

Regulação negativa de Calbindina-D28k durante o envelhecimento neural animal

Downregulation of Calbindin-D28k during animal neural aging

Regulación a la baja de Calbindin-D28k durante el envejecimiento neuronal animal

Jean Carlos Souza Silva¹, Antônio William do Nascimento Fernandes²,
 Maria Jussara Medeiros Nunes³, Paulo Leonardo Araújo de Góis
 Morais⁴, Ivana Alice Teixeira Fonseca⁵, Rovena Clara Galvão Januário
 Engelberth⁶, José Rodolfo Lopes de Paiva Cavalcanti⁷,
 Dayane Pessoa de Araújo⁸

1.Biólogo, Mestre em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira da Fisiologia, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-8344-5512>

2.Enfermeiro, Especialista em Enfermagem do Trabalho, Sociedade Brasileira da Fisiologia, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0001-7925-4887>

3.Enfermeira, Especialista em Urgência e Emergência, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-3324-0081>

4.Biólogo, Doutor em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-9162-2280>

5.Educadora física, Doutora em Ciências do Esporte, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-4757-914X>

6.Bióloga, Doutora em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-5232-5275>

7.Enfermeiro, Doutor em Psicobiologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-1554-3249>

8.Enfermeira, Doutora em Farmacologia, Faculdade de Enfermagem, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN, Brasil. <https://orcid.org/0000-0002-2366-4024>

Resumo

Introdução. A regulação nos níveis de cálcio (Ca^{2+}) em neurônios é fundamental para a sinalização celular, transmissão sináptica e homeostase neuronal. A calbindina-D28k (CB) é uma proteína de ligação ao cálcio composta por seis domínios EF-hands, quatro das quais podem se ligar ao Ca^{2+} com alta afinidade molecular e regular os seus níveis intracelulares. O estudo é centrado em investigar o padrão de expressão de CB como um fator de neuroproteção durante o envelhecimento animal. **Objetivo.** Construir uma análise crítica de resultados de diferentes estudos originais com o objetivo de responder à pergunta: os níveis de Calbindina-D28k podem sofrer modificações durante a senescência animal? Além de uma discussão aprofundada sobre a temática atual. **Método.** A estratégia de busca dos dados utilizados contou com estudos obtidos por meio das bases de dados: *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE/PubMed), *Science Direct* e *Web of science*. 57 artigos foram analisados. **Resultados.** As bases de dados apontaram para poucos estudos envolvendo a quantificação da proteína em neurônios humanos e estudos pós-morte, mas com base robusta em experimentos animais e *in vitro*. Os achados mostram que animais idosos têm expressão reduzida de CB. Os níveis CB relacionam-se com a neuroproteção em modelos animais. **Conclusão.** Diante dos achados, os dados sugerem que a regulação negativa de CB pode estar relacionada ao envelhecimento. As informações levantadas aqui podem ser utilizadas em estudos futuros sobre a patogênese de doenças que envolvam a neurodegeneração e expressão de proteínas ligantes de cálcio, mais especificamente a Calbindina-D28k. **Unitermos.** Calbindina-D28k; Neuroproteção; Proteínas ligantes de cálcio; Envelhecimento

Abstract

Introduction. Regulation of calcium (Ca^{2+}) levels in neurons is critical for cell signaling, synaptic transmission and neuronal homeostasis. Calbindin-D28k (CB) is a calcium-binding protein composed of six EF-hands domains, four of which can bind Ca^{2+} with high molecular affinity and regulate its intracellular levels. The study is focused on investigating the pattern of CB expression as a neuroprotective factor during animal aging. **Objective.** To construct a critical analysis of results from different original studies to answer the question: can Calbindin-D28k levels change during animal senescence? In addition to an in-depth discussion on the current topic. **Method.** The data search strategy used included studies obtained through the following databases: Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE/PubMed), Science Direct and Web of science. 57 articles were analyzed. **Results.** The databases pointed to few studies involving protein quantification in human neurons and postmortem studies, but with a robust basis in animal experiments and in vitro. The findings show that aged animals have reduced expression of CB. CB levels are related to neuroprotection in animal models. **Conclusion.** In view of the findings, the data suggest that the downregulation of CB may be related to aging. The information gathered here can be used in future studies on the pathogenesis of diseases involving neurodegeneration and expression of calcium-binding proteins, more specifically Calbindin-D28k.

Keywords. Calbindin-D28k; Neuroprotection; Calcium-binding proteins; Aging

Resumen

Introducción. La regulación de los niveles de calcio (Ca^{2+}) en las neuronas es fundamental para la señalización celular, la transmisión sináptica y la homeostasis neuronal. Calbindin-D28k (CB) es una proteína de unión a calcio compuesta por seis dominios EF-hands, cuatro de los cuales pueden unirse a Ca^{2+} con alta afinidad molecular y regular sus niveles intracelulares. El estudio se centra en investigar el patrón de expresión de CB como factor neuroprotector durante el envejecimiento animal. **Objetivo.** Construir un análisis crítico de los resultados de diferentes estudios originales para responder a la pregunta: ¿pueden cambiar los niveles de Calbindin-D28k durante la senescencia animal? Además de una discusión en profundidad sobre el tema actual. **Método.** La estrategia de búsqueda de datos utilizada incluyó estudios obtenidos a través de las siguientes bases de datos: Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE/PubMed), Science Direct y Web of Science. Se analizaron 57 artículos. **Resultados.** Las bases de datos señalaron pocos estudios relacionados con la cuantificación de proteínas en neuronas humanas y estudios post mortem, pero con una base sólida en experimentos con animales e in vitro. Los hallazgos muestran que los animales de edad avanzada tienen una expresión reducida de CB. Los niveles de CB están relacionados con la neuroprotección en modelos animales. **Conclusión.** En vista de los hallazgos, los datos sugieren que la regulación a la baja de CB puede estar relacionada con el envejecimiento. La información recopilada aquí se puede utilizar en futuros estudios sobre la patogénesis de enfermedades que involucran la neurodegeneración y la expresión de proteínas de unión a calcio, más específicamente Calbindin-D28k.

Palabras clave. Calbindin-D28k; Neuroprotección; Proteínas ligantes de cálcio; Envejecimiento

Trabalho realizado na Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN, Brasil.

Conflito de interesse: não

Recebido em: 11/01/2022

Aceito em: 09/06/2022

Endereço de correspondência: Dayane Pessoa de Araújo. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Faculdade de Enfermagem. Rua Desembargador Dionísio Filgueira. Centro. CEP 59610090. Mossoró-RN, Brasil. E-mail: dayanepessoa@uern.br

INTRODUÇÃO

O cálcio, como um segundo mensageiro, transporta sinais por toda a célula nervosa como uma reação à despolarização da membrana. Portanto, ele está transferindo

informações sobre o status da atividade neuronal tanto localmente, por exemplo, em uma coluna dendrítica ou um pequeno segmento dendrítico, quanto dentro do neurônio, por exemplo, para aumentar o metabolismo energético^{1,2}. Mudanças nos níveis de Ca²⁺ são frequentemente restritas a regiões específicas do citosol, permitindo que diferentes processos (como exocitose de uma vesícula secretora) aconteçam localmente, sem afetar outros processos em outras partes da célula¹. Uma função crucial do cálcio é regular a sinalização dependente da atividade. Por mecanismos de *feed-back* e *feed-forward*, a sinalização de cálcio reforça conexões sinápticas relevantes, elimina conexões desnecessárias e evita a super excitação, pois controla a excitabilidade neuronal^{1,2}.

A liberação de neurotransmissores está intimamente relacionada às oscilações nos níveis de cálcio intracelular. A densidade do canal de íons de cálcio é alta em zonas ativas nos terminais pré-sinápticos, opostos aos receptores pós-sinápticos. Os íons de cálcio não se difundem longe de seu local de entrada porque são imediatamente tamponados por proteínas de ligação ao cálcio²⁻⁵. Portanto, o influxo de cálcio gera um aumento local na concentração de cálcio no local das zonas ativas. Em todas as sinapses, a liberação do neurotransmissor tem uma correlação não linear com o influxo de Ca²⁺, o que significa que um aumento de duas vezes nos níveis de Ca²⁺ pode produzir um aumento de 16 vezes na quantidade de neurotransmissor liberado[5,6]. Ao ajustar os níveis de cálcio no terminal pré-sináptico, ao longo

da duração do potencial de ação, a liberação do neurotransmissor também é regulada, portanto a transmissão sináptica também é afetada^{1,6}. Estudos mostram que quase todos os adultos mais velhos apresentam algum grau de doença de Alzheimer e outras patologias cerebrais, porém a extensão em que essas patologias contribuem para o comprometimento motor varia significativamente de pessoa para pessoa^{7,8}. Isso sugere que outros fatores, como estilos de vida ou proteínas, podem compensar os efeitos negativos das patologias cerebrais por meio de outras vias moleculares.

A concentração citosólica de Ca^{2+} pode aumentar transitoriamente em 10–100 vezes, devido à liberação induzida por sinal do retículo endoplasmático ou influxo do meio extracelular pelos canais de cálcio. A súbita mudança citosólica no nível de cálcio é detectada por certas proteínas de ligação ao Ca^{2+} . Estas proteínas de ligação ao cálcio regulam a concentração do Ca^{2+} , mas também são regulados pela quantidade intracelular de cálcio. A concentração de cálcio citosólico livre em uma célula em repouso é baixa devido à captação para o retículo endoplasmático e/ou transporte contínuo para fora da célula, orquestrado por bombas movidas a ATP. Complementando esses principais mecanismos de entrada e saída, quando os tampões de cálcio ficam carregados com cálcio, eles servem como agentes de ajuste fino das propriedades espaciais e temporais dos sinais de cálcio. Essas proteínas influenciam a amplitude e o tempo de recuperação dos transientes de

cálcio⁹. Além disso, os PLCs possivelmente direta ou indiretamente facilitam a sensibilização ou dessensibilização dos canais de cálcio e podem cortar a entrada adicional de cálcio na célula¹⁰.

As proteínas de ligação ao Ca²⁺ são um grupo heterogêneo e extenso de proteínas¹¹, que estão envolvidos em muitas funções celulares e extracelulares, desde a homeostase do cálcio até as vias de sinalização do cálcio^{1,12}. O sinal de cálcio é deflagrado por vários motivos proteicos de ligação de cálcio. Eles estão presentes no tampão de cálcio especializado e nas proteínas sensoras de cálcio que acoplam as mudanças na concentração de cálcio a uma ampla variedade de funções, dependendo de sua disposição e fonte de cálcio¹³. Apesar do fato de terem várias estruturas e propriedades, eles se ligam seletiva e reversivelmente ao cálcio em domínios específicos, a cinética dessa interação frequentemente sendo muito rápida^{1,14}.

A Figura 1 elucida as principais vias de sinalização celular que provocam influxo de Ca²⁺ na célula e os receptores descritos em literatura¹⁵. Há um grande número de receptores [GPCRs (receptores acoplados à proteína G) e PTCKRs (receptores ligados à proteína tirosina quinase)] que são acoplados a diferentes isoformas de PLC (fosfolipase C) que geram o segundo mensageiro mobilizador de Ca²⁺, o inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3)^{15,16}.

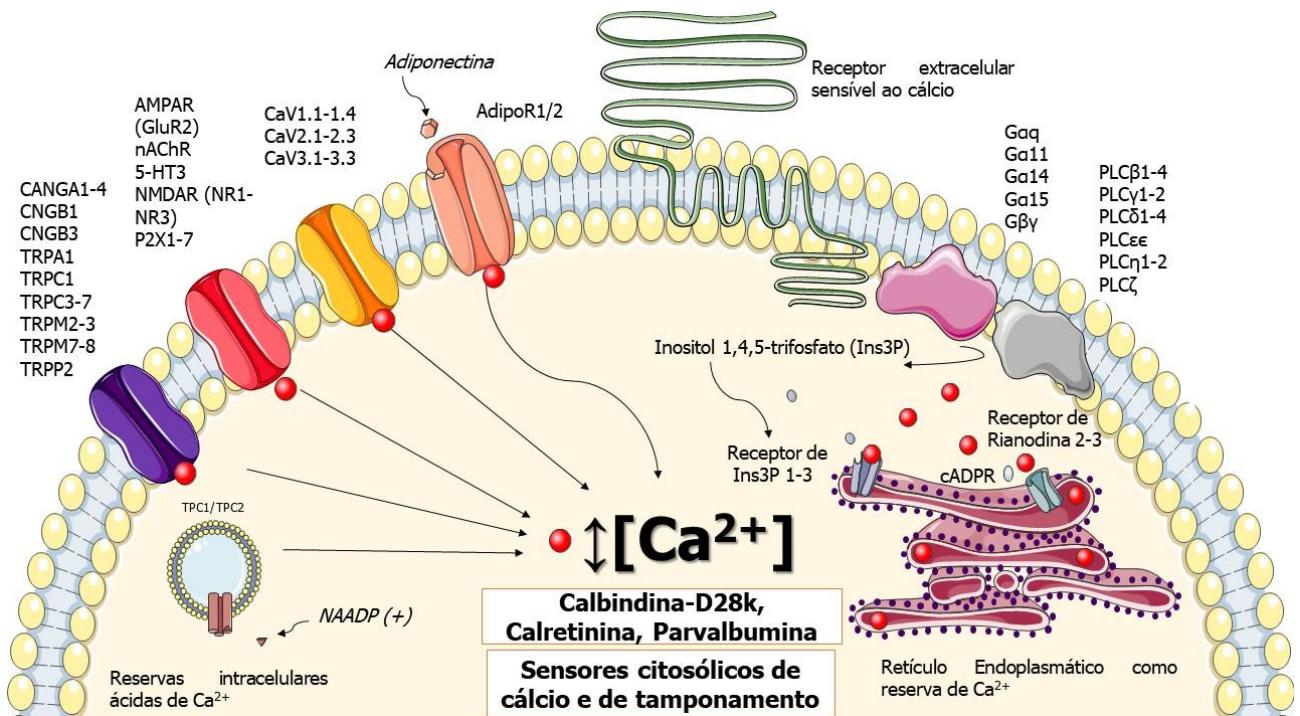


Figura 1. Modelo esquemático da sinalização celular mediada por cálcio e a participação das PLCs (Calbindina-D28k, Calretinina e Parvalbumina) como sensores citosólicos e de tamponamento do íon. Os principais receptores capazes de modular o influxo de Ca^{2+} na célula estão abreviados. Abreviaturas: AC - adenilato ciclase; AdipoR - receptor de adiponectina; AMPAR - receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico; CaBP - proteína de ligação ao Ca^{2+} ; cADPR - cADP-ribose; CaM - calmodulina; CNGA - canal α controlado por nucleotídeos cíclicos; CNGB - canal β controlado por nucleotídeos cíclicos; DUOX - dupla oxidase; GCAP - proteína ativadora da guanilato ciclase; GPCR - receptor acoplado à proteína G; 5-HT3 - canal 3 de serotonina; IP3 - InsP3; P2X - receptor purinérgico P2X; TRPA - canal TRP de anquirina; TRPC - canal TRP canônico; TRPM - canal TRP da melastatina; TRPML - canal TRP de mucolipina; TRPP - canal TRP de policistina; TRPV - canal TRP vanilóide; Adaptado de Berridge MJ (2012) Cell Signaling Biology; doi:10.1042/csb0001002. © 2012¹⁶.

A Figura 2 resume a regulação e tamponamento do Ca^{2+} no interior da célula é responsável por regular uma série de eventos celulares. As células expressam um grande número de proteínas de ligação ao Ca^{2+} que funcionam como tampões no citoplasma [PV (parvalbumina), CB (calbindina D-28k) e calretinina]. As propriedades espaciais e temporais dos sinais de Ca^{2+} são moldadas por sua rápida ligação aos tampões citosólicos^{9,15,16}.

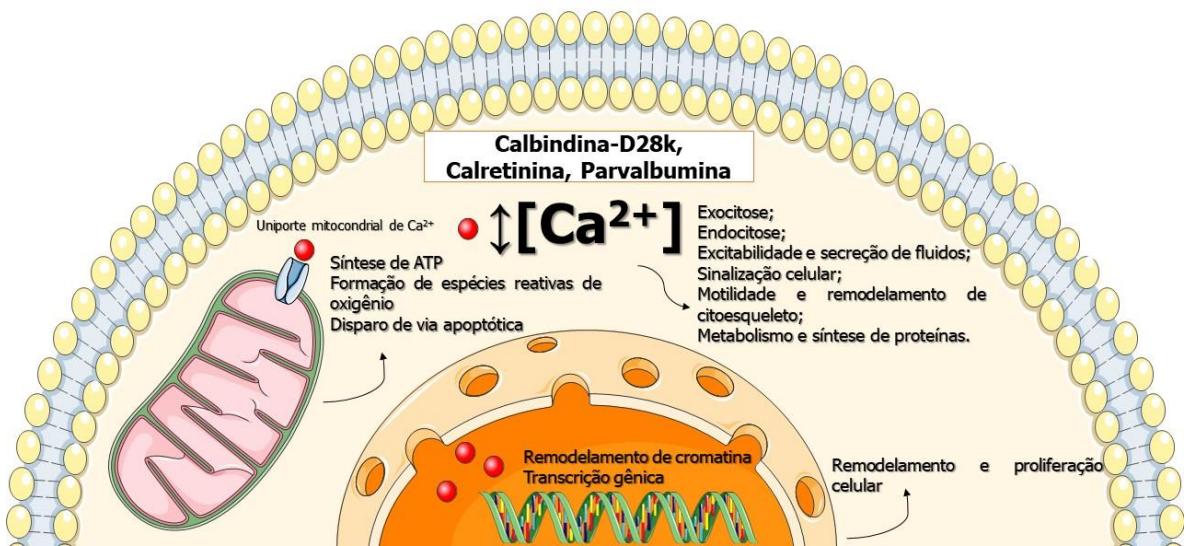


Figura 2. Mecanismos celulares controlados pela regulação dos níveis intracelulares de cálcio. Adaptado de Berridge, MJ (2012) Cell Signaling Biology; doi:10.1042/csb0001002. © 2012¹⁶

Na senilidade, o meio celular do cérebro exibe sinais reveladores de comprometimento bioenergético neuronal, neuroplasticidade prejudicada, atividade da rede neuronal desregulada, desequilíbrio homeostático dos níveis de Ca^{2+} neuronal, o acúmulo de moléculas e organelas alteradas por oxidação e processos inflamatórios¹⁷. Estas modificações celulares e moleculares no parênquima cerebral tornam o cérebro em envelhecimento vulnerável aos danos da senilidade e aumento da predisposição às doenças de Alzheimer e Parkinson, além de derrames.

Proteínas estruturais e efetoras (por exemplo, sinalização, enzimas) são as bases físicas das redes neurais que ligam os fatores de risco ao declínio motor. As patologias neurodegenerativas estão associadas a proteínas mal dobradas ou ativadas de forma anormal que conduzem aos

efeitos negativos de acumulação de patologias cerebrais na função motora¹⁸. Outras proteínas não identificadas, não relacionadas à presença de patologias cerebrais, também contribuem para o declínio motor. Identificar essas últimas proteínas é crucial, pois podem fornecer resistência motora, ou seja, compensar os efeitos negativos do acúmulo de patologias cerebrais que contribuem para o declínio motor. A resistência pode ser um alvo terapêutico de alto valor que poderia compensar os efeitos motores de muitas combinações de patologias cerebrais, quase todas atualmente intratáveis^{18,19}.

A desregulação da homeostase do cálcio intracelular tem sido associada a sintomas neuropatológicos observados na senilidade. Alterações na distribuição e frequência relativa das proteínas de ligação ao cálcio (PLCs) como a CB, que são importantes na regulação dos níveis de cálcio intracelular, podem contribuir para a interrupção da homeostase do cálcio²⁰.

A CB foi mostrada pela primeira vez no intestino de pássaros e, em seguida, encontrada no rim de mamíferos. Também é expressa em várias células neuronais e endócrinas²¹.

Calbindina-D28K é uma proteína de 28 kDa tem uma estrutura primária de 261 aminoácidos (massa molecular de 28kDa) e é codificado pelo gene CALB1. Contém 4 domínios ativos de ligação ao cálcio e 2 domínios modificados que perderam sua capacidade de ligação ao cálcio²¹. Atua como um tampão de cálcio e sensor de cálcio e pode conter quatro

Ca^{2+} nas mãos EF dos loops EF1, EF3, EF4 e EF5²¹. CB pertence a uma superfamília de proteínas de ligação de cálcio que inclui calmodulina e troponina C. Todas essas proteínas têm um alto conteúdo em hélice a e compartilham estruturas de mão de EF que constituem os domínios de ligação de cálcio²¹. Ela é conhecida por interagir com a caspase-3 e inibir a apoptose. Suas propriedades antiapoptóticas foram demonstradas em células neuronais, osteócitos, osteoblastos e linfócitos. Quando a apoptose é iniciada, as concentrações de Ca^{2+} dentro da célula aumentam e uma diminuição na apoptose é observada. CB também inibe a degradação de substratos de caspase-3 sintéticos e naturais, enquanto outras proteínas de ligação a Ca^{2+} não²¹.

Os indícios apontam que a CB fornece uma importante linha de defesa inicial por meio de sua capacidade de controlar a dinâmica de fluxo do cálcio intracelular, e consequentemente, a homeostase celular nervosa. Mapear as alterações citoarquitetônicas de neurônios imunorreativos às proteínas ligantes de cálcio pode fornecer uma base sólida de possíveis desbalanços do cálcio neuronal na senescência. Objetivamos a busca de dados correlacionais da expressão de Calbindina-D28k ao processo de envelhecimento ainda são escassos nas bases de dados científicos. Sendo assim, investigações desta natureza podem servir de base para intervenções farmacológicas direcionadas aos fatores que resultam no declínio cognitivo e motor.

O objetivo desse trabalho foi levantar dados atualizados de correlatos experimentais de alterações morfológicas

dos níveis de Calbindina-D28k, em modelos animais, *in vitro* e *in vivo*, relacionados ao envelhecimento neuronal e citoproteção nervosa.

MÉTODO

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade do Estado do Rio Grande do Norte - UERN, campus Mossoró-RN. A estratégia de busca de dados utilizada contou com estudos obtidos por meio das seguintes bases de dados: *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE/PubMed), *Science Direct* e *Web of science*. Para cada fonte de dados utilizou-se os filtros: título, assunto e tipo.

Os termos utilizados na busca dos artigos são padronizados pelo *Medical Subject Heading* (MeSH) e os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS). O descritor Calbindin-D28k foi combinado utilizando o operador booleano AND com os descritores: *Aging*, *Neurological* e *Brain* e seus correspondentes respectivos nas línguas portuguesa e inglesa. Foi feito o fichamento com alguns elementos considerados básicos: questão/problema de investigação, objetivos, procedimentos metodológicos de coleta e análise de dados e principais resultados.

A questão norteadora do estudo foi: “Os níveis e a expressão de Calbindina-D28K podem se alterar ao longo do envelhecimento neuronal?”. Utilizamos material dos últimos 20 anos. Ressalta-se que foram excluídos os artigos com as limitações metodológicas pobemente documentadas,

descrição inadequada dos fatores de conclusão e das características da amostra, ausência de análise ajustada para fatores de conclusão e tipo de estudo: revisão, resenha e artigos não disponíveis na íntegra, editorial, nota ao editor, revisão sistemática, revisão de literatura, trabalhos do tipo meta análise. Ademais todos os artigos encontrados e disponíveis que se enquadram no presente estudo foram analisados. Como critérios de inclusão têm-se os trabalhos disponíveis na íntegra nas fontes de dados selecionados. Trabalhos em todas as línguas foram analisados.

A avaliação da elegibilidade dos estudos efetivou-se através da pergunta e o tipo de estudo, dividida em três etapas: I. Leitura do título (145 trabalhos selecionados); II. Leitura dos resumos (103 trabalhos tiveram seus resumos analisados); III. Leitura dos trabalhos completos (57 estudos foram elegíveis para leitura completa). Os achados referentes aos trabalhos estão listados nas referências de 22 a 78.

Todos os materiais coletados estão sob a guarda dos pesquisadores e foram armazenados sob a forma de arquivos digitais em nuvem de armazenamento compartilhado exclusivamente com os pesquisadores. As informações serão armazenadas por um prazo mínimo de cinco anos, podendo ser solicitadas a qualquer momento durante esse período. Após este período serão deletadas.

RESULTADOS

Caracterização neuroquímica das proteínas ligantes de cálcio (PLCs): estrutura e função

As proteínas ligantes de cálcio (PLCs) têm sido estudadas há muito tempo, recebendo foco particular em estudos neuroquímicos devido à sua expressão diferencial no SNC. Muitas subpopulações de neurônios expressam um ou mais dessas PLCs. Os neurônios imunorreativos à CB são amplamente distribuídos de forma semelhante e incluem células de Purkinje cerebelares²²⁻²⁴. Várias subpopulações do hipocampo, incluindo células granulares do giro dentado e neurônios piramidais CA1 superficiais²⁵, bem como populações corticais^{26,27}.

O detalhamento da função fisiológica das PLCs é o foco de muitas pesquisas atuais. Os neurônios requerem a capacidade de tamponar eficientemente o cálcio, uma vez que a translocação ativa de cálcio coloca uma alta demanda metabólica na célula, e grandes quantidades de energia já são necessárias para restabelecer gradientes eletroquímicos após os potenciais de ação e liberação sináptica^{28,29}.

As PLCs também ajudam a moldar as respostas sinápticas e a excitabilidade celular dos neurônios. Assim, suas diferentes propriedades cinéticas e de tamponamento podem ser adequadas aos requisitos específicos das populações neuronais que as expressam^{12,13,27,30}.

Através do uso de camundongos *knockout*, a influência das PLCs na função neuronal foi um pouco mais delimitada. A deleção das PLCs, parvalbumina, CB ou calretinina, demonstrou ter consequências importantes para a

plasticidade sináptica^{31,32}. Camundongos com deficiência de CB alteraram a facilitação de pulso pareado e a potenciação de longo prazo nas regiões hipocampais^{31,32}. Achados como estes refletem a capacidade das PLCs de modificarem as propriedades espaciais e temporais dos transientes de cálcio que ocorrem durante a atividade sináptica. Os achados relatados por um papel neuroprotetor e funcional para a proteína CB em estender temporariamente um sinal de cálcio neuronal, permitindo a ativação de vias moleculares de sinalização intracelular dependentes de cálcio relacionadas à memória.

As PLCs parecem ter diferentes propriedades funcionais que podem ser adequadas para a excitabilidade e as características sinápticas da população neuronal na qual são expressos. No entanto, devido às suas diferentes cinéticas e capacidades de tamponamento para o cálcio, bem como seus diferentes níveis de expressão dentro da célula, isso também pode ter implicações na capacidade da célula de lidar com elevações tóxicas no cálcio intracelular²⁷.

Um estudo com transfecção de cDNAs de PLCs em células híbridas de neuroblastoma-retina N18-RE mostrou que durante citotoxicidade de Ca^{2+} induzida por L-glutamato a expressão elevada de PLC atenuou os danos causados pela toxicidade do modelo. Os autores mostraram que o "rápido" tamponamento de Ca^{2+} induzido pela CB (e também pela CR) pode proteger as células N18-RE 105 deste tipo de citotoxicidade dependente de Ca^{2+} ³³. Já em outro modelo usando a transfecção citada anteriormente, porém utilizando

células de carcinoma embrionário murino P19 indiferenciadas também mostraram que as células que expressam CR e CB foram protegidas da morte durante as primeiras 2 horas de exposição ao NMDA. Esta proteção foi, no entanto, transitória e não foi suficiente para resgatar as células P19 após estimulação prolongada³⁴.

Em modelos usando neurônios infectados usando vetor viral de herpes simplex (HSV) com cDNA para CB responderam à hipoglicemia com diminuição das concentrações de Ca^{2+} intracelular e aumento de sobrevida neuronal³⁵. Além disto, os pesquisadores também estudaram a participação desta proteína na resposta de neuroproteção à citotoxicidade induzida por glutamato e comprovaram que neste modelo, os neurônios tiveram decréscimo das concentrações intracelulares de Ca^{2+} e maior sobrevida neuronal. Quando expostos à cianeto de sódio, os neurônios não responderam estes achados neuroprotetores. O modelo de transfecção por vetores virais é apontado com potencial para a terapia gênica neuronal³⁶.

A transfecção *in vivo* com o vetor CB HSV no hipocampo aumenta a sobrevivência neuronal no giro denteadoo após a aplicação do antimetabólito 3-acetilpiridina. É relatado um significativo aumento na sobrevivência neuronal transsinápтика na área CA3 após a neurotoxicidade do ácido caínico³⁵. Os efeitos protetores da transfecção com o vetor CB em um cérebro intacto podem ser benéficos durante as mudanças na homeostase do Ca^{2+} causadas por trauma

neurológico associado ao envelhecimento e certas doenças neurológicas^{35,36}.

Assim, há muitos exemplos de estudos que apoiam e se opõem ao conceito de que a expressão de PLCs e a resistência a lesões mediadas por cálcio estão relacionadas. Isso pode refletir o fato de que parece haver mais fatores além da expressão de PLCs que determinam a suscetibilidade neuronal a processos degenerativos, como o modo de lesão e outros fatores específicos de subgrupo^{27,37}. Os neurônios são células altamente especializadas, explicando as numerosas populações de células distintas dentro de cada região do SNC, e o perfil de expressão de PLCs pode refletir apenas uma faceta personalizada de sua função³⁸. Outros aspectos importantes da biologia neuronal que podem afetar a capacidade dos PLCs de fornecer proteção contra insultos incluem sua localização dentro da célula e a regulação de sua expressão.

Estudos destacam a associação entre neurônios suscetíveis a processos degenerativos e a expressão de diferentes PLCs³⁹⁻⁴⁴. No entanto, após uma investigação mais aprofundada, a relação causal é claramente muito complexa. Em primeiro lugar, a influência da expressão de CaBP na vulnerabilidade neuronal parece depender fortemente da doença ou modelo de doença, onde a gravidade da lesão e também a via precisa de elevação do cálcio podem ser cruciais. Em segundo lugar, a população neuronal envolvida também é um fator importante, com perfis de expressão de PLCs aparentando estar bem ajustados para atender aos

requisitos funcionais específicos do tipo de célula. Existem também vários outros fatores envolvidos na determinação da suscetibilidade de determinadas populações neuronais à degeneração, incluindo, mas não se limitando a, sua conectividade de circuito, rede de suporte trófico, contribuições relativas de receptores NMDA pós-sinápticos e também seus requisitos de energia⁴⁵⁻⁵¹. Com respeito a este último, é de notar que a presença de PLCs particulares pode refletir a atividade dos neurônios em que são expressos. Por exemplo, a alta expressão de PLCs foi associada a altas taxas de influxo de cálcio e/ou liberação intracelular²⁷. No entanto, esses mesmos neurônios também podem ser os que mais correm o risco de degeneração devido às mesmas altas demandas de energia colocadas sobre eles²⁷.

Experimentos recentes levaram a uma perspectiva emergente de que algumas PLCs, além de atuarem como tampões de cálcio, também podem atuar como sensores de cálcio. Assim, já existem relatos de que a CB pode exibir propriedades adequadas para funcionar como um sensor, capaz de fazer rearranjo conformacional após a ligação do cálcio e interação potencial com proteínas envolvidas na sinalização do cálcio e demais vias celulares. Até momento, isso foi investigado principalmente *in vitro* ou em células não neuronais, mas abre a possibilidade de direcionamento terapêutico de vias de sinalização indesejáveis, como está sendo explorado outras PLCs^{27,52}.

Diante do exposto, torna-se cada vez mais evidente que os perfis de expressão de PLCs são dinâmicos durante o

desenvolvimento, envelhecimento e após doença ou lesão. Compreender os fatores que controlam a expressão de PLCs e como os neurônios a regulam em condições fisiopatológicas podem permitir o desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras, adaptadas às populações neuronais específicas em risco, aprimorando assim, a medicina de precisão.

Aspectos bioquímicos da Calbindina-D28k no Sistema Nervoso Central

O cálcio (Ca^{2+}) é um segundo mensageiro universal que regula as atividades mais importantes de todas as células eucarióticas. É de importância elementar para os neurônios pois favorece da transmissão do sinal despolarizante e contribui para a atividade sináptica². Os neurônios desenvolveram extensas e intrincadas vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} para acoplar o sinal de Ca^{2+} à sua maquinaria bioquímica de informação^{2,6}. O influxo de Ca^{2+} nos neurônios ocorre por meio de receptores de membrana plasmática e canais iônicos voltagem-dependentes. A liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, como o retículo endoplasmático, pelos canais intracelulares também contribui para a elevação do Ca^{2+} citosólico^{2,6}. Dentro da célula, Ca^{2+} é controlado pela ação tamponante das proteínas citosólicas de ligação ao Ca^{2+} e por sua captação e liberação pela mitocôndria. A captação de Ca^{2+} na matriz mitocondrial estimula o ciclo do ácido cítrico, aumentando assim a produção de ATP e a remoção de Ca^{2+} do citosol pelas bombas acionadas por ATP no retículo endoplasmático

e na membrana plasmática. Um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ na membrana plasmática também participa do controle do Ca^{2+} neuronal. A capacidade prejudicada dos neurônios em manter um nível de energia adequado pode impactar a sinalização de Ca^{2+} durante o envelhecimento e em processos de doenças neurodegenerativas^{5,6}.

Compondo a família das proteínas ligantes de Ca^{2+} juntamente com a parvalbumina, calmodulina e calretinina, a CB liga-se ao Ca^{2+} com alta afinidade molecular, sendo assim, capaz de regular os níveis intracelulares deste na célula alvo^{28,53,54}. Fisiologicamente, no intestino e nos rins, a CB funciona intracelularmente no sequestro e troca do Ca^{2+} livre. Enquanto no SNC, os neurônios CB-positivos são capazes de fazer um ajuste fino dos níveis excessivos do cálcio intracelular^{30,53}.

Em estudos envolvendo lesão e vias de morte celular, a função neuroprotetora da CB é mais evidenciada. O íon de Ca^{2+} é um elemento bioquímico fundamental na transdução de sinal em células, incluindo neurônios. Participam de uma série de eventos intraneuronais. Já foi descrita sua participação no controle da organização do citoesqueleto, mediação dos efeitos tróficos e hormonais, liberação de neurotransmissores, sinalização sináptica, transdução de sinal por receptor, metabolismo celular, controle da excitabilidade neuronal, regulação da expressão gênica e plasticidade sináptica. Em virtude de sua versatilidade o cálcio no interior neuronal, e das demais células, agem como

cavalos de força regulando de modo direto e indireto as funcionalidades vitais destes neurônios^{2,5,37,55}.

Os íons de Ca²⁺ também estão envolvidos no controle do desenvolvimento e regeneração nervosa^{37,56}. A participação efetiva do Ca²⁺ nestes processos intracelulares é criticamente dependente de uma regulação precisa das concentrações citosólicas de Ca²⁺. Os níveis normais de Ca²⁺ intracelular são aproximadamente 100 nM, 20.000 vezes mais baixos do que a concentração de 2 mM encontrada extracelularmente^{37,55}. Ao contrário de outras moléculas de segundo mensageiro, o Ca²⁺ não pode ser metabolizado. Portanto, os níveis intracelulares de Ca²⁺ são controlados por meio de outros mecanismos, como transporte através das membranas (utilizando bombas e trocadores de Ca²⁺), mobilização das reservas/estoques intracelulares (por exemplo, no retículo endoplasmático e mitocôndria) e ligação a proteínas de ligação a Ca²⁺, como por exemplo a CB^{2,6,28,37}.

A elevação transiente de cálcio citosólico e/ou mitocondrial participa de diversas vias de sinalização celular em mecanismos fisiológicos e patológicos. Aumentos significativos do cálcio por estes mecanismos contribuem para a geração do estresse oxidativo e para a morte celular. A modulação das concentrações do cálcio citosólico é capaz de regular a ativação e inativação das enzimas dependentes de Ca²⁺ (fosfolipases, proteases e nucleases)⁵⁷. A mitocôndria e o retículo endoplasmático desempenham um papel essencial na manutenção da homeostase intracelular de Ca²⁺, bem como no disparo das vias de morte celular.

Trabalhos já evidenciaram que, na indução de estímulos apoptóticos, a ativação dos processos mitocondriais pode promover a liberação de citocromo c, seguida da ativação de caspases, fragmentação nuclear e morte celular por apoptose^{57,58}.

Já foi demonstrado que a concentração de Ca²⁺ citosólico é reduzida em neurônios em cultura que sofrem morte neuronal causada por inibidores do sistema proteassoma da ubiquitina. A ativação da entrada de cálcio via canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem restaura os níveis de Ca²⁺ citosólicos e reduz essa morte neuronal⁵⁹. Mostrou-se que essa redução na concentração do cálcio intracelular é transitória e ocorre no início do processo de morte celular, antes da ativação da caspase-3. Agentes que aumentam o influxo de Ca²⁺, como ativação de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem ou estimulação de Ca²⁺ a entrada através do trocador Na/Ca²⁺ da membrana plasmática atenua a morte neuronal apenas se aplicada no início do processo de morte celular⁵⁸.

Altas concentrações intracelulares de Ca²⁺ levam não apenas à ruptura das funções celulares normais de Ca²⁺ descritas acima, mas também à superativação de proteínas de ruptura da estrutura celular que são dependentes de Ca²⁺. Assim, a ativação de proteases dependentes de Ca²⁺ podem resultar na interrupção da organização do citoesqueleto, bem como danos a outras proteínas, a ativação da fosfolipase está associada à interrupção mitocondrial, colapso de sua membrana e interrupção da síntese de ATP e ativação de

endonucleases pode resultar em clivagem da cromatina e danos ao DNA^{53,58}. Consistente com o papel do cálcio na morte celular, vários modos de degeneração neuronal, incluindo isquemia, hipoglicemias, exposição a aminoácidos excitatórios, toxicidade β-amiloide e excitação sustentada, mostraram estar associados e em parte causados por elevações acentuadas na concentração intracelular de Ca²⁺^{37,54}.

As diferentes funções da CB em neurônios ainda permanecem desconhecidas. Culturas primárias ricas em neurônios derivadas de cérebros de embriões de ratos com 16 dias de idade mostraram que ela foi expressa apenas em uma subpopulação de neurônios, estas células foram intensamente coradas. Todavia, as células astrogliais identificadas pela presença do marcador específico da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) não se demonstrou por expressar CB. Portanto, ela é um marcador útil para definir uma subpopulação neuronal em culturas primárias ricas em neurônios⁶⁰.

DISCUSSÃO

Estudos mostraram que a densidade de coloração para CB nas camadas superficiais da área visual temporal média é reduzida em comparação com áreas localizadas dorsal e ventralmente. O grupo sugere que esse fenômeno se deve principalmente a um afinamento relativo da região mais densamente marcada, perto da superfície pial do córtex, reproduzido também nas áreas pré-motoras. Além disso, as

camadas intermediárias da área visual temporal média são caracterizadas por um aumento da densidade de grandes perfis celulares corados em escuro, que correspondem a uma população celular específica, células “halo”⁶¹. O padrão cortical de distribuição neuronal laminar se assemelha ao encontrado.

Foi demonstrado que a maior densidade de neurônios imunorreativos à CB estava localizada na camada IV do córtex visual de morcegos. A maioria dos neurônios CB foi caracterizada por uma forma estrelada ou redonda/oval. Neste estudo a maioria dos neurônios CB continham ácido gama-aminobutírico (GABA). Muitos dos neurônios CB eram interneurônios GABAérgicos⁶². Evidências anteriores já sustentam que estes neurônios corticais imunorreativos à CB são predominantemente interneurônios GABAérgicos^{61,63}.

A perda de imunorreatividade encontrada relacionada a senescência da saguis é um ponto crítico para a homeostase do cálcio no córtex pré-motor, e consequentemente, para a sua funcionalidade. Outros estudos já relacionam essa redução ao processo de senescência animal. Também foi demonstrado que no cerebelo de hamster idosos (19 a 24 meses) os transcritos de CB mostraram redução de cerca de 50% a 68% em comparação aos animais jovens (4 meses) e adultos (9 meses)⁶⁴. Além disso, a pesquisa também mostrou a diminuição na expressão do gene da CB, durante a senescência, também no hipocampo (redução de aproximadamente 60%) e corpo estriado (aproximadamente 25%). Estas evidências levantam a possibilidade de que a

expressão de CB do SNC pode ser regulada negativamente durante a senescência. A diminuição estatisticamente significativa do mRNA de CB no processo normal de senescência fornece suporte adicional para a hipótese de que esta proteína de ligação ao cálcio pode ter um papel importante na degeneração neuronal⁶⁵.

Mudanças opostas na expressão das proteínas ligadoras de cálcio também já foram mostradas nos núcleos hipotalâmicos envolvidos na regulação metabólica e sexual durante a senescência⁶⁶.

Sabe-se que mudanças relacionadas à idade nos níveis dos principais tampões de cálcio intracelular ocorrem em diferentes partes do cérebro dos mamíferos, incluindo a via auditiva central. As mudanças observadas relacionadas à idade nos sistemas de expressão da CB podem contribuir significativamente para a deterioração da função auditiva conhecida como presbiacusia central. Um estudo que mapeou alterações na expressão de CB feitos por técnicas de imuno-histoquímica e *western blot* nas estruturas superiores da via auditiva central, no colículo inferior (CI), corpo geniculado medial (CGM) e córtex auditivo (CA) de duas linhagens de ratos, *Long-Evans* de envelhecimento lento e *Fischer 344* de envelhecimento rápido. Independentemente da linhagem do rato, o envelhecimento reduz o número de neurônios imunorreativos à CB acompanhado de uma redução relacionada à idade nos volumes médios de somas neuronais imunorreativos à CB. Além disso, os dados também revelaram um declínio pronunciado relacionado à

idade nos níveis de CB em ambas as cepas ao longo todas as regiões do cérebro examinada⁶⁷.

Regiões macroscópicas do cérebro do rato em envelhecimento exibiram diminuições específicas e significativas (60-80%) no RNAm da CB e nos níveis de proteína no cerebelo, corpo estriado e região do tronco cerebral. Áreas discretas do cérebro humano em envelhecimento também exibem diminuições significantes (50-88%) na proteína CB e seu RNAm no cerebelo, corpo estriado e núcleo basal, mas não no neocôrte, hipocampo, amígdala, *locus ceruleus* ou núcleo rafe dorsal. Neste mesmo estudo, a comparação do tecido cerebral humano doente com controles pareados por idade e sexo rendeu diminuições significativas (60-88%) na proteína CB e RNAm na substância negra (doença de Parkinson), no corpo estriado (doença de Huntington), no núcleo basal (Doença de Alzheimer), e no hipocampo e núcleo da rafe dorsal (doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer), mas não no cerebelo, neocôrte, amígdala ou *locus ceruleus*. Uma vez que a expressão do gene da CB diminuiu especificamente em áreas do cérebro conhecidas por serem particularmente afetadas na senescência (e nas doenças neurodegenerativas citadas), pode-se concluir que a diminuição da expressão do gene da CB pode levar a uma falha no tamponamento do cálcio ou homeostase do cálcio intraneuronal⁶⁸.

Estudos analisando a expressão de CB no córte somatossensorial de camundongos, ratos e gerbils (1, 6 e 24 meses) usando imuno-histoquímica e *western blotting*

observam-se diferenças associadas à idade na expressão de CB. O número de neurônios imunorreativos CB foi consideravelmente maior nas camadas II e III em comparação com as outras camadas, e as alterações associadas à idade no número total de neurônios foram diferentes entre as espécies. Em camundongos, os maiores números neuronais foram observados no grupo adulto e os menores no grupo idoso. Nos ratos, os maiores números de neurônios foram observados no grupo jovem e os menores no grupo idoso, e nos gerbils, os adultos exibiram os maiores números de neurônios e os jovens os menores⁶⁹. A pesquisa indicou que os interneurônios imunorreativos CB no córtex somatossensorial de roedores podem ser afetados pela idade, e seus números no córtex somatossensorial idoso são diminuídos quando comparados aos do adulto. O padrão de mudança associado à idade foi semelhante entre as três espécies, com seu número total sendo aumentado nos animais adultos e diminuído nos animais idosos. Os achados descritos por Ahn *et al* (2017)⁶⁸ seguem os dados mostrados aqui comprovando que em outras espécies, áreas corticais podem sofrer quedas significativas da expressão de CB. Indiretamente sugerimos que o metabolismo neuronal de Ca²⁺ pode estar alterado nestas áreas durante a senescênci animal. A fim de comprovar isto, indicamos a análise da expressão de demais PLCs como ação compensatória de “*up regulation*” para compensar os declínios na expressão de CB.

O NO modula as atividades de vários canais e receptores para participar da regulação dos níveis neuronais

intracelulares de Ca²⁺. A expressão de CB também pode ser alterada pelo NO⁷⁰. Em uma análise detalhada sobre a expressão de CB em camundongos no caute para a sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS -/-), foi observado que com o uso de imuno-histoquímica a expressão de CB é especificamente alterada no córtex cerebral e região hipocampal de camundongos nNOS -/- e que sua expressão muda de acordo com o tipo neuronal⁷⁰.

Parece que o NO pode estar envolvido em várias funções, como a modulação da homeostase neuronal de Ca²⁺, a regulação da transmissão sináptica e a neuroproteção, influenciando a expressão de PLCs⁷⁰. No entanto, os mecanismos exatos dessa regulamentação e seu significado funcional requerem uma investigação mais aprofundada, com ênfase nas alterações resultantes da senescência.

Achados sugerem que a quantidade de neurônios positivos para CB exibiu uma tendência consistente em direção a uma diminuição em 17 áreas corticais no grupo de indivíduos idosos em comparação com os jovens em um estudo relacionando a expressão de CB no córtex cerebral de humanos⁷¹. Foi atingida uma significância estatística no córtex de associação visual, giro cingulado posterior, córtex visual primário e giro parahipocampal, das áreas corticais analisadas apenas estas apresentaram perda estatisticamente significativa de CB variando entre 20,9 e 45,4%. Estas evidências deste estudo apontou uma tendência consistente para a perda relacionada à idade de

neurônios positivos para CB em todo o córtex cerebral humano⁷¹. A depleção de CB relacionada à idade provavelmente priva os neurônios da capacidade de tamponar o cálcio intracelular e, portanto, os deixa vulneráveis a processos patológicos que podem causar aumento do cálcio intracelular e levar à sua degeneração.

Enquanto isso, em relação a demências da senilidade, a atenuação da imunorreatividade à CB se relaciona a diversas doenças relacionadas ao avançar da idade. Já foi mostrado que os neurônios contendo CB no prosencéfalo basal morrem gradualmente durante a senescência, e esse processo é acelerado em indivíduos com doença de Alzheimer^{72,73}. Estes neurônios sofrem uma perda substancial de CB no curso da senescência, ocorre também uma perda adicional de CB na doença de Alzheimer, tanto no nível de RNA quanto de proteína. Significativamente, os neurônios colinérgicos que perderam CB na senescência foram aqueles que degeneraram seletivamente na doença de Alzheimer. Além disso, neurônios contendo CB eram virtualmente resistentes ao processo de formação de emaranhados, uma marca registrada da doença. A perda da capacidade de tamponamento do cálcio nesses neurônios e o aumento patológico resultante no cálcio intracelular são permissivos à formação de emaranhados e degeneração⁷³.

A expressão de *Calb1* é显著mente reduzida em mutantes de *Drosophila* para esse modelo⁷⁴. Alterar os níveis de *Calb1* afeta o fenótipo fisiopatológico induzido em outros modelos de camundongos transgênicos de doença

neurológica. Por exemplo, suprimir a expressão de *Calb1* piora o fenótipo da doença em um modelo de doença de Alzheimer⁴⁵. Além do acúmulo da proteína β-amiloide e de tau, vários processos neurodegenerativos da doença de Alzheimer no estágio inicial são acompanhados por desregulação do cálcio, morte neuronal e disfunção mitocondrial e sináptica^{75,76}. A interrupção da homeostase do cálcio foi relatada nos cérebros de pacientes com Alzheimer e indivíduos idosos normais^{75,76}. Níveis alterados de proteínas de ligação ao cálcio podem resultar em homeostase de Ca²⁺ prejudicada em condições patológicas e sinalização de Ca²⁺ interrompida, levando à perda de sinapses e disfunções da rede neural⁴⁵.

Manipulações experimentais dos níveis de CB também afetam os desfechos comportamentais e fisiológicos animais. A super expressão de CB no giro denteadoo de ratos produz déficits na aprendizado do labirinto de água e aprendizado de reversão do labirinto em T⁵¹. Camundongos machos transgênicos *knockdown* para *Calb1* têm déficits na aprendizagem espacial no labirinto aquático de Morris e no labirinto radial de oito braços em comparação com os controles⁴⁵. Camundongos com nocaute completo para *Calb1* (KO) têm ritmos circadianos interrompidos e manutenção da potenciação de longo prazo do hipocampo prejudicada em comparação com os tipos selvagens^{46,47}.

A CB também já foi apontada com potencial terapêutico para a Doença de Parkinson quando a super expressão induziu o crescimento de neuritos em células neuronais

dopaminérgicas, além de fornecer proteção aos neurônios dopaminérgicos contra o processo patológico na doença de Parkinson. Camundongos com super expressão de CB induzidos por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) foram gerados, e os dados evidenciaram células TH positivas, o conteúdo de DA e a capacidade etiológica em camundongos transgênicos induzidos por MPTP foram significativamente maiores do que em camundongos do tipo selvagem induzidos por MPTP. Os resultados demonstram que a super expressão de CB pode fornecer proteção para os neurônios dopaminérgicos da neurodegeneração⁴⁹.

Um estudo objetivando avaliar a capacidade relativa de neurônios estriatais calbindinérgicos de ratos adultos na resistência ao desafio excitotóxico mediado por Ca²⁺ com ácido quinolínico (AQ - excitotoxina específica para receptores NMDA) mostrou que a excitotoxicidade é capaz de gerar perda neuronal em neurônios parvalbuminérgicos, calbindinérgicos e encefalinérgicos. Entretanto, os neurônios ricos em CB mostraram sobrevida significativamente aumentada. A CB foi sugerida com potencial positivo aos neurônios estriatais com proteção contra insultos excitotóxicos moderados⁷⁷.

Os achados neurológicos relacionando à CB estão associadas ao envelhecimento se estende à senilidade de doenças neurocomportamentais. A redução de CB tem sido associada a uma série de doenças neurocomportamentais. Há significativamente menos neurônios imunopositivos para

CB no córtex cerebral de indivíduos com esquizofrenia, em comparação com indivíduos controle^{78,79}.

CONCLUSÃO

Diante dos achados, as bases científicas evidenciam alterações significativas na imunomarcação e expressão de CB relacionadas à idade em vários modelos *in vivo* e *in vitro*. Os dados sugerem que a regulação da expressão gênica desta proteína pode estar relacionada ao envelhecimento. Isto aponta que o fenótipo metabólico de cálcio neuronal pode se alterar nas áreas motoras ao longo da senescência primata. As informações levantadas aqui podem ser utilizadas em estudos futuros sobre a patogênese de doenças que envolvam a neurodegeneração e expressão de proteínas ligantes de cálcio. Mais estudos são necessários para identificar os impactos destas alterações morfológicas no comportamento e nos declínios cognitivos e motores relacionados ao envelhecimento. Sugerimos fortemente estudos futuros de análise de expressão gênica de CB, quantificação proteica em tecidos neurais de primatas humanos e não humanos em diferentes faixas etárias, transcriptoma molecular, regulação da expressão gênica dessa proteína (e das demais PLCs) e mapeamento de possíveis modificações pós-traducionais durante a senescência de primatas. Além de recomendarmos a caracterização do padrão de distribuição morfológico e eletrofisiológico destas células em um contexto neuropatológico.

REFERÊNCIAS

- 1.Kelemen K, Szilágyi T. New Approach for Untangling the Role of Uncommon Calcium-Binding Proteins in the Central Nervous System. *Brain Sci* 2021;11:634. <https://doi.org/10.3390/brainsci11050634>
- 2.Bading H. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat Rev Neurosci* 2013;14:593-608. <https://doi.org/10.1038/nrn3531>
- 3.Kasai H. Comparative biology of Ca²⁺-dependent exocytosis: Implications of kinetic diversity for secretory function. *Trends Neurosci* 1999;22:88-93. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01293-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01293-4)
- 4.Blaustein MP. Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci* 1988;11:438-43. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(88\)90195-6](https://doi.org/10.1016/0166-2236(88)90195-6)
- 5.Bazargani N, Attwell D. Astrocyte calcium signaling: The third wave. *Nat Neurosci* 2016;19:182-9. <https://doi.org/10.1038/nn.4201>
- 6.Brini M, Calì T, Ottolini D, Carafoli E. Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:2787-814. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1550-7>
- 7.Buchman AS, Yu L, Wilson RS, Leurgans SE, Nag S, Shulman JM, et al. Progressive parkinsonism in older adults is related to the burden of mixed brain pathologies. *Neurology* 2019;92:E1821-30. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007315>
- 8.Buchman AS, Dawe RJ, Leurgans SE, Curran TA, Truty T, Yu L, et al. Different combinations of mobility metrics derived from a wearable sensor are associated with distinct health outcomes in older adults. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci* 2020;75:1176-83. <https://doi.org/10.1093/GERONA/GLZ160>
- 9.Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:517-29. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- 10.Bastianelli E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum* 2003;2:242-62. <https://doi.org/10.1080/14734220310022289>
- 11.Elíes J, Yáñez M, Pereira TMC, Gil-Longo J, MacDougall DA, Campos-Toimil M. An Update to Calcium Binding Proteins. *Adv Exp Med Biol* 2020;1131:183-213. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_8
- 12.Xu JH, Tang FR. Voltage-dependent calcium channels, calcium binding proteins, and their interaction in the pathological process of epilepsy. *Int J Mol Sci* 2018;19:2735. <https://doi.org/10.3390/ijms19092735>
- 13.Bagur R, Hajnóczky G. Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell* 2017;66:780-8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028>
- 14.Yáñez M, Gil-Longo J, Campos-Toimil M. Calcium binding proteins. *Adv Exp Med Biol* 2012;740:461-82. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_19
- 15.Berridge MJ. Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans* 2012;40:297-309. <https://doi.org/10.1042/BST20110766>
- 16.Berridge MJ. Module 2: Cell Signalling Pathways. *Cell Signal Biol* 2014;6:csb0001002. <https://doi.org/10.1042/csb0001002>
- 17.Mattson MP, Arumugam TV. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab* 2018;27:1176-99. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>
- 18.Buchman AS, Yu L, Oveisgharan S, Petyuk VA, Tasaki S, Gaiteri C, et al. Cortical proteins may provide motor resilience in older adults. *Sci Rep* 2021;11:11311. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90859-3>
- 19.Bennett DA. Mixed pathologies and neural reserve: Implications of

- complexity for Alzheimer disease drug discovery. PLoS Med 2017;14:e1002256. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002256>
- 20.Moyer JR, Furtak SC, McGann JP, Brown TH. Aging-related changes in calcium-binding proteins in rat perirhinal cortex. Neurobiol Aging 2011;32:1693-706. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.10.001>
- 21.Noble JW, Almalki R, Roe SM, Wagner A, Duman R, Atack JR. The X-ray structure of human calbindin-D28K: an improved model. Acta Crystallogr Sect D Struct Biol 2018;74:1008-14.
<https://doi.org/10.1107/S2059798318011610>
- 22.Tokuno H, Watson C, Roberts A, Sasaki E, Okano H. Marmoset neuroscience. Neurosci Res 2015;93:1-2.
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.03.001>
- 23.Celio MR. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. Neuroscience 1990;35:375-475. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90091-H](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90091-H)
- 24.Kim BJ, Lee SY, Kim HW, Park EJ, Kim J, Kim SJ, et al. Optimized immunohistochemical analysis of cerebellar Purkinje cells using a specific biomarker, calbindin D28k. Korean J Physiol Pharmacol 2009;13:373-8.
<https://doi.org/10.4196/kjpp.2009.13.5.373>
- 25.Li JT, Xie XM, Yu JY, Sun YX, Liao XM, Wang XX, et al. Suppressed Calbindin Levels in Hippocampal Excitatory Neurons Mediate Stress-Induced Memory Loss. Cell Rep 2017;21:891-900.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.006>
- 26.van Brederode JFM, helliesen MK, hendrickson AE. Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin-D28k in the sensorimotor cortex of the rat. Neuroscience 1991;44:157-71.
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90258-P](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90258-P)
- 27.Fairless R, Williams SK, Diem R. Calcium-binding proteins as determinants of central nervous system neuronal vulnerability to disease. Int J Mol Sci 2019;20:2146. <https://doi.org/10.3390/ijms20092146>
- 28.Miller RJ. The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis. Prog Neurobiol 1991;37:255-85. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(91\)90028-Y](https://doi.org/10.1016/0301-0082(91)90028-Y)
- 29.Magistretti PJ, Allaman I. A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. Neuron 2015;86:883-901.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.035>.
- 30.Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakost S. Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein calbindin-1328k in cultured hippocampal neurons. Neuron 1991;6:41-51.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90120-O](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90120-O)
- 31.Klapstein GJ, Vietla S, Lieberman DN, Gray PA, Airaksinen MS, Thoenen H, et al. Calbindin-D(28k) fails to protect hippocampal neurons against ischemia in spite of its cytoplasmic calcium buffering properties: Evidence from calbindin-D(28k) knockout mice. Neuroscience 1998;85:361-73.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00632-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00632-5)
- 32.Molinari S, Battini R, Ferrari S, Pozzi L, Killcross AS, Robbins TW, et al. Deficits in memory and hippocampal long-term potentiation in mice with reduced calbindin D28K expression. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:8028-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.8028>
- 33.D'Orlando C, Celio MR, Schwaller B. Calretinin and calbindin D-28k, but not parvalbumin protect against glutamate-induced delayed excitotoxicity in transfected N18-RE 105 neuroblastoma-retina hybrid cells. Brain Res 2002;945:181-90. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02753-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02753-1)
- 34.D'Orlando C, Fellay B, Schwaller B, Salicio V, Bloc A, Gotzos V, et al.

- Calretinin and calbindin D-28k delay the onset of cell death after excitotoxic stimulation in transfected P19 cells. *Brain Res* 2001;909:145-58. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02671-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02671-3)
35. Phillips RG, Meier TJ, Giuli LC, McLaughlin JR, Ho DY, Sapolsky RM. Calbindin D(28K) gene transfer via herpes simplex virus amplicon vector decreases hippocampal damage in vivo following neurotoxic insults. *J Neurochem* 1999;73:1200-5. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0731200.x>
36. Meier TJ, Ho DY, Park TS, Sapolsky RM. Gene transfer of calbindin D(28k) cDNA via herpes simplex virus amplicon vector decreases cytoplasmic calcium ion response and enhances neuronal survival following glutamatergic challenge but not following cyanide. *J Neurochem* 1998;71:1013-23. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71031013.x>
37. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995;80:259-68. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90408-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90408-5)
38. Chanthaphavong RS, Murphy SM, Anderson CR. Chemical coding of sympathetic neurons controlling the tarsal muscle of the rat. *Auton Neurosci Basic Clin* 2003;105:77-89. [https://doi.org/10.1016/S1566-0702\(03\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S1566-0702(03)00045-6)
39. Kalaria RN, Mukaetova-Ladinska EB. Delirium, dementia and senility. *Brain* 2012;135:2582-4. <https://doi.org/10.1093/brain/aws235>
40. Yuan H-H, Chen R-J, Zhu Y-H, Peng C-L, Zhu X-R. The Neuroprotective Effect of Overexpression of Calbindin-D28k in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* 2013;47:117-22. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8332-3>
41. Bobay BG, Stewart AL, Tucker AT, Thompson RJ, Varney KM, Cavanagh J. Structural insights into the calcium-dependent interaction between calbindin-D28K and caspase-3. *FEBS Lett* 2012;586:3582-9. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.08.032>
42. Wu C-K, Thal L, Pizzo D, Hansen L, Masliah E, Geula C. Apoptotic signals within the basal forebrain cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2005;195:484-96. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.06.020>
43. Sun S, Li F, Gao X, Zhu Y, Chen J, Zhu X, et al. Calbindin-D28K inhibits apoptosis in dopaminergic neurons by activation of the PI3-kinase-Akt signaling pathway. *Neuroscience* 2011;199:359-67. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.054>
44. Yenari MA, Minami M, Sun GH, Meier TJ, Kunis DM, McLaughlin JR, et al. Calbindin D28K Overexpression Protects Striatal Neurons From Transient Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 2001;32:1028-35. <https://doi.org/10.1161/01.STR.32.4.1028>
45. Kook S-Y, Jeong H, Kang MJ, Park R, Shin HJ, Han S-H, et al. Crucial role of calbindin-D28k in the pathogenesis of Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Differ* 2014;21:1575-87. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.67>
46. Westerink RHS, Beekwilder JP, Wadman WJ. Differential alterations of synaptic plasticity in dentate gyrus and CA1 hippocampal area of Calbindin-D28K knockout mice. *Brain Res* 2012;1450:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.036>
47. Kriegsfeld LJ, Mei DF, Yan L, Witkovsky P, LeSauter J, Hamada T, et al. Targeted mutation of the calbindin D 28K gene disrupts circadian rhythmicity and entrainment. *Eur J Neurosci* 2008;27:2907-21. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06239.x>
48. Montpied P, Winsky L, Dailey JW, Jobe PC, Jacobowitz DM. Alteration in Levels of Expression of Brain Calbindin D-28k and Calretinin mRNA in

- Genetically Epilepsy-Prone Rats. *Epilepsia* 1995;36:911–21. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1157.1995.TB01635.X>
- 49.Yuan H-H, Chen R-J, Zhu Y-H, Peng C-L, Zhu X-R. The Neuroprotective Effect of Overexpression of Calbindin-D28k in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* 2013;47:117–22. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8332-3>
- 50.Foster TC, Kumar A. Calcium Dysregulation in the Aging Brain. *Neuroscientist* 2016;8:297–301. <https://doi.org/10.1177/107385840200800404>
- 51.Molinari S, Battini R, Ferrari S, Pozzi L, Killcross AS, Robbins TW, et al. Deficits in memory and hippocampal long-term potentiation in mice with reduced calbindin D28K expression. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:8028–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.8028>
- 52.Schmidt H. Three functional facets of calbindin D-28k. *Front Mol Neurosci* 2012;5:25. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00025>
- 53.Wu CK, Nagykery N, Hersh LB, Scinto LFM, Geula C. Selective age-related loss of calbindin-D28k from basal forebrain cholinergic neurons in the common marmoset (*callithrix jacchus*). *Neuroscience* 2003;120:249–59. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00248-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00248-3)
- 54.Iacopino AM, Rhoden WB, Christakos S. Calcium binding protein (calbindin-D28k) gene expression in the developing and aging mouse cerebellum. *Mol Brain Res* 1990;8:283–90. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(90\)90041-B](https://doi.org/10.1016/0169-328X(90)90041-B)
- 55.Trump BF, Berezovsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *New Horizons Sci Pract Acute Med* 1996;4:139–50. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.2.7781924>
- 56.Utzschneider DA, Rand MN, Waxman SG, Kocsis JD. Nuclear and cytoplasmic Ca²⁺ signals in developing rat dorsal root ganglion neurons studied in excised tissue. *Brain Res* 1994;635:231–7. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91444-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91444-3)
- 57.Smaili S, Hirata H, Ureshino R, Monteforte PT, Morales AP, Muler ML, et al. Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. *An Acad Bras Cienc* 2009;81:467–75. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652009000300011>
- 58.Wu S, Hyrc KL, Moulder KL, Lin Y, Warmke T, Snider BJ. Cellular calcium deficiency plays a role in neuronal death caused by proteasome inhibitors. *J Neurochem* 2009;109:1225–36. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06037.x>
- 59.Snider BJ, Tee LY, Canzoniero LMT, Babcock DJ, Choi DW. NMDA antagonists exacerbate neuronal death caused by proteasome inhibition in cultured cortical and striatal neurons. *Eur J Neurosci* 2002;15:419–28. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01867.x>
- 60.Pfeiffer B, Norman AW, Hamprecht B. Immunocytochemical characterization of neuron-rich rat brain primary cultures: calbindin D28K as marker of a neuronal subpopulation. *Brain Res* 1989;476:120–8. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91543-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91543-6)
- 61.Bourne JA, Warner CE, Upton DJ, Rosa MGPC. Chemoarchitecture of the middle temporal visual area in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): Laminar distribution of calcium-binding proteins (Calbindin, Parvalbumin) and nonphosphorylated neurofilament. *J Comp Neurol* 2007;500:832–49. <https://doi.org/10.1002/cne.21190>
- 62.Kim HG, Gu YN, Lee KP, Lee JG, Kim CW, Lee JW, et al. Immunocytochemical localization of the calcium-binding proteins calbindin

- D28k, calretinin and parvalbumin in bat visual cortex. *Histol Histopathol* 2016;31:317-27. <https://doi.org/10.14670/HH-11-680>
63. Lee JY, Choi JS, Ye EA, Kim HH, Jeon CJ. Organization of calbindin D28K-immunoreactive neurons in the dog superior colliculus. *Zoolog Sci* 2007;24:1103-14. <https://doi.org/10.2108/zsj.24.1103>
64. Kishimoto J, Tsuchiya T, Cox H, Emson P., Nakayama Y. Age-related Changes of Calbindin-D28k, Calretinin, and Parvalbumin mRNAs in the Hamster Brain. *Neurobiol Aging* 1998;19:77-82. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00166-8)
65. Kishimoto J, Tsuchiya T, Cox H, Emson PC, Nakayama Y. Age-related changes of calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin mRNAs in the hamster brain. *Neurobiol Aging* 1998;19:77-82. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00166-8)
66. Vishnyakova PA, Moiseev KY, Spirichev AA, Emanuilov AI, Nozdrachev AD, Masliukov PM. Expression of calbindin and calretinin in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei during aging. *Anat Rec* 2021;304:1094-104. <https://doi.org/10.1002/ar.24536>
67. Ouda L, Burianova J, Syka J. Age-related changes in calbindin and calretinin immunoreactivity in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol* 2012;47:497-506. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2012.04.003>
68. Iacopino AM, Christakos S. Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:4078-82. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.11.4078>
69. Ahn JH, Hong S, Park JH, Kim IH, Cho JH, Lee TK, et al. Immunoreactivities of calbindin-D28k, calretinin and parvalbumin in the somatosensory cortex of rodents during normal aging. *Mol Med Rep* 2017;16:7191-8. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7573>
70. Cho YJ, Lee JC, Kang BG, An J, Song HS, Son O, et al. Immunohistochemical study on the expression of calcium binding proteins (calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin) in the cerebral cortex and in the hippocampal region of nNOS knock-out(-/-) mice. *Anat Cell Biol* 2011;44:106. <https://doi.org/10.5115/acb.2011.44.2.106>
71. Bu J, Sathyendra V, Nagykery N, Geula C. Age-related changes in calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex. *Exp Neurol* 2003;182:220-31. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00094-3](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00094-3)
72. Riascos D, Nicholas A, Samaekia R, Yukhananov R, Mesulam MM, Bigio EH, et al. Alterations of Ca²⁺-responsive proteins within cholinergic neurons in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2014;35:1325-33. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.017>
73. Riascos D, de Leon D, Baker-Nigh A, Nicholas A, Yukhananov R, Bu J, et al. Age-related loss of calcium buffering and selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2011;122:565-76. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0865-4>
74. Tessier CR, Broadie K. The fragile X mental retardation protein developmentally regulates the strength and fidelity of calcium signaling in *Drosophila* mushroom body neurons. *Neurobiol Dis* 2011;41:147-59. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.09.002>
75. Hardy J, Selkoe DJ. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* (80-) 2002;297:353-6. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1072994>
76. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, et al.

- Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 2001;21:3017-23. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-09-03017.2001>
- 77.Figueredo-Cardenas G, Harris CL, Anderson KD, Reiner A. Relative resistance of striatal neurons containing calbindin or parvalbumin to quinolinic acid-mediated excitotoxicity compared to other striatal neuron types. *Exp Neurol* 1998;149:356-72. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6724>
- 78.Torrey EF, Barci BM, Webster MJ, Bartko JJ, Meador-Woodruff JH, Knable MB. Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol Psychiatry* 2005;57:252-60. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.10.019>
- 79.Sakai T, Oshima A, Nozaki Y, Ida I, Haga C, Akiyama H, et al. Changes in density of calcium-binding-protein-immunoreactive GABAergic neurons in prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathology* 2008;28:143-50. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00867.x>