

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento
Departamento de Farmacología y Terapéutica

**Alteraciones en el acoplamiento
estímulo-secreción relacionadas con el
envejecimiento en un modelo murino
de senescencia acelerada SAMP8**

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor presentada por

Andrés Mateo Baraibar Sierra

Madrid, 2019

Esta Tesis Doctoral, ha tenido como principal objetivo el estudio de las posibles alteraciones que acontecen en el acoplamiento estímulo-secreción durante el envejecimiento, utilizando los ratones SAMP8 (presentan una senescencia acelerada) y los ratones SAMR1 como controles (presentan una senescencia normal).

Para este estudio, hemos utilizado como modelo neurosecretor la célula cromafín de la médula adrenal de los ratones de ambas cepas a los 2, 6 y 12 meses. Para analizar los mecanismos implicados en este acoplamiento estímulo-secreción durante el envejecimiento, hemos utilizado las técnicas electrofisiológicas de “patch-clamp” y amperometría desgranando así el comportamiento eléctrico y químico de dicho proceso. Mediante la técnica de “western blot” hemos analizado los posibles cambios en las proteínas implicadas en la exocitosis. Además, valiéndonos del laberinto en Y, hemos evaluado el nivel de memoria y aprendizaje espacial de los ratones en cuestión.

Hemos encontrado déficits en el aprendizaje y la memoria espacial de los ratones SAMP8 a los 6 y 12 meses. Se ha observado un aumento de la I_{Ca} , la I_{Na} y la $I_{K(Ca)}$ durante el envejecimiento, ocurriendo a los 6 y 12 meses en los ratones SAMP8, pero también en los ratones SAMR1 a los 12 meses. El aumento de las corrientes viene acompañado de un incremento en el número de vesículas liberadas y, por ende, en la cantidad de neurotransmisor tras la estimulación con alto K^+ . Sin embargo, tras la estimulación con ACh no se observan estos cambios, manteniéndose una secreción estable a lo largo de la edad. La liberación del neurotransmisor ocurre de manera más lenta y con la misma carga cuantal durante el envejecimiento de ambas cepas, tanto a través del estímulo de alto K^+ como el de ACh. Durante el envejecimiento se produce una hipoexcitabilidad de la célula cromafín en reposo caracterizada por una hiperpolarización del V_m y un menor disparo de potenciales de acción. Los potenciales de acción generados espontáneamente o provocados por un estímulo en la célula cromafín son de mayor amplitud, de mayor anchura y con una post-hiperpolarización mayor a lo largo de la edad, ocurriendo primero en los ratones SAMP8 a los 6 y 12 meses y posteriormente en los SAMR1 a los 12 meses. Esto, origina un mayor intervalo entre potenciales de acción y una disminución de la frecuencia de disparo ante un estímulo despolarizante. También se produce una hiperpolarización del potencial umbral de disparo. La despolarización del V_m producida por la ACh disminuye a los 6 y 12 meses en los ratones SAMP8 y a los 12 meses en los SAMR1, generándose a la vez un aumento en el número de potenciales de acción. La despolarización producida por alto K^+ no sufre variaciones durante el envejecimiento. No se han encontrado diferencias relevantes en la expresión de proteínas totales implicadas en la exocitosis (SNAP-25, syntaxina 1, dinamina 1-2, sinaptotagmina 1) ni en el hipocampo ni en la corteza cerebral de los ratones SAMP8 y SAMR1. Se han detectado niveles elevados de la proteína tau fosforilada en el hipocampo de los ratones SAMP8 a los 12 meses.

Aunando estos hallazgos, podríamos inferir que durante el envejecimiento se produce una hipoexcitabilidad de las células cromafines (que se observa más precozmente en el modelo de senescencia acelerada SAMP8, en comparación con lo que ocurre en el modelo de envejecimiento “normal” SAMR1), lo que modula la neurotransmisión ante un estímulo estresante. Estas alteraciones que se producen en la célula cromafín adrenomedular podrían corresponder a mecanismos compensatorios que se producen con la edad o, si se producen también a nivel del sistema nervioso central, ser el inicio o la

causa de esa situación patológica. Finalmente, las alteraciones relacionadas con el envejecimiento aquí descritas podrían ayudar a esclarecer la delgada línea que separa el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas.



Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
UAM

D. LUIS GANDÍA JUAN, Profesor Titular de Farmacología del Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento y del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

y D. JESÚS MIGUEL HERNÁNDEZ GUIJO, Profesor Titular de Farmacología del Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento y del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN, que D. ANDRÉS MATEO BARAIBAR SIERRA ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado “**Alteraciones en el acoplamiento estímulo-secreción relacionadas con el envejecimiento en un modelo murino de senescencia acelerada SAMP8**”, como Tesis para alcanzar el grado de Doctor.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden y firman la presente en Madrid a 6 de noviembre de 2018.

D. Luis Gandía Juan
Profesor Titular de Farmacología

D. Jesús M. Hernández Guijo
Profesor Titular de Farmacología

Dedicatoria

Ama, porque siempre has estado, estás y estarás, muchas gracias por todo.

Aita, beti indartsu, nire ondoan etengabe, nire sostengua izan zara.

Mikel, txikitatik beti elkarrekin.

Y a ti, Déborah, por existir y compartir tu vida conmigo.

En torno a dichos conceptos primordiales, origen de la vida y naufragio de la misma, giran religiones y filosofías. Ni la ciencia escapa, no obstante su serena objetividad, a la dolorosa inquietud del no ser. Cuando astrónomos, matemáticos, físicos, químicos y biólogos, etcétera, calculan, observan o experimentan creen enfrentarse sin intención trascendental con un problema real y concreto; mas a poco que mediten caerán en la cuenta de que, allá en inaccesible lontananza, fulgura un ideal incitador de su acción: la resolución del triple enigma de la senilidad, la enfermedad y la muerte. Porque todo el mundo está íntimamente trabado por lazos causales. En nuestras vidas repercuten las causas profundas y lejanas de la evolución, desde las órbitas vertiginosas de los electrones hasta el giro majestuoso de los astros. Ni hay que olvidar que nuestro cuerpo es un agregado de energía cósmica transformada y de enjambres electrónicos complicadísimos semejantes a sistemas planetarios.

El mundo visto a los ochenta años. Impresiones de un arteriosclerótico.

Por Don Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

INDICE

	<u>Pág.</u>
MARCO DE LA TESIS DOCTORAL	1
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1.-ENVEJECIMIENTO.....	7
1.1.-Teorías estocásticas	9
1.1.1.-Alteraciones a nivel molecular	9
1.1.1.1.-Teorías genéticas:.....	9
1.1.1.2.-Teoría de la mutación somática	10
1.1.1.3.-Teoría del error-catástrofe.....	10
1.1.1.4.-Teoría de las uniones cruzadas de estructuras celulares.....	11
1.1.2.-Alteraciones a nivel celular	11
1.1.2.1.-Teoría de la acumulación de productos de desecho.....	11
1.1.2.2.-Teoría de la telomerasa	11
1.1.2.3.-Teoría de los radicales libres	12
1.1.3.-Alteraciones a nivel de sistemas orgánicos	12
1.1.3.1.-Teoría inflamatoria.....	12
1.1.3.2.-Teoría inmunológica.....	13
1.1.3.3.-Teoría neuroendocrina	14
1.2.-Teorías deterministas.....	15
1.2.1.-Teoría de la capacidad replicativa finita de las células	15
1.2.2.-Teorías evolutivas.....	15
1.2.2.1.-Teoría del recambio poblacional	16
1.2.2.2.-Teoría de las mutaciones perjudiciales	16
1.2.2.3.-Teoría del soma desechable	16
1.3.-Resumen de daños que ocurren durante el envejecimiento	17
2.-ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	18
2.1.-Envejecimiento y enfermedad de Alzheimer	18
2.1.1.-Hipótesis colinérgica	19
2.1.2.-Hipótesis amiloidogénica	20
2.1.3.-Hipótesis de la taupatía.....	20
2.1.4.-Hipótesis del calcio	21
2.1.5.-Hipótesis del estrés oxidativo.....	22
2.1.6.-Hipótesis de la neuroinflamación	22
2.1.7.-Hipótesis de la excitotoxicidad por glutamato	23
2.2.-Envejecimiento y esclerosis lateral amiotrófica	23
2.2.1.-Hipótesis de la excitotoxicidad por glutamato	24
2.2.2.-Hipótesis de la autofagia	25
2.2.3.-Hipótesis de la neuroinflamación	25

2.3.-Envejecimiento y enfermedad de Parkinson	25
2.3.1.-Depósitos de α -sinucleína	26
2.3.2.-Depósitos de metales	27
2.3.3.-Daños del ADN mitocondrial	27
3.-MODELO DE SENESCENCIA ACELERADA: RATONES SAM	27
3.1.-Alteraciones neurofisiopatológicas	31
3.1.1.-Alteraciones de tipo A	31
3.1.2.-Alteraciones de tipo B	31
3.1.3.-Alteraciones de tipo C	32
3.2.-Alteraciones en el comportamiento	32
3.2.1.-Aprendizaje espacial y capacidad de memoria	32
3.2.2.-Aprendizaje en la tarea de evitación pasiva y activa	32
3.2.3.-Estudios de miedo condicionado	33
3.2.4.-Memoria declarativa	33
3.2.5.-Alteraciones de los ritmos circadianos	33
4.-LA CÉLULA CROMAFÍN: UN MODELO NEUROSECRETOR	34
4.1.-Características anatómicas e histológicas	35
4.1.1.-La corteza suprarrenal	35
4.1.2.-La médula adrenal	36
4.2.-La célula cromafín de la médula adrenal.....	37
4.3.-Excitabilidad de la célula cromafín	39
4.3.1.-Canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v)	39
4.3.2.-Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV)	39
4.3.3.-Canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca})	40
4.3.3.1.-Canales de K^+ dependientes Ca^{2+} e independientes de voltaje (SK)	40
4.3.3.2.-Canales de K^+ dependientes Ca^{2+} y de voltaje (BK)	41
4.3.4.-Canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v)	41
4.3.5.-Receptores nicotínicos (nAChRs)	41
4.3.6.-Potencial de membrana (V_m) y generación del potencial de acción (PA)	42
4.4.-Maquinaria excitotóxica de la célula cromafín	43
4.5.-La célula cromafín en el eje simpático-adrenomedular (ESAM)	45
4.6.-Acoplamiento estímulo-secreción en la célula cromafín.....	47
4.7.-La célula cromafín como modelo para estudiar el envejecimiento del SN	49
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
1.-ANIMALES EMPLEADOS.....	59
2.-AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN	59
3.-REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS: <i>PATCH-CLAMP</i>	62
3.1.-Fundamentos de la técnica	62
3.2.-Descripción de la técnica	65
3.3.-Aplicación de la técnica	67
3.3.1.-Preparación y superfusión de las células.....	67
3.3.2.-Preparación de las “pipetas de patch”	68
3.3.3.-Giga-sello y configuración de célula completa.....	69
3.4.-Obtención de los registros electrofisiológicos	72
3.4.1.-Registro de corrientes iónicas.....	72
3.4.2.-Registro del potencial de membrana (V_m).....	75
3.4.3.-Medida de la capacidad de la membrana.....	79
4.-REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS: AMPEROMETRÍA	80
4.1.-Fundamentos de la técnica	80
4.2.-Descripción de la técnica	81
4.3.-Aplicación de la técnica	83
4.3.1.-Preparación de los microelectrodos de amperometría.....	83
4.3.2.-Calibración de los electrodos	85
4.3.3.-Obtención de los registros de amperometría.....	86
5.-IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOTRANSFERENCIA	87
5.1.-Extracción de proteínas totales.....	87
5.2.-Cuantificación de proteínas totales por el método BCA.....	87
5.3.-Separación de proteínas.....	88
5.4.-Identificación de proteínas	89
5.5.-Cuantificación de la expresión de proteínas individuales	93
6.-EVALUACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL: LABERINTO EN Y	93
7.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	95
8.-SOLUCIONES Y PRODUCTOS QUÍMICOS EMPLEADOS.....	96
8.1.-Soluciones utilizadas en el cultivo celular	96
8.1.1.-Solución de Locke.....	96
8.1.2.-Solución de cultivo DMEM	96
8.2.-Soluciones utilizadas en los registros electrofisiológicos.....	96
8.2.1.-Soluciones extracelulares	96
8.2.1.1.-Solución Krebs-HEPES.....	96
8.2.1.2.-Solución Krebs-HEPES con ACh (100 μ M).....	96

8.2.1.3.-Solución Krebs-HEPES con alto potasio (70 mM).....	97
8.2.2.-Soluciones intracelulares.....	97
8.2.2.1.-Solución INC.....	97
8.2.2.2.-Solución KCC.....	97
8.3.-Soluciones para la inmunodetección de proteínas (“western blot”).....	98
8.3.1.-Soluciones para extracción de proteínas totales.....	98
8.3.2.-Soluciones para cuantificación de proteínas.....	98
8.3.2.1.-Solución de BSA.....	98
8.3.2.2.-Reactivo A.....	98
8.3.2.3.-Reactivo B.....	98
8.3.3.-Soluciones para separación e identificación de proteínas.....	98
8.3.3.1.-Gel de carga (“Stacking gel”).....	98
8.3.3.2.-Gel de separación (“Running gel”).....	99
8.3.3.3.-Tris-HCl pH 6,8.....	99
8.3.3.4.-Tris-HCl pH 8,8.....	99
8.3.3.5.-Tampón de carga.....	99
8.3.3.6.-Tampón de electroforesis.....	99
8.3.3.7.-Tampón de transferencia.....	99
8.3.3.8.-TBS.....	99
8.3.3.9.-TBST.....	100
IV. RESULTADOS.....	101
1.-CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS RATONES SAM.....	103
2.-CORRIENTES IÓNICAS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.....	106
2.1.-Tamaño celular estimado a través de la capacidad de la membrana celular.....	106
2.2.-Corrientes nicotínicas (I_{ACh}).....	107
2.3.-Corrientes de sodio (I_{Na}).....	109
2.4.-Corrientes de calcio (I_{Ca}).....	110
2.5.-Corrientes de potasio dependientes de calcio ($I_{K(Ca)}$).....	111
2.6.-Corrientes de potasio dependientes de voltaje ($I_{K(V)}$).....	112
3.-SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS Y ENVEJECIMIENTO.....	113
3.1.-Secreción de catecolaminas inducida por K^+	113
3.1.1.-Análisis cinético de los eventos excitotóxicos únicos en respuesta a K^+	116
3.2.-Secreción de catecolaminas estimulada por ACh.....	118
3.2.1.-Análisis cinético de los eventos excitotóxicos únicos en respuesta a ACh.....	121
3.3.-Efectos del envejecimiento sobre la formación del poro de fusión.....	123
3.4.-Efectos del envejecimiento sobre otros eventos excitotóxicos.....	124

4.-POTENCIAL DE MEMBRANA Y POTENCIALES DE ACCIÓN DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	125
4.1.- V_m en reposo y disparo de PAs espontáneos	125
4.1.1.-Umbral de disparo de los PAs	127
4.1.2.-Análisis cinético de los PAs espontáneos.....	128
4.2.-V_m y PAs en respuesta a la estimulación con K^+ o ACh	130
4.2.1.-Variaciones en el V_m en respuesta a la estimulación con K^+	130
4.2.2.-Variaciones en el V_m en respuesta a la estimulación con ACh.....	132
4.2.3.-Análisis cinético de los PAs inducidos por el estímulo con ACh	133
4.3.-Efectos del envejecimiento sobre los PA inducidos eléctricamente	134
5.-PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA EXOCITOSIS EN LOS RATONES SAMR1 Y SAMP8.	136
V. DISCUSIÓN	141
VI. CONCLUSIONES	167
VII. BIBLIOGRAFÍA	171

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

[Ca²⁺]_c:	Concentración de calcio en el citosol	HHA:	Eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal
Aβ:	Péptido amiloide beta	HEPES:	(N-[2-hidroxietil]-piperacino-N'-[2-ácido etanosulfónico])
ACh:	Acetilcolina	HRP:	Peroxidasa de rábano (del inglés <i>Horseradish Peroxidase</i>)
AChE:	Acetilcolinesterasa	I_{ACh}:	Corriente nicotínica evocada por acetilcolina
AD:	Adrenalina	I_{Ca}:	Corriente de calcio
AMPA:	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico	I_K:	Corriente de potasio
APP:	Proteína precursora amiloide	I_{K(Ca)}:	Componente dependiente de calcio de la corriente de potasio
ATP:	Trifosfato de adenina	I_{K(V)}:	Componente dependiente de voltaje de la corriente de potasio
BCA:	Ácido bicinconínico	I_{Na}:	Corriente de sodio
BSA:	Albúmina de suero bovino	IRP:	Contingente de vesículas rápidamente liberables (del inglés "Immediately Releasable Pool")
CCDV_s:	Canales de calcio dependientes de voltaje	ISI	Periodo entre potenciales del acción (del inglés "Inter Spike Interval")
CC:	Célula cromafín	NA:	Noradrenalina
CCR:	Célula cromafín de ratón	nAChR:	Receptor nicotínico neuronal para la acetilcolina
ChAT:	Colino acetiltransferasa	NMDA:	Ácido N-metil-D-aspartico
CICR:	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺ (del inglés <i>Calcium induced calcium release</i>)	PA:	Potencial de acción
DMEM:	Medio de Eagle modificado por Dulbecco	PHP:	Post-hiperpolarización
EA:	Enfermedad de Alzheimer	PMCA:	Bomba de calcio de la membrana plasmática (del inglés <i>Plasma membrane calcium ATPase</i>)
EAF:	Enfermedad de Alzheimer familiar	PNMT	Feniletanolamina-N-metiltransferasa
EEM:	Error estándar de la media	PS1:	Presenilina-1
EP:	Enfermedad de Parkinson	PS2:	Presenilina-2
ERN:	Especies reactivas de nitrógeno	PVDF:	Polifluoruro de vinilideno
ERO:	Especies reactivas de oxígeno		
ESAM:	Eje simpático-adrenomedular		
EGTA:	Ácido etilenglicol-bis (beta-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético		
GTP:	Trifosfato de guanina		

RE:	Retículo endoplásmico	SNC:	Sistema nervioso central
RyR:	Receptor de rianodina	SNP:	Sistema nervioso periférico
SAM:	Modelo murino de senescencia acelerada (del inglés <i>Senescence-Accelerated Mouse</i>)	SNS:	Sistema nervioso simpático
SERCA:	Bomba de calcio de la membrana del RE (del inglés <i>Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase</i>)	SOD1	Superóxido dismutasa 1
SN:	Sistema nervioso	TEA:	Tetraetilamonio
SNA:	Sistema nervioso autónomo	TH:	Tirosina hidroxilasa
SNAP25:	Proteína asociada al sinaptosoma-25 (del inglés <i>Synaptosome Associated Protein 25</i>)	VAMP2:	Proteína de membrana asociada a vesículas-2 (del inglés <i>Vesicle-Associated Membrane Protein 2</i>)
SNARE	Complejo de proteínas de la maquinaria de la exocitosis (del inglés “ <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor</i> ”)	V_m:	Potencial de membrana
		TBS:	Tampón Tris salino
		TBST:	Tampón Tris salino con Tween-20

“Una gota de pura valentía vale más que un océano cobarde”

Miguel Hernández Gilabert. Poeta y dramaturgo español (1910-1942)

MARCO DE LA TESIS DOCTORAL

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento (ITH) de la Universidad Autónoma de Madrid, estando relacionada con una de las líneas de investigación que se desarrollan en el mismo orientada a la caracterización de los mecanismos de comunicación neuronal a nivel del sistema nervioso.

Es bien sabido que el sistema nervioso se caracteriza principalmente por su capacidad para transmitir información de unas neuronas a otras (mediante un lenguaje de tipo electroquímico), proceso que se conoce como “neurotransmisión”. Durante las últimas tres décadas, el ITH se ha centrado en el esclarecimiento de los distintos mecanismos y componentes que inician y regulan la neurotransmisión.

En el desarrollo de esta línea investigadora del ITH ha resultado primordial el uso de la célula cromafín de la médula suprarrenal como modelo experimental. La célula cromafín, considerada actualmente como un excelente modelo para el estudio de la exocitosis, comparte origen embrionario con las neuronas simpáticas y su función fisiológica consiste en la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo en respuesta a diversas situaciones que generan estrés. Esta liberación tiene lugar mediante un proceso de exocitosis dependiente de calcio (Ca^{2+}) y por ello no es de extrañar que las células cromafines, a similitud de las neuronas, posean todos los elementos necesarios para un estricto control, tanto espacial como cinético, de los transitorios de Ca^{2+} necesarios para regular las distintas etapas del proceso de neurotransmisión. Mediante la utilización de este modelo experimental, el ITH ha contribuido a dilucidar las diferentes vías de entrada de Ca^{2+} en la célula, la participación de distintos orgánulos en la redistribución de este ion en el citosol, así como los mecanismos que ponen fin a la señalización por Ca^{2+} y sacan este ion al exterior celular. Entre otros hallazgos, cabe destacar que el ITH ha contribuido a describir la existencia de varios subtipos de canales de calcio implicados en la generación de las señales de calcio y ha postulado la existencia de una tríada funcional integrada por los canales de calcio, la mitocondria y el retículo endoplásmico, que actúa regulando la circulación celular del calcio y la exo-endocitosis de neurotransmisores (García *et al.*, 2006).

Durante la última década esta línea de investigación se ha orientado hacia la aplicación de este conocimiento básico a distintos modelos de enfermedad, entre otras: la hipertensión arterial (Miranda-Ferreira *et al.*, 2008; Miranda-Ferreira *et al.*, 2009; Miranda-Ferreira *et al.*, 2010), la hipoxia en edades tempranas de la vida (Fernández-Morales *et al.*, 2009) y en enfermedades de tipo neurodegenerativo como la esclerosis lateral amiotrófica (Calvo-Gallardo *et al.*, 2015), la enfermedad de Alzheimer (de Diego *et al.*, 2012) o la enfermedad de Huntington (Martínez-

Ramírez *et al.*, 2018). En estas situaciones patológicas hemos encontrado alteraciones de la cinética del poro de fusión, que controla las últimas etapas de la exocitosis de neurotransmisores, lo que nos ha conducido a la hipótesis que implica la existencia de una alteración de la tríada funcional que controla las señales de calcio y las respuesta exocitóticas en la célula cromafín en estas patologías que cursan con alteraciones de los procesos neurosecretorios.

Como continuación a estos estudios se encuentra el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral orientado a la caracterización de posibles alteraciones en la excitabilidad celular y en los procesos de neurotransmisión que acontecen con el envejecimiento. Para ello, hemos empleado un modelo murino de envejecimiento acelerado (SAMP8) y su correspondiente control (SAMR1), en los que hemos investigado el comportamiento del poro de fusión exocitótico y la cinética de liberación del neurotransmisor en las células cromafines de estos ratones (mediante la técnica de amperometría en célula única) y las distintas corrientes iónicas implicadas en el proceso de neurotransmisión en la célula cromafín así como su excitabilidad celular (mediante la técnica electrofisiológica de “patch clamp”).

“Somos solo custodios temporales de las partículas de las que estamos hechos. Continuarán liderando una existencia futura en el enorme universo que las hizo”

Stephen William Hawking. Físico teórico, astrofísico, cosmólogo y divulgador científico británico (1942-2018)

I. INTRODUCCIÓN

El ineludible aumento de la población mundial que se ha ido produciendo a lo largo del último siglo, y el que se prevé para los próximos 50 años, plantea un complejo reto para las sociedades actuales, generando diversos desafíos en materia de economía, medioambiente y sostenibilidad. Según el último informe de Naciones Unidas (United-Nations, 2017), la población mundial crecerá desde los 7.550 millones de personas que habitaban el planeta en 2017, hasta los 9.772 millones en 2050. Sin embargo, uno de los problemas más serios a los que se tendrá que hacer frente no es tanto el aumento de la población, sino su envejecimiento. A este respecto, la Organización Mundial de la Salud alerta de que en apenas 35 años, la población mundial de más de 60 años se duplicará hasta los 2.100 millones de personas (OMS, 2015). Este aumento drástico de la población envejecida conduce, inexorablemente, a un aumento de la población que padecerá enfermedades de tipo neurodegenerativo, puesto que el mayor factor de riesgo en el desarrollo de éstas es la edad.

El estudio de las modificaciones fisiológicas que se producen durante el envejecimiento toma especial relevancia a la hora de entender los posibles mecanismos subyacentes de las enfermedades neurodegenerativas. Es por esa razón que, en esta Tesis Doctoral, se abordará la caracterización de posibles alteraciones que puedan acontecer en el acoplamiento estímulo-secreción de neurotransmisores durante el envejecimiento, utilizando la célula cromafín como modelo experimental. Para este fin, hemos empleado dos cepas de ratones cuyas características nos permiten realizar nuestro estudio comparativo abordando un envejecimiento completamente normal (modelo SAMR1) y un envejecimiento acelerado (modelo SAMP8). En esta Introducción se comentarán diferentes aspectos del envejecimiento y su posible correlación con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, las principales características de los dos modelos murinos escogidos, y las peculiaridades del acoplamiento estímulo-secreción que hacen de la célula cromafín un modelo ideal para estudiar los procesos de exo-endocitosis que acontecen durante el proceso de neurotransmisión.

1.-ENVEJECIMIENTO

No es fácil englobar en una sola definición un proceso que abarca millares de cambios y depende de numerosos factores, existiendo innumerables definiciones del envejecimiento según el contexto de estudio desde el que se defina (cronológico, social, psicológico o biológico). Esto se debe a que cada disciplina desarrolla sus propias teorías que describen el fenómeno del envejecimiento con pocos avances paralelos en la concepción de teorías que permitan comprenderlo y explicarlo. Así, por ejemplo, desde un punto de vista psicológico, el

envejecimiento se analiza desde el conductismo y las teorías del aprendizaje social, desde el psicoanálisis, el humanismo, las teorías cognitivas y abordajes psicosociales. Por otro lado, desde una perspectiva biológica, el envejecimiento incluye los cambios que virtualmente sufren todos los sistemas biológicos con el paso del tiempo y supone bases fisiológicas y neurobiológicas asociadas a cambios funcionales, sistémicos, neuroquímicos y morfológicos (Fernández, 2004).

En esta Tesis Doctoral se abordará el envejecimiento desde un punto de vista biológico, dentro del cual también existen diversas definiciones. Por ejemplo, la OMS define el envejecimiento como *“la consecuencia de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, lo que lleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, un aumento del riesgo de enfermedad, y finalmente a la muerte”*. Otra definición es la que aparece recogida en la Enciclopedia Británica y lo define como *“el cambio gradual e intrínseco en un organismo que conduce a un riesgo creciente de vulnerabilidad, pérdida de vigor, enfermedad y muerte. Tiene lugar en una célula, un órgano o en la totalidad del organismo durante el período vital completo como adulto de cualquier ser vivo”*. Finalmente, cabe destacar la aportación del científico Bertrand Strehler, quien describió cómo debían ser los cambios ligados a la edad y que definió el envejecimiento como *“un proceso de desorganización gradual e irreversible que ocurre con el paso del tiempo, causa una pérdida progresiva de la capacidad bioenergética y el rendimiento funcional e imposibilita la supervivencia ilimitada de los sujetos humanos y miembros de otras especies de metazoos, incluso en un hábitat óptimo”*.

La posible causa de esta gran variabilidad a la hora de definir el envejecimiento puede atribuirse a las numerosas teorías (más de 300) que intentan explicar este proceso (Medvedev, 1990). Además, debemos tener en cuenta que cada avance científico que se produce en los campos de la biología celular y molecular contribuye a generar nuevas teorías y/o completa o descarta a las antiguas.

En cualquier caso, cada una de estas teorías debe tener en cuenta que para que un cambio ligado a la edad se pueda considerar como parte de un envejecimiento no patológico es necesario que presente las siguientes características (Strehler, 1959): debe ser **universal** (tiene que ocurrir en todos los individuos de una especie, en lugar de en casos aislados que podrían sufrir las consecuencias de accidentes o genotipos anormales), **de naturaleza intrínseca** (necesario para distinguir el envejecimiento natural de otras alteraciones que pueden surgir con el paso del tiempo a causa de factores nocivos del medio ambiente), **de carácter progresivo** (debe ser un

proceso que ocurre gradualmente y no un fenómeno repentino) y **perjudicial** (debe disminuir la funcionalidad de los organismos).

Ante la complejidad de intentar explicar brevemente las múltiples teorías sobre el envejecimiento, en esta Introducción intentaremos simplificarlas diferenciando entre dos tipos de teorías, a saber:

1.1.-Teorías estocásticas

Son aquellas que plantean la existencia de diversas variables aleatorias que hacen que el envejecimiento resulte ser un proceso azaroso y que, por tanto, debería ser estudiado mediante cálculos probabilísticos.

Se basan en la acumulación de acontecimientos perjudiciales debido a la exposición a factores exógenos adversos. Consideran como principal responsable del proceso al genoma y, por otro lado, se tiene en cuenta a una serie de fenómenos ambientales que desestabilizan la homeostasis celular.

Estas teorías se pueden describir mediante diferentes alteraciones que acontecen a diferentes niveles de organización: a nivel molecular, a nivel celular o a nivel de sistemas u órganos.

1.1.1.-Alteraciones a nivel molecular

1.1.1.1.-Teorías genéticas:

Aquí se encuentran englobadas tres teorías:

- a) ***Teoría de la regulación génica***: establece que las diferentes especies animales presentan un conjunto de genes que aseguran su desarrollo y su reproducción; la duración de la fase de reproducción dependerá de la defensa que el organismo haya sido capaz de desarrollar frente a determinados factores externos adversos. Esta teoría defiende, por tanto, que el envejecimiento es el resultado de un desequilibrio de los factores que hubiesen permitido mantener la fase de reproducción (Kanungo, 1980).
- b) ***Teoría de la diferenciación terminal***: propone que el envejecimiento es resultado de la inestabilidad en la regulación genética, particularmente de los efectos adversos del metabolismo sobre ésta (Cutler, 1991).
- c) ***Teoría de la inestabilidad del genoma***: defiende que un denominador común del envejecimiento es la acumulación de daño en los genes a lo largo de toda la vida del individuo. La integridad y estabilidad del ADN se enfrentan continuamente a agentes

exógenos físicos, químicos y biológicos, así como a amenazas endógenas, incluidos los errores de replicación del ADN, reacciones hidrolíticas espontáneas y especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas lesiones genéticas surgen de daños muy diversos que incluyen: mutaciones puntuales, translocaciones, ganancias y pérdidas cromosómicas, el acortamiento de los telómeros y la alteración genética causada por la integración de virus y transposones. Además de estas lesiones directas en el ADN, también se puede generar inestabilidad en el genoma por defectos en la arquitectura nuclear, que son conocidos como laminopatías (López-Otín *et al.*, 2013).

1.1.1.2.-Teoría de la mutación somática

En 1959, Szilard propuso que el envejecimiento ocurre como resultado de la acumulación de mutaciones en el ADN nuclear de las células somáticas, describiendo que ocurren “golpes” que “destruyen” cromosomas a lo largo de la vida, que son característicos de la especie y no varía apreciablemente de individuo a individuo (Szilard, 1959).

Años más tarde se agregó a esta teoría el concepto de que la causa principal del envejecimiento celular es una inestabilidad del genoma mitocondrial por una falta de equilibrio entre la reparación mitocondrial y el microambiente oxidativo de las mitocondrias. Al verse afectada la generación de ATP, estas células estarían abocadas a sufrir un déficit en el funcionamiento fisiológico y, finalmente, la muerte (Miquel y Fleming, 1984).

Actualmente se sabe que las mutaciones en el ADN mitocondrial causan una gran variedad de enfermedades mitocondriales y están muy implicadas en enfermedades asociadas a la edad y al envejecimiento. Además, hay muchas evidencias de que la mayoría de mutaciones en el ADN mitocondrial se generan por errores en la replicación y no por el daño acumulado (Park y Larsson, 2011).

1.1.1.3.-Teoría del error-catástrofe

Esta teoría propone que los errores transcripcionales y/o traduccionales que se producen en la síntesis de proteínas durante el envejecimiento causan proteínas aberrantes y esto, a su vez, provoca una cascada de errores que conduce a la pérdida “catastrófica” de la homeostasis celular que inevitablemente derivará en la muerte celular (Orgel, 1963).

Sin embargo, los errores en la síntesis de proteínas suelen ser raros, y es por ello que la mayoría de científicos han abandonado esta teoría. Lo que sí que se ha descrito es la aparición de alteraciones post-traduccionales que conducen a la aparición de formas anómalas de proteínas.

Actualmente, las alteraciones de este tipo más estudiadas son las que se producen por sistemas de oxidación catalizados por metales, ya que tienen el potencial de inactivar enzimas (Oshima *et al.*, 2013).

1.1.1.4.-Teoría de las uniones cruzadas de estructuras celulares

La teoría de las uniones cruzadas, también conocida como la “teoría de la glicosilación”, fue propuesta por Johan Bjorksten en 1942. Defiende que una acumulación de proteínas entrecruzadas daña las células y los tejidos, ralentizando los procesos corporales que resultan en el envejecimiento.

La glicosilación comienza con la reacción de la glucosa con residuos de lisina y con ciertas bases de ácidos nucleicos, formándose productos finales de glicosilación avanzada que alteran la función biológica de las proteínas extracelulares. La mayoría de estudios que relacionan esta teoría con el envejecimiento no han sido concluyentes, sin embargo, algunos de ellos han demostrado que ciertas proteínas de cerebros humanos jóvenes a las que se les ha expuesto agentes de entrecruzamiento (p.ej. glutaraldehído) podrían asemejarse mucho a las proteínas de cerebros envejecidos (Bjorksten y Tenhu, 1990).

1.1.2.-Alteraciones a nivel celular

1.1.2.1.-Teoría de la acumulación de productos de desecho

Esta teoría fue descrita por primera vez por Sheldrake, quien propuso que el envejecimiento celular se puede explicar en términos de la acumulación de productos de desecho, algunos de los cuales pueden ser perjudiciales para la célula; la única manera que las células podrían evitar su mortalidad sería creciendo y dividiéndose, diluyendo los productos de desecho acumulados (Sheldrake, 1974). Una de las evidencias que apoyan esta teoría es, por ejemplo, la acumulación de lipofuscina (un polímero de lípidos y fosfolípidos derivado de la peroxidación lipídica) que se produce a lo largo del envejecimiento. Este producto de desecho se va acumulando en forma de pequeños gránulos en el interior celular y aumenta de tamaño a medida que aumenta la edad.

1.1.2.2.-Teoría de la telomerasa

Los telómeros son regiones de ADN no codificante que tienen como función la estabilidad e integridad de los cromosomas. En células somáticas, los telómeros se hacen progresivamente más cortos a medida que aumenta la edad (con cada división celular) por la pérdida de actividad

de la telomerasa (enzima encargada de la reparación y el reemplazo de los telómeros), regulando así el “reloj biológico” que controla la vida útil de las células en división. Esto ha llevado a la proposición de que la actividad de la telomerasa es determinante en el envejecimiento (Goyns y Lavery, 2000).

En relación con esta teoría, también se ha descrito un efecto contrario al envejecimiento, esto es, diversos cambios oncogénicos pueden ayudar a que células con telómeros cortos escapen de la senescencia y se conviertan en células inmortales y/o cancerígenas, generalmente a través de una activación de la telomerasa (Shay, 2016).

1.1.2.3.-Teoría de los radicales libres

Esta teoría fue descrita originalmente por Denham Harman en 1956, que propuso que los organismos envejecen porque acumulan daño oxidativo (Harman, 1956). Este daño proviene de especies reactivas de oxígeno (ERO), que son metabolitos parcialmente reducidos por el oxígeno molecular generado como producto de reacciones metabólicas o como subproductos de diversos procesos celulares, como la respiración.

Ésta ha sido una de las teorías sobre el envejecimiento más valorada, existiendo un gran número de publicaciones cada año que respaldan que la producción de ERO y el daño oxidativo aumentan con la edad, que la reducción del daño oxidativo aumenta la vida útil de diversos organismos, y que una mayor producción de ERO acorta la esperanza de vida (Kirkwood y Kowald, 2012). A pesar de este amplio respaldo, esta teoría resulta controvertida en la actualidad, habiéndose publicado un inmenso número de trabajos que la contradicen y consideran que limita la comprensión del envejecimiento (Gladyshev, 2014; Liochev, 2015).

1.1.3.-Alteraciones a nivel de sistemas orgánicos

1.1.3.1.-Teoría inflamatoria

Aunque la implicación del proceso inflamatorio en diferentes patologías (aterosclerosis, diabetes, demencias...) está ampliamente demostrada, su importancia en el proceso de envejecimiento ha comenzado a coger fuerza desde hace no muchos años. Actualmente, se le considera como una piedra angular de los mecanismos que subyacen al proceso de envejecimiento, incluso se habla de “envejecimiento inflamatorio” (o en inglés “inflamm-aging”). Éste es un término que originalmente propuso Claudio Franceschi para describir el estado inflamatorio característico del envejecimiento asociado con la exposición crónica a antígenos (de origen endógeno o exógeno) y al estrés (Franceschi *et al.*, 2000). Las reiteradas

exposiciones a diferentes tipos de estrés a lo largo de la edad, aumentan la necesidad del funcionamiento del sistema inmunológico innato, lo cual genera un fenotipo inflamatorio. Éste se trata de un estado de inflamación crónica de bajo grado, controlada y asintomática, sin embargo, favorece el daño a nivel molecular, celular, orgánico y de sistemas.

Es importante subrayar que la inflamación se asocia con la base de otras teorías del envejecimiento. Por ejemplo, existe una estrecha relación entre la inflamación y el daño oxidativo, ya que la superproducción o liberación descontrolada de ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) es un importante factor que causa inflamación tisular (Cesari *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta que los últimos pasos de otras teorías del envejecimiento van a relacionarse con procesos inflamatorios, esta teoría es una de las más estudiadas en la actualidad y cuenta con un gran número de trabajos que la avalan.

1.1.3.2.-Teoría inmunológica

Esta teoría se basa en la premisa de que con el envejecimiento las respuestas inmunes disminuyen, lo que contribuye al aumento en la incidencia de enfermedades crónicas lo que, relacionando esta teoría con la anterior, podría tener un componente inflamatorio. Además, la inmunosenescencia se caracteriza por una disminución de la resistencia a enfermedades infecciosas, una disminución a la protección contra el cáncer, y una falta de reconocimiento del propio cuerpo dando lugar a patologías autoinmunes (Franceschi *et al.*, 2000).

Sin embargo, no todas las funciones inmunes se ven afectadas por igual durante el envejecimiento. Por una parte, el timo en humanos, encargado de la selección y maduración de las células T, alcanza su máxima funcionalidad durante la pubertad. Posteriormente se atrofia y comienza a disminuir la producción de células T y hormonas maduras (George y Ritter, 1996). Por el contrario, las actividades de otros linfocitos (p.ej. los linfocitos “Natural Killer”) y el sistema del complemento no parecen verse afectados por el envejecimiento.

Además, como ya se ha visto anteriormente, muchas de estas teorías se entrelazan, dado que las células inmunes están altamente influenciadas por el equilibrio entre los estados antioxidante/oxidante y de ahí que los sistemas inmunitarios se puedan ver afectados por el aumento de radicales libres que se produce durante el envejecimiento (Knight, 2000).

1.1.3.3.-Teoría neuroendocrina

Esta teoría postula que el envejecimiento resulta de alteraciones funcionales en el control neuronal y en la respuesta endocrina del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HHA), lo que produce una disfunción de la actividad de las glándulas endocrinas y de sus órganos diana, así como desequilibrios en la comunicación hormonal cruzada y de la señalización entre los diferentes ejes endocrinos.

Una de las principales funciones del eje HHA es producir las respuestas fisiológicas necesarias para la conservación y mantenimiento de la homeostasia celular ante los continuos cambios del medio externo. A lo largo de la vida de un organismo, la exposición crónica a situaciones de estrés derivadas de una multitud de factores físicos, biológicos o emocionales, pueden llegar a agotar o debilitar la capacidad de adaptación mediada por el eje HHA. Así, podríamos decir que el envejecimiento resultaría de una disminución de la capacidad de adaptación y supervivencia al estrés (Weinert y Timiras, 2003).

Además, no solo se han observado alteraciones en el eje HHA sino también en el eje simpático adrenomedular. La glándula adrenal (que se verá en detalle más adelante) se encarga de la secreción de las catecolaminas adrenalina (AD) y noradrenalina (NA) a la circulación en respuesta a diversos estímulos estresantes.

Durante el envejecimiento, se ha observado un menor número de receptores adrenérgicos y una disminución de su sensibilidad (Scarpace et al., 1991; Farrell y Howlett, 2008). Sin embargo, aunque todavía no se han descrito bien los mecanismos subyacentes implicados, se ha observado que las concentraciones plasmáticas de NA aumentan con la edad (Esler et al., 1995), aunque puede deberse también a que su degradación se reduce durante el envejecimiento (Morrow et al., 1987). También se ha observado una menor secreción en reposo de AD de la médula adrenal, pero en plasma no se ven cambios significativos (Seals y Esler, 2000), lo que se puede deber también a una menor degradación de la AD durante la edad. En respuesta al estrés también se observa una menor secreción de AD a edades avanzadas (Esler et al., 2002). Finalmente, también se ha descrito un aumento de la actividad en reposo del sistema nervioso simpático (SNS) (Iwase et al., 1991).

Finalmente, hay que subrayar que la teoría endocrina y la inmunológica están altamente relacionadas, puesto que muchas hormonas que se ven afectadas durante el envejecimiento controlan funciones inmunes y, a la inversa, numerosas citoquinas estimulan la secreción de hormonas afectando a la función neuroendocrina (Weinert y Timiras, 2003).

1.2.-Teorías deterministas

Son aquellas que engloban los fenómenos que se describen a través de un número limitado de variables conocidas, que evolucionan exactamente de la misma forma cada vez que se repite el fenómeno estudiado y que no ocurren al azar.

Estas teorías sugieren que los distintos procesos que pueden ocurrir en el envejecimiento estarían programados de forma innata en el genoma de cada organismo. En este bloque podemos distinguir las siguientes teorías:

1.2.1.-Teoría de la capacidad replicativa finita de las células

Contrariamente a lo que se pensó durante muchos años con respecto a que las células humanas eran capaces de replicarse de forma indefinida en cultivos celulares, en 1961 Hayflick y Moorhead establecieron que los fibroblastos humanos obtenidos de un embrión eran capaces de duplicarse hasta un máximo de 50 veces, estableciéndose así el llamado “límite de Hayflick” que describe la limitación proliferativa de las células humanas (Hayflick y Moorhead, 1961). En relación a este fenómeno, se ha descrito que la capacidad de las células para duplicarse se reduce progresivamente con la edad del donante, existiendo una relación inversa entre la edad del donante y la división potencial de células *in vitro*.

Esta teoría guarda cierta relación con la teoría de la telomerasa, ya que como se ha comentado anteriormente, los telómeros podrían considerarse en cierto modo el reloj biológico que determina la capacidad proliferativa de las células. El acortamiento progresivo de éstos que se produce a medida que aumenta la edad del individuo por pérdida de la acción de la telomerasa, conduce inevitablemente a la reducción de la capacidad duplicativa de las células y, por ende, al envejecimiento del organismo (Goyns y Lavery, 2000).

1.2.2.-Teorías evolutivas

Estas teorías parten de la base de que el envejecimiento es un proceso perjudicial para el individuo, pero que constituye una característica normal en la vida de los animales superiores, siendo en cierta medida un proceso de selección natural. Teniendo en cuenta que la evolución intenta mejorar la “salud reproductiva” de la especie, la longevidad solo sería seleccionada en caso de que resultase beneficiosa para esa salud reproductiva.

Estas teorías apoyan por tanto la idea de que el envejecimiento no está programado genéticamente, sino que es el resultado de diversos procesos biológicos normales que resultan

necesarios para diversos aspectos de la vida (particularmente para la reproducción de la especie). Dentro de este apartado podríamos hablar de tres teorías:

1.2.2.1.-Teoría del recambio poblacional

Esta teoría postula que la senescencia es una adaptación necesaria ya que sin ella el recambio y renovación de las poblaciones resultaría perjudicado. Según esta teoría evolutiva, solo los individuos más aptos son los que dejarían su impronta en la descendencia, seleccionándose aquellas modificaciones genéticas que mejoran las aptitudes de los individuos.

1.2.2.2.-Teoría de las mutaciones perjudiciales

Esta teoría propone que las mutaciones perjudiciales que se activan tarde son las responsables del envejecimiento ya que los alelos que pudieran resultar perjudiciales van a persistir en la especie al manifestarse tardíamente (en fases avanzadas de madurez sexual). Un ejemplo representativo de esta teoría sería lo que ocurre con la enfermedad de Huntington, consecuencia de una mutación letal dominante, que permanece en la población a pesar de que desde un punto de vista evolutivo idealmente debería desaparecer. Al ser una enfermedad de aparición tardía (generalmente a partir de los 30-40 años), permite que un portador se reproduzca antes de morir y siga así transmitiendo la enfermedad a su descendencia, evitándose una posible selección natural.

Esta teoría inspiró la *teoría de la acumulación de mutaciones*, que sugiere que el envejecimiento se produce por la acumulación de mutaciones de acción tardía. Sin embargo, no tiene muchas evidencias experimentales.

1.2.2.3.-Teoría del soma desechable

Esta teoría postula que el envejecimiento es el resultado de un desajuste entre la supervivencia tardía y la fecundidad temprana. El organismo somático se mantiene solo para el éxito reproductivo y después es desechable, por lo que la evolución busca conseguir un equilibrio óptimo entre supervivencia y reproducción. A pesar de incluirse por algunos autores entre las teóricas del envejecimiento, no explica ninguna causa de éste, sino tan solo que la vida tiene una duración determinada.

1.3.-Resumen de daños que ocurren durante el envejecimiento

Una vez descritas brevemente las diferentes teorías que tratan de explicar el proceso del envejecimiento, se puede observar un inmenso abanico de posibles alteraciones que se pueden producir a lo largo de la edad. Como se muestra esquemáticamente en la **Figura 1**, sobre una posible predisposición genética van a influir los factores ambientales, que generalmente contribuyen a acelerar el proceso de envejecimiento.

La conjunción de estos condicionantes genéticos y factores externos, puede conducir a diferentes tipos de alteraciones: daños en el ADN, cambios epigenéticos, daño oxidativo y/o nitrosativo, acumulación de desechos a nivel intracelular, procesos inflamatorios, respuestas inmunes anómalas, alteraciones neuroendocrinas o alteraciones en la homeostasis de proteínas. Finalmente, debemos destacar que todas estas alteraciones pueden interconectarse presentando orígenes diferentes o siendo una la consecuencia de otra, lo que dificulta tremendamente los estudios del envejecimiento.

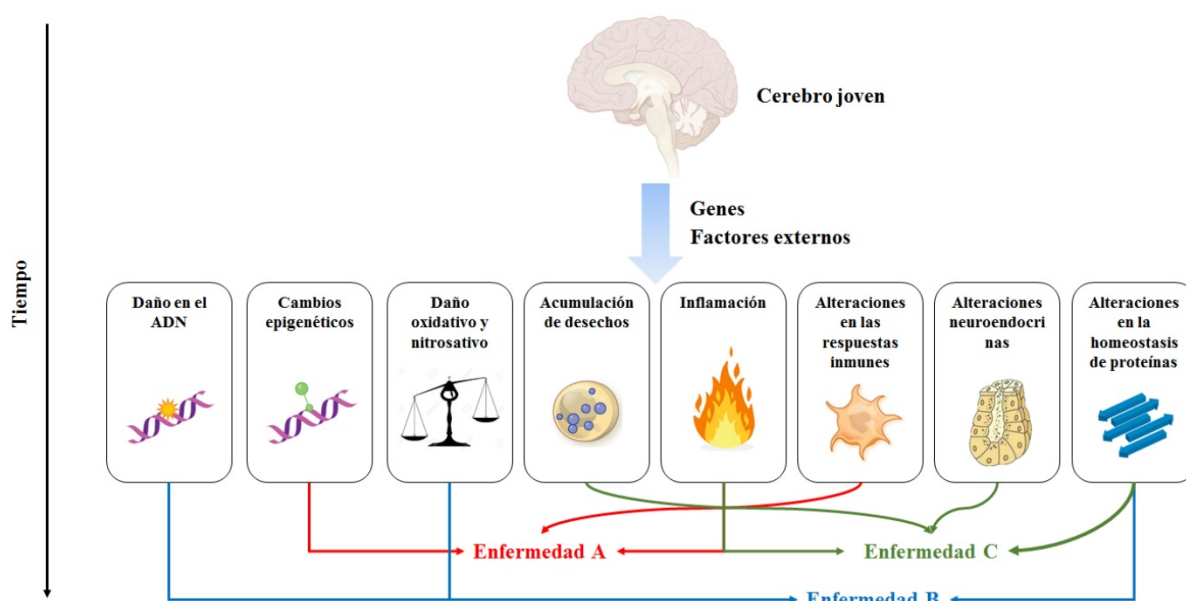


Figura 1. Resumen de los daños descritos durante el envejecimiento. Daños descritos por las diferentes teorías del envejecimiento y que según su posible aparición a lo largo del tiempo (en este caso en el cerebro), pueden originar diferentes enfermedades. Esquema modificado de Wyss-Coray (2016).

Debemos llamar la atención al hecho de que muchas de las características fisiopatológicas que se aprecian en los cerebros envejecidos (**Figura 1**) muestran ciertas analogías con alteraciones que acontecen en las distintas enfermedades de tipo neurodegenerativo, por lo que surge la cuestión de si estas alteraciones características del envejecimiento “normal” son meros cambios sin importancia o, si por el contrario, éstas son los heraldos de las enfermedades

neurodegenerativas que se pueden producir en el futuro de los individuos que padecen estos cambios y que, según el tipo de alteración/es que se genere/n, desembocará en un tipo de enfermedad neurodegenerativa u otra.

2.-ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Los factores estocásticos de una persona (representados por la genética) y distintos factores medioambientales pueden determinar el tipo de enfermedad neurodegenerativa que dominará su cerebro en un futuro. No es difícil, por tanto, ver las enfermedades neurodegenerativas como expresiones de un envejecimiento acelerado. Es por eso que también debemos intentar comprender los mecanismos que subyacen en las diferentes enfermedades neurodegenerativas y tratar de relacionarlos con los cambios observados durante el proceso de envejecimiento, esto es ver cuáles de ellos coinciden con el proceso de envejecimiento y qué importancia tienen éstos en el desarrollo de la enfermedad.

Describiremos a continuación, de forma breve, las características que presentan las principales enfermedades neurodegenerativas, haciendo especial énfasis en aquellas que se podrían correlacionar con alteraciones propias del envejecimiento.

2.1.-Envejecimiento y enfermedad de Alzheimer

Se estima que, actualmente, alrededor de 50 millones de personas padecen algún tipo de demencia en el mundo y, de acuerdo con las proyecciones de crecimiento de la población mundial que se detallaban al principio de la Introducción, en el año 2030 la padecerán alrededor de 82 millones de personas y en 2050, alrededor de 151 millones (Patterson, 2018). Claramente este no se debe solo al aumento de la población mundial, sino al envejecimiento de dicha población, ya que no hay que olvidar que el mayor factor de riesgo de las demencias es la edad, siendo su prevalencia de entre 5-8% para personas de entre 60 y 65 años, y mostrando un patrón de crecimiento exponencial con la edad, doblándose cada cinco años (Garré-Olmo, 2018).

En 1907, el psiquiatra y neurólogo alemán Alois Alzheimer describió por primera vez, en una paciente llamada Auguste Deter, las características histopatológicas de una enfermedad que cursaba con deterioro cognitivo progresivo, alucinaciones y delirios. Estas características histopatológicas que describió son las que actualmente se denominan como **placas seniles** (formadas por la agregación extracelular de la proteína β amiloide ($A\beta$)) y los **ovillos**

neurofibrilares (formados por la desestructuración de los microtúbulos a causa de una hiperfosforilación de la proteína tau) (Alzheimer *et al.*, 1995).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia representando el 60% de los casos. Normalmente se presenta como una enfermedad esporádica, sin embargo, en torno a un 2-5% de los casos aparece en forma familiar (EAF). Todos los estudios sobre la incidencia de la EA coinciden en mostrar que se trata de una patología que, al igual que todas las demencias, aumenta con la edad y presenta un patrón de crecimiento exponencial a partir de los 65 años (3% en personas de 65 a 74 años, 17% en personas de 75 a 84 años y 32% en mayores de 85 años). Aun así, la EA no se puede considerar como parte del envejecimiento ya que una edad avanzada no es suficiente para causarla.

A pesar de que la EA fue descrita hace más de un siglo, sus causas son todavía hoy desconocidas. Sin embargo, cada vez hay más teorías sobre las alteraciones fisiopatológicas involucradas en su origen, muchas de las cuales están estrechamente relacionadas con las alteraciones que se producen en un cerebro con un envejecimiento no patológico. Las hipótesis fisiopatológicas que se consideran actualmente como origen de esta patología y que guardan mayor relación con el envejecimiento son las siguientes:

2.1.1.-Hipótesis colinérgica

Es una de las hipótesis más estudiadas debido al papel del neurotransmisor fisiológico acetilcolina (ACh) en la memoria y el aprendizaje, y a su potencial terapéutico. Surgió a raíz de los estudios en los que se ha visto que durante la EA se produce: un déficit a nivel neocortical de la enzima responsable de la síntesis de la acetilcolina (ACh), la colina acetiltransferasa (ChAT); una reducción en la recaptación de colina y en la liberación de ACh; y la pérdida de somas de neuronas colinérgicas (Francis *et al.*, 1999).

Durante el envejecimiento también se han visto cambios en el sistema colinérgico, entre otros una disminución de la capacidad de respuesta del sistema colinérgico debido a una menor síntesis y liberación de ACh en la corteza e hipocampo (Decker, 1987), una menor actividad de la ChAT y de la acetilcolinesterasa (AChE) y un menor número de receptores muscarínicos (Yufu *et al.*, 1994). Aun así, a diferencia de la EA, no parece haber una clara pérdida de neuronas colinérgicas.

2.1.2.-Hipótesis amiloidogénica

Esta hipótesis propuesta en 1991 por John Hardy y David Allsop, postula que, debido a la acumulación de la proteína beta amiloide ($A\beta$) en la EA (resultante de la escisión aberrante de la proteína precursora de $A\beta$ (APP) por acción de las enzimas β -secretasa y γ -secretasa), se producen alteraciones en los niveles de diversos neurotransmisores, en las enzimas encargadas de metabolizarlos y en sus receptores (Hardy y Allsop, 1991), lo que conduce al desarrollo de un déficit cognitivo.

Sin embargo, se ha observado que en torno a un 20-30% de pacientes ancianos (75-85 años) presentan un depósito de proteína $A\beta$ similar a la observada en pacientes de EA sin que éste se acompañe de EA ni de déficits cognitivos (Rodríguez *et al.*, 2009). Por lo tanto, la presencia de placas seniles de $A\beta$ es una característica patológica de EA que ocurre también durante el envejecimiento no patológico.

Es posible que esta discrepancia se pueda explicar con la hipótesis de la reserva cognitiva, la cual postula que algunos individuos se encuentran mejor equipados para enfrentar los desafíos neurofisiológicos que ocurren en el proceso de envejecimiento atribuyéndose generalmente a niveles más altos de educación e inteligencia. Por lo tanto, es posible que las alteraciones estructurales y funcionales que ocurren en el cerebro con el envejecimiento se atenúen, retrasen o enmascaren en personas con una mayor reserva cognitiva (Stern, 2009).

2.1.3.-Hipótesis de la taupatía

Esta hipótesis postula que la EA se debe principalmente a la hiperfosforilación de la proteína tau. Cuando tau se hiperfosforila, el ensamblaje de los microtúbulos se desestructura, lo que produce una degeneración celular y la aparición de los ovillos neurofibrilares (Goedert *et al.*, 1992).

Sin embargo, se ha observado que también se produce hiperfosforilación de tau y aparición de ovillos neurofibrilares en cerebros sanos de individuos envejecidos (Scholl *et al.*, 2016). Es importante destacar que la presencia de ovillos neurofibrilares se ha asociado con la pérdida de memoria durante el envejecimiento patológico y el no patológico, mientras que la relación con las placas de beta amiloide no está tan clara (Guillozet *et al.*, 2003).

2.1.4.-Hipótesis del calcio

Teniendo en cuenta la vital importancia del catión Ca^{2+} en la excitabilidad celular y en los procesos de comunicación interneuronal, es lógico que su homeostasia esté estrictamente regulada. Igualmente, no es de extrañar que en el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas la homeostasis del Ca^{2+} se pueda ver alterada, lo que ha llevado a postular la denominada *hipótesis del calcio*, que intenta explicar tanto la EA como el envejecimiento (Khachaturian, 1994; Nikolettou y Tavernarakis, 2012).

Durante el **envejecimiento** la homeostasia del Ca^{2+} se puede ver alterada de diversas formas, habiéndose observado, entre otros: i) un aumento en la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDVs) (Landfield y Pitler, 1984; Thibault y Landfield, 1996); ii) una disminución de la salida de Ca^{2+} a través de las bombas de calcio de la membrana plasmática (PMCA) (Michaelis *et al.*, 1996); iii) un aumento de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (RE) a través de los receptores de inositol trisfosfato (InsP_3Rs) y de rianodina (RyRs) (Thibault *et al.*, 2007); iv) un aumento en la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) (Gant *et al.*, 2006); v) una disminución de la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA (Lehohla *et al.*, 2008); vi) un deterioro de la bomba SERCA; y vii) una disminución en la capacidad de aclaramiento del Ca^{2+} por parte de la mitocondria (Murchison y Griffith, 1999). Todas estas alteraciones que acontecen a lo largo de la edad conducen a un mismo proceso, esto es, a un aumento de las concentraciones basales de Ca^{2+} intracelular.

En la EA se producen cambios muy similares que también conducen a un aumento mantenido del Ca^{2+} citosólico, si bien se producen incluso en mayor número. En esta enfermedad, como se ha comentado previamente, representan un papel muy importante los depósitos de $\text{A}\beta$, que pueden afectar directamente a la entrada de Ca^{2+} y a sus niveles intracelulares. Con respecto a las alteraciones en la entrada de Ca^{2+} , se ha descrito que el $\text{A}\beta$ en su forma agregada puede favorecer la apertura de los receptores ionotrópicos activados por glutamato NMDA y AMPA (Domingues *et al.*, 2007; Ferreira y Klein, 2011) y la activación de receptores sensibles a Ca^{2+} y, con ello, la apertura de canales que permean este catión (Ye *et al.*, 1997); por otro lado, puede bloquear canales de K^+ de rápida inactivación favoreciendo así la despolarización celular y contribuir con ello a la muerte celular (Good *et al.*, 1996). Igualmente se ha descrito que los oligómeros de $\text{A}\beta$ facilitan la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDVs (principalmente del subtipo L aunque también a través de los del subtipo N) (Silei *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2007). En cuanto al manejo del Ca^{2+} intracelular se ha observado un aumento de la expresión y la función de los RyRs (Kelliher *et al.*, 1999) y que las mutaciones en la presenilina 1 y 2 (PS1 y PS2) producen

un incremento del flujo de Ca^{2+} desde el RE mediado por IP_3 (Leissring *et al.*, 1999; Leissring *et al.*, 2000).

En definitiva, en ambos casos (EA y envejecimiento) se produce un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, si bien en la EA pueden participar un mayor número de factores ($\text{A}\beta$, mutaciones en PS1 y PS2), pudiendo conducir así a una mayor muerte celular. Es de destacar que diversos estudios realizados en animales y humanos han demostrado que en la EA el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se produce antes que la patología producida por $\text{A}\beta$ (Etcheberrigaray *et al.*, 1998).

2.1.5.-Hipótesis del estrés oxidativo

Al igual que una de las teorías que trata de explicar el envejecimiento describe la importancia del estrés oxidativo en su desarrollo, también hay numerosos estudios que lo identifican como una de las causas del inicio y progresión de la EA. Así, a modo de ejemplo, en la EA se ha observado un aumento de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD) en cerebros post-mortem de pacientes con EA, que se produciría como posible respuesta ante un mayor metabolismo de peróxido en el cerebro (Martins *et al.*, 1986), habiéndose descrito igualmente un aumento de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que produce peróxido de hidrógeno mediante la dismutación de radicales superóxido.

También se ha descrito que el $\text{A}\beta$ se acumula a nivel mitocondrial, lo que conduce a una disminución de la actividad de los complejos III y IV de la cadena respiratoria. Esto genera una menor actividad mitocondrial iniciando un círculo vicioso en el que la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, el estrés oxidativo y la disminución de la síntesis de ATP inducen una sobrecarga adicional de Ca^{2+} y un mayor estrés oxidativo (Giorgi *et al.*, 2012).

2.1.6.-Hipótesis de la neuroinflamación

Se ha descrito que la neuroinflamación podría preceder a la muerte neuronal, tanto en la EA como en otras enfermedades de tipo neurodegenerativo, dando una gran importancia a ciertas citoquinas y especies reactivas que activan la cascada de la muerte celular y la neurodegeneración (Morales *et al.*, 2014).

En el caso de la EA, se ha descrito un aumento de numerosos mediadores inflamatorios como las citoquinas, el complemento, la ciclooxigenasa o las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Rogers *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que existe una alta expresión de estos

mediadores inflamatorios en la vecindad de los depósitos de A β y los ovillos neurofibrilares, que a su vez están asociados con áreas de alta neurodegeneración (Akiyama *et al.*, 2000).

Como hemos comentado anteriormente, la teoría inflamatoria del envejecimiento postula la existencia de una inflamación crónica, de bajo grado, controlada y asintomática; sin embargo, en la EA esta inflamación está descontrolada y conduce a la muerte neuronal.

2.1.7.-Hipótesis de la excitotoxicidad por glutamato

Esta hipótesis postula que niveles elevados de aminoácidos excitatorios como el glutamato pueden producir una activación prolongada de sus receptores (fundamentalmente de los de tipo AMPA y NMDA), favoreciendo con ello una entrada masiva de Na⁺ y Ca²⁺ en las neuronas, lo que desencadenaría una cascada de acontecimientos que finalizarían con la muerte neuronal. Sin embargo, no se han encontrado evidencias de niveles elevados de aminoácidos excitatorios en la EA.

En relación a esta hipótesis, las distintas alteraciones que se producen durante el envejecimiento y la EA contribuyen a un estado en el que la neurona se encuentra con niveles anormalmente altos de Ca²⁺ intracelular, con procesos de estrés oxidativo y nitrosativo, peroxidación lipídica y niveles energéticos insuficientes entre otros procesos. Esta situación podría favorecer un aumento de la susceptibilidad neuronal al daño excitotóxico, con lo que se podrían desencadenar procesos de muerte neuronal incluso ante niveles normales de aminoácidos excitatorios (Gazulla y Cavero-Nagore, 2006).

En esta dirección cabe destacar que se han observado cambios funcionales y en la expresión de los receptores NMDA a lo largo del envejecimiento en diferentes modelos animales, lo que apoyaría la idea de una mayor participación de los procesos de excitotoxicidad a edades avanzadas. En el caso de la EA también se ha descrito un aumento en la expresión de los receptores NMDA en estadios iniciales de la enfermedad (Magnusson, 2012).

2.2.-Envejecimiento y esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), descrita por primera vez en 1869 por el neurólogo francés Jean Martin Charcot, es una enfermedad neurodegenerativa fatal, de rápida evolución y que resulta de la pérdida de neuronas motoras en la médula espinal, tronco cerebral y corteza motora (J-M. y A., 1869). Esta pérdida de motoneuronas resulta en una atrofia muscular, una debilidad progresiva con parálisis de la musculatura voluntaria y finalmente un fallo de la

musculatura respiratoria provocando la muerte del paciente, en menos de 5 años desde su aparición. Lo que convierte a la ELA en una enfermedad devastadora es el hecho de que, durante el progreso de la enfermedad, la mente y los sentidos no se ven afectados ya que las neuronas sensoriales o autónomas no degeneran. Además, hay una selectividad en la degeneración de las motoneuronas, ya que aquellas encargadas de controlar la vejiga urinaria y los esfínteres, así como las que controlan los movimientos oculares, están relativamente poco afectadas.

La mayoría de los casos de ELA son de aparición esporádica, existiendo tan solo un 5-10% de los casos con componente familiar-hereditario (Kurland y Mulder, 1955), destacando aquellos casos debidos a mutaciones en la superóxido dismutasa 1 (SOD1), que representa hasta el 20% de los casos familiares (Rosen, 1993).

El envejecimiento constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad ya que su incidencia aumenta drásticamente con la edad (80% de los casos se manifiestan entre los 40 y 70 años de edad). En un 5% de los pacientes, la ELA se manifiesta precozmente, antes de los 30 años; la mayoría de estos casos presentan mutaciones específicas como la proteína de unión al ARN FUS y la SOD1 (Niccoli *et al.*, 2017).

Entre las hipótesis fisiopatológicas que intentan explicar el origen y desarrollo de la ELA encontramos las siguientes:

2.2.1.-Hipótesis de la excitotoxicidad por glutamato

En 1987 se realizaron las primeras observaciones que describían la presencia de niveles anormales de glutamato en plasma de pacientes con ELA (Plaitakis y Caroscio, 1987), encontrándose más tarde una disminución de los transportadores de glutamato en estos pacientes (Rothstein *et al.*, 1992), así como una menor expresión del transportador de aminoácidos excitadores glial 2 (EEAT2), responsable de la eliminación del glutamato de la hendidura sináptica (Rothstein, 1995; Van Den Bosch *et al.*, 2006). Posteriormente se observó que las motoneuronas son altamente susceptibles a la excitotoxicidad por glutamato y tienen una baja capacidad de amortiguación del Ca^{2+} (Rothstein, 1995; Van Den Bosch *et al.*, 2006).

De forma similar a lo comentado anteriormente en el caso de la EA, las alteraciones en la homeostasia del Ca^{2+} que acontecen durante el envejecimiento, así como los cambios en los niveles de expresión de los receptores de tipo NMDA, pueden contribuir a esa mayor susceptibilidad de las motoneuronas a la excitotoxicidad por glutamato.

2.2.2.-Hipótesis de la autofagia

Se han descrito numerosas mutaciones en diferentes proteínas involucradas en la autofagia durante la enfermedad (Niccoli *et al.*, 2017). Una de las más importantes se produce en la proteína ubiquitina 2 (UBQLN2) que juega un papel importante en la regulación de diferentes mecanismos y vías de degradación de proteínas, incluido el sistema ubiquitina-proteasoma, la autofagia y la vía de degradación de proteínas asociadas al retículo endoplásmico (Deng *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta que muchas de las mutaciones encontradas en la ELA producen un mal plegamiento de proteínas dándoles una ganancia de función y produciendo su agregación (p.ej. las mutaciones en SOD1) (Strong *et al.*, 2005), las alteraciones en la autofagia van a agravar el proceso, al no poder eliminar los desechos, provocando una cadena de acontecimientos que finalizaran con la muerte neuronal.

Con respecto a la posible correlación entre el envejecimiento y la ELA, se ha descrito la existencia de un deterioro progresivo del sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia durante el envejecimiento, particularmente en neuronas (Ciechanover y Kwon, 2015).

2.2.3.-Hipótesis de la neuroinflamación

Varios genes asociados con la ELA están directamente relacionados con la activación de vías inflamatorias, lo que podría implicar que la neuroinflamación también puede contribuir directamente al desarrollo de la patología y que no se trata de una respuesta meramente defensiva. Así, entre otras posibles alteraciones, se ha descrito que los ratones que tienen mutada la SOD1 muestran astrogliosis y activación microglial, y que si se sobreexpresa la SOD1 mutada en astrocitos y microglia, se acelera el progreso de la enfermedad (Boillee *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2011).

2.3.-Envejecimiento y enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno del movimiento más común y representa la segunda enfermedad degenerativa más frecuente del SNC. La enfermedad se describió originalmente por James Parkinson en su “Ensayo sobre la parálisis temblorosa” publicado en 1817, donde describió cuidadosamente los principales signos motores de la enfermedad y que se siguen considerando características distintivas de la EP: bradicinesia, rigidez y temblor (Parkinson, 2002). La característica neuropatológica que caracteriza la EP es la presencia de los llamados cuerpos de Lewy, formados por la proteína α -sinucleína, en la sustancia negra del

cerebro. Además, en la *pars compacta* de la sustancia negra se produce una muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas, lo que conduce a una reducción y/o enlentecimiento de los movimientos voluntarios. Con la progresión de la enfermedad, la acumulación de α -sinucleína se va generalizando en el cerebro, produciéndose también distintas alteraciones de tipo cognitivo, del estado de ánimo y del sueño (García-Ruiz *et al.*, 2014).

La prevalencia de la EP es de aproximadamente 1-2 personas por cada 1000 habitantes, afectando al 1% de la población mayor de 60 años y al 5 % en mayores de 85 años. Raramente (3-4% del total) se producen casos en pacientes menores de 60 años de edad, y normalmente esta aparición precoz de la sintomatología parece asociarse a mutaciones que afectan al metabolismo de proteínas y a la función mitocondrial (Tysnes y Storstein, 2017).

En muchos estudios se ha discutido si los procesos patológicos que acontecen en la EP son exageraciones de las alteraciones propias del envejecimiento, si estas alteraciones nos hacen vulnerables a la enfermedad o si se trata de procesos independientes. La mayoría de estos estudios apoyan la idea de que tanto la patogénesis como las formas clínicas de la EP son el resultado de interacciones muy complejas entre el envejecimiento y otros factores de susceptibilidad, convirtiendo a la EP en uno de los mejores ejemplos de enfermedad relacionada con la edad (Hindle, 2010). Entre las observaciones que apoyan la existencia de este tipo de correlación podemos destacar las siguientes:

2.3.1.-Depósitos de α -sinucleína

Se ha descrito que la presencia de depósitos intracelulares de α -sinucleína está relacionada con la edad (Chu y Kordower, 2007), existiendo menores niveles de esta proteína patológica en cerebros envejecidos que en cerebros con EP (Jellinger, 2004).

Es posible que, durante el envejecimiento, estos depósitos de α -sinucleína y la disminución de dopamina no sean suficientes para producir la degeneración neuronal en la *pars compacta*, sin embargo, como se ha comentado anteriormente en el caso de la ELA, alteraciones en los procesos de autofagia y en los sistemas de eliminación de desechos que se producen a lo largo de la edad, junto con los altos niveles de agregación proteica, pueden conducir a la muerte de las neuronas dopaminérgicas característica de la EP.

2.3.2.-Depósitos de metales

En la EP se ha descrito que el aumento del depósito de ciertos metales (particularmente de hierro) que ocurre a lo largo del envejecimiento puede producir un incremento en el estrés oxidativo y hacer que las neuronas sean más vulnerables a los efectos de diversos factores tóxicos endógenos o exógenos. En el caso de la EP, se han observado acúmulos de hierro en las neuronas de la sustancia negra (Zecca *et al.*, 2004).

2.3.3.-Daños del ADN mitocondrial

Como hemos descrito anteriormente al comentar la teoría de la mutación somática del envejecimiento, las deleciones que se producen en el ADN mitocondrial durante la edad parecen estar relacionadas con la posible aparición de diferentes patologías neurodegenerativas. También se ha descrito que estas deleciones producen un deterioro funcional en las neuronas de la *pars compacta* de cerebros envejecidos, con lo que se produce un aumento del daño oxidativo, la formación de cuerpos de Lewy y la muerte neuronal por apoptosis (Vanitallie, 2008), pudiendo aumentar la susceptibilidad a desarrollar EP.

3.-MODELO DE SENESCENCIA ACELERADA: RATONES SAM

El modelo murino de senescencia acelerada SAM (de sus siglas en inglés “Senescence-Accelerated Mouse”) tiene su origen en unos ratones criados inicialmente en el Instituto Rockefeller llamados AKR. Estos ratones se vienen utilizando ampliamente en la investigación del cáncer por su alta probabilidad de padecer leucemia (60-90%), ya que son virémicos desde el nacimiento y expresan el retrovirus ecotrópico AKV en todos los tejidos. Fueron traspasados a los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine, EE.UU.), donde se nombraron como ratones AKR/J y donde aún se mantienen con dicha denominación.

En 1968, el Laboratorio Jackson donó varias parejas de ratones AKR/J al profesor Toshio Takeda del Departamento de Patología de la Universidad de Kyoto. El profesor Takeda y sus colaboradores observaron que, con el sucesivo apareamiento entre ratones cosanguíneos, aparecían ciertas camadas en las que la mayoría de los ratones mostraba un cierto grado, de carácter moderado a grave, de pérdida de la actividad motora, alopecia y/o falta de brillo en el pelaje, engrosamiento de la piel, lesiones perioftálmicas, aumento de la cifolordosis y una vida más corta.

En 1975 seleccionaron cinco camadas que presentaban esta sintomatología como progenitores de una serie “**propensa a la senescencia**” (**serie P**) y otras tres camadas que envejecían normalmente como progenitores de la serie “**resistente a la senescencia**” (**serie R**). Unos años más tarde, en 1981, estos mismos autores, basándose en los distintos grados de senescencia observados (valorados de uno a cinco, según los signos clínicos y lesiones relacionadas con la edad), la esperanza de vida y los fenotipos patológicos, subclasificaron, identificaron y caracterizaron las distintas cepas de la serie P (de P-1 a P-5) y de la serie R (de la R-1 a la R-3). Además describieron que, aunque todas estas cepas procedían de los ratones AKR/J, las dos series seleccionadas (R y P) presentaban una baja incidencia de linfomas (16% en los R y 8% en los P) (Takeda *et al.*, 1981).

En 1991, se describieron cinco cepas más de la serie P (aunque se perdieron la P-4 y P-5) y una más de la serie R (la R-4, aunque se perdió la R-3), lo que significaba que seguían apareciendo nuevas características patológicas que permitían diferenciar esas nuevas cepas de las ya caracterizadas (Takeda *et al.*, 1991). Por aquel entonces, las características patológicas que presentaban determinadas cepas las convertían en modelos experimentales para el estudio de diferentes enfermedades (por ejemplo, amiloidosis en P-1/2 u osteoporosis en P-6).

Actualmente las diferentes cepas de ratones SAM que se han generado (**Figura 2**) son fenotípicamente estables y sus características fisiopatológicas han sido fielmente descritas en numerosos trabajos (Takeda *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 1994; Higuchi, 1997; Takeda *et al.*, 1997), siendo una de las características más importantes la reducción de la esperanza de vida en la serie P (≈ 9.7 meses de media) en comparación con la de los ratones de la serie R (≈ 16.3 meses de media). Todas las cepas que se representan en la **Figura 2**, se vienen utilizando en diferentes laboratorios de todo el mundo para el estudio de alteraciones involucradas en el proceso de envejecimiento.

Lo interesante de las cepas SAMP es que presentan un envejecimiento acelerado y, además, en cada una de ellas se puede identificar una determinada patología característica asociada a la edad que es más destacable por su gravedad o rapidez de instauración y progresión (**Tabla 1**). Esto no implica que esa determinada característica no esté presente en el resto de cepas SAMP, puesto que normalmente está asociada a la edad. A modo de ejemplo podemos citar los ratones SAMP6, en los que la característica patológica más destacable es el desarrollo de una rápida osteoporosis senil (Azuma *et al.*, 2018), sin embargo, en el resto de cepas SAMP se ha descrito que se produce también osteoporosis a edades avanzadas.

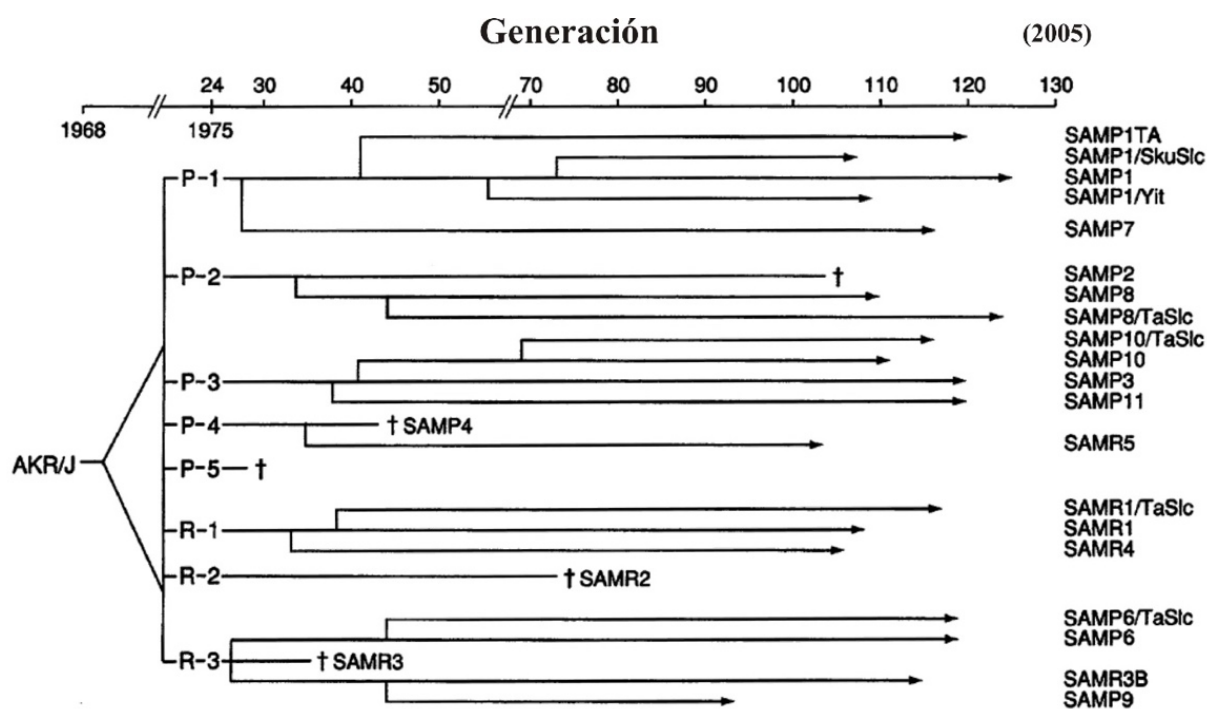


Figura 2. Árbol genealógico de los ratones SAM. Genealogía de los ratones SAM desde sus antecesores AKR/J hasta su estado de diferenciación y desarrollo en diciembre de 2005, donde se muestra la pérdida (cruz) y la generación de nuevas cepas. Tomado de Takeda, 2009.

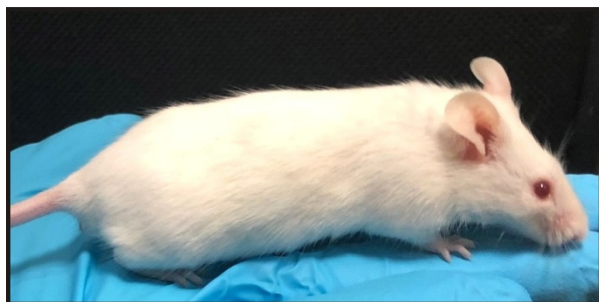
Cepas	Fenotipos patológicos
SAMP	
SAMP1	Amiloidosis senil, riñón contraído, respuesta inmune deteriorada y deficiencia auditiva.
SAMP2	Amiloidosis senil y secundaria; riñón contraído y respuesta inmune deteriorada.
SAMP3	Enfermedad degenerativa de la articulación temporomandibular.
SAMP6	Osteoporosis y amiloidosis secundaria.
SAMP7	Linfoma linfoblástico y amiloidosis senil.
SAMP8	Déficits en el aprendizaje y la memoria y respuesta inmune deteriorada.
SAMP9	Cataratas, linfoma linfoblástico y amiloidosis senil.
SAMP10	Atrofia cerebral y déficits en la memoria y aprendizaje.
SAMP11	Riñón contraído y amiloidosis senil.
SAMR	
SAMR1	Linfoma no tímico, sarcoma histiocítico y quiste ovárico.
SAMR4	Linfoma no tímico, sarcoma histiocítico.
SAMR5	Colitis.

Tabla 1. Principales alteraciones patológicas desarrolladas por cada cepa de las series P y R de ratones SAM. En color azul se indican las dos cepas utilizadas para el estudio que ocupa esta Tesis Doctoral. Modificado de Takeda *et al.*, 1997.

Finalmente debemos comentar que en los ratones SAMR también se han descrito fenotipos patológicos, pero en ninguna de las cepas de esta serie se observa un proceso de envejecimiento acelerado.

Para el desarrollo de la parte experimental de la presente Tesis Doctoral, hemos seleccionado la cepa SAMP8 por los déficits en el aprendizaje y en la memoria que presentan a lo largo de la edad. Estos ratones tienen una vida media de aproximadamente 381 días (12,7 meses) (Taniguchi *et al.*, 2016) y, además, siguen teniendo características muy similares a las descritas por el profesor Takeda en 1981 para la serie P en comparación con la R a saber: alopecia y falta de brillo en el pelaje, engrosamiento de la piel, lesiones perioftálmicas y aumento de la cifolordosis como se puede observar en la **Figura 3**.

SAMR1 (12 meses)



SAMP8 (12 meses)



Figura 3. Fotografías de los ratones SAMR1 y SAMP8 a la edad de 12 meses. Fotografías realizadas en nuestro laboratorio de dos ratones empleados en esta Tesis Doctoral. A la derecha un ratón SAMR1 de 12 meses y a la izquierda un SAMP8 de 12 meses. Nótese la diferencia de aspecto entre ambos ratones de la misma edad.

A modo de control se han realizado paralelamente experimentos en ratones de la cepa SAMR1, que presentan un fenotipo de envejecimiento normal con una vida media en torno a los 567 días (19 meses) (Taniguchi *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta que el ratón SAMP8 presenta déficits de memoria y aprendizaje, a continuación se expondrán brevemente las principales alteraciones relacionadas con dichos procesos neuronales y que se podrían encontrar en los dos modelos murinos utilizados.

3.1.-Alteraciones neurofisiopatológicas

3.1.1.-Alteraciones de tipo A

Estas alteraciones son propias de la edad y han sido observadas durante el envejecimiento de diferentes modelos murinos. En el caso de las cepas SAMR1 y SAMP8, se ha descrito que ambos modelos animales presentan una reducción en la densidad de las espinas dendríticas en neuronas del hipocampo, astrogliosis y lipopigmentosis (Takeda, 2009).

3.1.2.-Alteraciones de tipo B

Estas alteraciones son propias de la edad pero que aparecen antes y/o se encuentran exacerbadas en los ratones SAMP8, en comparación con los ratones SAMR1. Así, por ejemplo, en los ratones SAMP8 se ha descrito un aumento en la expresión de la proteína APP y de su ARNm a los 6 y 12 meses de edad (Morley *et al.*, 2000) y se han encontrado mayores depósitos de A β en el hipocampo, en comparación con lo observado en los ratones SAMR1 a los 6, 9 y 12 meses (Del Valle *et al.*, 2010).

También se ha descrito un aumento en la proteína tau fosforilada y en las kinasas implicadas en su fosforilación (GSK-3 β y CDK 5) a nivel del hipocampo y de la corteza en ratones SAMP8 de 10 meses de edad (Canudas *et al.*, 2005; Casadesus *et al.*, 2012; Bodea *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017) y la presencia de ovillos neurofibrilares en neuronas de la corteza (Sureda *et al.*, 2006). Posiblemente relacionado con estos cambios, se ha descrito una pérdida neuronal en el *giro dentado* y en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo de ratones SAMP8 (Li *et al.*, 2013). Además, se ha descrito un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Pelegri *et al.*, 2007).

Con respecto a la posible afectación de la neurotransmisión, se ha descrito un aumento del glutamato en el cerebro de los ratones SAMP8 en comparación con SAMR1, un aumento de la liberación del mismo por un estímulo y una disminución en el número de receptores NMDA (Kitamura *et al.*, 1992). Además, el sistema colinérgico también parece estar afectado en los ratones SAMP8, con una menor liberación de ACh y la muerte de las neuronas colinérgicas a lo largo de la edad (Zhao *et al.*, 1992; He *et al.*, 2014). También se ha observado una disminución de la liberación y recaptación de NA (Zhao y Nomura, 1990). Las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* y las noradrenérgicas del *locus coeruleus* también degeneran con mayor rapidez en los ratones SAMP8 en comparación con SAMR1 (Karasawa *et al.*, 1997).

3.1.3.-Alteraciones de tipo C

Estas alteraciones son propias solamente de los ratones SAMP8, no observándose en ratones SAMR1 incluso en casos de edad avanzada. A modo de ejemplo, estos ratones presentan estructuras granulares y degeneración espongiiforme (Takeda, 2009).

3.2.-Alteraciones en el comportamiento

En 1986, Masaomi Miyamoto y colaboradores realizaron las primeras pruebas de comportamiento a los ratones SAMP8 y SAMR1, observando una clara disminución en la capacidad de aprendizaje de los ratones SAMP8 en comparación con los SAMR1 (Miyamoto *et al.*, 1986). Desde entonces se han realizado numerosos estudios en estos ratones para comprobar diferentes aspectos de su comportamiento, memoria y aprendizaje, siendo de destacar los siguientes hallazgos:

3.2.1.-Aprendizaje espacial y capacidad de memoria

Utilizando distintos modelos de laberinto acuático (laberinto acuático de Morris (Miyamoto *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 2007; Orejana *et al.*, 2012), laberinto acuático con brazo radial (Chen *et al.*, 2004), laberinto acuático en T y laberinto de brazos radiales (Miyamoto *et al.*, 1986; Miyamoto, 1997)) se han observado claros signos de déficits cognitivos en el proceso de aprendizaje espacial y de la memoria en ratones SAMP8 a partir de los 5-6 meses de edad.

3.2.2.-Aprendizaje en la tarea de evitación pasiva y activa

Estos modelos conductuales sirven para medir la memoria a corto plazo y se basan en la capacidad del animal de evitar de forma pasiva o activa determinados ambientes que le pueden resultar dañinos.

Se ha descrito que los ratones SAMP8 presentan deficiencias en las respuestas de evitación pasiva y activa a los 6-9 meses de edad (Miyamoto, 1997; Flood y Morley, 1998). Se han realizado estudios para ver si las diferencias observadas en estos modelos pudieran relacionarse con una alteración de la sensibilidad ante la descarga eléctrica en los ratones SAMP8, no habiéndose observado diferencias significativas a lo largo de la edad ni en comparación con los ratones SAMR1 (Flood y Morley, 1998).

3.2.3.-Estudios de miedo condicionado

Este tipo de test conductual se realiza para medir la memoria asociativa y dependiente del hipocampo y la comunicación amígdala-hipocampo. Es un test similar a los experimentos de Pávlov, en el que se asocia una descarga eléctrica dañina para el animal a un tono sonoro y posteriormente solo se emite el tono. El comportamiento de congelación de los movimientos del animal ante este segundo tono se utiliza como índice de respuesta al miedo.

Se ha descrito que en los ratones SAMP8, a partir de los 4 meses de edad, la respuesta al miedo es menor en comparación con la observada en los ratones SAMR1 (Ohta *et al.*, 2001).

3.2.4.-Memoria declarativa

Se explora mediante el conocido test de reconocimiento de objetos. Se ha descrito que los ratones SAMP8 presentan un índice de discriminación (porcentaje de exploración del nuevo objeto en comparación con el tiempo total del experimento) que se reduce significativamente a partir de los 5 meses de edad, en comparación con la respuesta observada en los ratones SAMR1 (López-Ramos *et al.*, 2012).

3.2.5.-Alteraciones de los ritmos circadianos

Se ha descrito que en los ratones SAMP8 se produce un aumento de la actividad diurna a partir de los 6 meses de edad, lo que indicaría la existencia de alteraciones en el ritmo circadiano de estos ratones en comparación con los ratones SAMR1 (Miyamoto, 1997; Pang *et al.*, 2006).

Como puede apreciarse, muchas de las alteraciones tanto fisiológicas como de comportamiento que se han descrito en los ratones SAMP8 son similares a las observadas en las demencias, y más concretamente con lo que ocurre en la EA. Es por eso que numerosos trabajos utilizan estos ratones como modelo de EA espontáneo, si bien existe mucha controversia sobre la validez de dicha comparación.

Sin embargo, sí que parece haber un consenso en relación a que las alteraciones que presentan los ratones SAMP8 asociadas a un envejecimiento acelerado del sistema nervioso, los hace candidatos ideales para estudiar los cambios fisiopatológicos que se producen a lo largo de la edad y, por lo tanto, perfectos para el estudio desarrollado en la presente Tesis Doctoral.

4.-LA CÉLULA CROMAFÍN: UN MODELO NEUROSECRETOR

Las células cromafines de la médula suprarrenal remedan a las neuronas simpáticas no solo en su mismo origen embrionario, a partir de la cresta neural, sino también en su función neurosecretora de catecolaminas. Precisamente es este estrecho parentesco entre ambos tipos celulares el que ha hecho que durante décadas se hayan utilizado las células cromafines como un excelente modelo experimental para explorar los mecanismos implicados en el proceso de neurotransmisión sináptica, tanto a nivel central como a nivel periférico. De forma muy resumida podemos decir que este tipo celular resulta de gran utilidad para el estudio de la síntesis, el almacenamiento, la liberación por exocitosis de neurotransmisores y la endocitosis, de la modulación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) y de los movimientos intracelulares de Ca^{2+} , entre otros.

Gracias a estas características, estas células han sido, y continúan siendo, una “ventana abierta al cerebro”. De hecho, por poner algún ejemplo de la importancia que este modelo celular ha supuesto para la neurociencia, podemos comentar que la mayoría de las proteínas que forman el complejo SNARE, de la maquinaria de la exocitosis, fueron caracterizadas inicialmente en las células cromafines por investigadores de la talla de Erwin Neher, inventor de las técnicas electrofisiológicas de “patch-clamp” y Premio Nobel de Medicina en 1991 y Thomas Südhof, Premio Nobel de Medicina en 2013. Otra ganadora del Nobel, Rita Levi-Montalcini también utilizó las células cromafines para estudios de plasticidad neuronal, como lo atestigua en una revisión publicada justo antes de morir (Bornstein *et al.*, 2012).

Tanto es el parecido entre la célula cromafín y las neuronas que Stefan R. Bornstein y colaboradores las identificaron como el “cerebro periférico” dado que: a) reciben estímulos de naturaleza tanto química como eléctrica; b) son capaces de descifrar y reconocer esas señales; c) poseen la maquinaria necesaria para generar distintos patrones de respuestas, como es la liberación de catecolaminas y otras sustancias (Bornstein *et al.*, 2012).

Revisaremos en este apartado de la Introducción las principales características de las células cromafines adrenomedulares, en las que nos hemos basado para plantear el estudio aquí desarrollado relativo a las posibles alteraciones de la excitabilidad celular y del proceso neurosecretor que acontecen durante el proceso de envejecimiento.

4.1.-Características anatómicas e histológicas

Las glándulas adrenales se encuentran localizadas en el polo cefálico de cada riñón en vertebrados mamíferos (**Figura 4, A**). Están irrigadas por las arterias adrenal superior, media e inferior y la circulación venosa se realiza a través de las venas adrenolumbares que desembocan en las venas cava y renal.

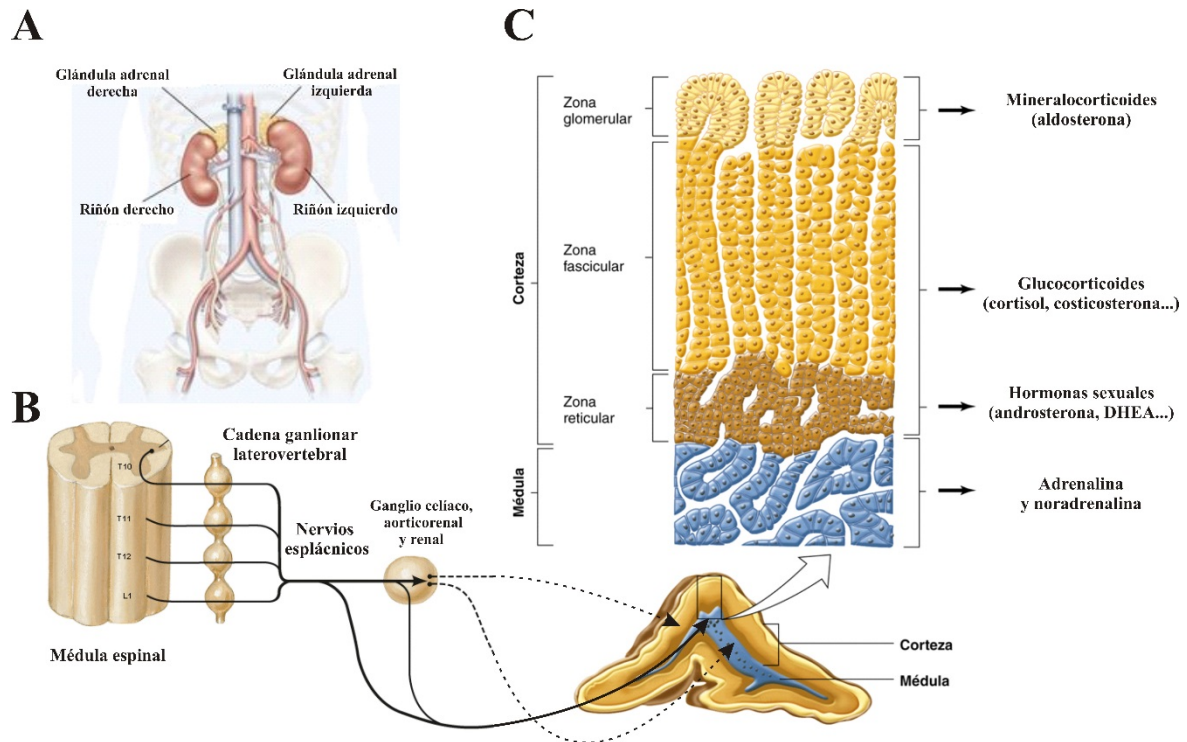


Figura 4. La glándula adrenal. A Ubicación de la glándula adrenal en el cuerpo humano (glándula suprarrenal en el caso humano). B Inervación de la glándula adrenal a través del nervio espláncnico. C Histología de la glándula adrenal: corteza (zona glomerular, zona fascicular y zona reticular, de arriba abajo) y médula adrenal. Modificado de: “Vander’s Human Physiology: The Mechanisms of Body Function, 11th ed. McGraw-Hill, 2007”

En la glándula adrenal se pueden diferenciar dos partes bien definidas tanto estructural como funcionalmente: la corteza (en la parte externa) y la médula (en la parte central de la glándula). Ambas se encuentran envueltas por una gruesa cápsula de tejido conjuntivo (Simpson, 1937).

4.1.1.-La corteza suprarrenal

Forma la parte externa de la glándula, se origina embriológicamente a partir del mesodermo y se encarga fisiológicamente de la síntesis y liberación de corticosteroides, como los mineralocorticoides, glucocorticoides y las hormonas sexuales de naturaleza androgénica. Se

divide en 3 zonas histológica y funcionalmente bien divididas (**Figura 4, C**) (Willenberg y Bornstein, 2017):

- *Zona glomerular*: es la parte más externa de la corteza y es la encargada de sintetizar y secretar los mineralocorticoides (básicamente la aldosterona).
- *Zona fasciculada*: es la parte intermedia de la corteza y es la responsable de la síntesis y liberación de glucocorticoides (principalmente cortisol y corticosterona). Las células que aquí se encuentran forman parte del eje HHA. La secreción de glucocorticoides produce un aumento de la proteólisis, la lipólisis y la gluconeogénesis, aumentando así los niveles de glucosa, triglicéridos y aminoácidos plasmáticos.
- *Zona reticular*: es la parte más interna de la corteza que está en contacto con la médula adrenal. Las células ubicadas en esta zona se encargan de la síntesis de andrógenos (testosterona, deshidroepiandrosterona, dihidrotestosterona y androstenodiona) que regulan la masa muscular y el crecimiento celular.

Los corticoides producidos a nivel de la corteza pueden afectar al funcionamiento de la médula adrenal, regulando la síntesis y la liberación de catecolaminas; también se ha descrito que la liberación de catecolaminas puede regular la síntesis de algunos corticoides (Sharara-Chami *et al.*, 2010).

4.1.2.-La médula adrenal

Forma la parte más interna de la glándula adrenal (**Figura 4, C**). Comparte un origen neuroectodérmico con el sistema nervioso simpático (Euler, 1972) y está formada principalmente por las células cromafines, aunque también están intercaladas por células sustentaculares (pequeñas e irregulares) que son consideradas como componentes neurogliales de la médula adrenal (Cocchia y Michetti, 1981). Presenta además una gran cantidad de vasos sanguíneos y de fibroblastos, los cuales forman un estroma de fibras reticulares que rodea a grupos de células secretoras (Coupland, 1965).

La inervación de la médula adrenal se produce principalmente a través de fibras preganglionares simpáticas (de naturaleza colinérgica) procedentes de la médula espinal. La mayor parte de estas fibras proceden del nervio esplácnico mayor, sin embargo, también inervan la médula los nervios esplácnicos menores y otras fibras procedentes de los ganglios celíacos lumbares (**Figura 4, B**) (Appel y Elde, 1988).

La función principal de las células cromafines es la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina principalmente, aunque también dopamina) que activarán un estado de alerta en el individuo, preparándolo para una situación de “lucha o huida” ante una amenaza o situación de estrés (Coupland, 1965). Con respecto a esta función de respuesta al estrés, se ha observado que determinados estímulos estresantes pueden producir una liberación selectiva desde poblaciones de células adrenérgicas, noradrenérgicas o dopaminérgicas (por ejemplo, la hipoglucemia activa la secreción de adrenalina mientras que el estrés producido por el frío libera noradrenalina (Vollmer *et al.*, 1992)), lo que indica que la liberación de cada neurotransmisor puede regularse por diferentes factores, si bien todavía no se saben con precisión los mecanismos implicados en este proceso.

4.2.-La célula cromafín de la médula adrenal

La célula cromafín debe su nombre a su afinidad por las sales de cromo que le dan una tonalidad amarillenta-parduzca ante el microscopio óptico (Coupland, 1965). Derivan embriológicamente de la cresta neural y tanto anatómica como funcionalmente forman parte del sistema nervioso simpático, pudiendo considerarse neuronas modificadas (Bronner-Fraser, 1994) y, por ello, son células conocidas como paraneuronas (Fujita *et al.*, 1988), ya que no siendo neuronas, su origen, estructura, función y metabolismo son muy similares (Winkler, 1976; Winkler, 1977; Livett, 1984; Carmichael y Winkler, 1985; Winkler *et al.*, 1987). Tanto es el parecido entre la célula cromafín y las neuronas que Stefan R. Bornstein y colaboradores las nombraron como el “cerebro periférico” dado que: a) reciben estímulos de naturaleza tanto química como eléctrica; b) son capaces de descifrar y reconocer esas señales; c) poseen la maquinaria necesaria para generar distintos patrones de respuestas, como es la liberación de catecolaminas y otras sustancias (Bornstein *et al.*, 2012)

Fisiológicamente las células cromafines presentan una apariencia poligonal, sin embargo, cuando se aíslan y se mantienen en cultivo, adoptan una forma esférica de $\approx 15\text{-}30\ \mu\text{m}$ de diámetro. Cada célula contiene unas 12.000 vesículas (gránulos cromafines) que contienen un “cóctel intravesicular” formado por catecolaminas (0.5-1 M), ATP (120-250 mM), Ca^{2+} (40 μM), ascorbato, opioides, otros nucleótidos, enzimas y cromograninas, a un pH de 5.5 y todo ello en 200 nm de diámetro con una osmolaridad total de 1.500 miliosmoles (Estévez-Herrera *et al.*, 2016).

En función de la catecolamina que secreten, se distinguen fundamentalmente tres tipos de células cromafines: adrenérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas. En todas ellas las

catecolaminas son sintetizadas a partir del aminoácido L-tirosina que procede de la dieta (**Figura 5**), siendo la diferencia entre las células adrenérgicas y noradrenérgicas debida a la presencia en las células adrenérgicas de una enzima adicional en la ruta biosintética, la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT).

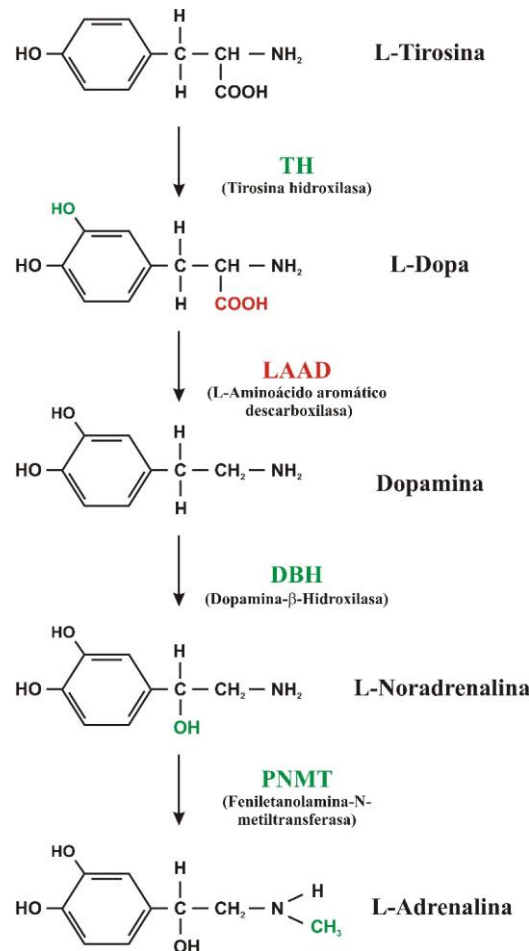


Figura 5. Ruta biosintética de las catecolaminas. Ruta desde la L-tirosina a la L-adrenalina. En verde o en rojo se muestran los grupos químicos que han sido modificados por las enzimas correspondientes (en verde o en rojo también).

Fisiológicamente las células cromafines reciben señales de tipo excitatorio a través del nervio esplácnico, que libera mayoritariamente ACh (Feldberg *et al.*, 1934). Tras su estimulación, las células cromafines liberan las catecolaminas que contienen (y el resto de componentes del “cóctel vesicular” como péptidos opioides, ATP, cromograninas) al torrente sanguíneo, desde donde se distribuirán a la periferia hasta afectar a multitud de órganos diana (Wolf *et al.*, 2016).

Las catecolaminas liberadas interactúan con receptores α- y β-adrenérgicos en los tejidos diana, iniciándose así la respuesta característica de “lucha o huida” (Cannon, 1920). Entre sus efectos se incluye el aumento de la presión sanguínea, el desvío de la circulación sanguínea hacia

el músculo esquelético, el cerebro y el corazón, un incremento de la frecuencia cardíaca y de la contractibilidad del corazón, la relajación de los músculos bronquiales para aumentar el aporte de oxígeno a la sangre, el incremento de la glucogenolisis y de la gluconeogénesis en el hígado y de la lipólisis en los adipocitos para proporcionar gran cantidad de sustratos energéticos que permitan incrementar la actividad muscular, el aumento de la midriasis para mejorar la visión, la disminución del flujo de sangre a los intestinos y los riñones y la relajación del músculo liso intestinal (Tank y Lee Wong, 2015).

4.3.-Excitabilidad de la célula cromafín

Las células cromafines, al igual que las neuronas, son células excitables gracias a la presencia de distintos subtipos de canales iónicos, tanto dependientes de voltaje (canales de Na^+ , canales de Ca^{2+} , canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , canales de K^+ dependientes de voltaje, canales de Cl^- y canales no selectivos para cationes) como canales iónicos operados por ligando (receptor nicotínico para la ACh, receptor de GABA, receptor de glicina y receptores ionotrópicos de tipo NMDA, AMPA y Kainato para el glutamato), en su membrana (Artalejo, 1995). Describiremos a continuación las principales características de estos canales iónicos de las células cromafines, así como su influencia en la excitabilidad celular.

4.3.1.-Canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v)

Se ha descrito que los canales de Na^+ con una mayor expresión en las células cromafines de ratón (CCR) corresponden a los subtipos Na_v 1.3 y Na_v 1.7 que se caracterizan por su rápida inactivación y que están implicados en la generación del potencial de acción (Vandael *et al.*, 2015). Ambos subtipos de canal de Na^+ se caracterizan por presentar un umbral de activación en torno a -40 o -30 mV, alcanzándose la máxima activación a voltajes de -10 mV. La conductancia de estos canales es de ≈ 19.5 picosiemens (pS) (Catterall *et al.*, 2005).

4.3.2.-Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV)

La liberación de catecolaminas es un proceso que depende del aumento del Ca^{2+} intracelular. La principal fuente de Ca^{2+} que induce la liberación de catecolaminas es la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los CCDV. Sin embargo, los diferentes subtipos de canales de Ca^{2+} presentes en la membrana de la célula cromafín pueden tener otras funciones más allá de la fusión vesicular y la liberación de catecolaminas, entre otras la regulación de los potenciales de acción

espontáneos o provocados, el control de la frecuencia de los potenciales de acción o la regulación del proceso de endocitosis (Mahapatra *et al.*, 2012; Nanclares *et al.*, 2018).

En las células cromafines de ratón se ha descrito la presencia de distintos subtipos de CCDVs (García *et al.*, 2006), cuyas características describiremos brevemente a continuación:

- *Canales de Ca^{2+} del subtipo L ($Ca_v 1.1-1.4$):* Representan hasta el 45% del total de CCDV en la célula cromafín de ratón. Estos canales se caracterizan por mostrar una lenta inactivación, siendo además menos sensibles al mantenimiento de un potencial de membrana ligeramente despolarizado. Constituyen la vía de entrada de Ca^{2+} en el músculo cardíaco y liso, y tienen una especial relevancia en la regulación de la exocitosis de hormonas y neurotransmisores.
- *Canales de Ca^{2+} del subtipo P/Q ($Ca_v 2.1$):* Representan un 15-30% del total de canales. En realidad, son dos subtipos de canales diferentes pero cada uno de ellos está poco expresado en las células cromafines de rata y ratón. Esto, junto a la dificultad de separar la subunidad α_{1A} de cada subtipo hace que convenga tratarlos como uno solo. Estudios recientes asocian estos subtipos de canales directamente con la secreción de los depósitos de vesículas inmediatamente liberables (IRP de sus siglas en inglés “Immediately Releasable Pool”) (Alvarez *et al.*, 2008).
- *Canales de Ca^{2+} del subtipo N ($Ca_v 2.2$):* Representan un 30% del total de canales. Estos presentan una inactivación mucho más rápida que los canales de tipo L y además se inactivan a voltajes ligeramente despolarizados con una conductancia mucho menor.
- *Canales de Ca^{2+} del subtipo R ($Ca_v 2.3$):* Representan un 10% del total de canales. Parece que dependen de algún factor intracelular para su activación que desaparece cuando se realiza la configuración de célula entera rompiendo el sello, ya que solo se han detectado cuando se ha realizado la configuración de parche perforado. Se inactivan rápidamente.

4.3.3.-Canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca})

Aquí podemos distinguir dos tipos de canales de K^+ en función de sus características de activación y de su conductancia (Lingle *et al.*, 2018b):

4.3.3.1.-*Canales de K^+ dependientes Ca^{2+} e independientes de voltaje (SK)*

Son canales de pequeña conductancia, de ahí su nombre “Small-K”, y se activan por pequeños incrementos de la $[Ca^{2+}]_c$ (aproximadamente a 0.7 μM). La célula cromafín de ratón expresa

todos los subtipos SK1, SK2 y SK3. Estos canales se activan principalmente durante la fase de post-hiperpolarización del potencial de acción, contribuyendo a regular la frecuencia de disparo de potenciales de acción.

4.3.3.2.-Canales de K^+ dependientes Ca^{2+} y de voltaje (BK)

Estos canales se caracterizan por su alta conductancia (de ahí su nombre “Big-K”) y se activan en presencia de elevaciones apropiadas de la $[Ca^{2+}]_c$ junto con una suficiente despolarización, generando la principal corriente de salida en las células cromafines de todas las especies animales estudiadas. En algunas células cromafines la corriente puede ser inactivante (denominada BKi) y en otras, no inactivante (denominadas BKs). Estos canales participan fundamentalmente en la fase de repolarización del potencial de acción.

4.3.4.-Canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv)

Marty y Neher describieron por primera vez dos tipos de canales Kv que denominaron FK y SK (de “fast- K^+ ” y “slow- K^+ ”) debido a que el primero presentaba cinéticas de activación e inactivación más rápidas que el segundo. El canal FK presenta una conductancia de 18 pS, mientras que el SK presenta una conductancia menor 8 pS (Marty y Neher, 1985). También se ha descrito que la inactivación canal FK es casi completa a los 100 ms y la recuperación de la inactivación es muy rápida (en unos 40 ms) (Lingle *et al.*, 2018a).

4.3.5.-Receptores nicotínicos (nAChRs)

Tanto a nivel del SNC como en el SNP se expresan receptores nicotínicos (nAChRs). Diversos estudios farmacológicos, inmunológicos y electrofisiológicos demuestran que los nAChRs que expresa la célula cromafín son de tipo neuronal (Sala *et al.*, 2008), si bien todavía existe controversia sobre las diferentes subunidades que componen los nAChRs de la célula cromafín de diferentes especies. En la médula de ratón se ha caracterizado la presencia de ARNm para las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$, y se cree que el nAChR mayoritario que existe en la célula cromafín es el que se forma por combinación de las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$, aunque también pueden asociarse $\alpha 5$, $\alpha 6$ y/o $\beta 2$ formando heterómeros más complejos (Wu *et al.*, 2010).

4.3.6.-Potencial de membrana (V_m) y generación del potencial de acción (PA)

El potencial de membrana (V_m) en reposo de las células cromafines varía según la especie animal en la que se estudie. Algunos autores describen que éste se encuentra en valores entre -50 y -80 mV (Artalejo, 1995) mientras que otros trabajos describen un V_m algo más despolarizado, sobre todo en células cromafines de rata y ratón, con valores entre -45 y -60 mV (Nassar-Gentina *et al.*, 1988; Vandael *et al.*, 2013; Lingle *et al.*, 2018a).

La célula cromafín de rata y ratón puede disparar potenciales de acción (PA) espontáneos (Brandt *et al.*, 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980; Lingle *et al.*, 2018a), de forma similar a lo que ocurre en neuronas. La **Figura 6** muestra esquemáticamente la implicación de las distintas corrientes iónicas en la generación, desarrollo y terminación del PA, y sus correspondientes conductancias durante las diferentes fases del PA. La generación del PA se inicia gracias a la activación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, lo que favorece la **entrada de Na^+** , generándose así una rápida despolarización de la membrana que puede alcanzar valores positivos de hasta +30 mV. Se ha descrito que en la célula cromafín se pueden llegar a generar PAs aunque los canales de Na^+ se encuentren bloqueados (p.ej. utilizando tetrodotoxina), siendo necesario en estos casos eliminar también las corrientes de entrada de Ca^{2+} para que estos PAs no se generen (Vandael *et al.*, 2015).

Durante la fase de activación del PA también se produce una **entrada de Ca^{2+}** a la célula a través de los CCDV, que se activan a potenciales superiores a -30 mV y que alcanzan la máxima corriente de entrada a despolarizaciones en torno a los 0/+10 mV. Esta activación de los CCDV se asocia a la regulación de la frecuencia de disparo del potencial de acción (“efecto marcapasos”), principalmente los CCDV del subtipo L, que además han mostrado cierto acoplamiento a los canales BK (Marcantoni *et al.*, 2007; Albiñana *et al.*, 2015).

La **salida de K^+** a través de los diferentes tipos de canales de K^+ es la encargada de la fase de repolarización del PA. Los canales de tipo SK parecen ser los implicados en determinar el intervalo entre PAs (actividad marcapasos). Además, también se ha descrito una relación directa entre la actividad de los CCDV del subtipo L y la activación de los canales SK (Vandael *et al.*, 2012). También los canales BK están implicados en la fase de repolarización del PA y en la post-hiperpolarización (PHP). Cuando se bloquean estos canales se va a producir un retraso en la fase de repolarización del PA y una reducción de las fases tempranas de la PHP, lo que puede conducir a un aumento en la frecuencia de disparo de PAs (Marcantoni *et al.*, 2010). En ratones, los canales de Kv también tienen una gran relevancia en la repolarización acompañando a los BK en

comparación con lo que ocurre en células cromafines de rata en las que los BK contribuyen al 75% repolarización y los Kv tienen una importancia menor (Lingle *et al.*, 2018a).

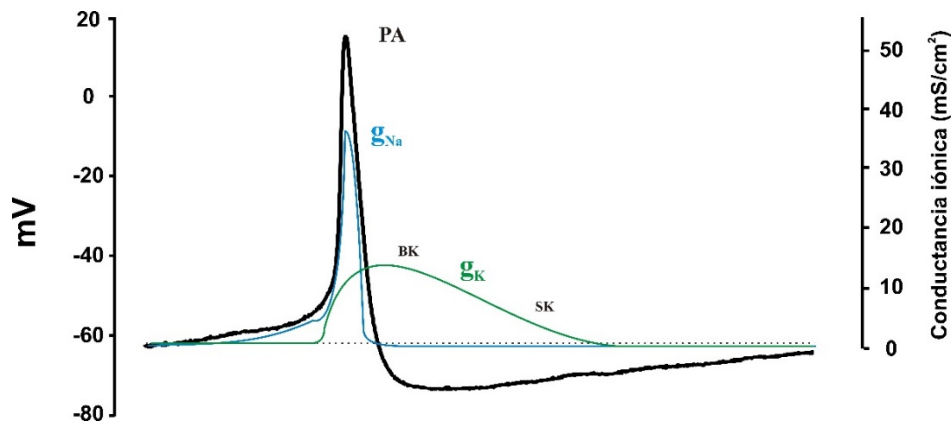


Figura 6. Corrientes iónicas involucradas en la generación y terminación del PA. Esquema de las corrientes que generan (Na^+) y terminan (K^+) el PA y sus conductancias durante las diferentes fases del PA. Modificado de Hodgkin y Huxley (1952).

4.4.-Maquinaria exocitótica de la célula cromafín

La exocitosis constituye la etapa final de la transmisión sináptica y entre los procesos de tráfico intracelular, este proceso destaca como mecanismo fundamental de la liberación de hormonas y neurotransmisores (entre otros mediadores celulares). La exocitosis implica la fusión de la membrana de una vesícula secretora con la membrana plasmática y el establecimiento de una solución de continuidad entre el interior vesicular y el medio externo que posibilita la liberación del mediador. Muchos estudios sobre los entresijos de la maquinaria secretora han demostrado que el proceso de exocitosis requiere de varias etapas sucesivas donde se ven implicadas la interacción y la fina coordinación de estructuras moleculares muy complejas, que dan lugar a: 1) el movimiento de vesículas hacia la zona activa; 2) el atraque de las vesículas en la zona de liberación; 3) la maduración del complejo; 4) la fusión de la vesícula y liberación del contenido vesicular; 5) la recuperación de la membrana mediante la endocitosis (**Figura 7**) (Camacho *et al.*, 2003; Thorn *et al.*, 2016).

Las células cromafines, al igual que otros tipos celulares (como las neuronas, las células endocrinas y exocrinas y las células hematopoyéticas), presentan una “exocitosis regulada”, que sólo tiene lugar en respuesta a una estimulación fisiológica y en la que está implicada una elevación de la $[Ca^{2+}]_c$. En este proceso se produce inicialmente la aproximación de las vesículas sinápticas a las zonas activas de exocitosis, permaneciendo a continuación éstas en un estado de atraque (“docking”) a la membrana antes de sufrir el proceso de exocitosis (Verhage y Sorensen,

2008). En este estado, las vesículas sufren un proceso de maduración (“priming”) dependiente de ATP, que las prepara para experimentar el proceso de fusión de membranas dependiente de Ca^{2+} (Rettig y Neher, 2002).

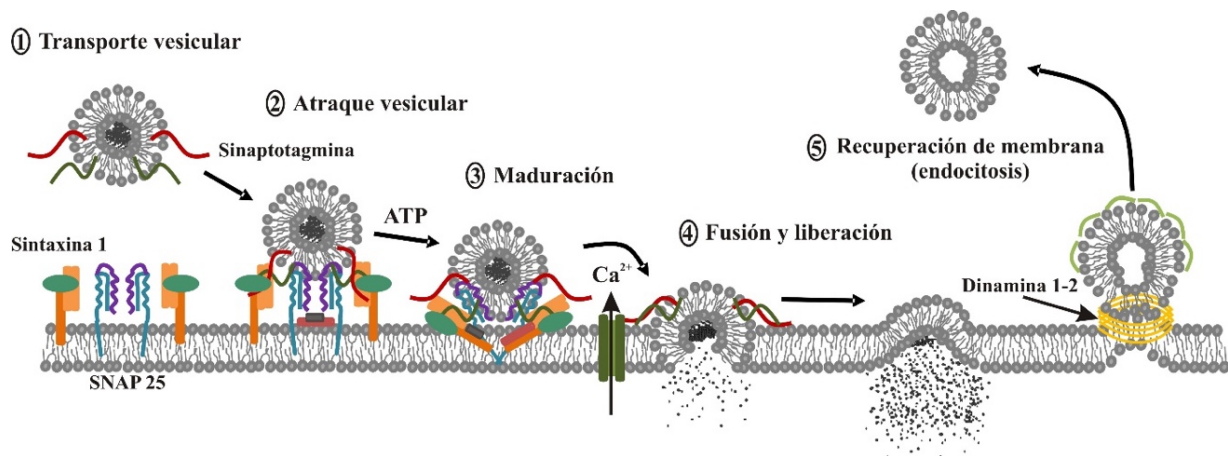


Figura 7. Esquema simplificado de las diferentes etapas implicadas en el proceso de la exocitosis. 1) Acercamiento vesicular a la membrana plasmática con las proteínas de fusión vesiculares sinaptotagmina (en rojo) y VAMP-2 (en verde) y en la membrana plasmática SNAP25 (en azul y morado) y sintaxina 1 (en naranja). **2 y 3)** La unión entre VAMP-2, sintaxina 1 y SNAP25 forma el núcleo del complejo SNARE. **4)** Gracias a la sinaptotagmina (sensor de Ca^{2+}) y proteínas accesorias como Munc-18 (verde claro), sindapinas (rosa) y complejinas (gris) se forma el poro de fusión y se favorece la liberación del contenido vesicular. **5)** Endocitosis para recuperar membrana plasmática mediada por la dinamina 1-2 (amarillo) y la clatrina (verde). Adaptado y modificado de Camacho *et al.* 2003.

La fusión de la membrana vesicular con la plasmática es una reacción que requiere de la interacción de una serie de proteínas específicas que permitan a ambas membranas mantenerse juntas, ya que la repulsión entre ambas membranas y el entorno acuoso no favorecería su fusión espontánea (Sudhof, 1995). Este proceso de fusión está mediado por grandes complejos moleculares que se ensamblan a demanda y se desensamblan cuando el proceso de exocitosis ha finalizado.

Hay una gran cantidad de proteínas implicadas en la formación de estos complejos, siendo el denominado complejo SNARE (del inglés “*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*”) el núcleo de este motor de fusión (Jahn y Scheller, 2006). Estas proteínas fueron caracterizadas a finales de los años 80, y se encuentran muy conservadas a lo largo de la evolución. Se localizan tanto en la membrana de las vesículas secretoras (v-SNAREs) como en la membrana plasmática (t-SNAREs). Las principales proteínas que forman este complejo son la SNAP-25 (del inglés “*Synaptosome Associated Protein 25*”), la sintaxina 1 y la VAMP2 (del inglés “*Vesicle-Associated Membrane Protein 2*”, también denominada sinaptobrevina) (Sollner *et al.*, 1993). Además, existe otra proteína vesicular decisiva para el

proceso, la sinaptotagmina, que se ha propuesto como el sensor de Ca^{2+} en la última etapa de la exocitosis (Camacho *et al.*, 2003).

Por sí mismas, estas proteínas son capaces de llevar a cabo el proceso de fusión *in vitro* (Weber *et al.*, 1998) pero *in vivo* la fusión de membranas requiere un gran número de otras proteínas reguladoras como la α -SNAP, el factor sensible a n-etilmaleimida (NSF) (Sudhof, 1995) o la sinaptotagmina (Voets *et al.*, 2001), entre otras. Todo este complejo entramado de proteínas constituye la denominada “**maquinaria de la exocitosis**”.

En cuanto al proceso de endocitosis, que permite la recuperación de la membrana plasmática, además de actuar la clatrina, también se ha descrito la participación clave de la dinamina 1-2 en la escisión de la vesícula (**Figura 7, punto 5**). Sin embargo, actualmente se cree que la dinamina también participa en el proceso de exocitosis, contribuyendo junto a las sindapinas a la expansión del poro de fusión (Samasilp *et al.*, 2012).

4.5.-La célula cromafín en el eje simpático-adrenomedular (ESAM)

El sistema nervioso autónomo (SNA) es el responsable de la respuesta inmediata del organismo ante una situación de estrés o amenaza para la integridad del mismo (respuesta de “lucha o huida” caracterizada por primera vez por Walter Cannon a principios del siglo XX (Cannon, 1914)). Su activación se puede producir por estímulos que son percibidos tanto por los órganos de los sentidos como por distintos receptores del organismo (p.ej. los barorreceptores del arco aórtico) (Ulrich-Lai y Herman, 2009).

Siguiendo las complejas integraciones neocorticales y límbicas que se producen en la interpretación de un estímulo como “amenazante”, el complejo amigdalino-dorsomedial parece representar el punto más alto en el origen de esta respuesta de “lucha o huida”. Desde ese punto, los impulsos nerviosos pasan a las regiones hipotalámicas laterales y posteriores (Roldán *et al.*, 1974), y continúan descendiendo a través de la médula espinal y del nervio esplácnico hasta la médula adrenal (**Figura 8**), produciéndose fundamentalmente una respuesta a través del sistema nervioso simpático, por lo que podemos hablar de un “eje simpático-adrenomedular” (ESAM) en el que participa la célula cromafín adrenomedular.

Durante estas respuestas “simpáticas” en el momento de la “lucha o huida”, también se han detectado activaciones simultáneas de las regiones anteriores del hipotálamo desencadenando también respuestas parasimpáticas que activan funciones de inhibición, ralentización y “restauración” (Roldán *et al.*, 1974).

El aumento en la concentración de NA (liberada desde los nervios simpáticos) y de AD (liberada tras la estimulación directa de las células cromafines de la médula adrenal) será el responsable de poner en marcha la serie de reacciones descritas previamente y cuyo objetivo final va ser facilitar un aumento del flujo de sangre oxigenada al sistema nervioso central y al sistema músculo esquelético, cuyos órganos deberán coordinar una respuesta efectiva de “lucha o huida” (Cannon, 1920; Tank y Lee Wong, 2015).

La capacidad limitada de las respuestas simpáticas para continuar liberando neurotransmisores ante una situación de estrés prolongada, produce, segundos después de la activación del ESAM, la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). Así, ante una situación de estrés prolongado, el hipotálamo libera la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que actuando sobre la hipófisis, facilitará la liberación por ésta de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la cual estimula la producción de glucocorticoides y andrógenos por la corteza suprarrenal (**Figura 8**). Los glucocorticoides, en definitiva, aumentan el aporte de glucosa, triglicéridos y aminoácidos plasmáticos a los tejidos, aumentando así la capacidad de la respuesta de “lucha o huida”.

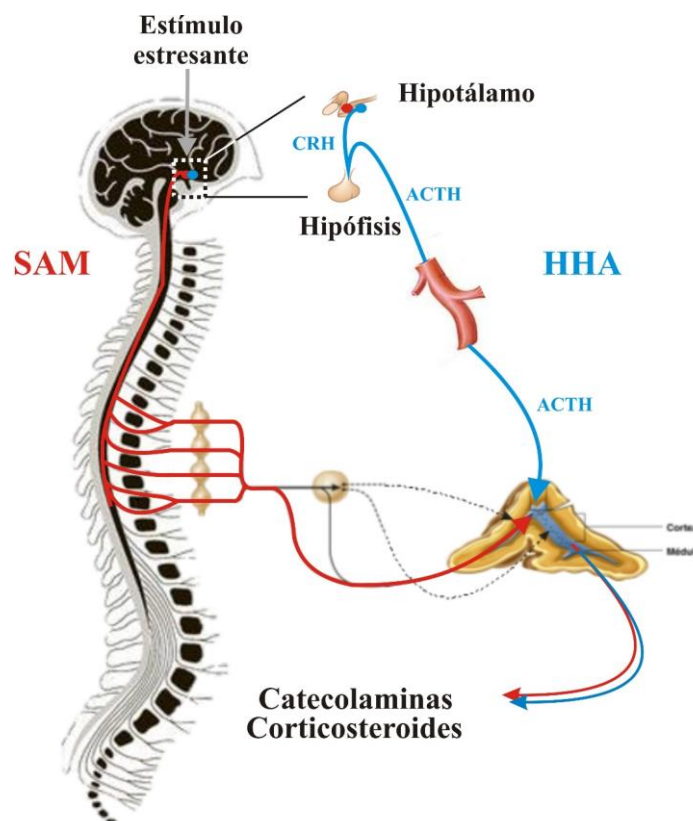


Figura 8. Esquema de la activación de los ejes ESAM y HHA ante un estímulo estresante. Representación del eje simpático-adrenomedular (ESAM) (en rojo) y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (en azul). La activación del eje ESAM producirá la liberación de catecolaminas y la activación del eje HHA liberará la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que en la hipófisis producirá la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que a su vez producirá la liberación de corticosteroides de la corteza adrenal.

4.6.-Acoplamiento estímulo-secreción en la célula cromafín

En 1961, Douglas y Rubin acuñaron el término “acoplamiento estímulo-secreción” tras observar que “*la acción excitante de la ACh en la médula suprarrenal depende de la presencia de Ca^{2+} y sugiere que la ACh provoca la secreción medular suprarrenal causando una penetración de iones de calcio en las células medulares suprarrenales*” (Douglas y Rubin, 1961). Este término sirve, pues, para denominar en su conjunto a las distintas fases del proceso que acontece desde que la ACh liberada por las terminaciones del nervio esplácnico estimula a la célula cromafín hasta que se produce la secreción de catecolaminas al torrente sanguíneo.

Desde entonces, se han ido describiendo los diferentes acontecimientos implicados en este proceso, en este “acoplamiento estímulo-secreción” y que se representan de forma esquemática en la **Figura 9**.

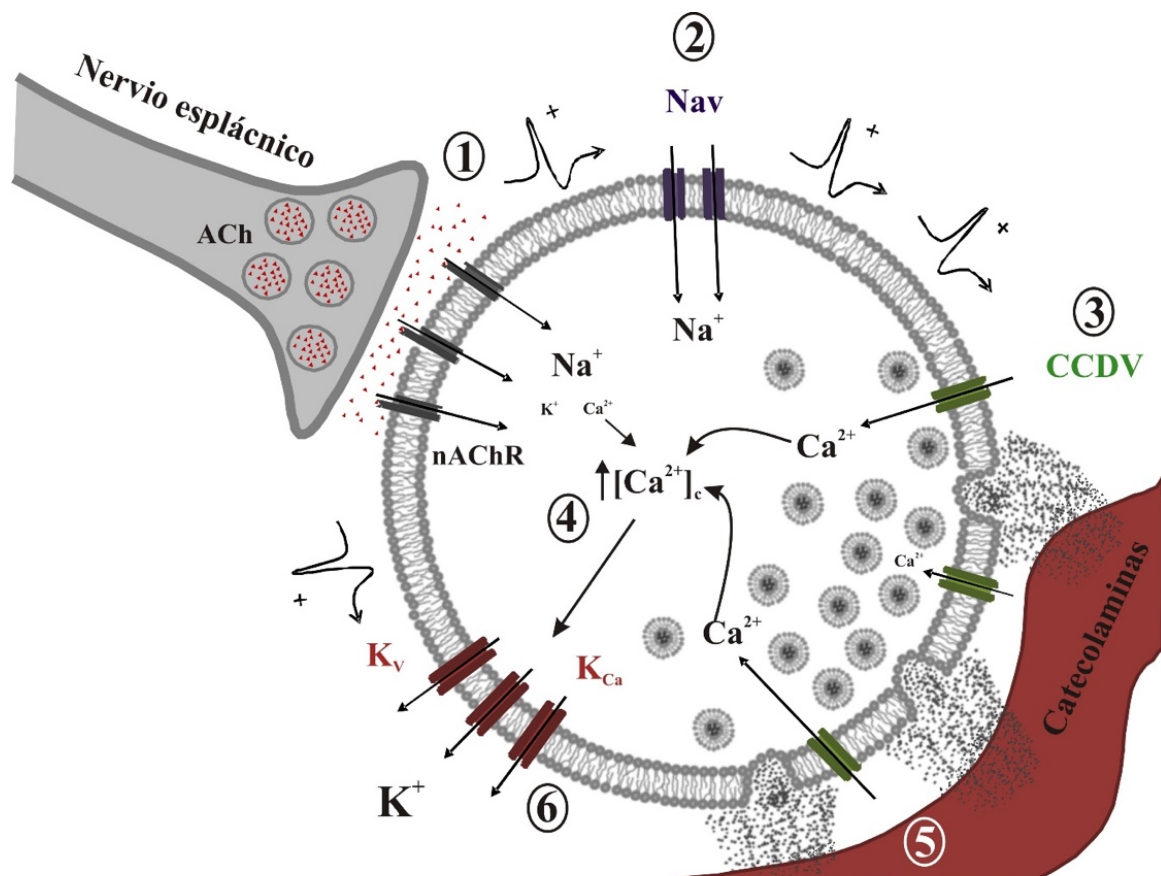


Figura 9. Esquema representativo del “acoplamiento estímulo-secreción” en la célula cromafín. 1) El nervio esplácnico tras ser estimulado libera su neurotransmisor (ACh) que va a activar los receptores nicotínicos de la célula cromafín (nAChR), produciendo así una entrada de Na^+ (y también de Ca^{2+} , aunque en menor medida). 2) La entrada de cargas positivas provoca una despolarización del potencial de membrana (V_m) dando lugar a la apertura de los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v). 3) La entrada de Na^+ en la célula a través de éstos produce una mayor despolarización del V_m que a su vez induce la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) y la consiguiente entrada de Ca^{2+} al interior celular. 4) La entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV elevan las concentraciones de Ca^{2+} citosólico. 5) Este aumento del Ca^{2+} provoca, entre otros muchos procesos, la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo. 6) El V_m que se encuentra muy despolarizado, vuelve al estado de reposo gracias a la salida de cargas positivas (K^+) a través de los canales de K^+ voltaje (K_v) y Ca^{2+} dependientes.

Como se indica en la **Figura 9**, ante una situación de estrés o peligro, se activa el eje ESAM, provocando la liberación de ACh por el nervio esplácnico (Feldberg *et al.*, 1934). La ACh liberada se une a receptores nicotínicos y muscarínicos ubicados en la membrana plasmática de la célula cromafín. La proporción de estos dos tipos de receptores colinérgicos cambia según la especie animal, variando así también la relación directa con la secreción de catecolaminas. Así, por ejemplo, en células cromafines bovinas los receptores nicotínicos son responsables del 90% de la secreción de catecolaminas, mientras que en cromafines porcinas es de entorno a un 60%. (Nassar-Gentina *et al.*, 1997). En los mamíferos parece predominar la respuesta nicotínica, mientras que la vía muscarínica parece realizar una función reguladora.

Los receptores nicotínicos son receptores de tipo ionotrópico que, cuando se activan mediante la unión de dos moléculas de ACh, sufren un cambio conformacional abriéndose el canal iónico que forma parte del receptor, aumentando así la conductancia de éste a iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (aunque sobre todo al Na^+) (Nooney *et al.*, 1992). La entrada de Na^+ hacia el interior celular producirá una pequeña despolarización de la membrana plasmática, lo que favorecerá la apertura de canales de Na^+ dependientes de voltaje (Ceña *et al.*, 1983). Esto llevará a una mayor entrada de cargas positivas (Na^+) que incrementará el grado de despolarización de la membrana, dando lugar a una mayor probabilidad de generar potenciales de acción y a una mayor probabilidad de apertura de los CCDVs (Ceña *et al.*, 1983), que en última instancia favorecen la entrada de iones Ca^{2+} , con lo que se produce el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que servirá como señal para disparar la liberación de catecolaminas (**Figura 9**).

La finalización del proceso fisiológico de liberación excitotóxica de catecolaminas se puede deber a varios factores. Entre ellos se encuentra la acción de la acetilcolinesterasa (AChE), que está en la hendidura sináptica y se encarga de degradar rápidamente la ACh. Además, se ha descrito que entre los productos de secreción de las células cromafines se libera una pequeña cantidad de esta enzima (Bon *et al.*, 1990; Small *et al.*, 1993). Otro de los factores que pueden contribuir a la finalización de la respuesta secretora es la desensibilización de los receptores nicotínicos (Quick y Lester, 2002). El manejo del Ca^{2+} por los depósitos intracelulares también puede jugar un papel muy importante en la regulación de la secreción de catecolaminas, ya que la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que se produce tras la apertura de los CCDVs va a ser rápidamente tamponada por proteínas citosólicas quelantes de Ca^{2+} , por el RE y la mitocondria (García *et al.*, 2006). La modulación autocrina/paracrina de la actividad de los CCDVs por los productos co-secretados junto a las catecolaminas durante la exocitosis (ATP y opioides fundamentalmente)

también puede contribuir a modular las señales citosólicas de Ca^{2+} y, de esta manera, limitar la extensión del proceso excocitótico (Gandía *et al.*, 1993; Hernández-Guijo *et al.*, 1999)

Finalmente, la salida de K^+ a través de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y de voltaje, produce la repolarización celular y con ello una disminución de la excitabilidad, volviendo otra vez al punto de inicio y preparando a la célula para poder responder a un nuevo estímulo.

4.7.-La célula cromafín como modelo para estudiar el envejecimiento del SN

Como ya se ha comentado anteriormente, las células cromafines de la médula adrenal comparten el mismo origen embrionario neuroectodérmico con las neuronas, por lo que este tipo celular presenta características tanto estructurales como funcionales muy similares a las de las neuronas. Así, hemos visto que comparten la propiedad de su excitabilidad, gracias a la presencia en su membrana de distintos subtipos de canales iónicos, tanto dependientes de voltaje (Na_v , CCDV y K_v), como dependientes de calcio (K_{Ca}) y operados por receptores (nAChRs). Gracias a estos canales iónicos, las células cromafines al igual que las neuronas pueden: a) recibir señales de naturaleza eléctrica y química; b) decodificar y reconocer esas señales; c) generar y elaborar un patrón de respuestas como la liberación de un neurotransmisor y otros mensajeros.

Una de las principales ventajas que puede aportar el trabajar con las células cromafines en comparación con las neuronas, es que se pueden realizar cultivos primarios a partir de animales adultos para estudiar funciones neuronales a edades avanzadas, mientras que en caso de las neuronas generalmente se obtienen a partir de animales en etapas embrionarias o perinatales. Además, las células cromafines adoptan una morfología esférica cuando se mantienen en cultivo primario (a diferencia de las neuronas que tienden a emitir prolongaciones a modo de dendritas), lo que la convierten en una célula ideal para la aplicación de técnicas electrofisiológicas.

Las células cromafines han servido durante muchos años como una ventana al estudio de las funciones del cerebro y como un buen modelo de transmisión neuroquímica. Además, los primeros estudios de los orgánulos secretores se realizaron en las células cromafines, donde también se caracterizaron las principales proteínas implicadas en la exocitosis. Es por ello que la célula cromafín ha sido recientemente propuesta como “el cerebro periférico” (Bornstein *et al.*, 2012).

Este modelo no solo se ha mostrado útil para el estudio de las funciones básicas de la transmisión sináptica del SN en situaciones fisiológicas, sino que también numerosos estudios han utilizado la célula cromafín como modelo para el estudio de la transmisión sináptica en

condiciones que reproducen situaciones patológicas o en condiciones tóxicas. A modo de ejemplo, en los últimos años se ha demostrado que los cambios que se producen a nivel del SNC durante distintas patologías de tipo neurodegenerativo, afectan al modo en que se comunica la célula cromafín, alterando la forma en que ésta recibe las señales, su excitabilidad/respuesta ante dichas señales, la forma en que maneja el Ca^{2+} intracelular y, en definitiva, a la respuesta en forma de liberación de neurotransmisores (Johnson *et al.*, 2007; de Diego *et al.*, 2012; Calvo-Gallardo *et al.*, 2015; Martínez-Ramírez *et al.*, 2018).

Como hemos comentado en esta Introducción, el envejecimiento afecta a todos los sistemas, siendo el sistema nervioso especialmente vulnerable a sus consecuencias pudiendo derivar en diferentes enfermedades neurodegenerativas. Vistas las similitudes entre la célula cromafín y las neuronas, no es difícil pensar que ambas pueden sufrir cambios similares a lo largo de la edad.

Por otro lado, una de las alteraciones que se ha descrito tanto durante el envejecimiento como en algunas enfermedades neurodegenerativas, son las alteraciones funcionales en los ejes ESAM y HHA, es decir, en las relaciones centrales/periféricas y, por ende, neuronales/hormonales, lo que puede estar asociado con el desarrollo, la progresión o la exacerbación de las enfermedades neurodegenerativas (Seals y Esler, 2000; Esch *et al.*, 2002). De esta manera, la conexión entre el SNC y el sistema nervioso periférico (SNP) se convierte en una vía por la que las alteraciones derivadas del envejecimiento del cerebro se pueden ver reflejadas en la célula cromafín.

Por todas estas características consideramos que la célula cromafín adrenomedular se puede considerar como un buen modelo para estudiar algunos aspectos característicos del envejecimiento, como por ejemplo los cambios que afectan a los procesos de excitabilidad celular y de transmisión sináptica.

“Nada en la vida es para ser temido, es solo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

María Salomea Skłodowska-Curie. Física y Química polaca. Premio Nobel de Física 1903. Premio Nobel de Química 1911 (1867-1934)

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El inexorable paso del tiempo conlleva una inevitable acumulación de alteraciones (daño en el DNA, inflamación, estrés oxidativo, alteraciones en las respuestas inmunes y neuroendocrinas, fallos en la degradación de desechos, alteraciones en la homeostasis de proteínas, entre muchas otras) que hacen al organismo más vulnerable a padecer determinadas enfermedades. Al ser el SN especialmente sensible a este tipo de daños, la aparición de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la ELA o el Parkinson es más probable conforme aumenta la edad (Niccoli *et al.*, 2017; Tysnes y Storstein, 2017; Garré-Olmo, 2018).

En estas enfermedades, y también durante el envejecimiento, se han descrito alteraciones en la función neuronal y sináptica en diferentes puntos del SN que, en algunos casos, se acompañan de un deterioro cognitivo. Estos defectos en la transmisión sináptica se pueden producir por alteraciones neuronales en la capacidad de recibir las señales, en el procesamiento de éstas, o en la síntesis, almacenamiento y liberación de neurotransmisores que participan en la respuesta fisiológica a dichas señales (Rothstein, 1995; Hardy y Selkoe, 2002; Hindle, 2010).

Para estudiar las posibles alteraciones que se puedan producir durante el envejecimiento en los procesos de transmisión sináptica, en la presente Tesis Doctoral nos hemos planteado trabajar con un modelo de ratón que nos puede permitir estudiar estas posibles alteraciones de la transmisión sináptica en una situación de envejecimiento “acelerado” (ratón SAMP8) y compararlo frente a un envejecimiento “normal” (ratón SAMR1). Los ratones SAMP8 presentan numerosas alteraciones patológicas que ocurren no solo durante el envejecimiento sino también en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Kitamura *et al.*, 1992; Karasawa *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 1997; Takeda, 2009; Li *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017). Además, relacionadas con estos cambios se han observado diversas alteraciones en estudios conductuales, incluyendo alteraciones en los procesos de memoria y aprendizaje de forma precoz (Miyamoto *et al.*, 1986; Flood y Morley, 1998; Ohta *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2014).

Como ya hemos comentado, aunque el envejecimiento afecta a todo el organismo, el SN (tanto el SNC como el SNP) resulta ser especialmente vulnerable a muchas de estas alteraciones, lo que puede favorecer la aparición y/o el empeoramiento de enfermedades neurodegenerativas. Por ello, muchos de los estudios sobre el envejecimiento realizados hasta la fecha se centran en el cerebro y prioritariamente en las células de tipo neuronal. En este contexto, el estudio de procesos extremadamente rápidos (milisegundos) como es la caracterización cinética de las distintas etapas de la exocitosis, resultaría muy complejo de realizar en neuronas. Por el contrario, la célula cromafín adrenomedular, las técnicas de registro electrofisiológico y la técnica de registro amperométrico de la liberación de neurotransmisores

nos aportan una excelente alternativa para el estudio que aquí proponemos, como lo demuestra el hecho de que ya existen varios estudios que han tipificado las alteraciones en este modelo de neurotransmisión que acontecen en enfermedades neurodegenerativas como la ELA (Calvo-Gallardo *et al.*, 2015), la enfermedad de Huntington (Johnson *et al.*, 2007; Mackenzie *et al.*, 2014; Martínez-Ramírez *et al.*, 2018) o la enfermedad de Alzheimer (Keating *et al.*, 2008; de Diego *et al.*, 2012; Nanclares, 2017).

En este contexto, nuestra hipótesis de trabajo nace de la idea de que **la célula cromafín adrenomedular sufre cambios fisiopatológicos durante el envejecimiento que comprometen la integridad del acoplamiento estímulo-secreción, que afectarían a la excitabilidad celular y a la generación de las señales citosólica de Ca^{2+} o bien al propio proceso exocitótico de catecolaminas.** Estos cambios podrían estar directamente relacionados con la célula cromafín o podrían ser la consecuencia de la afectación del SNC, que se reflejaría a través del eje simpático-adrenomedular.

Si esta hipótesis se confirmase, los cambios acaecidos en el acoplamiento estímulo-secreción a nivel de la célula cromafín (ya sea en la recepción de la señal, su descodificación o en la respuesta generada) que posee un papel clave en la respuesta al estrés, podrían suceder también en las neuronas del SNC.

Además, las posibles alteraciones que pudieran observarse con respecto a la excitabilidad celular y al proceso secretor de catecolaminas, se podrán comparar con los que se producen en otros modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas e interpretar así la posible existencia de una correlación entre los cambios propios del envejecimiento y estas enfermedades de tipo neurodegenerativo.

Para explorar esta hipótesis nos planteamos desarrollar los objetivos concretos que se describen a continuación:

1. Caracterizar las posibles **alteraciones cognitivas** que pudieran aparecer en ratones SAMP8 a lo largo de la edad, comparándolas con lo que ocurre en ratones SAMR1. Para ello se aplicarán tests que exploran la memoria en estos animales.
2. Caracterizar posibles cambios que puedan ocurrir en la **excitabilidad celular** de las células cromafines adrenomedulares aisladas de ratones SAMP8 a lo largo de la edad, comparándolas con lo que ocurre en ratones SAMR1. Para ello se caracterizará mediante técnicas de registro electrofisiológico el potencial de membrana de las células cromafines,

el disparo de potenciales de acción y la actividad de los distintos canales iónicos y receptores implicados en el acoplamiento estímulo-secreción de la célula cromafín.

3. Caracterizar los posibles cambios que pudieran ocurrir en el proceso de **exocitosis de catecolaminas** en células cromafines adrenomedulares aisladas de ratones SAMP8 a lo largo de la edad, comparándolas con lo que ocurre en ratones SAMR1. Para ello se utilizarán técnicas de registro amperométrico, que nos permitirán estudiar detalladamente la cinética del poro de fusión exocitótico tras la aplicación de un estímulo secretagogo fisiológico (ACh) o un estímulo químico (alto K^+).
4. Caracterizar los posibles cambios en la **expresión de proteínas de la maquinaria exocitótica** en ratones SAMP8 a lo largo de la edad, comparándolos con lo que ocurre en ratones SAMR1.

En este contexto, el estudio comparativo de la excitabilidad y del proceso exocitótico de catecolaminas en la célula cromafín de los modelos murinos de envejecimiento SAMP8 y SAMR1, podría proporcionarnos una valiosa información sobre los cambios que acontecen en el cerebro durante el envejecimiento, así como sobre la posible afectación de otros sistemas, como es el eje simpático-adrenal.

“No temas a las dificultades: lo mejor surge de ellas”

**Rita Levi-Montalcini. Científica italiana. Premio Nobel
de Fisiología o Medicina 1986 (1909-2012)**

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1.-ANIMALES EMPLEADOS

Todos los procedimientos experimentales realizados con animales de laboratorio en esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo siguiendo las directrices marcadas por el Comité Ético de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid para el cuidado y la utilización de animales en la investigación científica. Estas directrices siguen las marcadas por el Parlamento Europeo (2010/63/EU) y la legislación española (RD 1201/2005 y 53/2013).

Para desarrollar la parte experimental de esta Tesis Doctoral se utilizaron ratones macho de dos cepas denominadas SAM (“Senescence Accelerated Mouse”) (Takeda *et al.*, 1981); la primera de ellas fue la cepa SAMP8 (“Senescence Accelerated Mouse Prone-8”, un modelo murino de envejecimiento acelerado) y la segunda fue la cepa SAMR1 (“Senescence Accelerated Mouse Resistant-1”, que presenta un envejecimiento normal) la cual utilizamos como control (Takeda *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 1994; Takeda, 2009). Estas dos cepas de ratones fueron donadas gentilmente por la Doctora Elena Puerta Ruiz de Azúa (Universidad de Navarra) y la Doctora Mercé Pallás Lliberia (Universidad de Barcelona).

Los ratones de ambas cepas (SAMP8 y SAMR1), se utilizaron en los días postnatales P60, P180 y más de P360. Los ratones de la cepa SAMR1 presentan un envejecimiento normal a lo largo de las tres edades, sin presentar cambios en el aprendizaje y la memoria. Los ratones SAMP8 a los 2 meses de edad (P60) no presentan déficits cognitivos, sin embargo, a los 6 (P120) y 12 meses (P360) ya muestran un fenotipo de envejecimiento prematuro acompañado de déficits en el aprendizaje y la memoria (Miyamoto, 1997; Flood y Morley, 1998; Butterfield y Poon, 2005; Cheng *et al.*, 2014; Yanai y Endo, 2016).

Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el sufrimiento de los animales tanto a la hora del sacrificio como durante la cría. También se intentó utilizar el menor número de animales posible que nos permitiera el protocolo experimental y el poder estadístico de los datos. Los ratones se criaron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid el cual está acondicionado para su estabulado, cuidados y mantenimiento. Dichos ratones se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad controladas, con un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 horas y con agua y comida *ad libitum*.

2.-AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y aproximadamente a la misma hora de la mañana, e inmediatamente se procedió a la extracción de las glándulas

adrenales mediante laparotomía. Una vez extraídas, éstas se colocan en una placa Petri conteniendo una solución de Locke fría (composición en mM: 154 NaCl, 5,58 KCl, 3,6 NaHCO₃, 10 HEPES, 5,5 glucosa; pH = 7,35 ajustado con NaOH).

Posteriormente, las glándulas se trasladan a un papel de filtro humedecido con solución de Locke, colocado encima de una placa Petri que contiene hielo en su interior para mantener el frío durante la manipulación de la glándula y todo ello debajo de un microscopio estereoscópico (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EE.UU.).

Seguidamente, se procede a la retirada de grasa que rodea la glándula con la ayuda de unas tijeras oftálmicas y unas pinzas hasta que ésta queda completamente limpia y se puede realizar la disección de la médula. Para ello, con ayuda de dos pinzas, se sujeta la glándula por la cápsula y se estira por los extremos hasta que se produce su apertura. La retirada de la cápsula a menudo conlleva una retirada parcial de la corteza dejando al descubierto la médula adrenal. Los restos de corteza que quedan se extraen manualmente mediante la utilización de un bisturí.

A continuación, las médulas libres de corteza se colocan en un eppendorf con 100 µl de solución de Locke que contiene papaína (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 25 U/ml, durante 25-30 minutos a 37°C, tiempo necesario para que la papaína digiera las uniones intercelulares, facilitando la posterior disgregación de la médula y la obtención de las células cromafines.

Una vez finalizado este proceso de digestión enzimática, se retira y descarta la solución de papaína con cuidado de no aspirar los trozos de médula, y cuidadosamente con la ayuda de una pinza, éstos se trasladan a otro eppendorf que contiene 1 ml de medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), con alta glucosa (4,5 g/L), 26 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 4 % de suero bovino fetal y 50 UI/ml de penicilina-estreptomicina; pH = 7,35 (ajustado con NaOH), para diluir y lavar los restos de papaína.

Tras este lavado se retira el DMEM, y se añaden rápidamente 100 µl de DMEM nuevo a las médulas, y se procede a realizar una disgregación mecánica del tejido adrenomedular. Para realizar este paso, se utiliza en primer lugar una micropipeta de 1 ml con un volumen seleccionado de 90 µl y una punta de 1 ml (que previamente se pule al fuego para evitar que durante el proceso de disgregación las médulas queden enganchadas en la punta); se realizan 20-30 pases lentos y suaves al DMEM con las médulas, con cuidado de no introducir burbujas, de forma que las médulas pasen repetidamente por la punta de la micropipeta, lo que ocasiona que las células se vayan desprendiendo del tejido. Tras estos pases, sin aspirar lo que queda de

las médulas, se retira el máximo volumen de DMEM posible, que ya contiene células cromafines disgregadas, y lo pasamos a otro eppendorf.

Rápidamente, se añaden 80 μ l de DMEM en el eppendorf donde se encuentran los restos de las médulas y se repite el mismo proceso, pero esta vez con una micropipeta de 200 μ l, con un volumen seleccionado de 70 μ l (con una punta brevemente pulida al fuego) y se realizan otros 20-30 pases suaves y lentos al DMEM con los restos de las médulas, con cuidado de no hacer burbujas en el proceso, y tras acabar, se retira con cuidado todo el volumen que sea posible, sin absorber las médulas, y se deposita en el eppendorf que contiene las células de la anterior disgregación quedando un volumen aproximado de 160-170 μ l.

Al terminar esta segunda fase de disgregación mecánica, en caso de quedar todavía algún pequeño resto de tejido adrenomedular, se puede realizar una tercera disgregación añadiendo en este caso 40 μ l de DMEM al eppendorf que contiene los restos de las médulas. De nuevo, se utiliza la micropipeta de 200 μ l, pero esta vez con un volumen seleccionado de 30 μ l; se realizan otros 20-30 pases suaves y lentos al DMEM con las médulas, con cuidado de no introducir burbujas, y tras acabar, se retira el máximo volumen posible con cuidado y sin absorber los últimos restos de médula no disgregada, y se deposita en el eppendorf anterior junto el volumen obtenido de las dos disgregaciones anteriores (en torno a unos 200-210 μ l en total), obteniendo así la solución final de cultivo de células cromafines de ratón (CCR).

Finalmente, se descartan los últimos restos de médula no disgregada, y se procede al sembrado de las CCR. Para ello, previamente se debe haber preparado una placa multipocillo (24 pocillos) con cubreobjetos de 12 mm de diámetro esterilizados al fuego y posteriormente tratados con una gota (de tamaño suficiente para que cubra el cubreobjetos por completo) de una solución de poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,1 mg/ml, manteniéndose la placa durante 30-45 minutos a 37°C. Después, se procede al lavado de los pocillos con agua estéril (repitiéndose este lavado al menos 3 veces). Una vez los pocillos están secos, se añaden 15-20 μ l de la solución conteniendo las CCR en el centro del cubreobjetos, dejando así una gota concentrada en cada pocillo (repartiendo toda la solución de CCR en aproximadamente 12 pocillos).

Tras el sembrado de las CCR en todos los pocillos, se coloca la placa multipocillo en el incubador a una temperatura de 37°C, con una atmósfera saturada de humedad (95%) y con una concentración del 5% de CO₂ durante aproximadamente 1 h, tiempo en el que las células se

adherirán al cubreobjetos. Pasado este tiempo, se añaden 500 µl de DMEM a cada pocillo y se guarda la placa en el incubador hasta el día siguiente, en el que se realizarán los experimentos.

3.-REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS: PATCH-CLAMP

3.1.-Fundamentos de la técnica

La segunda ley de la termodinámica determina que todo sistema en el universo tiende a un equilibrio en el cual la temperatura, la presión y el potencial químico tienden a ser uniformes; sin embargo, para todas las células, es vital mantener una concentración desigual de sustancias en su interior y en el exterior. En el caso que nos compete, la desigualdad de cargas eléctricas a través de la membrana de una célula, permite a ésta establecer un “no equilibrio”, que es dinámico y que oscila alrededor de un estado estable desigual, el cual, mediante un minucioso engranaje molecular delicadamente acoplado, es capaz de reaccionar apropiadamente a una serie de variaciones para regresar a ese estado estable. Para comprender mejor este “no equilibrio”, primero hay que entender mejor su origen.

Cuando existen dos soluciones con diferentes concentraciones iónicas separadas por una membrana que deja pasar solo a uno de estos iones, éste tiene tendencia a moverse siguiendo un gradiente químico. Este movimiento iónico hace que se vayan acumulando cargas a uno de los lados de la membrana, estableciéndose así una diferencia eléctrica entre las dos soluciones, que va a afectar al movimiento del ion, alcanzándose un punto de equilibrio entre la fuerza eléctrica y la fuerza química. A esta diferencia de potencial a través de la membrana, que es necesaria para contrarrestar la tendencia del ion a moverse siguiendo su gradiente de concentración, es a lo que se denomina potencial de equilibrio para ese ion y viene determinado por la ecuación de Walther Nernst:

$$V_x = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[x]_e}{[x]_i}$$

- Donde:
- V_x = Potencial de equilibrio del ion x
 - R = Constante de los gases ($8.314472 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - T = Temperatura absoluta (298 K)
 - F = Constante de Faraday ($96500 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 - Z = número y polaridad de las cargas del ion (valencia)
 - $[X]_e$ = Concentración del ion x en el medio extracelular
 - $[X]_i$ = Concentración del ion x en el medio intracelular

Si intentamos aplicar estos conceptos a una célula de nuestro organismo, nos encontramos con que ésta se caracteriza por presentar una marcada diferencia en la composición iónica del medio intracelular (en el que es abundante el ion K^+), en comparación con la del medio extracelular (en el que predomina el ion Na^+). Esto hace que todas las células, por el simple hecho de estar vivas, tienen una diferencia de potencial (ΔV) entre ambos lados de su membrana plasmática (potencial de membrana V_m). Cuando este potencial de membrana alcanza el valor dado por la ecuación de Nernst para un determinado ion, el flujo neto de éste a través de la membrana se hace igual a cero.

Como la membrana celular puede ser permeable a más de un ion de forma simultánea, el potencial de membrana estará determinado por el potencial de reposo de cada uno de los iones implicados (que dependerá de las concentraciones intra y extracelulares de cada ion), pero condicionado por la permeabilidad relativa de la membrana para cada ion. Conociendo las permeabilidades relativas de la membrana a los diferentes iones en una determinada situación, podemos calcular el potencial de membrana en dicha situación mediante la llamada ecuación de campo constante de Goldman, Hodgkin y Katz:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_e + P_{Na}[Na^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_e}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_i}$$

Donde: R = Constante de los gases ($8.314472 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 T = Temperatura absoluta (298 K)
 F = Constante de Faraday ($96500 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 P_X = Permeabilidad relativa para cada ion
 $[X]_e$ = Concentración de cada ion en el medio extracelular
 $[X]_i$ = Concentración de cada ion en el medio intracelular

En esta fórmula se han representado únicamente los iones sodio, potasio y cloruro por ser los que más relevancia tienen en la generación del potencial de membrana en las células nerviosas y musculares

De acuerdo a esta ecuación, el V_m de una célula en un momento determinado depende fundamentalmente de la permeabilidad selectiva de la membrana a determinados iones y de la concentración de éstos tanto dentro como fuera de la célula. Así, a modo de ejemplo, en la situación de reposo de la célula, ésta presenta una mayor permeabilidad relativa al K^+ en comparación con otros iones, por lo que el V_m “en reposo” tenderá a aproximarse al potencial

de equilibrio del K^+ (de aproximadamente -80 mV según la ecuación de Nerst, condicionado a su vez por las concentraciones extracelulares e intracelulares de este ion).

La situación contraria la podemos encontrar cuando estimulamos una célula excitable y abrimos por ejemplo los canales de Na^+ . En esta situación se producirá un marcado aumento de la permeabilidad relativa a este ion y el V_m de la célula tenderá a aproximarse al potencial de equilibrio del Na^+ (aproximadamente $+60$ mV según la ecuación de Nerst). Es lo que se aprecia por ejemplo en la fase de despolarización de un potencial de acción.

Es importante recalcar que las células excitables de nuestro organismo (representadas principalmente por las neuronas y las células musculares), en situación de reposo, muestran cierta permeabilidad a los iones de Na^+ y Cl^- , además de al K^+ , gracias a la existencia de canales pasivos para cada ion. El movimiento pasivo de iones de K^+ hacia el exterior celular a través de los canales pasivos de K^+ , se contrarresta con el movimiento pasivo de Na^+ hacia el interior de la célula. Sin embargo, este trasiego de iones no puede mantenerse indefinidamente porque los gradientes iónicos para el Na^+ y para el K^+ disminuirían, alterándose de esta forma el V_m en reposo. En esta situación, la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática adquiere un papel muy importante en el mantenimiento del V_m , ya que evita la disipación de los gradientes iónicos de Na^+ y de K^+ , trasladando iones en contra de su gradiente electroquímico (saca tres iones de Na^+ y mete dos de K^+ al interior celular consumiendo ATP en este proceso).

Gracias a todos estos mecanismos descritos anteriormente, las células operan alejadas del equilibrio (asimetría iónica) y alcanzan un estado estable, lo que las convierte en estructuras disipativas con capacidad para intercambiar materia y energía con el entorno. Las denominadas “células excitables”, gracias a que poseen canales voltaje dependientes, son además capaces de variar el V_m ante determinados estímulos generando una respuesta determinada según el tipo celular. En concreto, esta variación del V_m celular es en lo que se basa la generación y transmisión del potencial de acción y, por lo tanto, juega un papel crucial en la comunicación y control de los organismos pluricelulares.

Las técnicas electrofisiológicas nos permiten registrar y medir todos estos movimientos iónicos y las variaciones que ocurren en el V_m durante la activación celular. Las técnicas que hoy en día utilizamos se han venido desarrollando a lo largo de la historia: desde los comienzos de la electrofisiología, en los que Luigi Galvani describió la naturaleza eléctrica del impulso nervioso en sus experimentos con ranas (Galvani, 1791), pasando por los experimentos que permitieron esclarecer los mecanismos iónicos que subyacen a la iniciación y propagación de

los potenciales de acción en el axón gigante del calamar (*Loligo pealeii* o *Loligo forbesii*) mediante la técnica de fijación de voltaje de doble electrodo (Hodgkin y Huxley, 1939; Curtis y Cole, 1940).

Pero no es hasta la aparición de la electrofisiología moderna cuando se ha avanzado en mayor grado en el conocimiento sobre la comunicación entre células excitables, gracias al desarrollo de la denominada técnica de “patch-clamp” por Erwin Neher y Bert Sakmman (Hamill *et al.*, 1981), que posibilita su aplicación en células de pequeño tamaño y, gracias a la mejora en la relación señal-ruido, se puede incluso registrar la actividad de un único canal iónico.

3.2.-Descripción de la técnica

La técnica de “patch-clamp” se caracteriza por aprovechar las propiedades eléctricas que poseen las células, a saber: 1) bicapa lipídica de la membrana celular, que actúa a modo de condensador eléctrico; 2) diferencias en la composición iónica de los medios intra y extracelular, que actúa a modo de generador de voltaje; y 3) canales iónicos, que actúan a modo de resistencias que regulan el paso de la corriente eléctrica. Estas propiedades convierten a las células excitables en pequeños circuitos eléctricos (**Figura 10**).

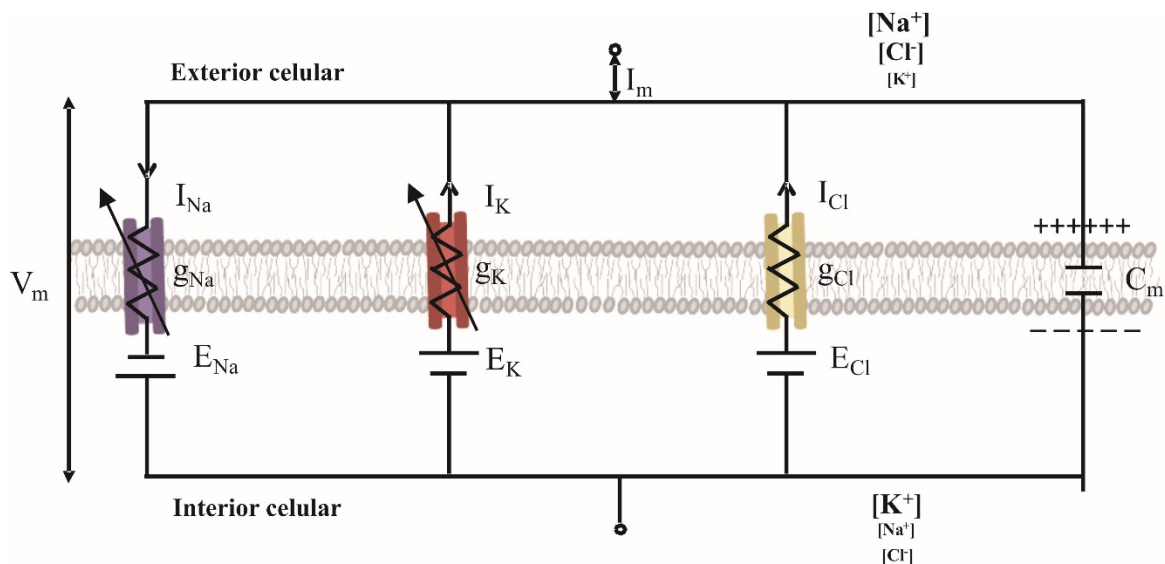


Figura 10. Representación esquemática del circuito eléctrico equivalente de una célula. Donde I es la corriente de cada ion (I_{Na} , I_K e I_{Cl}) e I_m la corriente total a través de la membrana, g es la conductancia (inversa de la resistencia (R)) para cada ion (g_{Na} , g_K y g_{Cl}), E es el potencial de equilibrio para cada ion (E_{Na} , E_K y E_{Cl}) en el cual el flujo para cada ion sería cero, C_m representa la capacidad de la membrana y V_m el potencial de membrana. Las conductancias para el Na^+ y el K^+ se muestran con flechas para indicar que pueden variar mediante la aplicación de voltaje al circuito, ya que se corresponden con los canales voltaje dependientes. Se han representado los iones de mayor importancia en el circuito. Adaptado de Hodgkin y Huxley (1952).

Así, esta técnica permite incluir a la célula con la que se va a trabajar en un circuito eléctrico que está conectado a un amplificador (modelo EPC-9, HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania) con el cual se pueden controlar diferentes parámetros del sistema, que deben de cumplir la ley de Ohm:

$$\text{Voltaje (V)} = \text{Intensidad de la corriente (I)} \times \text{Resistencia (R)}$$

De acuerdo a esta ley, los cambios de voltaje que se produzcan en el circuito eléctrico serán proporcionales al producto de la intensidad de la corriente por la resistencia del circuito. Nuestro interés al aplicar esta técnica se centra en caracterizar los posibles cambios de resistencia del circuito, que se corresponderían con las aperturas y/o cierres de los distintos canales iónicos que se producen durante la actividad de las células excitables. Para ello, esta técnica se puede aplicar en dos modalidades:

- Modalidad de “**fijación de voltaje**”: el amplificador mantiene fijo el voltaje (voltios) del circuito, por lo que cualquier cambio en la resistencia (ohmios) producido por la apertura o cierre de canales, se debe traducir directamente en cambios de la intensidad de la corriente (amperios). De este modo, si en respuesta a un determinado estímulo se produce un trasiego de cargas a través de los diferentes canales iónicos de membrana, la corriente que el amplificador necesita inyectar para mantener fijo el V_m es equivalente al movimiento de cargas que se ha producido a través de la membrana.

En esta modalidad, los registros obtenidos reflejarán la pérdida o ganancia de cargas en la célula. Así, a modo de ejemplo, si se produce una salida de cargas positivas (p.ej. por la salida de K^+), el amplificador detectará una pérdida de cargas positivas en el interior celular e inyectará cargas positivas para mantener fijo el V_m , resultando en un registro de corriente positivo. Si, por el contrario, lo que se produce es una entrada de cargas positivas (p.ej. entrada de Na^+) el amplificador lo compensará inyectando cargas negativas, resultando en un registro de corriente negativo.

- Modalidad de “**fijación de corriente**”: en este caso, el amplificador mantiene fija la intensidad de la corriente (amperios) del circuito, por lo que cualquier cambio en la resistencia (ohmios) producido por apertura o cierre de canales, se verá reflejado en cambios en el voltaje (voltios). De esta manera, cualquier paso de cargas a través de los canales y cualquier inyección o sustracción de corriente que realicemos, producirán variaciones del V_m celular. Por lo tanto, lo que medimos en esta modalidad de “fijación

de corriente” son las variaciones en el V_m celular, por ejemplo, en forma de potenciales de acción.

3.3.-Aplicación de la técnica

Describiremos en este apartado los preparativos y pasos necesarios para realizar los registros electrofisiológicos en células cromafines.

3.3.1.-Preparación y superfusión de las células

Para el registro tanto de las corrientes iónicas que atraviesan la membrana plasmática como del V_m , los cubreobjetos que contienen las CCR se colocan en una cámara de metacrilato que contiene una solución control Krebs-HEPES (KH) (véase su composición en el apartado 8 de esta sección, relativo a soluciones experimentales empleadas), montada sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Diaphot. La cámara de metacrilato se perfunde continuamente con KH a través de un circuito formado por una vía de entrada, que baña directamente la cámara y, otra vía de salida (succión), que se encuentra en otra sección para evitar que las ondas de la succión afecten a los registros. Adicionalmente, se coloca una pipeta de perfusión a ≈ 50 -100 μm de la célula elegida para realizar el experimento y se perfunde KH a través de ésta.

La pipeta de perfusión que se ha utilizado para los experimentos de esta Tesis Doctoral es de fabricación artesanal, y está formada por 5 tubos de polietileno de 0,28 mm de diámetro interno insertados dentro de una punta de pipeta, de manera que no queden espacios muertos entre los tubos y la pared de la pipeta, y desembocando todos en una salida en común (**Figura 11, A**). En algunos experimentos, como en los que se miden corrientes a través de receptores nicotínicos, es necesaria la aplicación rápida del correspondiente agonista del receptor y, por ello, se utiliza otra pipeta de perfusión que lleva incorporada un tubo de polietileno de 0,58 mm de diámetro interno (que llamaremos “vía rápida”) junto a 4 tubos de 0,28 mm (**Figura 11, B**), lo que nos permite dar pulsos breves de agonista, en nuestro caso, ACh.

Cada uno de estos tubos se conecta por su extremo posterior a un reservorio donde se encuentran acumuladas las soluciones con las que se va a trabajar. El flujo a través de las vías es controlado electrónicamente mediante válvulas solenoides (una para cada vía) (The Lee Company, Essex, CT, EEUU) de manera que sólo una de las válvulas puede permanecer abierta al mismo tiempo (controlador de válvulas, Segainvex UAM). La velocidad de perfusión es de

aproximadamente 1 ml/min en el caso de las vías normales, y de 2 ml/min en el de vía rápida, siendo esta velocidad del flujo regulada por gravedad.

En estas condiciones, la renovación total del medio que rodea a la célula al cambiar de solución se produce en ≈ 50 ms. Todos los experimentos de medida de corrientes iónicas y de V_m realizados en esta Tesis Doctoral se han realizado a temperatura ambiente (26 ± 2 °C).

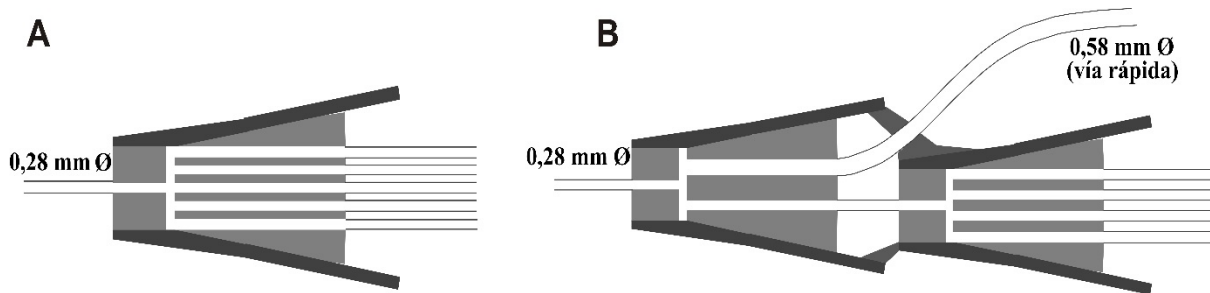


Figura 11. Representación de las pipetas de perfusión. A Pipeta de perfusión de cinco vías de 0,28 mm de diámetro cada una. B Pipeta de perfusión de “vía rápida”, con cuatro vías de 0,28 mm y una de 0,58 mm de diámetro.

3.3.2.-Preparación de las “pipetas de patch”

Para la realización de los experimentos de “patch-clamp” se utilizan pipetas que se preparan a partir de capilares de borosilicato de 100 mm de longitud, 1,5 mm de diámetro exterior y 0,4 mm de diámetro interior (World Precision Instruments, Florida, EEUU). Para la fabricación de las “pipetas de patch”, estos capilares se colocan en un estirador Narishige, modelo PC-10 (Narishige, Tokio, Japón), que aplica un primer calor que produce un estiramiento de la parte central del capilar y posteriormente un segundo calor que separa en dos la pipeta, quedando así dos pipetas cuyas puntas tienen un diámetro aproximado de 1 μ m. Para que las pipetas tengan una superficie roma y suave (para evitar el daño celular durante la realización del sello eléctrico), éstas se pulen aplicando calor con una microforja (Narishige modelo MF-830). Tras estos procedimientos en esta Tesis Doctoral se han obtenido pipetas con una resistencia de 5-10 M Ω .

Para poder registrar corrientes o medir el potencial de membrana, es esencial conectar la “pipeta de patch” conteniendo una solución salina al amplificador, utilizando para ello un **electrodo de Ag/AgCl**. Generalmente, estos electrodos se fabrican sumergiendo el cuerpo principal del electrodo, formado de plata, en un baño con iones de cloruro, los cuales, al entrar

en contacto con la superficie de éste, generan un recubrimiento de cloruro de plata (Mitchell, 1980). Las ventajas de estos electrodos son: la gran cantidad de estudios basados en su fiabilidad, la baja resistividad eléctrica, la facilidad de manejo, el bajo potencial de “offset” (diferencia de potencial entre el electrodo y el medio) y el bajo coste en comparación con otros electrodos fabricados con otro tipo de metales. Sin embargo, se degradan al tener una pérdida de iones en su superficie por el paso de corrientes eléctricas. Si estos electrodos se someten a una señal monofásica, la generación de iones se da en un solo sentido, lo que en periodos largos llega a causar la pérdida total de la interfaz de cloruro de plata (polarización del electrodo), exponiendo plata pura al medio de cultivo. Esto no sólo causa la degradación de la interfaz electrodo/electrólito (solución de la pipeta), sino que también el electrodo empieza a liberar iones de plata en el medio. Para evitarlo, los electrodos de Ag se cloruran regularmente sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO).

3.3.3.-Giga-sello y configuración de célula completa

Una vez tenemos todo preparado, el primer paso en la ejecución de la técnica de “patch clamp” es la **formación de un sello de alta resistencia eléctrica** entre la membrana plasmática y la punta de la pipeta. Para ello, como hemos explicado antes, se utiliza una pipeta de cristal de borosilicato cuya punta ha sido pulida por el calor generado al calentarse una resistencia y que posee un diámetro de aproximadamente 1 μm . La pipeta se aproxima a la membrana de la célula y se presiona contra ella, formando un sello eléctrico débil con una baja resistencia del orden de 10-50 $\text{M}\Omega$. Normalmente no se puede trabajar con estos sellos de baja resistencia ya que siempre habrá una fuga de corriente y no tienen estabilidad mecánica.

Para evitar un elevado ruido en los registros y la existencia de un flujo de corriente entre la pipeta y el baño, una vez se ha producido el contacto con la membrana, se aplica una ligera succión hacia el interior de la pipeta, originando sellos con resistencias de entre 1-100 $\text{G}\Omega$ conocidos como “**giga-sellos**”, lo que ya nos permitiría fijar el potencial del parche de membrana que se encuentra pinzado en la pipeta. La alta resistencia de este sello, asegura que la mayoría de las corrientes originadas en ese pequeño parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta y de allí, al circuito de medida de corriente.

La estabilidad mecánica de estos “giga-sellos” nos permite realizar determinadas manipulaciones mecánicas, lo que da lugar a las diferentes configuraciones de esta técnica (**Figura 12**), cuyas principales características se describen a continuación:

- **Célula adherida o parche “in situ” (“cell-attached”)**: Esta configuración es la que se consigue al formar el “giga-sello” después de la leve succión. Permite el registro de corrientes unitarias a través de uno o varios canales presentes en el parche de membrana que queda atrapado por la pipeta de vidrio. Esta configuración resulta de gran utilidad para el estudio de la actividad de los canales iónicos en condiciones fisiológicas (por ejemplo, modulación de la actividad de los canales iónicos por segundos mensajeros intracelulares).
- **Configuración de célula entera (“whole-cell”)**: Esta configuración se consigue a partir de la configuración anterior “cell-attached”, tras aplicar una fuerte succión que provoca la rotura del parche de membrana. Con ello se pone en contacto el líquido de la pipeta con el interior celular y, al ser mayor el volumen del líquido de la pipeta, éste dializa la célula. Esta configuración nos permite registrar la actividad de la totalidad de los canales iónicos presentes en la membrana celular. El punto negativo de esta configuración es que debido a la diálisis del interior celular por la solución de la pipeta se pierde completamente la integridad intracelular y con ello la posibilidad de estudiar efectos moduladores de la actividad de los canales iónicos por segundos mensajeros. La principal ventaja de esta técnica es la posibilidad de dializar la célula con soluciones intracelulares de muy diversa composición.
- **Configuración de parche perforado (“perforated patch”)**: Es una variación de la configuración “whole-cell” en la que en lugar de romper el parche de membrana mediante una succión brusca se provoca la apertura de pequeños poros en dicho parche mediante la inclusión de agentes antifúngicos (nistatina o anfotericina) en la solución de la pipeta. Estos poros permiten el paso de pequeños iones, pero no de moléculas más grandes, con lo que se consigue una continuidad eléctrica que nos permite el estudio de la actividad de todos los canales iónicos de la membrana, pero sin que se produzca la pérdida de la integridad celular.
- **Configuraciones de parche escindido**: Estas configuraciones son las indicadas para registrar corrientes unitarias que fluyen a través de un único canal iónico cuando adicionalmente se quiere controlar la composición intracelular y/o extracelular. En primer lugar, la configuración **exterior-fuera (“outside-out”)**, se obtiene desde la configuración de “whole-cell” realizando una separación rápida de la pipeta produciendo así una escisión de un trozo de la membrana. Esta configuración es útil para estudiar los efectos de los agentes farmacológicos aplicados rápidamente desde el lado extracelular de la

membrana. En segundo lugar, se puede obtener la configuración *interior-fuera* (“*inside-out*”) a partir de la configuración de “cell-attached”. Para ello, una vez obtenemos el “giga-sello”, realizamos una separación rápida de la pipeta en bajo calcio (choque osmótico) quedando el lado intracelular en el exterior de la pipeta (pasando a ser “intracelular” el medio que tenemos en el baño). Esta configuración es la más indicada para estudiar el efecto de diferentes agentes en los canales iónicos a nivel intracelular.

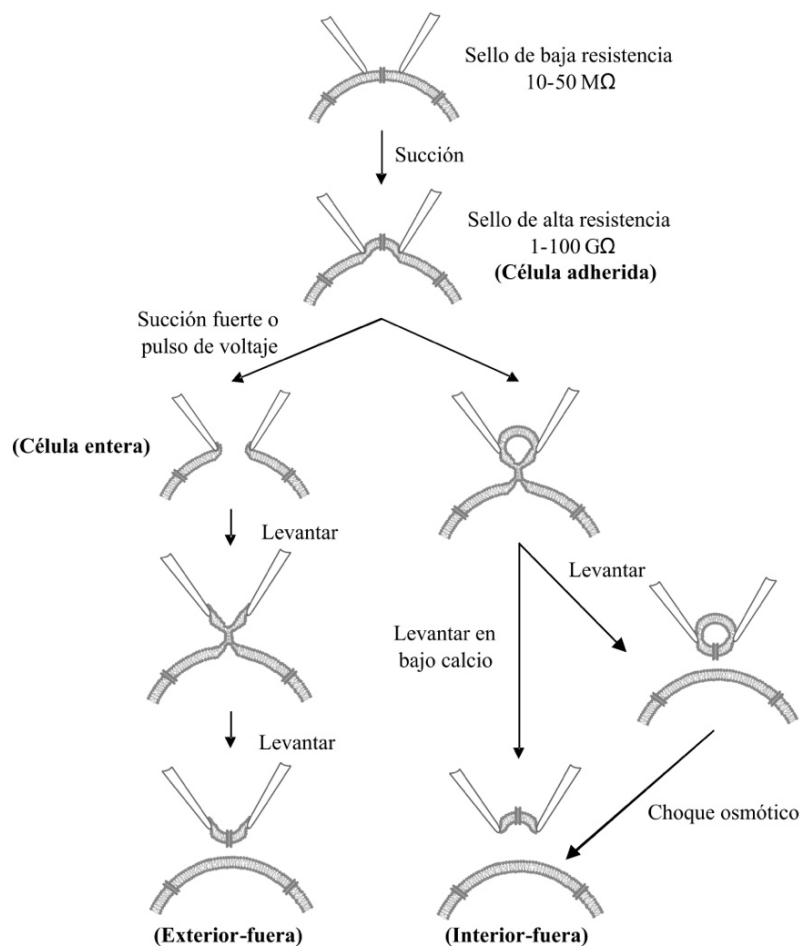


Figura 12. Representación esquemática de las diferentes configuraciones que ofrece la técnica de “patch-clamp”. Orden de representación empezando desde arriba a la izquierda: célula adherida, célula entera, parche escindido exterior-fuera y parche escindido interior-fuera. Versión elaborada a partir del esquema de Hamill y colaboradores (1981).

En el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la configuración de célula entera (“whole-cell”) para realizar todos los experimentos de corrientes iónicas y registro de V_m . Esta configuración presenta ventajas experimentales entre las que cabe destacar que es fácil de obtener y permite la elección de la composición de la solución

intracelular, lo que es esencial para poder medir y separar las diferentes corrientes. Sin embargo, dado que en esta configuración se dializa la célula con la solución de la pipeta, se produce una pérdida gradual de los componentes intracelulares, sobre todo de segundos mensajeros, perdiéndose los posibles efectos moduladores de éstos sobre receptores y/o canales iónicos.

3.4.-Obtención de los registros electrofisiológicos

Para la obtención de los registros electrofisiológicos se utilizó el software Pulse v8.74 (HEKA Elektronik), utilizando generalmente una frecuencia de muestreo de 20 KHz. El análisis de los datos se realizó con este mismo software Pulse v8.74 (HEKA Elektronik) y posteriormente los datos obtenidos fueron tratados usando el software Excel (Microsoft, Redmond, WA).

Las representaciones gráficas y análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad Prism v6.01 (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA). Los ejemplos representativos se obtuvieron mediante el software IgorPro v4.0.8 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) y fueron maquetadas mediante el software Corel Draw X3 Graphics Suite (Corel, Ottawa, Canadá).

3.4.1.-Registro de corrientes iónicas

Para el registro de los diferentes tipos de corrientes iónicas en las CCR hemos utilizado la modalidad de “fijación de voltaje” y la configuración de “célula entera” (Hamill *et al.*, 1981), dializándose las células con distintas soluciones intracelulares que nos permiten estudiar aisladamente cada subtipo de canal iónico. Igualmente, las células se han superfundido con diferentes soluciones extracelulares, adecuadas al tipo de corriente iónica que se pretende estudiar en cada experimento.

El V_m de las células se ha fijado a un valor de -80 mV y las medidas de todas las corrientes a través de canales iónicos, excepto las corrientes nicotínicas, se realizaron mediante la aplicación de protocolos típicos de curvas IVs (que permiten valorar la intensidad de la corriente a diferentes voltajes), lo que nos permite caracterizar el rango de activación de los diferentes canales iónicos y evitar posibles errores debidos a factores que pudieran originar una alteración en la activación de los canales. A continuación, detallamos los protocolos experimentales utilizados para el registro de los distintos tipos de corrientes iónicas:

- **Corrientes nicotínicas** (I_{ACh}): La inducción de este tipo de corrientes, que se generan como consecuencia de la activación de los nAChRs, se realizó mediante la aplicación

repetida de pulsos breves (250 ms) con una solución KH conteniendo 100 μM de ACh, a intervalos de 30 s, a través de la pipeta de perfusión de “vía rápida”. Con la aplicación de estos pulsos se obtienen corrientes iónicas de entrada caracterizadas por presentar una rápida activación y una rápida inactivación (**Figura 13, A**).

La solución intracelular utilizada para la realización de estos registros fue la denominada INC (ver composición en el apartado de soluciones), que permite evitar una posible “contaminación” con corrientes de salida de K^+ .

Para los análisis cuantitativos de las corrientes nicotínicas se midió la intensidad máxima de la corriente de entrada (corriente pico, en pA) y la carga (pC).

- **Corrientes de Na^+ (I_{Na}):** La inducción de este tipo de corrientes a través de los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v) se realizó mediante la aplicación de un protocolo de curva IV_{Na} , consistente en la aplicación de pulsos despolarizantes de 10 ms de duración a voltajes en un rango que va desde -60 mV a +60 mV, con saltos crecientes de 10 mV, aplicados a intervalos de 15 s. Con la aplicación de estos pulsos se obtienen corrientes iónicas de entrada caracterizadas por presentar una rápida activación y una muy rápida inactivación (**Figura 13, B**).

La solución intracelular utilizada para la realización de estos registros fue la denominada INC (ver composición en el apartado de soluciones), que permite evitar una posible “contaminación” con corrientes de salida de K^+ . Igualmente, para evitar que la entrada de Ca^{2+} , que también se produce en este rango de voltajes, pueda enmascarar la corriente de Na^+ , estas corrientes se obtuvieron en células superfundidas con una solución extracelular KH conteniendo 0 Ca^{2+} nominal.

Para la cuantificación de la magnitud de la I_{Na} se ha considerado la intensidad máxima de la corriente (en pA) obtenida en cada pulso despolarizante.

- **Corrientes de Ca^{2+} (I_{Ca}):** La inducción de este tipo de corrientes a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) se realizó mediante la aplicación de un protocolo de curva IV_{Ca} , consistente en la aplicación de pulsos despolarizantes de 50 ms de duración a voltajes en un rango que va desde -50 mV a +50 mV, con saltos crecientes de 10 mV, aplicados a intervalos de 10 s. Con la aplicación de estos pulsos se obtienen corrientes iónicas de entrada caracterizadas por presentar una rápida activación (aunque más lenta que la de la I_{Na}) y una lenta inactivación (**Figura 13, C**).

La solución intracelular utilizada para la realización de estos registros fue la denominada INC (ver composición en el apartado de soluciones), que permite evitar una posible “contaminación” con corrientes de salida de K^+ . Las células se superfundieron con una solución extracelular KH conteniendo 2 mM de Ca^{2+} .

Puesto que en el rango de voltajes aplicado también se van a activar simultáneamente los canales de Na^+ , la cuantificación de la magnitud de la I_{Ca} se realizó midiendo la intensidad de la corriente a los 10 ms del inicio del pulso despolarizante donde, gracias a la rápida inactivación de las corrientes de Na^+ , se puede medir la corriente máxima de Ca^{2+} (pA) sin que interfiera la de Na^+ .

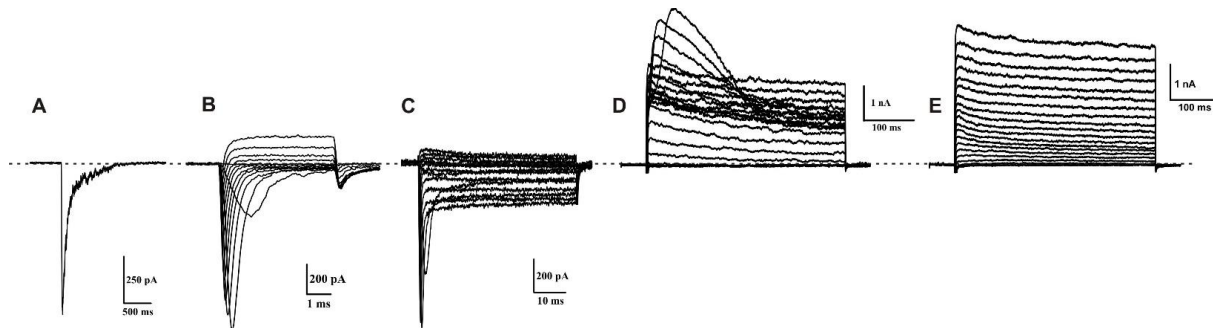


Figura 13. Diferentes tipos de corrientes iónicas registradas en la célula cromafín en respuesta a protocolos de estimulación específicos. A Corriente nicotínica. **B** IV de Na^+ (corriente de sodio a diferentes voltajes). **C** IV de Ca^{2+} (corriente de calcio a diferentes voltajes). **D** IV de $K^+_{(Ca)}$ (corriente de potasio dependiente de calcio a diferentes voltajes). **E** IV de $K^+_{(V)}$ (corriente de potasio a diferentes voltajes).

- **Corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+} ($I_{K(Ca)}$):** La inducción de este tipo de corrientes a través de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} ($K_{(Ca)}$) se realizó mediante la aplicación de un protocolo de curva IV_K , consistente en la aplicación de pulsos despolarizantes de 400 ms de duración, a voltajes en un rango que va desde -40 mV a +150 mV, con saltos de voltaje crecientes de 10 mV, aplicados a intervalos de 10 s. Con la aplicación de estos pulsos despolarizantes se obtienen corrientes iónicas de salida caracterizadas por presentar una rápida activación seguida de una fase de inactivación (**Figura 13, D**).

La solución intracelular utilizada para la realización de estos registros fue la denominada KCC (ver composición en el apartado de soluciones). Estas corrientes se obtuvieron en células superfundidas con una solución KH conteniendo 2 mM de Ca^{2+} .

La cuantificación de la magnitud de estas corrientes se realizó midiendo la máxima corriente (en nA) a los 100 ms del inicio del pulso despolarizante.

- **Corrientes de K^+ dependientes de voltaje ($I_{K(V)}$):** La inducción de este tipo de corrientes a través de los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_V) se realizó mediante la aplicación de un protocolo de curva IV_K , consistente en la aplicación de pulsos despolarizantes de 400 ms de duración, a voltajes en un rango que va desde -40 mV a +150 mV, con saltos de voltaje crecientes de 10 mV, aplicados a intervalos de 10 s. Con la aplicación de estos pulsos despolarizantes se obtienen corrientes iónicas de salida caracterizadas por presentar una rápida activación y una prácticamente nula inactivación (**Figura 13, E**).

La solución intracelular utilizada para la realización de estos registros fue la denominada KCC (ver composición en el apartado de soluciones). Para evitar la activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , estas corrientes se obtuvieron en células superfundidas con una solución KH conteniendo 0 mM de Ca^{2+} nominal.

La cuantificación de la magnitud de estas corrientes se realizó midiendo la máxima corriente (en nA) a los 100 ms del inicio del pulso despolarizante.

3.4.2.-Registro del potencial de membrana (V_m)

El registro del potencial de membrana de las células excitables da una información vital para comprender cómo se comunican entre ellas. El lenguaje que utilizan este tipo de células (desde las neuronas hasta las células cromafines) es un lenguaje electroquímico, es decir, señales eléctricas que originarán señales químicas (neurotransmisores) y viceversa, que es en lo que se basa la actividad sináptica.

La existencia de canales dependientes de voltaje que se abren o cierran en respuesta al V_m , confiere a estas células la capacidad de la excitabilidad y, por lo tanto, la capacidad de generación y transmisión del **potencial de acción (PA)**. Esto significa que, ante un evento despolarizante producido generalmente por un estímulo, el V_m en reposo variará hacia valores más positivos en los que, si se sobrepasa el umbral de disparo se generará el PA. En las CC de ratón y rata las variaciones del V_m en reposo son lo suficientemente fuertes para llegar al potencial umbral y generar **PA**s espontáneos sin necesidad de estímulos externos (Brandt *et al.*, 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980; Marcantoni *et al.*, 2007; Lingle *et al.*, 2018a).

Para el registro del V_m y de los potenciales de acción en las CCR hemos utilizado la modalidad de “fijación de corriente” y la configuración de “célula entera” (Hamill *et al.*, 1981), dializándose las células con la solución intracelular denominada KCC (véase el apartado de soluciones para la composición).

Los registros de V_m son extremadamente sensibles a la posible fuga de corriente que se puede producir entre la pipeta y la membrana plasmática una vez realizado y roto el sello (habitual en células mal selladas o dañadas). Por ello, en los experimentos realizados en la modalidad de “fijación de corriente”, en ningún caso se han tenido en cuenta células que presentaban una corriente de fuga superior a -10 pA. Salvo para la obtención de los potenciales de acción provocados, en ningún momento se inyectó corriente.

Los protocolos que hemos empleado en la presente Tesis Doctoral para medir diferentes aspectos de la excitabilidad celular fueron los siguientes:

- **Registro del V_m en reposo y PAs espontáneos:** Para registrar las variaciones que se producen cuando la célula se encuentra en reposo, se registró el V_m durante 5 minutos mientras se perfundía una solución extracelular KH. Durante este tiempo de registros se puede producir el disparo de PAs espontáneos (**Figura 14, A**).

Debido a que el V_m sufre fluctuaciones, el valor de V_m se calculó considerando el valor medio durante los 5 minutos de registro (aquellos registros que mostraron una tendencia hacia la despolarización o hiperpolarización durante todo el registro fueron descartados). En estos registros se midió el V_m (en mV), se contabilizó el número de PAs espontáneos, y se realizó el análisis cinético de dichos PAs.

- **Registro del V_m durante el estímulo de ACh:** Para estudiar los posibles cambios que se pueden producir en la excitabilidad durante el estímulo de ACh y correlacionarlos con los que se pueden producir en la liberación de neurotransmisores, se perfundió una solución KH conteniendo ACh 100 μ M durante 1 minuto. La despolarización inducida por la aplicación de ACh puede favorecer el disparo de PAs (**Figura 14, B**). Se midió la máxima despolarización producida por la ACh (en mV), se contabilizó el número de PAs generados, y se realizó el análisis cinético de dichos PAs.

- **Registro del V_m durante el estímulo de K^+ :** Para estudiar los posibles cambios que se pueden producir en la excitabilidad en respuesta a la estimulación con alto K^+ y correlacionarlos con los que se pueden producir en la liberación de neurotransmisores, se perfundió una solución KH conteniendo 70 mM K^+ (con reducción isoosmótica de Na^+) durante 1 minuto. La estimulación con K^+ produce una despolarización intensa y mantenida durante todo el tiempo de aplicación, lo que previene la aparición de PAs (**Figura 14, C**). Se midió la máxima despolarización producida por el K^+ (mV).

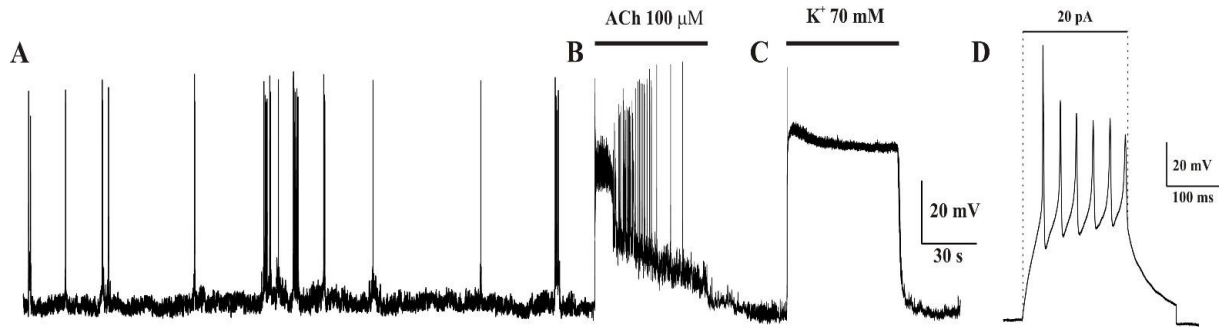


Figura 14. Protocolos experimentales utilizados para el registro de cambios en el V_m y el disparo de potenciales de acción. **A** Registro del V_m en reposo durante 5 minutos. **B** Registro del V_m durante un pulso de ACh 100 μM de un minuto. **C** Registro del V_m durante un pulso de K^+ 70 mM de un minuto. **D** Potenciales de acción provocados por la aplicación de un pulso de corriente de 20 pA desde -80 mV.

- **Registro de PAs provocados por un pulso eléctrico:** Para generar potenciales de acción de manera artificial, se aplicaron pulsos de corriente de 20 pA durante 200 ms mientras se perfundía la célula con una solución KH. Para que todos los pulsos partiesen del mismo V_m , inyectamos la corriente necesaria para llevar el V_m a un valor inicial de -80 mV (**Figura 14, D**). La despolarización producida por la inyección de la corriente de 20 pA es suficiente para que el V_m supere el umbral de disparo de PAs. Se contabilizó el número de PAs generados en las CCs de cada cepa durante el envejecimiento.

Los análisis cuantitativos y cinéticos de los PAs se llevaron a cabo utilizando el programa Clampfit (Molecular Devices, CA, USA). Para este estudio se tuvo en cuenta todo aquel PA que superase un V_m de -10 mV y se seleccionó un tiempo de pre- y post-disparo de 10 y 50 ms respectivamente. Todo aquel PA que se solapase con otro en los 10 ms de “pre-disparo” o 25 ms de “post-disparo” (por una alta frecuencia de disparo o “burst”) fue descartado. Igualmente se descartaron para el análisis cuantitativo y cinético los PAs de todos aquellos registros (basal y ACh) en los que el número de PAs fuese menor de 5 (por ser poco representativo) o mayor de 300/min (indicativo de un posible daño de la célula). De cada uno de los PAs se midieron los siguientes parámetros (**Figura 15**):

- **Amplitud del PA:** altura máxima del PA (en mV)
- **Tiempo de subida 10-90%:** tiempo que tarda en ascender el PA entre el 10 y el 90% de la fase de crecimiento (en ms)
- **Pendiente de subida 10-90%:** representa la velocidad de ascensión del PA entre el 10 y el 90% de la fase de crecimiento (en mV/ms)
- **$t_{1/2}$:** anchura del PA al 50% de su amplitud (en ms)

- A_{PA} : es el área positiva del PA (gris oscuro) (en mV/ms)
- **Tiempo de bajada 90-10%**: tiempo que tarda en descender el PA entre el 90 y el 10% de la fase de decrecimiento (en ms)
- **Pendiente de bajada 90-10%**: representa la velocidad de descenso del PA entre el 90 y el 10% de la fase de decrecimiento (en mV/ms).
- **Amplitud de la PHP**: hiperpolarización máxima del PA (en mV)
- A_{PHP} : área negativa del PA (área de la post-hiperpolarización; en mV/ms) (gris claro).

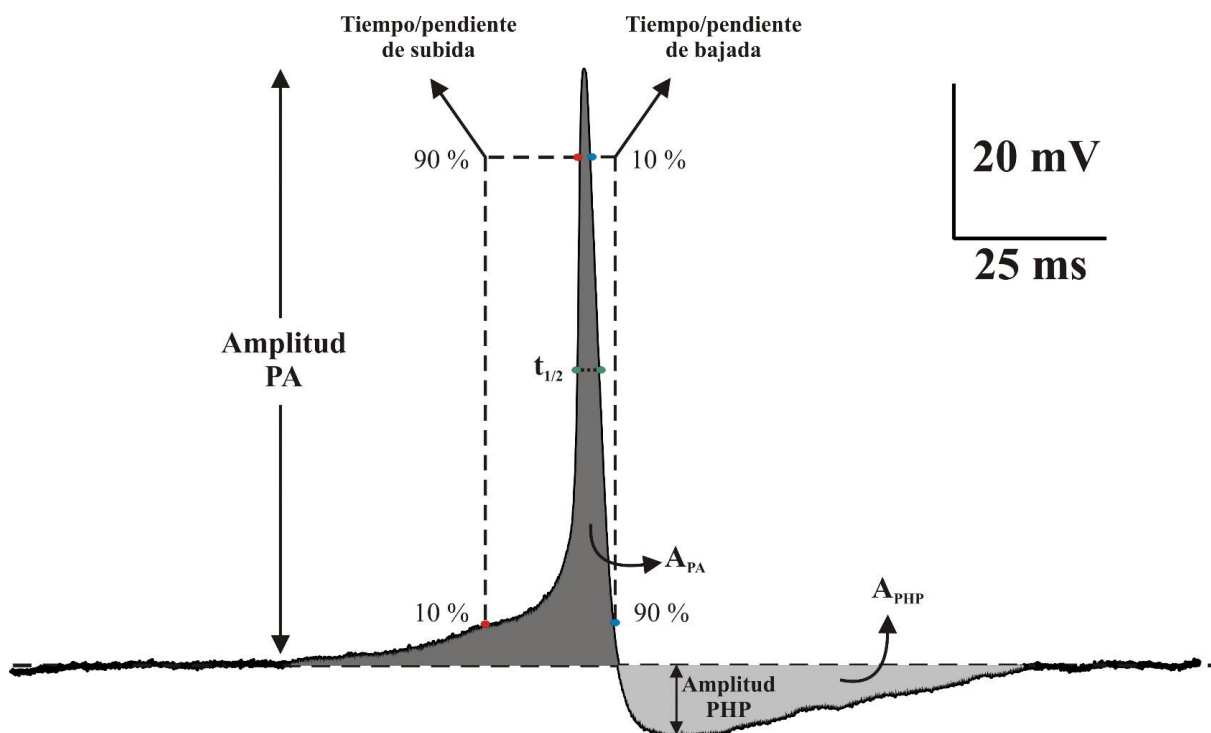


Figura 15. Potencial de acción modelo y parámetros cinéticos analizados. Amplitud del PA que es la altura máxima del PA (mV); tiempo de subida 10-90% (ms); pendiente de subida 10-90% (mV/ms); $t_{1/2}$ que es la anchura del PA (ms); A_{PA} que es el área positiva del PA (gris oscuro) (mV/ms); tiempo de bajada 90-10% (ms); pendiente de bajada 90-10% (mV/ms); Amplitud de la PHP que es la hiperpolarización máxima del PA (mV) y A_{PHP} que es el área de la post-hiperpolarización (mV/ms) (gris claro).

Durante el registro del V_m en reposo, también se evaluó el **umbral de disparo**, que se define como el potencial de membrana necesario para producir la apertura de los canales de Na^+ dependientes de voltaje y desencadenar el disparo del PA. Utilizando el programa Clampfit, se midió manualmente, uno a uno, el punto del V_m (mV) en el que se produce el disparo de los PAs. En la **Figura 16** se puede ver un ejemplo de un potencial de acción fallido (**A**, la despolarización del V_m no llega a alcanzar el umbral de disparo) y un segundo punto del mismo registro de V_m en el que sí se ha llegado a alcanzar el potencial umbral y por tanto se ha producido el disparo de un potencial de acción (**B**).

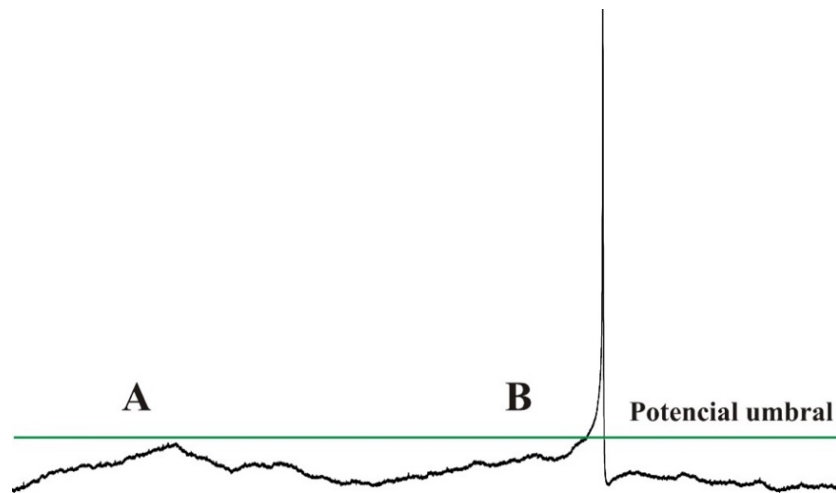


Figura 16. Representación del umbral de disparo. **A** Despolarización del V_m que no sobrepasa el potencial umbral y, por lo tanto, no genera un potencial de acción (potencial fallido). **B** Potencial de acción generado después de que el V_m llegue al potencial umbral de disparo.

Para el análisis estadístico de estos resultados se obtuvieron los valores de la media para cada parámetro a estudiar de todos los PAs de cada célula (cada registro); luego se realizó la media para cada parámetro de todas las células pertenecientes a un mismo ratón y, por último, se agruparon los datos de todos los ratones pertenecientes a un mismo grupo. Este método tiene en cuenta la variabilidad en el número de eventos observados en las distintas células individuales, y proporciona resultados consistentes de experimento a experimento.

3.4.3.-Medida de la capacidad de la membrana

En diversos estudios se ha demostrado que el tamaño celular es un parámetro importante a tener en cuenta a la hora de caracterizar y cuantificar diferentes corrientes iónicas puesto que generalmente, a mayor tamaño celular, se pueden registrar corrientes más grandes y viceversa, ya que a mayor superficie celular hay un mayor número de canales (Neher y Marty, 1982).

La valoración del tamaño celular puede hacerse utilizando técnicas electrofisiológicas gracias a la propiedad de condensador eléctrico que supone la bicapa lipídica de la membrana, habiéndose descrito que la capacidad específica de las membranas biológicas es bastante constante, y se estima que tiene un valor de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, independientemente del tipo de célula.

Gracias a los estudios realizados en el laboratorio de Erwin Neher (Sigworth *et al.*, 1995) es posible determinar este parámetro utilizando el circuito C-Slow del amplificador EPC-9 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania), que permite determinar la capacidad de membrana de las células una vez ajustados y compensados los transitorios capacitativos que se producen en respuesta a un pulso de voltaje (de 5 ms a 5 mV) y que corresponden a la capacidad de la

pipeta de patch. Esta lectura de la capacidad de la membrana proporciona una determinación aproximada del tamaño celular.

4.-REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS: AMPEROMETRÍA

4.1.-Fundamentos de la técnica

La amperometría es una técnica que implica la medición de la intensidad de la corriente que circula por un circuito eléctrico.

En su aplicación a la determinación de los niveles de determinados neurotransmisores, podemos describirla como un método electroquímico en el que un potencial lo suficientemente positivo aplicado desde un electrodo de referencia va a producir la oxidación de moléculas de un neurotransmisor (las catecolaminas o la serotonina, por ejemplo), liberándose así electrones que van a ser captados por un electrodo de trabajo, generándose una corriente eléctrica cuya intensidad puede ser cuantificada. La aplicación de esta técnica en la presente Tesis Doctoral nos ha permitido estudiar detalladamente los paseos finales del proceso de liberación de neurotransmisores, esto es, de la exocitosis.

Los primeros indicios sobre la liberación de neurotransmisores por exocitosis se obtuvieron en el laboratorio de Bernard Katz en los años cincuenta (Fatt y Katz, 1952; Del Castillo y Katz, 1954). Este grupo estudió la liberación de la ACh en los terminales nerviosos de la placa motora y descubrieron que su liberación se producía en forma de paquetes discretos o cuantos. Más adelante, Klein (Klein y Thureson-Klein, 1971) aportó pruebas morfológicas utilizando la microscopía electrónica, con la que consiguió fotografiar una vesícula fusionándose con la membrana plasmática en el nervio esplácnico bovino. Posteriormente, se siguieron aportando pruebas que apoyaban la hipótesis de la exocitosis como el mecanismo para la liberación de neurotransmisores y hormonas. Sin embargo, todas estas aproximaciones eran medidas indirectas de este proceso.

Fue en 1990 cuando el grupo de Mark Wightman logró registrar la secreción de una única célula cromafin bovina utilizando la técnica de amperometría. Este grupo consiguió observar una liberación de catecolaminas por exocitosis de cada una de las vesículas secretoras (Leszczyszyn *et al.*, 1990; Leszczyszyn *et al.*, 1991; Wightman *et al.*, 1991). Uno de los avances técnicos que permitió realizar estas mediciones tan precisas fue la puesta a punto de microelectrodos de carbón que proporcionan una medida directa de lo acontecido en la superficie de la célula. Es por eso que esta técnica fue la primera aproximación que permitió

una medida directa del número de moléculas liberadas por cada vesícula y el modo en que se liberaban, es decir, la cinética del proceso de exocitosis.

4.2.-Descripción de la técnica

En esta Tesis Doctoral hemos utilizado la técnica de amperometría para analizar la secreción de catecolaminas de las células cromafines estimulada por ACh y K^+ . En este caso, la técnica consiste en aproximar un fino microelectrodo de carbono, que se encuentra polarizado a un voltaje superior al de oxidación de las catecolaminas (alrededor de 700 mV), hasta tocar la superficie de la célula cromafín (**Figura 17, B**). Las catecolaminas liberadas mediante el proceso de exocitosis en la zona de membrana celular que se encuentra en contacto con el electrodo de carbono van a sufrir una rápida oxidación, generando especies reducidas y dos electrones por cada molécula de catecolamina oxidada (**Figura 17, A**).

Debido al potencial positivo del electrodo de carbono, los electrones se verán atraídos por éste, lo que generará un trasiego de electrones que producirá un aumento de la corriente dando lugar a lo que denominamos como “**espigas amperométricas**”, y que representan el curso temporal de la liberación de catecolaminas desde cada una de las vesículas sinápticas. Éstas se amplifican mediante un amperómetro y quedan registradas en un ordenador, obteniendo finalmente un registro amperométrico (**Figura 17, C**).

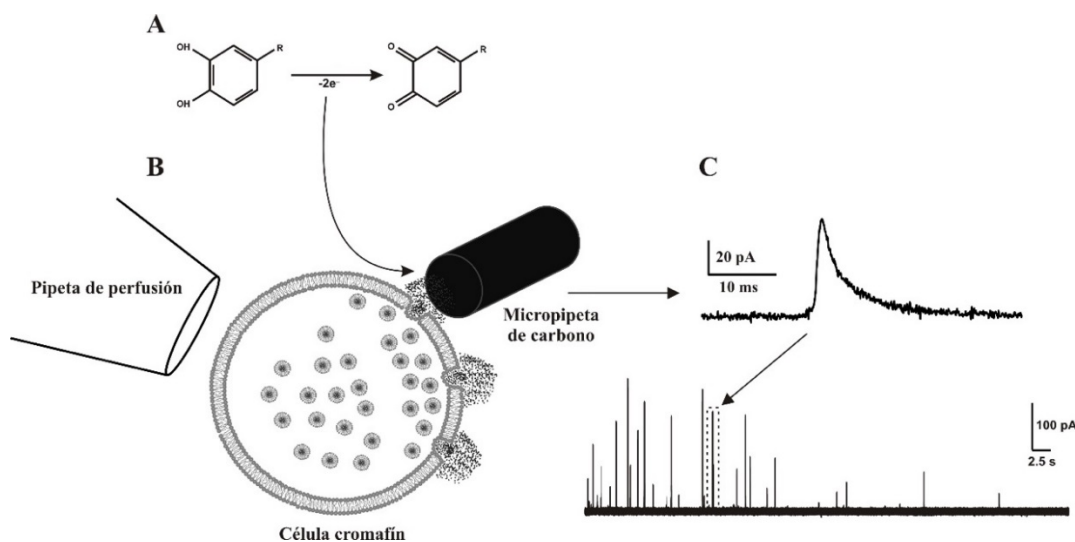


Figura 17. Técnica de amperometría. **A** Proceso de oxidación de las catecolaminas por el cual se generan productos reducidos y dos electrones por cada molécula de catecolamina oxidada. **B** Pipeta de perfusión a través de la cual se superfunde ACh o K^+ que estimulará la célula cromafín produciendo la exocitosis de las catecolaminas que se oxidarán en contacto con el microelectrodo de carbono. **C** Registro de una espiga amperométrica correspondiente a la liberación de una sola vesícula sináptica. La parte inferior de este panel muestra un registro amperométrico de 1 minuto de duración en el que se detecta la liberación de múltiples vesículas (abajo).

El proceso de exocitosis del contenido de una sola vesícula se compone de varios pasos bien definidos (**Figura 18, A**), los cuales se pueden medir gracias al análisis de los diferentes parámetros de las espigas amperométricas, es decir, la cinética de estas espigas (**Figura 18, B**):

- El acercamiento de la vesícula a la membrana plasmática, su anclaje y fusión de la membrana. En el registro amperométrico no hay variación de la corriente puesto que no se ha oxidado ninguna catecolamina (**1**)
- En la exocitosis de algunas vesículas, inicialmente se puede producir una pequeña apertura del poro de fusión que lleva consigo una reducida liberación de catecolaminas. Estas pocas catecolaminas también se oxidan y forman lo que denominamos el “**pie de espiga**” (**2**). Aquí podemos analizar parámetros como la amplitud del pie, la duración del pie y la liberación cuantal de catecolaminas durante el pie, representados por I_{pie} , T_{pie} y Q_{pie} respectivamente.
- Apertura completa del poro de fusión liberando toda la carga de catecolaminas. Éstas son oxidadas produciéndose un aumento rápido de la corriente (**3**). Aquí podemos analizar la *velocidad de crecimiento* de la espiga, que es calculada mediante la pendiente de la fase de crecimiento de la espiga (en pA/ms) y la I_{max} , que representa la altura de la espiga (en pA).
- Una vez se han liberado casi todas las catecolaminas y éstas han sido oxidadas, la corriente decae (**4**). En esta fase se pueden analizar parámetros como: $t_{1/2}$, que es la anchura de la espiga al 50% de su altura (en ms); el *tiempo de caída*, que es obtenido con el tiempo entre el 75 y el 25% de la altura de la espiga en la fase de descenso (en ms); Q , que es el área de la espiga, una indicación del contenido y/o liberación de catecolaminas de la vesícula (tamaño cuantal) (en pC); y la *base de la espiga*, que indica la duración de la exocitosis de esa vesícula (en ms).
- Cuando ya se han oxidado todas las catecolaminas liberadas durante el proceso de exocitosis del contenido vesicular ya no se producen nuevas variaciones de la corriente amperométrica, volviendo así al estado basal (**5**)

Como hemos visto, la técnica de detección amperométrica de la liberación de catecolaminas nos va a permitir medir de forma directa dos importantes aspectos del proceso de exocitosis, a saber: el contenido total de catecolaminas que se libera de cada vesícula y la cinética de las espigas amperométricas, es decir, la forma en que se liberan estas catecolaminas.

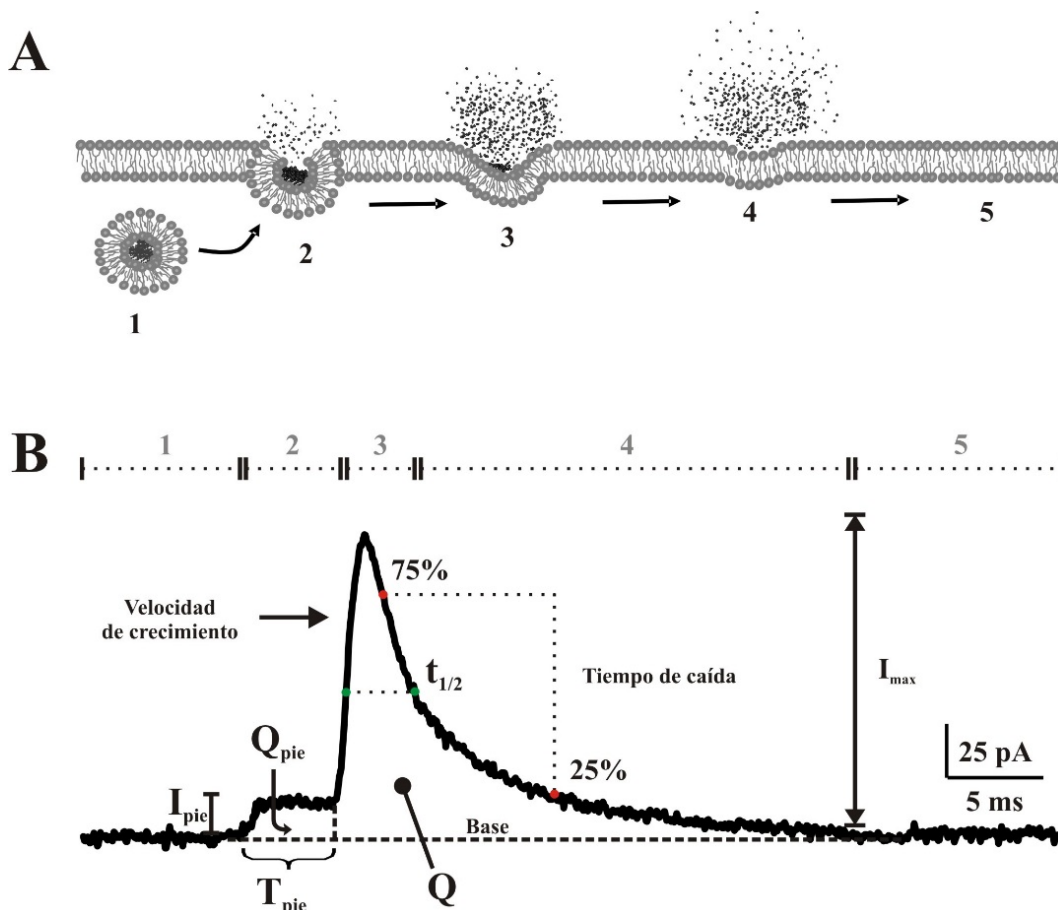


Figura 18. Representación esquemática de las distintas fases del proceso de exocitosis y los parámetros de las espigas amperométricas. **A** Esquema del proceso de exocitosis del contenido de una vesícula; (1) acercamiento de la vesícula, anclaje y fusión a la membrana plasmática; (2) apertura del poro de fusión; (3) liberación rápida del contenido vesicular; (4) liberación completa del contenido vesicular; (5) fusión completa de la vesícula con la membrana plasmática. **B** Fases de la espiga amperométrica relacionadas con las fases del proceso de exocitosis y los parámetros analizables de la misma: *Velocidad de crecimiento*: calculada con la pendiente de la fase de crecimiento de la espiga; I_{max} : altura de la espiga; $t_{1/2}$: anchura de la espiga al 50% de su altura; Q : área de la espiga; *tiempo de caída*: obtenido con el tiempo entre el 75 y el 25% de la altura de la espiga en la fase de descenso; *Base de la espiga*: duración de la espiga; I_{pie} : altura del pie de espiga; T_{pie} : duración del pie de espiga y Q_{pie} : área del pie de espiga.

4.3.-Aplicación de la técnica

Describiremos en este apartado los preparativos y pasos necesarios para realizar los registros amperométricos en células cromafines.

4.3.1.-Preparación de los microelectrodos de amperometría

En la investigación que nos atañe en esta Tesis Doctoral hemos utilizado nuestros propios microelectrodos de amperometría, los cuales, se han fabricado basándose en el método previamente descrito por Kirk T. Kawagoe y colaboradores (Kawagoe *et al.*, 1993).

Este método consiste en introducir una fibra de carbono de 10 μm de diámetro (Amoco, Whiting, IN) en un capilar de borosilicato de 1,8 mm de diámetro exterior y 1,5 mm de diámetro interior (Kimble-Kontes, Querétaro, México) y para ello, dado que estas fibras de carbono son muy pequeñas, utilizamos una ligera succión (gracias a una bomba de vacío) a través del capilar de borosilicato, lo que permite la entrada de la fibra fácilmente. A continuación, los capilares con las fibras en su interior son estirados mediante el estirador de pipetas (modelo PC-10, Narishige, Tokio, Japón), mediante la aplicación de 2 calores sucesivos, obteniéndose 2 pipetas por cada capilar de borosilicato.

De las puntas de ambas pipetas separadas sobresale la fibra de carbono, que se corta con ayuda de unas pequeñas tijeras, obteniéndose así dos pipetas con sendas fibras sobresaliendo por la punta. Es importante que el calor aplicado en los dos pulsos permita que la anchura de la punta del capilar se ajuste casi perfectamente a la anchura de la fibra de carbono: si es muy estrecha se rompe la punta de la pipeta y si es muy ancha puede dar lugar luego a un mal aislamiento con la resina.

A continuación, se prepara una mezcla de resina epoxi (86 % p/p de resina EPON[®] Resin-828 (Miller-Stephenson, Danbury, CT) y 14 % p/p de m-fenildiamina (Sigma-Aldrich)). La mezcla se calienta en un tubo de ensayo al baño maría a unos 90°C, y se agita suavemente con una pipeta Pasteur hasta que se obtiene una mezcla homogénea, todo ello bajo la protección de una campana extractora ya que los vapores de la resina pueden ser irritantes. Es en ese momento cuando se debe introducir la punta de cada pipeta (cada una con su fibra sobresaliendo) en la mezcla de resina mientras ésta aún se encuentra en estado líquido (debe mantenerse la temperatura elevada durante el máximo tiempo posible para evitar que la mezcla de resina epoxi se endurezca prematuramente). Posteriormente se deja secar la resina durante 24 h. Al día siguiente las puntas se introducen en un horno durante 2 h a 100°C y otras 2 h a 150°C para que la mezcla de resina se endurezca. Gracias a este proceso se consigue aislar eléctricamente la fibra de carbono y la punta de la pipeta impidiendo el paso de líquidos entre el interior y el exterior de la misma.

A la hora de realizar los registros amperométricos deberemos tener en cuenta que toda la fibra de carbono que sobresale de la punta de la pipeta está recubierta de resina, por lo que deberemos cortar ésta con la ayuda de un bisturí dejándola con una longitud de no más de 1 mm. Con esto conseguimos que quede expuesta una zona libre de resina al final de la fibra que será conductora de la electricidad y que será la que esté en contacto con la célula para detectar las catecolaminas liberadas.

4.3.2.-Calibración de los electrodos

Teniendo en cuenta que las sensibilidades entre los diferentes electrodos pueden variar y que es importante conseguir amplitudes similares entre los registros de unas células y otras, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral siempre hemos calibrado los microelectrodos con una solución que contenía 50 μM de adrenalina en KH (Machado *et al.*, 2008).

Para el calibrado de estos electrodos se conectaron las pipetas al amplificador de patch-clamp EPC-9 (Heka Elektronik), que proporciona el voltaje de oxidación de +700 mV, y se posicionaron por medio de un micromanipulador (modelo MHW-3, Narishige) a una distancia de unos 50-100 μm de la salida del sistema de perfusión (distancia a la que se encontrará la célula a la hora de medir la secreción de catecolaminas). Solo se utilizaron aquellos electrodos que registraron una corriente entre 100 y 400 pA tras ser perfundidas con la solución de adrenalina. El calibrado de los electrodos se realiza en condiciones de parada de flujo porque la magnitud de la señal electroquímica es altamente dependiente del flujo (Machado *et al.*, 2008), por lo que se descartaron todos aquellos microelectrodos que no alcanzaron ese rango de corriente al final del periodo de parada de flujo (**Figura 19**).

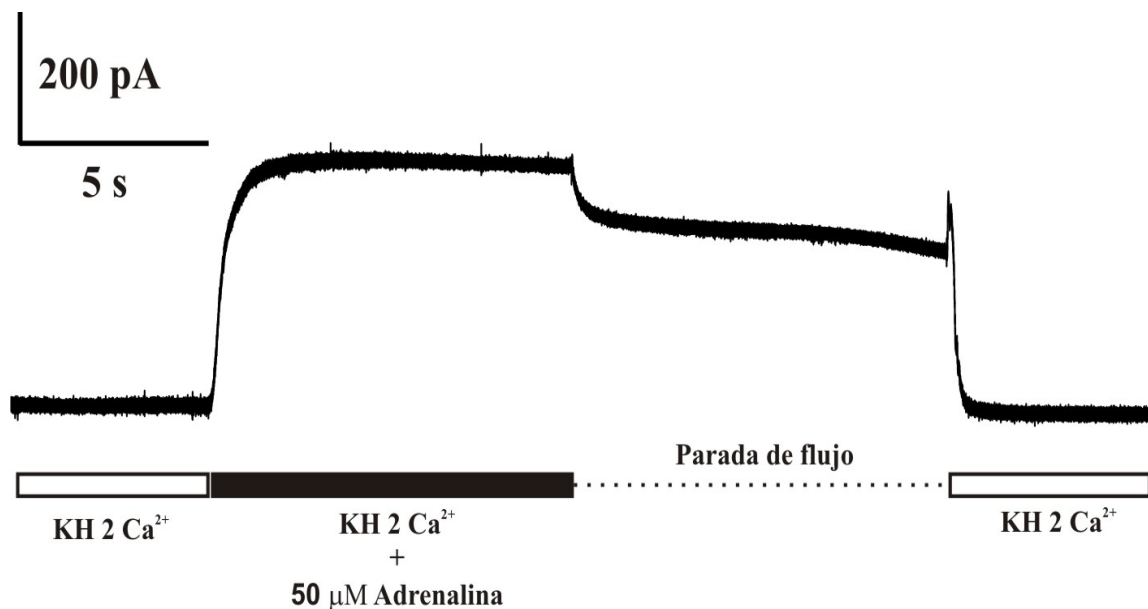


Figura 19. Calibración de los microelectrodos de carbono usando adrenalina. El paso del KH a una velocidad aproximada de 2 ml/min mantiene el registro estable (barras blancas). Cuando se cambia la solución a la que contiene 50 μM de adrenalina, ésta produce un aumento de la corriente hasta unos 400 pA (barra negra). Cuando se para el flujo (línea discontinua), la corriente de oxidación cae a unos 300 pA. Las medidas de calibrado se realizan bajo condiciones de parada de flujo. Al perfundir de nuevo la solución KH se vuelve al estado basal tras una pequeña elevación de la corriente.

4.3.3.-Obtención de los registros de amperometría

Para el registro de las señales amperométricas en CCR se conectan los microelectrodos al amplificador de patch-clamp EPC-9 (Heka Elektronik), que proporcionará el voltaje de oxidación de +700 mV, y se posicionan por medio de un micromanipulador sobre la célula objeto de experimentación, llegando a tocar ligeramente su membrana celular. La estimulación de la célula con ACh o K⁺ se realizará mediante la pipeta de perfusión descrita anteriormente

Los registros amperométricos se obtuvieron usando el software Pulse v8.74 (HEKA Elektronik) y se analizaron utilizando el software Excel (Microsoft, Redmond, WA), y el software IgorPro v4.0.8 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR). Sólo se consideraron para el análisis cuantitativo y cinético aquellas espigas con una amplitud mayor de 5 pA.

La cuantificación del número de espigas y el análisis cinético de los eventos amperométricos individuales se realizó usando una macro escrita en IgorPro que el grupo de Eugene Mosharov (Mosharov y Sulzer, 2005) cedió gentilmente a la comunidad científica. Gracias a este gesto ha sido posible el análisis de los parámetros cinéticos indicadores del modo de liberación de los neurotransmisores, así como de la cantidad de catecolaminas liberadas (**Figura 18**). La carga amperométrica total (total de catecolaminas liberadas a lo largo del período de estimulación de 1 min) se ha calculado como la suma de las cargas de las espigas amperométricas individuales registradas durante ese período de estimulación (de manera idéntica para los estímulos de K⁺ y ACh). Para estudiar el patrón de liberación de catecolaminas durante el minuto de estimulación se ha contabilizado el número de espigas y la carga acumuladas cada 5 segundos.

Para el análisis estadístico de los parámetros amperométricos obtenidos, se hizo la media de cada parámetro de todas las espigas amperométricas de cada célula (registro), se hizo la media para cada parámetro de todas las células pertenecientes a cada ratón y, por último, se agruparon todos los datos de todos los ratones pertenecientes a un mismo grupo de ratón (edad y cepa) para hacer la comparación estadística como se ha descrito previamente para este tipo de estudios (Colliver *et al.*, 2000; Colliver *et al.*, 2001).

Los datos obtenidos fueron tratados usando el software Excel (Microsoft, Redmond, WA). Las representaciones gráficas de las medias de los valores y el análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad Prism v6.01 (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA). Los ejemplos representativos de los registros amperométricos de 1 minuto y de las espigas amperométricas

se obtuvieron mediante el software IgorPro v4.0.8 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) y fueron maquetadas mediante el software Corel Draw X3 Graphics Suite (Corel, Ottawa, Canadá).

5.-IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOTRANSFERENCIA

Los experimentos de identificación y cuantificación de proteínas de la exocitosis mediante la técnica de inmunotransferencia (“western-blot”) se llevaron a cabo a partir de muestras de tejido congeladas a -80 °C. Los tejidos utilizados fueron la corteza prefrontal y el hipocampo dada la implicación de estas áreas cerebrales en las enfermedades neurodegenerativas. Teniendo en cuenta que la médula adrenal se ha utilizado para la realización de los experimentos electrofisiológicos y amperométricos de esta Tesis Doctoral, la reducida muestra que se puede obtener de cada médula adrenal y, el elevado tiempo de espera que sería necesario para obtener un mayor número de ratones SAMP8 y SAMR1 de 6 y 12 meses, no ha sido posible realizar los experimentos de inmunotransferencia con tejido adrenomedular.

5.1.-Extracción de proteínas totales

Para el estudio tanto de las proteínas que forman parte del complejo SNARE como para otras que participan también en el proceso de exocitosis, realizamos la extracción de la proteína total de las muestras tal y como se describe en el trabajo realizado por Yoosoo Yang y colaboradores (Yang *et al.*, 2015). Este protocolo consiste en homogeneizar los tejidos con ayuda de un homogenizador manual de plástico, en hielo, en una solución de lisis RIPA (ver composición en el apartado de soluciones) a la que se añaden inhibidores de proteasas (SIG-MAFAST[®] Protease Inhibitor Tablets, S8820-2TAB, Sigma Aldrich) para evitar la degradación proteica. Se añade un volumen de 150 µl de la solución RIPA en las muestras de corteza prefrontal y 500 µl en las de hipocampo. Las muestras se mantienen en constante agitación durante 2 h a 4°C. A continuación, se centrifugan a 4°C durante 20 min a 12000 xg. Se retira el sobrenadante, el cual contiene las proteínas totales a medir y se traspara a eppendorfs nuevos, el pellet se descarta. Las muestras se vuelen a congelar a -80°C.

5.2.-Cuantificación de proteínas totales por el método BCA

La cuantificación de la cantidad de proteínas que contenía cada una de nuestras muestras se realizó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) utilizando un kit comercial (Pierce[®] BCA Protein Assay Kit - ThermoFisher Scientific-23225).

Este método se basa en la propiedad de las proteínas de reducir, de manera proporcional a su concentración, el Cu^{+2} a Cu^{+1} en medio alcalino (reacción de Biuret). De esta manera, el ácido bicinónico es un cromógeno específico de Cu^{+1} que forma un complejo dando un color púrpura. El complejo hidrosoluble muestra una fuerte absorbancia a 562 nm, de manera lineal con el incremento de la cantidad de proteína en un rango de 20-2000 $\mu\text{g/ml}$, lo que permite la cuantificación espectrofotométrica de las proteínas. Una ventaja adicional del método de BCA es que generalmente es más tolerante a la presencia de compuestos que interfieren con otros métodos de cuantificación de proteínas. En particular, no se ve afectado por una gama de detergentes y agentes desnaturizantes como la urea y el cloruro de guanidinio, aunque es más sensible a la presencia de azúcares reductores (Smith *et al.*, 1985).

Para poder realizar este método, es necesario una placa de 96 pocillos donde irán las muestras a medir. Además, se ha de preparar una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA) que incluye el kit a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Así, en 6 pocillos preparamos concentraciones crecientes de BSA (0, 2, 4, 8, 16 y 20 μl) y añadimos agua milli-Q (agua destilada y desmineralizada) hasta llegar a 40 μl . Las muestras se preparan añadiendo en cada pocillo 39 μl de agua milli-Q y 1 μl de muestra.

Una vez tenemos la recta patrón y todas las muestras preparadas, calculamos la mezcla de los reactivos A y B del kit que tenemos que hacer para cargar 200 μl de la mezcla en cada pocillo de la recta patrón y de las muestras. La proporción de los reactivos en la mezcla es de 49 partes del reactivo A (carbonato sódico, bicarbonato de sodio, ácido bicinónico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0,1 M) con 1 parte del reactivo B (solución al 4% de sulfato cúprico). Esta mezcla presenta una tonalidad verde que irá cambiando a púrpura según reaccione con las proteínas y el complejo se forme. Se incuba 30 min a 37°C en condiciones de oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo se mide la absorbancia a 562 nm.

5.3.-Separación de proteínas

Para realizar la separación de las diferentes proteínas de cada muestra por su tamaño se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE).

Para ello, primero se mezclan las muestras con el tampón de carga 4X (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad) + β -Mercaptoethanol (Santa Cruz Biotechnology) 9:1 y calculando la cantidad necesaria para que las muestras contengan 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas. Dichas muestras se calientan a

99°C durante 4 min en constante agitación. Así, cargamos una misma cantidad de proteína (20-30 µg) en los pocillos de los geles de poliacrilamida (4% “stacking gel” y 12% “running gel”). Junto a las proteínas se carga siempre en cada gel un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein® Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards #1610375, Bio-Rad) que permitirá conocer el peso de las proteínas de interés.

Gracias a un alimentador (PowerPac® Basic Power Supply, Bio-Rad), se somete al gel a un campo eléctrico (90 mV hasta que el marcador pase el “stacking gel” y se sube a 120 mV durante 1 h y 30 min), en una cubeta de electroforesis “Mini-PROTEAN® 3 cell” (Bio-Rad) conteniendo un tampón de electroforesis (ver composición en apartado de soluciones).

Una vez las proteínas han corrido el gel, hacemos una transferencia “en húmedo”. Para ello, se preparan las membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Immobilon® -P Transfer Membranes, Millipore) de 7x9 cm y con un tamaño de poro de 0,45 µm a donde se transferirán las proteínas de los geles. Debido a su naturaleza hidrofóbica, el PVDF ha de ser previamente activado sumergiendo la membrana en metanol puro durante 10 s, lavándose a continuación con agua destilada. De esta manera, se coloca la membrana con el gel en la unidad de transferencia y ésta se sumerge en un tampón de transferencia (ver composición en apartado de soluciones) y así, mediante la aplicación de un campo eléctrico con una intensidad de corriente de 360 mA durante 2 h y 30 min, se realiza la electrotransferencia.

Una vez las proteínas se han transferido a la membrana, es necesario bloquear la membrana con una solución de BSA al 4% en TBS Tween 20 (TBST) (ver composición en apartado de soluciones) durante toda la noche a 4°C y en agitación constante. Esto es debido a que la membrana escogida para transferir las proteínas une las mismas de manera inespecífica y como el anticuerpo que se emplea posteriormente en la detección es de naturaleza proteica, podría unirse a los lugares libres en la membrana, dificultando la distinción del complejo antígeno-anticuerpo que se formará con la proteína a estudiar (**Figura 20**).

5.4.-Identificación de proteínas

Una vez se tiene la membrana bloqueada con BSA al 4%, se procede a la identificación de las proteínas de interés. Para poder identificar varias proteínas de cada membrana hay que saber el peso molecular de cada proteína a medir, fijarse en el marcador de peso molecular y cortar la membrana horizontalmente separándola en diferentes fragmentos. Esto nos permite incubar

cada fragmento de membrana que contiene nuestra proteína o proteínas de interés con anticuerpos específicos para ellas (son los llamados anticuerpos primarios) durante 2 h a temperatura ambiente y en constante agitación (**Figura 20**).

En esta Tesis Doctoral se han identificado diferentes proteínas relacionadas con la exocitosis (dos de la membrana plasmática: SNAP25 y sintaxina 1; y otra en la membrana vesicular: sinaptotagmina-1) y la endocitosis (dinamina 1-2). Para la identificación y cuantificación del nivel de expresión de estas proteínas se han utilizado los siguientes anticuerpos primarios:

- *Anti-sinaptotagmina-1 (N-19)* (sc-7753; Santa Cruz Biotechnology): Se trata de un anticuerpo obtenido en cabra, que reconocerá a la proteína sinaptotagmina-1 que se encuentra en la membrana de las vesículas sinápticas y es considerada el sensor de Ca^{2+} implicado en la regulación de la liberación de neurotransmisores, principalmente en el sistema nervioso central (SNC) (Geppert *et al.*, 1994), con un peso molecular aproximado de 40-65 kDa. Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:200 en TBST con BSA al 0,4%.
- *Anti-sintaxina 1 (HPC-1)* (sc-12736; Santa Cruz Biotechnology): Se trata de un anticuerpo obtenido en ratón, que reconocerá a la proteína del complejo t-SNARE (target-SNARE; presente en la membrana de las terminaciones nerviosas o células secretoras) sintaxina 1, con un peso molecular aproximado de 31 kDa. Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:200 en TBST con BSA al 0,4%.
- *Anti-SNAP-25 (C-18)* (sc-12736; Santa Cruz Biotechnology): Se trata de un anti-cuerpo obtenido en cabra, que reconocerá a la proteína del complejo t-SNARE (presente en la membrana de las terminaciones nerviosas o células secretoras) SNAP-25, con un peso molecular de 25 kDa. Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:200 en TBST con BSA al 0,4%.
- *Anti-dinamina 1-2* (Dynamamin #610245; BD Biosciences): Se trata de un anticuerpo obtenido en ratón que reconocerá las proteínas dinamina 1 y 2. A esta proteína se le está atribuyendo últimamente una participación en la expansión del poro de fusión durante la exocitosis (Samasilp *et al.*, 2012), ya que clásicamente siempre ha estado involucrada en los procesos de endocitosis. Tienen un peso molecular de aproximadamente 100 kDa. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:4000 en TBST con BSA al 0,4 %.

Además, hemos medido también los niveles de expresión del transportador vesicular de ACh (VACHT) y los niveles de proteína tau fosforilada (*p*-tau) en la corteza y el hipocampo. Estas determinaciones se realizaron con la idea de valorar posibles alteraciones en el estado colinérgico del cerebro de los ratones (VACHT) y para comprobar si en nuestros ratones SAMP8 se produce una hiperfosforilación de tau. Para ello, se han utilizado los siguientes anticuerpos primarios:

- *Anti-VACHT (N-19)* (sc-7717; Santa Cruz Biotechnology): Se trata de un anticuerpo obtenido en cabra, que reconocerá al transportador de ACh vesicular (VACHT). Tiene un peso molecular de entre 55 y 70 kDa. Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:400 en TBST con BSA al 0,4%.
- *Anti-fosfo-tau (Ser202, Thr205)* (MN 1020; Thermo Fisher Scientific): Se trata de un anticuerpo obtenido en ratón, que reconoce la proteína tau fosforilada en los residuos Ser202 y Thr205. Tiene un peso molecular de aproximadamente 79 kDa. Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:1000 en TBST con BSA al 0,4%.

Como control de carga en esta serie de experimentos orientada a la identificación y cuantificación de la expresión proteica hemos utilizado la proteína del citoesqueleto β -actina:

- *Anti- β -actina (AC-15)* (A-3854; Sigma Aldrich). Se trata de un anticuerpo obtenido en ratón que reconocerá la proteína del citoesqueleto β -actina. Este anticuerpo lleva conjugada la peroxidasa de rábano (HRP), por lo que no necesitará incubación con un anticuerpo secundario (ver más abajo). Tiene un peso molecular de 42 kDa. Este anticuerpo se utilizó a una dilución 1:5000 en TBST con BSA al 0,4%.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizan 3 lavados con TBST de 5 min a temperatura ambiente y con agitación constante. Después, se incuban las membranas con el anticuerpo secundario (anticuerpo que reconoce la inmunoglobulina G (IgG) del animal en el que se haya obtenido el anticuerpo primario, y que se encuentra conjugado a HRP, durante 45 min a temperatura ambiente y en constante agitación (**Figura 20**). Los anticuerpos secundarios que se han utilizado son los siguientes:

- *Anti-IgG de ratón-HRP* (sc-2005; Santa Cruz Biotechnology). Empleado a una dilución 1:10000 en TBST con BSA 0,4%.

- *Anti-IgG de cabra-HRP* (sc 2354; Santa Cruz Biotechnology). Empleado a una dilución 1:10000 en TBST con BSA 0,4%.
- *Anti-IgG de conejo-HRP* (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology). Empleado a una dilución 1:10000 en TBST con BSA 0,4%.

Posteriormente, se realizan 2 lavados con TBST y 1 de TBS de 5 min a temperatura ambiente y en constante agitación.

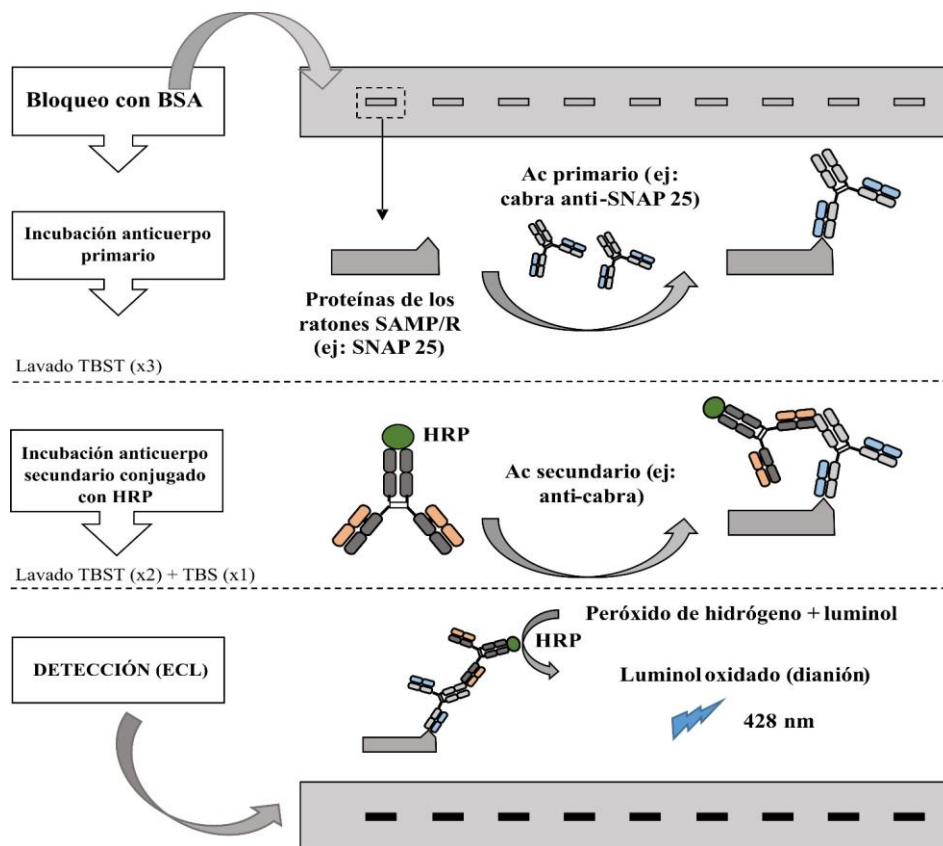


Figura 20. Incubación de las membranas con los anticuerpos y revelado con ECL. De arriba abajo: bloqueo de la membrana con BSA al 4% (para evitar interacciones del anticuerpo con el resto de la membrana); incubación del anticuerpo primario (ej: SNAP-25 obtenido en cabra); 3 lavados de 5 min con TBST; incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (ej: reconoce inmunoglobulina G de cabra); 2 lavados con TBST y 1 con TBS; Detección: reacción catalizada por HRP que forma luminol oxidado que al volver a su estado basal emite luz a 428 nm.

Finalmente, las membranas se incuban con la solución de revelado “ECL[®] Select Western Blotting Detection Reagent” (RPN2235, GE Healthcare). El ECL está compuesto por una solución de luminol y una solución de peróxido que son mezcladas en proporción 1:1 en oscuridad. Después de añadir esta mezcla, la enzima HRP cataliza la oxidación del luminol, que pasa a estar en un estado excitado (dianión decarboxilato en estado excitado), el cual al

volver a su estado basal (dianión decarboxilato en estado basal) emite luz a 428 nm (azul). Esta luz fue detectada mediante un detector de quimioluminiscencia (Molecular Image[®] Chemi-DocTM XRS System, BioRad).

5.5.-Cuantificación de la expresión de proteínas individuales

Para la cuantificación relativa de proteínas obtenida en los ensayos de “western blot” se empleó el software Scion Image v4.0.3.2 (Scion Corporation, MA, USA). Se calculó la densitometría de cada banda (obtenida para cada proteína de interés) y se relativizó a la densitometría obtenida para la banda de β -actina de cada una de las muestras (utilizada como control de carga en nuestras muestras).

Los datos obtenidos fueron tratados usando el software Excel (Microsoft, Redmond, WA). Las representaciones gráficas y análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad Prism v6.01 (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA).

6.-EVALUACIÓN DE LA MEMORIA ESPACIAL: LABERINTO EN Y

El laberinto en Y permite evaluar la memoria espacial a corto plazo y se basa en el instinto natural de los roedores para explorar entornos desconocidos. Esta tarea de exploración involucra muchas partes del cerebro de los roedores, incluyendo el hipocampo, el septo, el cerebro anterior basal y la corteza prefrontal. Es por eso que este tipo de laberinto se utiliza en numerosas investigaciones que involucran enfermedades neurodegenerativas, ya que lesiones o daños que se puedan producir en las áreas anteriormente nombradas pueden afectar a la cognición y al aprendizaje espacial.

En esta Tesis Doctoral se ha utilizado un laberinto en Y fabricado con metacrilato de color negro (para reducir la ansiedad de los ratones) y que consta de tres brazos de igual longitud (40 cm), anchura (10 cm) y altura (15 cm) interconectados entre sí en un ángulo de 120°.

Los experimentos se realizaron según el método descrito por Delli y colaboradores (Delli *et al.*, 1992), que consiste en la realización de dos pruebas independientes separadas entre sí por un intervalo de 30 min. En la primera prueba se bloquea uno de los brazos mediante una puerta “guillotina” (el cual será nombrado “brazo nuevo”) y se coloca al ratón en el brazo de inicio. De esta manera, se deja que el ratón explore libremente durante 5 min el brazo de inicio y el brazo no bloqueado (el cual será nombrado “brazo antiguo”) (**Figura 21, A**). Una vez

terminados los 5 min se saca el ratón del laberinto, se deja que descansa 30 min y se limpia el laberinto.

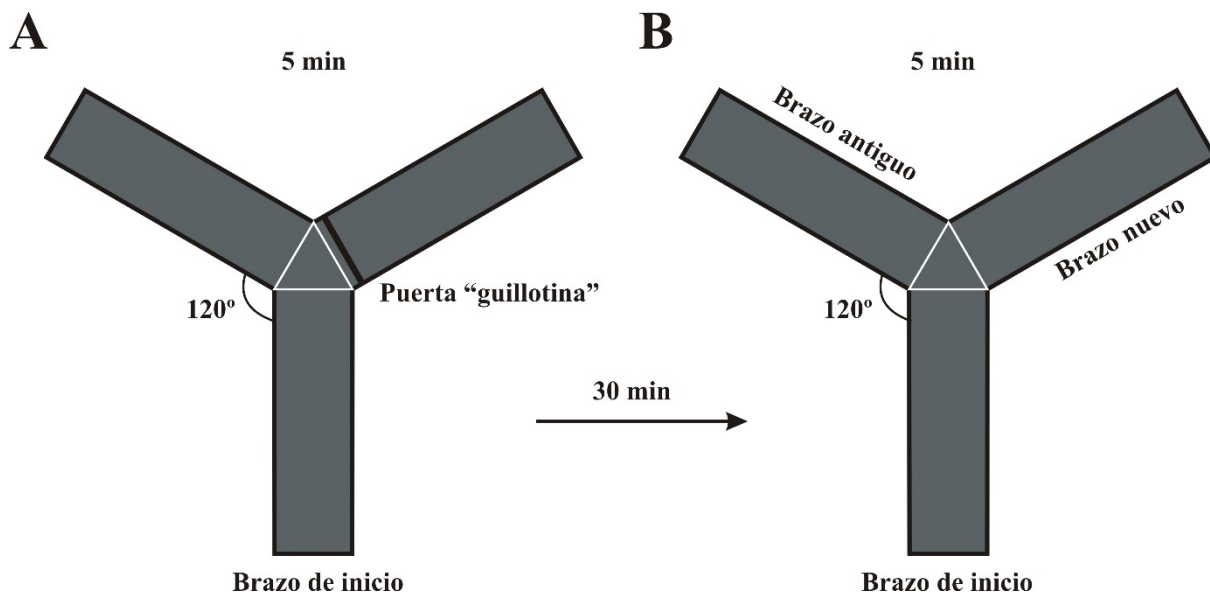


Figura 21.-Protocolo utilizado en el laberinto en Y. A) Representación del laberinto en la primera fase del protocolo: 5 min en el que el ratón explora el brazo de inicio y el brazo antiguo (el tercer brazo permanece cerrado). B) Representación del laberinto en la segunda fase del protocolo: tras 30 min de descanso, se desbloquea el tercer brazo y el ratón explora durante 5 minutos los tres brazos.

Para realizar la segunda prueba se desbloquea el brazo que tenía la puerta "guillotina" (brazo nuevo), se coloca de nuevo al ratón en el brazo de inicio y se le deja de nuevo que explore libremente, durante 5 min, los tres brazos: el de inicio, el antiguo y el nuevo (Figura 21, B). Los 5 min de cada protocolo fueron grabados a través de una cámara situada encima del laberinto conectada a un ordenador. En condiciones normales, los roedores preferirán explorar el brazo nuevo (antes bloqueado) en lugar del que ya habían explorado. Para cada experimento diferente se fueron alternando el brazo antiguo y el nuevo.

Una vez finalizado el experimento se analizan los videos resultantes de la segunda fase del protocolo, es decir, los 5 min en los que el ratón explora libremente entre los 3 brazos abiertos del laberinto. Se midieron tres parámetros diferentes. En primer lugar, el número de entradas totales en todos los brazos, para descartar posibles déficits motores del animal que pudieran llevarle a una menor movilidad exploratoria dentro del laberinto. En segundo lugar, se midió el número de entradas en cada brazo y, en tercer lugar, el tiempo que el ratón permanecía en cada brazo. En todos los casos se tuvo en cuenta como entrada en el brazo y tiempo que ha estado

en ese brazo cuando el 85% del cuerpo del ratón se encontraba en dicho brazo. Todos aquellos ratones que realizaron menos de 5 entradas totales fueron descartados.

El porcentaje de entradas en cada brazo se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de entradas en el brazo} \times 100}{\text{Número de entradas en todos los brazos}}$$

El porcentaje del tiempo gastado en cada brazo se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Tiempo gastado en el brazo (s)} \times 100}{\text{Tiempo total en los tres brazos}}$$

Los datos obtenidos fueron tratados usando el software Excel (Microsoft, Redmond, WA). Las representaciones gráficas y análisis estadístico se realizaron con el software GraphPad Prism v6.01 (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA).

7.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral se expresan como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Antes de realizar el análisis estadístico entre las medias de los diferentes grupos de datos, se estudió la distribución de los mismos y su ajuste a una distribución normal mediante la realización del test de la normalidad de D'Agostino & Pearson.

Las diferencias entre las medias de los parámetros a evaluar de la misma cepa (SAMR1 o SAMP8) a lo largo de la edad (2, 6 y 12 meses) que se ajustaron a una distribución normal, fueron evaluadas por un test de “ANOVA de una vía” (análisis de la varianza) con test *post-hoc* de Tukey's (comparación múltiple entre varios grupos). En el caso de que las medias no se ajustaran a una distribución normal, se evaluaron por el test de Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns (comparación múltiple entre varios grupos).

Las diferencias entre las medias de los parámetros a evaluar entre las dos cepas de ratón (SAMR1 y SAMP8) a la misma edad (2, 6 ó 12 meses) que se ajustaron a una distribución normal, fueron evaluadas por una *t* de Student. En el caso de que las medias no se ajustaran a una distribución normal, se evaluaron por una U de Mann-Whitney.

En todos los casos se exigió un nivel de confianza del 95%, es decir, $*p < 0,05$; se establecieron dos límites estadísticos adicionales, situados en $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$.

8.-SOLUCIONES Y PRODUCTOS QUÍMICOS EMPLEADOS

8.1.-Soluciones utilizadas en el cultivo celular

8.1.1.-Solución de Locke

La preparación se realizó en agua bi-destilada (mili-Q) a partir de:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 154 mM
- KCl (131494, Panreac)..... 5,58 mM
- NaHCO₃ (141638.1211, Panreac) 3,6 mM
- HEPES (H4034, Sigma-Aldrich) 10 mM
- Glucosa (G8270, Sigma-Aldrich) 5,5 mM

El pH fue ajustado a 7,35 con NaOH.

8.1.2.-Solución de cultivo DMEM

Esta solución está compuesta por DMEM convencional con alta glucosa (4,5 g/l) (D5648, Sigma-Aldrich) al que se le añade NaHCO₃ 26 mM y HEPES 10 mM.

Posteriormente esta solución se suplementa con suero bovino fetal (F7524, Sigma-Aldrich) en una concentración del 4% v/v, 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml estreptomicina (P0781, Sigma-Aldrich).

Su pH se ajusta a 7,35 usando NaOH y se esteriliza filtrándolo a través de un poro de 0,22 µm de diámetro.

8.2.-Soluciones utilizadas en los registros electrofisiológicos

8.2.1.-Soluciones extracelulares

8.2.1.1.-Solución Krebs-HEPES

La preparación se realizó en agua bi-destilada (mili-Q) a partir de:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 145 mM
- KCl (131494, Panreac) 5,6 mM
- MgCl₂ (131396.1210, Panreac) 1,2 mM
- CaCl₂ (C5080, Sigma-Aldrich) 2,0 mM
- HEPES (H4034, Sigma-Aldrich) 10 mM
- Glucosa (G8270, Sigma-Aldrich) 11 mM

El pH fue ajustado a 7,35 con NaOH.

8.2.1.2.-Solución Krebs-HEPES con ACh (100 µM)

La preparación se realizó en agua bi-destilada (mili-Q) a partir de una solución Krebs-HEPES estándar a la que se le añadió ACh 100 µM (A6625, Sigma-Aldrich).

8.2.1.3.-Solución Krebs-HEPES con alto potasio (70 mM)

La preparación se realizó en agua bi-destilada (mili-Q) a partir de:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 79,9 mM
- KCl (131494, Panreac) 70 mM
- MgCl₂ (131396.1210, Panreac) 1,2 mM
- CaCl₂ (C5080, Sigma-Aldrich) 2,0 mM
- HEPES (H4034, Sigma-Aldrich) 10 mM
- Glucosa (G8270, Sigma-Aldrich) 11 mM

El pH fue ajustado a 7,35 con KOH.

8.2.2.-Soluciones intracelulares

8.2.2.1.-Solución INC

Esta solución intracelular para medir la I_{ACh}, la I_{Ca} y la I_{Na}, ya que impide la salida de K⁺ que no permitiría ver el resto de corrientes en los registros.

La preparación se realizó en agua bi-destilada (mili-Q) a partir de:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 10 mM
- Ácido glutámico (G1251, Sigma-Aldrich) 100 mM
- EGTA (Ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter) –N, N, N', N'-tetraacético) (E0396, Sigma-Aldrich) 14 mM
- TEA-Cl (Cloruro de tetraetilamonio) (T2265, Sigma-Aldrich) 20 mM
- HEPES (H4034, Sigma-Aldrich) 20 mM
- Mg-ATP (A9187, Sigma-Aldrich) 5 mM
- Na-GTP (G8877, Sigma-Aldrich) 0,3 mM

El pH fue ajustado a 7,2 con CsOH.

8.2.2.2.-Solución KCC

Esta solución intracelular se empleó para medir las corrientes de potasio (I_K) tanto dependientes de Ca²⁺ (I_{K(Ca)}) como de voltaje (I_{K(V)}) y para la medida del potencial de membrana (V_m). La preparación se realizó en agua bi-destilada (milli-Q) a partir de:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 10 mM
- Ácido glutámico monopotásico (G1501, Sigma-Aldrich) 120 mM
- EGTA (Ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil éter) –N, N, N', N'-tetraacético) (E0396, Sigma-Aldrich) 14 mM
- HEPES (H4034, Sigma-Aldrich) 20 mM
- Mg-ATP (A9187, Sigma-Aldrich) 5 mM
- Na-GTP (G8877, Sigma-Aldrich) 0,3 mM

El pH fue ajustado a 7,2 con KOH.

8.3.-Soluciones para la inmunodetección de proteínas (“western blot”)

8.3.1.-Soluciones para extracción de proteínas totales

Se empleó la solución de lisis RIPA:

- NaCl (121659.1211, Panreac) 150 mM
- Tritón® X-100 (X100, Sigma-Aldrich) 1%
- Desoxicolato sódico (D6750, Sigma-Aldrich) 0,5%
- SDS (Dodecil sulfato sódico) (L4390, Sigma-Aldrich) 0,1%
- Tris-HCl pH 8 50 mM

8.3.2.-Soluciones para cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas mediante el método BCA, se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific-23225) que contiene las siguientes soluciones:

8.3.2.1.-Solución de BSA

Contiene albúmina de suero bovino a una concentración de 2 µg/µl en una solución salina al 0,9% y azida sódica al 0,05%.

8.3.2.2.-Reactivo A

Carbonato sódico, bicarbonato de sodio, ácido bicinconónico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0,1 M (el kit no proporciona las cantidades de cada compuesto).

8.3.2.3.-Reactivo B

Solución al 4% de sulfato cúprico.

8.3.3.-Soluciones para separación e identificación de proteínas

8.3.3.1.-Gel de carga (“Stacking gel”)

Se empleó un gel de acrilamida/poliacrilamida en agua bi-destilada (milli-Q) al 4% a partir de:

- Acrilamida/bis-acrilamida 40% (A7802, Sigma-Aldrich) 10%
- Tris-HCl pH 6,8 10%
(a partir de la solución más abajo detallada)
- SDS (Dodecil sulfato sódico) (L4390, Sigma-Aldrich) 10%
- Persulfato amónico (A3678, Sigma-Aldrich) 10%
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina) (T9281, Sigma-Aldrich) 0,1%

8.3.3.2.-Gel de separación (“Running gel”)

Se empleó un gel de acrilamida/poliacrilamida en agua bi-destilada al **12%** a partir de:

- Acrilamida/bis-acrilamida 40% (A7802, Sigma-Aldrich) 30%
- Tris-HCl pH 8,8 20%
(a partir de la solución abajo detallada)
- SDS (Dodecil sulfato sódico) (L4390, Sigma-Aldrich) 10%
- Persulfato amónico (A3678, Sigma-Aldrich) 10%
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina)
(T9281, Sigma-Aldrich) 0,05%

8.3.3.3.-Tris-HCl pH 6,8

La preparación se realizó en agua bi-destilada (milli-Q) a partir de:

- Trizma® base (T1503, Sigma-Aldrich) 1,25 M

El pH fue ajustado a 6,8 con HCl.

8.3.3.4.-Tris-HCl pH 8,8

La preparación se realizó en agua bi-destilada (milli-Q) a partir de:

- Trizma® base (T1503, Sigma Aldrich) 1,875 M

El pH fue ajustado a 8,8 con HCl.

8.3.3.5.-Tampón de carga

Se preparó a partir de tampón de carga 4X (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad) y se añadió 9:1 β -Mercaptoethanol (Santa Cruz Biotechnology).

8.3.3.6.-Tampón de electroforesis

La preparación se realizó en agua bi-destilada (milli-Q) a partir de:

- Trizma® base (T1503, Sigma-Aldrich) 25 mM
- Glicina (G8898, Sigma-Aldrich) 192 mM
- SDS (Dodecil sulfato sódico) (L4390, Sigma-Aldrich) 3,47 mM

8.3.3.7.-Tampón de transferencia

La preparación se realizó en agua bi-destilada (milli-Q) a partir de:

- Trizma® base (T1503, Sigma-Aldrich) 25 mM
- Glicina (G8898, Sigma-Aldrich) 192 mM
- Metanol (L4390, Sigma-Aldrich) 20%

8.3.3.8.-TBS

La preparación se realizó en agua bi-destilada (milli-Q) a partir de:

- Tris-HCl pH 7,5 20 mM
- NaCl (121659.1211, Panreac) 136,8 mM

8.3.3.9.-TBST

La preparación se realizó en agua bi-destilada (milli-Q) a partir de:

- Tris-HCl pH 7,5 20 mM
- NaCl (121659.1211, Panreac) 136,8 mM
- Tween® 20 (P5927, Sigma-Aldrich) 0,1%

“En algún lugar, algo increíble está esperando a ser descubierto”

Carl Sagan. Divulgador científico estadounidense (1934-1996)

IV. RESULTADOS

1.-CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS RATONES SAM

En una etapa inicial de este trabajo nos propusimos evaluar a modo de control interno algunas de las características fenotípicas que ya habían sido descritas como diferenciales de las dos cepas de ratones SAM utilizadas como modelos experimentales en esta Tesis Doctoral (Takeda *et al.*, 1981; Takeda *et al.*, 1991). Para ello elegimos como parámetros evaluables la ganancia ponderal y la situación cognitiva de los animales a lo largo de la edad, analizando la evolución de estos dos parámetros comparativamente en los ratones SAMR1 y SAMP8.

En primer lugar, determinamos el peso de los ratones a las tres edades establecidas para nuestro estudio, esto es, a los 2, 6 y 12 meses de vida de los animales. La **Figura 22** muestra los datos obtenidos en este estudio, pudiendo apreciarse que los ratones de la cepa SAMR1 van aumentando de peso progresivamente a lo largo de la edad ($27,11 \pm 0,81$ g a los 2 meses (n=14), $32,52 \pm 0,67$ g a los 6 meses (n=13) y $35,58 \pm 0,74$ g a los 12 meses (n=15)) mientras que los ratones de la cepa SAMP8 no solo presentan un peso significativamente menor a todas las edades estudiadas ($23,85 \pm 0,49$ a los 2 meses (n=11), $29,39 \pm 0,71$ a los 6 meses (n=11) y $29,19 \pm 1,57$ a los 12 meses (n=9)) sino que, además, a partir de los 6 meses de edad el peso de los animales se estabiliza y dejan de ganar peso con la edad.

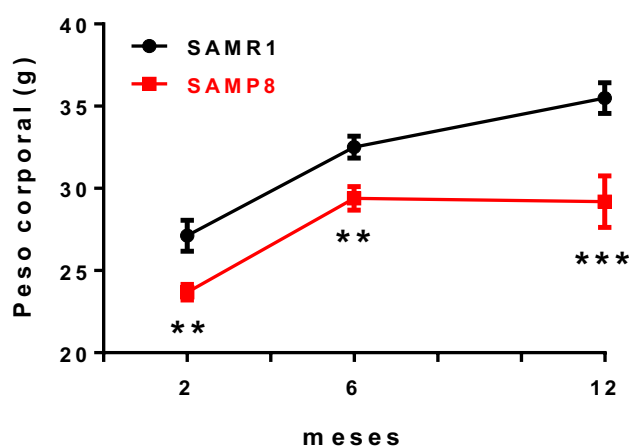


Figura 22. Evolución del peso de los ratones SAM con el avance de la edad. La gráfica representa el peso (g) de los ratones SAMR1 y SAMP8 a los 2, 6 y 12 meses de edad. Los datos son medias \pm EEM del número de ratones indicados en el texto. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparación con la cepa SAMR1 (*t* de Student).

En segundo lugar, quisimos evaluar el estado cognitivo de los ratones SAMR1 y SAMP8 y las posibles alteraciones de éste a lo largo del envejecimiento, para lo que utilizamos la prueba del laberinto en Y (que permite evaluar la memoria espacial a corto plazo), utilizando el

protocolo experimental descrito en el apartado de Materiales y Métodos (**Figura 21**). Los datos obtenidos en esta serie de experimentos se muestran resumidos en la **Figura 23**.

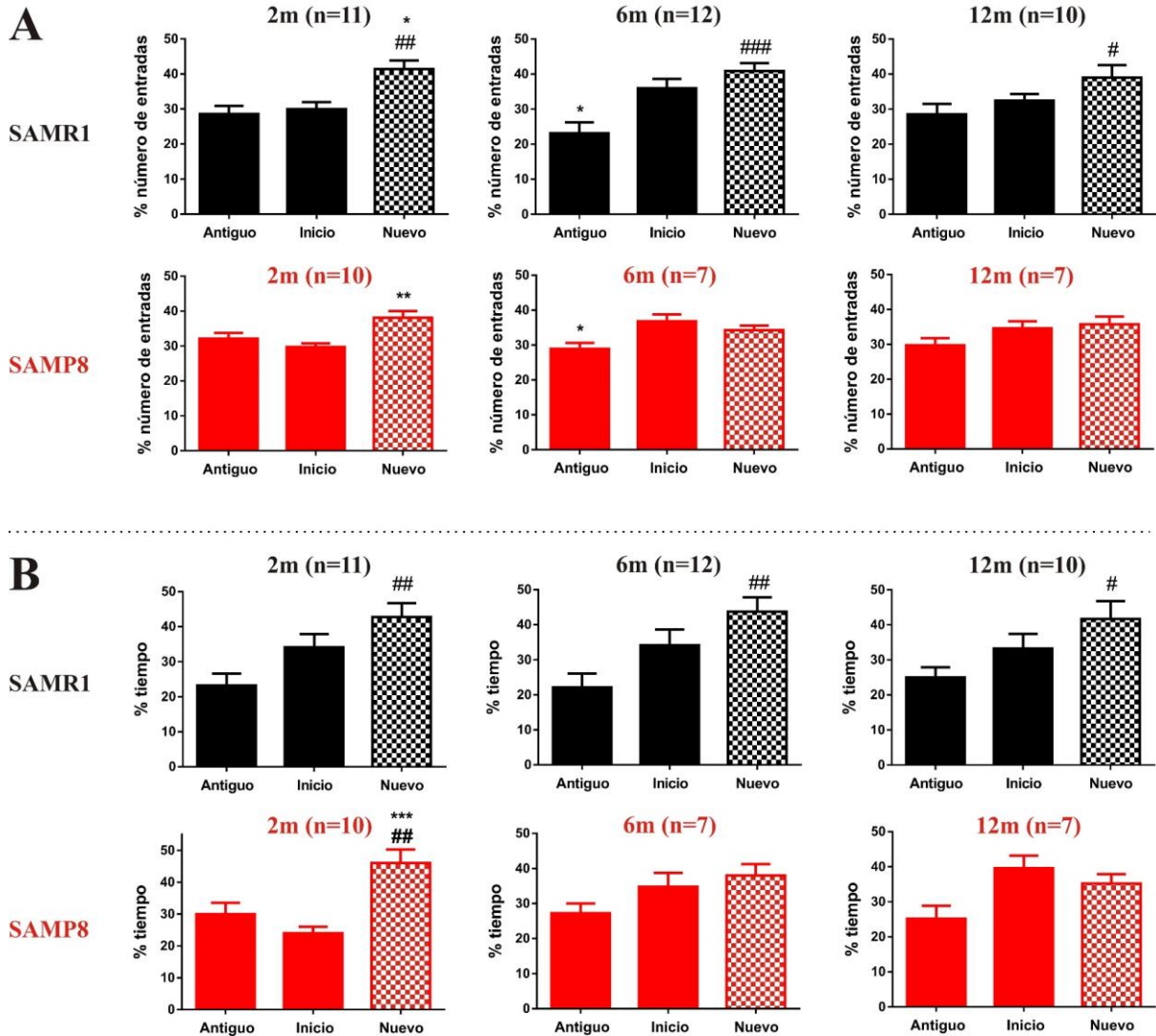


Figura 23. Prueba del laberinto en Y en los ratones SAMR1 y SAMP8 a los 2, 6 y 12 meses. El panel **A** muestra el porcentaje del número de entradas en cada brazo (antiguo, inicio y nuevo) de los ratones SAMR1 (barras negras) y SAMP8 (barras rojas) de 2, 6 y 12 meses de edad durante 5 minutos de experimento. El panel **B** muestra el porcentaje de tiempo que invierten en explorar cada brazo (antiguo, inicio y nuevo) los ratones SAMR1 (barras negras) y SAMP8 (barras rojas) de 2, 6 y 12 meses de edad. Los datos representan las medias \pm EEM correspondientes al número de ratones indicado entre paréntesis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en comparación con el brazo de inicio. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ en comparación con el brazo antiguo (ANOVA de una vía con test *post-hoc* de Tukey's cuando paramétrico y Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns cuando no paramétrico).

La **Figura 23** muestra el porcentaje del número de entradas y del tiempo de exploración que los animales pasan en cada brazo del laberinto, a saber: brazo antiguo (brazo que el animal ya había explorado anteriormente), brazo de inicio (brazo en el que se coloca al animal al inicio

del experimento) y brazo nuevo (brazo que el animal no ha explorado previamente y al cual tenderá a explorar más veces y más tiempo). En cuanto al número de entradas (**Figura 23, A**), se puede observar como los ratones SAMR1 prefieren explorar más veces el brazo que no conocen (brazo nuevo) que el brazo que recuerdan (brazo antiguo) tanto a los 2, como a los 6 y 12 meses, lo que indicaría que estos ratones no sufren un deterioro cognitivo. Por el contrario, los ratones SAMP8 de 2 meses también prefieren explorar más veces el brazo nuevo en vez del que recuerdan, sin embargo, a los 6 y 12 meses exploran todos los brazos por igual sin tener preferencia por el nuevo, lo que indicaría una pérdida de memoria espacial (ya que no recuerdan haber explorado el brazo antiguo).

Si nos fijamos en el porcentaje de tiempo de exploración de cada brazo (**Figura 23, B**), observamos un resultado similar al del número de entradas esto es, los ratones SAMR1 exploran durante un mayor tiempo el brazo nuevo, a todas las edades analizadas, mientras que los ratones SAMP8 solo muestran esta curiosidad a edades tempranas (2 meses), perdiendo la preferencia por el brazo nuevo a los 6 y 12 meses.

Para descartar que los resultados observados en esta prueba del laberinto en Y pudieran estar condicionados por una posible alteración de tipo motor en los ratones SAMP8 a las edades de 6 y 12 meses (por su envejecimiento prematuro), analizamos comparativamente el número de entradas totales en todos los brazos en ambas cepas a las diferentes edades (**Figura 24**).

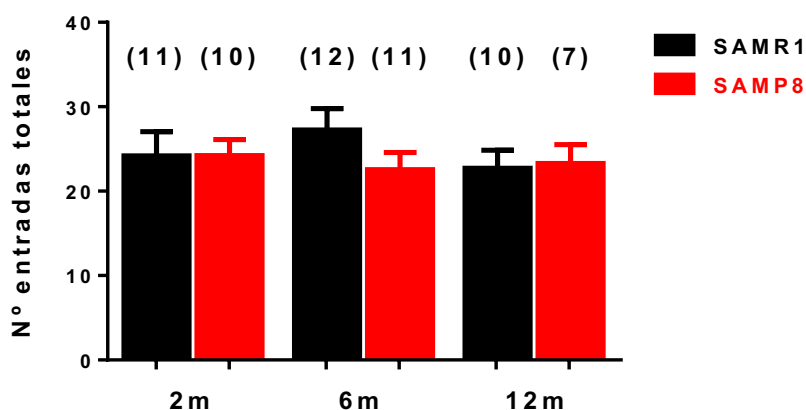


Figura 24. Número de entradas totales de los ratones SAMR1 y SAMP8 a los 2, 6 y 12 meses de edad. La gráfica muestra el número de entradas totales que los ratones SAMR1 (barras negras) y SAMP8 (barras rojas) realizan en todos los brazos del laberinto durante los 5 minutos del experimento, a las tres edades estudiadas. Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de animales indicado entre paréntesis (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns) (U de Mann-Whitney).

Como puede apreciarse en la figura, no se observaron cambios significativos en el número de entradas totales a los diferentes brazos del laberinto al comparar la actividad de los ratones

SAMP8 con la de los SAMP1, lo que descartaría posibles déficits motores en los ratones que pudieran enmascarar los defectos cognitivos apreciados en los ratones SAMP8.

2.-CORRIENTES IÓNICAS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Como se ha explicado en el apartado de Introducción, al producirse la descarga de ACh del nervio esplácnico, inmediatamente se produce un “baile” de iones, puesto que la célula cromafín adrenomedular va a sufrir una fase de activación en la que están implicados distintos tipos de canales iónicos. Este “baile iónico” juega un papel crucial en la excitabilidad celular y en el disparo y la regulación del proceso de exocitosis. Es por ello que, para poder analizar las posibles alteraciones del acoplamiento estímulo-secreción que pudieran acontecer durante el proceso de envejecimiento, nos planteamos analizar qué ocurre con la actividad de los distintos subtipos de canales iónicos implicados en dicho proceso a lo largo de la edad, estudiando ésta comparativamente en los ratones SAMR1 y SAMP8. Para ello se ha utilizado la técnica de “patch-clamp” en la modalidad de fijación de voltaje (-80 mV) en configuración de célula entera y una combinación de soluciones extra e intracelulares que nos ha permitido disecar y estudiar aisladamente cada subtipo de canal. Describiremos a continuación los principales hallazgos sobre las corrientes iónicas obtenidas en experimentos realizados con CCR aisladas de ratones SAMR1 y SAM8:

2.1.-Tamaño celular estimado a través de la capacidad de la membrana celular

Como se ha comentado en el apartado de *Materiales y Métodos*, se ha descrito que la magnitud de las corrientes iónicas pueden variar en función el tamaño celular, ya que una mayor superficie de membrana celular puede contener un mayor número de canales iónicos (Neher y Marty, 1982). Ante esta situación, nos pareció oportuno estimar, al menos aproximadamente, el tamaño de las células aisladas a partir de ratones SAMR1 y SAMP8 de las distintas edades, para descartar que los posibles cambios de intensidad de las corrientes iónicas que pudiéramos detectar fuesen simplemente debidos a cambios en el tamaño celular.

Los resultados obtenidos al analizar el tamaño celular se muestran en la **Figura 25**, en la que puede apreciarse que no parecen existir diferencias significativas en el tamaño celular entre las células aisladas a partir de ratones SAMR1 a las tres edades del estudio ($7,54 \pm 0,31$ pF a los 2 meses, $7,31 \pm 0,3$ pF a los 6 meses y $7,31 \pm 0,41$ pF a los 12 meses) ni en las aisladas de los SAMP8 ($7,93 \pm 0,24$ pF a los 2 meses, $7,61 \pm 0,44$ pF a los 6 meses y $7,83 \pm 0,77$ pF a los

12 meses). Tampoco se observaron diferencias significativas al estudiar comparativamente el tamaño celular de las células SAMR1 y SAMP8 a cada edad.

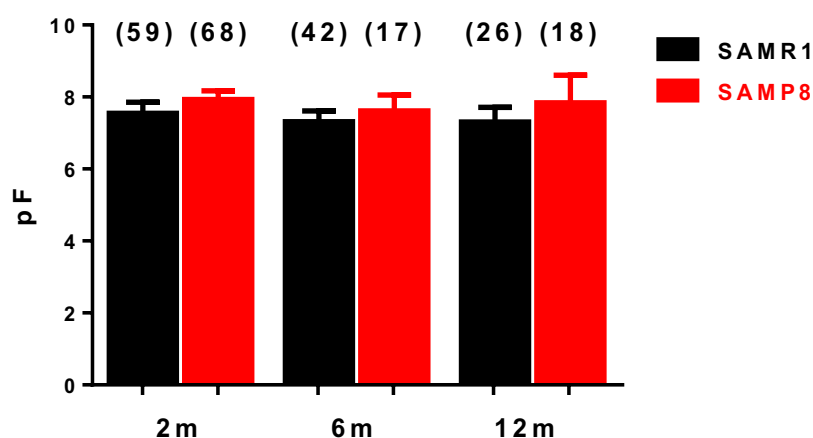


Figura 25. Estimación del tamaño de las CCs aisladas de ratones SAMR1 y SAMP8. La figura muestra el tamaño celular aproximado medido mediante el cálculo de la capacidad de la membrana (en pF) de las células cromafines de los ratones SAMR1 y SAMP8 a los 2, 6 y 12 meses de edad. Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de células entre paréntesis de al menos tres ratones diferentes (ANOVA de una vía con test *post-hoc* de Tukey's misma cepa a lo largo de la edad) (*t* de Student misma edad diferentes cepas).

A la vista de estos resultados que indican que no se producen variaciones en el tamaño celular a lo largo de la edad ni entre las dos cepas de ratones, consideramos que no era necesario normalizar la magnitud de las corrientes iónicas en función del tamaño celular, por lo que en los experimentos que se describen a continuación, el tamaño de las corrientes iónicas se expresará simplemente como intensidad de la corriente (en pA).

2.2.-Corrientes nicotínicas (I_{ACh})

Como se ha descrito anteriormente, la ACh liberada por las terminaciones del nervio esplácnico va a estimular fundamentalmente receptores de tipo nicotínico en la membrana de la célula cromafín adrenomedular, lo que generará la apertura del canal iónico acoplado a dicho receptor y favorecerá la entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} (en menor proporción), generándose así una corriente iónica de entrada hacia el interior celular.

Para estudiar esta respuesta inicial de la célula cromafín, se registraron las corrientes nicotínicas (I_{ACh}) provocadas por pulsos de 250 ms de duración con una solución KH conteniendo ACh (100 μM) aplicados a intervalos de 30 s. En la **Figura 26** se representa la amplitud máxima y la carga iónica total de la I_{ACh} obtenidas en CCs aisladas de ratones SAMR1 y SAMP8 a lo largo de la edad.

Los datos recogidos en esta figura muestran que no se producen grandes variaciones ni en la amplitud ni en la carga total de la I_{ACh} de ratones SAM a lo largo de la edad. Con respecto a la amplitud de la I_{ACh} , los ratones SAMR1 no muestran cambios significativos a lo largo de la edad ($485 \pm 64,7$ pA a los 2 meses, $474,1 \pm 56,3$ pA a los 6 meses y $642,3 \pm 103,1$ pA a los 12 meses). En el caso de los ratones SAMP8 se observa un ligero, aunque significativo, incremento del tamaño de la corriente en animales de 6 meses, volviendo a disminuir a los 12 meses ($475,1 \pm 52$ pA a los 2 meses, $638,6 \pm 68,3$ a los 6 meses y $547,1 \pm 65,3$ pA a los 12 meses). Este valor de I_{ACh} en ratones SAMP8 a los 6 meses es también significativamente mayor con respecto a la observada en ratones SAMR1 de la misma edad.

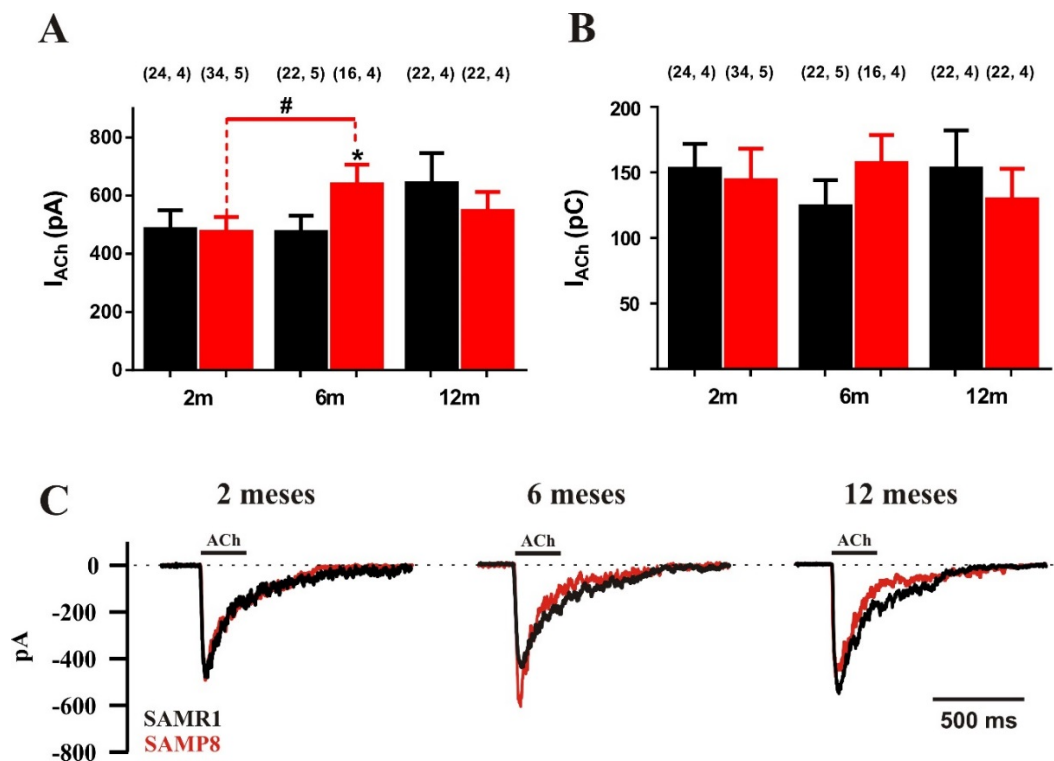


Figura 26. Corriente nicotínica registrada en CCs de ratones SAMR1 y SAMP8. A Amplitud media (pA) de las corrientes nicotínicas en los ratones SAMR1 y SAMP8 a los 2, 6 y 12 meses. B Carga total (pC) de la corriente nicotínica en los ratones SAMR1 y SAMP8 a los 2, 6 y 12 meses. Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de células y número de ratones indicados entre paréntesis. C Ejemplos representativos de las corrientes nicotínicas registradas en CCs de ratones SAMR1 (trazo negro) y SAMP8 (trazo rojo) a los 2, 6 y 12 meses. Los datos son medias \pm EEM del número de células y número de ratones entre paréntesis. * $p < 0,05$ en los ratones de la cepa SAMP8 en comparación con los de la cepa SAMR1 (U de Mann-Whitney). # $p < 0,05$ en los ratones SAMP8 a lo largo de la edad (indicado por barra roja) (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

Cuando valoramos la carga total de la I_{ACh} , se observa un comportamiento similar a lo que ocurre con la corriente máxima esto es, no se observan cambios a lo largo de la edad ni en los ratones SAMR1 ($152,8 \pm 189$ pC a los 2 meses, $124,2 \pm 19,9$ pC a los 6 meses y $153,1 \pm 29$ pC a los 12 meses), ni en los SAMP8 ($143,9 \pm 24,2$ pC a los 2 meses, $157,2 \pm 21,3$ pC a los 6 meses y $130 \pm 23,2$ pC a los 12 meses), ni entre ambas cepas de animales.

2.3.-Corrientes de sodio (I_{Na})

Los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v) son los siguientes en entrar en juego en ese “baile iónico” que se produce cuando la ACh estimula la célula cromafín. Por ello, procedimos al estudio de los posibles cambios en las I_{Na} durante el envejecimiento a través de protocolos de curva IV en las que se midió la intensidad de corriente (I) en función del voltaje (V) tras la aplicación de pulsos despolarizantes de 10 ms de duración e intensidad creciente (incrementos de 10 mV) desde -60 mV a +60 mV, aplicados a intervalos de 15 s (IV_{Na}) (**Figura 27**). Estos experimentos se hicieron en ausencia de Ca^{2+} extracelular para evitar contaminación con la I_{Ca} .

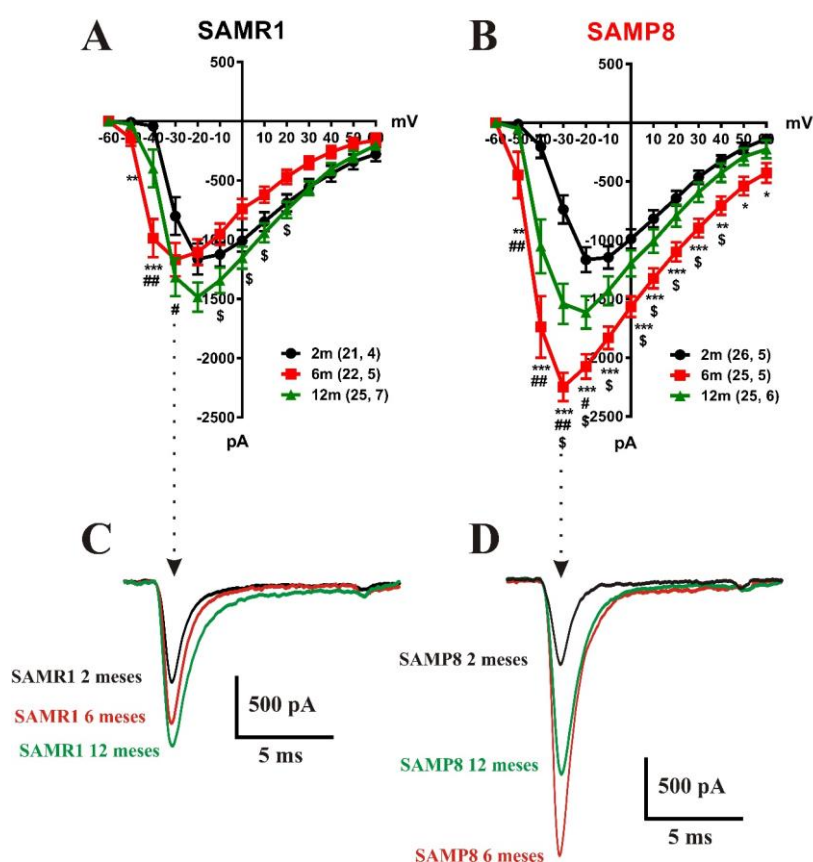


Figura 27. Corrientes de sodio en CCs de ratones SAMR1 y SAMP8. Curvas IV_{Na} obtenidas en CCs de ratones SAMR1 (A) y SAMP8 (B) a los 2 (trazo negro), 6 (trazo rojo) y 12 meses (trazo verde). Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de células y de ratones indicado entre paréntesis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ en los ratones de 12 meses en comparación con los de 2 meses. \$\$\$ $p < 0,05$ en los ratones de 12 meses en comparación con los de 6 meses (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns). Los paneles C y D muestran registros originales representativos de la I_{Na} obtenidos a -30 mV a las tres edades en SAMR1 (C) y SAMP8 (D).

Los resultados mostrados en la **Figura 27** indican que se produce un aumento notable de la I_{Na} a los 12 meses en los ratones SAMR1. Este aumento de la I_{Na} también se produce en los ratones SAMP8, si bien en este caso ya es significativo a la edad 6 meses, y con una mayor

amplitud, manteniéndose este aumento a los 12 meses. En ambos casos, tanto en SAMR1 como SAMP8, este aumento se produce en mayor medida a voltajes más negativos, observándose un ligero desplazamiento hacia la izquierda en la curva IV, lo que indicaría que las células muestran una mayor excitabilidad, al producirse la apertura de los Na_v a voltajes más negativos, esto es, con menores despolarizaciones de la membrana.

2.4.-Corrientes de calcio (I_{Ca})

Posteriormente entran en juego los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) que permiten la entrada de los cationes Ca^{2+} y que serán, en última instancia, los responsables de la exocitosis. Por ello, procedimos al estudio de los posibles cambios en la I_{Ca} durante el envejecimiento a través de protocolos de curva IV en las que se midió la intensidad de corriente (I) en función del voltaje (V) tras la aplicación de pulsos despolarizantes de 50 ms de duración e intensidad creciente (incrementos de 10 mV) desde -50 mV a +50 mV, aplicados a intervalos de 10 s (I_{Ca}) (Figura 28). Estos registros se realizaron en presencia de 2 mM de Ca^{2+} en la solución extracelular.

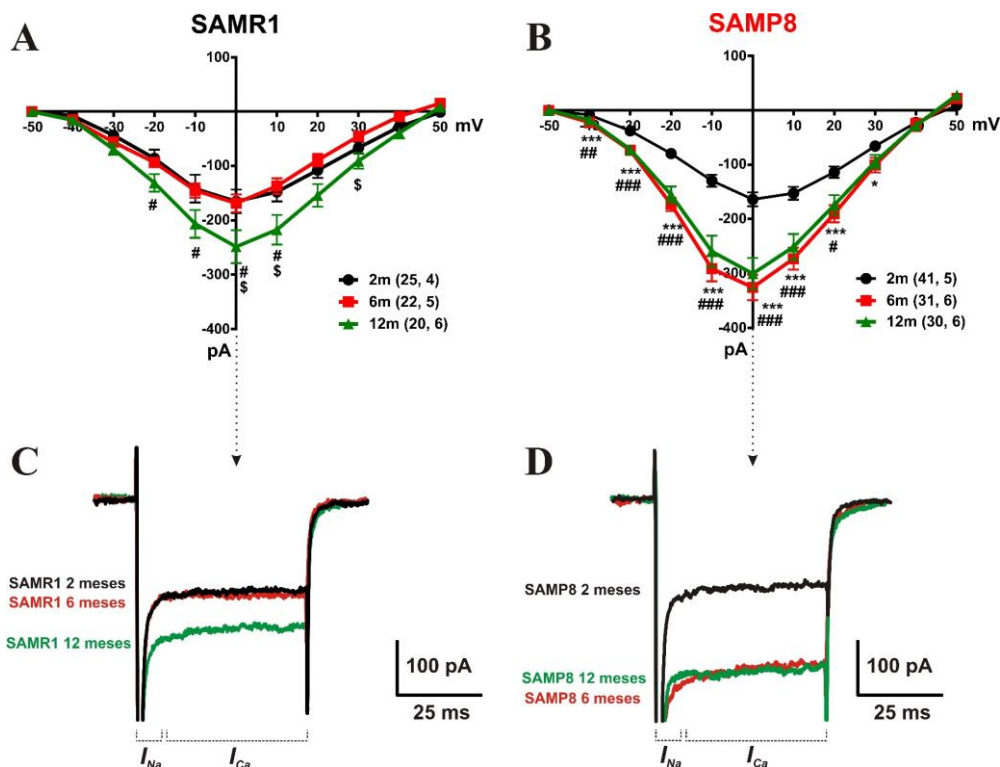


Figura 28. Corrientes de calcio en CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8. Curvas I_{Ca} obtenidas en CCs de ratones SAMR1 (A) y SAMP8 (B) a los 2 (trazo negro), 6 (trazo rojo) y 12 meses (trazo verde). Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de células y de ratones indicado entre paréntesis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses. # $p < 0,05$; ### $p < 0,01$ en los ratones de 12 meses en comparación con los de 2 meses. \$ $p < 0,05$ en los ratones de 12 meses en comparación con los de 6 meses (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns). Los paneles C y D muestran registros originales representativos de la I_{Ca} obtenidos a 0 mV a las tres edades en SAMR1 (C) y SAMP8 (D).

Los resultados mostrados en la **Figura 28** indican que las CCs de los ratones SAMR1 muestran una I_{Ca} muy similar a los 2 y 6 meses, produciéndose un aumento notable de la I_{Ca} a los 12 meses, a la mayoría de los voltajes estudiados. Este aumento de la I_{Ca} también se produce en los ratones SAMP8, si bien en este caso ya es significativo a la edad de 6 meses, y con una mayor amplitud, manteniéndose este aumento a los 12 meses. Al igual que ocurre en los SAMR1, el incremento de la I_{Ca} se produce en la mayoría de los voltajes estudiados.

2.5.-Corrientes de potasio dependientes de calcio ($I_{K(Ca)}$)

El mecanismo responsable de la repolarización celular y, por lo tanto, de la finalización del acoplamiento estímulo-secreción, son los canales de K^+ . Por ello, procedimos al estudio de posibles cambios en la $I_{K(Ca)}$ durante el envejecimiento a través de protocolos de curva IV en las que se midió la intensidad de corriente (I) en función del voltaje (V) tras la aplicación de pulsos despolarizantes de 400 ms de duración e intensidad creciente (incrementos de 10 mV) desde -40 mV a +150 mV, aplicados a intervalos de 10 s (IV_{KCa}) (**Figura 29**). Estos registros se realizaron en presencia de 2 mM de Ca^{2+} en la solución extracelular.

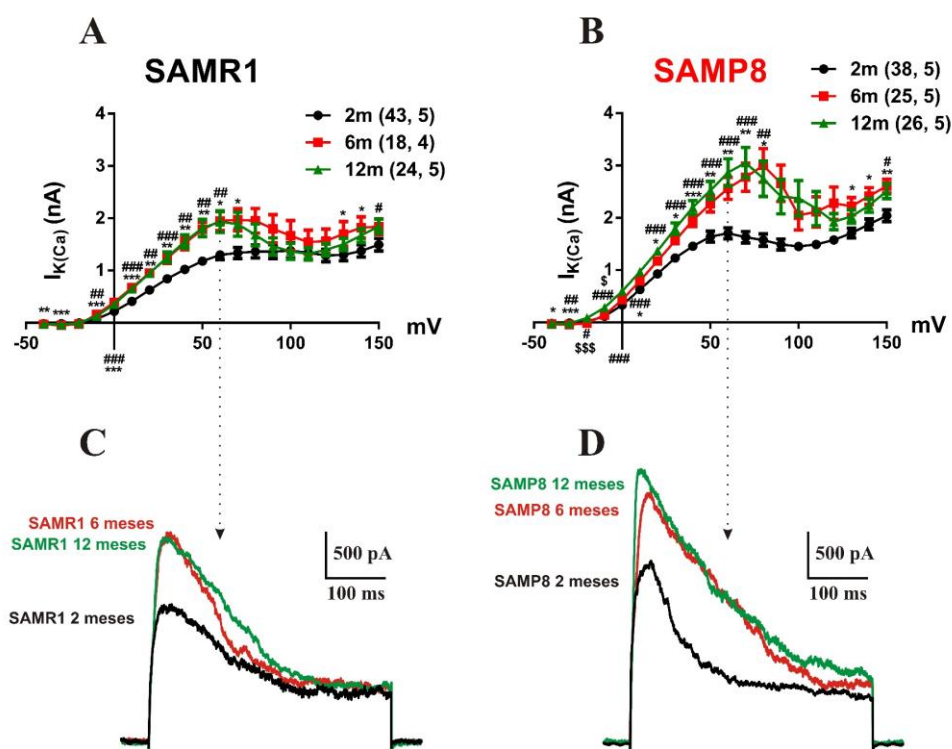


Figura 29. Corriente de potasio-calcio dependiente ($I_{K(Ca)}$) en CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8. Curvas IV_{KCa} obtenidas en CCs de ratones SAMR1 (A) y SAMP8 (B) a los 2 (trazo negro), 6 (trazo rojo) y 12 meses (trazo verde). Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de células y de ratones indicado entre paréntesis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ en los ratones de 12 meses en comparación con los de 2 meses. § $p < 0,05$ en los ratones de 12 meses en comparación con los de 6 meses (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns). Los paneles C y D muestran registros originales representativos de la $I_{K(Ca)}$ obtenidos a +60 mV a las tres edades en SAMR1 (C) y SAMP8 (D).

Los resultados de la **Figura 29** muestran un aumento de la $I_{K(Ca)}$ a los 6 y 12 meses tanto en los ratones SAMR1 como en los ratones SAMP8. Además, en estos últimos, la $I_{K(Ca)}$ es mayor a todas las edades si se compara con la de los ratones SAMR1.

2.6.-Corrientes de potasio dependientes de voltaje ($I_{K(V)}$)

Los posibles cambios en la $I_{K(V)}$ se analizaron mediante protocolos de curva IV en las que se midió la intensidad de corriente (I) en función del voltaje (V) tras la aplicación de pulsos despolarizantes de 400 ms de duración e intensidad creciente (incrementos de 10 mV) desde -40 mV a +150 mV, aplicados a intervalos de 10 s (**Figura 29**). Estos registros se realizaron en ausencia de Ca^{2+} en la solución extracelular (0 Ca^{2+} nominal).

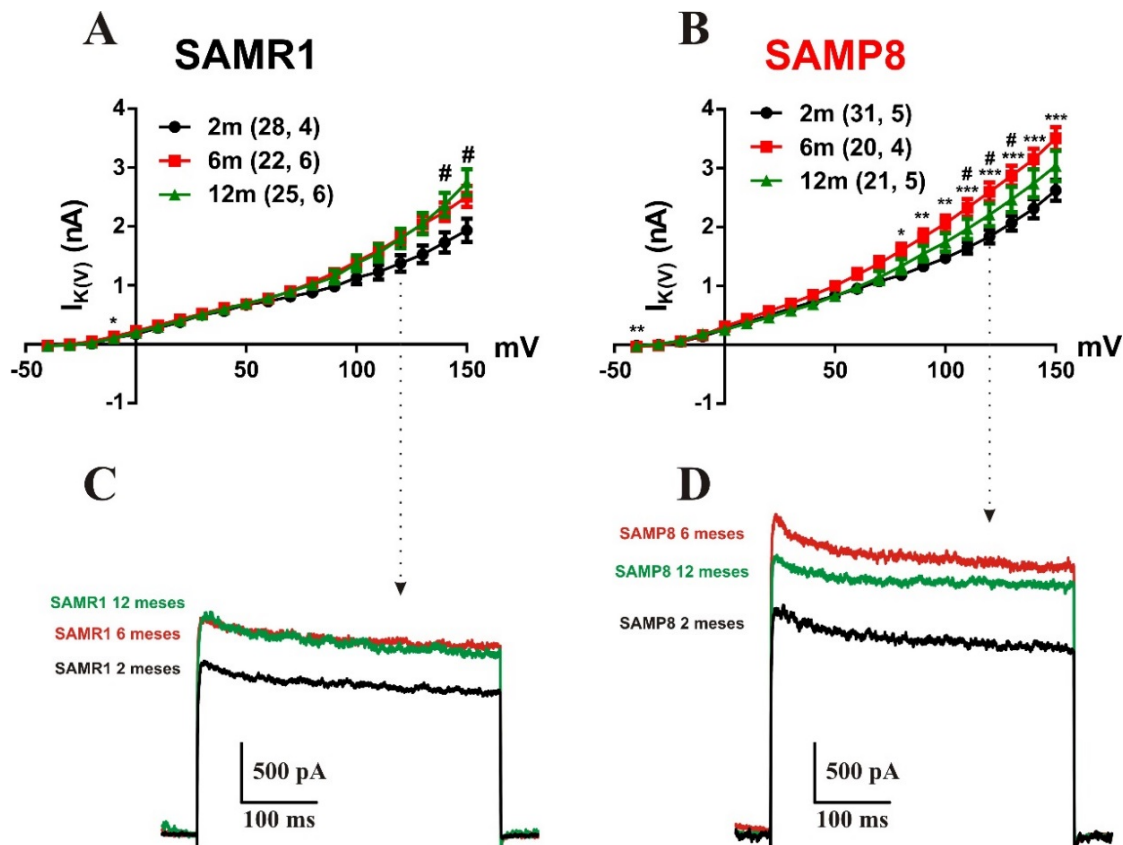


Figura 30. Corriente de potasio dependientes de voltaje ($I_{K(V)}$) de las CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8. Curvas $IV_{K(V)}$ obtenidas en CCs de ratones SAMR1 (A) y SAMP8 (B) a los 2 (trazo negro), 6 (trazo rojo) y 12 meses (trazo verde). Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de células y de ratones indicado entre paréntesis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses (en los SAMP8). # $p < 0,05$ en los ratones de 12 meses en comparación con los de 2 meses (en ambas cepas) (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns). Los paneles C y D muestran registros originales representativos de la $I_{K(V)}$ obtenidos a +120 mV a las tres edades en SAMR1 (C) y SAMP8 (D).

Como se muestra en la **Figura 30**, la I_{Kv} presenta un comportamiento similar al descrito para la $I_{K(Ca)}$, esto es, un aumento de la corriente a los 6 y 12 meses en ambas cepas de animales, presentando además una mayor corriente los ratones SAMP8 cuando se compara con los SAMR1 a todas las edades. No obstante, hay que llamar la atención al hecho de que este aumento significativo se produce a voltajes extremadamente positivos (a partir de +80 mV), lo que pone en duda la posible relevancia fisiopatológica de este hallazgo.

3.-SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS Y ENVEJECIMIENTO

En esta Tesis Doctoral hemos utilizado la técnica de registro amperométrico para analizar los posibles efectos del envejecimiento sobre el proceso secretor de catecolaminas por células cromafines aisladas de ratones SAMR1 y SAMP8. Una de las principales ventajas del uso de esta metodología es que nos permite analizar detalladamente las características cinéticas de los últimos pasos de la exocitosis (según se ha descrito en el apartado de Materiales y Métodos).

Para inducir la exocitosis de las catecolaminas en las CCR se han utilizado dos tipos de estímulos secretores, a saber: un estímulo con un pulso de una solución KH conteniendo el neurotransmisor fisiológico ACh (100 μ M), que producirá una respuesta secretora en cuya génesis y mantenimiento van a intervenir varios de los canales iónicos que están presentes en la membrana de la célula cromafín, generándose un patrón de despolarización y disparo de PAs que conducen a un aumento de la $[Ca^{2+}]_c$ y, como consecuencia, la secreción de catecolaminas. Por otro lado, vamos a aplicar un estímulo de tipo químico consistente en la aplicación de una solución de KH conteniendo alto K^+ que, como ya se ha descrito en apartados anteriores, produce una despolarización de la membrana celular (Orozco *et al.*, 2006), suficiente para inducir directamente la apertura de los CCDV, facilitando así una entrada masiva de Ca^{2+} desde el exterior celular y, por ende, la exocitosis de las catecolaminas.

Estos dos secretagogos se van a aplicar durante un tiempo de estimulación de 1 minuto con el objetivo de provocar la liberación de un número elevado de espigas amperométricas, lo que nos ayudará a mejorar el poder estadístico del análisis de los eventos amperométricos únicos.

3.1.-Secreción de catecolaminas inducida por K^+

Para realizar el estudio de liberación cuantales de catecolaminas, cada célula registrada fue superfundida con una solución KH conteniendo 2 mM Ca^{2+} durante varios minutos (en los

cuales no se observó ningún o casi ningún evento amperométrico) y, a continuación, fue estimulada una única vez, durante 1 minuto, con una solución KH que contenía 70 mM K^+ . Al finalizar este tiempo de estimulación, se perfundió de nuevo la célula con la solución KH y se registró la actividad amperométrica durante otros 2 min adicionales, asegurándonos de que la secreción cesaba, ya que de lo contrario esto podría indicar un posible daño celular provocado por el electrodo y la célula se descartaría. Los datos obtenidos en esta serie de experimentos están representados en la **Figura 31**.

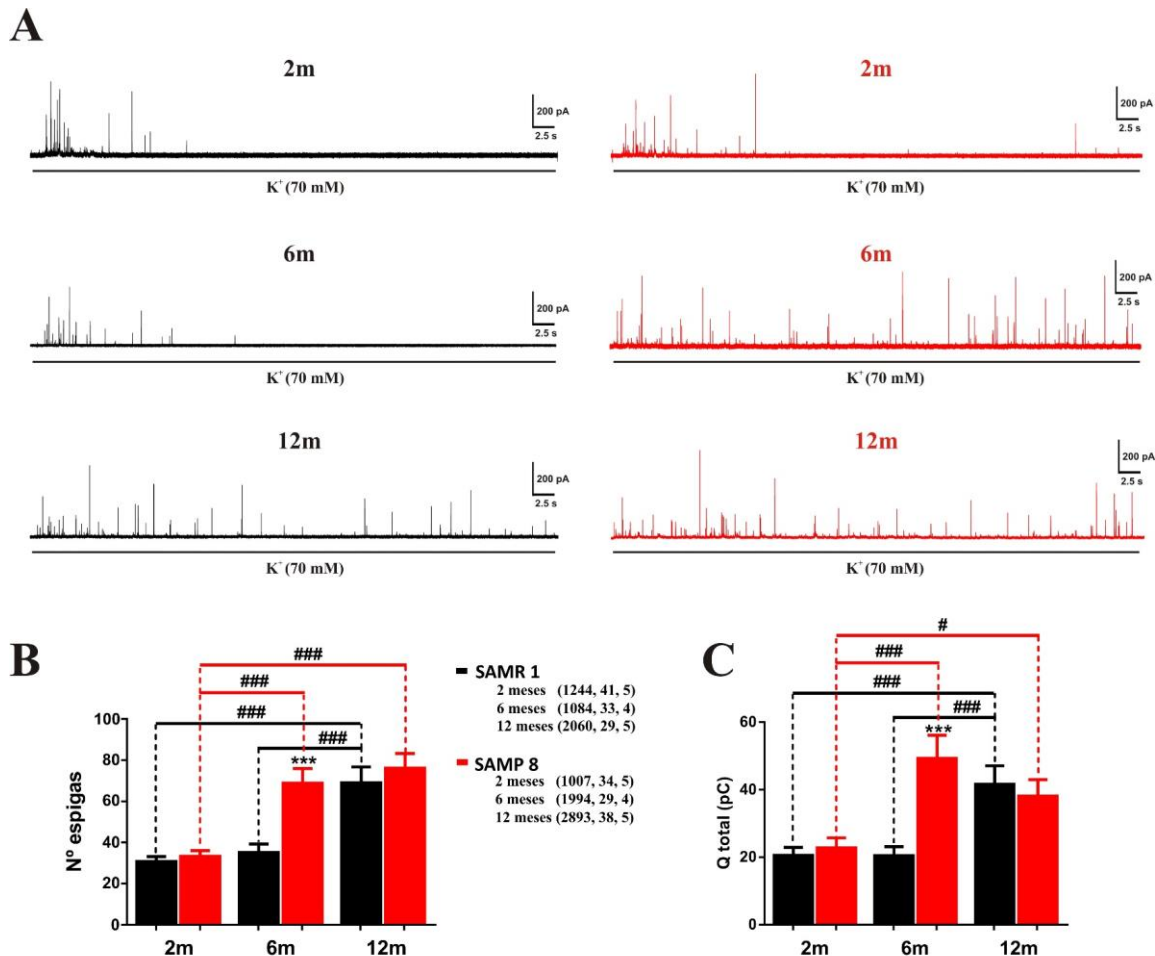


Figura 31. Secreción de catecolaminas en respuesta a la aplicación de un pulso de K^+ (70 mM) en CCs de ratones SAMR1 y SAMP8. **A** Registros amperométricos representativos de la liberación de catecolaminas en respuesta a la aplicación de un pulso de 1 min de K^+ (70 mM) en CCs de ratones SAMR1 (trazos negros) y SAMP8 (trazos rojos) de 2, 6 y 12 meses. **B** Número de espigas amperométricas registradas durante el minuto de estimulación. **C** Cantidad total de catecolaminas liberadas (área bajo la curva de todas las espigas de cada registro; representado en pC) durante el minuto de estimulación. Los datos son medias \pm EEM del número de espigas, número de células y número de ratones entre paréntesis. *** $p < 0,001$ en los ratones de la cepa SAMP8 en comparación con los de la cepa SAMR1 (U de Mann-Whitney). # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

En la **Figura 31A** se muestran seis ejemplos representativos de registros amperométricos obtenidos en respuesta a la estimulación con un minuto de K^+ en CCs de ratones SAMR1 (en

negro) y SAMP8 (en rojo) de 2, 6 y 12 meses de edad. En esta figura se puede observar cómo en las células de los ratones SAMR1 de 2 meses, se produce una masiva liberación de catecolaminas principalmente durante en los primeros 10 s del estímulo, que va disminuyendo en los siguientes 10 s, y acaba por cesar durante el resto del registro. Un perfil secretor similar se produce en CCs procedentes de animales de 6 meses de edad; sin embargo, a los 12 meses se mantiene la marcada liberación de catecolaminas al inicio del estímulo, pero la respuesta secretora se alarga y se mantiene durante todo el registro. Esta secreción más prolongada se corrobora al analizar el número de espigas amperométricas (vesículas liberadas) contabilizadas durante los registros (**Figura 31, B**), siendo ésta igual a los 2 ($30,8 \pm 2,3$ vesículas) y 6 ($35,2 \pm 4,1$ vesículas) meses, y presentando un notable aumento (el doble) a los 12 meses ($69,1 \pm 7,6$ vesículas; $p < 0,001$).

El aumento del número de vesículas liberadas que se observa a los 12 meses, va acompañado de un aumento en la carga total de catecolaminas secretadas (**Figura 31, C**) desde los valores registrados a los 2 y 6 meses ($20,5 \pm 2,4$ pC y $20,5 \pm 2,6$ pC, respectivamente) hasta el alcanzado en CCs procedentes de animales de 12 meses ($41,6 \pm 5,5$ pC). Este paralelismo entre el incremento del número de vesículas y la carga total nos anticipa el dato de que la carga de catecolaminas por vesícula debe ser muy similar a lo largo de la edad en los ratones SAMR1.

En cuanto a la secreción de catecolaminas inducida por K^+ en CCs de los ratones SAMP8, a los 2 meses se puede observar una secreción similar a la registrada en los SAMR1 de la misma edad, con un perfil secretor caracterizado por una mayor secreción durante los primeros 10 s que cesa durante el resto del estímulo. Sin embargo, en los ratones SAMP8 de 6 meses podemos apreciar un aumento en la secreción durante todo el estímulo, manteniéndose este incremento y perfil secretor en las células de los ratones SAMP8 a los 12 meses (**Figura 31, A**). De nuevo, estos datos se corroboran al contabilizar el número de espigas amperométricas liberadas en cada registro (**Figura 31, B**), observándose una secreción similar a los de los ratones SAMR1 a los 2 meses ($33,3 \pm 2,3$ vesículas), pero incrementándose significativamente ya a los 6 meses ($68,8 \pm 7,2$ vesículas), y manteniéndose este incremento a los 12 meses ($76,1 \pm 7,2$ vesículas).

Con respecto a la carga total de las catecolaminas liberadas, ésta es muy similar a la registrada en los ratones SAMR1 a los 2 meses ($22,8 \pm 3$ pC), pero aumenta significativamente a los 6 y 12 meses ($49,27 \pm 6,8$ y $38,1 \pm 4,9$ pC, respectivamente; **Figura 31, C**), indicando nuevamente que el contenido cuantitativo de catecolaminas de cada vesícula individual podría no variar a lo largo de la edad tampoco en estos ratones.

Las diferencias en el perfil secretor de catecolaminas a cada edad en las dos cepas de ratones SAM se ponen mejor de manifiesto en la representación que se muestra en la **Figura 32**, donde hemos representado de forma acumulativa el número total de vesículas secretadas a intervalos de 5 segundos. En esta gráfica se muestra claramente cómo en las CCs de los ratones SAMR1 a los 2 y 6 meses, la mayor parte de la secreción de vesículas (número de espigas) y de catecolaminas (carga total) acontece durante los primeros 10 segundos de aplicación del estímulo con K^+ , mientras que en células de ratones SAMR1 de 12 meses el número de vesículas y catecolaminas secretadas sigue incrementándose durante el minuto de estímulo (**Figura 32, A y B**). Estas mismas diferencias en el patrón de secreción ocurren en las CCs de los ratones SAMP8, sin embargo, se adelantan a los 6 meses de edad y se mantienen a los 12 meses (**Figura 32, C y D**).

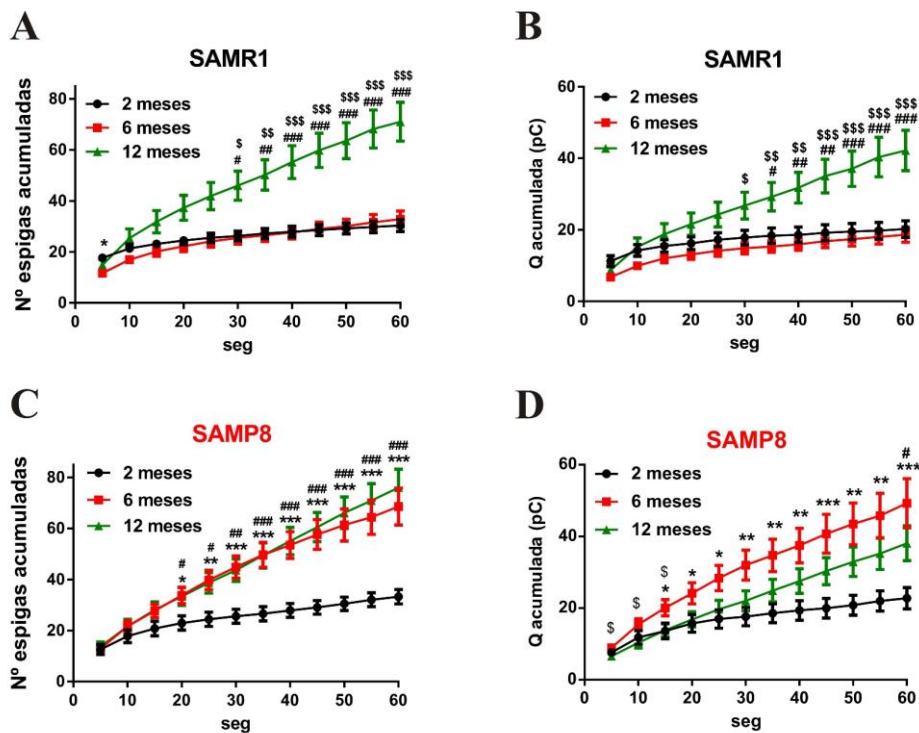


Figura 32. Secreción acumulada de catecolaminas en respuesta a K^+ (70 mM) medida a intervalos de 5 segundos. A y C Número de espigas acumuladas cada 5 segundos en CCs de ratones SAMR1 (A) y SAMP8 (C) de 2, 6 y 12 meses de edad. B y D Carga total acumulada cada 5 segundos en CCs de ratones SAMR1 (B) y SAMP8 (D) de 2, 6 y 12 meses de edad. Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de células y de ratones indicado entre paréntesis en la **Figura 31**. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses (en la cepa SAMP8). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ en los ratones de 12 meses en comparación con los de 2 meses (en ambas cepas). \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ en los ratones de 12 meses en comparación con los de 6 meses (en ambas cepas) (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

3.1.1.-Análisis cinético de los eventos exocitóticos únicos en respuesta a K^+

Como hemos comentado en el apartado anterior, el hecho de que el incremento en el número de vesículas secretadas que acontece con el envejecimiento tanto en ratones SAMR1

como SAMP8 se produzca de forma paralela a un incremento en la carga total de catecolaminas, podría indicar que el contenido cuantal de las vesículas individuales no sufre variaciones con la edad en ninguna de las dos cepas de ratones SAM estudiadas. Para corroborar esta observación, realizamos el análisis cinético de los eventos excitotóxicos únicos (ver parámetros evaluados en la sección de Materiales y Métodos, **Figura 18**). Este análisis detallado nos podría proporcionar información clave sobre la forma en que se liberan los neurotransmisores y si se ve afectada a lo largo de la edad. Los resultados de este análisis se recogen en la **Figura 33**.

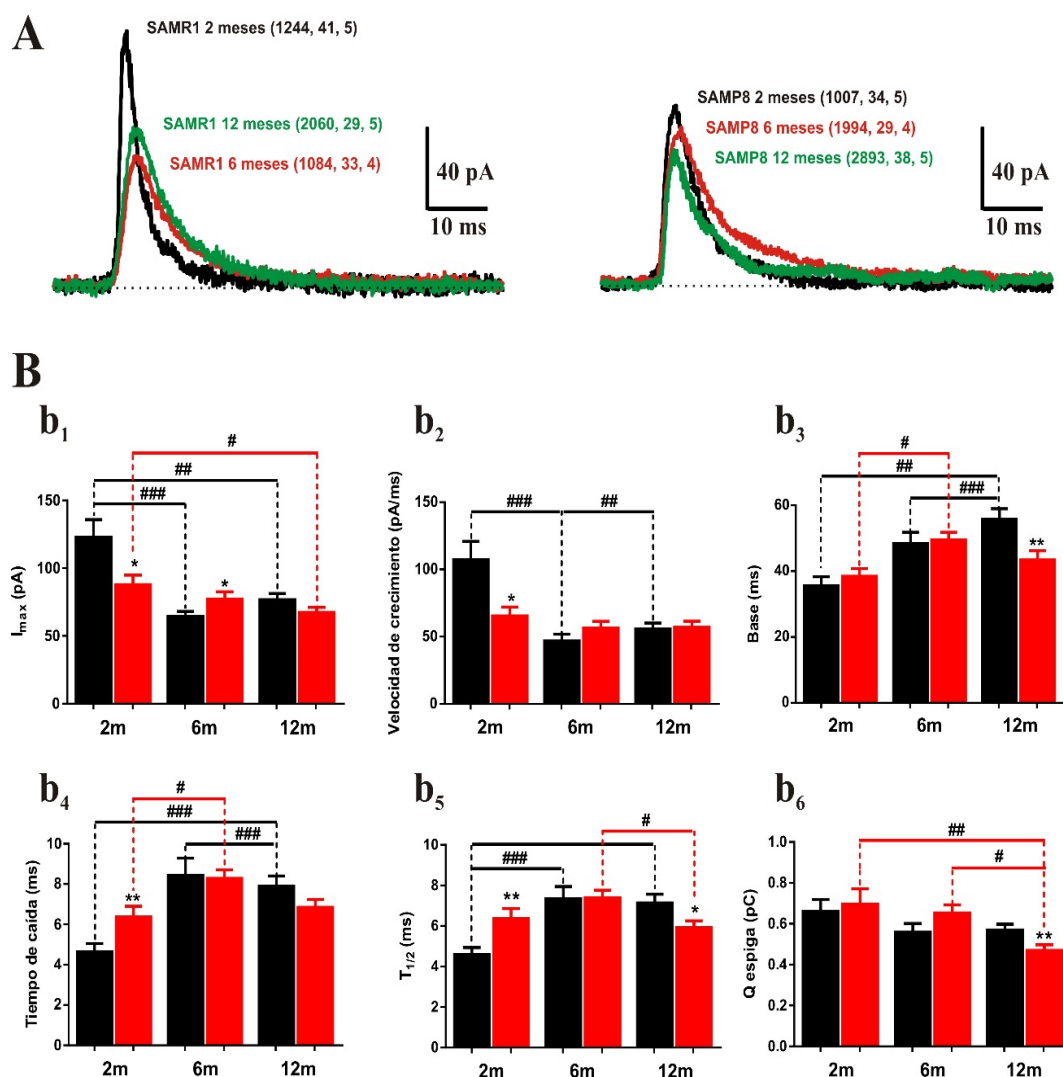


Figura 33. Ejemplos representativos y parámetros cinéticos de las espigas amperométricas liberadas en respuesta a K^+ (70 mM). **A** Ejemplos representativos de las espigas amperométricas medias de CCs de ratones SAMR1 (izquierda) y SAMP8 (derecha) a los 2 (trazo negro), 6 (trazo rojo) y 12 meses (trazo verde). **B** Parámetros cinéticos de las espigas amperométricas de los ratones SAMR1 (barras negras) y SAMP8 (barras rojas) a lo largo de la edad. A saber: **b₁** I_{max} : altura de la espiga; **b₂** Velocidad de crecimiento: calculada con la pendiente de la fase de crecimiento de la espiga; **b₃** Base de la espiga: duración de la espiga; **b₄** tiempo de caída: obtenido con el tiempo entre el 75 y el 25% de la altura de la espiga en la fase de descenso; **b₅** $t_{1/2}$: anchura de la espiga al 50% de su altura; **b₆** Q: área de la espiga. Los datos son medias \pm EEM del número de espigas, células y ratones entre paréntesis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en los ratones de la cepa SAMP8 en comparación con los de la cepa SAMR1 (U de Mann-Whitney). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

Al analizar los parámetros las espigas amperométricas individuales liberadas en respuesta al K^+ (**Figura 33**), se observó una clara disminución en la amplitud máxima (I_{max}) de las espigas con el avance la edad en CCs de ambas cepas (**b₁**). En los ratones SAMR1 esta caída es mayor desde los valores registrados en ratones de 2 meses en comparación con los valores a los 6 y 12 meses (la amplitud se reduce a la mitad). En los ratones SAMP8, la I_{max} de la espiga amperométrica en ratones de 2 meses es significativamente menor que la observada en ratones SAMR1. Al igual que ocurría con los SAMR1, la amplitud de la espiga se reduce al avanzar la edad. Se observa un patrón similar de reducción de la velocidad de crecimiento a lo largo de la edad (**b₂**).

En cuanto a la duración de las espigas (base), se observa un aumento de este parámetro a medida que avanza la edad, tanto en los ratones SAMR1 como en los SAMP8 (**b₃**), lo que se corresponde con un incremento en el tiempo en que tarda en caer la espiga amperométrica (**b₄**). De esta manera, al tener una base mayor y tardar más tiempo en caer la espiga, podemos observar con claridad cómo las espigas amperométricas son más anchas (se incrementa el $t_{1/2}$) al avanzar la edad, en ambos tipos de animales (**b₅**). Es de destacar que en todos estos parámetros se producen mayores variaciones en los ratones SAMR1 desde los valores registrados a los 2 meses, en comparación con los de los 6 y 12 meses, que en los ratones SAMP8, donde estos parámetros parecen estar ya alterados a la edad de 2 meses, por lo que las variaciones que se producen a lo largo de la edad son menos manifiestas. Así, según aumenta la edad, las espigas amperométricas se hacen más pequeñas y más anchas (**Figura 33, A**), por lo que la liberación de los neurotransmisores se realiza con mayor lentitud. Esto ocurre tanto en los ratones SAMR1 como en los SAMP8, pero en estos últimos parece que estos cambios se adelantan a los 2 meses.

Por último, al analizar el contenido cuantales de cada espiga (Q_{espiga}) se observó que éste sufre tan solo pequeñas variaciones a lo largo del envejecimiento de los ratones de ambas cepas, aunque sí se produce una disminución significativa en los ratones SAMP8 de 12 meses, en comparación con los valores registrados en CCs de los ratones de 2 y de 6 meses.

3.2.-Secreción de catecolaminas estimulada por ACh

Para realizar el estudio de liberación cuantales de catecolaminas inducida por ACh, cada célula registrada fue superfundida con una solución KH conteniendo 2 mM Ca^{2+} durante varios minutos (en los cuales no se observó ningún o casi ningún evento amperométrico) y, a

continuación, fue estimulada una única vez, durante 1 minuto, con una solución KH que contenía 100 μM de ACh. Al finalizar este tiempo de estimulación, se perfundió de nuevo la célula con la solución KH y se registró la actividad amperométrica durante otros 2 min adicionales. Los datos obtenidos en estos experimentos están representados en la **Figura 34**.

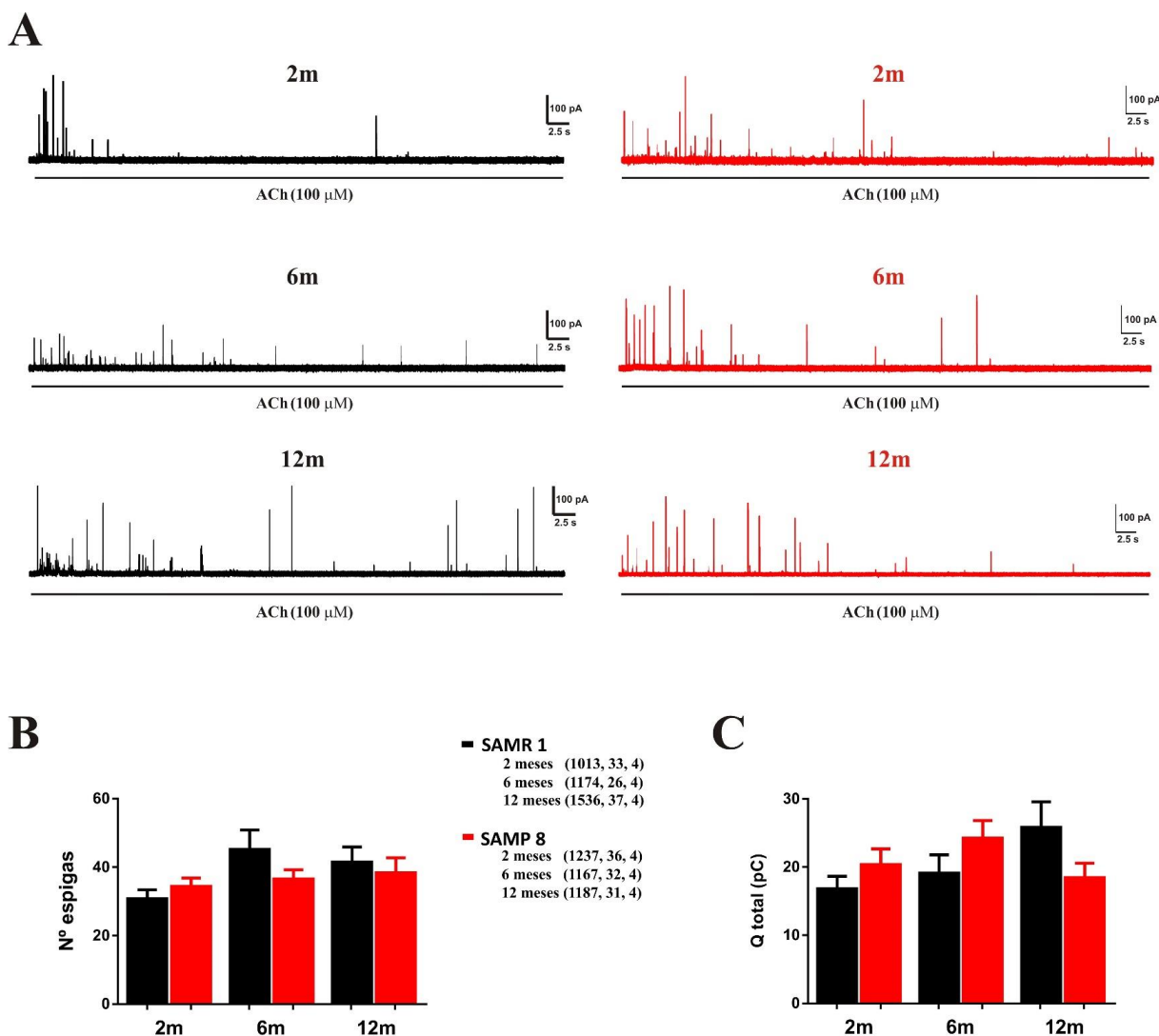


Figura 34. Secreción de catecolaminas en respuesta a la aplicación de un pulso con ACh (100 μM) en CCs de ratones SAMR1 y SAMP8. A Registros amperométricos representativos de la liberación de catecolaminas en respuesta a 1 min de estimulación con ACh (100 μM) en CCs de ratones SAMR1 (trazos negros) y SAMP8 (trazos rojos) de 2, 6 y 12 meses. **B** Número de espigas amperométricas registradas durante el minuto de estimulación. **C** Cantidad total de catecolaminas liberadas (área bajo la curva de todas las espigas de cada registro; representado en pC) durante el minuto de estimulación. Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de espigas, de células y de ratones entre paréntesis (U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

En la **Figura 34A** se muestran seis ejemplos representativos de registros amperométricos obtenidos en respuesta a la estimulación con un minuto de ACh en CCs de ratones SAMR1 (en

negro) y SAMP8 (en rojo) de 2, 6 y 12 meses. En esta figura se puede observar cómo las células de los ratones SAMR1 presentan una secreción muy similar a los 2, 6 y 12 meses, presentando una mayor actividad secretora durante los primeros 20 segundos de estímulo y decayendo progresivamente. Este similar perfil secretor que se observa a todas las edades estudiadas se corrobora al analizar el número total de espigas amperométricas (vesículas liberadas) contabilizadas durante los registros (**Figura 34, B**), siendo éste similar a los 2 ($30,8 \pm 2,6$ vesículas), 6 ($45,2 \pm 5,7$ vesículas) y 12 meses ($41,5 \pm 4,3$ vesículas). Tampoco se observan variaciones significativas al analizar la cantidad total de catecolaminas secretadas (**Figura 34, C**) en CCs de ratones SAMR1 de 2 ($16,8 \pm 1,8$ pC), 6 ($19,1 \pm 2,7$ pC) y 12 meses ($25,9 \pm 3,7$ pC).

Con respecto a los ratones SAMP8 también se observa un perfil secretor caracterizado por una mayor secreción durante los primeros 20 segundos de estímulo que va decayendo progresivamente. No se observan cambios significativos en la secreción de catecolaminas a lo largo de la edad, ni en comparación con los ratones SAMR1 (**Figura 34, A**). Esto se corrobora con el número de espigas amperométricas contabilizadas durante los registros (**Figura 34, B**), que es similar en CCs de ratones de 2 ($34,4 \pm 2,5$ vesículas), 6 ($36,5 \pm 2,7$ vesículas) y 12 meses ($38,3 \pm 4,4$ vesículas). Finalmente, tampoco se aprecian diferencias en la carga total de catecolaminas secretadas por CCs de animales de 2 ($20,4 \pm 2,3$ pC), 6 ($24,2 \pm 2,6$) y 12 meses ($25,9 \pm 3,7$) (**Figura 34, C**).

Como en el caso de la secreción inducida por K^+ , las posibles diferencias en el perfil secretor de catecolaminas a cada edad se podrían poner mejor de manifiesto representando la secreción acumulada a intervalos de 5 segundos, como se representa en la **Figura 35**. En esta gráfica, no se observaron diferencias significativas entre los patrones de secreción registrados en CCs de ratones SAMR1 a las diferentes edades estudiadas (ni en el número de espigas, ni en la carga acumulada, **Figuras 35, A y B**). En todos los casos el patrón de secreción producido por la aplicación del estímulo con ACh se caracteriza por presentar una mayor actividad secretora durante los primeros 20 segundos del estímulo, si bien se siguen liberando vesículas durante el resto del estímulo, de manera muy similar a todas las edades.

Estos mismos patrones de secreción se observan en CCs de ratones SAMP8 estimuladas con ACh, esto es, no se aprecian diferencias significativas entre los registros obtenidos en células de ratones de las diferentes edades estudiadas, ni en el número de espigas liberadas (**Figura 35, C**) ni en la carga total acumulada (**Figura 35, D**) a intervalos de 5 segundos.

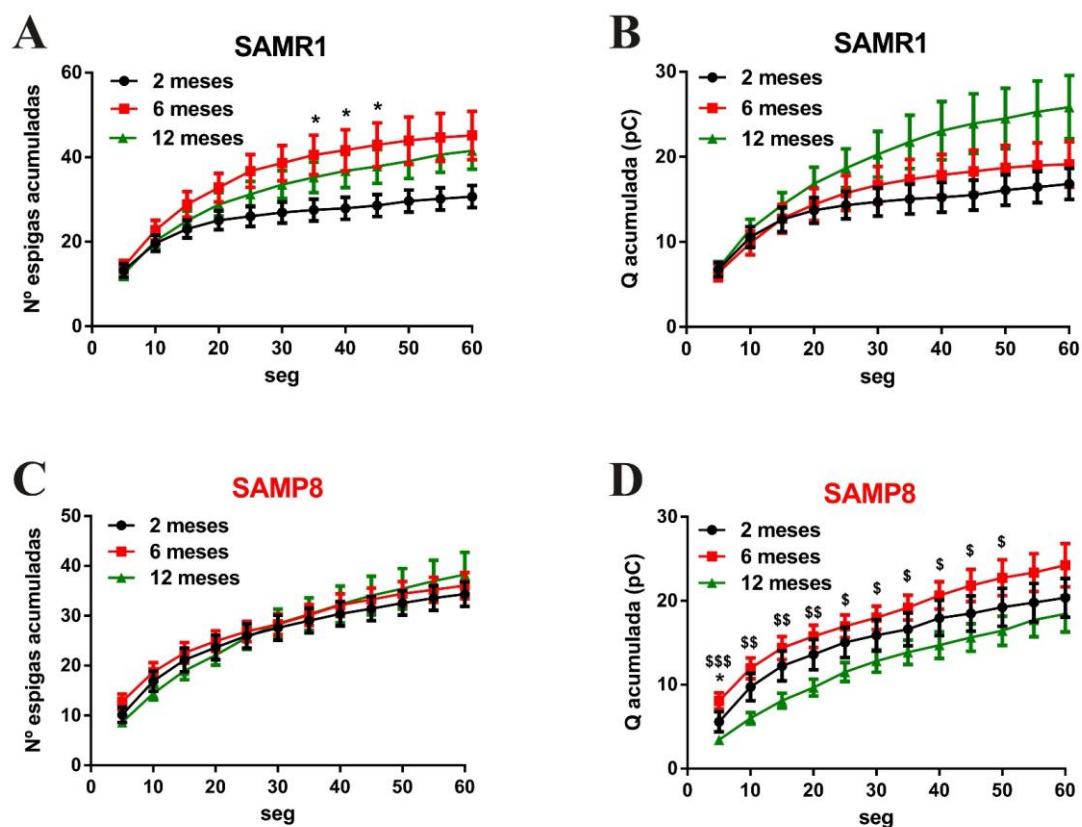


Figura 35. Secreción acumulada de catecolaminas en respuesta a ACh (100 μ M) medida a intervalos de 5 segundos. A y C Número de espigas acumuladas cada 5 segundos a los 2, 6 y 12 meses de las CCs de los ratones SAMR1 (A) y SAMP8 (C). **B y D** Carga total acumulada cada 5 segundos a los 2, 6 y 12 meses de las CCs de los ratones SAMR1 (B) y SAMP8 (D). Los datos son medias \pm EEM del número de células y número de ratones indicados entre paréntesis en la **Figura 34**. * $p < 0,05$ en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses (en ambas cepas) \$ $p < 0,05$ \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ en los ratones de 12 meses en comparación con los de 6 meses (en la cepa SAMP8) (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

3.2.1.-Análisis cinético de los eventos exocitóticos únicos en respuesta a ACh

Al igual que hicimos con la secreción estimulada con K^+ , hemos analizado las características cinéticas de los eventos exocitóticos únicos liberados tras el estímulo de ACh (100 μ M). Al analizar estos parámetros cinéticos (**Figura 36**), se observaron cambios muy similares a los observados con el estímulo de K^+ .

Con respecto a la amplitud (I_{max}) de la espiga amperométrica, se observa una ligera disminución de ésta con la edad en ambas cepas (**b1**), si bien las diferencias entre los valores registrados en animales de 2 y 12 meses no parecen ser significativas. La velocidad de crecimiento de la espiga se reduce significativamente en ratones SAMR1 entre los 2 y los 6 meses de edad, mientras que las variaciones en este parámetro son significativas entre los 6 y los 12 meses en los ratones SAMP8 (**b2**).

En el caso de los ratones SAMR1, se ve un claro aumento de la duración de la espiga (base, **b₃**), y del tiempo de caída (**b₄**) y, por ello, de la anchura de la espiga (**b₅**) a lo largo de la edad. En el caso de los ratones SAMP8 también se aprecia este aumento en la duración de la espiga (**b₃**), pero no en el tiempo de caída ni en la anchura de la misma (**Figura 36**).

Por último, en cuanto al contenido cuantitativo de cada espiga individual (Q_{espiga}), no se observan cambios significativos en ninguna de las cepas entre los 2 y los 12 meses, aunque sí se observan cambios a los 6 meses (**Figura 36, b₆**).

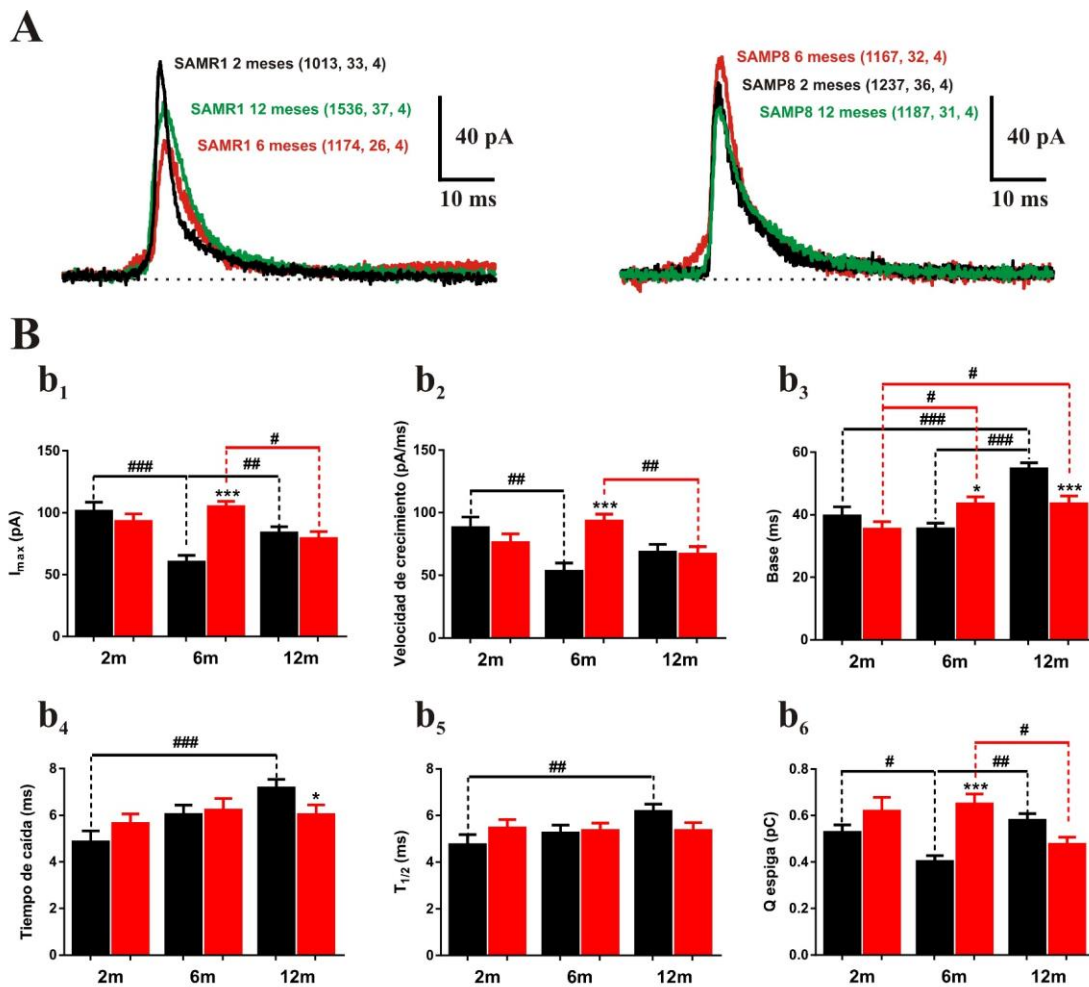


Figura 36. Ejemplos representativos y parámetros cinéticos de las espigas amperométricas liberadas en respuesta a ACh (100 μ M). **A** Ejemplos representativos de las espigas amperométricas medias de CCs de ratones SAMR1 (izquierda) y SAMP8 (derecha) a los 2 (trazo negro), 6 (trazo rojo) y 12 meses (trazo verde). **B** Parámetros cinéticos de las espigas amperométricas de los ratones SAMR1 (barras negras) y SAMP8 (barras rojas) a lo largo de la edad. A saber; **b₁ I_{max}**: altura de la espiga; **b₂ Velocidad de crecimiento**: calculada con la pendiente de la fase de crecimiento de la espiga; **b₃ Base de la espiga**: duración de la espiga; **b₄ tiempo de caída**: obtenido con el tiempo entre el 75 y el 25% de la altura de la espiga en la fase de descenso; **b₅ t_{1/2}**: anchura de la espiga al 50% de su altura; **b₆ Q**: área de la espiga. Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de espigas, células y ratones indicado entre paréntesis. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ en los ratones de la cepa SAMP8 en comparación con los de la cepa SAMR1 (U de Mann-Whitney). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

3.3.-Efectos del envejecimiento sobre la formación del poro de fusión

Previamente a que se fusione completamente la membrana de las vesículas con la membrana plasmática y se produzca la exocitosis del neurotransmisor contenido en la vesícula, puede tener lugar una pequeña liberación de neurotransmisor como resultado de una primera fusión parcial transitoria entre ambas (véase en Materiales y Métodos **figura 18, paso 2**). La pequeña cantidad de catecolaminas que pueden ser liberadas durante estos eventos “pre-excitóticos” también se oxidan y producen lo que se denomina "pie de espiga", que se observa en los registros amperométricos como una pequeña elevación de la corriente, cuyas características cinéticas podemos analizar.

No en todos los casos las espigas amperométricas presentan el “pie de espiga”, por lo que nos pareció interesante intentar caracterizar si la aparición de éste se pudiera ver afectada durante el envejecimiento. Para ello, se contabilizó el porcentaje de espigas que presentan “pie” en ambas cepas a todas las edades (**Figura 37**) y se analizaron varios parámetros cinéticos de este pie de espiga, a saber: T_{pie} , que es la duración del pie e indica el tiempo que se requiere para que el poro se estabilice antes de su expansión completa; I_{pie} y Q_{pie} , que son la amplitud (altura) y la carga del pie respectivamente, y que representan la cantidad de catecolaminas liberadas durante este periodo de fusión transitoria (**Figura 37, panel a₁**) (Zhou *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 2008; Zhang y Jackson, 2010).

Como puede apreciarse en la **Figura 37A**, no se observaron diferencias en el porcentaje de espigas con “pie” a lo largo de la edad ni tampoco entre ambas cepas, manteniéndose alrededor del 30-40 % tanto cuando la exocitosis se estimuló con K^+ (**a₂**) como cuando se estimuló con ACh (**a₃**).

Cuando se analizan los cambios en los parámetros cinéticos del “pie de espiga” inducido por los estímulos de K^+ (**Figura 37, B**) se puede observar que, en el caso de los ratones SAMR1, hay una disminución de la altura del “pie” (**b₁**) a lo largo de la edad, sin que se afecte la duración del pie (**b₂**), lo que se traduce en una reducción de la cantidad de catecolaminas liberadas en este periodo (**b₃**). En el caso de los ratones SAMP8, éstos no muestran una variación significativa de la altura del pie con la edad (**b₁**), pero sí que se reduce el tiempo del mismo (**b₂**), con lo que también se reduce la carga total del pie (**b₃**). Datos similares se obtienen al analizar el pie de espiga en respuesta a la estimulación con ACh (**Figura 37, C**).

Estos datos indicarían que durante el envejecimiento no se producen cambios en el porcentaje de espigas que presentan “pie de espiga”, si bien durante éste se produce una menor liberación de catecolaminas en ambas cepas de animales.

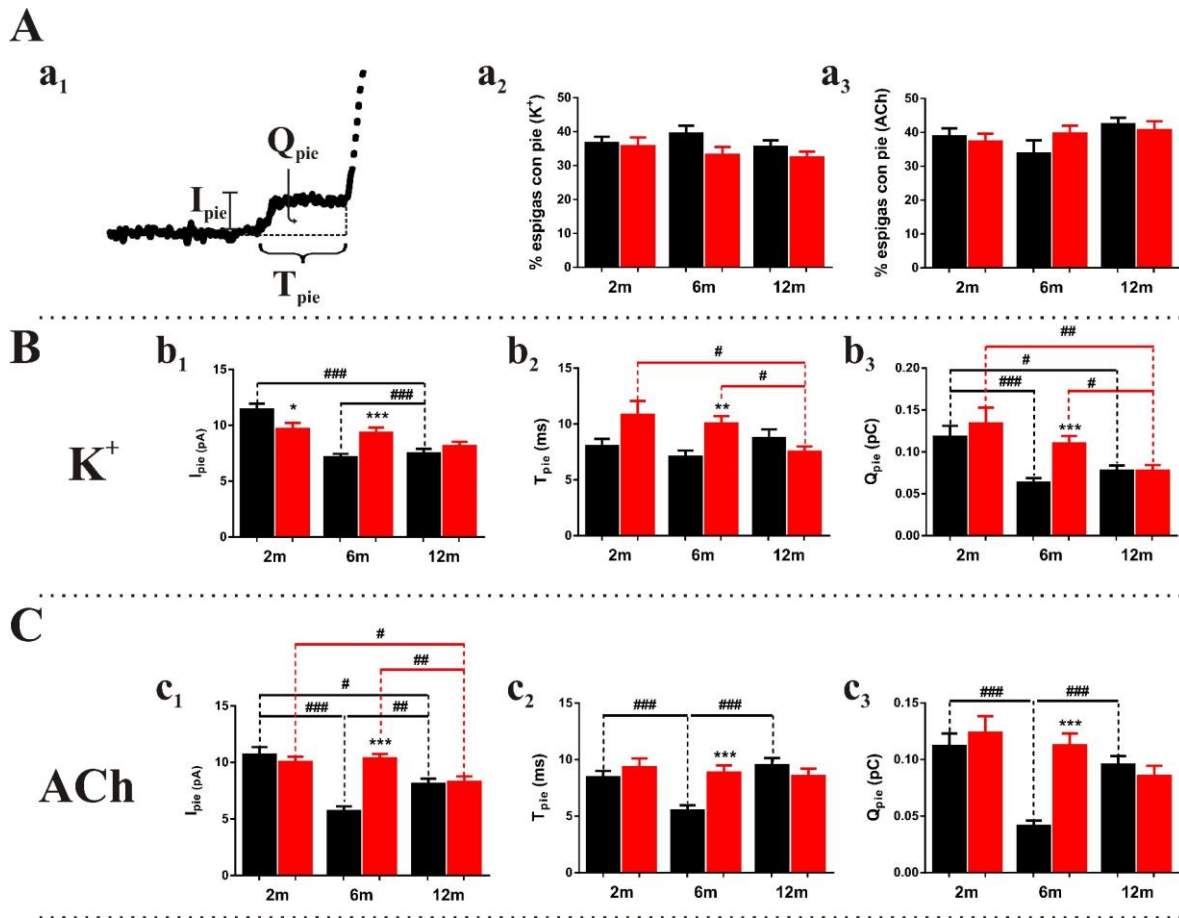


Figura 37. Número de espigas con pie y parámetros cinéticos del pie de espiga originadas en respuesta a K⁺ (70 mM) y ACh (100 μM). A Ejemplo de un “pie de espiga” y los parámetros medidos. **a₁** Ejemplo representativo de una espiga amperométrica con “pie” y los parámetros cinéticos medidos. **a₂** Porcentaje del número de espigas con “pie” en ratones SAMR1 (barras negras) y SAMP8 (barras rojas) inducidas por K⁺; **a₃** Porcentaje del número de espigas con “pie” en cada registro de los ratones SAMR1 (barras negras) y SAMP8 (barras rojas) inducidas por ACh. **B y C** Parámetros cinéticos del “pie” de las espigas amperométricas de los ratones SAMR1 (barras negras) y SAMP8 (barras rojas) K⁺ (**B**) o ACh (**C**). **b₁** y **c₁** *I*_{pie}: representa la amplitud (altura) del “pie de espiga”; **b₂** y **c₂** *t*_{pie}: representa la duración del “pie de espiga” y, **b₃** y **c₃** *Q*: representa la carga del “pie de espiga” (área bajo el “pie”). * *p* < 0,05; ** *p* < 0,01; *** *p* < 0,001 en los ratones de la cepa SAMP8 en comparación con los de la cepa SAMR1 (U de Mann-Whitney). # *p* < 0,05; ## *p* < 0,01; ### *p* < 0,001 en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

3.4.-Efectos del envejecimiento sobre otros eventos exocitóticos

El poro de fusión es inicialmente inestable y, por lo tanto, en vez de expandirse y producir la secreción total del contenido vesicular, puede liberar una pequeña cantidad de dicho contenido y volver a cerrarse produciéndose el denominado parpadeo (o también conocido como “flickering” o “kiss and run”) (Zhou *et al.*, 1996; Zhang y Jackson, 2010). Por otro lado, cuando un estímulo produce una elevación excesiva de la [Ca²⁺]_c (como suele ocurrir con el estímulo

de K^+), se produce una secreción masiva y aumenta la probabilidad de que se solapen eventos exocitóticos cerca de la fibra de carbono. A la coincidencia en el tiempo de dos o más espigas, sin dejar que termine la exocitosis de la anterior, se le denomina “espiga múltiple” (Amatore *et al.*, 2009).

En los estudios amperométricos realizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos cuantificado estos dos tipos de eventos exocitóticos, el “flickering” o parpadeo y las espigas múltiples. La contabilización de estos eventos exocitóticos inducidos por ambos estímulos (K^+ y ACh) en los ratones SAMR1 y SAMP8, no mostró diferencias significativas ni a lo largo de la edad ni entre las diferentes cepas.

4.-POTENCIAL DE MEMBRANA Y POTENCIALES DE ACCIÓN DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Una vez conocidas las posibles alteraciones en la actividad de los distintos canales iónicos que participan en el proceso de acoplamiento estimulación-secreción en la célula cromafín adrenomedular, el siguiente paso será analizar si estas alteraciones afectan a la excitabilidad celular resultante de la integración de la actividad de todos estos canales iónicos. Asimismo, si existiesen también cambios en la excitabilidad celular, éstos podrían estar relacionados con las posibles alteraciones encontradas en la secreción.

Para ello, recurrimos a la técnica de “patch-clamp”, en su modalidad de fijación de corriente (current-clamp) y la configuración de célula entera, para caracterizar los posibles cambios en el potencial de membrana de la célula y en el disparo de potenciales de acción que pudieran acontecer en relación con el envejecimiento.

4.1.- V_m en reposo y disparo de PAs espontáneos

Como se comentaba en el apartado de Materiales y Métodos, todas las células poseen una diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular que se denomina potencial de membrana (V_m). En las CCs murinas este V_m sufre pequeñas variaciones que, cuando llegan al umbral de disparo, generan PAs en una actividad denominada espontánea. Pequeños cambios en el V_m en reposo, pueden suponer enormes cambios en la excitabilidad celular conforme se aleje o acerque al potencial umbral de disparo de los PAs.

La **Figura 38** muestra los resultados obtenidos en este estudio al registrar el V_m y el número de PAs espontáneos durante un periodo de 5 minutos en reposo, sin aplicar ningún tipo de

estímulo. Los datos obtenidos muestran que, durante el envejecimiento, las CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8 sufren una ligera hiperpolarización del V_m .

En el caso de los ratones SAMR1, el V_m a los 2 meses de edad presenta un valor medio de $-58,3 \pm 1,5$ mV, hiperpolarizándose hasta valores de $-61 \pm 1,3$ mV a los 6 meses, y de $-64,7 \pm 1,5$ mV a los 12 meses ($p < 0,05$ con respecto a 2 meses; **Figura 38, B**). El V_m en reposo de los ratones SAMP8 no mostró diferencias significativas con los valores obtenidos en SAMR1 a ninguna de las edades estudiadas. En esta cepa también se observó una ligera hiperpolarización con la edad, con valores de $-58,9 \pm 1,7$ mV a los 2 meses, $-62,6 \pm 1,8$ mV a los 6 meses y $-65 \pm 1,4$ mV a los 12 meses ($p < 0,05$ con respecto a 2 meses; **Figura 38, B**).

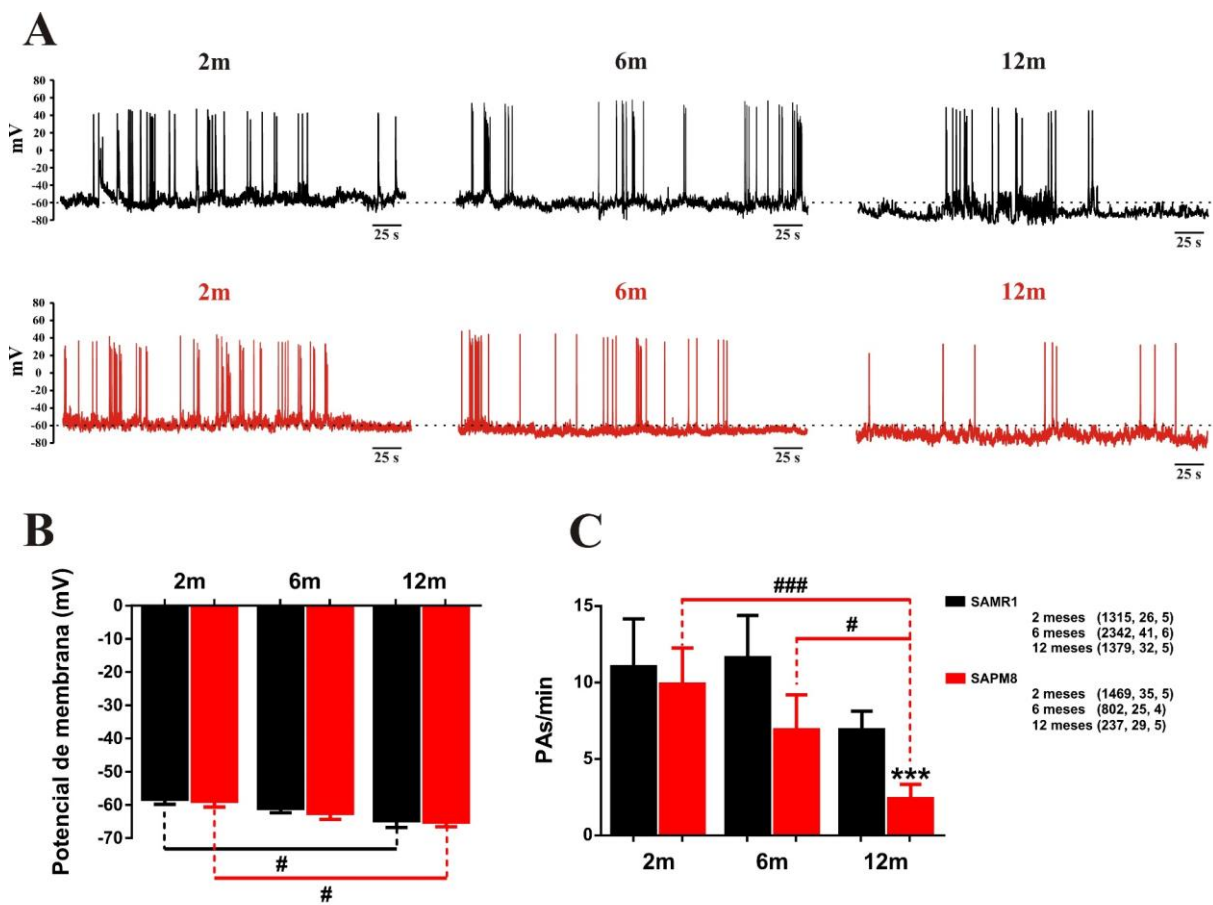


Figura 38. Potencial de membrana en reposo durante el envejecimiento de los ratones SAMR1 y SAMP8. A Ejemplos representativos del potencial de membrana (V_m) en reposo registrado durante 5 minutos en los ratones SAMR1 (trazo negro) y SAMP8 (trazo rojo) de 2, 6 y 12 meses de edad. **B** V_m medio (en mV) de las CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8 de 2, 6 y 12 meses de edad. **C**) Número de potenciales de acción espontáneos contabilizados durante los 5 minutos de registro del V_m en las CCs de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2, 6 y 12 meses de edad. Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de potenciales de acción, células y ratones indicado entre paréntesis. *** $p < 0,001$ en los ratones de la cepa SAMP8 en comparación con los de la cepa SAMR1 (U de Mann-Whitney). # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

Esta ligera hiperpolarización trae consigo una disminución en el disparo de potenciales de acción espontáneos (medido como PAs/min), desde valores de $11,1 \pm 3,1$ (SAMR1) y $9,9 \pm 2,3$ (SAMP8) a los 2 meses, hasta valores de $6,9 \pm 1,2$ (SAMR1) y $2,4 \pm 0,5$ (SAMP8) a los 12 meses, siendo de destacar que solo en el caso de los ratones SAMP8 las diferencias observadas a los 12 meses fueron estadísticamente significativas con respecto a las edades de 2 y 6 meses (**Figura 38, C**). Nótese que la disminución en el número de potenciales de acción que ocurre en los ratones SAMP8 a los 6 meses es similar a la observada en ratones SAMR1 a los 12 meses. Estos datos indican que se produce una reducción gradual en la excitabilidad basal de las CCs de ambas cepas, si bien ésta se manifiesta antes en los ratones SAMP8, en comparación con los SAMR1.

4.1.1.-Umbral de disparo de los PAs

El punto clave para generar o no un potencial de acción lo encontramos en el umbral de disparo. Toda aquella variación del V_m producida espontáneamente o por un estímulo que no sea capaz de superar el potencial umbral, quedará abocada al fracaso en la generación de PAs.

Es por ello que, para dilucidar si la ligera hiperpolarización del V_m (que se produce a lo largo de la edad) es la responsable de la reducción en el número de PAs espontáneos o lo es alguna alteración en el potencial umbral, analizamos la evolución de este último en ambas cepas a las diferentes edades.

La **figura 39** muestra cómo durante el envejecimiento se produce una hiperpolarización del potencial umbral (señalado con la línea discontinua verde) en las CCs de ambos tipos de ratones. En el caso de los ratones SAMR1 el potencial umbral a los 2 es de $-36,3 \pm 0,9$ mV), hiperpolarizándose éste a los 6 meses (de $-38,7 \pm 0,7$ mV) y algo más a los 12 meses ($-42 \pm 1,4$ mV; $p < 0,01$ con respecto al valor a los 2 meses). Con respecto a los ratones SAMP8, se observa también este efecto de hiperpolarización del potencial umbral, si bien éstas diferencias ya son significativas desde los 6 meses de edad ($-35,7 \pm 1,2$ mV a los 2 meses; $-41,5 \pm 1,3$ mV a los 6 meses y $-40 \pm 0,7$ mV a los 12 meses).

Estos resultados indican que a medida que el V_m se hiperpolariza ($\approx 5-7$ mV) a lo largo de la edad, lo hace también el potencial umbral ($\approx 5-7$ mV).

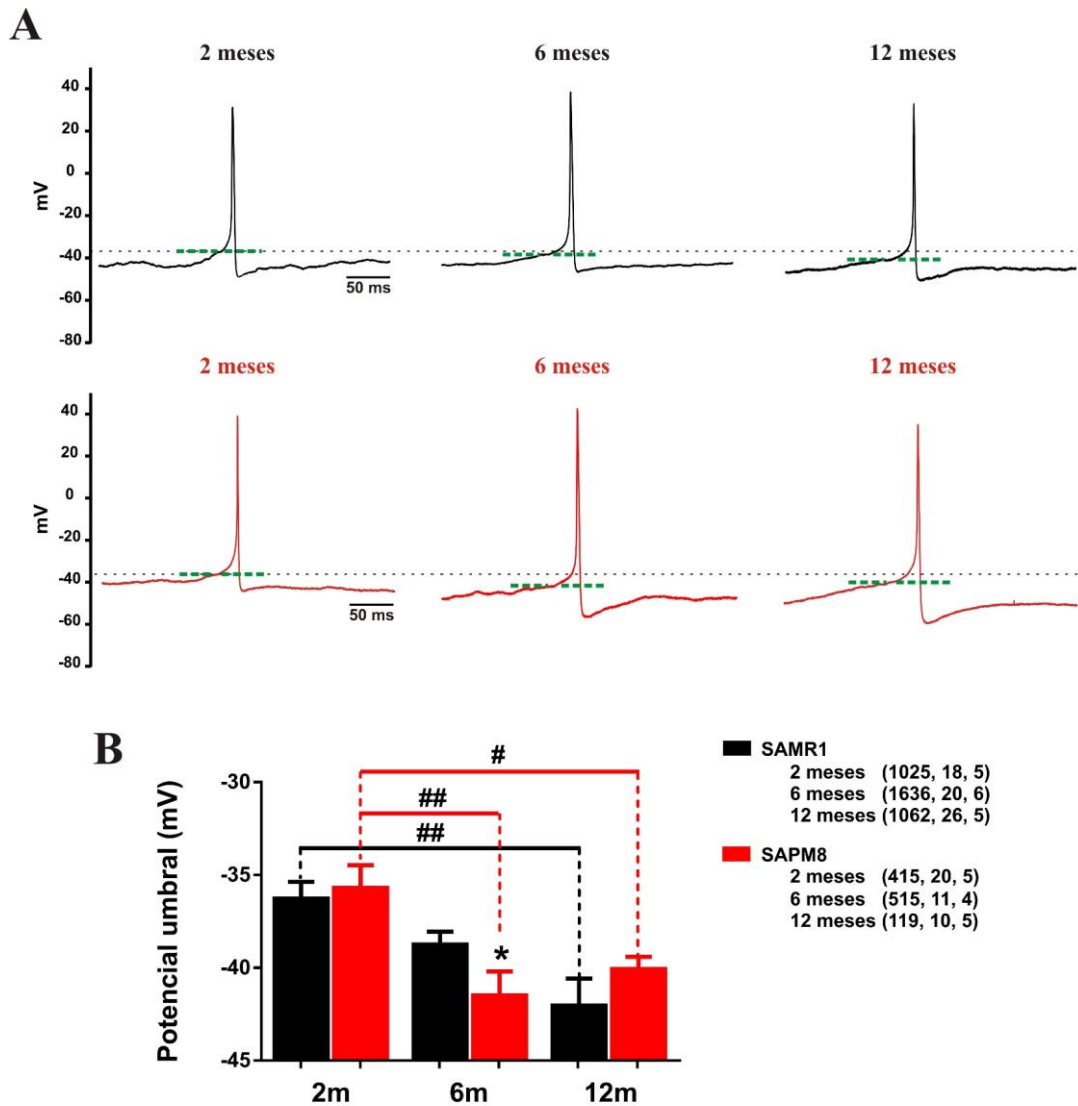


Figura 39. Potencial umbral para el disparo de PAs. A) Ejemplos representativos del potencial umbral medio (resaltado con la línea discontinua verde) al que disparan PAs las CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8. B) Valores medios del potencial umbral en las dos cepas de ratones. * $p < 0,05$ en los ratones de la cepa SAMP8 en comparación con los de la cepa SAMR1 (U de Mann-Whitney). Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de potenciales de acción, células y ratones entre paréntesis. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

4.1.2.-Análisis cinético de los PAs espontáneos

Para el análisis estadístico de estos resultados se obtuvieron los valores de la media para cada parámetro de los PAs detectados durante los 5 minutos de registro del V_m en reposo (según se describe en el apartado de Materiales y Métodos). La **Figura 40** recoge los principales hallazgos obtenidos en este análisis de PAs espontáneos.

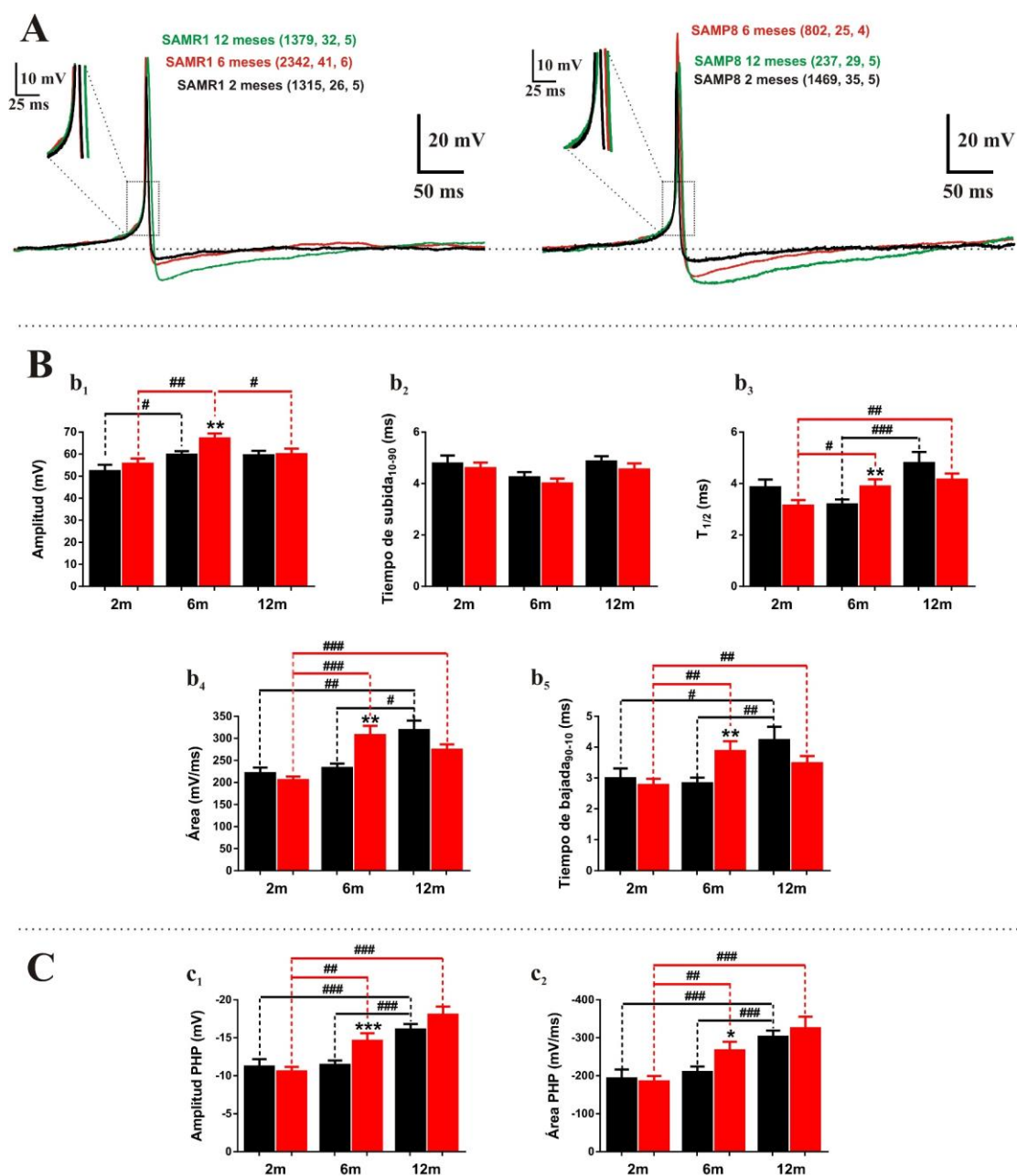


Figura 40. Análisis cinético de los potenciales de acción espontáneos. A Ejemplos representativos del PA promedio de los ratones SAMR1 (izquierda) y SAMP8 (derecha) a los 2 (trazo negro), 6 (trazo rojo) y 12 meses (trazo verde). B Parámetros cinéticos medios de la fase de despolarización del PA de ratones SAMR1 y SAMP8: **b₁** amplitud del PA; **b₂** tiempo de subida desde el 10 al 90% del PA; **b₃** t_{1/2} del PA; **b₄** área del PA; **b₅** tiempo de bajada del 90 al 10% del PA. C Parámetros cinéticos medios de la fase de hiperpolarización del PA de los ratones SAMR1 y SAMP8: **c₁** amplitud de la post-hiperpolarización (PHP); **c₂** área de la post-hiperpolarización (PHP). Los datos corresponden a la media ± EEM del número de potenciales de acción, células y ratones indicado entre paréntesis. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 en los ratones de la cepa SAMP8 en comparación con los de la cepa SAMR1 (U de Mann-Whitney). # p < 0,05; ### p < 0,01; #### p < 0,001 en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

Como se puede observar en la **Figura 40B**, la amplitud de los PAs aumenta significativamente desde los 2 a los 6 meses en ambas cepas, siendo mayor este aumento en los SAMP8 (**b₁**), sin embargo, a la edad de 12 meses la amplitud del PA recupera los valores que

presentaba a los 2 meses. No se han encontrado diferencias en la velocidad de la fase de despolarización del PA (\mathbf{b}_2) durante el envejecimiento ni entre cepas.

Donde sí que se han observado claras diferencias a lo largo de la edad en ambas cepas es en tres parámetros que están relacionados muy relacionados entre sí como son la anchura o $t_{1/2}$ del PA (\mathbf{b}_3), el tiempo de caída (\mathbf{b}_5) y el área del PA (\mathbf{b}_4), parámetros que son dependientes de las corrientes de Ca^{2+} y K^+ . Así, durante el envejecimiento se produce un incremento de los valores de estos tres parámetros, si bien estas variaciones se observan a los 12 meses en los ratones SAMR1 mientras que ya son patentes a los a los 6 meses en los SAMP8 (manteniéndose las diferencias en ratones de 12 meses).

Quizás el cambio más notable que se aprecia en los parámetros cinéticos de los PAs espontáneos son los que se producen en la fase de hiperpolarización del mismo (**Figura 40, C**). En esta fase, se observa un aumento claro tanto de la amplitud (\mathbf{c}_1) como del área (\mathbf{c}_2) de la post-hiperpolarización a lo largo de la edad, siendo ésta significativa en ambas cepas de ratones, si bien, como ocurre con otros parámetros estos cambios se observan a los 12 meses en el caso de los ratones SAMR1, mientras que ya son patentes a los 6 meses en los SAMP8 (manteniéndose a los 12 y duplicando casi los valores registrados en ratones de 2 meses).

4.2.- V_m y PAs en respuesta a la estimulación con K^+ o ACh

Como se describe más adelante, la respuesta secretora de catecolaminas de las CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8 muestran ciertas diferencias en función del estímulo utilizado para inducir la exocitosis (estimulación “fisiológica” con ACh o aplicación de un estímulo químico con soluciones conteniendo alto K^+). Por ello, en este punto nos planteamos caracterizar si estos dos tipos de estimulación pudieran estar produciendo alteraciones en la excitabilidad de las CCs que justificasen esa diferente respuesta secretora. Para ello registramos los posibles cambios en el V_m y en el disparo de PAs en respuesta a la aplicación de ACh o K^+ . En estos experimentos, ambos secretagogos se superfundieron durante 1 minuto.

4.2.1.-Variaciones en el V_m en respuesta a la estimulación con K^+

La aplicación extracelular de una solución conteniendo una alta concentración de K^+ va a producir un cambio en el potencial de equilibrio de este ión con lo que, dada la predominancia de este ion para regular el V_m , se produce una fuerte despolarización del potencial de membrana.

Como muestra la **Figura 41A**, la superfusión de las CCRs de los ratones SAM con una solución de KH conteniendo 70 mM de K^+ (con reducción isoosmolar de Na^+) produce una rápida despolarización del V_m , que se mantiene mientras perdure la aplicación del pulso de K^+ .

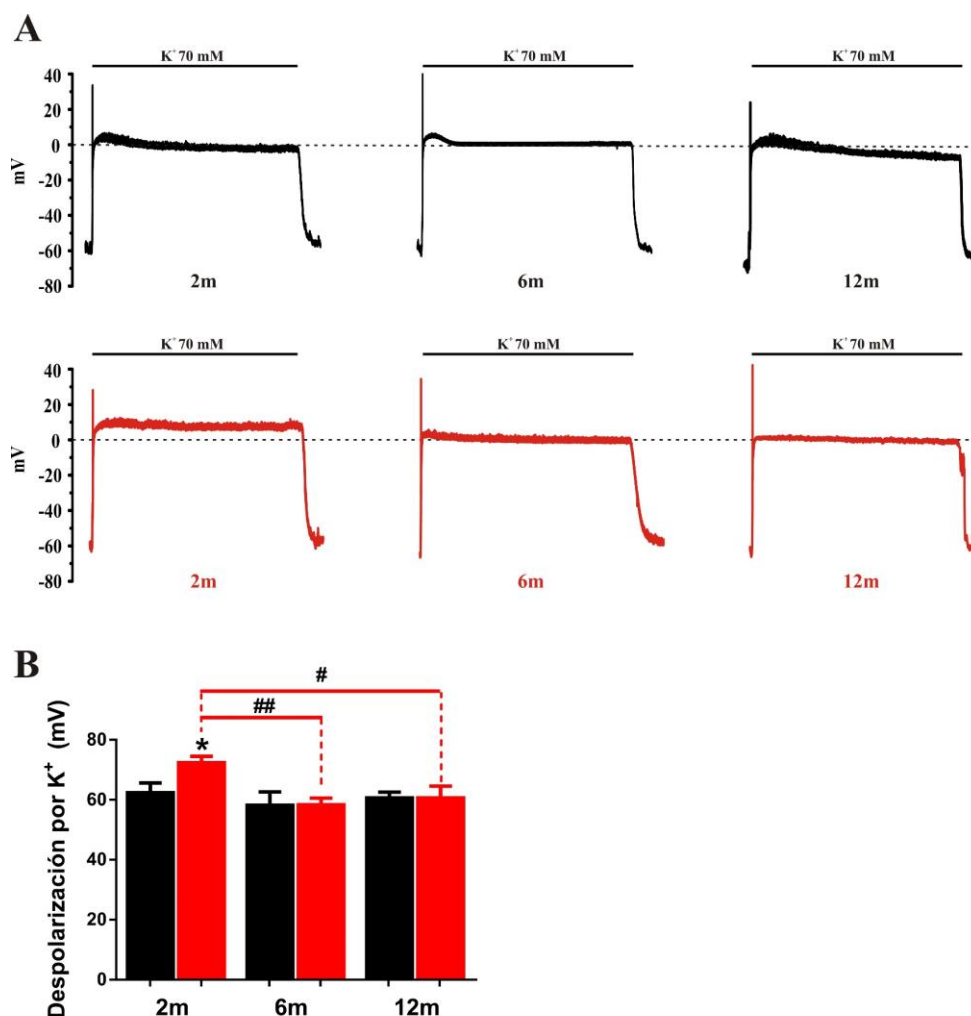


Figura 41. Despolarización producida por K^+ en CCs de ratones SAMR1 y SAMP8. **A** Ejemplos representativos del V_m y su modificación en respuesta a la aplicación de un pulso con K^+ (70 mM) durante 1 minuto en CCS de ratones SAMR1 (trazo negro) y SAMP8 (trazo rojo) de 2, 6 y 12 meses de edad. **B** V_m medio (mV) de la despolarización máxima producida por el pulso de K^+ en CCs de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2, 6 y 12 meses de edad. Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de células indicadas en el texto. * $p < 0,05$ en los ratones de la cepa SAMP8 en comparación con los de la cepa SAMR1 (U de Mann-Whitney). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

Los datos representados en la **figura 41** indican que durante el envejecimiento de los ratones SAMR1, no se aprecian diferencias en el grado de despolarización inducida por el K^+ en las CCs, siendo ésta similar a las tres edades estudiadas ($62,4 \pm 3,3$ mV a los 2 meses ($n=13$), $58,2 \pm 44$ mV a los 6 meses ($n=30$) y $60,7 \pm 1,9$ mV a los 12 meses ($n=23$)). En el caso de los ratones SAMP8 se ha encontrado un ligero incremento en el grado de despolarización inducida por el K^+ en animales de 2 meses ($72,4 \pm 21$ mV, $n=26$) en comparación con la observada a los

6 ($58,3 \pm 2,3$ mV, $n=13$) y 12 meses ($60,6 \pm 3,9$ mV, $n=13$) y con los SAMR1 de 2 meses (**Figura 41B**).

4.2.2.-Variaciones en el V_m en respuesta a la estimulación con ACh

Como se ha comentado previamente, a diferencia de lo que ocurre con el K^+ , la aplicación de un estímulo “fisiológico” con ACh va a poner en marcha la activación y coordinación de los distintos canales iónicos implicados en el acoplamiento estímulo-secreción en la CCR, lo que va a condicionar un diferente patrón de despolarización/repolarización de las células.

Como muestra la **Figura 42A**, la superfusión de las CCRs de los ratones SAM con una solución de KH conteniendo $100 \mu\text{M}$ de ACh produce una rápida despolarización inicial del V_m , seguida de una fase de lenta repolarización durante la que se pueden generar PAs.

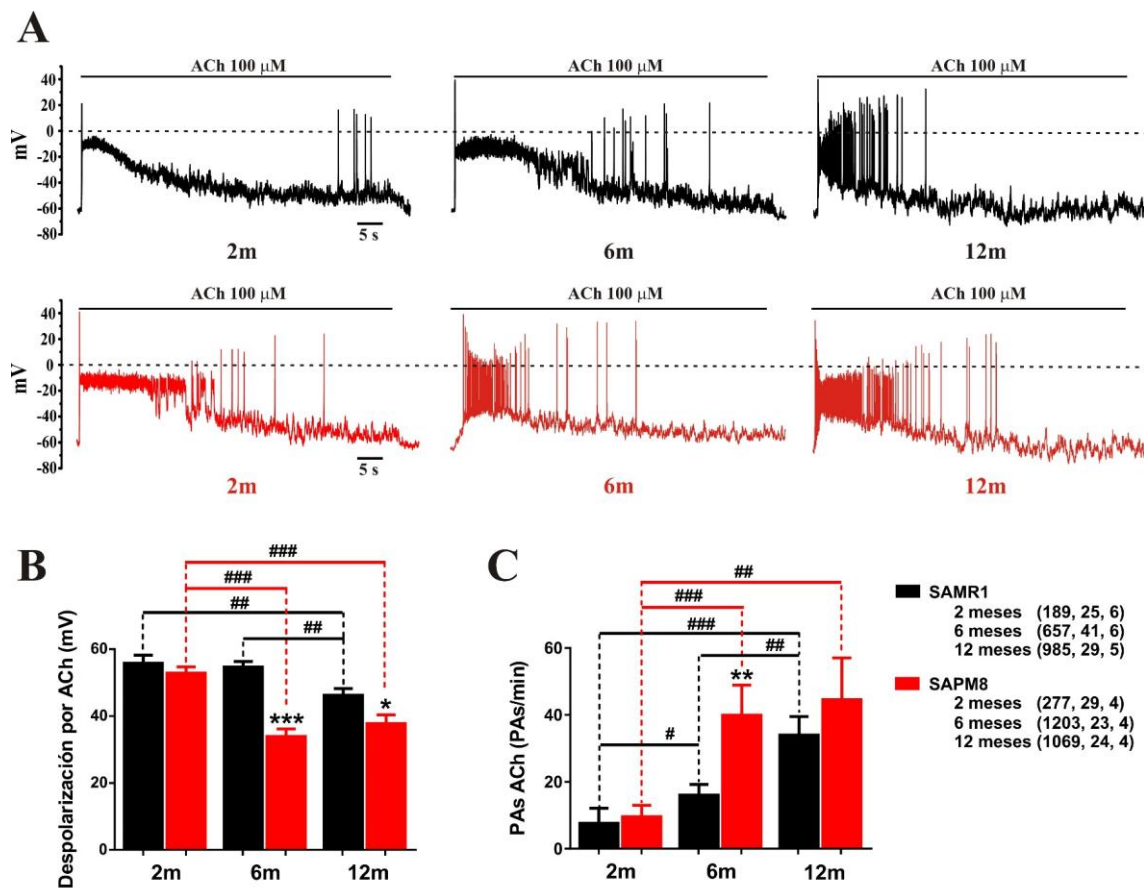


Figura 42. Efectos de la aplicación de un pulso con ACh en CCs de ratones SAMR1 y SAMP8. **A** Ejemplos representativos de los cambios en el V_m en respuesta a la aplicación de un pulso de ACh ($100 \mu\text{M}$, durante 1 minuto) en Ccs de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2, 6 y 12 meses de edad. **B** V_m medio (mV) de la despolarización máxima inducida por la ACh en las CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8 de 2, 6 y 12 meses de edad. **C** Número de PAs inducidos por el estímulo con ACh de las CCs de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2, 6 y 12 meses de edad. Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de PAs, células y ratones indicados entre paréntesis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ en los ratones de la cepa SAMP8 en comparación con los de la cepa SAMR1 (U de Mann-Whitney). ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

La **Figura 42A** muestra registros representativos mostrando el patrón de cambios en el V_m y de disparo de PAs que se produce tras la superfusión de CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8 con ACh (100 μ M) durante 1 minuto. Como puede observarse en todos los trazados, la ACh produce una rápida despolarización inicial. En el caso de los ratones SAMR1 se produce una despolarización similar en animales de 2 ($55,8 \pm 2,4$ mV) y 6 meses ($54,7 \pm 16$ mV), sin embargo, ésta es mucho menor en los animales de 12 meses ($46,2 \pm 1,9$ mV; **Figura 42B**). Esta menor despolarización inicial se observa también en los ratones SAMP8, pero en este caso la reducción ya es significativa en animales de 6 meses edad ($52,9 \pm 1,8$ mV a los 2 meses vs $33,9 \pm 2,3$ mV a los 6 meses, $p < 0,001$), manteniéndose esta reducción del grado de despolarización en ratones de 12 meses ($37,7 \pm 2,7$ mV, $p < 0,001$ en comparación con los animales de 2 meses).

El menor grado de despolarización en respuesta a la ACh que se observa con el envejecimiento de los animales curiosamente se acompaña de un incremento en la frecuencia de disparo de PAs, aumentando este parámetro en los ratones SAMR1 desde valores de $7,6 \pm 4,5$ PAs/min en animales de 2 meses hasta valores de $16 \pm 3,1$ PAs/min a los 6 meses y de $34 \pm 5,6$ PAs/min en animales de 12 meses ($p < 0,001$). Resultados similares se obtienen en los ratones SAMP8, en los que también la menor despolarización inicial inducida por la ACh se acompaña de un incremento en la frecuencia de disparo de PAs ($9,5 \pm 3,4$ PAs/min a los 2 meses, $39,9 \pm 9$ PAs/min a los 6 meses y $44,5 \pm 12,5$ PAs/min a los 12 meses).

4.2.3.-Análisis cinético de los PAs inducidos por el estímulo con ACh

El mecanismo por el que se produce la despolarización celular mediante la superfusión con una solución KH con alto K^+ no permite la repolarización del V_m por lo que va a resultar prácticamente imposible que la CCR pueda disparar PAs durante el minuto de aplicación de dicho estímulo. Por el contrario, en el caso de la aplicación de la ACh, tras la rápida despolarización inicial se produce una fase en la que el V_m tiende a recuperar valores más negativos, durante la cual, como muestra la **Figura 42**, se puede producir el disparo de PAs.

En este apartado hemos analizado (según se describe en el apartado de Material y Métodos) las principales características cinéticas de los PAs que se producen durante el periodo (1 min) de estimulación de las CCR con ACh. Los resultados correspondientes a este análisis se recogen en la **Tabla 2**.

Las modificaciones que se producen en la cinética de los PAs inducidos por la estimulación con ACh de las CCs de los ratones SAMP8 (**Tabla 2**) son muy similares a las observadas al analizar los PAs espontáneos (en ausencia de estimulación) que se registran en estas mismas células. Sin embargo, en los ratones SAMR1 algunos de estos cambios pierden la significancia estadística. Aun así, se observa un ensanchamiento y enlentecimiento de los PAs durante el envejecimiento.

Edad y cepa	Amplitud (mV)	Crecimiento 10-90 (ms)	Pendiente 10-90 (mV/ms)	Caída 90-10 (ms)	Pendiente 90-10 (mV/ms)	Área (mV.ms)	T _{1/2} (ms)	PHP (mV)	Área PHP (mV.ms)
SAMR1 (2m)	39.3 ± 4.2	6.0 ± 0.5	5.1 ± 0.9	3.3 ± 0.4	-12.2 ± 1.5	193 ± 14	4.9 ± 0.5	-10.3 ± 1.3	-170 ± 32
SAMR1 (6m)	36.4 ± 2.2	6.9 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.7 ± 0.4	-9.5 ± 1.6	221 ± 8	6.2 ± 0.5	-9.9 ± 0.9	-166 ± 12
SAMR1 (12m)	33.3 ± 2.2	7.4 ± 0.3	3.8 ± 0.3	5.1 ± 0.4	-6.6 ± 1.7 [#]	246 ± 16	7.7 ± 0.6 [#]	-11.3 ± 0.9	-191 ± 19
SAMP8 (2m)	38.4 ± 1.6	6.0 ± 0.2	4.9 ± 0.4	3.2 ± 0.4	-12.6 ± 1.4	185 ± 13	4.2 ± 0.3	-8.2 ± 0.9	-151 ± 14
SAMP8 (6m)	40.7 ± 2.3	6.2 ± 0.3 [*]	5.4 ± 0.5 [*]	4.4 ± 0.4	-10.4 ± 1.2	255 ± 16 ^{**}	5.9 ± 0.5 [*]	-12.5 ± 0.8 ^{**}	-214 ± 19
SAMP8 (12m)	31.1 ± 2.1 ^{ss}	6.6 ± 0.4 ^{#s}	3.5 ± 0.3 ^{#s}	4.7 ± 0.7	-7.3 ± 1.0 ^{###}	224 ± 14	7.5 ± 0.8 ^{###}	-13.0 ± 0.9 ^{###}	-234 ± 18 [#]

Tabla 2. Análisis cinético de los PAs producidos por la estimulación con ACh (100 µM). Se han analizado los siguientes parámetros cinéticos de la fase de despolarización del potencial de acción (a la izquierda de la línea de puntos) en ratones SAMR1 y SAMP8 (de izquierda a derecha): amplitud del PA; tiempo de subida desde el 10 al 90% del PA; pendiente de subida desde el 10 al 90% del PA; tiempo de caída del 90 al 10% del PA; pendiente de caída del 90 al 10% del PA; área del PA; t_{1/2}, anchura del PA medida al 50% del mismo. Igualmente se han analizado los parámetros cinéticos característicos de la fase de hiperpolarización del potencial de acción (a la derecha de la línea de puntos): amplitud de la post-hiperpolarización (PHP) y área de la post-hiperpolarización (PHP). Los datos mostrados corresponden a la media ± EEM del número de células y de ratones indicados en la **Figura 42C**. * p < 0,05; ** p < 0,01 en los ratones de 6 meses en comparación con los de 2 meses (en ambas cepas). # p < 0,05; ### p < 0,01; ### p < 0,001 en los ratones de 12 meses en comparación con los de 2 meses (en ambas cepas). ^s p < 0,05; ^{ss} p < 0,01 en los ratones de 12 meses en comparación con los de 6 meses (en ambas cepas) (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

4.3.-Efectos del envejecimiento sobre los PA inducidos eléctricamente

Como una tercera vía de aproximación para la caracterización de posibles alteraciones en la excitabilidad celular que acontecen a lo largo del envejecimiento, nos planteamos el estudio de los efectos de éste sobre los PAs provocados por la aplicación de pulsos eléctricos despolarizantes. Para ello, aplicamos pulsos de una intensidad de 20 pA y 200 ms de duración, a CCR a las que se les había inyectado previamente la corriente necesaria para mantener su V_m en un valor de -80 mV. En estas condiciones experimentales, la despolarización producida por la inyección de la corriente de 20 pA es suficiente para que el V_m supere el umbral de disparo de PAs. Se contabilizó el número de PAs generados en las CCs de ratones SAMR1 y SAMP8 a las tres edades estudiadas. Los datos obtenidos en esta serie de experimentos se recogen en la **Figura 43**.

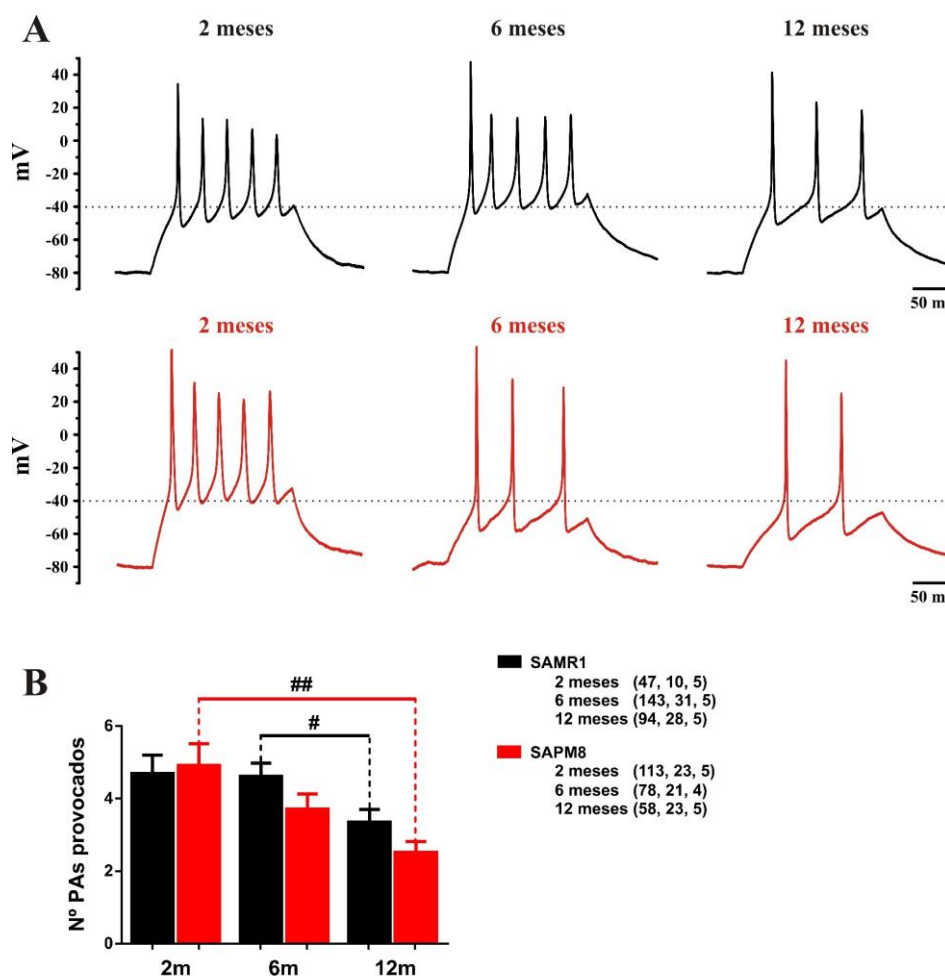


Figura 43. Potenciales de acción provocados por la inyección de corriente en ratones SAMR1 y SAMP8. A todas las células se les inyectó inicialmente la corriente suficiente para alcanzar un V_m de -80 mV. **A** Ejemplos representativos de PAs provocados por un estímulo de 20 pA de 200 ms de duración en CCs de ratones SAMR1 (trazo negro) y SAMP8 (trazo rojo) de 2, 6 y 12 meses de edad. **B** Número medio de PAs evocados por un estímulo eléctrico (20 pA, 200 ms) en las CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8 de 2, 6 y 12 meses de edad. Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de potenciales de acción, células y ratones indicado por paréntesis. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

Los datos obtenidos en estos experimentos muestran que las CCs de los ratones SAMR1 y SAMP8 generan un menor número de PAs en respuesta a la aplicación de un estímulo eléctrico (Figura 43). Este menor número de PAs provocados es significativo a los 12 meses en los ratones SAMR1, pasando de $4,7 \pm 0,5$ PAs y $4,6 \pm 0,4$ PAs a los 2 y 6 meses, respectivamente, a un valor de $3,4 \pm 0,3$ PAs a los 12 meses. Con respecto a los ratones SAMP8, se observa también una reducción del número de PAs evocados, si bien esta reducción ya es significativa a la edad de 6 meses, pasando de $4,9 \pm 0,6$ PAs a los 2 meses a $3,7 \pm 0,4$ y $2,5 \pm 0,3$ a los 6 y 12 meses respectivamente. Además, se puede observar también como aumenta la PHP de los PAs a las mismas edades, corroborando los datos de los PAs espontáneos anteriormente descritos.

5.-PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA EXOCITOSIS EN LOS RATONES SAMR1 Y SAMP8.

Las alteraciones en el poro de fusión durante el envejecimiento de los ratones SAMR1 y SAMP8, podrían estar relacionadas con los cambios observados en las corrientes iónicas y excitabilidad celular. Sin embargo, no se pueden descartar alteraciones en las proteínas implicadas directamente en el proceso de exocitosis, particularmente en la formación del poro de fusión, es decir, las proteínas del complejo SNARE (Jahn y Scheller, 2006). Es por ello que realizamos experimentos de “wester blot” para cuantificar las posibles variaciones en la expresión de estas proteínas durante el envejecimiento en ambas cepas de ratones SAM.

En esta parte del estudio hemos medido también los niveles de expresión del transportador vesicular de ACh (VACHT) y los niveles de proteína tau fosforilada (*p*-tau) en la corteza y el hipocampo, con el objetivo de valorar posibles alteraciones en el estado colinérgico del cerebro de los ratones (VACHT) y para comprobar si en nuestros ratones SAMP8 se produce una hiperfosforilación de tau que pudiera correlacionarse con el desarrollo de déficits cognitivos

Para realizar estos experimentos recogimos muestras de dos tejidos que se ven claramente afectados por patologías asociadas al envejecimiento, como son la corteza prefrontal y el hipocampo. Dada la escasez de muestra de médula adrenal, no se pudo utilizar dicho tejido en estos experimentos. Tanto en las muestras de corteza como del hipocampo se extrajeron y midieron proteínas totales. Como control de carga se empleó la β -actina, utilizada para normalizar las señales de las proteínas de interés.

En la **Figura 44** se pueden observar los resultados obtenidos en corteza prefrontal de ratones SAMR1 y SAMP8 de 2, 6 y 12 meses de edad. Como puede apreciarse en la misma, no se han encontrado diferencias significativas durante el envejecimiento de los animales, ni entre las dos cepas de animales en las proteínas del complejo SNARE analizadas (SNAP-25 y sintaxina 1) (**C y D**), ni en la proteína vesicular que actúa como sensor de Ca^{2+} (sinaptotagmina 1) (**E**), ni en la proteína implicada en la endocitosis (dinamina 1-2) (**F**), ni en el transportador vesicular de ACh (**G**). Por último, tampoco se han encontrado diferencias en la cantidad relativa de la proteína tau fosforilada (**H**). Esto se aprecia en los ejemplos representativos de los revelados de “western blot” de SNAP25 y pTau (Ser²⁰²/Thr²⁰⁵), donde la intensidad de las bandas no varía durante el envejecimiento.

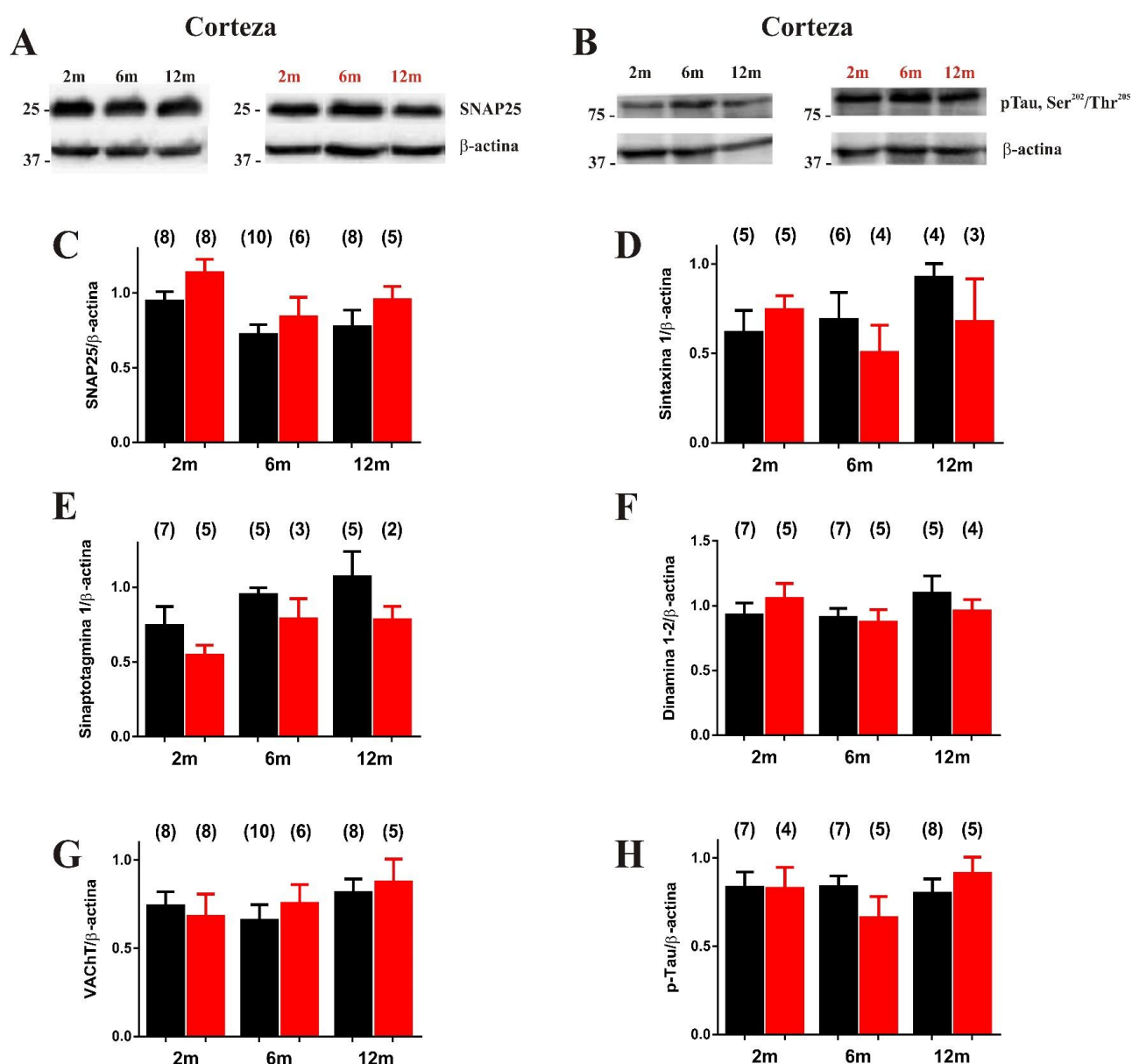


Figura 44. Expresión relativa de proteínas implicadas en la exocitosis en la corteza prefrontal de ratones SAMR1 y SAMP8. La expresión de proteínas totales se analizó mediante la técnica de “western blot”; la densidad relativa de las bandas fue calculada como ratios entre la banda perteneciente a cada proteína y su correspondiente banda de β -actina (control de carga). **A** Ejemplo representativo de la expresión de la proteína SNAP-25 (arriba) y de la β -actina (abajo) en la corteza prefrontal de ratones SAMR1 (edades en negro) y SAMP8 (edades en rojo) de 2, 6 y 12 meses. **B** Ejemplo representativo de la expresión de pTau, Ser²⁰²/Thr²⁰⁵ (arriba) y de β -actina (abajo) en la corteza de ratones SAMR1 (edades en negro) y SAMP8 (edades en rojo) de 2, 6 y 12 meses. Los diagramas de barras muestran la expresión en ratones SAMR1 (barras negras) y SAMP8 (barras rojas) de SNAP-25 (**C**), sintaxina 1 (**D**), sinaptotagmina 1 (**E**); dinamina 1-2 (**F**); VACHT (**G**) y pTau, Ser²⁰²/Thr²⁰⁵ (**H**). Los datos corresponden a la media \pm EEM del número de muestras que se indica entre paréntesis (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

Cuando se analizó la expresión de estas mismas proteínas en el hipocampo de ambas cepas de ratones SAM, sí que se observaron algunos cambios durante el envejecimiento (**Figura 45**).

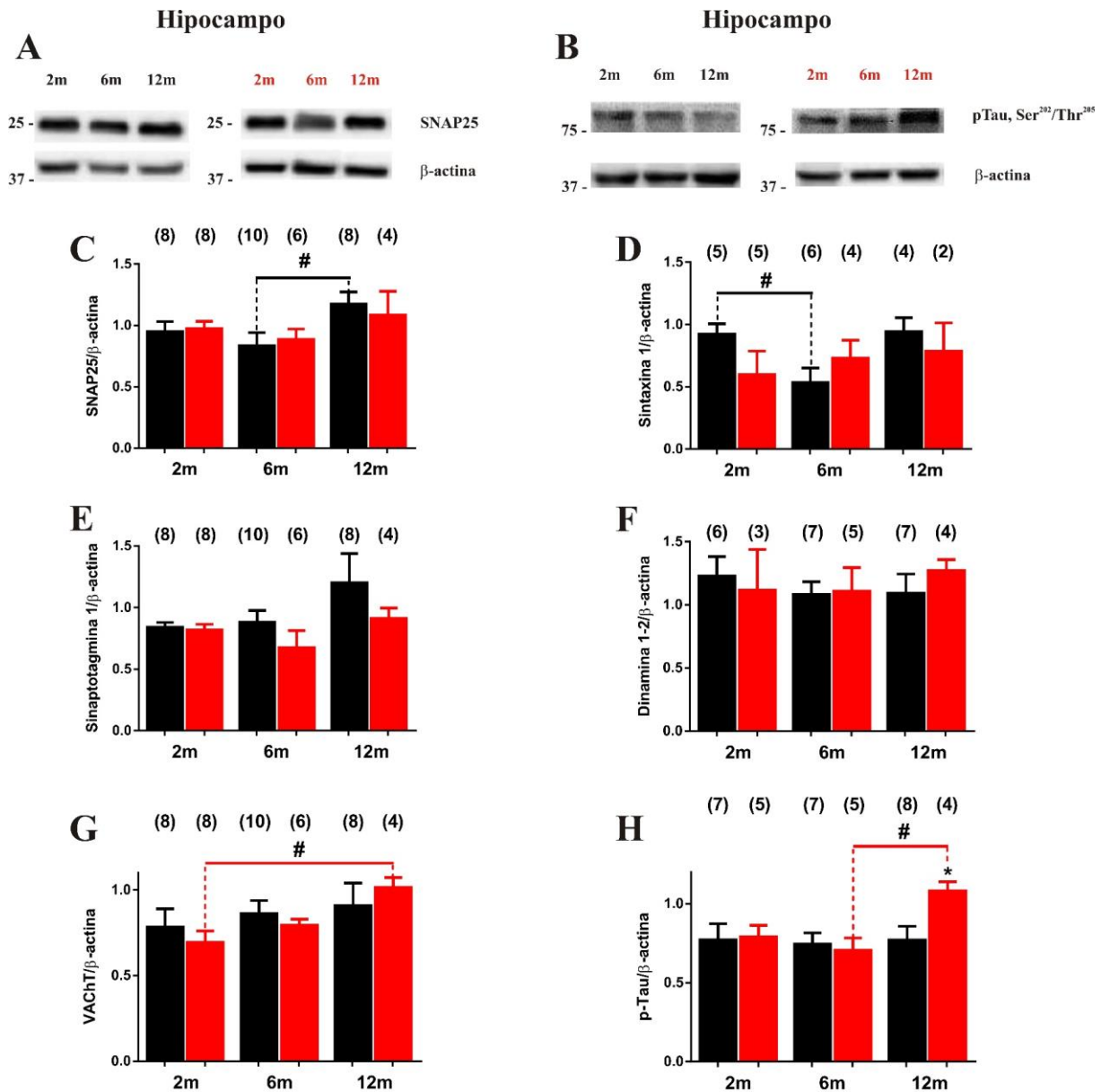


Figura 45. Expresión relativa de proteínas implicadas en la exocitosis en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8. La expresión de proteínas totales se analizó mediante la técnica de “western blot”; la densidad relativa de las bandas fue calculada como ratios entre la banda perteneciente a cada proteína y su correspondiente banda de β-actina (control de carga). **A**) Ejemplo representativo de la expresión de la proteína SNAP-25 (arriba) y de la β-actina (abajo) en el hipocampo de ratones SAMR1 (edades en negro) y SAMP8 (edades en rojo) de 2, 6 y 12 meses. **B**) Ejemplo representativo de la expresión de pTau, Ser²⁰²/Thr²⁰⁵ (arriba) y de β-actina (abajo) en el hipocampo de ratones SAMR1 (edades en negro) y SAMP8 (edades en rojo) de 2, 6 y 12 meses. Los diagramas de barras muestran la expresión en ratones SAMR1 (barras negras) y SAMP8 (barras rojas) de SNAP-25 (**C**), sintaxina 1 (**D**), sinaptotagmina 1 (**E**); dinamina 1-2 (**F**); VACHT (**G**) y pTau, Ser²⁰²/Thr²⁰⁵ (**H**). Los datos corresponden a la media ± EEM del número de muestras que se indica entre paréntesis. # p < 0,05 en los ratones SAMR1 (indicado con la barra negra) y SAMP8 (indicado con la barra roja) a lo largo de la edad (Kruskal-Wallis con test *post-hoc* de Dunns).

Como puede apreciarse en la **Figura 45** se produce un pequeño aumento de la proteína SNAP25 a los 12 meses en los ratones SAMR1 (**C**), y una pequeña disminución a los 6 meses de la proteína syntaxina 1 en los mismos ratones (**D**). Por otro lado, al igual que ocurría en la corteza prefrontal, no se observan cambios en el sensor de Ca^{2+} (sinaptotagmina 1) ni en la dinamina 1-2 (**E y F**, respectivamente).

Los cambios más notables se producen en el transportador vesicular de ACh (**G**) y en la proteína tau fosforilada (**H**). En la primera (VChT), se aprecia un aumento durante el envejecimiento de los ratones SAMR1 y SAMP8 (siendo solamente significativo en los ratones SAMP8). En la segunda (pTau (Ser²⁰²/Thr²⁰⁵), se aprecia un incremento en sus niveles de expresión en los ratones SAMP8 a los 12 meses de edad.

**“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar
lo que nadie más ha pensado”**

**Albert Szent. Fisiólogo húngaro. Premio Nobel en
Fisiología o Medicina 1937 (1893-1986)**

V. DISCUSIÓN

Los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral, en la que hemos realizado un estudio comparativo con dos cepas de ratones caracterizadas por presentar claras diferencias en su envejecimiento, nos muestran un escenario que indica que, durante el envejecimiento, el proceso de acoplamiento estímulo-secreción en la célula cromafín sufre importantes cambios que ésta intenta compensar.

Para asegurarnos que nuestras observaciones están realmente relacionadas con un envejecimiento normal *versus* un posible envejecimiento acelerado, llevamos a cabo inicialmente una serie de experimentos orientados a caracterizar la integridad de nuestros modelos experimentales. Al no tratarse de ratones de tipo transgénico, la realización de un genotipado de los mismos no era una opción, por lo que nos hemos centrado en cuatro características distintivas de los ratones SAMP8 (modelo de envejecimiento acelerado), que no se producen en los ratones SAMR1 (modelo resistente a ese envejecimiento acelerado).

La primera característica distintiva que hemos estudiado es la evolución del peso corporal de los animales con el avance de la edad. Hemos encontrado un menor peso de los ratones SAMP8, en comparación con los ratones SAMR1, a todas las edades estudiadas, destacando además el hecho de que en los SAMP8 a partir de los 6 meses de edad ya no se produce una ganancia ponderal, como se observa en la **Figura 22**. Esto se corresponde con datos previos de la literatura que describen que los ratones SAMP8 se caracterizan por tener un menor peso corporal, en comparación con otras cepas de ratones y que, además, dejan de ganar peso a partir de los 3-7 meses de edad (Takeda *et al.*, 1981; Delerue *et al.*, 2013; Sawano *et al.*, 2013).

Las alteraciones en el peso corporal no solo han sido descritas en este modelo de ratón, sino que también parecen ocurrir en modelos murinos de enfermedad de Alzheimer, como el modelo APP/PS1 (Wirhns *et al.*, 2008; Ferguson *et al.*, 2013) o el modelo 3xTg (Knight *et al.*, 2012). En nuestro laboratorio también hemos trabajado con este último modelo de Alzheimer, el triple transgénico, y hemos observado que a partir de 6 meses los ratones no tienen una ganancia de peso (Nanclares, 2017).

En humanos, también durante el envejecimiento se producen cambios en el peso corporal, debidos a la pérdida progresiva tanto de masa muscular como de densidad ósea entre otros. Igualmente, en pacientes con enfermedades neurodegenerativas también se ha descrito la posible pérdida de peso, que puede llegar a ocurrir incluso años antes de que se llegue a diagnosticar la enfermedad, como ocurre en el caso de la enfermedad de Parkinson, (Aziz *et al.*, 2008; Kistner *et al.*, 2014). Los mecanismos implicados en esta pérdida de peso son

multifactoriales y generan mucha controversia. Algunos autores lo relacionan con alteraciones de núcleos hipotalámicos implicados en el control de la ingesta a través del sistema dopaminérgico y que, por otra parte, regulan el metabolismo energético y el apetito a través del sistema noradrenérgico y serotoninérgico (Knight *et al.*, 2012; Kistner *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que estos sistemas se pueden ver alterados durante el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas, ésta podría ser una de las explicaciones de la pérdida de peso en estos modelos animales.

La segunda característica distintiva que hemos analizado en nuestros modelos animales es la cognición, para lo que hemos recurrido a la prueba del laberinto en Y. Hemos encontrado que los ratones SAMP8 muestran un déficit de la memoria espacial a corto plazo que se hace patente a los 6 y a los 12 meses de edad, mientras que no se observan alteraciones significativas en los ratones SAMR1 (**Figura 23**). En este sentido, se han publicado numerosos trabajos que describen la existencia de diversos déficits cognitivos en los ratones SAMP8 que aparecen a partir de los 4 ó 9 meses de edad, dependiendo del test utilizado. Así, se ha descrito que estos ratones presentan déficits en el aprendizaje y la memoria espacial, en la memoria a corto plazo, en la memoria a largo plazo (específicamente en la declarativa), en la memoria del miedo y en la memoria asociativa (Miyamoto *et al.*, 1986; Miyamoto, 1997; Flood y Morley, 1998; Ohta *et al.*, 2001; López-Ramos *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2014).

De un modo muy general, pues su complejidad es mucho mayor, las principales áreas del cerebro involucradas en los diferentes tipos de memoria son la amígdala (memoria asociada al miedo y consolidación de recuerdos), el hipocampo (codificación de recuerdos, consolidación de la memoria, memoria a corto y largo plazo, memoria espacial), el cerebelo (memoria procedimental) y la corteza (memoria a largo plazo, de trabajo, prospectiva entre otras). El hecho de que los ratones SAMP8 presenten déficits en los distintos tipos de memoria implica que se estarían produciendo alteraciones en distintos momentos del envejecimiento en estas zonas cerebrales (dadas las diferencias en la aparición de los déficits en los distintos test).

La tercera característica distintiva que hemos valorado son los niveles de la proteína tau fosforilada. Hemos encontrado un aumento de la proteína tau fosforilada en el hipocampo de los ratones SAMP8 de 12 meses de edad (**Figura 45**). Varios trabajos han descrito una hiperfosforilación de esta proteína en los ratones SAMP8 a partir de los 10 meses en hipocampo y corteza (Canudas *et al.*, 2005; Casadesus *et al.*, 2012; Bodea *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017). Este aumento junto con la aparición de ovillos neurofibrilares en las neuronas de la corteza (Sureda *et al.*, 2006) se relacionan directamente con los déficits cognitivos ya que, si se

aumentan los niveles de tau fosforilada, se produce un empeoramiento del déficit cognitivo (Bodea *et al.*, 2017), y si se disminuyen (Farr *et al.*, 2016), se produce una mejora de los déficits cognitivos en estos ratones. Es posible que el aumento de tau fosforilada que hemos encontrado en el hipocampo de nuestros ratones esté relacionado con la pérdida de memoria y aprendizaje espacial observados en la prueba del laberinto en Y, ya que dependen de esa área cerebral.

No podemos obviar, sin embargo, que no hemos encontrado diferencias en los niveles de proteína tau fosforilada en la corteza prefrontal. Ello podría deberse a que la patología tau comienza en la corteza entorrinal y en el hipocampo y se va extendiendo progresivamente a otras áreas del cerebro (de Calignon *et al.*, 2012), por lo que no podemos descartar que, a los 12 meses en nuestros ratones no se ha propagado todavía a la corteza y esta anomalía se encuentre solo a nivel del hipocampo.

La cuarta característica distintiva analizada la componen los rasgos fenotípicos característicos de estos animales. Hemos utilizado ratones SAMP8 y SAMR1 a las edades de 2, 6 y 12 meses. Con el avance de la edad, los ratones SAMP8 han ido presentando gradualmente las características fenotípicas descritas hace ya más de 25 años por Takeda *et al.* (1981), fundamentalmente la alopecia y falta de brillo de la piel, el engrosamiento de la piel, pequeñas lesiones perioftálmicas y un aumento de la cifolordosis, mientras que estas características no se observaron en los ratones SAMR1 durante el periodo de estudio de hasta 12 meses (**Figura 3**).

Todas estas características, observadas en los ratones SAMP8 utilizados en esta Tesis, vienen a corroborar por tanto la utilidad de estos ratones como un modelo de envejecimiento acelerado frente a la cepa de ratones SAMR1, un modelo resistente a dicha senescencia acelerada. Además, uno de los factores que, en nuestra opinión, aumenta el interés de este estudio, es que la mayoría de las alteraciones que se producen en relación con el envejecimiento no ocurren únicamente en el ratón SAMP8 (que presenta la mayoría de patologías asociadas a la edad), sino que también ocurren en el ratón SAMR1, si bien en éste aparecen a edades más avanzadas. Este hecho apoyaría la idea de que los cambios que se produzcan en ambas cepas, primero en los SAMP8 y más tardíamente en los SAMR1, son probablemente cambios ligados al envejecimiento.

Como avanzábamos al inicio de esta Discusión, los resultados experimentales obtenidos en la presente Tesis Doctoral indican que, durante el envejecimiento, las células cromafines adrenomedulares aisladas de ambas cepas de ratones SAM sufren notables alteraciones en los

distintos elementos que participan en el acoplamiento estimulación-secreción. Así, hemos encontrado cambios en las distintas corrientes iónicas, que van a ser responsables de las alteraciones observadas en la excitabilidad de la célula, tanto en situación de reposo como durante la generación de PAs. Además, teniendo en cuenta que el manejo celular del Ca^{2+} es el principal determinante para que se produzca el proceso de exocitosis, el aumento de estas corrientes podría explicar los cambios observados en la secreción con el envejecimiento.

Es interesante resaltar que la magnitud de las diferencias que se producen con el envejecimiento en la respuesta secretora de catecolaminas es diferente entre los dos estímulos secretadores utilizados, siendo por lo general más tenues cuando se utilizó ACh como estímulo secretagogo, en comparación con los cambios observados cuando se utiliza K^+ para inducir la secreción. Igualmente, hemos encontrado alteraciones durante el envejecimiento en parámetros relacionados con la excitabilidad de las CCs en respuesta a la aplicación de ACh, que lógicamente no se pueden apreciar al estimular las células con K^+ .

Hemos encontrado un incremento (a más del doble) del número de vesículas secretadas en respuesta a la aplicación de un estímulo no fisiológico (solución de KH con 70 mM de K^+), a medida que progresa la edad de los ratones. Este incremento se produce antes en los ratones SAMP8, siendo patente en animales de 6 meses de edad, y se mantiene a los 12 meses, mientras que en los ratones SAMR1 el aumento en el número de vesículas secretadas en respuesta a K^+ tan solo se va a apreciar en los animales de 12 meses (**Figura 31**). Cuando se utiliza el estímulo fisiológico (ACh), no se observan cambios significativos en el número de vesículas en relación con el envejecimiento de los animales en ninguna de las dos cepas (**Figura 34**).

A la hora de intentar dar una explicación a estas diferencias en función del estímulo secretagogo empleado debemos tener en cuenta el “distinto mecanismo neurosecretor” de ambos estímulos. Desde hace muchos años, el K^+ , la ACh y otros secretagogos como el Ba^{2+} han sido ampliamente utilizados para el estudio de la secreción y para el estudio detallado de la cinética del poro de fusión (Schroeder *et al.*, 1996; Calvo-Gallardo *et al.*, 2015) ya que todos ellos producen una despolarización celular (Orozco *et al.*, 2006; Baraibar *et al.*, 2018; Martínez-Ramírez *et al.*, 2018) que en última instancia favorecerá la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDVs. Sin embargo, como hemos comentado previamente, el estímulo de K^+ y de ACh difieren en cuanto a su capacidad para generar PAs, señales transitorias de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y secreción de catecolaminas, como demostraron en los años 60 William Douglas y colaboradores (Douglas y Rubin, 1961; Douglas y Rubin, 1963; W. *et al.*, 1967).

Así, la respuesta secretora que se produce en respuesta a la aplicación de pulsos de ACh requiere de la activación de los nAChRs, lo que va a generar una pequeña despolarización capaz de inducir el disparo de PAs (**Figura 42**) con ello la apertura de los canales de Na^+ dependientes de voltaje y/o de los CCDVs, generándose finalmente elevaciones transitorias de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ más pequeñas y muy localizadas cerca de las áreas en las que tiene lugar la exocitosis. Por el contrario, la aplicación de un pulso de K^+ va a generar una rápida despolarización de la membrana (Orozco *et al.*, 2006), que no se acompaña de PAs (**Figura 41**), pero que sirve para abrir todos los CCDVs de la membrana celular, con lo que se generan transitorios de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de mayor intensidad y que alcanzan rápidamente gran parte del citosol (Cuchillo-Ibáñez *et al.*, 2002). Esta diferente forma de generar señales transitorias de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ explicaría también el distinto perfil secretor que se observa al estimular las CCs con K^+ (se produce una secreción masiva principalmente en los primeros 10 segundos tras la aplicación del pulso; **Figuras 31 y 32**) o con ACh (la secreción es más mantenida a lo largo del pulso; **Figuras 34 y 35**).

Gracias al el estudio detallado del poro de fusión, nuestros resultados revelan también diferentes alteraciones en la cinética de liberación de vesículas durante el envejecimiento tanto con la estimulación con K^+ (**Figura 33**) como con ACh (**Figura 36**). Estos resultados indican una disminución de la altura de la espiga (I_{max}), un aumento en la anchura ($t_{1/2}$) y de la base, y un enlentecimiento del crecimiento y de la caída de la misma. Estos datos indican que a medida que avanza la edad de los animales, la liberación de las catecolaminas contenidas en las vesículas secretoras se produce una forma más lenta. Estos cambios en la cinética de apertura del poro de fusión se observan claramente cuando las CCs son estimuladas con K^+ , siendo los cambios más tenues cuando se aplica ACh.

Debemos destacar en este punto que estas alteraciones en las características cinéticas de la espiga secretora parecen preceder a las alteraciones que se producen con la edad en otros elementos implicados en el acoplamiento estimulación-secreción. En ratones SAMR1 los primeros cambios significativos en la cinética de la espiga secretora se aprecian al alcanzar los ratones la edad de 6 meses, manteniéndose dichos cambios en ratones de 12 meses. Curiosamente los ratones SAMP8 ya parecen haber sufrido estas modificaciones a los 2 meses (véase los modelos de espigas secretora a las diferentes edades en los dos tipos de ratones en la **Figura 33, A**). A modo de ejemplo, la amplitud de la espiga en ratones SAMP8 de 2 meses es significativamente menor que la de los ratones SAMR1 a esa misma edad, pero es comparable a la de los ratones SAMR1 de edades más avanzadas (6 y 12 meses).

La reducción de la amplitud de la espiga amperométrica que se produce con el avance de la edad podría conducir a una reducción en el contenido cuantal de catecolaminas de las vesículas secretoras individuales, de forma similar a lo observado en experimentos realizados en células PC12 en los que la incubación de las células con reserpina (un bloqueante del transportador vesicular de monoaminas) produce una reducción de la I_{max} , acompañado claramente de una disminución del contenido vesicular de catecolaminas (Colliver *et al.*, 2000). Sin embargo, en nuestro estudio la disminución de la amplitud de la espiga parece que es compensada con un aumento en la anchura de ésta, incrementándose tanto el $t_{1/2}$ (**Figuras 33 y 36, panel b₄**) como la base de la espiga (**Figuras 33 y 36, panel b₃**), con lo que la liberación cuantal de las espigas individuales no se va a modificar significativamente durante el envejecimiento (**Figuras 33 y 36, panel b₆**). Estos datos indican por tanto que, a lo largo del envejecimiento se produce la misma liberación de catecolaminas por vesícula, si bien ésta se produce con una mayor lentitud.

Cambios en la cinética del poro de fusión y en la liberación de las espigas amperométricas se han descrito también en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer tanto en los ratones 3xTg (Nanclares, 2017) como en ratones APP/PS1, se ha observado que la liberación de catecolaminas ocurre de manera más rápida pero las vesículas secretoras tienen un menor contenido cuantal (de Diego *et al.*, 2012). En la enfermedad de Huntington parece que se repite este mismo patrón de liberación, observándose también una reducción del contenido cuantal de catecolaminas en cada vesícula (Martínez-Ramírez *et al.*, 2018). También se ha descrito que en un modelo murino de enfermedad de Parkinson se produce una aceleración del proceso exocitótico en células cromafines (Logan *et al.*, 2017). Sin embargo, en la ELA la liberación de catecolaminas se hace más lenta, pero las vesículas poseen un mayor contenido cuantal de catecolaminas (Calvo-Gallardo *et al.*, 2015), liberándose una mayor cantidad de neurotransmisor.

En este punto nos planteamos la posibilidad de que estos cambios en la cinética de liberación de catecolaminas que se observa durante el envejecimiento de los ratones SAM pudieran deberse a cambios en alguna de las proteínas de la llamada “maquinaria de la exocitosis”. En relación a esta posibilidad, hay mucha controversia en la literatura sobre las alteraciones en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la exocitosis que pueden ocurrir durante el envejecimiento o en enfermedades neurodegenerativas. Así, algunos autores han descrito que durante el envejecimiento se produce una disminución de la expresión de las proteínas SNAP-25, syntaxina 1, sinaptotagmina 1 y 2, VAMP2 y dinamina en neuronas de

hipocampo de rata, lo que produce un deterioro en la neurotransmisión (VanGuilder *et al.*, 2010). En pacientes con Alzheimer se ha descrito que en distintas áreas cerebrales como el hipocampo, la corteza entorrinal y la corteza occipital se produce una disminución en la expresión de algunas de estas proteínas como VAMP2 o syntaxina, aunque no en SNAP-25 (Sze *et al.*, 2000). Por el contrario, otros autores sí que observan niveles disminuidos de SNAP-25 en hipocampo y corteza de pacientes de EA (Guerini *et al.*, 2014). En la enfermedad de Huntington la proteína complexina II (que se une al complejo SNARE para la neurotransmisión) se encuentra disminuida en pacientes, en ratones transgénicos R6/2 y en células PC12 que expresan huntingtina (Smith *et al.*, 2005). Además, como comentábamos anteriormente, las acumulaciones de α -sinucleína pueden afectar a las proteínas involucradas en la secreción acelerándola (Logan *et al.*, 2017).

A pesar de toda esta controversia en la literatura, en nuestro estudio no hemos encontrado cambios relevantes en ninguna de las proteínas analizadas (SNAP-25, syntaxina 1, sinaptotagmina 1 y dinamina 1-2) ni a nivel de la corteza prefrontal (**Figura 44**) ni en el hipocampo (**Figura 45**), no habiendo podido analizar la expresión de estas proteínas en el tejido adrenomedular. En estudios similares realizados en modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas como el ratón 3xTg (modelo de EAF) o el SOD1 (modelo de ELA) en los que también se han encontrado diferencias en la cinética de las espigas amperométricas, tampoco se han encontrado alteraciones en la expresión de estas proteínas ni en la médula adrenal ni en el cerebro (Calvo-Gallardo *et al.*, 2015; Nanclares, 2017).

No hemos encontrado diferencias significativas en el número de espigas amperométricas que presentan “pie de espiga” durante el envejecimiento, aunque sí una disminución de la altura y de la carga de estos “pies” (**Figura 37**). Tampoco hemos encontrado cambios en otros eventos exocitóticos como el número de vesículas que presentan un comportamiento tipo parpadeo (“kiss and run”). Estos datos estarían en concordancia con los resultados de los experimentos de “western blot”, es decir, no se observan alteraciones significativas en la estabilización del del poro de fusión ni en las proteínas implicadas en ello.

Otra de las posibles explicaciones al por qué de los cambios cinéticos de las espigas secretoras que se producen durante el envejecimiento, vendría de la mano de posibles alteraciones en el manejo del calcio por la célula cromafín. Se ha descrito que las señales transitorias de Ca^{2+} , el aclaramiento del Ca^{2+} y los microdominios de Ca^{2+} pueden afectar a la cinética de las espigas amperométricas. Se han observado diferencias en la cinética de las espigas cuando se utilizan diferentes estímulos como la ACh (espigas más finas) o el K^+

(espigas más gruesas, relacionadas con la generación de transitorios de Ca^{2+} mayores) y al utilizar FCCP (agente desacoplante de la fosforilación oxidativa mitocondrial), que bloquea el aclaramiento de la señal $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por las mitocondrias, lo que provoca que tras la estimulación con ACh la cinética de las espigas secretoras obtenidas sea similar a las obtenidas con K^+ (Calvo-Gallardo *et al.*, 2016).

Durante la exposición de los resultados de esta Tesis Doctoral hemos descrito cambios en las corrientes iónicas que se producen durante el envejecimiento en ratones SAM. Uno de los cambios más importantes a este nivel son los que se producen en las corrientes de Ca^{2+} a través de los CCDV, que se ven aumentadas (casi al doble) al progresar la edad de los animales. Estos cambios se producen en los ratones SAMP8 ya a los 6 meses, manteniéndose este cambio en ratones de 12 meses, mientras que en los ratones SAMR1 este incremento de la I_{Ca} no se aprecia hasta los 12 meses de edad (**Figura 28**). Se ha descrito que este aumento de la I_{Ca} también se produce en neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo en ratones SAMP8 a los 12 meses en comparación con los 2 meses (Wang *et al.*, 2017) y que en estos cambios tendrían una mayor implicación los CCDV del subtipo L (Thibault y Landfield, 1996). También en enfermedades neurodegenerativas, como en la EA, se ha descrito un aumento de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de tipo L relacionada con la patología por $\text{A}\beta$ (Silei *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2007). Finalmente, cabe destacar que recientemente nuestro grupo también ha descrito el incremento de la I_{Ca} que se produce en la CC de modelos murinos de EA (Nanclares, 2017) y de ELA (Calvo-Gallardo *et al.*, 2015).

Al ser la exocitosis un proceso dependiente de Ca^{2+} , las posibles alteraciones en la homeostasia de este catión repercutirán de manera directa en la neurotransmisión. Lógicamente, este aumento en la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDVs está íntimamente ligado con el aumento en la secreción de catecolaminas observado con el estímulo de K^+ (que abre directamente los CCDV) (**Figura 31**). Como hemos descrito, ambas alteraciones se producen de forma paralela, observándose inicialmente en los ratones SAMP8 (a los 6 y 12 meses) y más tardíamente en los SAMR1 (a los 12 meses). También con este estímulo hemos encontrado que la mayor liberación de vesículas y de catecolaminas, se produce por una dilatación en el tiempo de la respuesta al estímulo (**Figura 32**). Esto podría deberse a un incremento en el número de vesículas de reserva que se acercan a la membrana como consecuencia de esa mayor entrada de calcio (este contingente de vesículas representa hasta el 95% de las vesículas que contiene una célula cromafín y su acercamiento hacia las zonas activas de exocitosis es un proceso que también depende de Ca^{2+}), aunque este proceso puede durar varios minutos (Steyer *et al.*, 1997).

Aunque las corrientes de entrada de Ca^{2+} aumenten con la edad, cuando utilizamos el estímulo fisiológico (ACh), no hemos observado un aumento significativo en la secreción de catecolaminas ni una prolongación en el tiempo en que la célula mantiene esta secreción (**Figuras 34 y 35**). Este sorprendente hallazgo podría estar relacionado con la expresión de un menor número de nAChRs o con una mayor desensibilización de los mismos durante el envejecimiento. Esto originaría una reducción en la magnitud de la I_{ACh} y, al fin y al cabo, una menor activación de los canales CCDV, con lo que aun existiendo una mayor corriente de Ca^{2+} , la secreción se mantendría a lo largo de la edad. No obstante, no hemos encontrado ningún cambio importante en la amplitud máxima de las corrientes nicotínicas ni en la carga iónica originada por su activación durante el envejecimiento (**Figura 26**). Esta contradicción nos animó a realizar los experimentos de excitabilidad celular por si se estuviesen produciendo alteraciones en ésta que pudieran explicar por qué razón no se observa el incremento en la secreción de catecolaminas con la edad cuando se utiliza el estímulo con ACh. En relación a estos cambios en la respuesta secretora a ACh, resulta curioso que mientras en el modelo 3xTg de EA (Nanclares, 2017) y en el SOD1 de ELA (Calvo-Gallardo *et al.*, 2015) se produce un aumento de la secreción de catecolaminas en respuesta al estímulo con ACh, en el ratón R6/2 modelo de enfermedad Huntington la secreción inducida por ACh disminuye (Martínez-Ramírez *et al.*, 2018).

Además del aumento en las corrientes de Ca^{2+} , en el presente estudio hemos encontrado también un aumento de las corrientes de sodio y potasio durante el envejecimiento de ambas cepas SAMR1 y SAMP8. En cuanto a las corrientes de sodio, el aumento de éstas se ha producido a todos los voltajes estudiados, siendo mayor a voltajes más negativos y, por lo tanto, dándose un desplazamiento de la curva hacia esos voltajes (**Figura 27**). Este incremento en la I_{Na} es más prominente en los ratones SAMP8, ocurriendo a los 6 y 12 meses, y algo menor en los ratones SAMR1, no apreciándose en este caso hasta la edad de 12 meses. Se han observado cambios similares durante el envejecimiento en fibras musculares esqueléticas de ratas de 24 meses cuando se las compara con ratas de 4 meses (Desaphy *et al.*, 1998). Asimismo, se han descrito cambios en la I_{Na} en la célula cromafín de diferentes modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas, observándose aumentos muy similares en ratones 3xTg de 12 meses de edad (Nanclares, 2017) pero una disminución considerable de la I_{Na} en ratones modelo de ELA (Calvo-Gallardo *et al.*, 2015) y en la enfermedad de Huntington (Martínez-Ramírez *et al.*, 2018).

En cuanto a las corrientes de K^+ , hemos encontrado un aumento durante el envejecimiento tanto en las que dependen de voltaje como las que dependen de Ca^{2+} . En primer lugar, la $I_{K(V)}$ presentan un incremento a los 6 y 12 meses en ambas cepas de ratones SAM, si bien debemos destacar que este aumento ocurre a voltajes extremadamente positivos (a partir de +80 mV), lo que cuestionaría la importancia fisiopatológica que pudieran tener estos cambios. Cuando se analizan las corrientes de salida a través de canales K_V a voltajes más bajos, en los que sí opera fisiológicamente la célula cromafín, no encontramos diferencias en las corrientes con el envejecimiento, ni entre ratones SAMR1 y SAMP8 (**Figura 30**).

Por el contrario, en la $I_{K(Ca)}$ sí que se observa un aumento de la corriente a todos los voltajes, haciéndose ésta más notable en el rango de voltaje en el que se estarían activando los CCDVs (**Figura 29**). Lógicamente, al tratarse de corrientes dependientes de Ca^{2+} , este aumento probablemente se correlaciona con el incremento de la I_{Ca} anteriormente comentado (**Figura 28**). Este aumento en la $I_{K(Ca)}$ ocurre tanto en los ratones SAMR1 como en los SAMP8 a las mismas edades, esto es, a los 6 y 12 meses de edad (si bien el incremento es algo mayor en los SAMP8), mientras que el incremento de las corrientes de Ca^{2+} se produce a los 6 y 12 meses en los ratones SAMP8, pero únicamente a los 12 meses en los SAMR1. Una correlación entre el incremento de la $I_{K(Ca)}$ y la edad, al igual que el incremento de la I_{Ca} , se ha descrito también en neuronas del SNC (Power *et al.*, 2002; Sesti, 2016) y en otros tejidos como el músculo esquelético (Tricarico *et al.*, 1997). En patologías de tipo neurodegenerativo también se ha observado un incremento de la $I_{K(Ca)}$, como en neuronas del hipocampo de un modelo murino de EA donde, ligado a este aumento, se observa una depresión de la transmisión sináptica que es revertida cuando se utilizan bloqueantes de estos canales (caribdotoxina y paxilina) (Hu *et al.*, 2001). También se ha descrito un incremento de esta corriente (más del doble) en la célula cromafín del modelo 3xTg de EA (Nanclares, 2017).

Los canales iónicos (tanto los dependientes de voltaje como los operados por receptores, como el nAChR) constituyen los principales componentes involucrados en la excitabilidad de las células, ya que, mediante la coordinación de su activación van a regular distintos procesos celulares, entre otros las respuestas excitóticas. Como hemos podido observar en este trabajo, durante el envejecimiento se producen diversas alteraciones en las corrientes iónicas lógicamente es de esperar que afecten, en mayor o menor medida, al V_m en reposo de la célula cromafín y al disparo de PAs. Para analizar cómo podría estar repercutiendo el aumento de estas corrientes iónicas durante el envejecimiento sobre el V_m , nos propusimos caracterizar las posibles variaciones de éste en reposo (sin aplicar ningún tipo de estímulo). En este estudio

hemos encontrado que las CCs sufren una ligera, pero significativa, hiperpolarización del V_m a medida que aumenta la edad, tanto en los ratones SAMR1 como SAMP8 (**Figura 38**). Esta hiperpolarización es paulatina y de apenas 5-7 mV entre los 2 y 12 meses de edad en ambas especies de ratones SAM, sin embargo, estos pequeños cambios en el V_m en reposo de una célula pueden conllevar enormes cambios en su excitabilidad. Aunque hay mucha controversia al respecto en la literatura, dependiendo también en gran medida de las áreas del cerebro en las que se realice el estudio, se ha descrito una hiperpolarización del V_m en distintos tipos neuronales durante el envejecimiento. Así, por ejemplo, en neuronas del núcleo del lecho del *stría terminalis* (que controla señales autónomas y neuroendocrinas relacionadas con la regulación del estrés y la ansiedad) de ratones muy envejecidos (30 meses) se produce una hiperpolarización de ≈ 11 mV en su V_m (Smithers *et al.*, 2017). También se ha observado una hiperpolarización del V_m en CCs de los ratones 3xTg de EA (Nanclares, 2017).

En estos cambios en la excitabilidad celular pueden jugar un papel importante los canales de K^+ de pequeña conductancia (SK). Estos canales se activan únicamente por Ca^{2+} y muestran una prácticamente nula dependencia del voltaje, requiriendo concentraciones muy bajas de Ca^{2+} para su activación (la activación semi-máxima de estos canales se produce a $0,3 \mu M$ de Ca^{2+}), si bien parecen estar regulados por calmodulina, cinasas y fosfatasas (Xia *et al.*, 1998; Adelman *et al.*, 2012). Estos canales se pueden activar por pequeñas elevaciones en la $[Ca^{2+}]_c$ proveniente de varias fuentes: del flujo de Ca^{2+} a través de los CCDV; de los canales iónicos permeables al Ca^{2+} regulados por agonistas (NMDARs o nAChRs); y/o del Ca^{2+} que es liberado de los reservorios intracelulares (a través de IP_3 y/o por el componente CICR). Esta activación de los SK por Ca^{2+} proveniente de distintas fuentes se ha observado tanto en neuronas (Bond *et al.*, 2005; Adelman *et al.*, 2012) como en CCs (Lingle *et al.*, 2018). Durante el envejecimiento, y también durante las enfermedades neurodegenerativas, se producen diversas alteraciones en estas fuentes de Ca^{2+} que, en definitiva, producen una elevación sostenida de la $[Ca^{2+}]_c$. Es posible que este incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ basal pueda estar sobreactivando los canales SK y de esta manera, a medida que avanza el envejecimiento, esto contribuye a generar una hiperpolarización del V_m . Finalmente, cabe destacar también que el V_m en reposo de las células podría variar a lo largo de la edad por alteraciones en diferentes bombas iónicas o en los canales de potasio TASK (canales de K^+ sensibles a pH) (Lingle *et al.*, 2018).

Con respecto a las alteraciones en el V_m en reposo que se producen durante el envejecimiento, quisimos caracterizar si éste también tiene alguna repercusión sobre el potencial umbral que marca el disparo de PAs. Recordemos que el PA se inicia (se dispara)

cuando el V_m se despolariza por encima de un valor crítico, y con ello comienzan a abrirse los canales de sodio dependientes de voltaje (Hodgkin y Huxley, 1952). Se ha descrito que diversos factores como la velocidad de despolarización que precede al PA, los intervalos entre PAs (ISI, del inglés “Inter Spike Intervals”), los subtipos de canales de Na^+ presentes en la célula, o las variaciones en la activación de los canales de Na^+ , entre otros, pueden hacer variar el potencial umbral (Platkiewicz y Brette, 2010).

En nuestro estudio, hemos observado cómo, a lo largo de la edad también se produce una hiperpolarización del potencial umbral para el disparo de PAs espontáneos ($\approx 5-7$ mV; **Figura 39**), lo que podría correlacionarse con el desplazamiento de la curva de activación de las corrientes de Na^+ hacia potenciales más hiperpolarizados. En la **Figura 46** mostramos esta correlación mediante la representación conjunta de las alteraciones en la I_{Na} y las alteraciones en el potencial umbral, tanto en ratones SAMR1 como en SAMP8.

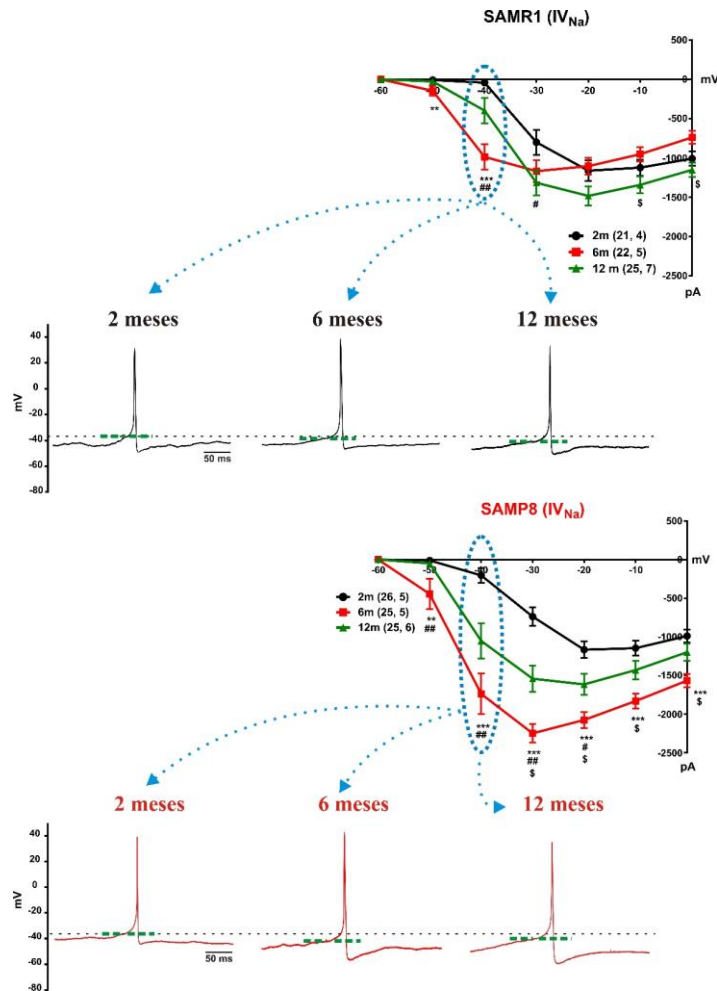


Figura 46. Correlación entre el desplazamiento hacia potenciales más hiperpolarizados de la curva I_{Na} y la hiperpolarización del potencial umbral que ocurren durante el envejecimiento de los ratones SAMR1 y SAMP8 (para más detalle Figuras 27 y 39). El desplazamiento de la curva de activación de los canales de Na^+ hacia potenciales más negativos se corresponde con la hiperpolarización del potencial umbral, tanto a los 6 y 12 meses en los ratones SAMR1 (arriba) como en los ratones SAMP8 (abajo).

A pesar de que el paralelismo que se produce entre la hiperpolarización del V_m a lo largo de la edad y la hiperpolarización del potencial umbral para el disparo de PAs espontáneos se podría esperar que se mantuviese la frecuencia de disparo de PAs espontáneos durante el envejecimiento, en esta Tesis Doctoral hemos encontrado una marcada reducción en la frecuencia de disparo de PAs, que se aprecia más claramente a los 12 meses de edad en los SAMR1 y que se adelanta a los 6 y 12 meses en los SAMP8 (**Figura 38, C**).

Es muy probable que esta reducción de la frecuencia de disparo de PAs pueda estar relacionada con cambios en las características cinéticas de los PAs. Para dilucidar esta posibilidad, analizamos la cinética de los PAs espontáneos (**Figura 40**) y hemos encontrado diversos cambios relacionados con el envejecimiento, entre los que cabe destacar los siguientes:

- Una *mayor amplitud* de los PAs. Se aprecia una mayor amplitud de los PAs en los ratones SAMR1 y SAMP8 en función de la edad. Esta mayor amplitud podría estar relacionada con la hiperpolarización del V_m y con el aumento de magnitud de las corrientes de Na^+ . En este sentido, esperábamos un cambio mucho más drástico debido al marcado incremento de estas corrientes (de hasta 2 veces en ratones SAMR1 y de hasta 3 veces en ratones SAMP8) (**Figura 27**). Este aumento de la amplitud del PA no se acompaña de variaciones significativas en el *tiempo de subida* del PA.
- Una *mayor anchura* ($t_{1/2}$), *tiempo de bajada* y *área del PA*. La mayor entrada de Na^+ (**Figura 27**) y Ca^{2+} (**Figura 28**) que se observan al avanzar la edad de los animales, junto a una posible menor capacidad de la célula para aclarar el calcio y una $I_{K(V)}$ que no varía durante el envejecimiento (**Figura 30**), podrían explicar este aumento de la anchura, el área y el tiempo de caída del PA, que se observa más precozmente en los ratones SAMP8 (a los 6 y 12 meses) y más tardíamente en los ratones SAMR1 (a los 12 meses).

Sin embargo, como consecuencia del aumento de la I_{Ca} también se produce un aumento de la $I_{K(Ca)}$ (**Figura 29**), que es la principal responsable de la repolarización del V_m . Al aumentar la corriente $I_{K(Ca)}$ (presumiblemente la corriente BK), el V_m debería repolarizarse antes y con ello sería esperable que el PA fuese más estrecho. Esta aparente discrepancia podría explicarse con los resultados del elegante trabajo de Vandael y colaboradores (Vandael *et al.*, 2010) en el que, utilizando el bloqueante de los canales BK paxilina, los autores no observan cambios en la anchura del PA en CCs de ratón, por lo que concluyen que el canal BK tendría una menor relevancia en la repolarización de las CCRs, siendo más relevante el papel de la $I_{K(V)}$ en la misma. Por el contrario, en CCs de rata, en la que hasta el 75% de la repolarización depende de los canales BK, sí

que se produce un aumento de la anchura y del tiempo de caída del PA al utilizar el bloqueante. Por lo tanto, la menor intervención en la repolarización de los canales BK, la ausencia de cambios significativos en los canales $K_{(V)}$ y el aumento de las I_{Na} y I_{Ca} , podrían explicar el aumento en la anchura, área y tiempo de caída del PA observado en nuestro estudio.

- *Mayor amplitud y área de la PHP.* En nuestro estudio hemos observado un incremento en la amplitud de la PHP al avanzar la edad de los animales. Este incremento es más manifiesto (y más precoz) en ratones SAMP8 (**Figura 40**). Esta mayor amplitud de la PHP podría estar relacionada con el incremento de la $I_{K(Ca)}$, de acuerdo a lo publicado por Vandael y colaboradores, que demostraron que el tratamiento con paxilina reducía la amplitud de la PHP sin afectar a otros parámetros de la fase de hiperpolarización del PA (Vandael *et al.*, 2010). Esto indica la implicación de los canales BK únicamente en la fase inicial de la PHP. La participación de los canales BK en la parte más rápida de la PHP ha sido también descrita en el SNC (Storm, 1987; Springer *et al.*, 2014).

Como se ha demostrado en varios trabajos, el resto de la PHP es fundamentalmente dependiente de los canales SK, tanto en el SNC (Pedarzani *et al.*, 2001; Bond *et al.*, 2005; Adelman *et al.*, 2012) como en la CC de ratón (Vandael *et al.*, 2010; Lingle *et al.*, 2018). Estos canales SK son así los que más relevancia adquieren en los ISI (separación entre PAs) y, por lo tanto, en la regulación de la frecuencia de disparo de los PAs. Aunque en nuestro estudio no hemos distinguido entre canales SK y BK, el incremento de la I_{Ca} que se produce con el envejecimiento (**Figura 28**) indudablemente contribuye a un incremento de las $I_{K(Ca)}$ globales a lo largo de la edad (**Figura 29**) entre las que se encuentran las corrientes SK. Este aumento de la corriente a través de los canales SK será el responsable del incremento en el área de la PHP que se observa en los ratones SAMP8 (a los 6 y 12 meses) y más tardíamente (a los 12 meses) en los ratones SAMR1.

Aunque en estudios realizados en neuronas piramidales del hipocampo no se han observado cambios en la amplitud y/o anchura de los PAs a lo largo del envejecimiento (Tombaugh *et al.*, 2005; Gant *et al.*, 2006), otros autores sí que han descrito cambios en el comportamiento de la PHP muy similares a los observados en nuestro estudio (Landfield y Pitler, 1984; Landfield, 1988; Disterhoft *et al.*, 1996; Tombaugh *et al.*, 2005; Gant *et al.*, 2006; Bodhinathan *et al.*, 2010). Por ejemplo, en neuronas piramidales de rata, se ha descrito un incremento de la PHP, tanto de la fase de rápida hiperpolarización (mediada por los canales BK) como de la fase lenta (mediada por los canales SK) a medida que aumentan la edad (desde los 4 hasta los 23 meses). Esto, se ha relacionado

con un aumento de la corriente de Ca^{2+} a través de los canales del subtipo L y un aumento en el componente CICR (Gant *et al.*, 2006) y con los receptores de rianodina (Bodhinathan *et al.*, 2010). Igualmente, se han descrito los mismos cambios en la PHP en neuronas de varios modelos transgénicos de EA en los que se ha observado una correlación entre la presencia de placas de $\text{A}\beta$ (que produce un aumento del Ca^{2+} intracelular) y el aumento en la PHP (Barrow *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2006; Kaczorowski *et al.*, 2011). Asimismo, se ha encontrado un aumento en la amplitud del PA y en la PHP en células cromafines del modelo 3xTg de EA (Nanclares, 2017). En todos estos trabajos las alteraciones observadas en la cinética de los potenciales de acción durante el envejecimiento y también durante la EA en el SNC, se ven correlacionadas con una disminución en la excitabilidad neuronal y con déficits en el aprendizaje y la memoria.

- *Incremento del ISI* cuando se utiliza un protocolo de PA provocados. De forma similar a lo descrito en el SNC, en esta Tesis Doctoral hemos encontrado una relación directa y dependiente de la edad, entre los cambios observados en la cinética del potencial de acción y las alteraciones en la excitabilidad celular producida por un pulso despolarizante (**Figura 43**). Se ha descrito que cuando se provoca el disparo de un tren de PAs durante segundos mediante un pulso eléctrico, la carga total de las corrientes SK va aumentando progresivamente, lo que va separando cada vez más los potenciales de acción (va aumentando el ISI), lo que indica claramente que el ISI está modulado por la corriente SK (Vandael *et al.*, 2012). De hecho, si se bloquea la corriente SK por apamina, se reduce el ISI, con el consecuente incremento de la frecuencia de disparo de PAs durante el pulso despolarizante (Vandael *et al.*, 2012). Por el contrario, al aumentar la sensibilidad de los canales SK, se produce un aumento claro del ISI con una disminución en la frecuencia de disparo ante el mismo pulso despolarizante (Pedarzani *et al.*, 2001). En el presente estudio, el incremento de la I_{Ca} , que conduce a un incremento de las $I_{K(Ca)}$ (tanto del componente BK como el SK), se va a traducir finalmente en una reducción, a lo largo de la edad, del número de PAs provocados durante la aplicación de un pulso despolarizante de 200 ms (**Figura 43**), lo que podría ser atribuible a la activación por el Ca^{2+} de los canales SK en las CCs de los ratones SAM. Como ocurre con muchos otros parámetros, estos cambios se manifiestan más precozmente en los ratones SAMP8 (a los 6 y 12 meses) y más tardíamente en los SAMR1 (a los 12 meses).

A la luz de los resultados descritos sobre las diferentes modificaciones que sufren las corrientes iónicas a lo largo del envejecimiento, podemos describir un marco en el que la célula cromafín reúne todos los requisitos necesarios para que se produzca una mayor secreción de catecolaminas a lo largo del envejecimiento. Estos requisitos incluyen el aumento de la mayoría de corrientes iónicas (principalmente las de Ca^{2+}) (**Figuras 27, 28 y 29**) con el consecuente incremento en la liberación de catecolaminas producido tras aplicar un estímulo de K^+ (**Figura 31**). Sin embargo, la célula cromafín no llega a sufrir variaciones significativas en la secreción en respuesta a la aplicación de un pulso de ACh (**Figura 34**) ni cambios en las corrientes nicotínicas (**Figura 26**). Aun así, no podemos olvidar que la liberación de catecolaminas se realiza con una mayor lentitud a medida que aumenta la edad, lo que se puede poner mejor de manifiesto a través de un estímulo más estresante y que fuerza la maquinaria excitotóxica como lo hace el K^+ . Por otra parte, la célula cromafín durante el envejecimiento, sufre una depresión de su excitabilidad debido a la hiperpolarización del V_m en reposo que se acompaña de un menor disparo de PAs tanto espontáneos (**Figura 38**) como provocados (**Figura 43**).

En este punto nos planteamos caracterizar cómo la hipo-excitabilidad que se produce con el envejecimiento de las CCs podría estar enmascarando el efecto esperable de aumento de la I_{Ca} sobre la secreción de catecolaminas cuando ésta se estimulaba mediante la aplicación de un pulso con ACh. Para ello realizamos los experimentos de registro de la excitabilidad celular (V_m) en respuesta a la aplicación de un pulso con K^+ o ACh de características similares a las utilizadas para inducir la secreción de catecolaminas, esto es, de 1 minuto de duración.

Al analizar comparativamente los efectos de la aplicación de un pulso de 1 min de duración con una solución conteniendo 70 mM K^+ (**Figura 47**) o ACh (**Figura 48**) sobre la secreción de catecolaminas y el V_m , a lo largo del envejecimiento y comparando éstos con las variaciones de la I_{Ca} encontramos que, como era de esperar, la despolarización producida por 70 mM de K^+ no se modifica durante el envejecimiento en ninguna de las dos cepas de ratones SAM y que, en esta situación va a existir una relación directa entre el aumento de la I_{Ca} y la mayor secreción producida por el mismo estímulo (**Figura 47**). Sin embargo, cuando aplicamos el estímulo con ACh (100 μM), hemos encontrado que al avanzar la edad de los ratones se produce una menor despolarización del V_m acompañada de una mayor frecuencia de disparo de PAs (a los 12 meses en los SAMR1 y a los 6 y 12 meses en los SAMP8), con lo que desaparece la simple relación directa entre el aumento de I_{Ca} y la secreción y entrando en juego los otros factores que afectan a la excitabilidad celular, entre otros, la mayor actividad de los canales SK (**Figura 48**).

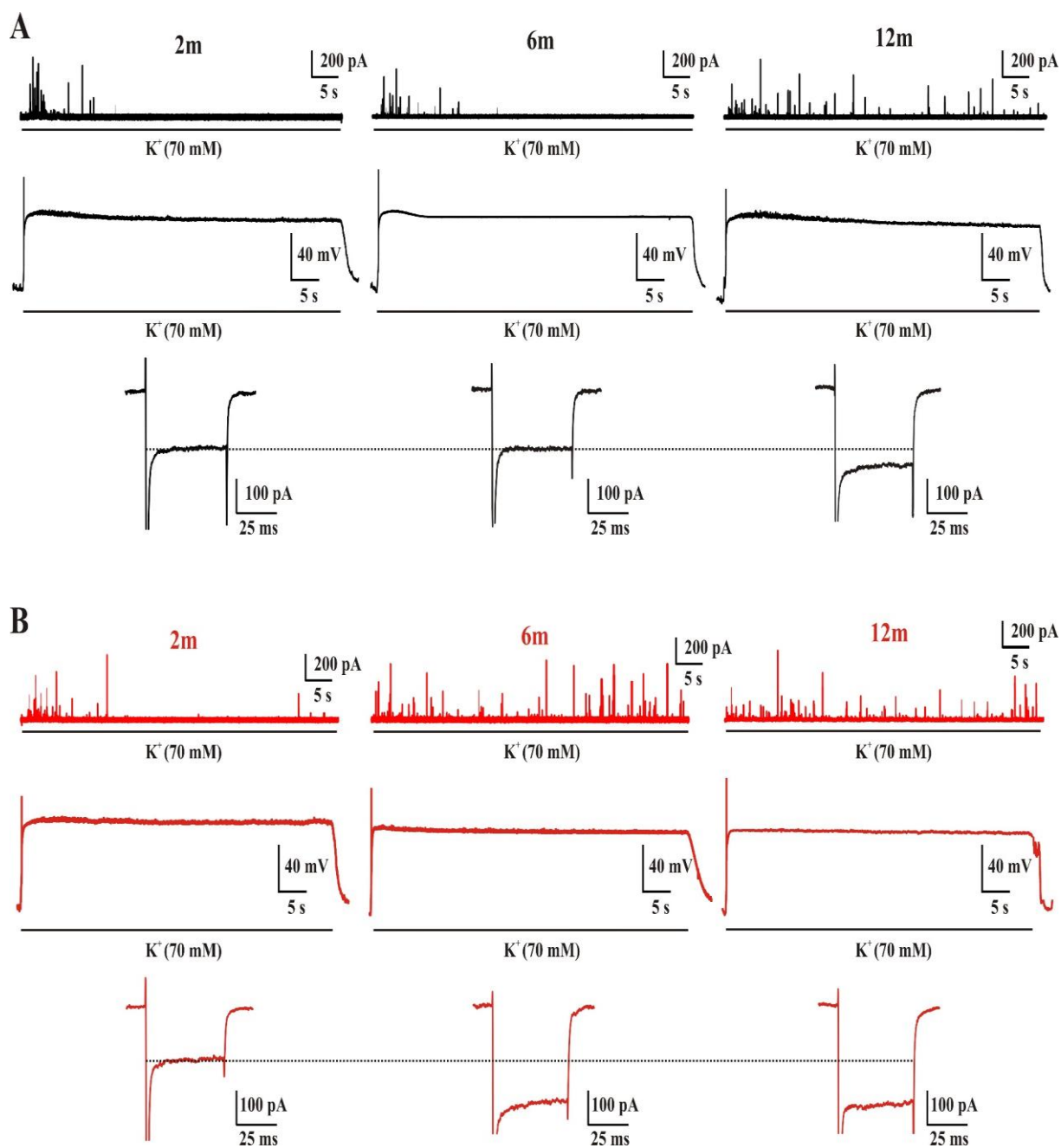


Figura 47. Respuestas excitóticas asociadas a la entrada de Ca^{2+} producida por cambios en el V_m en respuesta al estímulo con K^+ (70 mM) en CCs de ratones SAMR1 y SAMP8. La despolarización del V_m y la consecuente secreción de catecolaminas a lo largo de la edad (2, 6 y 12 meses) en los ratones SAMR1 (A) y SAMP8 (B) se originó a partir de un estímulo de K^+ (70 mM) de 1 minuto de duración. Las I_{Ca} se obtuvieron mediante IV_{Ca} y los ejemplos aquí mostrados son los obtenidos ante un pulso despolarizante de -80 mV a 0 mV. Para más detalle ir a **Figuras 28, 31, 41**.

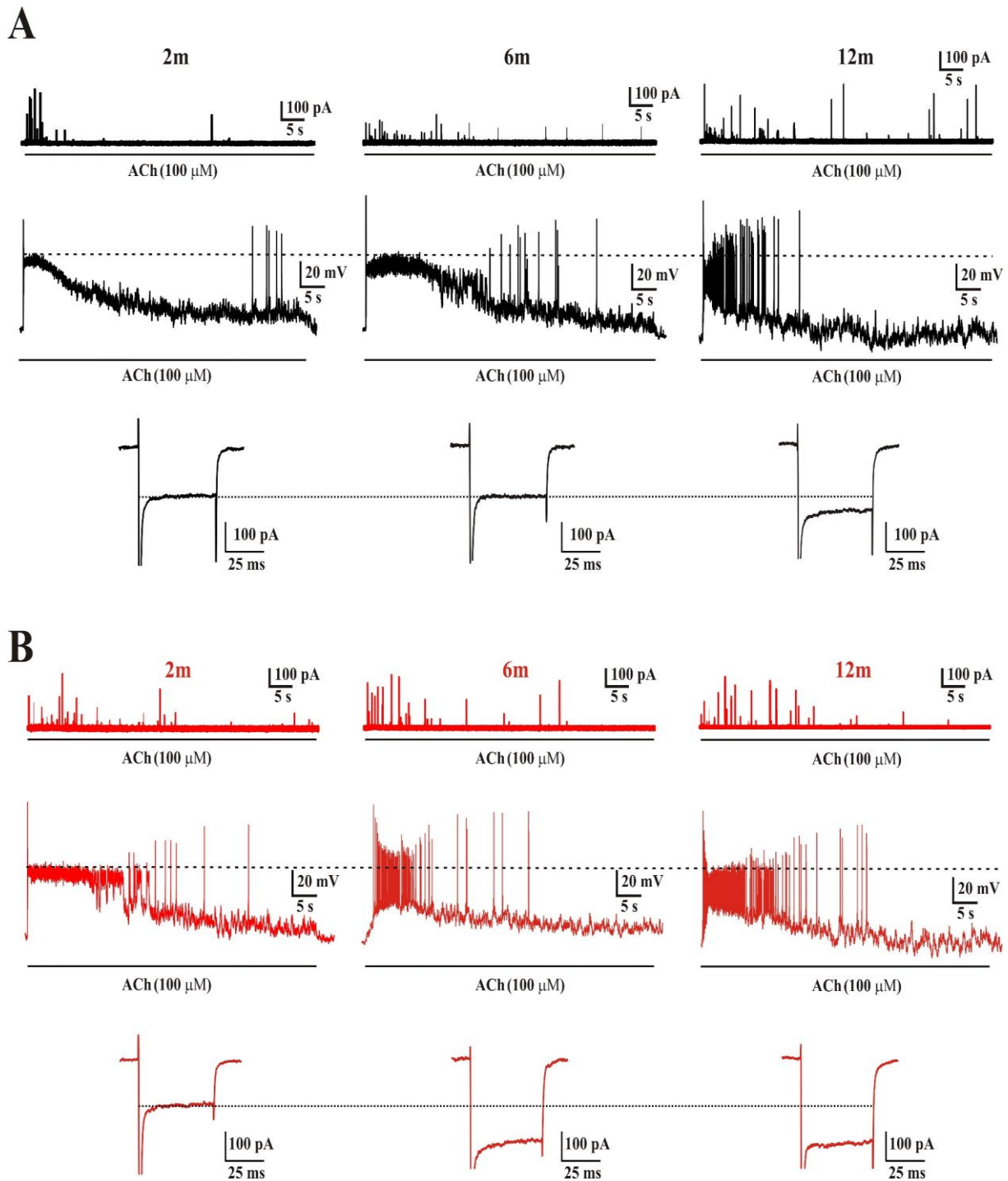


Figura 48. Respuestas excitóticas asociadas a la entrada de Ca^{2+} producida por cambios en el V_m en respuesta al estímulo con ACh ($100 \mu\text{M}$) en CCs de ratones SAMR1 y SAMP8. La despolarización del V_m y la consecuente secreción de catecolaminas a lo largo de la edad (2, 6 y 12 meses) en los ratones SAMR1 (A**) y SAMP8 (**B**) se originó a partir de un estímulo de ACh ($100 \mu\text{M}$) durante 1 minuto. Las I_{Ca} se obtuvieron mediante IV_{Ca} y los ejemplos aquí mostrados son los obtenidos ante un pulso despolarizante de -80 mV a 0 mV . Para más detalle ir a Figuras 28, 34 y 42.**

Con respecto a la importancia de las alteraciones en los CCDV durante el envejecimiento de los ratones SAM, debemos recordar que la célula cromafín adrenomedular presenta diferentes subtipos de CCDV en la superficie de su membrana. La proporción de estos subtipos de canales varía ampliamente entre las especies animales (García *et al.*, 2006), sin embargo, parece existir una predominancia en el control de la secreción a través de los canales del subtipo L independientemente del tipo de preparación experimental (cultivo celular, rodaja de médula adrenal o glándula intacta), o el tipo de técnica utilizada (registros de la capacidad eléctrica de la membrana, amperometría, técnicas ópticas o químicas) en CCs bovinas, de gato, de rata y de ratón (Marcantoni *et al.*, 2007). Además, se ha descrito que ante estímulos prolongados con K^+ (Lopez *et al.*, 1994) o ACh (Nagayama *et al.*, 1999) existe un acoplamiento preferencial entre los canales del subtipo L y la secreción de catecolaminas. Esto es debido a que los canales de tipo L se caracterizan por presentar una menor inactivación a voltajes despolarizados y una activación e inactivación más lenta en el tiempo en comparación con los demás subtipos (P/Q, N y R) que se activan e inactivan completamente con una mayor rapidez (Nanclares *et al.*, 2018). Es por eso que los canales de tipo L también regularían la reposición de vesículas cercanas a la membrana favoreciendo una liberación más sostenida o tónica. De esta manera, ante un estímulo despolarizante de K^+ , que no varía durante el envejecimiento, es posible que el aumento en la secreción se produzca por el incremento de la corriente de Ca^{2+} a través de los canales del subtipo L, favoreciendo así una liberación más sostenida como hemos observado a lo largo del minuto de estimulación (**Figura 47**). Otra idea que apoya que el aumento de las corrientes de Ca^{2+} podría ser en gran parte de tipo L, es el aumento proporcional que se observa en la PHP del PA (dependiente de los canales BK y SK) que hemos visto a lo largo de la edad, ya que se ha descrito una estrecha dependencia entre los CCDV del subtipo L y los canales SK (Vandael *et al.*, 2012) y BK (Vandael *et al.*, 2010).

En cuanto a la despolarización producida por la ACh, no hemos encontrado una clara explicación que justifique que, sin verse afectadas significativamente con la edad las corrientes nicotínicas (**Figura 26**) y produciéndose un aumento del resto de corrientes iónicas, ésta disminuya durante el envejecimiento (**Figura 42**). Sin embargo, existen varias posibilidades que podrían explicar el hecho de que la ACh produzca una secreción de catecolaminas similar a lo largo de la edad, a pesar de que se produzca un aumento de la I_{Ca} . En primer lugar, junto con la menor despolarización del V_m en respuesta a ACh, hemos encontrado un aumento del número de PAs que se producen en respuesta al estímulo con ACh. Esto sería consecuencia del mayor tiempo que pasa el V_m en una situación propensa al disparo de PAs, es decir, ni

demasiado despolarizado para no poder generarlos (como ocurre a edades tempranas en ambas cepas, o con la aplicación de K^+) pero lo suficientemente despolarizado como para poder superar el potencial umbral, el cual se hiperpolariza a lo largo de la edad facilitando esta situación. Como hemos explicado en el párrafo anterior, los CCDV del subtipo L están más asociados a la secreción inducida por elevadas y largas despolarizaciones, por lo que, la menor despolarización que se observa a lo largo de la edad, en respuesta a ACh (la cual no llega -40 mV, voltaje en el que comienzan a abrirse los CCDV), produciría una menor entrada de Ca^{2+} a través de los canales del subtipo L y, con ello, una menor secreción. Sin embargo, también existe un componente de la secreción que estaría asociado al disparo de PAs y que se produce a través de los canales P/Q (ya que se activan con mayor rapidez que los canales del subtipo L) (Marcantoni *et al.*, 2007) por lo que, la mayor frecuencia de disparo de PAs (que favorecería la actividad de los canales P/Q) podría compensar el menor grado de despolarización. A pesar de ello, es posible que, la activación de los canales P/Q no resulte tan eficaz para inducir la secreción de catecolaminas y, por tanto, aunque aumenten significativamente la I_{Ca} , la secreción en respuesta a ACh se mantiene.

Otra de las posibles explicaciones a estas diferencias en la secreción entre la ACh y el K^+ , viene de la mano de lo que se comentaba al principio de esta Discusión. Ambos estímulos producen diferentes señales transitorias de $[Ca^{2+}]_c$ y, por lo tanto, diferentes formas en que la CC va a aclarar los niveles elevados de dicho catión (Cuchillo-Ibáñez *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta el aumento de las corrientes de Ca^{2+} y las alteraciones en las organelas intracelulares (que limitan la capacidad para aclarar el Ca^{2+}) que se producen a lo largo del envejecimiento (Murchison y Griffith, 1999), no sería de extrañar que ante un estímulo de K^+ con transitorios de $[Ca^{2+}]_c$ que inundan muy rápidamente todo el citosol, la CC no pueda disiparlo eficazmente y ello favorezca el transporte vesicular desde zonas más profundas en el citosol hacia las zonas activas de exocitosis y con ello se favorezca la liberación de un mayor número de vesículas. En el caso de la ACh, al generarse señales transitorias de $[Ca^{2+}]_c$ más pequeñas y localizadas, las organelas intracelulares podrían tamponarlo y mantener la liberación de catecolaminas constante.

A pesar de que en este trabajo no se han estudiado los receptores muscarínicos, no podemos olvidarnos de la variedad de efectos que puede producir su activación en las células cromafines (liberación de Ca^{2+} intracelular, activación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales catiónicos no selectivos y CCDV e incluso inicio o aumento de los PAs), de su naturaleza más duradera y de su participación en la secreción de catecolaminas (Olivos y Artalejo, 2008).

Diversos trabajos han descrito una menor expresión de receptores muscarínicos en el SNC durante el envejecimiento (Biegon *et al.*, 1989; Yufu *et al.*, 1994), por lo que una menor expresión o actividad de dichos receptores en la célula cromafín, también podría contribuir a explicar cómo, a pesar del aumento de las corrientes de Ca^{2+} , la ACh llega a producir no produce un aumento de la secreción de catecolaminas a lo largo del envejecimiento.

Para finalizar esta Discusión, y en relación con la Hipótesis de esta Tesis Doctoral, podemos plantearnos si las diversas alteraciones que hemos observado en diversos elementos participantes en el acoplamiento estímulo-secreción en este modelo de neurosecreción se corresponden a cambios propios que sufre la propia célula cromafín adrenomedular a lo largo de la edad y/o a mecanismos compensatorios que se producen en la célula cromafín en respuesta a las alteraciones que ocurren a nivel del SNC y que se reflejan en la célula cromafín a través del eje simpático-adrenomedular.

En primer lugar, a favor de la posibilidad de que se trate de cambios propios de la célula cromafín, cabe comentar que las diversas alteraciones que hemos descrito que acontecen en la célula cromafín durante el envejecimiento podrían asemejarse a las que se producen en otras neuronas del SNC (dada las similitudes funcionales entre éstas y las CCs). Asumiendo este hecho, una liberación de neurotransmisores más lenta y una hipoexcitabilidad como la que hemos visto en la célula cromafín durante el envejecimiento, podría implicar una menor neurotransmisión en el SNC como se ha podido observar en diferentes trabajos (Disterhoft *et al.*, 1996; Gant *et al.*, 2006; Hindle, 2010) y ello explicar los déficits en procesos como el aprendizaje y la memoria que se observan en nuestros ratones SAMP8 a los 6 y 12 meses de edad.

Las alteraciones de la excitabilidad celular podrían estar en relación con un posible desequilibrio en la homeostasia del Ca^{2+} debida, por ejemplo, al aumento de las corrientes a través de los CCDV que hemos podido observar en las CCs de nuestros ratones que, en definitiva incrementa también las corrientes SK y BK. Este desequilibrio en la forma en la que la CC maneja el Ca^{2+} , también sucede en el SNC, donde se ha visto que durante el envejecimiento hay un aumento en la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDVs (Landfield y Pitler, 1984; Thibault y Landfield, 1996), una disminución de la salida de Ca^{2+} a través de las bombas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) (Michaelis *et al.*, 1996), un aumento de la liberación de Ca^{2+} desde el RE mediada por los receptores de IP_3 y los RyRs (Thibault *et al.*, 2007), un aumento en la CICR (Gant *et al.*, 2006), una disminución de la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA (Lehohla *et al.*, 2008), un deterioro de la SERCA y una

disminución en la capacidad de aclaramiento del Ca^{2+} por parte de la mitocondria (Murchison y Griffith, 1999). Todas estas alteraciones que acontecen a lo largo del envejecimiento tanto en la neurona como en la célula cromafin podrían conducir a un mismo proceso, un aumento basal de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular.

En la EA se producen cambios muy similares que también conducen a un aumento mantenido del Ca^{2+} , sin embargo, en esta patología se produce incluso un mayor número de alteraciones debido a la patología A β . Así, por ejemplo, oligómeros de A β : favorecen la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDVs, con mayor especificidad por los canales del subtipo L aunque también a través de los del subtipo N (Silei *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2007); se ha observado un aumento de la expresión y la función de los RyRs (Kelliher *et al.*, 1999) y que las mutaciones en la presinilina 1 y 2 (PS1 y PS2) producen un incremento del flujo de Ca^{2+} desde el RE mediado por IP_3 (Leissring *et al.*, 1999; Leissring *et al.*, 2000); el péptido A β agregado produce la apertura de los receptores ionotrópicos activados por glutamato de tipo NMDA y AMPA ((Domingues *et al.*, 2007; Ferreira y Klein, 2011); o la disminución del tamponamiento del Ca^{2+} a través de las mitocondrias (Giorgi *et al.*, 2012) entre otros efectos. Por lo tanto, no es de extrañar que en la EA se haya descrito una disminución de la transmisión sináptica asociada al aumento del Ca^{2+} y de la PHP (Kaczorowski *et al.*, 2011). Sin embargo, otros autores describen una correlación entre una hiperexcitabilidad del SN con la EA, habiéndose visto un aumento en la excitabilidad de neuronas corticales y del giro dentado junto con un aumento en la probabilidad de liberación vesicular en diferentes modelos de EA (Chakroborty *et al.*, 2012; Hazra *et al.*, 2013; Busche y Konnerth, 2016). En la célula cromafin del modelo 3xTg de EA, nuestro grupo ha encontrado también un aumento en la liberación de catecolaminas y una mayor excitabilidad del V_m ante un pulso de ACh (Nanclares, 2017). Estas diferencias entre lo que ocurre durante el envejecimiento y lo que ocurre en la EA podrían ser importantes a la hora de entender por qué en el EA se produce una muerte neuronal importante asociada a los déficits cognitivos mientras que, en el envejecimiento, aunque se altere la cognición, no se produce una excesiva muerte neuronal.

Con respecto a la posibilidad de que las alteraciones que hemos encontrado en las CCs de los ratones SAM en realidad sean un reflejo de alteraciones del SNC que producen cambios en la actividad del eje ESAM, podemos comentar que se ha descrito que durante el envejecimiento la actividad basal del SN simpático aumenta en distintas partes del organismo (Iwase *et al.*, 1991; Seals y Esler, 2000; Hotta y Uchida, 2010; Piazza *et al.*, 2010). A modo de ejemplo, en 1986, Ito y colaboradores, describieron un aumento en la actividad de las fibras

simpáticas preganglionares que se dirigen a la glándula adrenal a medida que aumentaba la edad en ratas. Además, también observaron un incremento en la liberación de catecolaminas, tanto de adrenalina como de noradrenalina con el envejecimiento de éstas (Ito *et al.*, 1986).

Aunque, como se ha comentado en la Introducción, la medida de los niveles de catecolaminas plasmáticas durante el envejecimiento no resulta muy fiable debido a su degradación, lo que genera mucha controversia, se ha descrito un aumento de los niveles plasmáticos de noradrenalina, indicando un aumento en la actividad del SNA, pero sin cambios en los niveles de adrenalina, lo que podría deberse a un aumento en la degradación de ésta amina (Morrow *et al.*, 1987; Esler *et al.*, 1995; Seals y Esler, 2000). Como se describe en el trabajo realizado por Douglas Seals y colaboradores, los aumentos relacionados con la edad en la actividad periférica del SN simpático en condiciones de reposo, se puede deber a un incremento primario en la descarga simpática generada por el SNC (Seals y Esler, 2000). Además, en la reactividad del eje ESAM también intervienen diferentes características del individuo que pueden variar a lo largo de la edad como son el control del estrés, la incertidumbre, el miedo o la ira. A medida que las situaciones o factores estresantes aumentan en su cronicidad, su frecuencia y/o su duración durante el envejecimiento, la actividad simpática también aumenta (Piazza *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta estos datos, no sería de extrañar que en los ratones utilizados en esta Tesis Doctoral se pudiera estar produciendo un aumento del tono basal del eje ESAM a lo largo de su envejecimiento. Es posible que, además, en los ratones más viejos, debido a factores externos estresantes y a su menor capacidad para afrontarlos, se produzca una exacerbación de la activación de este eje. De este modo, un aumento en la estimulación de las células cromafines adrenales que se cronifica durante el envejecimiento, podría poner en marcha mecanismos compensatorios que generarían un estado de menor excitabilidad, como muestran nuestros resultados. Este sería un intento de la célula cromafín para disminuir o, por lo menos, no incrementar aún más la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo que podrían producir daños a nivel sistémico.

Dada la hipótesis aquí sugerida y su posible relación con la EA, se ha observado tanto en pacientes como en diferentes modelos murinos que el estrés está íntimamente involucrado en el desarrollo y la progresión de la enfermedad. Esta enfermedad implica la pérdida devastadora de la función cognitiva, que es estresante en sí misma, pero también puede alterar los circuitos neuronales que median las respuestas al estrés. Además, un estrés crónico impulsa

la progresión de la enfermedad y puede exacerbar los síntomas. A esto se le ha denominado el “círculo vicioso del estrés” (Justice, 2018).

En la CC del modelo murino 3xTg de EA, se han descrito numerosas similitudes con las alteraciones observadas en esta Tesis Doctoral, sin embargo, dos diferencias destacan, una mayor excitabilidad ante un estímulo, y una mayor liberación de catecolaminas (Nanclares, 2017). Es posible que, durante el progreso de esta enfermedad neurodegenerativa tan devastadora, los mecanismos compensatorios que hemos observado durante el envejecimiento de la CC fallen, incrementado la respuesta al estrés y ésta, la progresión de la enfermedad.

**“La ciencia progresa mejor cuando las observaciones nos obligan a
alterar nuestras preconcepciones”**

Vera Cooper Rubin. Astrónoma estadounidense (1928-2016).

VI. CONCLUSIONES

Esta Tesis Doctoral ha tenido como principal objetivo el estudio de las posibles alteraciones que acontecen en el acoplamiento estímulo-secreción durante el envejecimiento en la célula cromafín, utilizando el modelo murino de senescencia acelerada SAMP8, así como la caracterización de los posibles mecanismos implicados en estas alteraciones.

De los resultados obtenidos en este trabajo, al igual que de su análisis y discusión, podemos extraer las siguientes conclusiones:

- I. Hemos encontrado déficits en el aprendizaje y la memoria espacial de los ratones SAMP8 a los 6 y 12 meses.
- II. Se ha observado un aumento de la I_{Ca} , la I_{Na} y las $I_{K(Ca)}$ durante el envejecimiento, ocurriendo éstas a los 6 y 12 meses en los ratones SAMP8, pero también en los ratones SAMR1 a edades más tardías (a los 12 meses).
- III. El incremento de las corrientes iónicas viene acompañado de un aumento en el número de vesículas sinápticas liberadas y, por ende, en la cantidad de neurotransmisor tras la estimulación con alto K^+ . Sin embargo, tras la estimulación con ACh no se observan estos cambios, manteniéndose una secreción estable a lo largo de la edad.
- IV. La liberación del neurotransmisor ocurre de manera más lenta, pero manteniéndose el contenido cuantal de las vesículas individuales, durante el envejecimiento de ambas cepas de ratones, tanto en respuesta al estímulo de alto K^+ como al de ACh.
- V. Durante el envejecimiento se produce una hipoexcitabilidad de la célula cromafín caracterizada por una hiperpolarización del V_m en reposo, una hiperpolarización del potencial umbral de disparo y una reducción en la frecuencia de disparo de potenciales de acción.
- VI. Los potenciales de acción generados espontáneamente o provocados por un estímulo en la célula cromafín son de mayor amplitud, de mayor anchura y con una post-hiperpolarización mayor a medida que progresa el envejecimiento, ocurriendo más precozmente en los ratones SAMP8 (a los 6 y 12 meses) que en los SAMR1 (a los 12

meses). Esto, origina un mayor intervalo entre potenciales de acción y una disminución de la frecuencia de disparo ante un estímulo despolarizante.

- VII. La despolarización del V_m inducida por la aplicación de un pulso de ACh disminuye a los 6 y 12 meses en los ratones SAMP8 y a los 12 meses en los SAMR1, acompañándose ésta de un incremento en el número de PA. Por el contrario, la despolarización producida por alto K^+ no sufre variaciones durante el envejecimiento y no genera el disparo de potenciales de acción.
- VIII. No se han encontrado diferencias relevantes en la expresión de proteínas implicadas en la exocitosis (SNAP-25, syntaxina 1, dinamina 1-2, sinaptotagmina 1) ni en el hipocampo ni en la corteza cerebral de los ratones SAMP8 y SAMR1. Se han detectado niveles elevados de la proteína tau fosforilada en el hipocampo de los ratones SAMP8 a los 12 meses.

Aunando estos hallazgos, podríamos inferir que durante el envejecimiento se produce una hipoexcitabilidad de las células cromafines (que se observa más precozmente en el modelo de senescencia acelerada SAMP8, en comparación con lo que ocurre en el modelo de envejecimiento “normal” SAMR1), lo que modula la neurotransmisión ante un estímulo estresante. Estas alteraciones que se producen en la célula cromafín adrenomedular podrían corresponder a mecanismos compensatorios que se producen con la edad o, si se producen también a nivel del sistema nervioso central, ser el inicio o la causa de esa situación patológica. Finalmente, las alteraciones relacionadas con el envejecimiento aquí descritas podrían ayudar a esclarecer la delgada línea que separa el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas.

**“Un libro abierto es un cerebro que habla; cerrado, un amigo que espera;
olvidado, un alma que perdona; destruido, un corazón que llora”**

Proverbio hindú.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adelman JP, Maylie J y Sah P** (2012). Small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels: form and function. *Annu Rev Physiol* 74: 245-269.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G y Wyss-Coray T** (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21: 383-421.
- Albiñana E, Segura-Chama P, Baraibar AM, Hernández-Cruz A y Hernández-Guijo JM** (2015). Different contributions of calcium channel subtypes to electrical excitability of chromaffin cells in rat adrenal slices. *J Neurochem* 133: 511-521.
- Alvarez YD, Ibanez LI, Uchitel OD y Marengo FD** (2008). P/Q Ca^{2+} channels are functionally coupled to exocytosis of the immediately releasable pool in mouse chromaffin cells. *Cell Calcium* 43: 155-164.
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN y Murtagh FR** (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 8: 429-431.
- Amatore C, Arbault S, Bouret Y, Guille M, Lemaitre F y Verchier Y** (2009). Invariance of exocytotic events detected by amperometry as a function of the carbon fiber microelectrode diameter. *Anal Chem* 81: 3087-3093.
- Appel NM y Elde RP** (1988). The intermediolateral cell column of the thoracic spinal cord is comprised of target-specific subnuclei: evidence from retrograde transport studies and immunohistochemistry. *J Neurosci* 8: 1767-1775.
- Artalejo AR** (1995). Electrical properties of adrenal chromaffin cells. *En: "The electrophysiology of neuroendocrines cells" Eds H Scherubl and Hescheler, J CRC Press INC: 259-299.*
- Aziz NA, van der Marck MA, Pijl H, Olde Rikkert MG, Bloem BR y Roos RA** (2008). Weight loss in neurodegenerative disorders. *J Neurol* 255: 1872-1880.
- Azuma K, Zhou Q y Kubo KY** (2018). Morphological and molecular characterization of the senile osteoporosis in senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6). *Med Mol Morphol* 51: 139-146.
- Baraibar AM, de Pascual R, Camacho M, Domínguez N, Machado JD, Gandía L y Borges R** (2018). Distinct patterns of exocytosis elicited by Ca^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch* 470: 1459-1471
- Barrow PA, Empson RM, Gladwell SJ, Anderson CM, Killick R, Yu X, Jefferys JG y Duff K** (2000). Functional phenotype in transgenic mice expressing mutant human presenilin-1. *Neurobiol Dis* 7: 119-126.

- Biegon A, Hanau M, Greenberger V y Segal M** (1989). Aging and brain cholinergic muscarinic receptor subtypes: an autoradiographic study in the rat. *Neurobiol Aging* 10: 305-310.
- Bjorksten J y Tenhu H** (1990). The crosslinking theory of aging--added evidence. *Exp Gerontol* 25: 91-95.
- Bodea LG, Evans HT, Van der Jeugd A, Ittner LM, Delerue F, Kril J, Halliday G, Hodges J, Kiernan MC y Gotz J** (2017). Accelerated aging exacerbates a pre-existing pathology in a tau transgenic mouse model. *Aging Cell* 16: 377-386.
- Bodhinathan K, Kumar A y Foster TC** (2010). Redox sensitive calcium stores underlie enhanced after hyperpolarization of aged neurons: role for ryanodine receptor mediated calcium signaling. *J Neurophysiol* 104: 2586-2593.
- Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, Kollias G y Cleveland DW** (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* 312: 1389-1392.
- Bon S, Bader MF, Aunis D, Massoulie J y Henry JP** (1990). Subcellular distribution of acetylcholinesterase forms in chromaffin cells. Do chromaffin granules contain a specific secretory acetylcholinesterase? *Eur J Biochem* 190: 221-232.
- Bond CT, Maylie J y Adelman JP** (2005). SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Curr Opin Neurobiol* 15: 305-311.
- Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Androutsellis-Theotokis A, Eisenhofer G, Vukicevic V, Licinio J, Wong ML, Calissano P, Nistico G, Preziosi P y Levi-Montalcini R** (2012). Chromaffin cells: the peripheral brain. *Mol Psychiatry* 17: 354-358.
- Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y y Miyazaki S** (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol* 263: 417-439.
- Bronner-Fraser M** (1994). Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *FASEB J* 8: 699-706.
- Busche MA y Konnerth A** (2016). Impairments of neural circuit function in Alzheimer's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371.
- Butterfield DA y Poon HF** (2005). The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 40: 774-783.
- Calvo-Gallardo E, de Pascual R, Fernández-Morales JC, Arranz-Tagarro JA, Maroto M, Nanclares C, Gandía L, de Diego AM, Padín JF y García AG** (2015). Depressed excitability and ion currents linked to slow exocytotic fusion pore in chromaffin cells of the SOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 308: C1-19.
- Calvo-Gallardo E, Lopez-Gil A, Mendez-Lopez I, Martinez-Ramirez C, Padin JF y Garcia AG** (2016). Faster kinetics of quantal catecholamine release in mouse chromaffin

- cells stimulated with acetylcholine, compared with other secretagogues. *J Neurochem* 139: 722-736.
- Camacho M, Montesinos MS, Machado JD y Borges R** (2003). La excitosis como mecanismo de comunicación neuronal. Una visión desde la célula cromafin. *Rev Neurol* 36: 0355-0360.
- Cannon WB** (1914). The emergy function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *Am J Physiol* 33: 356-372.
- Cannon WB** (1920) *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage; an account of recent researches into the function of emotional excitement*. D. Appleton and Company: New York, London.
- Canudas AM, Gutiérrez-Cuesta J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A y Pallás M** (2005). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev* 126: 1300-1304.
- Carmichael SW y Winkler H** (1985). The adrenal chromaffin cell. *Sci Am* 253: 40-49.
- Casadesus G, Gutiérrez-Cuesta J, Lee HG, Jiménez A, Tajés M, Ortuno-Sahagun D, Camins A, Smith MA y Pallás M** (2012). Neuronal cell cycle re-entry markers are altered in the senescence accelerated mouse P8 (SAMP8). *J Alzheimers Dis* 30: 573-583.
- Catterall WA, Goldin AL y Waxman SG** (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57: 397-409.
- Ceña V, Nicolás GP, Sánchez-García P, Kirpekar SM y García AG** (1983). Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience* 10: 1455-1462.
- Cesari M, Kritchevsky SB, Leeuwenburgh C y Pahor M** (2006). Oxidative damage and platelet activation as new predictors of mobility disability and mortality in elders. *Antioxid Redox Signal* 8: 609-619.
- Chakroborty S, Kim J, Schneider C, Jacobson C, Molgo J y Stutzmann GE** (2012). Early presynaptic and postsynaptic calcium signaling abnormalities mask underlying synaptic depression in presymptomatic Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 32: 8341-8353.
- Chen GH, Wang YJ, Qin S, Yang QG, Zhou JN y Liu RY** (2007). Age-related spatial cognitive impairment is correlated with increase of synaptotagmin 1 in dorsal hippocampus in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 28: 611-618.
- Chen GH, Wang YJ, Wang XM y Zhou JN** (2004). Accelerated senescence prone mouse-8 shows early onset of deficits in spatial learning and memory in the radial six-arm water maze. *Physiol Behav* 82: 883-890.
- Cheng XR, Zhou WX y Zhang YX** (2014). The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model. *Ageing Res Rev* 13: 13-37.

- Chu Y y Kordower JH** (2007). Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiol Dis* 25: 134-149.
- Ciechanover A y Kwon YT** (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med* 47: e147.
- Cocchia D y Michetti F** (1981). S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 215: 103-112.
- Colliver TL, Hess EJ y Ewing AG** (2001). Amperometric analysis of exocytosis at chromaffin cells from genetically distinct mice. *J Neurosci Methods* 105: 95-103.
- Colliver TL, Hess EJ, Pothos EN, Sulzer D y Ewing AG** (2000). Quantitative and statistical analysis of the shape of amperometric spikes recorded from two populations of cells. *J Neurochem* 74: 1086-1097.
- Coupland RE** (1965) *The natural history of the chromaffin cell*. Longmans.
- Cuchillo-Ibáñez I, Olivares R, Aldea M, Villarroya M, Arroyo G, Fuentealba J, García AG y Albillos A** (2002). Acetylcholine and potassium elicit different patterns of exocytosis in chromaffin cells when the intracellular calcium handling is disturbed. *Pflugers Arch* 444: 133-142.
- Curtis HJ y Cole KS** (1940). Membrane action potentials from the squid giant axon. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 15: 147-157.
- Cutler RG** (1991). Recent progress in testing the longevity determinant and dysdifferentiation hypotheses of aging. *Arch Gerontol Geriatr* 12: 75-98.
- de Calignon A, Polydoro M, Suarez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pittstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spires-Jones TL y Hyman BT** (2012). Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 73: 685-697.
- de Diego AM, Lorrio S, Calvo-Gallardo E y García AG** (2012). Smaller quantal size and faster kinetics of single exocytotic events in chromaffin cells from the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 428: 482-486.
- Decker MW** (1987). The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain Res* 434: 423-438.
- Del Castillo J y Katz B** (1954). Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124: 560-573.
- Del Valle J, Durán-Vilaregut J, Manich G, Casadesus G, Smith MA, Camins A, Pallás M, Pelegrí C y Vilaplana J** (2010). Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* 19: 1303-1315.
- Delerue F, Sjollem G, Whittle B, Kruger S, Andrews D y Gotz J** (2013). Single nucleotide variants (SNVs) define senescence-accelerated SAMP8 mice, a model of a geriatric condition. *J Alzheimers Dis* 36: 349-363.

- Dellu F, Mayo W, Cherkaoui J, Le Moal M y Simon H** (1992). A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. *Brain Res* 588: 132-139.
- Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, Jiang H, Hirano M, Rampersaud E, Jansen GH, Donkervoort S, Bigio EH, Brooks BR, Ajroud K, Sufit RL, Haines JL, Mugnaini E, Pericak-Vance MA y Siddique T** (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477: 211-215.
- Desaphy JF, De Luca A, Imbrici P y Conte Camerino D** (1998). Modification by ageing of the tetrodotoxin-sensitive sodium channels in rat skeletal muscle fibres. *Biochim Biophys Acta* 1373: 37-46.
- Disterhoft JF, Thompson LT, Moyer JR, Jr. y Mogul DJ** (1996). Calcium-dependent afterhyperpolarization and learning in young and aging hippocampus. *Life Sci* 59: 413-420.
- Domingues A, Almeida S, da Cruz e Silva EF, Oliveira CR y Rego AC** (2007). Toxicity of beta-amyloid in HEK293 cells expressing NR1/NR2A or NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Neurochem Int* 50: 872-880.
- Douglas WW y Rubin RP** (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159: 40-57.
- Douglas WW y Rubin RP** (1963). The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J Physiol* 167: 288-310.
- Esch T, Stefano GB, Fricchione GL y Benson H** (2002). The role of stress in neurodegenerative diseases and mental disorders. *Neuro Endocrinol Lett* 23: 199-208.
- Esler M, Kaye D, Thompson J, Jennings G, Cox H, Turner A, Lambert G y Seals D** (1995). Effects of aging on epinephrine secretion and regional release of epinephrine from the human heart. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 435-442.
- Esler M, Lambert G, Kaye D, Rumantir M, Hastings J y Seals DR** (2002). Influence of ageing on the sympathetic nervous system and adrenal medulla at rest and during stress. *Biogerontology* 3: 45-49.
- Estévez-Herrera J, González-Santana A, Baz-Dávila R, Machado JD y Borges R** (2016). The intravesicular cocktail and its role in the regulation of exocytosis. *J Neurochem* 137: 897-903.
- Etcheberrigaray R, Hirashima N, Nee L, Prince J, Govoni S, Racchi M, Tanzi RE y Alkon DL** (1998). Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families. *Neurobiol Dis* 5: 37-45.
- Euler USv** (1972). Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves. The effect of drugs. *Hand Exp Pharmacol* 33: 186-230.
- Fang Q, Berberian K, Gong LW, Hafez I, Sorensen JB y Lindau M** (2008). The role of the C terminus of the SNARE protein SNAP-25 in fusion pore opening and a model for fusion pore mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15388-15392.

- Farr SA, Sandoval KE, Niehoff ML, Witt KA, Kumar VB y Morley JE** (2016). Peripheral administration of GSK-3beta antisense oligonucleotide Improves learning and memory in SAMP8 and Tg2576 mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 54: 1339-1348.
- Farrell SR y Howlett SE** (2008). The age-related decrease in catecholamine sensitivity is mediated by beta(1)-adrenergic receptors linked to a decrease in adenylate cyclase activity in ventricular myocytes from male Fischer 344 rats. *Mech Ageing Dev* 129: 735-744.
- Fatt P y Katz B** (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117: 109-128.
- Feldberg W, Minz B y Tsudzimura H** (1934). The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J Physiol*: 286-304.
- Ferguson SA, Sarkar S y Schmued LC** (2013). Longitudinal behavioral changes in the APP/PS1 transgenic Alzheimer's disease model. *Behav Brain Res* 242: 125-134.
- Fernández R** (2004). Gerontología social. Madrid: Pirámide.
- Fernández-Morales JC, Cortés-Gil L, García AG y de Diego AM** (2009). Differences in the quantal release of catecholamines in chromaffin cells of rat embryos and their mothers. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C407-418.
- Ferreira ST y Klein WL** (2011). The Abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 96: 529-543.
- Flood JF y Morley JE** (1998). Learning and memory in the SAMP8 mouse. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 1-20.
- Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E y De Benedictis G** (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908: 244-254.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M y Wilcock GK** (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 137-147.
- Fujita T, Kanno T y Kobayashi S** (1988). Adrenal chromaffin cells. In *The paraneuron*. Springer-Verlag: Berlin, pp 135-144.
- Galvani L** (1791). De viribus electritatis in motu musculari commentarius. *Bon Sci Art Inst Acad Comm* 7: 363-418.
- Gandía L, García AG y Morad M** (1993). ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J Physiol* 470: 55-72.
- Gant JC, Sama MM, Landfield PW y Thibault O** (2006). Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *J Neurosci* 26: 3482-3490.
- García AG, García-De-Diego AM, Gandía L, Borges R y García-Sancho J** (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86: 1093-1131.

- García-Ruiz PJ, Chaudhuri KR y Martínez-Martín P** (2014). Non-motor symptoms of Parkinson's disease A review...from the past. *J Neurol Sci* 338: 30-33.
- Garré-Olmo J** (2018). [Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias]. *Rev Neurol* 66: 377-386.
- Gazulla J y Caverro-Nagore M** (2006). Glutamato y enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 42: 0427-0432.
- George AJ y Ritter MA** (1996). Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today* 17: 267-272.
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF y Sudhof TC** (1994). Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79: 717-727.
- Giorgi C, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Suski JM, Wieckowski MR y Pinton P** (2012). Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion* 12: 77-85.
- Gladyshev VN** (2014). The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxid Redox Signal* 20: 727-731.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ y Crowther RA** (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8: 159-168.
- Good TA, Smith DO y Murphy RM** (1996). Beta-amyloid peptide blocks the fast-inactivating K^+ current in rat hippocampal neurons. *Biophys J* 70: 296-304.
- Goyns MH y Lavery WL** (2000). Telomerase and mammalian ageing: a critical appraisal. *Mech Ageing Dev* 114: 69-77.
- Guerini FR, Agliardi C, Sironi M, Arosio B, Calabrese E, Zanzottera M, Bolognesi E, Ricci C, Costa AS, Galimberti D, Griffanti L, Bianchi A, Savazzi F, Mari D, Scarpini E, Baglio F, Nemni R y Clerici M** (2014). Possible association between SNAP-25 single nucleotide polymorphisms and alterations of categorical fluency and functional MRI parameters in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 42: 1015-1028.
- Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC y Mesulam MM** (2003). Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 60: 729-736.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B y Sigworth FJ** (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100.
- Hardy J y Allsop D** (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12: 383-388.
- Hardy J y Selkoe DJ** (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356.

- Harman D** (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
- Hayflick L y Moorhead PS** (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
- Hazra A, Gu F, Aulakh A, Berridge C, Eriksen JL y Ziburkus J** (2013). Inhibitory neuron and hippocampal circuit dysfunction in an aged mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 8: e64318.
- He Y, Zhu J, Huang F, Qin L, Fan W y He H** (2014). Age-dependent loss of cholinergic neurons in learning and memory-related brain regions and impaired learning in SAMP8 mice with trigeminal nerve damage. *Neural Regen Res* 9: 1985-1994.
- Hernández-Guijo JM, Carabelli V, Gandía L, García AG y Carbone E** (1999). Voltage-independent autocrine modulation of L-type channels mediated by ATP, opioids and catecholamines in rat chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 11: 3574-3584.
- Higuchi K** (1997). Genetic characterization of senescence-accelerated mouse (SAM). *Exp Gerontol* 32: 129-138.
- Hindle JV** (2010). Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Ageing* 39: 156-161.
- Hodgkin AL y Huxley AF** (1939). Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature* 144: 710.
- Hodgkin AL y Huxley AF** (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117: 500-544.
- Hotta H y Uchida S** (2010). Aging of the autonomic nervous system and possible improvements in autonomic activity using somatic afferent stimulation. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1: S127-136.
- Hou X, Parkington HC, Coleman HA, Mechler A, Martin LL, Aguilar MI y Small DH** (2007). Transthyretin oligomers induce calcium influx via voltage-gated calcium channels. *J Neurochem* 100: 446-457.
- Hu H, Shao LR, Chavoshy S, Gu N, Trieb M, Behrens R, Laake P, Pongs O, Knaus HG, Ottersen OP y Storm JF** (2001). Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J Neurosci* 21: 9585-9597.
- Ito K, Sato A, Sato Y y Suzuki H** (1986). Increases in adrenal catecholamine secretion and adrenal sympathetic nerve unitary activities with aging in rats. *Neurosci Lett* 69: 263-268.
- Iwase S, Mano T, Watanabe T, Saito M y Kobayashi F** (1991). Age-related changes of sympathetic outflow to muscles in humans. *J Gerontol* 46: M1-5.
- J-M. C y A. J** (1869). Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antéro-latérale. *Arch Physiol*: 744-760.

- Jahn R y Scheller RH** (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 631-643.
- Jellinger KA** (2004). Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J Neural Transm (Vienna)* 111: 1219-1235.
- Johnson MA, Villanueva M, Haynes CL, Seipel AT, Buhler LA y Wightman RM** (2007). Catecholamine exocytosis is diminished in R6/2 Huntington's disease model mice. *J Neurochem* 103: 2102-2110.
- Justice NJ** (2018). The relationship between stress and Alzheimer's disease. *Neurobiol Stress* 8: 127-133.
- Kaczorowski CC, Sametsky E, Shah S, Vassar R y Disterhoft JF** (2011). Mechanisms underlying basal and learning-related intrinsic excitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32: 1452-1465.
- Kanungo MS** (1980). Biochemistry of ageing. *New York Academic Press*.
- Karasawa N, Nagatsu I, Sakai K, Nagatsu T, Watanabe K y Onozuka M** (1997). Immunocytochemical study of catecholaminergic neurons in the senescence-accelerated mouse (SAM-P8) brain. *J Neural Transm (Vienna)* 104: 1267-1275.
- Kawagoe KT, Zimmerman JB y Wightman RM** (1993). Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *J Neurosci Methods* 48: 225-240.
- Keating DJ, Dubach D, Zanin MP, Yu Y, Martin K, Zhao YF, Chen C, Porta S, Arbones ML, Mittaz L y Pritchard MA** (2008). DSCR1/RCAN1 regulates vesicle exocytosis and fusion pore kinetics: implications for Down syndrome and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 17: 1020-1030.
- Kelliher M, Fastbom J, Cowburn RF, Bonkale W, Ohm TG, Ravid R, Sorrentino V y O'Neill C** (1999). Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and beta-amyloid pathologies. *Neuroscience* 92: 499-513.
- Khachaturian ZS** (1994). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci* 747: 1-11.
- Kidokoro Y y Ritchie AK** (1980). Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol* 307: 199-216.
- Kim HS, Moon S, Kim S, Lee MJ, Suk MH, Park DH, Shin DW, Park CS y Kang JH** (2017). Chronological changes in the expression of phosphorylated tau and 5AMPactivated protein kinase in the brain of senescenceaccelerated P8 mice. *Mol Med Rep* 15: 3301-3309.
- Kirkwood TB y Kowald A** (2012). The free-radical theory of ageing--older, wiser and still alive: modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support. *Bioessays* 34: 692-700.
- Kistner A, Lhomme E y Krack P** (2014). Mechanisms of body weight fluctuations in Parkinson's disease. *Front Neurol* 5: 84.

- Kitamura Y, Zhao XH, Ohnuki T, Takei M y Nomura Y** (1992). Age-related changes in transmitter glutamate and NMDA receptor/channels in the brain of senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* 137: 169-172.
- Klein RL y Thureson-Klein A** (1971). An electron microscopic study of noradrenaline storage vesicles isolated from bovine splenic nerve trunk. *J Ultrastruct Res* 34: 473-491.
- Knight EM, Verkhatsky A, Luckman SM, Allan SM y Lawrence CB** (2012). Hypermetabolism in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33: 187-193.
- Knight JA** (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 30: 145-158.
- Kurland LT y Mulder DW** (1955). Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. 2. Familial aggregations indicative of dominant inheritance. II. *Neurology* 5: 249-268.
- Landfield PW** (1988). Hippocampal neurobiological mechanisms of age-related memory dysfunction. *Neurobiol Aging* 9: 571-579.
- Landfield PW y Pitler TA** (1984). Prolonged Ca^{2+} -dependent afterhyperpolarizations in hippocampal neurons of aged rats. *Science* 226: 1089-1092.
- Lehohla M, Kellaway L y Russell VA** (2008). Effect of ageing on Ca^{2+} uptake via NMDA receptors into barrel cortex slices of spontaneously hypertensive rats. *Metab Brain Dis* 23: 1-8.
- Leissring MA, Akbari Y, Fanger CM, Cahalan MD, Mattson MP y LaFerla FM** (2000). Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J Cell Biol* 149: 793-798.
- Leissring MA, Parker I y LaFerla FM** (1999). Presenilin-2 mutations modulate amplitude and kinetics of inositol 1, 4,5-trisphosphate-mediated calcium signals. *J Biol Chem* 274: 32535-32538.
- Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Near JA y Wightman RM** (1990). Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. *J Biol Chem* 265: 14736-14737.
- Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Near JA y Wightman RM** (1991). Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem* 56: 1855-1863.
- Li G, Cheng H, Zhang X, Shang X, Xie H, Zhang X, Yu J y Han J** (2013). Hippocampal neuron loss is correlated with cognitive deficits in SAMP8 mice. *Neurol Sci* 34: 963-969.
- Lingle CJ, Martinez-Espinosa PL, Guarina L y Carbone E** (2018a). Roles of Na^{+} , Ca^{2+} , and K^{+} channels in the generation of repetitive firing and rhythmic bursting in adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch* 470: 39-52.

- Lingle CJ, Martínez-Espinosa PL, Guarina L y Carbone E** (2018b). Roles of Na⁺, Ca²⁺, and K⁺ channels in the generation of repetitive firing and rhythmic bursting in adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch* 470: 39-52.
- Liochev SI** (2015). Reflections on the theories of aging, of oxidative stress, and of science in general. Is It time to abandon the free radical (oxidative stress) theory of aging? *Antioxid Redox Signal* 23: 187-207.
- Livett BG** (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev* 64: 1103-1161.
- Logan T, Bendor J, Toupin C, Thorn K y Edwards RH** (2017). alpha-Synuclein promotes dilation of the exocytotic fusion pore. *Nat Neurosci* 20: 681-689.
- López MG, Albillos A, de la Fuente MT, Borges R, Gandía L, Carbone E, García AG y Artalejo AR** (1994). Localized L-type calcium channels control exocytosis in cat chromaffin cells. *Pflugers Arch* 427: 348-354.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M y Kroemer G** (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194-1217.
- López-Ramos JC, Jurado-Parras MT, Sanfeliu C, Acuña-Castroviejo D y Delgado-García JM** (2012). Learning capabilities and CA1-prefrontal synaptic plasticity in a mice model of accelerated senescence. *Neurobiol Aging* 33: 627 e613-626.
- Machado JD, Montesinos MS y Borges R** (2008). Good practices in single-cell amperometry. *Methods Mol Biol* 440: 297-313.
- Mackenzie KD, Duffield MD, Peiris H, Phillips L, Zanin MP, Teo EH, Zhou XF y Keating DJ** (2014). Huntingtin-associated protein 1 regulates exocytosis, vesicle docking, readily releasable pool size and fusion pore stability in mouse chromaffin cells. *J Physiol* 592: 1505-1518.
- Magnusson KR** (2012). Aging of the NMDA receptor: from a mouse's point of view. *Future Neurol* 7: 627-637.
- Mahapatra S, Calorio C, Vandael DH, Marcantoni A, Carabelli V y Carbone E** (2012). Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis. *Cell Calcium* 51: 321-330.
- Marcantoni A, Baldelli P, Hernández-Guijo JM, Comunanza V, Carabelli V y Carbone E** (2007). L-type calcium channels in adrenal chromaffin cells: role in pace-making and secretion. *Cell Calcium* 42: 397-408.
- Marcantoni A, Vandael DH, Mahapatra S, Carabelli V, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J y Carbone E** (2010). Loss of Cav1.3 channels reveals the critical role of L-type and BK channel coupling in pacemaking mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 30: 491-504.
- Martínez-Ramírez C, Baraibar AM, Nanclares C, Méndez-López I, Gómez A, Muñoz MP, de Diego AMG, Gandía L, Casarejos MJ y García AG** (2018). Altered excitability and exocytosis in chromaffin cells from the R6/1 mouse model of Huntington's disease is linked to overexpression of mutated huntingtin. *J Neurochem* (in press).

- Martins RN, Harper CG, Stokes GB y Masters CL** (1986). Increased cerebral glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease may reflect oxidative stress. *J Neurochem* 46: 1042-1045.
- Marty A y Neher E** (1985). Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 367: 117-141.
- Medvedev ZA** (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65: 375-398.
- Michaelis ML, Bigelow DJ, Schoneich C, Williams TD, Ramonda L, Yin D, Huhmer AF, Yao Y, Gao J y Squier TC** (1996). Decreased plasma membrane calcium transport activity in aging brain. *Life Sci* 59: 405-412.
- Miquel J y Fleming JE** (1984). A two-step hypothesis on the mechanisms of in vitro cell aging: cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial mutagenesis. *Exp Gerontol* 19: 31-36.
- Miranda-Ferreira R, de Pascual R, Caricati-Neto A, Gandía L, Jurkiewicz A y García AG** (2009). Role of the endoplasmic reticulum and mitochondria on quantal catecholamine release from chromaffin cells of control and hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 231-240.
- Miranda-Ferreira R, de Pascual R, de Diego AM, Caricati-Neto A, Gandía L, Jurkiewicz A y García AG** (2008). Single-vesicle catecholamine release has greater quantal content and faster kinetics in chromaffin cells from hypertensive, as compared with normotensive, rats. *J Pharmacol Exp Ther* 324: 685-693.
- Miranda-Ferreira R, de Pascual R, Smaili SS, Caricati-Neto A, Gandía L, García AG y Jurkiewicz A** (2010). Greater cytosolic and mitochondrial calcium transients in adrenal medullary slices of hypertensive, compared with normotensive rats. *Eur J Pharmacol* 636: 126-136.
- Mitchell JH** (1980). Biomedical instrumentation and measurements: (Second edition) by L. Cromwell, F. J. Weibell and E. A. Pfeiffer, Prentice-Hall Inc., New Jersey, U.S.A., 1980, ISBN 0-13-076448-5. *International Journal of Bio-Medical Computing* 11: 531.
- Miyamoto M** (1997). Characteristics of age-related behavioral changes in senescence-accelerated mouse SAMP8 and SAMP10. *Exp Gerontol* 32: 139-148.
- Miyamoto M, Kiyota Y, Yamazaki N, Nagaoka A, Matsuo T, Nagawa Y y Takeda T** (1986). Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav* 38: 399-406.
- Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farias GA y Maccioni RB** (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci* 8: 112.
- Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N y Flood JF** (2000). Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides* 21: 1761-1767.

- Morrow LA, Linares OA, Hill TJ, Sanfield JA, Supiano MA, Rosen SG y Halter JB** (1987). Age differences in the plasma clearance mechanisms for epinephrine and norepinephrine in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 508-511.
- Mosharov EV y Sulzer D** (2005). Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods* 2: 651-658.
- Murchison D y Griffith WH** (1999). Age-related alterations in caffeine-sensitive calcium stores and mitochondrial buffering in rat basal forebrain. *Cell Calcium* 25: 439-452.
- Nagayama T, Matsumoto T, Kuwakubo F, Fukushima Y, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, Kimura T y Satoh S** (1999). Role of calcium channels in catecholamine secretion in the rat adrenal gland. *J Physiol* 520 Pt 2: 503-512.
- Nanclares C** (2017). Alteraciones de la neurotransmisión relacionadas con la progresión de la enfermedad de Alzheimer en ratones transgénicos 3xTg-AD. *Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Madrid*.
- Nanclares C, Baraibar AM y Gandía L** (2018). L-type calcium channels in exocytosis and endocytosis of chromaffin cells. *Pflugers Arch* 470: 53-60.
- Nassar-Gentina V, Catalán L y Luxoro M** (1997). Nicotinic and muscarinic components in acetylcholine stimulation of porcine adrenal medullary cells. *Mol Cell Biochem* 169: 107-113.
- Nassar-Gentina V, Pollard HB y Rojas E** (1988). Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am J Physiol* 254: C675-683.
- Neher E y Marty A** (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6712-6716.
- Niccoli T, Partridge L y Isaacs AM** (2017). Ageing as a risk factor for ALS/FTD. *Human Molecular Genetics* 26: R105-R113.
- Nikoletopoulou V y Tavernarakis N** (2012). Calcium homeostasis in aging neurons. *Front Genet* 3: 200.
- Nooney JM, Peters JA y Lambert JJ** (1992). A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture. *J Physiol* 455: 503-527.
- Oh MM, Oliveira FA y Disterhoft JF** (2010). Learning and aging related changes in intrinsic neuronal excitability. *Front Aging Neurosci* 2: 2.
- Ohta A, Akiguchi I, Seriu N, Ohnishi K, Yagi H, Higuchi K y Hosokawa M** (2001). Deterioration in learning and memory of fear conditioning in response to context in aged SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 22: 479-484.
- Olivos L y Artalejo AR** (2008). Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192: 213-220.

- OMS** (2015). Organización Mundial de la Salud. (2015). Informe mundial sobre el envejecimiento y la salud. Obtenido de: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186466/9789240694873_spa.pdf;jsessionid=0C70FF97EF5CEB6400FDCDD203CE907C?sequence=1.
- Orejana L, Barros-Minones L, Jordan J, Puerta E y Aguirre N** (2012). Sildenafil ameliorates cognitive deficits and tau pathology in a senescence-accelerated mouse model. *Neurobiol Aging* 33: 625 e611-620.
- Orgel LE** (1963). The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 49: 517-521.
- Orozco C, Garcia-de-Diego AM, Arias E, Hernandez-Guijo JM, Garcia AG, Villarroya M y Lopez MG** (2006). Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Pharmacol* 553: 28-38.
- Oshima J, Martin GM y Hisama FM** (2013). The Biological Basis of Aging: Implications for Medical Genetics. In Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. eds Rimoin D., Pyeritz R., & Korf B. Academic Press: Oxford, pp 1-19.
- Pang KC, Miller JP, Fortress A y McAuley JD** (2006). Age-related disruptions of circadian rhythm and memory in the senescence-accelerated mouse (SAMP8). *Age (Dordr)* 28: 283-296.
- Park CB y Larsson NG** (2011). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol* 193: 809-818.
- Parkinson J** (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14: 223-236; discussion 222.
- Patterson CL, C. Bliss A, Lefevre, M. Weidner, W.** (2018). World Alzheimer Report 2018. The state of the art of dementia research: New frontiers. Obtenido de: <https://www.alzco.uk/news/world-alzheimer-report-2018-state-of-art-of-dementia-research-new-frontiers>.
- Pedarzani P, Mosbacher J, Rivard A, Cingolani LA, Oliver D, Stocker M, Adelman JP y Fakler B** (2001). Control of electrical activity in central neurons by modulating the gating of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Biol Chem* 276: 9762-9769.
- Pelegrí C, Canudas AM, del Valle J, Casadesus G, Smith MA, Camins A, Pallás M y Vilaplana J** (2007). Increased permeability of blood-brain barrier on the hippocampus of a murine model of senescence. *Mech Ageing Dev* 128: 522-528.
- Piazza JR, Almeida DM, Dmitrieva NO y Klein LC** (2010). Frontiers in the use of biomarkers of health in research on stress and aging. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 65: 513-525.
- Plaitakis A y Caroscio JT** (1987). Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 22: 575-579.
- Platkiewicz J y Brette R** (2010). A threshold equation for action potential initiation. *PLoS Comput Biol* 6: e1000850.

- Power JM, Wu WW, Sametsky E, Oh MM y Disterhoft JF** (2002). Age-related enhancement of the slow outward calcium-activated potassium current in hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. *J Neurosci* 22: 7234-7243.
- Quick MW y Lester RA** (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53: 457-478.
- Rettig J y Neher E** (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science* 298: 781-785.
- Rodrigue KM, Kennedy KM y Park DC** (2009). Beta-amyloid deposition and the aging brain. *Neuropsychol Rev* 19: 436-450.
- Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, Joyce J y Grover A** (2007). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol* 82: 235-246.
- Roldán E, Álvarez-Peláez R y Fernández de Molina A** (1974). Electrographic study of the amygdaloid defense response. *Physiology & Behavior* 13: 779-787.
- Rosen DR** (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364: 362.
- Rothstein JD** (1995). Excitotoxic mechanisms in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* 68: 7-20; discussion 21-27.
- Rothstein JD, Martin LJ y Kuncl RW** (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326: 1464-1468.
- Sala F, Nistri A y Criado M** (2008). Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192: 203-212.
- Samasilp P, Chan SA y Smith C** (2012). Activity-dependent fusion pore expansion regulated by a calcineurin-dependent dynamin-syndapin pathway in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 32: 10438-10447.
- Sawano E, Negishi T, Aoki T, Murakami M y Tashiro T** (2013). Alterations in local thyroid hormone signaling in the hippocampus of the SAMP8 mouse at younger ages: association with delayed myelination and behavioral abnormalities. *J Neurosci Res* 91: 382-392.
- Scarpace PJ, Tumer N y Mader SL** (1991). Beta-adrenergic function in aging. Basic mechanisms and clinical implications. *Drugs Aging* 1: 116-129.
- Scholl M, Lockhart SN, Schonhaut DR, O'Neil JP, Janabi M, Ossenkopppele R, Baker SL, Vogel JW, Faria J, Schwimmer HD, Rabinovici GD y Jagust WJ** (2016). PET imaging of Tau deposition in the aging human brain. *Neuron* 89: 971-982.
- Schroeder TJ, Borges R, Finnegan JM, Pihel K, Amatore C y Wightman RM** (1996). Temporally resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. *Biophys J* 70: 1061-1068.

- Seals DR y Esler MD** (2000). Human ageing and the sympathoadrenal system. *J Physiol* 528: 407-417.
- Sesti F** (2016). Oxidation of K(+) Channels in Aging and Neurodegeneration. *Aging Dis* 7: 130-135.
- Sharara-Chami RI, Joachim M, Pacak K y Majzoub JA** (2010). Glucocorticoid treatment-effect on adrenal medullary catecholamine production. *Shock* 33: 213-217.
- Shay JW** (2016). Role of telomeres and telomerase in aging and cancer. *Cancer Discov* 6: 584-593.
- Sheldrake AR** (1974). The ageing, growth and death of cells. *Nature* 250: 381.
- Sigworth FJ, Affolter H y Neher E** (1995). Design of the EPC-9, a computer-controlled patch-clamp amplifier. 2. Software. *J Neurosci Methods* 56: 203-215.
- Silei V, Fabrizi C, Venturini G, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F y Lauro GM** (1999). Activation of microglial cells by PrP and beta-amyloid fragments raises intracellular calcium through L-type voltage sensitive calcium channels. *Brain Res* 818: 168-170.
- Simpson SL** (1937). Physiology of the Adrenal Gland. *Br Med J* 1: 229-232.
- Small DH, Michaelson S, Marley PD, Friedhuber A, Hocking A y Livett BG** (1993). Regulation of acetylcholinesterase secretion from perfused bovine adrenal gland and isolated bovine chromaffin cells. *J Auton Nerv Syst* 42: 131-141.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ y Klenk DC** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
- Smith R, Brundin P y Li JY** (2005). Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell Mol Life Sci* 62: 1901-1912.
- Smithers HE, Terry JR, Brown JT y Randall AD** (2017). Aging-Associated Changes to Intrinsic Neuronal Excitability in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Is Cell Type-Dependent. *Front Aging Neurosci* 9: 424.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH y Rothman JE** (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75: 409-418.
- Springer SJ, Burkett BJ y Schrader LA** (2014). Modulation of BK channels contributes to activity-dependent increase of excitability through MTORC1 activity in CA1 pyramidal cells of mouse hippocampus. *Front Cell Neurosci* 8: 451.
- Stern Y** (2009). Cognitive reserve. *Neuropsychologia* 47: 2015-2028.
- Steyer JA, Horstmann H y Almers W** (1997). Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388: 474-478.

- Storm JF** (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385: 733-759.
- Strehler BL** (1959). Origin and comparison of the effects of time and high-energy radiations on living systems. *Q Rev Biol* 34: 117-142.
- Strong MJ, Kesavapany S y Pant HC** (2005). The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 649-664.
- Sudhof TC** (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653.
- Sureda FX, Gutiérrez-Cuesta J, Romeu M, Mulero M, Canudas AM, Camins A, Mallol J y Pallás M** (2006). Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8. *Exp Gerontol* 41: 360-367.
- Sze CI, Bi H, Kleinschmidt-DeMasters BK, Filley CM y Martin LJ** (2000). Selective regional loss of exocytotic presynaptic vesicle proteins in Alzheimer's disease brains. *J Neurol Sci* 175: 81-90.
- Szilard L** (1959). On the nature of the aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45: 30-45.
- Takeda T** (2009). Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res* 34: 639-659.
- Takeda T, Hosokawa M y Higuchi K** (1991). Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc* 39: 911-919.
- Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, Hosono M, Akiguchi I y Katoh H** (1994). A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Arch Gerontol Geriatr* 19: 185-192.
- Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M y Yamamuro T** (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 17: 183-194.
- Takeda T, Matsushita T, Kurozumi M, Takemura K, Higuchi K y Hosokawa M** (1997). Pathobiology of the senescence-accelerated mouse (SAM). *Exp Gerontol* 32: 117-127.
- Taniguchi S, Hanafusa M, Tsubone H, Takimoto H, Yamanaka D, Kuwahara M y Ito K** (2016). Age-dependency of the serum oxidative level in the senescence-accelerated mouse prone 8. *J Vet Med Sci* 78: 1369-1371.
- Tank AW y Lee Wong D** (2015). Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr Physiol* 5: 1-15.
- Thibault O, Gant JC y Landfield PW** (2007). Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Ageing Cell* 6: 307-317.
- Thibault O y Landfield PW** (1996). Increase in single L-type calcium channels in hippocampal neurons during aging. *Science* 272: 1017-1020.

- Thorn P, Zorec R, Rettig J y Keating DJ** (2016). Exocytosis in non-neuronal cells. *J Neurochem* 137: 849-859.
- Tombaugh GC, Rowe WB y Rose GM** (2005). The slow afterhyperpolarization in hippocampal CA1 neurons covaries with spatial learning ability in aged Fisher 344 rats. *J Neurosci* 25: 2609-2616.
- Tricarico D, Petruzzi R y Camerino DC** (1997). Changes of the biophysical properties of calcium-activated potassium channels of rat skeletal muscle fibres during aging. *Pflugers Arch* 434: 822-829.
- Tysnes OB y Storstein A** (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 124: 901-905.
- Ulrich-Lai YM y Herman JP** (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10: 397-409.
- United-Nations** (2017). United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2017). World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP/248. . *Obtenido de:* <https://www.un.org/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2017-revision.html>.
- Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E y Robberecht W** (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762: 1068-1082.
- Vandael DH, Mahapatra S, Calorio C, Marcantoni A y Carbone E** (2013). Cav1.3 and Cav1.2 channels of adrenal chromaffin cells: emerging views on cAMP/cGMP-mediated phosphorylation and role in pacemaking. *Biochim Biophys Acta* 1828: 1608-1618.
- Vandael DH, Marcantoni A, Mahapatra S, Caro A, Ruth P, Zuccotti A, Knipper M y Carbone E** (2010). Ca(v)1.3 and BK channels for timing and regulating cell firing. *Mol Neurobiol* 42: 185-198.
- Vandael DH, Ottaviani MM, Legros C, Lefort C, Guerineau NC, Allio A, Carabelli V y Carbone E** (2015). Reduced availability of voltage-gated sodium channels by depolarization or blockade by tetrodotoxin boosts burst firing and catecholamine release in mouse chromaffin cells. *J Physiol* 593: 905-927.
- Vandael DH, Zuccotti A, Striessnig J y Carbone E** (2012). Cav1.3-driven SK channel activation regulates pacemaking and spike frequency adaptation in mouse chromaffin cells. *J Neurosci* 32: 16345-16359.
- VanGuilder HD, Yan H, Farley JA, Sonntag WE y Freeman WM** (2010). Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. *J Neurochem* 113: 1577-1588.
- Vanitallie TB** (2008). Parkinson disease: primacy of age as a risk factor for mitochondrial dysfunction. *Metabolism* 57 Suppl 2: S50-55.

- Verhage M y Sorensen JB** (2008). Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic* 9: 1414-1424.
- Voets T, Toonen RF, Brian EC, de Wit H, Moser T, Rettig J, Sudhof TC, Neher E y Verhage M** (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31: 581-591.
- Vollmer RR, Baruchin A, Kolibal-Pegher SS, Corey SP, Stricker EM y Kaplan BB** (1992). Selective activation of norepinephrine- and epinephrine-secreting chromaffin cells in rat adrenal medulla. *Am J Physiol* 263: R716-721.
- W. DW, T. K y R. SS** (1967). Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *The Journal of Physiology* 188: 107-120.
- Wang HL, Xian XH, Song QY, Pang C, Wang JL, Wang MW y Li WB** (2017). Age-related alterations of neuronal excitability and voltage-dependent Ca^{2+} current in a spontaneous mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 321: 209-213.
- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH y Rothman JE** (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92: 759-772.
- Weinert BT y Timiras PS** (2003). Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* (1985) 95: 1706-1716.
- Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Jr. y Viveros OH** (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10754-10758.
- Willenberg HS y Bornstein SR** (2017). Adrenal Cortex; Development, Anatomy, Physiology. . In: *De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al, editors South Dartmouth (MA): MDTextcom, Inc; 2000.*
- Winkler H** (1976). The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience* 1: 65-80.
- Winkler H** (1977). The biogenesis of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* 2: 657-683.
- Winkler H, Sietzen M y Schober M** (1987). The life cycle of catecholamine-storing vesicles. *Ann N Y Acad Sci* 493: 3-19.
- Wirhth O, Breyhan H, Schafer S, Roth C y Bayer TA** (2008). Deficits in working memory and motor performance in the APP/PS1ki mouse model for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29: 891-901.
- Wolf K, Zarkua G, Chan SA, Sridhar A y Smith C** (2016). Spatial and activity-dependent catecholamine release in rat adrenal medulla under native neuronal stimulation. *Physiol Rep* 4.

- Wu PC, Fann MJ y Kao LS** (2010). Characterization of Ca²⁺ signaling pathways in mouse adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem* 112: 1210-1222.
- Wyss-Coray T** (2016). Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature* 539: 180-186.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J y Adelman JP** (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395: 503-507.
- Yanai S y Endo S** (2016). Early onset of behavioral alterations in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *Behav Brain Res* 308: 187-195.
- Yang WW, Sidman RL, Taksir TV, Treleaven CM, Fidler JA, Cheng SH, Dodge JC y Shihabuddin LS** (2011). Relationship between neuropathology and disease progression in the SOD1^{G93A} ALS mouse. *Exp Neurol* 227: 287-295.
- Yang Y, Kim J, Kim HY, Ryoo N, Lee S, Kim Y, Rhim H y Shin YK** (2015). Amyloid-beta oligomers may impair SNARE-mediated exocytosis by direct binding to syntaxin 1a. *Cell Rep* 12: 1244-1251.
- Ye C, Ho-Pao CL, Kanazirska M, Quinn S, Rogers K, Seidman CE, Seidman JG, Brown EM y Vassilev PM** (1997). Amyloid-beta proteins activate Ca²⁺-permeable channels through calcium-sensing receptors. *J Neurosci Res* 47: 547-554.
- Yufu F, Egashira T y Yamanaka Y** (1994). Age-related changes of cholinergic markers in the rat brain. *Jpn J Pharmacol* 66: 247-255.
- Yun SH, Gamkrelidze G, Stine WB, Sullivan PM, Pasternak JF, Ladu MJ y Trommer BL** (2006). Amyloid-beta1-42 reduces neuronal excitability in mouse dentate gyrus. *Neurosci Lett* 403: 162-165.
- Zecca L, Youdim MBH, Riederer P, Connor JR y Crichton RR** (2004). Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 5: 863.
- Zhang Z y Jackson MB** (2010). Membrane bending energy and fusion pore kinetics in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Biophys J* 98: 2524-2534.
- Zhao XH, Kitamura Y y Nomura Y** (1992). Age-related changes in NMDA-induced [³H]acetylcholine release from brain slices of senescence-accelerated mouse. *Int J Dev Neurosci* 10: 121-129.
- Zhao XH y Nomura Y** (1990). Age-related changes in uptake and release on L-[³H]noradrenaline in brain slices of senescence accelerated mouse. *Int J Dev Neurosci* 8: 267-272.
- Zhou Z, Misler S y Chow RH** (1996). Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophys J* 70: 1543-1552.