

Revisión

Sánchez Julio César,¹ García-Cuevas Andrés Mauricio,¹ Cristhian David Arroyave Durán¹

Función del intercambiador sodio calcio (NCX) en la hipoxia neuronal y la neuroprotección

Role of the sodium-calcium exchanger (NCX) in neuronal hypoxia and neuroprotection

¹Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Tecnológica de Pereira
Pereira, Colombia

Resumen

El intercambiador sodio calcio (NCX) es un transportador de membrana fundamental para la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, debido a su capacidad de realizar el intercambio iónico de Ca^{2+} hacia dentro y fuera de la célula dependiendo del gradiente electroquímico. La regulación del NCX es compleja y no completamente comprendida. Existen tres isoformas de este transportador, todas ellas implicadas en procesos de supervivencia neuronal. En neuronas sometidas a hipoxia, la inhibición de NCX aumenta la muerte neuronal; en cambio, la estimulación de NCX protege a las neuronas del daño hipóxico y disminuye el tamaño del infarto en modelos animales. Se han desarrollado moléculas con capacidad de estimular NCX y podrían ser el cimiento para futuras estrategias de neuroprotección; sin embargo, se requiere más investigación para entender la regulación de NCX en situaciones de estrés fisiológico y su importancia en el mecanismo de diversos agentes asociado a neuroprotección o neurotoxicidad. El NCX es un potencial blanco terapéutico en los estados de hipoxia neuronal que requiere más estudios para determinar la efectividad de su manipulación farmacológica, pero también es necesario determinar la relevancia que poseen otros mecanismos de transporte de Ca^{2+} en la hipoxia neuronal, para generar estrategias de neuroprotección clínicamente efectivas.

Palabras clave

Calcio, hipoxia, NCX, neuroprotección.

Abstract

The sodium calcium exchanger (NCX) is a membrane transporter, which is fundamental in Ca^{2+} intracellular homeostasis, because of its ability to move Ca^{2+} out or into the cell depending on the electrochemical gradient. NCX regulation is complex and not completely understood. There are three NCX isoforms, and all of them are involved in processes related to neuronal survival. In neurons exposed to hypoxia, the NCX inhibition increases neuronal death, instead NCX stimulation protects neurons from the hypoxic damage and reduces the infarct area in animal models. Molecules with the ability of stimulate selectively NCX have been developed and it could be the baseline for future neuroprotective strategies; however, further research is needed to better understand NCX regulation in physiological stress situations and its relevance in the mechanism of a number of agents that have been associated with neuroprotection or neurotoxicity. NCX is a potential therapeutic target on hypoxia conditions that requires more research to determine the effectiveness of its pharmacological handling; also, it is necessary to establish the importance that possess other Ca^{2+} transport mechanisms on the neuronal hypoxia, to develop clinically effective strategies of neuroprotection.

Keywords

Calcium, hypoxia, NCX, neuroprotection

Correspondencia:

Dr. Julio César Sánchez,
AA. 97, La Julita, Pereira, Risaralda, Colombia,
Tel. 57 6 3137333, Fax 57 6 3137125.
Correo electrónico: jcsanchez@utp.edu.co

Introducción

El evento cerebrovascular (ECV) es la segunda causa de muerte en el mundo y una importante causa de morbilidad, mortalidad y discapacidad.¹ En Latinoamérica, siguen aumentando los casos; los ECVs causaron 2,8 millones de muertes en 2010 y de éstas, el 57% correspondieron a casos en países en vía de desarrollo. 39,4 millones de años de vida potencialmente perdidos fueron ocasionados por el ECV isquémico y 64% corresponden a pacientes en países en vía de desarrollo.²

El aumento en la prevalencia y pobre control de los factores de riesgo han favorecido el desarrollo de la enfermedad cerebrovascular, cuadro de base para el desarrollo de ECV. Esta elevada morbilidad es consecuencia de la interacción entre el deterioro neurológico resultante, los efectos emocionales y sociales de este deterioro y el alto riesgo de recurrencia.

Por estas razones el estudio de los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la muerte neuronal después de la hipoxia es un propósito de gran importancia para la investigación, pues permitirá comprender mejor el proceso e intervenir en éste para minimizar el daño o repararlo cuando esto sea posible a través de diversas estrategias.

El calcio (Ca^{2+}) es un factor fundamental para comprender los mecanismos que conducen a la muerte neuronal inducida por hipoxia, así como por otras noxas externas.³ Este ion tiene un papel fundamental en la activación de señales apoptóticas cuando hay acumulación intracelular sostenida de este ion, sobre todo en el mitocondrio.⁴ Sin embargo, el Ca^{2+} también tiene funciones antiapoptóticas cuando las concentraciones se elevan de forma leve o moderada y transitoriamente;⁵ este ion se moviliza desde el exterior o desde los depósitos intracelulares a través de transportadores de diverso tipo; además, los niveles de Ca^{2+} citoplasmático retornan rápidamente a sus concentraciones basales para que exista una adecuada homeostasis, gracias también a otros transportadores, existentes

tanto en la membrana externa como en las membranas internas, particularmente la del retículo endoplásmico. Es por esta razón que el estudio de estos procesos se vuelve relevante en el análisis del fenómeno de daño neuronal, especialmente para entender los mecanismos de neuroprotección, los cuales tienen una gran utilidad en términos de disminución de complicaciones neurológicas, calidad de vida y costos de tratamiento en los pacientes que sufren de un evento hipóxico neuronal. Uno de los transportadores más importantes en la homeostasis del Ca^{2+} es el intercambiador $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ (NCX), el cual es capaz de mediar el intercambio de estos iones hacia dentro y fuera de la célula; el mecanismo por el cual se determina la dirección del flujo iónico es el gradiente electroquímico dominante para ambos iones, además del potencial de membrana.⁶ Esto lo convierte en uno de los reguladores principales de la homeostasis de Na^+ y Ca^{2+} , al actuar como un sistema de baja afinidad y alta capacidad que responde a cambios transitorios de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Generalmente, el balance estequiométrico de NCX se encuentra en una relación de 3:1 ($\text{Na}^+ : \text{Ca}^{2+}$).⁷ Sin embargo, este balance puede variar a 4:1 o 1:1 dependiendo de las concentraciones intracelulares de cada ion y de las condiciones de cada célula.⁸ Por tanto, de acuerdo a la dirección del flujo existen dos modos de funcionamiento del NCX: el modo de salida de Ca^{2+} o el modo de entrada de Ca^{2+} , ambos de gran relevancia en diferentes contextos.

Desarrollo

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL NCX

Existen tres isoformas del NCX, nombradas NCX1-3, las cuales están codificadas por el grupo de genes SLC8, una de las cinco familias pertenecientes a la super familia CaCA (Ca^{2+} /cation antiporters).⁹ En los mamíferos se han identificado tres genes diferentes de SLC8: SLC8A1 que codifica NCX1, SLC8A2 que codifica NCX2 y SLC8A3 que codifica NCX3. Recientemente se describió la proteína NCLX (producto del gen SLC8B1), un intercambiador de

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, el cual tiene la capacidad de intercambiar Na^+ o Li^+ con Ca^{2+} .¹⁰ NCX2 y NCX3 han sido encontrados en cerebro, en músculo estriado y en miofibroblastos gástricos humanos¹¹ y NCX3 se expresa adicionalmente en los macrófagos y monocitos humanos;¹² NCX1 parece ser expresado universalmente en las células de mamíferos.¹³ Otras proteínas relacionadas pero menos caracterizadas, son aquellas pertenecientes a la familia de genes SLC24, que codifican los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependientes de K^+ (NCKX), los cuales utilizan el gradiente tanto de ingreso de Na^+ como de salida K^+ para promover la salida de Ca^{2+} de las células. Existen cinco genes SLC24 humanos identificados y se ha demostrado su amplia distribución en el cerebro de roedores, en los cuales se han asociado con procesos como el aprendizaje motor y la memoria de trabajo espacial.¹⁴

Inicialmente, se predijo que la estructura secundaria del NCX se basaba en 9 hélices transmembrana, pero recientemente se determinó su configuración en un homólogo secuencial bacteriano mediante cristalografía por rayos X y se elucidó un transportador dimérico de 10 hélices transmembrana;¹⁵ las dos mitades comparten una disposición similar con cuatro sitios de unión en el centro de la proteína, uno específico para Ca^{2+} y tres que probablemente se unen a Na^+ , con dos pasajes que permiten el acceso del Ca^{2+} y el Na^+ a los sitios de unión desde el espacio extracelular (*Figura 1*). Aunque el peso molecular del NCX eucariótico es tres veces mayor, existe evidencia de que el número de hélices y el ensamblaje en la membrana son similares, por lo que se presupone también realice el intercambio iónico del mismo modo.¹⁶

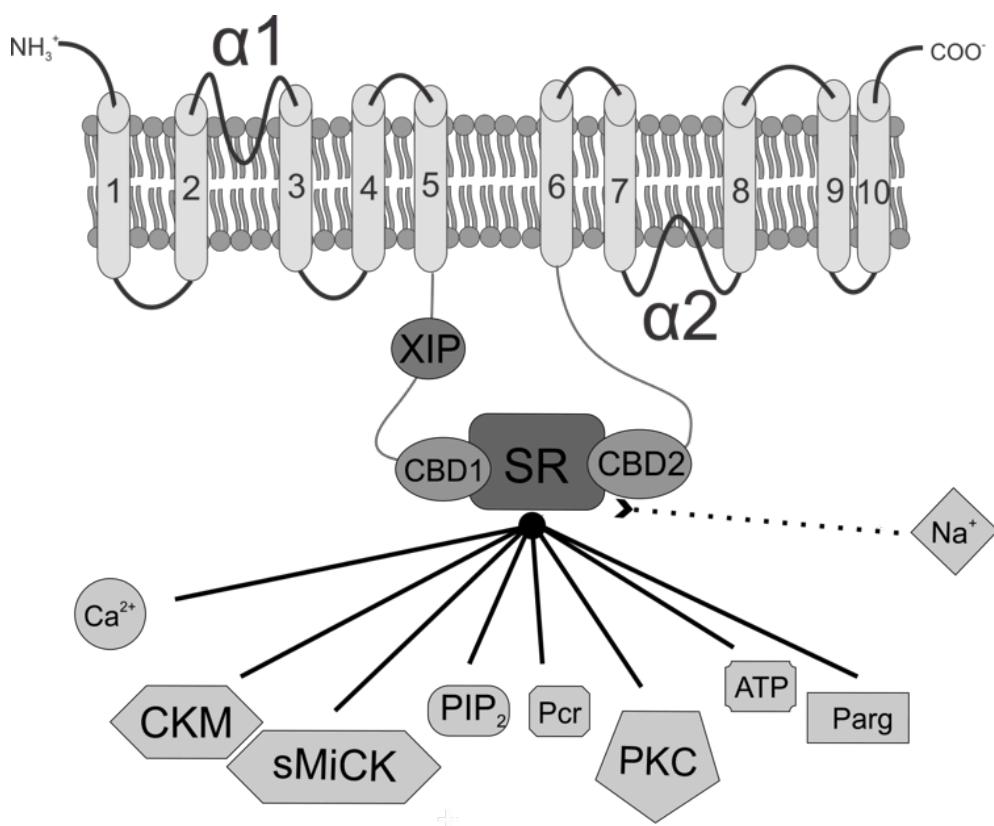


Figura 1. Esquematización de la estructura del intercambiador sodio calcio (NCX) en la membrana celular. El f-loop se encuentra ubicado entre las hélices transmembrana 5 y 6, y es el lugar donde se localizan los segmentos regulatorios de NCX y los segmentos a través de los cuales se movilizan los iones. La estructura cuenta con dos segmentos de repeticiones denominados α_1 y α_2 . SR: Segmento regulatorio. XIP: Péptido inhibidor de NCX. CBD1: Dominio de unión de calcio 1. CBD2: Dominio de unión de calcio 2. PIP₂: Fosfatidil Inositol difosfato. PArg: Fosfoarginina. PCr: fosfocreatina. PKC: Proteinasa C. CKM: Creatinquinasa mitocondrial. sMiCK: Creatinquinasa sarcomérica mitocondrial. Línea no punteada: estimulación. Línea punteada: inhibición.

El NCX es regulado por la interacción reversible de efectores citosólicos con un segmento regulatorio (f-loop). Aunque el f-loop no está implicado directamente en el intercambio de Na^+ y Ca^{2+} , es el responsable de regular la actividad de NCX desencadenada por mensajeros citoplasmáticos (**Figura 1**) como el Ca^{2+} , el Na^+ , H^+ , óxido nítrico (ON), fosfatidilinositol difosfato (PIP2), fosfoarginina, fosocreatinina, ATP y los inhibidores endógenos de NCX.^{17, 18} La unión alostérica del Ca^{2+} con los dominios intracelulares CBD1 y CBD2 (calcium-binding domain) es el modo imperioso de activación del NCX, lo cual es especialmente importante en tejidos excitables. En contraste, el incremento citosólico de Na^+ activa el NCX rápidamente y luego lo inactiva; por lo tanto, la elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} activa el NCX y mitiga la inactivación inducida por Na^+ . La inactivación dependiente de Na^+ no puede ser explicada por la interacción con los CBDs, puesto que el Na^+ no se une a éstos.¹⁸

Otros estudios han demostrado que la regulación de NCX dependiente de ATP se da a través de PIP2, puesto que éste modula la regulación secundaria dependiente de Ca^{2+} , Na^+ y H^+ .¹⁹ La creatina quinasa sarcomérica mitocondrial (sMiCK) y la creatina quinasa de músculo liso (CKM) modulan el modo de entrada y de salida de NCX mediante fosforilación putativa dada por una proteína quinasa C (PKC).²⁰

NCX Y FUNCIÓN NEURONAL

Se ha demostrado en neuronas de Purkinje de cerebro de rata que la acumulación de Na^+ intracelular estimula el modo de entrada de Ca^{2+} del NCX y este mecanismo promueve la transmisión sináptica.²¹ Este proceso podría dar forma a la dinámica presináptica del balance de Ca^{2+} para promover la transmisión sináptica, constituyéndose en una capacidad extra para integrar y optimizar la transmisión de información cerebelosa.

Los mecanismos subyacentes en la liberación de neurotransmisores dependientes de Ca^{2+} en neuronas y en células endocrinas requieren de una estimulación inducida por agonista, el que consecuentemente provoca el aumento citosólico de Ca^{2+} ; la amplitud y la duración de éste

promueve e integra la exocitosis de hormonas o neurotransmisores como GABA, glicina o glutamato.²² El incremento de la señal agonista inducida por Ca^{2+} está determinada principalmente por la cantidad de Ca^{2+} que ingresa a través de los canales de Ca^{2+} tipo L (LTCCs)²³ y/o la liberación de éste desde el retículo endoplásmico mediante de los canales activados por IP3. Curiosamente, la liberación exocítica dependiente del Ca^{2+} extracelular, puede ser observada cuando las concentraciones intracelulares de Na^+ aumentan lo suficiente como para estimular el modo de entrada de Ca^{2+} por NCX.²⁴ Aunque el NCX está involucrado en la liberación de neurotransmisores en tejido neuronal y glial, este parece desempeñar un mayor rol en el control de la homeostasis iónica cuando se responde a estímulos mecánicos y bioquímicos.

NCX E HIPOXIA NEURONAL

En la enfermedad cerebrovascular, las concentraciones elevadas de Ca^{2+} intracelular desencadenan necrosis y/o apoptosis de las neuronas vulnerables, mientras que la elevación del Na^+ intracelular resulta en edema celular y desorganización microtubular.²⁵ En modelos animales de isquemia cerebral, la activación farmacológica de NCX disminuyó el daño cerebral, mientras que los inhibidores de éste empeoraron la lesión.²⁶ El NCX se asocia también con potenciación hipocampal para el aprendizaje espacial a largo plazo y el daño por reperfusión cerebral.²⁷

La inhibición de la salida de Ca^{2+} a través de NCX ocasiona aumento de la lesión hipóxico-isquémica en médulas espinales aisladas de ratas adultas.²⁸ Las respuestas de las isoformas de NCX a la hipoxia-isquemia en ratas varían: el NCX2 con o sin inhibición no modifica la homeostasis celular en condiciones isquémicas; en contraste, NCX1 y NCX3 parecen poseer un rol significativo en generar un efecto neuroprotector o neurotóxico dependiendo de las condiciones de gradiente de Na^+ y Ca^{2+} .¹⁷

EINCXtieneunpapel determinadoenla homeostasis iónica en la zona peri-infarto de corteza de ratas con oclusión de la arteria cerebral media (ACM).²⁹ Al intervenir la función de NCX2 en ratones sometidos a isquemia cerebral transitoria, se produce mayor

muerte neuronal y una zona de infarto más extensa en los ratones knock-out para NCX2, tanto *in vivo* como *in vitro*, comparado con los ratones wild type.³⁰ Adicionalmente, existe un mayor deterioro focal y disminución de las corrientes de Ca²⁺ hacia dentro de la célula de NCX en neuronas hipocampales de ratas con supresión de NCX3.³¹

Al inhibir NCX1 y NCX3 hay una reducción en la supervivencia mediada por Akt1 en condiciones hipóxicas.³² La función de NCX en la microglía que rodea las neuronas de un núcleo de infarto posterior a hipoxia en modelos *in vivo* e *in vitro*, genera sobre expresión de NCX1 y disminución en la expresión de NCX2 y NCX3; además, en el NCX1 promueve la movilización de Ca²⁺ hacia dentro de la célula, disminuyendo las concentraciones de Ca²⁺ extracelular, aparentemente para disminuir la progresión de la muerte neuronal.³³ El factor nuclear kappa-β (NF-κB) estimula NCX1 para favorecer el flujo de Ca²⁺ al retículo endoplasmático y así facilitar a las neuronas reducir el estrés secundario a la hipoxia.³⁴ El péptido β-amiloide genera un forma hiperfuncional de NCX3 que aumenta las corrientes de Ca²⁺ hacia el retículo endoplasmático y retrasa así la activación de la caspasa-12 y, por ende, retarda la muerte neuronal.³⁵

La pre-isquemia y pos-isquemia promueven la expresión de NCX3, lo que genera neuroprotección mediante la activación de la vía óxido nítrico/IP3K/Akt lo que modula la homeostasis del Ca²⁺ en mitocondria y retículo endoplasmático.³⁶ Asimismo, la toxicidad inducida por NCX mediada por óxido nítrico ha sido documentada en células de neuroblastoma, astrocitos y microglía; el óxido nítrico estimula el modo de entrada de Ca²⁺ del NCX presumiblemente a través de GMPc/PKG, elevando las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, la producción de ROS y la fosforilación de ERK, JNK y p38 MAPK, eventos que finalmente desencadenan apoptosis.³⁷

NCX Y NEUROPROTECCIÓN

Existen ciertas moléculas que pueden disminuir la muerte neuronal mediante la regulación de NCX y tienen características prometedoras en el ámbito de la neuroprotección, como el ifenprodil

tartrato, antagonista selectivo de los receptores NMDA³⁸; este medicamento tiene la capacidad de inhibir el modo de entrada de Ca²⁺ de NCX y prevenir la disregulación tardía de calcio inducida por glutamato, mecanismo por el cual se produce muerte neuronal por excitotoxicidad. La neurounina-1, molécula sintetizada a partir del SM-15811, el cual es un inhibidor inespecífico de NCX, reduce el tamaño del infarto y la liberación de glutamato en ratas sometidas a isquemia transitoria por oclusión de la ACM.³⁹

Regular la expresión de NCX puede influir para generar neuroprotección contra la hipoxia. Al someter a hipoxia un cultivo primario de neuronas de corteza de rata que sobreexpresan NCX2 y NCX3, se produce mayor tasa de supervivencia y menor elevación del Ca²⁺ intracelular.⁴⁰ El aumento de la expresión de REST (RE-1 Silencing Transcription Factor) se asocia a menor actividad de NCX1, lo cual incrementa la supervivencia neuronal y disminuye la extensión del infarto, en contraste con la inhibición de REST, que tiene un efecto deletéreo.⁴¹ La inhibición del MicroARN-103-1 promueve la actividad de NCX1, generando neuroprotección en cultivos de neuronas de corteza de rata sometidos a hipoxia y disminución del déficit neurológico secundario a la oclusión de la ACM.⁴²

El Li⁺ tiene efectos significativos sobre NCX: promueve la salida de Ca²⁺ en las tres isoformas (en NCX1, el efecto es menor en comparación a la isoforma 2 y 3).⁴³ La exposición prolongada al Li⁺ funciona como un factor neuroprotector disminuyendo la excitotoxicidad por glutamato, suprimiendo la expresión de p53 y BAX e incrementando el Bcl-2.⁴⁴ Los agentes reductores y oxidantes también son estimuladores de la actividad de NCX; sin embargo, existe evidencia que sugiere que las especies reactivas de oxígeno (ROS) inhiben NCX y promueven la liberación de glutamato.⁴⁵ El ácido araquidónico (AA) es un sustrato fundamental en la producción de ROS y es un mediador en la cascada de la fosfolipasa A2 (PLA2), lo que en la isquemia neuronal promueve las señales y mecanismos proapoptóticos; la acción del AA en respuesta a la hipoxia podría regular la actividad de NCX, teniendo en cuenta el efecto de las ROS

sobre éste.⁴⁶ Los andrógenos (particularmente la dehidrotestosterona) modulan la expresión de SERCA en neuronas hipocampales de rata⁴⁷ y se conocen sus efectos sobre el aumento de la actividad de NCX en miocitos cardíacos,⁴⁸ efectos que podrían estar relacionados.

El E2 (17-β-estradiol) y el IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina-1), conocidos neruoprotectores, tienen actividad sobre el NCX en neuronas de corteza de rata; ambos agentes producen disminución de las corrientes de Ca²⁺

hacia dentro de la célula cuando se administran en conjunto y cuando se inhiben los mecanismos de transducción clásicos descritos para cada hormona, el efecto sobre Ca²⁺ permanece sin cambios, es decir, E2 e IGF-1 tienen efectos sobre NCX por mecanismos diferentes.⁴⁹ Este hecho recalca la necesidad de establecer los efectos de la hipoxia sobre la actividad de NCX en presencia de neuropotectores conocidos y de otros factores hormonales que se encuentran asociados a la enfermedad cerebrovascular.

Conclusión

El NCX es un blanco terapéutico indiscutible para el desarrollo de estrategias de neuroprotección en enfermedad cerebrovascular aguda, ya sea mediante la modulación de su expresión (especialmente NCX1) o de su actividad estimulando NCX directamente, lo cual puede lograrse con medicamentos como la neurounina-1 o el ifenprodil tartrato, aunque su utilidad clínica necesita más investigación. El eje central de la neuroprotección es el Ca²⁺, como factor dinámico y modulable por un largo y todavía no completamente conocido listado de hormonas, moléculas y

situaciones de estrés fisiológico, que involucran las vías de transporte de este ion, cuya regulación es fundamental para el desarrollo de estrategias farmacológicas óptimas para prevenir y potenciar estrategias terapéuticas que minimicen el daño neurológico secundario a hipoxia. Sin embargo, se requieren estudios que evalúen la relevancia de los demás mecanismos de transporte de Ca²⁺ en los efectos de la hipoxia a nivel neuronal, para ampliar el espectro de blancos terapéuticos dirigidos a una neuroprotección efectiva clínicamente.⁵⁰

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran que en este estudio no existen conflictos de interés relevantes.

Fuentes de financiamiento

No existieron fuentes de financiamiento para la realización de este estudio científico.

Referencias

1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet.* 2013;380(9859):2095-128.
2. Feigin V, Forouzanfar M, Krishnamurthi R, Mensah G, Connor M, Bennett D, et al. Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010 (GBD 2010) and the GBD Stroke Experts Group. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2014;383(9913):245-54.
3. Sanchez JC, Lopez-Zapata DF, Romero-Leguizamon CR. [Calcium transport mechanisms in neuroprotection and neurotoxicity]. *Rev Neurol.* 2010;51(10):624-32.
4. Giacomello M, Drago I, Pizzo P, Pozzan T. Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ.* 2007;14(7):1267-74.
5. Hajnóczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2003;304(3):445-54.
6. Bers DM, Weber CR. Na/Ca exchange function in intact ventricular myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2002;976(1):500-12.
7. Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological reviews.* 1999;79(3):763-854.
8. Fujioka Y, Hiroe K, Matsuoka S. Regulation kinetics of Na⁺-Ca²⁺ exchange current in guinea-pig ventricular myocytes. *The Journal of physiology.* 2000;529(3):611-23.
9. Cai X, Lytton J. The cation/Ca(2+) exchanger superfamily: phylogenetic analysis and structural implications. *Molecular biology and evolution.* 2004;21(9):1692-703.
10. Palty R, Silverman WF, Hershfinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, et al. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(1):436-41.
11. Kemény LV, Schnúr A, Czepán M, Rakonczay Z, Gál E, Lonovics J, et al. Na+/Ca²⁺ exchangers regulate the migration and proliferation of human gastric myofibroblasts. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2013;305(8):G552-G63.
12. Staiano RI, Granata F, Secondo A, Petraroli A, Loffredo S, Frattini A, et al. Expression and function of Na⁺/Ca²⁺ exchangers 1 and 3 in human macrophages and monocytes. *European journal of immunology.* 2009;39(5):1405-18.
13. Nicoll DA, Ottolia M, Philipson KD. Toward a topological model of the NCX1 exchanger. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;976:11-8.
14. Schnetkamp PP. The SLC24 gene family of Na(+)/Ca(2)(+)-K(+) exchangers: from sight and smell to memory consolidation and skin pigmentation. *Molecular aspects of medicine.* 2013;34(2-3):455-64.
15. Liao J, Li H, Zeng W, Sauer DB, Belmares R, Jiang Y. Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science.* 2012;335(6069):686-90.
16. John SA, Liao J, Jiang Y, Ottolia M. The cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger has two cytoplasmic ion permeation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2013;110(18):7500-5.
17. Annunziato L, Pignataro G, Di Renzo GF. Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):633-54.
18. Boyman L, Hagen BM, Giladi M, Hiller R, Lederer WJ, Khananshvili D. Proton-sensing Ca²⁺ binding domains regulate the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem.* 2011;286(33):28811-20.
19. DiPolo R, Beauge L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev.* 2006;86(1):155-203.
20. Yang YC, Fann MJ, Chang WH, Tai LH, Jiang JH, Kao LS. Regulation of sodium-calcium exchanger activity by creatine kinase under energy-compromised conditions. *J Biol Chem.* 2010;285(36):28275-85.
21. Roome CJ, Power EM, Empson RM. Transient reversal of the sodium/calcium exchanger boosts presynaptic calcium and synaptic transmission at a cerebellar synapse. *J Neurophysiol.* 2013;109(6):1669-80.
22. Reyes RC, Verkhratsky A, Parpura V. Plasmalemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger modulates Ca²⁺-dependent exocytotic release of glutamate from rat cortical astrocytes. *ASN neuro.* 2012;4(1).
23. Lipscombe D, Helton TD, Xu W. L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol.* 2004;92(5):2633-41.

24. Noda M, Ifuku M, Mori Y, Verkhratsky A. Calcium influx through reversed NCX controls migration of microglia. *Adv Exp Med Biol.* 2013;961:289-94.
25. Dubinsky JM, Rothman SM. Intracellular calcium concentrations during "chemical hypoxia" and excitotoxic neuronal injury. *The Journal of neuroscience.* 1991;11(8):2545-51.
26. Valsecchi V, Pignataro G, Del Prete A, Sirabella R, Matrone C, Boscia F, et al. NCX1 is a novel target gene for hypoxia-inducible factor-1 in ischemic brain preconditioning. *Stroke.* 2011;42(3):754-63.
27. Boscia F, D'Avanzo C, Pannaccione A, Secondo A, Casamassa A, Formisano L, et al. Silencing or knocking out the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-3 (NCX3) impairs oligodendrocyte differentiation. *Cell Death Differ.* 2012;19(4):562-72.
28. Tomes DJ, Agrawal SK. Role of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger after traumatic or hypoxic/ischemic injury to spinal cord white matter. *The Spine Journal.* 2002;2(1):35-40.
29. Tortiglione A, Picconi B, Barone I, Centonze D, Rossi S, Costa C, et al. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger maintains ionic homeostasis in the peri-infarct area. *Stroke.* 2007;38(5):1614-20.
30. Jeon D, Chu K, Jung KH, Kim M, Yoon BW, Lee CJ, et al. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 2 is neuroprotective by exporting Ca^{2+} during a transient focal cerebral ischemia in the mouse. *Cell Calcium.* 2008;43(5):482-91.
31. Molinaro P, Cuomo O, Pignataro G, Boscia F, Sirabella R, Pannaccione A, et al. Targeted disruption of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 3 (NCX3) gene leads to a worsening of ischemic brain damage. *J Neurosci.* 2008;28(5):1179-84.
32. Formisano L, Saggese M, Secondo A, Sirabella R, Vito P, Valsecchi V, et al. The two isoforms of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX1 and NCX3, constitute novel additional targets for the prosurvival action of Akt/protein kinase B pathway. *Mol Pharmacol.* 2008;73(3):727-37.
33. Boscia F, Gala R, Pannaccione A, Secondo A, Scorziello A, Di Renzo G, et al. NCX1 expression and functional activity increase in microglia invading the infarct core. *Stroke.* 2009;40(11):3608-17.
34. Sirabella R, Secondo A, Pannaccione A, Scorziello A, Valsecchi V, Adornetto A, et al. Anoxia-induced NF-kappaB-dependent upregulation of NCX1 contributes to Ca^{2+} refilling into endoplasmic reticulum in cortical neurons. *Stroke.* 2009;40(3):922-9.
35. Pannaccione A, Secondo A, Molinaro P, D'Avanzo C, Cantile M, Esposito A, et al. A new concept: Abeta1-42 generates a hyperfunctional proteolytic NCX3 fragment that delays caspase-12 activation and neuronal death. *J Neurosci.* 2012;32(31):10609-17.
36. Sisalli MJ, Secondo A, Esposito A, Valsecchi V, Savoia C, Di Renzo GF, et al. Endoplasmic reticulum refilling and mitochondrial calcium extrusion promoted in neurons by NCX1 and NCX3 in ischemic preconditioning are determinant for neuroprotection. *Cell Death Differ.* 2014;21(7):1142-9.
37. Takuma K, Ago Y, Matsuda T. The glial sodium-calcium exchanger: a new target for nitric oxide-mediated cellular toxicity. *Current Protein and Peptide Science.* 2013;14(1):43-50.
38. Brittain MK, Brustovetsky T, Sheets PL, Brittain JM, Khanna R, Cummins TR, et al. Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *Neurobiology of disease.* 2012;46(1):109-17.
39. Molinaro P, Cantile M, Cuomo O, Secondo A, Pannaccione A, Ambrosino P, et al. Neurounina-1, a novel compound that increases $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger activity, effectively protects against stroke damage. *Mol Pharmacol.* 2013;83(1):142-56.
40. Cross JL, Boulos S, Shepherd KL, Craig AJ, Lee S, Bakker AJ, et al. High level over-expression of different NCX isoforms in HEK293 cell lines and primary neuronal cultures is protective following oxygen glucose deprivation. *Neuroscience research.* 2012;73(3):191-8.
41. Formisano L, Guida N, Valsecchi V, Pignataro G, Vinciguerra A, Pannaccione A, et al. NCX1 is a new rest target gene: role in cerebral ischemia. *Neurobiology of disease.* 2013;50:76-85.
42. Vinciguerra A, Formisano L, Cerullo P, Guida N, Cuomo O, Esposito A, et al. MicroRNA-103-1 Selectively Downregulates Brain NCX1 and Its Inhibition by Anti-miRNA Ameliorates Stroke Damage and Neurological Deficits. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2014;22(10):1829-38.
43. Iwamoto T, Shigekawa M. Differential inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger isoforms by divalent cations and isothiourea derivative. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 1998;275(2):C423-C30.
44. Chen R-W, Chuang D-M. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(10):6039-42.

45. Salazar M, Pariente JA, Salido GM, González A. Ethanol induces glutamate secretion by Ca²⁺ mobilization and ROS generation in rat hippocampal astrocytes. *Neurochemistry international*. 2008;52(6):1061-7.
46. Herrera-Peco I, Sola R, Osejo V, Wix-Ramos R, Pastor J. Participación de los astrocitos activados mediante albúmina en la epileptogénesis. *Rev Neurol*. 2008;47:582-7.
47. Foradore C, Werner S, Sandau U, Clapp T, Handa R. Activation of the androgen receptor alters the intracellular calcium response to glutamate in primary hippocampal neurons and modulates sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 transcription. *Neuroscience*. 2007;149(1):155-64.
48. Tsang S, Wong SS, Wu S, Kravtsov GM, Wong T-M. Testosterone-augmented contractile responses to α1-and β1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2009;296(4):C766-C82.
49. Sanchez JC, Lopez-Zapata DF, Francis L, De Los Reyes L. Effects of estradiol and IGF-1 on the sodium calcium exchanger in rat cultured cortical neurons. *Cell Mol Neurobiol*. 2011;31(4):619-27.
50. Sánchez JC, López-Zapata DF, Romero-Leguizamón CR. Mecanismos de transporte de calcio en neuroprotección y neurotoxicidad. *Revista de neurología*. 2010;51(10):624-32.