol Chem* 2003;278:24500–8
- Guerini D. The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase. *Cell Tissue Res* 1998;292:p191–7
- Bravo-Martinez J, Delgado-Coello B, Mas-Oliva J. Cell calcium extrusion systems and their role in epileptogenesis. *Open Neurosci J* 2010;4:1–12
- Stahl WL, Eakin TJ, Owens JW Jr, Breininger JF, Filuk PE, Anderson WR. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by *in situ* hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;16:223–31
- Burette A, Rockwood JM, Strehler EE, Weinberg RJ. Isoform-specific distribution of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in the rat brain. *J Comp Neurol* 2003;456:746–76
- Zacharias DA, DeMarco SJ, Strehler EE. mRNA expression of the four isoforms of the human plasma membrane Ca²⁺-ATPase in the human hippocampus. *Mol Brain Res* 1997;45:173–6
- Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 1993;34:985–95
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972;32:281–94
- Sucher NJ, Deitcher DL, Baro DJ, Warrick RM, Guenther E. Genes and channels: patch/voltage-clamp analysis and single cell RT-PCR. *Cell Tissue Res* 2000;302:295–307
- Delgado-Coello B, Bravo-Martinez J, Mas-Oliva J. Promega Technical Reports. Detecting PMCA transcripts in single hippocampal neurons. See http://www.promega.com/pubs/tpub_010.htm (last checked October 2009)
- Bliss TVP, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973;232:331–56
- Storm JF. Action potential repolarization and a fast after hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 1987;385:733–59
- Liss B. Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e89
- Bauzano-Poley EA, Rodriguez-Barrionuevo C. Electroencephalographic diagnosis of the idiopathic generalized epilepsies of childhood. *Rev Neurol* 2001;32:365–72
- Ferrie CD. Idiopathic generalized epilepsies imitating focal epilepsies. *Epilepsia* 2005;46:91–5
- Kiernan MC, Krishnan AV, Lin CSY, Burke D, Berkovic SF. Mutation in the Na⁺ channel subunit SCN1B produces paradoxical changes in peripheral nerve excitability. *Brain* 2005;128:1841–6
- Crozier WJ. On the sensory discrimination of intensities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1936;22:412–6
- Quintero JL, Arenas MI, Garcia DE. The antidepressant imipramine inhibits M current by activating a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-dependent pathway in rat sympathetic neurones. *Br J Pharmacol* 2005;145:837–43
- Brini M. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase: from a housekeeping function to a versatile signaling role. *Pflügers Arch* 2009;457:657–64
- Pottorf WJ, Johanns TM, Derrington SM, Strehler EE, Enyedi A, Thayer SA. Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca²⁺ pump activity in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2006;98:1646–56
- Zacharias DA, Dalrymple SJ, Strehler EE. Transcript distribution of plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms and splice variants in the human brain. *Mol Brain Res* 1995;28:263–72
- Kenyon KA, Bushong EA, Mauer AS, Strehler EE, Weinberg RJ, Burette AC. Cellular and subcellular localization of the neuron-specific plasma membrane calcium ATPase PMCA1a in the rat brain. *J Comp Neurol* 2010;518:3169–83
- Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ, Sutliff RL, O'Connor KT, Neumann JC, Andringa A, Miller DA, Prasad V, Doetschman T, Paul RJ, Shull GE. Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J Biol Chem* 2004;279:33742–50
- Delgado-Coello B, Trejo R, Mas-Oliva J. Is there a specific role for the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in the hepatocyte? *Mol Cell Biochem* 2006;285:1–15
- Elwess NL, Filoteo AG, Enyedi A, Penniston JT. Plasma membrane Ca²⁺ pump isoforms 2a and 2b are unusually responsive to calmodulin and Ca²⁺. *J Biol Chem* 1997;272:17981–6
- Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Pászty K, Enyedi A, Penniston JT. Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca²⁺: fast pumps reside in fast cells. *Cell Calcium* 2001;30:49–57
- Brandt P, Neve RL, Kammesheidt A, Rhoads RE, Vanaman TC. Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels. *J Biol Chem* 1992;267:4376–85
- Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE. Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem* 1993;268:25993–6003
- Stauffer TP, Guerini D, Carafoli E. Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A study using specific antibodies. *J Biol Chem* 1995;270:12184–90
- Filoteo AG, Elwess NL, Enyedi A, Caride A, Aung HH, Penniston JT. Plasma membrane Ca²⁺ pump in rat brain. Patterns of alternative splices seen by isoform-specific antibodies. *J Biol Chem* 1997;272:23741–7
- Strehler EE, Treiman M. Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med* 2004;4:323–35
- Zacharias DA, Kappen C. Developmental expression of the four plasma membrane calcium ATPase (PMCA) genes in the mouse. *Biochim Biophys Acta* 1999;1428:397–405

- 44 Pal S, Limbrick DD Jr, Rafiq A, DeLorenzo RJ. Induction of spontaneous recurrent epileptiform discharges causes long-term changes in intracellular calcium homeostatic mechanisms. *Cell Calcium* 2000;**28**:181–93
- 45 Sun DA, Sombati S, Blair RE, DeLorenzo RJ. Long-lasting alterations in neuronal calcium homeostasis in an *in vitro* model of stroke-induced epilepsy. *Cell Calcium* 2004;**35**:155–63
- 46 Leite JP, García-Cairasco N, Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res* 2002;**50**:93–103
- 47 Zukin RS, Bennett MV. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 1995;**18**:306–13
- 48 Zacharias DA, Strehler EE. Change in plasma membrane Ca^{2+} -ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca^{2+} . *Curr Biol* 1996;**6**:1642–52

(Received November 12, 2010, Accepted January 11, 2011)

Cell Calcium Extrusion Systems and their Role in Epileptogenesis

Jorge Bravo-Martínez^{a,b}, Blanca Delgado-Coello^b and Jaime Mas-Oliva^{*b}

^aDepartamento de Fisiología, Facultad de Medicina, and ^bInstituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Abstract: The precise control for maintenance of a normal intracellular calcium concentration in eukaryote cells is accomplished by several systems located at the plasma membrane, as well as several internal membrane systems. Neurons are especially sensitive to changes in these control systems, since when fail and calcium homeostasis disturbed, the cell's metabolism is immediately modified and a pathological condition emerges. Such a condition has been associated with epileptogenesis, and especially to those mechanisms associated to calcium entrance or ON mechanisms. On the other hand, calcium extrusion mechanisms or OFF mechanisms, have been investigated to a lesser extent and therefore remain much less understood. Here, we present a review of these calcium extrusion systems located at the plasma membrane considered to be critical in the process of epileptogenesis; first of all the plasma membrane calcium ATPase (PMCA) as the catalytic moiety of the enzyme that moves calcium outwards in an energy-dependent fashion, and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) coupled to the (Na⁺/K⁺)-ATPase. Based on present knowledge considering the wide range of isoforms found for PMCA and NCX and their specific kinetic characteristics, a hypothesis for their participation on the OFF mechanisms related to the genesis of epilepsy is discussed.

Keywords: Epilepsy, epileptogenesis, calcium regulation, PMCA, NCX, calcium extrusion proteins.

1. INTRODUCTION

Epilepsy can be defined as a chronic illness of diverse etiology characterized by recurrent crises due to an excessive and synchronic burden of cerebral neurons, eventually associated with diverse clinical and paraclinical manifestations. Epilepsy is a common pathology; World Health Organization (WHO) statistics revealed in the year of 2001 a prevalence of 8.2 per 1,000 individuals in developed countries and 10 per 1,000 in developing countries. During the same year, incidence in developed countries was 50 per 100,000 individuals in the general population, and 100 per 100,000 in developing countries. The analysis we have performed in the present study is related to the 50% of these patients that present by diverse external causes an acquired epilepsy [1]. One very important period of epilepsy comprises epileptogenesis, i.e., the period in which epilepsy is developed, which can be considered the period between the lesion and the appearance of clinical manifestations. Epileptogenesis includes all phenomena that induce normal cells to discharge abnormally, which when repeated in a continuous fashion, produce an epileptic focus. For these phenomena to be expressed in cells, a change is required in the majority of systems controlling neuronal excitability and inhibitory processes. Such phenomena allow an exaggerated abnormal discharge of neurons provoking hyperexcitability in the long term. During the period of epileptogenesis, there also appear aberrant interconnections that promote neuronal synchronization with the consequent clinical manifestations [1].

Calcium is an important regulator in many metabolic pathways, as well as a second messenger; therefore, its intra-

cellular concentration is regulated precisely. Transitory elevations in calcium are created during diverse physiological processes such as synaptic transmission, long-term potentiation in the learning process, cellular growth and differentiation, cytoskeleton maintenance, and genetic expression. Intracellular calcium is maintained between 50 and 200 nM, which represents four orders of magnitude beneath its extracellular concentration [2,3]. When there is a considerable and irreversible increase in the intracellular concentration of calcium (glutamate-associated cytotoxicity), diverse mechanisms of cellular death are triggered. At the intermediate point between normal regulation of calcium inflow and intracellular calcium cytotoxicity-related cell death, a non-lethal, prolonged, and irreversible intracellular calcium increase occurs, triggering a series of abnormal plastic changes termed epileptogenesis. After a lesion takes place at the epicenter, these changes are severe and lead to cell death. Nonetheless, cells surrounding the epicenter experience less severe changes and form the substrate for the development of epilepsy [4]. For an adequate maintenance of calcium levels, cells are provided with specialized mechanisms for increasing cytoplasmic calcium concentration termed ON mechanisms, while those devoted to extrude calcium are considered the OFF mechanisms. A massive inflow of calcium during epileptogenesis involves several important consequences, such as changes in neuronal excitability [5], apoptosis induction, and fiber reorganization known as sprouting. The sprouting phenomenon possesses relevance because it promotes an important increase of excitatory circuits, mainly those of the recurrent type [1]. Although calcium inflow mechanisms have been extensively studied and their implication in epilepsy is well known, calcium extrusion processes are less understood. In this review, therefore, we focus on the investigation carried out studying mainly the calcium

*Address correspondence to this author at the Apdo, Postal 70-243, 04510 México, D.F., México; Tel: (+52) (55) 5622-5584, (+52) (55) 5622-5619; Fax: (+52) (55) 5622-5611; E-mail: jmas@ifc.unam.mx

extrusion mechanisms, specifically those located at the plasma membrane.

In hippocampus-cultured cells in which epileptiform activity is provoked by lowering magnesium in the perfusion medium, glutamate was added to the extracellular medium to measure glutamate-mediated calcium rises; chronic elevated basal intracellular calcium levels were found [6]. In order to observe the participation of ON mechanisms (in the induction phase of epilepsy) during exposure to glutamate, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and voltage-dependent calcium channels were blocked; thus, calcium levels diminished to nearly normal levels. When normal and epileptic cells were challenged with a glutamate stimulus to increase intracellular calcium levels, restored calcium levels were quickly observed only in normal cells. In contrast, epileptic cells did not restore calcium levels even after 4 hours, and depending on the duration of the first crisis, for up to 1 year [6]. These findings evidenced that for epilepsy induction, ON mechanisms are important, but OFF mechanisms play an equally important role in this process. Other authors have seen that intracellular calcium remained elevated in neurons isolated 1 year after induction of epilepsy with pilocarpine, in comparison with normal cells in similarly aged animals [7]. These findings strongly support the notion that for epilepsy maintenance, OFF mechanisms are truly important, perhaps in a more important fashion than ON mechanisms.

In a region that has been damaged, neurons are exposed for hours to high glutamate concentrations, promoting an important inflow of calcium into the cell. This phenomenon, together with a slow removal of calcium, leads to a more prolonged period of depolarization. These abnormal changes provide epileptic cells with the ability to produce paroxysmic depolarizations (PD) [8], as described for the first time by Matsumoto and Ajamone-Marsan [9]. PD are characterized by a burst of high-frequency action potentials (AP) accompanied by a sustained depolarization, which frequently is followed by hyperpolarization. Calcium participates in the activation of a phenomenon termed intrinsic burst firing, associated with synchronization of PD firing among neurons [10]. Calcium-induced glutamate exocytosis, which in turn induces the same plastic changes in efferent neurons, extends and propagates the epileptic focus.

2. LONG-TERM CELLULAR EFFECTS OF EPILEPSY

Upon an increase in the discharge of afferent connections into a neuron, the intensity of the neuron's response to these stimuli increases, i.e., potentiation of the synaptic transmission occurs. An important inflow of calcium and a calcium-induced expression of early expression genes such as c-jun, which is implicated in apoptosis-associated gene transcription; and c-fos, related with neurotrophic gene transcriptional activation. Neurotrophins such as nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin 4/5 (NT4/5) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) also intervene in the maturation, survival, and proliferation of specific neuronal populations [1]. Such activation induces the formation of new synaptic contacts, many of which are aberrant, causing

the sprouting phenomenon and imposing conditions under which excitability is exacerbated [11].

On the other hand, one consequence of glutamate receptor activation comprises an increase in intracellular calcium levels, which are finely regulated by different homeostatic cell mechanisms. Once these mechanisms are exceeded, cell death is induced through two different modalities: the acute (necrotic), or the long-term (apoptotic) death. The acute form is caused, among others, by the cell's persistent calcium entrance-mediated depolarization, causing increased sodium and chloride inflow. These ions increase water inflow into the cell, producing swelling and cell lysis [6]. In contrast, the long-term form of cell death consists of an initial increase of calcium considered non-cytotoxic since extrusion mechanisms are working. Nevertheless, as calcium extrusion mechanisms are not working properly, intracellular calcium concentration increases, allowing further liberation of this cation from intracellular stores [12]. Moreover, calcium inflow activates phospholipase A₂ [13] and nitrous oxide synthetase [14], which result with an increase in arachidonic acid and nitrous oxide. By means of cyclo- and lipoxygenase, arachidonic acid is transformed to release superoxide (O₂⁻) and hydroxyl (OH) radicals. When nitrous oxide reacts with superoxide radicals, peroxynitrite (ONOO⁻) a highly reactive molecule is generated [14]. These free radicals destroy cytoskeletal proteins, nucleic acids, and membrane lipids [15]. Peroxides, together with an increase in mitochondrial calcium permeability, alter mitochondrial function and therefore, adenosine triphosphate (ATP) generation. In addition, caspases are activated and these in turn promote the phenomenon of apoptosis. Calcium activates enzymes such as calpain, whose activation has been associated with an action upon the cytoskeleton, receptor proteins, G proteins, and calcium-dependent proteins.

3. CONTROL OF INTRACELLULAR Ca²⁺ CONCENTRATION

Cell calcium inflow is mediated by several mechanisms that together make up the named "ON component". Among these, the glutamate receptor-mediated synaptic mechanism is one of the most important since it has been extensively reported that its liberation in epileptogenesis is greatly increased. A secondary mechanism is mediated by voltage-dependent calcium channels, that is also activated during epileptic crises [1]. Internal calcium reservoirs such as endoplasmic reticulum and mitochondria intervene in the phenomenon, in a more limited manner.

On the other hand, there are specialized mechanisms to remove cytoplasmic calcium representing the "OFF component". Located in intracellular compartments important calcium uptake mechanisms are associated with the sarcoendoplasmic reticulum, the mitochondria, and the Golgi apparatus [16,17]. Also, the presence of calcium buffering proteins such as parvalbumin, calbindin, and calmodulin (CaM) must be mentioned. However, due to their limited capacity to retain calcium, these soluble proteins participate to a greater extent in modulating calcium signals than in controlling the cation's cytoplasmic concentration. At the plasma membrane level, both the plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) work against a high-concentration gradient; therefore, they are directly or indi-

rectly ATP-dependent and susceptible to ischemic injury [18]. The PMCA presents a high affinity and low capacity for removing calcium from the cell, pumping the ion against the concentration gradient; whereas the NCX is a low-affinity and high-capacity system. NCX transports sodium and calcium in opposite directions taking advantage of the sodium gradient across the membrane maintained by the Na^+/K^+ ATPase. The exchanger works in situations in which there is a large intracellular calcium accumulation that requires removal in brief periods of time, whereas the PMCA subsequently pumps the remnant calcium until the ion reaches normal values.

Alternative mechanisms of Ca^{2+} -ATPase regulation are directly coupled with specific signaling pathways according to their presence in excitable or non-excitable cells. Inherent

functions of excitable cells such as neurons require the coordinated extrusion of Ca^{2+} through the PMCA and the NCX in the plasma membrane. These transporters work in parallel by means of mechanisms not fully understood.

4. MEMBRANE CALCIUM EXPORTING SYSTEMS AT THE PLASMA MEMBRANE LEVEL

4.1. Plasma Membrane Calcium ATPase (PMCA) Isoforms

PMCA are highly conserved ATPases present in eukaryote cells that are encoded by four genes producing the basic PMCA isoforms (PMCA1–PMCA4). A large variety of isoforms, theoretically >30 PMCA variants, are generated by alternative splicing and differentially expressed according to

Table 1. Human PMCA Isoforms and Major Alternative Splice Variants

Isoform	Major Alternative Splice Variants	Tissue Distribution
PMCA1	PMCA1x/a	Brain, nervous tissue
	PMCA1x/b	Ubiquitous
	PMCA1x/c	Skeletal muscle, heart
PMCA2	PMCA2w/a	Inner ear hair cells
	PMCA2x/a	Brain (relatively rare)
	PMCA2z/a	Brain (generally more abundant than 2x/a)
	PMCA2w/b	Brain, breast (lactating mammary gland), pancreatic β -cells
	PMCA2x/b	Brain, excitable tissue
	PMCA2z/b	Brain, excitable tissue
PMCA3	PMCA3x/a	Brain
	PMCA3z/a	Brain (cortex, thalamus, substantia nigra), pancreatic β -cells
	PMCA3x/b	Brain
	PMCA3z/b	Brain, (cortex, thalamus, substantia nigra), pancreatic β -cells
	PMCA3x/f	(fast) skeletal muscle, brain (rare)
PMCA4	PMCA4x/a	Brain, heart, stomach
	PMCA4z/a	Heart, pancreas (Islet of Langerhans)
	PMCA4x/b	Ubiquitous
	PMCA4z/b	Heart

Modified from Strehler *et al.*, 2007.

cell type and specific function in diverse organisms (Table 1) [19–22]. Such a high level of redundancy must represent a biological advantage for a large number of organisms, especially at the tissue level where a wide range of isoforms are present. Alternative splicing occurs at two main sites of the PMCA coding gene: site A is localized near the first intracellular loop phospholipid-sensitive region, and site C, in the CaM-binding site (Fig. 1). In general terms, site A-edited isoforms show differences in the first intracellular loop length, whereas site C-edited isoforms exhibit differences at the C-terminal end. Regions for catalytic function, such as the ATP binding site, phosphorylation, and folding structural motifs, are highly conserved. Alternative splicing at site C is more complex due to the generation of multiple variants by inclusion/exclusion of different number of exons, which can be additionally edited through the use of internal splicing-donor sites (Fig. 2) [19]. A controversial splicing product at site B considered aberrant, would theoretically produce a PMCA with nine transmembrane domains (k isoform) as reported in human heart, rat liver and human corneal epithelium [23–25]. According to these findings, the reorganization of the pump to a one containing eight transmembrane domains in cells expressing a k isoform [26], should be considered in further detail.

The PMCA as the ion transporter catalytic entity presents a complex and dynamic regulation. These ATPases are mainly modulated by calcium as well as by CaM, among several alternative regulators [27,28]. The alternative site-C splicing region mainly on variants “a” and “b”, affects CaM binding and therefore its modulation capacity [29].

When the concentration of calcium in the vicinity of the pump corresponds to $<50\text{--}100\text{ nM}$, the majority of PMCA units are inactivated and maintained in an auto-inhibitory state. In this case, the C-terminal tail makes intramolecular contacts with the 1st and 2nd cytoplasmic loops and hides the largest catalytic domain, diminishing its affinity for calcium (Fig. 1) [16]. Therefore, the calcium-CaM domain releases the inhibition effect upon the ATPase, increasing calcium affinity and also increasing the V_{\max} of the reaction. Therefore, affinity for CaM in the distinct PMCA isoforms depends on the diverse spliced forms at the C-terminal end, where the highest affinity is observed with PMCA2b ($K_D < 2\text{ nM}$), followed by PMCA2a and -4b ($K_D < 5\text{--}10\text{ nM}$), and finally, by PMCA4a ($K_D < 50\text{ nM}$) [30]. The different affinities for CaM demonstrate that distinct PMCA isoforms possess different half-times of activation and inactivation constants playing specific roles during the regulation of cytoplasmic calcium concentration [31].

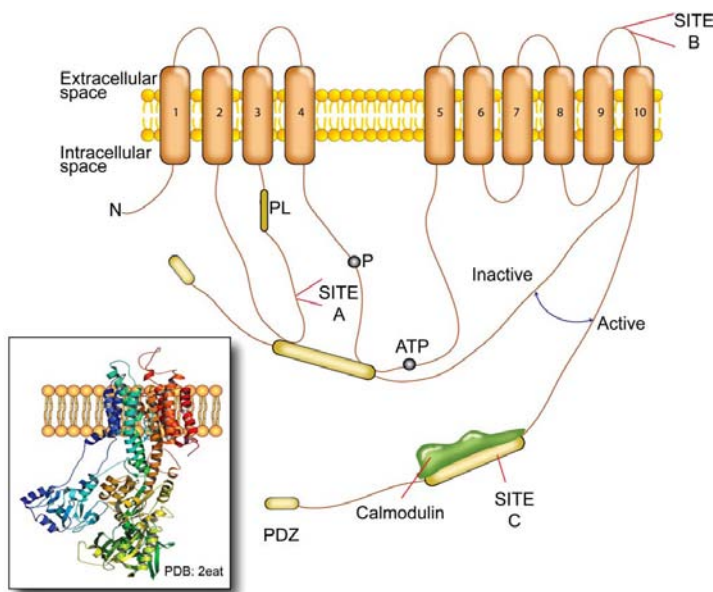


Fig. (1). Topologic representation of PMCA. This model is based on the known structure for the sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA, shown in inset, PDB access number 2eat). Putative transmembrane segments (1–10), the ATP binding site, the aspartic residue in which phosphorylation (P) takes place, the binding site for phospholipids (PL) near the splicing site denominated A, and the binding site for the modulator protein calmodulin contained at the splicing site denominated C are indicated. When calcium concentration in the vicinity of the pump is $<50\text{--}100\text{ nM}$, PMCA units are inactivated and maintained in an auto-inhibitory state. In this state, the C-terminal tail makes intramolecular contacts with the 1st and 2nd cytoplasmic loops and hides the largest catalytic domain, diminishing its affinity for calcium. The PDZ (PSD95/DlgA/zonula occludens-1) binding domain in some “b” isoforms involved in the interaction with partner proteins is also shown.

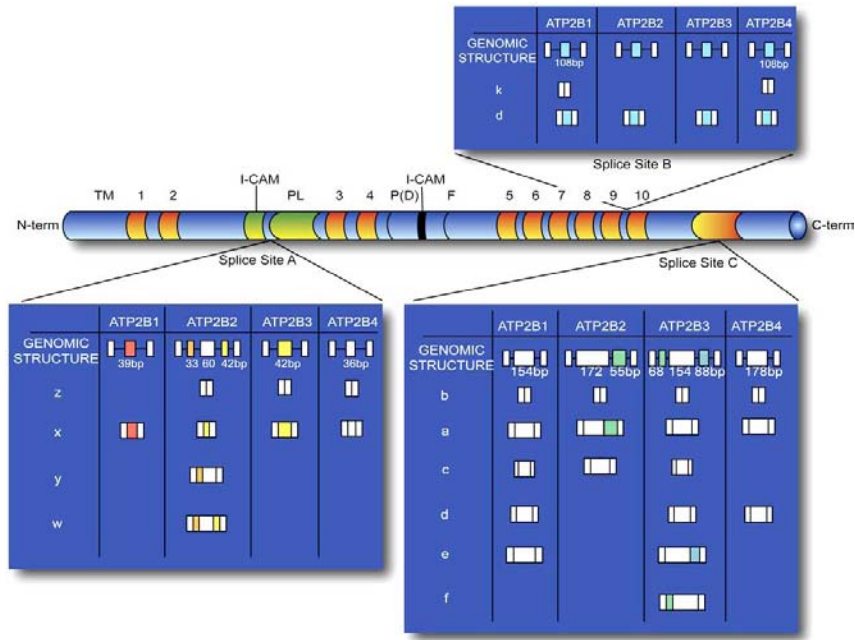


Fig. (2). Alternative splicing sites of the gene encoding for PMCA. Site A is located close to the phospholipids sensitive domain that involves a different number of exons that can be alternatively spliced. Site C located in the CaM binding domain, involves a complex splice pattern since several exons with internal donor splicing sequences can produce a diversity of PMCA isoforms with differential kinetic and distribution properties. Site B placed between transmembrane domains 9th and 10th is a controversial site since its physiological meaning is still not well understood. In the context of epilepsy, more research has been focused on isoforms spliced at site C, although some evidence suggests that isoforms spliced at other sites should not be excluded. Modified from [21, 22].

The different PMCA isoforms have significant differences in their capacity for managing calcium inflow of distinct intensity and duration; for instance, PMCA4b is activated by CaM at an activation rate of 46 seconds vs. 20 seconds for PMCA4a. After removing CaM, PMCA4b inactivation rate moves to nearly 20 minutes, whereas for PMCA4a this rate corresponds to <1 minute [30]. These data suggest that isoform PMCA4b is efficient for managing a slow calcium inflow, in comparison with PMCA4a, which corresponds to a competent isoform that responds to fast calcium signals [30]. In addition, since isoforms PMCA2a and PMCA3f present the highest activation rates, these are more adequate for managing a rapid calcium inflow such as that of excitable cells. PMCAs exhibit a specific memory for past activation; therefore, the inactivation constant is very slow, causing CaM to be attached to the protein for more time [32]. Thus, in cells activated by repetitive stimuli, PMCA2b is maintained pre-activated for a more prolonged period of time and therefore, responds immediately to the new calcium signal, crucial in epileptic cells.

Other PMCA modulators include several A and C protein kinases (PKA, PKC), proteases such as calpain or caspases, acid phospholipids, and dimerization or oligomerization of

the enzyme [33-35]. The C-terminal region possesses abundant serine and threonine residues, the substrate for protein kinases A and C. PKA activates the pump, diminishing the Km for calcium and increasing the V_{max} . The effects of PKC are more complex and vary according to isoform and splice type. PMCA4b isoform is activated by PKC, while the PMCA4a isoform is not affected. In contrast, PMCA2a and PMCA3a are slightly inhibited [36].

The lipid environment also intervenes in the regulation of the PMCA activity, specifically through the presence of cholesterol [37-40]. Other lipids affecting PMCA regulation are acidic phospholipids, in particular, phosphatidylinositol and phosphatidylserine whose activation is partially dependent on CaM [41,42]. Interestingly, PMCAs are also affected by peptide hormones acting by means of G proteins, by steroids, and by lipid 2nd messengers such as ceramide and sphingosine [43,44].

In general, PMCA, as well as NCX function in concert with other calcium-sequestering mechanisms, such as those present in the mitochondria and the endoplasmic reticulum. Cells must be capable of precisely controlling the type, localization, and activation state of each PMCA by means of pro-

teins that interact specifically with the different PMCA isoforms [45]. As dynamic participants in the regulation of intracellular calcium, PMCA isoforms require at the long-term a fine regulation that involves changes at the transcription level, stability of mRNA, alternative splicing, and control of protein translation. At the medium-term, local availability is regulated by directioning toward the specific membrane, internalization, and recycling. This type of regulation is probably due to the intervention of partner proteins belonging to the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family of proteins, which interact with the carboxy end of the 2b and 4b PMCA isoforms [46] at specific sites such as PDZ PSD95/DlgA/zonula occludens-1 (PDZ) domains. Short-term regulation provided by CaM or by differential phosphorylation is specific for each isoform, allowing dynamic PMCA-function regulation that ranges from seconds to days [47].

Another important factor comprises the subcellular organization of organelles involved in calcium regulation and its spatial relationship with plasma membrane microdomains. Although the manner in which these microdomains are established is not well known, it is well established that receptors, transporters, and signaling molecules are grouped into multiprotein complexes localized at strategic calcium signal sites [48].

4.2. Tissue Distribution and Local PMCA Expression

All cells express at least one PMCA variant with certain specificity for its expression in time and space. Each cell type possesses distinct splicing regulation mechanisms that determine its specific expression. PMCA1 is found in practically all cell types and has been found from the first stages of embryonic development. PMCA4 is also found in nearly all cell types, but in less abundance with respect to PMCA1 and only detected in late stages of embryonic development [49]. In general terms, PMCA isoforms are more abundant and diverse in brain than in other tissues, particularly variants PMCA2 and PMCA3 [16,50,51].

In the brain, where highly regulated signal transduction events take place, localization of the distinct isoform variants varies greatly among its different structures and cells. For instance, PMCA1 is expressed in cerebral cortex and in the CA1 region of hippocampus [21]. PMCA2 is expressed to a greater degree in cerebellum and also in the cerebral cortex and hippocampus, while PMCA3 is abundant in superficial layers of cerebral cortex and in the cerebellar cortex. PMCA4 expression is reduced in cerebral cortex layers II and VI of pyramidal cells, as well as in cerebellar cortex granular cells. PMCA4 expression in the olfactory bulb, hippocampus and striated nucleus is very marginal.

PMCA isoforms also present a distinct distribution at the subcellular level. For example, in cerebral cortex isoforms 1 and 3 are found in the neuropile (perhaps even in the synapses) and in some dendrites. PMCA2 is abundant in distal dendrites, while PMCA4 is found as abundant in somatodendritic regions [52,53]. These differences reflect functional calcium-regulation differences in the distinct cellular compartments. The possibility exists that several isoforms could be integrated into multiprotein complexes, e.g., PMCA2 and PMCA4 that might bind to the Na⁺/H⁺ exchanger regulator factor and PMCA2 to the MAGUK family

of proteins, that in turn bind to the NMDA receptor. PMCA4 interacts directly with the synthetase I nitrous oxide, known to decrease its activity in a dose-dependent way when calcium concentration in the microenvironment surrounding the enzyme is low [54].

Additional knowledge is also provided by studies focused on the association of specific PMCA isoforms to other proteins in caveolae related to calcium handling, since co-localization of PMCA and these structures has been suggested for different tissues [55,56]. In this sense, the association of PMCA isoforms to raft domains has been specially shown in neurons with the PMCA2 isoform [57]. However, the relevance of this type of associations in the context of epileptogenesis is still open to investigation.

4.3. Na⁺/Ca²⁺ Exchanger (NCX) Isoforms

The Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) is activated when intracellular calcium increases, removing one calcium ion for two or three sodium ions secondary to the Na⁺/K⁺ ATPase-generated Na⁺-gradient formation [18], and suggested that when altered might contribute to the establishment of epilepsy [58]. The NCX1 gene in humans is localized in chromosome 2 (p23-p22), NCX2 in chromosome 19 (q13.3), and NCX3 in chromosome 14 (q24.1) (NCBI Entrez Gene database).

To date, four Na⁺/Ca²⁺ exchanger genes have been cloned and functionally characterized. Isoform NCX1 was cloned in 1990 [59,60]; later, isoforms NCX2 and NCX3 were cloned in mammals. Recently, isoform NCX4 has been found in teleost, amphibian, and reptilian; and seems to be absent in birds and mammals [61,62]. Genes codifying for NCX comprise six exons (A-F): NCX1 contains all six, while NCX2 contains only two (B-C) and NCX3 contains four (A, B, C, E). NCX1 homolog genes have been identified in several species of microorganisms and have been grouped in the SLC8 (solute carrier 8) superfamily, from which the most frequently studied is NCX1 [63,64]. NCX expression levels are directly correlated to calcium extrusion in distinct cell types depending on their type of activity; for example, expression is high in cardiac cells, neurons, and kidney cells. Contrariwise, expression is relatively low in hepatic cells.

The portion corresponding to the intracellular loop oriented toward the extreme C-terminal of NCX produced by alternative splicing, vary with each one of the isoforms [65]. The 1.1–1.12 variants and the 1.41 were found from NCX1 [66]. NCX3 possesses the 3.1–3.3 variants and only the 2.1 variant is known for NCX2 (Fig. 3).

NCX1 presents nine transmembrane domains; domains 1–5 are separated from domains 6–9 by an intracellular loop representing more than one half of the protein [67]. Two conserved regions are localized in the intracellular loop; Ca²⁺ binding domains CBD1 and 2 [68]. The transmembrane regions are responsible for sodium and calcium transport through the cellular membrane [69]. There are two other conserved regions among the several NCXs and homologs termed $\alpha 1$ and 2; the first one found between transmembrane regions 2 and 3, while the second is located between regions 7 and 8 [64,70]. The $\alpha 1$ region of the NCX1 isoform is extracellular while the $\alpha 2$ region is intracellular (Fig. 4) [67].

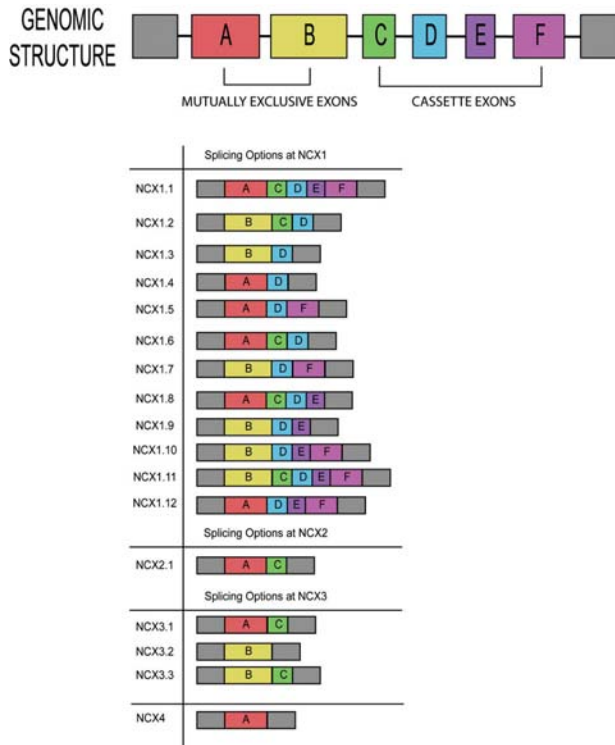


Fig. (3). Genomic structure of the NCX 1-4 isoform of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. NCX4 is present only in teleost, amphibian, and reptilian [62]. The different alternative options are illustrated. Modified from [65].

NCX1 transports in opposite directions three sodium ions for each calcium ion moved, and depending on local ion gradients can extrude from or incorporate calcium into the cell [60]. The exchanger is coupled with the sodium gradient, on which uptake velocity as well as transport direction depends. The NCX possesses two control levels; one comprises an intracellular loop with non-proteic factors that regulate protein's activity, and the other loop interaction with other regulator proteins that also modify its activity. Sodium and calcium ions, in addition to being transported also function as NCX activity regulators; for example, the increase in intracellular sodium inactivates the exchanger (sodium-dependent inactivation, I_i). Intracellular loop removal by means of α -chymotrypsin treatment eliminates NCX inhibition mechanisms, supporting the fact that these mechanisms are indeed found in this region [60]. Other protein-regulating factors include pH, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2), ATP, phosphorylation [71]; as well as the exchanger inhibitor peptide (XIP), which completely inhibits activity when interacting with the N-terminal segment of the large intracellular loop [69]. There are a number of proteins that associate with the NCX1 in the intracellular loop that regulate exchanger transport function, such as protein kinases A (PKA)

and C (PKC) [72-74]. It has been also found that phosphatases PP1 and 2A are associated with NCX1. Kinases and phosphatases are probably associated with the exchanger through another scaffolding protein, the mAKAP. Calcineurin (PP2B) is associated with the three NCXs by means of the CBD1 repeated sequence [60].

4.4. Tissue Distribution and Cell Expression of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger

NCX1 isoform is found in the majority of cell types, while NCX2 and NCX3 isoforms are present in skeletal muscle and the nervous system (Table 2) [75]. In the nervous system, NCX isoforms are expressed in several cerebral areas that even overlap; in particular, neocortex, cerebellar cortex, hippocampus, and hypothalamus [17]. Several isoforms are expressed in the neocortex and hippocampus, importantly in dendrites [76] and poorly expressed in axonic fibers and terminals suggesting that diverse isoforms are situated for buffering intracellular calcium in excitatory postsynaptic sites. Noteworthy, a functional interaction has been found between NCX and the glutamate receptor (mGluR1), most probably related to calcium entry into the cell [77].

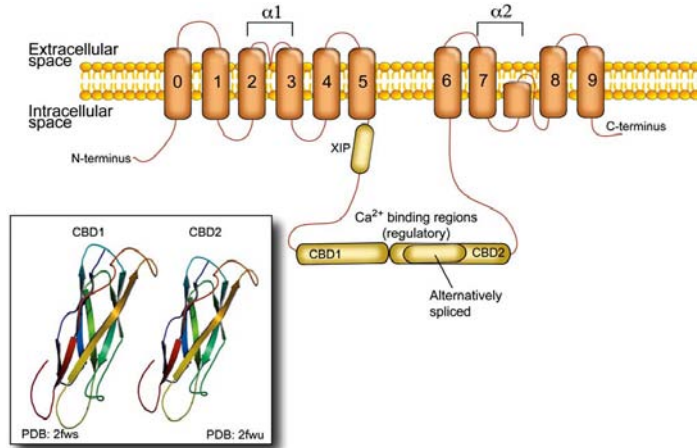


Fig. (4). Topologic representation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1). The two segments containing transmembrane domains 1–5 and 6–9 are separated by a large intracytoplasmic loop. This loop includes two domains for Ca²⁺ binding (CBD1; PDB access number 2fws, and CBD2; PDB access number 2fwu, shown in inset). There are two other conserved regions, the $\alpha 1$ and $\alpha 2$; the first is found between transmembrane regions 2 and 3, while the second is located between regions 7 and 8. These regions are considered responsible for sodium-calcium binding and transport. In the NCX1 isoform, the $\alpha 1$ region is extracellular, while the $\alpha 2$ region is intracellular. Modified from [64, 68].

Table 2. NCX Isoform and Major Alternative Splice Variants

Isoform	Alternative splice variants	Tissue distribution
NCX1	1.1	Heart
	1.2	Kidney
	1.3	Kidney
	1.4	Brain
	1.5	Brain
	1.6	Brain
	1.7	Kidney
	1.8	Brain
	1.9	Brain
	1.10	Brain
	1.11	Brain
	1.12	Brain
NCX2	2.1	Brain and skeletal muscle
NCX3	3.1-3	Brain and skeletal muscle

5. ROLE OF PMCA AND NCX IN EPILEPSY

Within the context of epilepsy, little is known concerning the role that distinct PMCA isoforms play in the control of epileptic crises and their consequences. Mapping studies conducted with *in situ* hybridization techniques in hippocampus of intraperitoneal (i.p.) kainic acid (KA)-treated rats, exhibited a differential expression of PMCA isoforms 1–3 [78]. In the case of isoform 1, there are no appreciable changes in mRNA levels in CA1 and 3 pyramidal cells up to 4 hours after injection with KA. At 12 hours, there is a significant decrease (47%) that is maintained up to 72 hours in CA3. In the dentate gyrus, no significant changes were observed for PMCA1. In the case of PMCA2, a maximum decrease is achieved at 12 hours post-injection, reaching levels ca 40% less than controls in CA3 and 1 and a maximum decrease of PMCA2 is achieved at 4 hours, reaching 34% less than controls. PMCA3 does not show significant changes in the entire hippocampus during the observation period. Complementary western blot analysis demonstrates that total PMCA protein levels were higher than controls only at 4 hours after treatment with KA [78]. Furthermore, in the inner molecular layer of the dentate gyrus of KA-treated rats, a higher expression of total PMCA was detected by immunocytochemical techniques at 3 weeks and 2.5 months after the injection of KA [79].

Based on this type of experimentation, it is recognized that clearance of calcium mediated by the PMCA has a relevant role in different neuronal processes. Elegant experiments performed with hippocampal cells expressing different PMCA isoforms fused to the enhanced green fluorescent protein have consistently shown that glutamate through NMDA receptors induce a Ca²⁺ inflow. Moreover, through the selective inhibition of processes such as the activity of SERCA, mitochondrial Ca²⁺ uptake, or NCX activity, it has

been shown that PMCA is the main protein mediating the extrusion of cytoplasmic calcium [80]. These studies have also shown that PMCA isoforms 4b, 2wb, and 2xb are internalized in hippocampal cells after glutamate exposure even at non-toxic concentrations. The observed internalization appears not to be due to damage of the plasma membrane, but instead mediated by calpain through an unknown mechanism [80].

New data from our laboratory employing single cells recorded with a whole-cell configuration and real-time PCR to measure different PMCA mRNAs, show that the expression of the housekeeping isoform PMCA1 importantly increases in cells localized in the hippocampus of chronic pilocarpine-induced epileptic rats [Bravo-Martínez *et al.*, submitted]. In contrast, PMCA3 transcripts show a significant decrease in the epileptic condition [Bravo-Martínez *et al.*, submitted]. These results might be interpreted in the context that different PMCA isoforms displaying a wide range of affinity constants for calcium and CaM might be specifically adjusting to the new condition. It is interesting to note that PMCA1 and PMCA4 as housekeeping isoforms have been considered slow-acting proteins, whereas PMCA2 and PMCA3 isoforms have been considered as fast-acting proteins in the fine tuning of cytoplasmic calcium concentrations [81].

On the other hand, it is noteworthy that nowadays less knowledge is available concerning the role of NCX during epileptogenesis. In the hippocampus of KA-epilepticized rats, it was demonstrated by means of immunocytochemistry techniques that the NCX1 isoform diminished in the internal molecular layer of the hippocampus as well as in layer III of the entorhinal cortex; whereas the NCX2 isoform increased mainly in astrocytes. Concerning the NCX3 isoform, it has been shown to diminish in mossy fibers, probably promoting the phenomenon of sprouting, since an increase in intracellular calcium is required for this process to occur [79].

So far, although the specific participation of Ca^{2+} extruding systems in epileptogenesis such as the one given by the PMCA is still unknown, useful information can be obtained from related studies. For instance, it has been shown that cultured neuroblastoma cells exposed to depolarizing KCl concentrations induce the expression of isoform 2x, while during basal conditions it is not found [82]. Interestingly, the effect is observed for several generations and demonstrated that a calcium transient is a necessary condition to express the 2x isoform in addition to the 2w found in non-stimulated cells [82]. Complementary information is added by studies conducted with cultured hippocampal neurons during maturation, where an important upregulation at the level of tran-

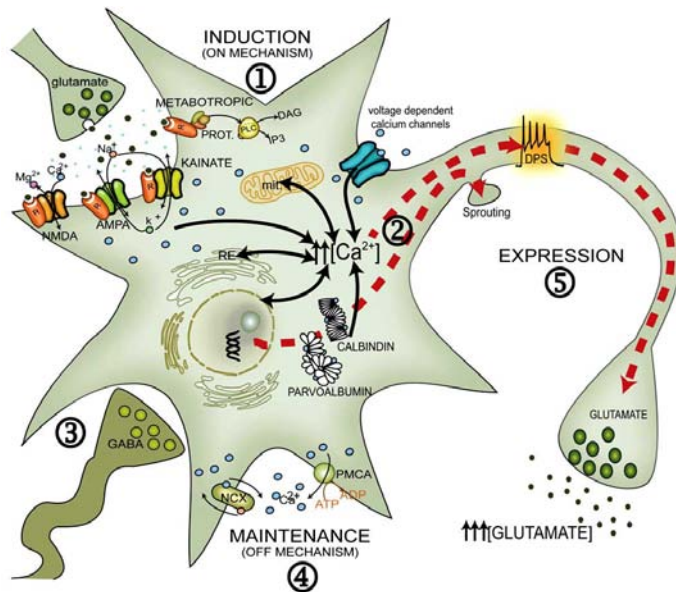


Fig. (5). Mechanisms of epileptogenesis and maintenance of epilepsy. Events related with epilepsy induction (1) involve stimulation mediated by excitatory neurotransmitters (adrenergic, cholinergic, glutamatergic) and by iterative electric stimulation, both resulting in a significant Ca^{2+} inflow (2). This entrance of Ca^{2+} is carried out by ON mechanisms located in the plasma membrane (glutamate receptors and voltage-dependent calcium channels). For epilepsy to be accomplished, the GABAergic inhibitory systems (3) must show an altered function producing an imbalance in the homeostasis between excitatory and inhibitory neurotransmitters. In the maintenance stage of epilepsy (4), calcium levels reach a higher new threshold near a normal concentration due to inadequate function of OFF mechanisms, basically the PMCA and the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger (NCX). A sustained elevation of intracellular Ca^{2+} levels is an essential condition for the cells to fire paroxysmic depolarizations and to synchronize with other cells in order to express clinical and electroencephalographic manifestations (5).

scripts and proteins mainly PMCA2 and the NCX2, has been described [83]. During neuronal maturation it is assumed that nervous cells require to improve their Ca^{2+} buffering capacity, and that changes might occur concomitantly with changes within intracellular Ca^{2+} buffering systems [83].

6. CONCLUDING REMARKS

Up to date, accumulated knowledge points to the fact that the ultimate control of calcium homeostasis in the neuron is carried out at the level of the plasma membrane by the Ca^{2+} -ATPase and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (Fig. 5). In the case of the epileptic cell, a different cytoplasmic calcium concentration threshold than the one observed in normal cells, is maintained within manageable levels. This higher intracellular calcium concentration induces the cell to discharge paroxysmic depolarizations and to synchronize with the remainder of epileptic cells. In parallel, a new equilibrium is reached in challenged cells where the expression of specific PMCA isoforms and other proteins mobilizing calcium lead the cell to overcome the new physiological demand. The temporal screening for the expression of the different isoforms providing the adequate kinetic properties aimed to restore as much as possible the "normal" cytoplasmic calcium levels, is the focus of future investigation. Likewise, the search of alternative regulating mechanisms involved at the transcriptional and/or translational levels of these isoforms will permit a better understanding of the origin and possible control of epileptogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research carried out at our laboratory has been supported by grants from CONACyT-México (47333/A-1) and DGAPA-UNAM (IN228607/19). We are grateful to Maggie Brunner, M.A. for editorial revision.

REFERENCES

- McNamara JO, Huang YZ, Leonard AS. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Science STKE* 2006; re12: 1-22.
- DeGraff AS. Epidemiological aspects of epilepsy in Norway. *Epilepsia* 1974; 15: 291-9.
- Putney J. Calcium. In: Siegel GJ, Ed. *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1999; pp. 453-69.
- Sun DA, Sombati S, Blair RE, DeLorenzo RJ. Long-lasting alterations in neuronal calcium homeostasis in an *in vitro* model of stroke-induced epilepsy. *Cell Calcium* 2004; 35: 155-63.
- García ML, Strehler EE. Plasma membrane calcium ATPases as critical regulators of calcium homeostasis during neuronal cell function. *Front Biosci* 1999; 4: D869-D82.
- Pal S, Limbrick DD, Jr, Rafiq A, DeLorenzo RJ. Induction of spontaneous recurrent epileptiform discharges causes long-term changes in intracellular calcium homeostatic mechanisms. *Cell Calcium* 2000; 28: 181-93.
- Raza M, Pal S, Rafiq A, DeLorenzo RJ. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 2001; 903: 1-12.
- De Curtis M, Avanzini G. Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 541-67.
- Matsumoto H, Ajmone-Marsan C. Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: interictal manifestations. *Exp Neurol* 1964; 9: 286-304.
- De Falco FAQ, Bartiromo U, Majello L, Di Geronimo G, Mundo P. Calcium antagonist nimodipine in intractable epilepsy. *Epilepsia* 1992; 33: 343-45.
- Jarrott B. Epileptogenesis: biochemical aspects. In: Eadie MJ, Vajda FJE, Eds. *Antiepileptic drugs pharmacology and therapeutics*. Springer: Berlin 1999; pp. 87-121.
- Budd SL. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol Ther* 1998; 80: 203-29.
- Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994; 269: 13057-60.
- Lipton SA, Choi YB, Sucher NJ, Pan ZH, Stamler JS. Redox state, NMDA receptors and NO-related species. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17: 186-7.
- Hall ED, Kupina NC, Althaus JS. Peroxynitrite scavengers for the acute treatment of traumatic brain injury. *Ann NY Acad Sci* 1999; 890: 462-8.
- Strehler EE, Treiman M. Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med* 2004; 4: 323-35.
- Minelli A, Castaldo P, Gobbi P, Salucci S, Magi S, Amoroso S. Cellular and subcellular localization of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium* 2007; 41: 221-34.
- Tymianski M. Cytosolic calcium concentrations and cell death *in vitro*. *Adv Neurol* 1996; 71: 85-105.
- Strehler EE, Zacharias DA. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* 2001; 81: 21-50.
- Keeton TP, Burk SE, Shull GE. Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms 1,2,3, and 4. *J Biol Chem* 1993; 268: 2740-8.
- Zacharias DA, Dalrymple SJ, Strehler EE. Transcript distribution of plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms and splice variants in the human brain. *Mol Brain Res* 1995; 28: 263-72.
- Kamagata A, Herchuelz A, Bollen A, Van Eylen F. Expression of multiple plasma membrane Ca^{2+} -ATPases in rat pancreatic islet cells. *Cell Calcium* 2000; 27: 231-46.
- Santiago-García J, Mas-Oliva J, Saavedra D, Zarain-Herzberg A. Analysis of mRNA expression and cloning of a novel plasma membrane Ca^{2+} -ATPase splice variant in human. *Mol Cell Biochem* 1996; 155: 173-82.
- Delgado-Coello B, Santiago-García J, Zarain-Herzberg A, Mas-Oliva J. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase mRNA expression in murine hepatocarcinoma and regenerating liver cells. *Mol Cell Biochem* 2003; 247: 177-84.
- Talarico EF, Jr, Mangini NJ. Alternative splice variants of plasma membrane calcium-ATPases in human corneal epithelium. *Exp Eye Res* 2007; 85: 869-79.
- Preiano BS, Guerini D, Carafoli E. Expression and functional characterization of isoforms 4 of the plasma membrane calcium pump. *Biochemistry* 1996; 35: 7946-53.
- James P, Maeda M, Fischer R, et al. Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca^{2+} pump of human erythrocytes. *J Biol Chem* 1988; 263: 2905-10.
- Enyedi A, Vorherr T, James P, et al. The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts both with calmodulin and with another part of the pump. *J Biol Chem* 1989; 264: 12313-21.
- Penniston JT, Enyedi A. Modulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *J Membr Biol* 1998; 165: 101-9.
- Caride AJ, Elwess NL, Verma AK, et al. The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca^{2+} pump is slow and is changed by alternative splicing. *J Biol Chem* 1999; 274: 35227-32.
- Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Pászty K, Enyedi A, Penniston JT. Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca^{2+} : fast pumps reside in fast cells. *Cell Calcium* 2001; 30: 49-57.
- Caride AJ, Penheiter AR, Filoteo AG, Bajzer Z, Enyedi A, Penniston JT. The plasma membrane calcium pump displays memory

- of past calcium spikes. Differences between isoforms 2b and 4b. *J Biol Chem* 2001; 276: 39797-804.
- [33] Lehotsky J. Plasma membrane Ca(2+)-pump functional specialization in the brain: complex of isoform expression and regulation by effectors. *Mol Chem Neurobiol* 1995; 25: 175-87.
- [34] Wang KK, Villalobo A, Roufogalis BD. The plasma membrane calcium pump: a multiregulated transporter. *Trends Cell Biol* 1992; 2: 46-52.
- [35] Carafoli E. The plasma membrane calcium pump. Structure, function, regulation. *Biochim Biophys Acta* 1992; 110: 266-67.
- [36] Verma AK, Paszty K, Filoteo AG, Penniston JT, Enyedi A. Protein kinase C phosphorylates plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4a at its calmodulin binding domain. *J Biol Chem* 1999; 274: 527-31.
- [37] Mas-Oliva J, Santiago-García J. Cholesterol effect on thermostability of the (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase from cardiac muscle sarcolemma. *Biochem Int* 1990; 21: 233-41.
- [38] Ortega A, Santiago-García J, Mas-Oliva J, Lepock JR. Cholesterol increases the thermal stability of the Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase of cardiac microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1283: 45-50.
- [39] Santiago-García J, Delgado-Coello BA, Mas-Oliva J. Thermal analysis of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Mol Cell Biochem* 2000; 209: 105-12.
- [40] Mas-Oliva J, Delgado-Coello B. Protein stability and the evolution of the cell membrane. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 2007; 146: 207-13.
- [41] Carafoli E. Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J* 1994; 8: 993-1002.
- [42] Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F, Vrolix M, Smeets H de, Casteels R. Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca²⁺-transporting ATPase: evidence for a tissue-dependent functional difference. *Biochem J* 1989; 263: 687-94.
- [43] Delgado-Coello B, Trejo R, Mas-Oliva J. Is there a specific role for the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in the hepatocyte? *Mol Cell Biochem* 2006; 285: 1-15.
- [44] Zylinska L, Gromadzinska E, Lachowicz L. Short-time effects of neuroactive steroids on rat cortical Ca²⁺-ATPase activity. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1437: 257-64.
- [45] Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ. The organisation and functions of local Ca²⁺ signals. *J Cell Sci* 2001; 114: 2213-22.
- [46] DeMarco SJ, Strehler EE. Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins. *J Biol Chem* 2001; 276: 21594-600.
- [47] Strehler EE, Caride AJ, Filoteo AG, Xiong Y, Penniston JT, Enyedi A. Plasma membrane Ca²⁺ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1099: 226-36.
- [48] Garner CC, Nash J, Haganir RL. PDZ domains in synapse assembly and signaling. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 274-80.
- [49] Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE. Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem* 1993; 268: 25993-26003.
- [50] Filoteo AG, Elwess NL, Enyedi A, Caride A, Aung HH, Penniston JT. Plasma membrane Ca²⁺ pump in rat brain: patterns of alternative splices seen by isoform-specific antibodies. *J Biol Chem* 1997; 272: 23741-7.
- [51] Guerini D. The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase. *Cell Tissue Res* 1998; 292: 191-7.
- [52] Zacharias DA, Strehler EE. Change in plasma membrane Ca²⁺-ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca²⁺. *Curr Biol* 1996; 6: 1642-52.
- [53] Burette A, Rockwood JM, Strehler EE, Weinberg RJ. Isoform-specific distribution of the plasma membrane Ca²⁺ ATPase in the rat brain. *J Comp Neurol* 2003; 467: 464-76.
- [54] Schuh K, Uldrijan S, Telkamp M, Rötthlein N, Neyses L. The plasma membrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. *J Cell Biol* 2001; 155: 201-5.
- [55] Daniel EE, El-Yazbi A, Cho WJ. Caveolae and calcium handling, a review and a hypothesis. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 529-44.
- [56] El-Yazbi AF, Cho WJ, Schuyler R, Daniel EE. Calcium extrusion by plasma membrane calcium pump is impaired in caveolin-1 knockout mouse small intestine. *Eur J Pharmacol* 2008; 591: 80-7.
- [57] Jiang L, Fernandes D, Mehta N, Bean JL, Michaelis ML, Zaidi A. Partitioning of the Plasma membrane Ca²⁺-ATPase into lipid rafts in primary neurons: effects of cholesterol depletion. *J Neurochem* 2007; 102: 378-88.
- [58] McNamara JO, Puranam RS. Epilepsy genetics: an abundance of riches for biologists. *Curr Biol* 1998; 8: R166-70.
- [59] Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *Science* 1990; 250: 562-5.
- [60] Ruknudin AM, Lakatta EG. The Regulation of the Na/Ca Exchanger and Plasmalemmal Ca²⁺ ATPase by other Proteins. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1099: 86-102.
- [61] Marshall CR, Fox JA, Butland SL, Ouellette BF, Brinkman FS, Tibbitts GF. Phylogeny of Na⁽⁺⁾/Ca²⁺ exchanger (NCX) genes from genomic data identifies new gene duplications and a new family member in fish species. *Physiol Genomics* 2005; 21: 161-73.
- [62] On C, Marshall CR, Chen N, Moyes CD, Tibbitts GF. Gene structure evolution of the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger (NCX) family. *BMC Evol Biol* 2008; 8: 127.
- [63] Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. The sodium/calcium exchanger family-SLC8. *PLoS Arch* 2004; 447: 543-8.
- [64] Lytton J. Na⁽⁺⁾/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem J* 2007; 406: 365-82.
- [65] Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁽⁺⁾/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 1997; 272: C1250-61.
- [66] Li JP, Kajiyah H, Okamoto F, Nakao A, Iwamoto T, Okabe K. Three Na⁽⁺⁾/Ca²⁺ exchanger (NCX) variants are expressed in mouse osteoclasts and mediate calcium transport during bone resorption. *Endocrinology* 2007; 148: 2116-25.
- [67] Philipson KD, Nicoll DA. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 111-33.
- [68] Hilge M, Aelen J, Perrakis A, Vuister GW. Structural Basis for Ca²⁺ Regulation in the Na⁽⁺⁾/Ca²⁺. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1099: 7-15.
- [69] Matsuoka S, Nicoll DA, Reilly RF. Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3870-4.
- [70] Schwarz BF, Benzer S. Calx, a Na-Ca exchanger gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10249-54.
- [71] Ruknudin AM, Wei S, Haigney MC. Phosphorylation and other conundrums of Na/Ca Exchanger, NCX1. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1099: 103-18.
- [72] Schulse DH, Muqhal M, Lederer WJ, Ruknudin AM. Sodium/calcium exchanger (NCX1) macromolecular complex. *J Biol Chem* 2003; 278: 28849-55.
- [73] Ryan C, Shaw G, Hardwicke PMD. Effect of Ca²⁺ on protein kinase A-mediated phosphorylation of a specific serine residue in an expressed peptide containing the Ca²⁺-regulatory domain of scallop muscle Na⁽⁺⁾/Ca²⁺ exchanger. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1099: 43-52.
- [74] Shigekawa M, Katanosaka Y, Wakabayashi S. Regulation of the cardiac Na⁽⁺⁾/Ca²⁺ exchanger by calcineurin and protein kinase C. *Ann NY Acad Sci* 2007; 10: 53-63.
- [75] Papa M, Canitano A, Boscia F, et al. Differential expression of the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger transcripts and proteins in rat brain regions. *J Comp Neurol* 2003; 461: 31-48.
- [76] Lörincz A, Rózsa B, Katona G, Vizi ES, Tamás G. Differential distribution of NCX1 contributes to spine-dendrite compartmentalization in CA1 pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1033-8.
- [77] Kim YT, Namkung YL, Kwak J, Suh CK. Involvement of Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger on metabotropic glutamate receptor 1-mediated

- [Ca²⁺]_i transients in rat cerebellar Purkinje neurons. *Neuroscience* 2007; 146: 170-7.
- [78] García ML, Murray KD, García VB, Strehler EE, Isackson PJ. Seizure-induced alterations of plasma membrane calcium ATPase isoforms 1, 2 and 3 mRNA and protein in rat hippocampus. *Mol Brain Res* 1997; 45: 230-8.
- [79] Ketelaars SOM, Gorter JA, Aronica E, Wadman WJ. Calcium extrusion protein expression in the hippocampal formation of chronic epileptic rats after kainate-induced status epilepticus. *Epilepsia* 2004; 45: 1189-201.
- [80] Pottorf WJ, 2nd, Johanns TM, Derrington SM, Strehler EE, Enyedi A, Thayer SA. Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca²⁺ pump activity in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2006; 98: 1646-56.
- [81] Strehler EE, Caride AJ, Filoteo AG, Xiong Y, Penniston JT, Enyedi A. Plasma membrane Ca²⁺ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1099: 226-36.
- [82] Zacharias DA, Strehler EE. Change in plasma membrane Ca²⁺-ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca²⁺. *Curr Biol* 1996; 6: 1642-52.
- [83] Kip SN, Gray NW, Burette A, Canbay A, Weinberg RJ, Strehler EE. Changes in the expression of plasma membranes calcium extrusion systems during the maturation of hippocampal neurons. *Hippocampus* 2006; 16: 20-34.

Received: May 14, 2009

Revised: December 01, 2009

Accepted: January 06, 2010

© Bravo-Martínez et al.; Licensee *Bentham Open*.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.



Corporate

Products

Resources

search...

GO ▶

[Technical Resources](#) > [Publications](#) > [Article](#)

Focus: Amplification

Detecting PMCA Transcripts in Single Hippocampal Neurons

Single hippocampal neurons from rats were amplified using the AccessQuick™ RT-PCR System to examine transcript expression from PMCA splice variants. The sensitivity of the single-cell RT-PCR allowed detection of low-level transcripts using ethidium bromide-stained agarose gels.

Blanca Delgado-Coello, Jorge Bravo-Martínez and Jaime Mas-Oliva

Department of Biochemistry, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México

Introduction

The hippocampus is a complex structure that is more sensitive to epileptogenic stimuli than other regions in the brain. When these cells become epileptic, they show an altered electrical activity and disturbed Ca_{2+} homeostasis over the short and long term (1). Since the plasma membrane Ca_{2+} -ATPase (PMCA) is an efficient protein that extrudes Ca_{2+} in eukaryotic cells, our interest has been to examine the expression of PMCA transcripts in neurons derived from the hippocampus. Since the level of PMCA is strictly regulated in excitable cells, the more than 20 isoforms produced by alternative splicing in four encoding genes acquires relevance (2). Single-cell RT-PCR is a sensitive technique that has been used to detect transcripts. Nevertheless, it involves methodological risks such as the possibility of contamination or the necessity to perform nested PCRs. Here, through an interdisciplinary approach involving electrophysiological and molecular biology techniques (3), we have taken advantage of the high sensitivity AccessQuick™ RT-PCR System (Cat.# A1703) to work at the zeptomolar level, avoiding collateral problems. We analyzed PMCA transcripts generally considered to have a poor level of expression in single hippocampal cells from the CA1 region, while GAPDH was used as a housekeeping gene.

Materials and Methods

Male Wistar rats 20–25 days old were used and brain slices were obtained in an appropriate artificial cerebrospinal fluid. Single hippocampal cells were visualized by infrared differential interference contrast (DIC) video microscopy and harvested using the whole-cell configuration (Figure 1). This methodology permits first, documenting the individual electrophysiological recording and second, isolating a single cell by only applying negative pressure to the microelectrode. Normal hippocampal cells were collected in the presence of RNasin® Plus RNase Inhibitor (Cat.# N2611), frozen in liquid nitrogen and kept at $-70^{\circ}C$ until further use.

Find more articles at the [Technical Publications Portal](#)

Subscribe and Share

[Sign up for email updates](#)[Subscribe to RSS updates](#) 

LabFact

Ethidium bromide can detect as little as 5ng of RNA in a band. Reference: Brown, T.A. (1998) In: Molecular Biology LABFAX II: Gene Analysis. 2nd ed. Academic Press, p. 101.

Technical Literature

[AccessQuick™ RT-PCR System Product Information](#)[Protocols and Applications Guide: Nucleic Acid Amplification](#)

Related Articles

[AccessQuick™ RT-PCR System: Simple, Stable and Sensitive](#)

Tools

[Amplification Product Selector](#)[T_m \(Melting Temperature\) Calculations for Oligos](#)[PCR Animation](#)

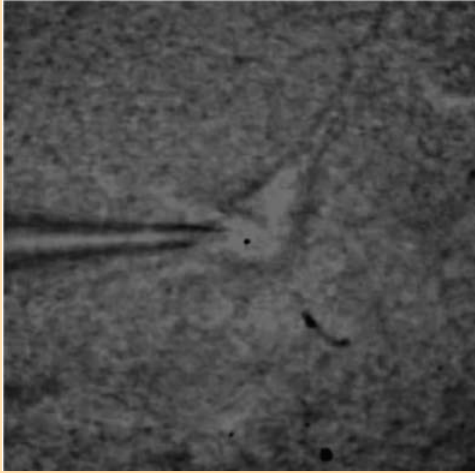


Figure 1. Single cell from the CA1 region of hippocampus visualized under a DIC infrared microscope using a whole-cell configuration.

One-step RT-PCRs were carried out in a final volume of 50 μ l following the [AccessQuick™ RT-PCR System Product Information](#) in an RNase-free environment. Each reaction contained 0.1 μ M of primers for each of the PMCA transcripts amplified.

For reverse transcription, samples were incubated at 45°C for 45 minutes. PCR conditions were as follows: 94°C for 2 minutes, followed by 45 cycles at 94°C for 15 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute. PCR was concluded with a final extension step at 72°C for 5 minutes, and the amplified samples were chilled at 4°C. Twenty-five microliters of each reaction was loaded on 4% ethidium bromide-stained gels, and analyzed in a laser scanner. Amplicons were sequenced to confirm their identity.

Results

Our data clearly show the presence of several PMCA transcripts edited at site A encoded by genes 1 (PMCA1A), 2 (PMCA2A), and 3 (PMCA3A), or at site C (PMCA1C) employing single hippocampal cells (Figure 2, Panel B). The presence of nonspecific amplicons in the PMCA3A reaction may require more stringent PCR conditions.

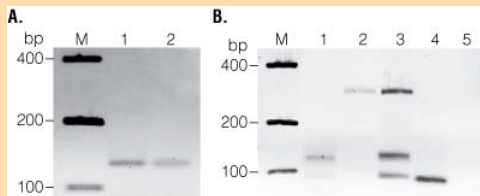


Figure 2. Representative agarose gels showing transcripts detected with the AccessQuick™ RT-PCR System.

Panel A. GAPDH transcripts (125bp) amplified from two hippocampal cells (lane 1) or only one cell (lane 2). Lane M, . **Panel B.** PMCA transcripts expressed in independent single hippocampal cells. Lane M, ; lane 1, 120bp PMCA1A; lane 2, 300bp PMCA2A; lane 3, 300bp PMCA3A; lane 4, 66bp PMCA1C; lane 5, control omitting reverse transcriptase.

Conclusion

This study provides a new application for the AccessQuick™ RT-PCR System that requires only one step to overcome the typical methodological problems involved in single-cell RT-PCR techniques. Therefore, this system provides the possibility to analyze products from single cells on stained gels.

Acknowledgement

This work was supported by CONACyT (Grant 47333/A-1) and DGAPA-UNAM (Grant IN228607/20) awarded to J. M-O.

References

1. DeLorenzo, R.J., Sun, D.A. and Deshpande, L.S. (2005) Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: The calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol. Ther.* **105**, 229–66.
2. Strehler, E.E. et al. (2007) Plasma membrane Ca²⁺-ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1099**, 226–36.
3. Sucher, N.J. et al. (2000) Genes and channels: Patch/voltage-clamp analysis and single-cell RT-PCR. *Cell Tissue Res.* **302**, 295–307.

How to Cite This Article

Scientific Style and Format, 7th edition, 2006

Delgado-Coello, B, Bravo-Martínez, J and Mas-Oliva, J. Detection of PMCA Transcripts in Single Hippocampal Neurons. [Internet] 2009. [cited: year, month, date]; 1, tpub_010. Available from: http://www.promega.com/pubs/tpub_010.htm

American Medical Association, Manual of Style, 10th edition, 2007

Delgado-Coello, B, Bravo-Martínez, J and Mas-Oliva, J. Detection of PMCA Transcripts in Single Hippocampal Neurons. Promega Corporation Web site. http://www.promega.com/pubs/tpub_010.htm Updated August 2009. Accessed Month Day, Year.

RNasin is a registered trademark of Promega Corporation. AccessQuick is a trademark of Promega Corporation.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our web site for [more information](#).

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.

En la literatura se han descrito ampliamente los cambios en la homeostasis del calcio observados en células epileptiformes a corto y largo plazo consistentes en aumento en los niveles de calcio citoplasmático. En las células excitables, el intercambiador sodio/calcio, junto con la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) desempeñan un papel importante en el control de los niveles de calcio. La participación en particular de PMCA se ha estudiado en períodos cercanos al estímulo epileptogénico aunque su papel no es bien conocido. El objetivo de esta tesis es investigar si la expresión de PMCA se altera de alguna forma en los estadios crónicos de la epilepsia. Mediante un enfoque interdisciplinario utilizando registros de célula completa y RT-PCR cuantitativa demostramos consistentemente en la fase crónica, cambios en las propiedades eléctricas tales como frecuencia de espigas, potencial de reposo de membrana y cambios en las propiedades pasivas de membrana. Una vez demostrada la excitabilidad alterada de las células epilépticas, se estudiaron los transcritos de PMCA en las mismas células. Se encontró que los transcritos de la isoforma PMCA1 aumentaron significativamente un mes posterior al estímulo epileptogénico dado por pilocarpina. PMCA3 que es una isoforma relevante en tejidos excitables, disminuyó significativamente. La isoforma PMCA4 no mostró cambios importantes. Estos hallazgos sugieren que en el largo plazo, PMCA1 que es una isoforma lenta, tiene relevancia en el re-establecimiento de un equilibrio nuevo en el control de calcio en las células epilépticas. En conjunto, este fenómeno sugiere que en los desórdenes convulsivantes ocurren cambios en el balance de isoformas que mantienen la homeostasis neuronal de calcio y que son fundamentales para la sobrevivencia de las células.