

Curso 2012/13
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/39
I.S.B.N.: 978-84-15939-11-5

DANIEL PEREDA DE PABLO

**Estudio conductual, metabólico
y de homeostasis vascular
en ratones carentes de cromograninas**

Directores

RICARDO BORGES JURADO
JOSÉ DAVID MACHADO PONCE



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

**“(…)¡Pero pequeño ratón, no estás solo
al demostrar que la previsión puede ser vana:
los planes mejor trazados de ratones y hombres
a menudo no prosperan,
y no nos dejan nada salvo pena y dolor,
en lugar del gozo prometido!”**

Robert Burns, “A un ratón”

**“¡Inteligencia, dame/
el nombre exacto de las cosas!”**

Juan Ramón Jiménez, “Eternidades”

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos BFU2007-64963 del Ministerio de Ciencia e Innovación (RB).

El autor de este trabajo Daniel Pereda De Pablo ha disfrutado de una beca de investigación BES-2008-002812 del programa FPI del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Publicaciones:

1. Borges R, **Pereda D**, Beltrán B, Prunell M, Rodríguez M, Machado JD. (2010). *"Intravesicular factors controlling exocytosis in chromaffin cells."* Cell Mol Neurobiol 30(8): 1359-1364.
2. Borges R, Domínguez N, Estévez-Herrera J, **Pereda D**, Machado JD.. (2012). *"Vesicular Ca(2+) mediates granule motion and exocytosis."* Cell Calcium 51(3-4): 338-341.
3. Domínguez N, Estévez-Herrera J, Pardo MR, **Pereda D**, Machado JD, Borges R. (2012). *"The functional role of chromogranins in exocytosis."* J Mol Neurosci 48(2): 317-322.

Artículos de divulgación:

Pereda, D., (2012) *"Taming yourself: adrenaline and the chromaffin granules"* Phenotype 13: 14-16

Prefacio

Hace aproximadamente un terremoto, una erupción volcánica, una tormenta tropical y seis cortísimos años, en aquellos felices tiempos en que aún no había oído hablar de la amperometría de célula única y no podía imaginar que nueve canicas y medio quilo de serrín sirvieran para evaluar la función hipocampal en roedores, dos de los mejores amigos que se pueden tener me llamaron por teléfono para decirme que en su laboratorio había un profesor que buscaba gente para trabajar en su grupo de investigación. Después de haberme pasado un año intentando profesionalmente encontrar vida en la galaxia elíptica M32, tristemente sin éxito, la idea de poder trabajar en biomedicina y en el mismo lugar del que tanto y tan bien había oído hablar a mis amigos me pareció genial. Así pues, dos días después aparecí por allí vestido elegante pero informal para conocer al profesor en cuestión, el doctor Ricardo Borges Jurado, e intentar convencerle de que podía ser una buena incorporación a su grupo, lo que suponía iba a ser complicado dado que no tenía idea de en qué trabajaban exactamente y había pasado más de dos años desde que pisara un laboratorio que no estuviera ocupado por telescopios y redes computacionales. Hoy todavía me rió en voz alta al recordar esa primera semana, desde las dieciséis interminables páginas del artículo sobre canales iónicos a tamaño de fuente -3 que Ricardo me dio como lectura ligera a los diez minutos de conocerme y que yo, ansioso por impresionarle, me leí del tirón en un rincón oscuro de la entonces enorme y fría sala de prácticas, hasta mi memorable primer encuentro con Manolo Feria en la puerta del departamento.

Me han pasado muchas cosas desde entonces, todas buenas o mejores, gracias a que Ricardo confió en mí a pesar de un comienzo francamente malo y de días en los que pensé que sería incapaz de dedicarme profesionalmente a la ciencia. Como escribió Charles Dickens: “Fue el mejor de los tiempos, fue el peor de los tiempos, la edad de la sabiduría, y también de la locura”. Por eso, por su afecto personal y por tantas otras cosas que no podría enumerar, mi primer pensamiento al sentarme a escribir esta tesis doctoral que resume el trabajo de seis años de mi vida es para él.

Gracias de corazón por todo, Ricardo.

Agradecimientos

Al entrar a formar parte del grupo de investigación del doctor Ricardo Borges, éste estaba compuesto por siete personas contándole a él. El entonces reciente doctor Marcial Camacho acababa de emprender su aventura postdoctoral en América, que ahora continúa en Alemania, y había un cierto vacío en todo el laboratorio que sólo las personas de su calidad humana, sentido del humor y nivel profesional pueden dejar tras de sí.

Aunque yo no lo sabía todavía, he tenido la suerte de ir descubriéndolo paso a paso en estos años, el doctor Borges es de esa clase de investigadores, los buenos, que sienten pasión por la ciencia y tienen la habilidad de contagiársela a aquellos que los rodean, y además viven su vida con la misma intensidad en lo personal y en lo profesional. Su impulso constante para hacernos avanzar más en nuestros experimentos, en nuestra actividad vital, su esfuerzo para que nunca le falté de nada a aquellos que trabajan con él (para él, si, pero sobre todo con él) y su capacidad para hacer todo eso respetando al mismo tiempo la tranquilidad y el criterio de cada uno de nosotros suponen para mí un ejemplo de lo que debe ser un líder. Cuanto de exhaustivo y documentado encuentren en esta tesis será en gran parte mérito suyo.

Si Ricardo era y es cabeza y corazón del grupo, el doctor José David Machado es su clave de bóveda. Siempre en medio entre unos y otros, una posición nada fácil, él ha sido el primero en hacernos las preguntas duras que nadie quiere hacer, la persona que hace nos hace mirar donde pisamos antes del siguiente paso para que no tropecemos en nuestra prisa por avanzar, el que se niega a dejarnos aplicar una técnica sin entenderla o un estadístico simplemente porque es el que todo el mundo use porque así es imposible mejorar como investigador. Todo ello desde la calidez, sencillez y cercanía que le caracterizan. Cuanto de riguroso y consecuente encuentren en esta tesis será también mérito suyo.

De mis compañeros estudiantes del primer año, aquellos con los que compartí horas de laboratorio y que me enseñaron las técnicas que usábamos con una paciencia y generosidad que ahora que me encuentro a punto de leer la tesis, inmerso en la misma vorágine de experimentos, redacciones y burocracia que ellos sufrían en aquella época, puedo apreciar en su justa medida, sólo puedo decir cosas buenas. La doctora Jéssica Díaz, cuya enorme capacidad de trabajo se

ve superada únicamente por su eterna disposición a ayudar a los demás en todo lo humanamente posible, y la doctora Monyka Montesinos, cuyo carácter apasionado y profesionalidad te hacen imposible no quererla si sobrevives al primer mes con ella, me ayudaron a integrarme dentro del equipo como si siempre hubiera pertenecido a él, y eso es algo que nunca podré agradecerles lo bastante. Beatriz Beltrán será para mí un ejemplo de personalidad y esfuerzo que espero poder imitar durante toda mi vida. El doctor José Francisco Gómez nunca dejó de encontrar tiempo para compartir conmigo sus conocimientos cuando lo necesitaba y siempre con una sonrisa amable. Las profesoras Carmen Marina Álvarez y Margarita Prunell fueron las primeras en introducirme en el mundo de la conducta animal y siempre me han demostrado cariño y amistad, amén de prestarme un lugar para trabajar. Por último, en absoluto menos importante, sin la ingenuidad y la habilidad técnica del doctor Yézer González mi trabajo hubiera sido infinitamente más complicado, mi vida mucho menos rica, y aquel gol de Iniesta en Stamford Bridge mucho menos emocionante.

Al mismo tiempo que iba conociendo a quienes eran mis compañeros y se convertirían en mis amigos me presentaban a los chicos de los otros laboratorios del departamento. Casi todos compartíamos la carrera de biología en La Laguna y a varios les recordaba de entonces, pero no fue hasta que nos sentamos a comer juntos una hora todos los días que se convirtieron en mucho más que rostros familiares en un aula. Desde la primera vez que discutí con Mayte sobre las playas de Santander versus las playas de Tenerife supe que en esa pequeña habitación abarrotada de tomos del B.O.E. había algo de magia. Poco a poco fui conociéndolos y apreciándolos a todos por su nombre. Chus y su candor, el carácter siempre curioso y combativo de Laura García y Mayte Arce, la bondad genuina de Jonathan, la discreta simpatía de Soledad, la encantadora calidez de Serena, las rutinas entrañables de Ada y Ricardo, la espontaneidad explosiva y siempre alegre de Laura Armas... Incluso de aquellos a quién no llegué a conocer tanto o que estuvieron poco tiempo aquí, como Idaira y Leni, Miriam, Estefanía, Carmen, Alyocha o Josico, guardaré siempre el buen recuerdo de los momentos que compartimos.

Actualmente, el grupo de investigación del doctor Borges incluye, además de a él mismo y al doctor Machado, a cinco investigadores más. Josué Campos hace gala de discreción y tranquilidad en todo momento, un profesional

responsable siempre dispuesto a echar una mano. Judit Estévez posee una alegría de vivir envidiable y contagiosa que hace que dé gusto trabajar junto a ella, y una determinación y perseverancia ante cada dificultad surgida en los experimentos que la convierten en una gran científica. Josito Hernández es un investigador laborioso y metódico que trabaja para vivir, y además vive bien, dotado de una sencillez natural que hace muy agradable trabajar con él. Marta Rodríguez es de esa clase de personas directa y sincera que uno tiene la fortuna de conocer muy pocas veces en la vida, además de contar con una extraordinaria capacidad organizativa de la que todos nos hemos beneficiado un poco, y de ser una madre cariñosa y orgullosa con razón.

Finalmente, Natalia Domínguez entró en el laboratorio sólo unos meses después que yo y se dispone a presentar también su tesis doctoral. Llevamos por tanto unos cinco o seis años como compañeros. No creo haber conocido ni trabajado nunca con nadie tan dotado para la ciencia por disposición, disciplina y talento, ni tan madura en lo personal y en lo profesional. Como todos los que hemos tenido el privilegio de disfrutar con su actividad investigadora, estoy segura de que tendrá éxito en cualquier camino futuro que elija y creo que cualquier laboratorio de investigación sería muy afortunado de poder contar con ella.

En estos años he tenido también la suerte de poder conocer y trabajar con muchos profesores e investigadores de nuestra universidad. Diego Álvarez y Teresa Giráldez me han honrado con su amistad y ha sido un placer colaborar con ellos cuando ha surgido la oportunidad. De su aproximación a la ciencia he aprendido mucho, y espero poder seguir ese ejemplo en lo personal y en lo profesional. Las conversaciones de pasillo y café con Agustín Valenzuela siempre han sido enriquecedoras y apasionadas, y no puedo más que agradecerle la ayuda y el interés que ha mostrado en todo momento por mi carrera profesional. El profesor Manolo Fera ha olvidado más sobre trabajo con animales de lo que yo aprenderé nunca, pero siempre ha estado dispuesto a cedernos su tiempo y sus conocimientos a cuántos se los hemos pedido, incluso ahora que, como él mismo dice, publica después de muerto como el Cid Campeador. El doctor Federico Díaz ha sido de gran ayuda en el trabajo con los animales, especialmente en aquellos experimentos que requerían sedación para el bienestar animal. Colaborar con el equipo de la profesora Gundela Meyer, Miriam, Carolina y Emilio, fue un placer y

una gran experiencia. Agradezco asimismo al profesor Tomás González por permitirme presenciar los experimentos con ácido kaínico que llevó a cabo y su didáctica explicación al respecto, y al doctor Carlos de las Cuevas por su ayuda durante los ensayos del laberinto acuático de Morris.

La crianza, mantenimiento y depósito de los animales fueron llevadas a cabo en el Estabulario y el Animalario de la Universidad de La Laguna, bajo la responsabilidad de María Rosa Arnau. Es un trabajo rutinario y a menudo desagradable pero de cuyo buen funcionamiento dependemos todos, y la doctora Arnau y su equipo hacen una labor sobresaliente con los medios de los que disponen. He perdido la cuenta del número de veces que he llamado con preguntas o peticiones de favores y nunca me han contestado con otra cosa que amabilidad y profesionalidad. Desde aquí mi reconocimiento y agradecimiento a todos ellos.

Finalmente, en mis últimos meses como doctorando tuve la gran oportunidad de realizar una estancia breve de investigación en el laboratorio del doctor Abraham Acevedo en el centro del Medical Research Council en Oxford, Inglaterra. Allí aprendí mucho sobre conducta animal, biología molecular y sobre otras formas de hacer las cosas, mejores o peores pero siempre enriquecedoras. Les agradezco a Abraham y a su equipo las facilidades que me pusieron en todo momento y la confianza que depositaron en mí durante mi estancia, así como su simpatía y amabilidad en el trato personal en aquellos días lejos de casa, y especialmente el no tener que pagar ninguna cerveza en los pubs que visitamos allí.

Es difícil resumir tantos años de buenos momentos para quién no ha podido vivirlos. El ambiente que se vivía entonces y ahora entre los muros de este departamento es sin duda especial. El cariño sincero que nos tenemos unos a otros, el grado de implicación, siempre para bien, en las vidas de los demás, son un motivo más que suficiente para que te apetezca venir a trabajar cada mañana. Los cambios personales, casi siempre también para bien, son celebrados por todos como propios y el refrán de las alegrías compartidas siempre ha sido cierto para nosotros. Desde nuestras personalidades y temperamentos tan distintos hemos creado algo muy bueno, y ni siquiera hace falta pasearse por las decenas de fotos de bodas, comidas y congresos que adornan las paredes de casi cada laboratorio para darse cuenta de eso.

He pasado un tiempo increíble aquí, y espero tener la oportunidad algún día de volver a encontrar un grupo humano como éste del que volver a formar parte. A ellos, y a todos, disfrutad con la lectura.

Para Carmina, Violeta y Alejandro, que siempre están conmigo.

Para los chicos de contuberniábulo, con afecto y agradecimiento por tantas horas
de amistad.

Para Carlos, Silvia, Gabriel y Darío, mi familia favorita, por ser y estar siempre ahí.

Para Moi, con la esperanza de que los años le den sabiduría sin cambiar su
carácter.

Para Ernesto, que no ha sido ajeno a la miseria de los vencidos y sin embargo
perdura. Y para la brillante Dulce y mi preciosa, inteligente y perspicaz sobrina
Ana Cristina por devolverle la sonrisa.

Para Jorge y Cristina, con cariño, respeto y admiración por la vida que luchan cada
día por construir.

Para Álvaro, amo de su destino, amigo y hermano.

Para Fernando, Iván y Alberto, por todas las cosas que podría escribir, y sobre
todo por las que no podría.

Para Cristina, prueba evidente de que le caigo bien a ese dios en quién ella no
cree.

Para mis padres, Ernesto y Cristina por su amor y paciencia infinitas.

Y para Sandra, mi Universo

Índice

Índice

Introducción	1
1.1 Exocitosis	5
1. 2 Células cromafines	6
1. 3 Gránulos cromafines	8
1. 3. 1 Granulogénesis	9
1. 3. 2 Contenido de las vesículas secretoras	10
1. 3. 2. 1 Catecolaminas	10
1. 3. 2. 2 Proteínas y péptidos	12
1. 3. 2. 3 Calcio y moléculas varias	14
1. 4 Matriz intravesicular	14
1. 5 Las graninas	15
1. 5. 1 Las secretograninas	16
1. 5. 2 Cromogranina A	18
1. 5. 3 Cromogranina B	23
1.6 Estudio de la conducta	26
1. 6. 1 Antecedentes históricos	26
1. 6. 2 La ciencia de la conducta animal	28
1. 6. 3 Los modelos animales en conducta	31
1. 6. 3. 1 El ratón de laboratorio como modelo animal	32

Objetivos	37
Materiales y métodos	41
3. 1 Generación, crianza y mantenimiento de los animales	43
3. 2 Consideraciones generales en el trabajo con los animales	43
3. 3 Caracterización conductual	45
3. 3. 1 Caja luz-oscuridad (Light-dark box)	45
3. 3. 1. 1 Equipo	45
3. 3. 1. 2 Protocolo	45
3. 3. 2 Campo abierto (Open field)	46
3. 3. 1. 1 Equipo	46
3. 3. 1. 2 Protocolo	46
3. 3. 3 Laberinto acuático de Morris (Morris water maze)	46
3. 3. 1. 1 Equipo	46
3. 3. 1. 2 Protocolo	47
3. 3. 4 RotaRod acelerado	48
3. 3. 1. 1 Equipo	48
3. 3. 1. 2 Protocolo	48
3. 3. 5 Test de agresión (Resident-intruder test)	49
3. 3. 1. 1 Equipo	49
3. 3. 1. 2 Protocolo	49
3. 3. 6 Test de enterramiento de canicas (Marble burying test)	50
3. 3. 1. 1 Equipo	50
3. 3. 1. 2 Protocolo	50
3. 3. 7 Test de Porsolt (Porsolt's forced swimming test)	50

3. 3. 1. 1 Equipo	51
3. 3. 1. 2 Protocolo	51
3. 3. 8 Test de evitación activa (Shuttle-box avoidance test)	51
3. 3. 1. 1 Equipo	52
3. 3. 1. 2 Protocolo	52
3. 4 Caracterización metabólica	52
3. 4. 1 Test de tolerancia a la glucosa con ayuno de 6 h	52
3. 4. 1. 1 Equipo	53
3. 4. 1. 2 Protocolo	53
3. 4. 2 Test de tolerancia a la glucosa con ayuno de 12 h	54
3. 4. 3 Test de tolerancia a la insulina	54
3. 4. 3. 1 Equipo	54
3. 4. 3. 2 Protocolo	54
3. 4. 4 Jaulas fisiológicas Physiocage	55
3. 4. 4. 1 Equipo	55
3. 4. 4. 2 Protocolo	55
3. 4. 5 Cintas de correr (Treadmill)	55
3. 4. 5. 1 Equipo	55
3. 4. 5. 2 Protocolo	56
3. 4. 6. Densitometría	56
3. 4. 6. 1 Equipo	56
3. 4. 6. 2 Protocolo	56
3. 5 Caracterización cardiovascular	57
3. 5. 1 Tensión arterial y frecuencia cardíaca	57
3. 5. 1. 1 Equipo	57

3. 5. 1. 2 Protocolo	57
Resultados	59
4. 1. Fondo genético original	61
4. 1. 1 El control de la glucemia está alterado de forma diferencial en las cepas transgénicas en la edad adulta	61
4. 1. 2 El perfil densitométrico de las cepas transgénicas muestran diferencias significativas en la arquitectura ósea y tisular entre 3 y 6 meses de edad	62
4. 1. 3 La ingesta de comida y agua no se corresponde con las diferencias de peso descritas	67
4. 1. 4 Las cepas transgénicas muestran una capacidad de ejercicio aeróbica muy diferente	68
4. 1. 5 Las cepas transgénicas muestran una coordinación motora dispar	68
4. 1. 6 La evaluación del fenotipo depresivo por el test de natación forzada o Porsolt revela una tendencia a este en los ratones CgA y CgA&B-KO adultos.	69
4. 1. 7 El test de laberinto acuático de Morris permite apreciar las diferencias en la memoria espacial entre las 3 cepas transgénicas	69
4. 2 Fondo genético unificado	70
4. 2. 1 El fenotipo alterado en el control de la glucemia observado en las cepas originales se mantiene con el fondo genético unificado	70
4. 2. 2 La evolución temporal de la distribución de la masa corporal revela una importante influencia de las cromograninas en la fisiología.-	73
4. 2. 3 Las cepas transgénicas presentan perturbaciones en el control de la frecuencia cardíaca y la presión arterial que se manifiestan a lo largo de la vida del animal	76

4. 2. 4 La coordinación motora en ratones de 12 meses de edad aparece mejorada en las cepas transgénicas CgA- y CgA&B-KO.	78
4.2. 5 La actividad de las 3 cepas medida en un campo abierto varía considerablemente con la edad.	79
4.2.6 La evaluación del fenotipo depresivo en las 3 cepas transgénicas revela diferencias entre sí y con los controles.	80
4. 2. 7 Los resultados del laberinto acuático de Morris en todas las cepas no muestran diferencias en la memoria espacial.	81
4. 2. 8 El aprendizaje condicionado a los 16 meses resulta notablemente más rápido en los ratones CgB-KO	82
4. 2. 9 No existe un fenotipo de ansiedad estadísticamente sólido en los ratones de 12 meses.	82
4. 2. 10 Los resultados del test de enterramiento de canicas indican un déficit en este proceso en los ratones carentes de CgB.	83
4. 2. 11 Los test de residente-intruso muestran una tendencia a la agresividad incrementada en los ratones CgB- y CgA&B-KO.	84
4. 2. 12 Las 3 cepas de ratones transgénicos presentan un porcentaje de barbering en el rostro y el pelaje considerablemente mayor que los c57.	85
Discusión	87
5. 1 Los complejos orígenes de las alteraciones fenotípicas en ratones carentes de cromograninas.	89
5. 2 Las cromograninas participan en la regulación del metabolismo de la glucosa.	90
5. 3 Existe un efecto poco claro de las cromograninas sobre la arquitectura de los animales.	92
5. 4 Al menos dos mecanismos diferentes implican a las cromograninas en la homeostasis vascular.	92
5. 5 El análisis del fenotipo emotivo y cognitivo en los ratones carentes de Cgs apoya la existencia de una actividad de estas independiente de las	94

catecolaminas en el sistema nervioso central.

Conclusiones 97

Bibliografía 101

“¡Bienvenido a mi casa! ¡Entre libremente y por su propia voluntad!”

Bram Stoker, “Drácula”

Introducción

El 16 de diciembre de 1982, la revista Nature publica el primer artículo científico en el que se describía la creación y caracterización parcial de un animal que portaba genes de otro introducidos artificialmente en su material genético (*Palmiter et al., 1982*). El animal en cuestión, un ratón jocosamente apodado "Supermouse" por sus propios creadores, llevaba incorporado el gen de la hormona del crecimiento de una rata junto a un promotor de la expresión de la metalotioneína I de ratón, lo que causaba una síntesis constitutiva de la citada hormona con el dramático aumento de tamaño consiguiente.

Este hallazgo fue por supuesto sólo un principio. En los treinta años transcurridos desde esa publicación, el catálogo de organismos transgénicos que han sido creados, bien expresando genes de otros animales, bien careciendo de genes propios, bien teniendo una expresión alterada de su propio ADN, abarca una lista interminable de ejemplos de ingenuidad humana desde lo sublime a lo extravagante. Si bien muchos de los más conocidos de entre estos representan herramientas biotecnológicas de gran potencial terapéutico, la síntesis en bacterias de insulina humana incluso antecede a Supermouse por tres años, es indudable que la investigación biomédica básica se ha visto beneficiada de forma capital por las posibilidades que se han abierto con este tipo de técnicas.

En el caso concreto de la neurociencia, definida por la Society for Neuroscience como "el estudio del sistema nervioso para el avance de la comprensión del comportamiento, la emoción y el pensamiento humano"¹, dadas la dificultad para implementar técnicas de gran utilización en otras ramas de la biología molecular como las inmunológicas, así como la complejidad para extrapolar resultados experimentales de biología molecular a las emociones, la existencia de animales transgénicos en los que se puedan evaluar todos los niveles biológicos, desde la simple expresión de un gen al comportamiento más elaborado, resulta sin duda capital.

Por otro lado, la caracterización del comportamiento ha resultado de gran ayuda para la determinación de procesos neurológicos de interés a nivel molecular. Valga un elegante ejemplo histórico para ilustrarlo: en el año 1909, en las marismas que el río Danubio crea cerca de la ciudad austríaca de Altenberg, un niño de seis años de nombre Konrad pasea con su amiga Gretl desde su casa

¹<http://www.sfn.org/index.aspx?pagename=whatIsNeuroscience>

familiar hasta la granja de un vecino que les va a regalar dos patitos recién eclosionados. Los animales adoptan como padres a los dos niños, siguiéndoles a todas partes y reclamándoles alimento. En 1935, poseedor ya de dos doctorados y casado con Gretl, Konrad Lorenz continúa obsesionado por este fenómeno de su niñez y lo describe con rigor científico: las crías de ganso adoptarán como progenitor al primer objeto móvil y cercano que vean entre las quince y las setenta y dos horas de vida de forma irreversible (no cambiarán su elección una vez hecha) y única (no adoptarán también a los siguientes objetos que aparezcan en su campo visual durante esa ventana de tiempo). El proceso pasa a conocerse como impronta o imprimación (traducción del original alemán *prägung*). Siendo ya un venerable premio Nobel de 73 años, Lorenz dirá: “De lo que no nos dimos cuenta es que yo me imprimé de los patos en el proceso. El trabajo de toda una vida determinado por una experiencia decisiva en la niñez”.

Estos hallazgos de Lorenz podrían no haber pasado de ser una curiosidad en una vida de por sí fascinante de no ser por su recuperación y aprovechamiento por parte de la biología molecular. En 1998, el equipo del doctor Brian McCabe en la Universidad de Cambridge publica los resultados de un estudio histológico y molecular de la expresión del gen codificante para la subunidad $\gamma 4$ del receptor GABA_A en el cerebro anterior del pollo doméstico. El artículo describe como la citada molécula aparece en varias localizaciones cerebrales pero su expresión disminuye tras haberse producido la impronta solamente en el hiperestriado ventral, una zona involucrada en la recepción de estímulos sensoriales visuales y auditivos y cuya ablación selectiva eliminaba la impronta recién adquirida en las crías. En otro artículo posterior publicado seis años más tarde, el mismo equipo de investigación demostró que los niveles de liberación de glutamato y GABA en hiperestriado ventral variaban de forma característica y congruente con un modelo en que un aumento en la liberación del glutamato y una disminución en la del GABA en la región cooperaran para establecer la impronta después de producirse. Aunque el proceso en sí aún esté lejos de ser explicado por completo, el avance producido por la combinación de ambas técnicas, caracterización de comportamiento y molecular, queda claramente de manifiesto.

La serie experimental anterior muestra a su vez la importancia de la correcta elección del modelo para el fenómeno de interés, lo que nos lleva al motivo de la presente tesis doctoral.

1.1.- Exocitosis.-

La exocitosis, tanto constitutiva como regulada, es uno de los fenómenos de mayor interés para la investigación biomédica y la biotecnología. Una simple búsqueda bibliográfica nos revela que en el momento de escribir estas líneas existen más de veinte mil artículos científicos sobre el tema², casi cinco mil de ellos publicados en los últimos cinco años.

En las neuronas, la *exocitosis* constituye la etapa final del proceso de liberación de neurotransmisores a nivel de las sinapsis. De manera muy simple, se puede definir como el proceso mediante el cual se produce la fusión de una vesícula con la membrana plasmática, de modo que las sustancias almacenadas en el interior de la vesícula se liberan de forma unidireccional al medio extracelular. Debido a la heterogeneidad estructural de las sinapsis y de los diferentes mecanismos de modulación, existen varias estrategias de regulación que controlan los sitios de liberación, la frecuencia de exocitosis, la cantidad de transmisor liberado por vesícula y la velocidad de liberación .

La *exocitosis constitutiva* es un mecanismo general en todas las células y sirve para liberar componentes a la matriz extracelular, o para incorporar moléculas nuevas a la membrana plasmática .

La *exocitosis no constitutiva o regulada* se caracteriza fundamentalmente por tres aspectos:

1. *Es específica de estirpe celular.* Existe un variado número de células que presentan diferentes tipos de gránulos o vesículas secretoras en su interior , que se liberan mediante exocitosis regulada y que pueden fusionarse de manera independiente unos de otros.
2. *Es dependiente de estímulo.* Diferentes linajes celulares reaccionan solo a estímulos específicos (las basófilos no liberarán histamina al elevarse la

²<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=exocytosis>

glucemia, los islotes β -pancreáticos si). Además, los estudios en sinapsis demuestran que la liberación de la carga vesicular varía en función del patrón de estimulación incluso en el mismo tipo celular .

3. En el caso concreto de la exocitosis de neurotransmisores, es *dependiente de calcio*. En los años 60 se observó que la acetilcolina (ACh) producía la liberación de catecolaminas (CA) de la glándula suprarrenal, y que esta respuesta desaparecía en ausencia de Ca^{2+} extracelular . También se observó que la secreción estaba acompañada por un aumento de la entrada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dentro de las células cromafines . Pero la primera demostración de que un aumento en el Ca^{2+} citoplasmático ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) era un requerimiento esencial para que tuviese lugar la exocitosis fue llevada a cabo en los años 70 . Con todas estas observaciones, y otros experimentos complementarios, Douglas acuñó la expresión “acoplamiento excitación-secreción” o “*stimulus-secretion coupling*” mediante el cual se produce la secreción de neurotransmisores y hormonas, siendo el Ca^{2+} el agente que conecta el estímulo o excitación y la respuesta secretora .

La exocitosis de neurotransmisores pertenece entra en la categoría de exocitosis reguladas. Representa un mecanismo fundamental para el mantenimiento de la homeostasis de los organismos vivos a todos los niveles y su estudio por medio de técnicas electrofisiológicas y electroquímicas ha resultado altamente exitoso. Desde la publicación de los artículos germinales describiendo las medidas de capacitancia en patch-clamp (Neher y Marty, 1982), amperometría (Leszczyszyn et al., 1990) y amperometría en parche (Albillos et al., 1997), todos ellos en célula única, el tejido cromafín adrenal de ratón ha sido el modelo de estudio elegido más comúnmente para esta clase de técnicas

1.2.- Células cromafines.-

Las células cromafines componen la mayor parte de la médula de las glándulas adrenales, dos glándulas endocrinas altamente estratificadas que se asientan sobre los riñones, aunque también aparecen en menor medida en ganglios simpáticos, el interior de algunos vasos y órganos y como parte del

sistema Bonghan (*Kwon et al., 2012*). Deben su nombre a la característica coloración parda que adquieren al ser teñidas con sales de cromo y presentan un citoplasma de apariencia punteada al microscopio óptico, que resulta ser debido a la presencia de un elevado número de estructuras vesiculares o gránulos cromafines (se calcula que en torno a treinta mil por célula) de un diámetro medio de 200-300 nanómetros, núcleo electrodensos oscuros y un halo translucido entre este y la membrana vesicular (fig. 1).

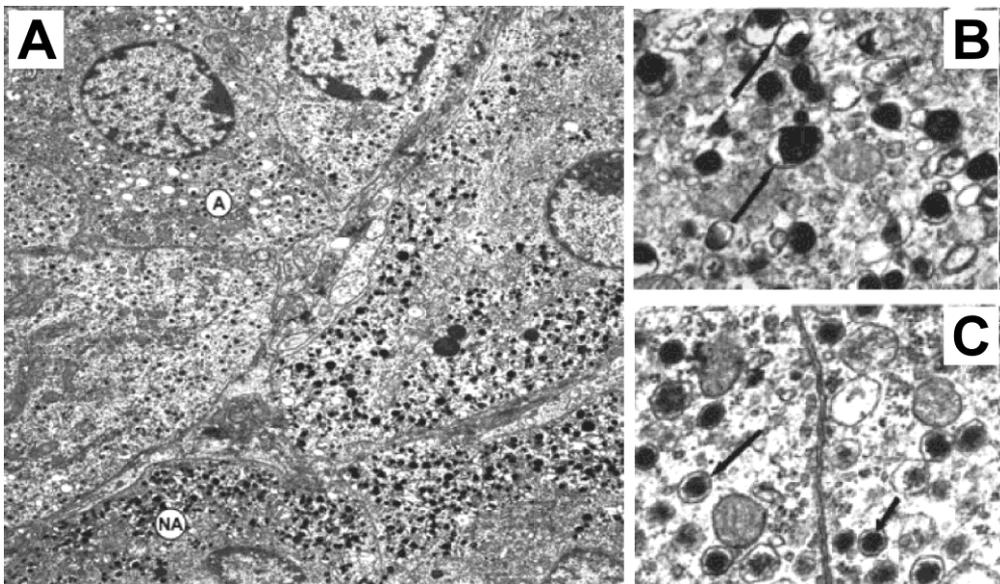


Fig. 1.- Características ultraestructurales de las células cromafines. A, corte de la médula adrenal, donde se puede observar un grupo de células adrenérgicas (A) y un grupo de células noradrenérgicas (NA). B, detalle de gránulos noradrenérgicos, donde se aprecia la alta densidad electrónica que presentan, así como un núcleo denso pegado a la membrana vesicular (flechas). C, detalle de gránulos adrenérgicos, con una densidad electrónica media y un halo uniforme que rodea al núcleo granular (flechas) .

La principal función fisiológica de las células cromafines es la liberación de adrenalina (AD) y noradrenalina (NA) por exocitosis a la circulación en respuesta al estrés como parte efectora del mecanismo “*Pelea o huye*”, un dramático y complejo mecanismo fisiológico de reacción al peligro descrito originalmente por el fisiólogo americano Walter Cannon (*Cannon, 1915*), y que también responde a

estímulos fisiológicos diversos como el frío (*Ueta et al., 2012*), cambios en la glucemia (*Barth et al., 2007*), el ejercicio físico (*Zouhal et al., 2008*) o la hipoxia (*Rostrup, 1998*).

Las células noradrenérgicas se encuentran generalmente en el centro de la médula de las glándulas suprarrenales, mientras que las células adrenérgicas predominan en las áreas adyacentes a la corteza adrenal y entre ambas existen algunas diferencias observables al microscopio electrónico (fig. 1) . Se ha descrito la posibilidad de que en una misma célula coexistan los dos tipos de gránulos, lo que puede representar diferentes pasos en la ruta biosintética o rutas de síntesis diferentes .

Las células cromafín comienzan su desarrollo embrionario como parte de la cresta neural para posteriormente migrar en varias etapas hacia la médula adrenal a lo largo del la formación del individuo, compartiendo origen con las neuronas simpáticas y conservando la capacidad de expresar características neuronales mediante el uso de estímulos adecuados , por lo que pueden ser usadas como modelo de células tanto endocrinas como neuronales . Son además células excitables que presentan propiedades eléctricas semejantes a las neuronas , por lo que cuentan con numerosas conexiones aferentes y eferentes, tanto simpáticas como parasimpáticas y sensoriales.

1.3.- Gránulos cromafines.-

Las *vesículas o gránulos cromafines* son unas estructuras biológicas fascinantes. Su pH interno es ácido, estimado en torno a 5.5 (*Johnson y Scarpa, 1974*), y su contenido de calcio es mayor que en el resto de la célula junta (*Mahapatra et al., 2004*). Su morfología y densidad electrónica oscila levemente varía en función del tipo de CA que almacenen, y existe también un grado de variación interespecífica. Se ha determinado la composición de las vesículas en cuanto a su contenido en proteínas y lípidos, el tamaño vesicular, densidad y masa, así como la cantidad de proteínas y lípidos por cada vesícula, además de determinar el número de copias de sus principales constituyentes .

Por ejemplo, los gránulos adrenérgicos varían entre 50 y 350 nm en diámetro (en ratón varían entre 170 y 350 nm), presentan una morfología

circular, una densidad moderada y aspecto granular en su interior. Algunos de estos gránulos presentan un halo claro, de aspecto uniforme y fino. Por otro lado, los gránulos noradrenérgicos son mayores (en ratón varían entre 185 y 495 nm), con una morfología irregular, de forma ovalada o elíptica, una alta densidad electrónica y un núcleo central denso cercano a la membrana .

1.3.1.- Granulogénesis.-

En condiciones de estrés, la concentración de catecolaminas en sangre puede aumentar hasta tres mil veces con dramáticos efectos fisiológicos. Con el fin de garantizar la perfecta regulación de este sistema de respuesta existen mecanismos que permiten excluir de forma selectiva los gránulos cromafines de la vía constitutiva de secreción.

La formación de los gránulos inmaduros ocurre en la red de *trans*-Golgi (TGN), aunque los pasos de maduración subsecuentes ocurren fuera de este compartimento . En las células neuroendocrinas, se ha propuesto a la CgA como una de las señales indicadoras del camino que deben seguir estos gránulos. Aunque el mecanismo exacto no se conoce con precisión, parece que las propiedades agregativas de la CgA, junto con su capacidad de unirse a las membranas, permiten que las membranas se envuelvan alrededor de los agregados de la CgA formando así las vesículas .

El colesterol también parece ser esencial en la formación de las vesículas . El papel del colesterol en la escisión de vesícula parece ser directo, facilitando la curvatura negativa de la membrana en la zona del cuello, en el momento de la separación de la vesícula. Por otro lado, debido a que el colesterol es un componente importante en las zonas conocidas como “balsas de lípidos” o “*lipid rafts*”, puede desempeñar un papel indirecto en el reclutamiento de proteínas asociadas a estas zonas, que conducen a la escisión de la membrana. La proteína dinamina II se ha propuesto como candidata para tal función, ya que se ha visto que está relacionada con el control de la formación de gránulos en las células AtT20 y porque se ha visto que su homólogo, dinamina I, está relacionada con la escisión de las vesículas endocíticas.

Una vez que los gránulos secretores inmaduros se han formado, deben ser procesados y remodelados para formar gránulos secretores maduros. En células endocrinas y neuroendocrinas, este paso implica tanto fusión con otros gránulos secretores inmaduros como eliminación de material no secretor o inmaduro .

1.3.2.- Contenido de las vesículas secretoras.-

1.3.2.1- Catecolaminas-

Las catecolaminas son un subconjunto de neurotransmisores pertenecientes a la familia de las monoaminas, moléculas compuestas por un único grupo amino unido a una molécula aromática por dos átomos de carbono, derivadas todas ellas bien de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) o bien de las hormonas tiroideas (tiroxina y triyodotironina). La característica diferencial de las catecolaminas radica en su grupo catecol, una modificación dihidroxilada del anillo aromático.

Este subconjunto de neurotransmisores incluye la *adrenalina* (AD), *noradrenalina* (NA) y la *dopamina* (DA). Las tres se sintetizan de forma secuencial a partir del aminoácido tirosina en las células cromafín (fig. 2). El proceso biogénico requiere de la actividad de cuatro enzimas:

- *Tirosina-hidroxilasa* (TH): cataliza el primer paso al hidroxilar el anillo aromático de la tirosina, dando lugar a la dihidroxifenilalanina (L-Dopa). La TH actúa en la fracción libre del citoplasma con una actividad de 100 a 1.000 veces menor que la de las tres siguientes, lo que hace de esta la reacción limitante en la síntesis de catecolaminas y determina la acción de diversas influencias de activación (estimulación de los nervios adrenérgicos) e inhibición (productos de síntesis de la propia ruta - CA). Asimismo, la adición de L-Dopa exógena al organismo permite un aumento de los niveles de dopamina por medio de la reacción descrita más adelante, lo que ha resultado ser de gran valor terapéutico en el tratamiento de patologías asociadas a un déficit dopaminérgico como el Parkinson o el envenenamiento por manganeso (*Cotzias, 1969*).

- *L-aminoácido-aromático descarboxilasa* (LAAD): cataliza la descarboxilación de la L-Dopa en dopamina en el citoplasma.

- *Dopamina-β-hidroxilasa* (DBH): cataliza la hidroxilación de la dopamina para dar lugar a la noradrenalina, pero solo en el interior de las vesículas cromafín, ya que esta enzima se encuentra ligada a la membrana intravesicular.

- *Feniletanolamina-N-metil-transferasa* (FNMT): cataliza la conversión de la noradrenalina en adrenalina, mediante la adición de un grupo metilo. Esta enzima se encuentra en la fracción soluble del citoplasma, por lo que la noradrenalina debe salir de los gránulos para ser metilada. Para su posterior liberación, la adrenalina tiene que ser transportada de nuevo al interior de los gránulos mediante un transportador de membrana llamado VMAT1. Este proceso aparentemente ineficiente permite en realidad la diferenciación de las estirpes cromafín en adrenérgica y noradrenérgica simplemente mediante la expresión diferencial del transportador .

Una cuarta monoamina, la serotonina, aparece en gran parte de los gránulos cromafines de la médula adrenal en rata (*Holzwarth y Brownfield, 1985*) y en cerca de un 90% de las células productoras de adrenalina de la glándula interrenal de rana (*Delarue et al., 1988*). En humanos, la mayor parte de la serotonina aparece en las células enterocromafines del tracto intestinal, donde parece regular el peristaltismo, y una pequeña parte se sintetiza en neuronas serotoninérgicas (*Berger et al., 2009*) con un impacto sorprendentemente grande en el comportamiento merced a una amplia variedad de subtipos de receptores de serotonina distribuidos por todo el cerebro (*de Almeida y Mengod, 2008*).

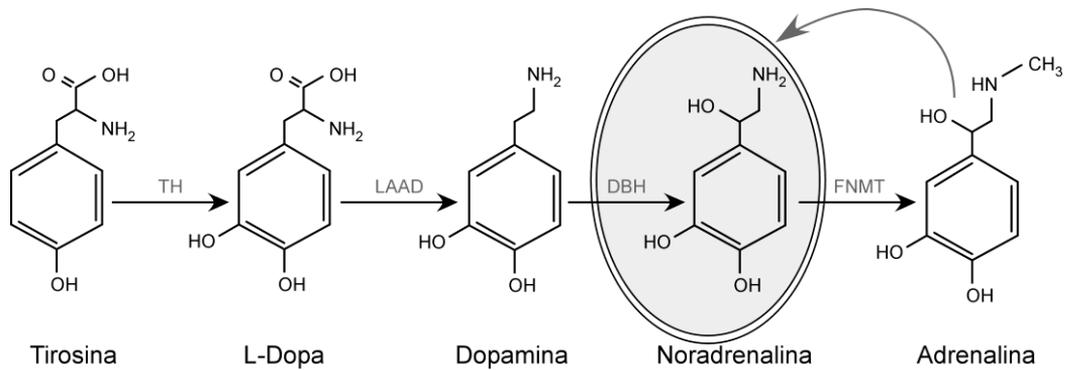


Fig. 2.- Ruta biosíntesis de las catecolaminas. Como la DBH se encuentra en el interior de las vesículas, la dopamina tiene que pasar al interior de las vesículas (indicado mediante el círculo gris). **TH**, tirosina-hidroxilasa; **LAAD**, L-aminoácido-aromático descarboxilasa; **DBH**, Dopamina-β-hidroxilasa; **FNMT**, Feniletanolamina-N-metil-transferasa.

1.3.2.2- Proteínas y péptidos-

El cóctel proteico contenido en el interior de los gránulos cromafines incluye 686 proteínas identificadas hasta la fecha, 371 en la fracción soluble y 384 asociadas a membrana (Wegrzyn *et al.*, 2010), con 69 que localizan en ambas partes.

Las graninas son de lejos el componente mayoritario en cuanto a proteínas del interior granular, representando en conjunto más de un 80% de las moléculas proteicas. Aunque por su interés para esta tesis doctoral se detallarán más en profundidad en su propio apartado, baste decir ahora que son un conjunto de proteínas ácidas de cadena única con la capacidad de formar agregados a pH ácido en presencia de calcio, a quien se unen con baja afinidad y alta capacidad (Yoo *et al.*, 2001), y que pueden unirse también a otros componentes de la vesícula como las catecolaminas y el ATP. Varias enzimas implicadas en la síntesis de catecolaminas ya han sido mencionadas y también forman parte del contenido granular.

El contenido en prohormonas y neuropéptidos de los gránulos es también muy elevado y correlaciona lógicamente con una abundancia de enzimas proteasas. Hasta siete de estas últimas han sido identificadas dentro de los gránulos (Hook *et al.*, 2008), destacando la catepsina L y la aminopeptidasa B, ambas involucradas en el procesamiento de la prohormona proencefalina y en la

producción de neuropéptidos (*Hwang et al., 2007a; Hwang et al., 2007b*); las prohormonas convertidas PC 1/3 y PC2 y la carboxipeptidasa E, las tres trabajando juntas al menos en parte para llevar a cabo el procesamiento de las graninas (*Fugere y Day, 2005*). En el caso concreto de la carboxipeptidasa E, su tendencia a agregarse a otras proteínas granulares a pH ácido y altas concentraciones de calcio recuerdan a las graninas, y no extrañamente un modelo transgénico carente de esta proteína presenta varias características observadas también en animales carentes de cromograninas como los descritos en esta tesis.

El catálogo de péptidos y neuropéptidos mencionados anteriormente incluye al menos tres clases distintas de péptidos opiodes: las encefalinas, mayoritarias, las endorfinas, principalmente en forma de β -endorfina_{1–31}, y las dinorfinas (*Crivellato et al., 2008*); el neuropéptido Y es un péptido de 36 aminoácidos que aparece asociado a las graninas y a las catecolaminas (*Laslop et al., 1989; Fischer-Colbrie et al., 1986*), y realiza una función autocrina de estimulación de la secreción de catecolaminas por medio de un receptor específico (*Cavadas et al., 2006*); las bombesinas son una familia de péptidos implicados en la respuesta al estrés como mediadores antiinflamatorios y con actividad paracrina sobre la corteza adrenal (*Malendowicz y Markowska, 1994; Yegen, 2003*); el factor de crecimiento transformante TGF- β , presente en varias isoformas desde estadios embrionarios (*Combs et al., 2000*); un conjunto de péptidos asociados a efectos sobre la presión arterial pero no derivados de las graninas incluye la adrenomedulina y el PAMP20, hipopresores ambos derivados de la misma prohormona (*Kobayashi et al., 2001*), y la neurotensina, un péptido pequeño de 13 aminoácidos con varias funciones adicionales en el sistema nervioso central y periférico y un control paracrino de la secreción de glucocorticoides y mineralocorticoides en la corteza adrenal (*Nussdorfer, 1996*); la ubiquitina y sus dos derivados, la ubifungina y la ubiquitina_{1–34}, presentan actividad antifúngica (*Kieffer et al., 2003*); finalmente, la existencia de un sistema renina-angiotensina intrínseco a los gránulos cromafines fue confirmada con la detección de renina, angiotensina II y enzima convertidora de angiotensina en gránulos cromafines bovinos.

Los estudios de proteómicas han puesto de manifiesto la existencia de un amplio surtido de proteínas que han sido relacionadas con enfermedades

neuroológicas (*Wegrzyn et al., 2010*): el péptido β -amiloide, las proteasas necesarias para su síntesis a partir de la proteína precursora amiloidea y esta última, todas ellas implicadas en la enfermedad de Alzheimer; la proteína prión; al menos dos proteínas implicadas en síndromes epilépticos, cistatina C y CLN8, y la proteína interactuante con huntingtina, asociada al desarrollo de la corea de Huntington.

1.3.2.3- Calcio y moléculas varias.-

La concentración intragranular del ion Ca^{2+} ha sido estimada en 20–40 mM frente a ~ 100 nM en el citosol (*Mahapatra et al., 2004*). Este ión es necesario durante las primeras etapas de la exocitosis, y durante la última fase de fusión de los gránulos con la membrana plasmática. Además, el Ca^{2+} estimula la endocitosis rápida en las células cromafines. Las vesículas secretoras también son capaces de acumular y secretar ATP y aunque se pensaba que el transporte hacia el interior de las vesículas era a través del transportador de CA, estudios recientes proponen que existe un transportador específico para nucleótidos, llamado VNUT (*vesicular nucleotide transporter*). Otros nucleótidos como GTP, GDP, ADP y AMP, el ácido ascórbico, que actúa como cofactor de la enzima DBH, y al menos dos mucopolisacáridos estructurales, condroitin-4- y condroitin-6-sulfato, también forman parte del contenido granular (*Crivellato et al., 2008*)

1.4.- Matriz intravesicular.-

Tan solo el contenido en catecolaminas de los gránulos cromafines ya alcanza concentraciones de en torno a 0.5-1 M, aproximadamente unos tres millones de moléculas por gránulo, con una osmolaridad teórica muy por encima de la celular, manteniendo sin embargo un diámetro estable y constante. Al mismo tiempo, los estudios de amperometría en célula única permiten estudiar la cinética de la liberación de las catecolaminas desde las vesículas durante la exocitosis, y este proceso es mucho más lento de lo que sería de producirse por difusión simple).

La hipótesis más aceptada para explicar este fenómeno apunta a la existencia de una matriz de naturaleza proteica, cuya función sería la formación de enlaces débiles con las catecolaminas y otros solutos del gránulo que reducirían la osmolaridad efectiva para alcanzar un equilibrio osmótico con el citosol. Al abrirse la vesícula al medio extracelular durante la exocitosis, los enlaces se romperían al variar las condiciones internas del gránulo por la entrada de agua y se produciría la liberación de la carga granular.

1.5.- Las graninas.-

Los componentes fundamentales de la citada matriz proteica son las ya mencionadas graninas, concretamente las cromograninas A (CgA) y B (CgB). Alterar la matriz intravesicular mediante la eliminación selectiva de una o ambas cromograninas anteriormente citadas disminuye drásticamente la cantidad de CA que puede almacenar cada gránulo incluso cuando las células fueron incubadas con L-Dopa antes de registrar, a pesar del consiguiente aumento de CA en el citosol (Domínguez *et al.*, 2012). Por otro, la disminución de la matriz, ya sea por la carencia de la CgA y la CgB (Díaz-Vera *et al.*, 2011) o por un proceso de exocitosis parciales sucesivas (Crivellato *et al.*, 2003), lleva a la formación de gránulos translúcidos con un diámetro dos o tres veces mayor que los gránulos normales, un aumento de tamaño esperable al aumentar la osmolaridad efectiva del gránulo.

Las graninas son una familia de proteínas ácidas y térmicamente estables que aparecen en una amplia variedad de gránulos secretores en tejidos endocrinos y nerviosos jugando un papel principal en el almacenamiento y liberación de las moléculas que colocalizan con ellos en esas estructuras (Huttner *et al.*, 1991; Blázquez and Shennan, 2000). Descubiertas en la médula adrenal en los años 60 (Blaschko *et al.*, 1967), el grupo está compuesto por dos tipos de proteínas estructuralmente diferenciables por medio de un puente disulfuro, presente en el extremo N-terminal de las cromograninas pero no de las secretograninas. No parece existir relación evolutiva directa entr ambas o dentro del grupo de este último, a pesar de las similitudes estructurales y funcionales encontradas (fig. 3)

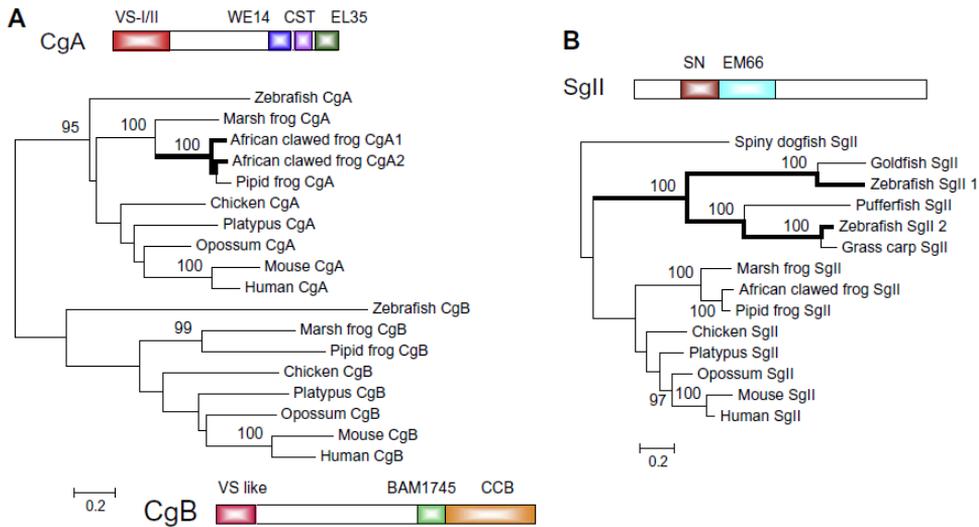


Fig. 3.- Árboles filogenéticos para las cromograninas A (CgA) y B (CgB) y la secretogranina II (SgII) realizados mediante estudios de alineación de secuencias. A, Esquema de la secuencia proteica de las cromograninas mostrando las regiones altamente conservadas a lo largo del árbol, sitas en los extremos N- y C-terminal y ricas en péptidos. La línea más oscura muestra un evento de duplicación de la CgA que tuvo lugar en anfibios. **B,** esquema de la secuencia proteica de la SgII mostrando la región más conservada que contiene dos péptidos de interés. La línea más oscura representa un evento de duplicación de la SgII que tuvo lugar en peces teleósteos (*Zhao et al., 2009*)

1.5.1.- Las secretograninas.-

A diferencia de las cromograninas, como veremos más adelante, las secretograninas forman un grupo heterogéneo filogenéticamente hablando: tanto la secretogranina II (SgII) como la VI (SgVI) se codifican en un único exón, mientras que la secretogranina III (SgIII), la V (SgV) y la proteína VGF se codifican en exones múltiples (*Helle, 2004; Blázquez, 2000; Dopazo et al., 1993; Mbikay et al., 2001; Eder et al., 2004; O'Connor et al., 1984; Taupenot et al., 2003; Gerdes et al., 1989; Ischia et al., 1997*) Su distribución en los organismos vivos es también muy variada: SgV aparece en invertebrados y vertebrados por igual, mientras que VGF y SgVI solo en mamíferos. Los estudios de alineamiento de secuencia muestran que no existe un ancestro común al linaje y, de hecho, SgV, una chaperona que regula la actividad de PC2 (*Mbikay et al., 2001*), no tiene relación evolutiva con el resto de la familia (*Zhao et al., 2009*)

Desde el punto de vista del estudio de los gránulos cromafines, el miembro más relevante de la subfamilia es la SgII. Es una proteína muy ácida de 590 aminoácidos codificada por un único exón y sometida a un extenso procesamiento postraduccional para generación de péptidos, que muestra un alto grado de conservación evolutiva entre especies (Zhao *et al.*, 2009). Sus funciones como proteína completa no están claras. Tanto la aplicación crónica de vasopresina como el PACAP (Turquier *et al.*, 2001) pueden causar un aumento de la síntesis en cerebro y cromafines respectivamente, y la hormona liberadora de gonadotropina estimula su secreción en pituitaria de rata (Conn *et al.*, 1992), mientras que el estradiol disminuye los niveles de mRNA codificante para la SgII en el mismo tejido (Anouar y Duval, 1992). En pacientes con insuficiencia cardíaca crónica o que han sufrido un infarto reciente, los niveles circulantes de la SgII y su producción en cardiomiocitos eran elevados, lo que podría sugerir un papel en la protección contra el apoptosis de dichas células (Røsjø *et al.*, 2012).

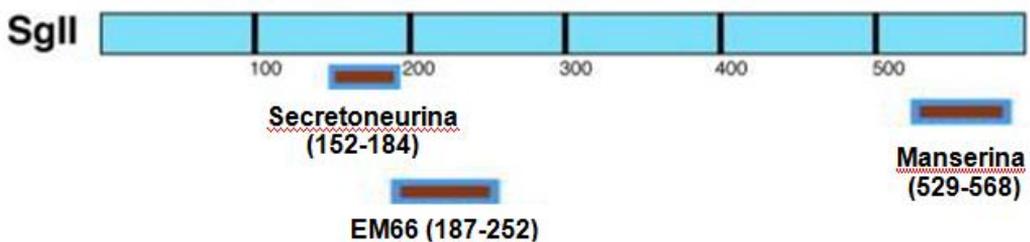


Fig. 4.- Diagrama simplificado de la secuencia proteica de la SgII, incluyendo sus péptidos principales (adaptado de Bartolomucci *et al.*, 2010)

Al menos tres péptidos con actividad biológica derivados de la SgII han sido descritos.

- La secretoneurina (SN), SgII152-184, es un péptido de 33 aminoácidos correspondiente a la sección central de la SgII y bien conservado entre mamíferos. Entre sus funciones mejor documentadas destacan incrementar la velocidad de migración de los monocitos en respuesta a una herida (Reinisch *et al.*, 1993) y la estimulación de la migración de las células endoteliales mediante una combinación de quimiotaxis y efectos antiproliferativos (Kahler *et al.*, 1997). Actúa también como un potente factor de crecimiento para motoneuronas

(Acsadi et al., 2002) y estimulando la liberación de dopamina desde las neuronas nigroestriatales. (Kirchmair et al., 2004) Además, altas concentraciones de SN aparecen en varios puntos de los sistemas nervioso y endocrino (Marksteiner et al., 1994); en la sustancia nigra de rata, una adición de SN aumenta los niveles de GABA y glutamato de forma dependiente de concentración (You et al., 1996).

Asimismo, se ha observado una expresión disminuida de SN en células de pacientes afectados por el síndrome de Prader-Willi, una enfermedad disómica uniparental que causa obesidad inducida por hiperfagia, retraso mental e hipogonadismo (Horsthemke et al., 2003).

- EM66, SgII187-252, es un péptido muy utilizado como marcador de tumores neuroendocrinos por su elevada producción en los feocromocitomas, tumores de la médula adrenal (Guillemot et al., 2006). En condiciones fisiológicas normales, su expresión ha sido detectada en varios puntos de la pituitaria (Montero-Hadjadje et al., 2003) y del sistema nervioso, especialmente relacionados con la respuesta al ayuno (Boutahricht et al., 2007).

- La manserina, SgII529-568 en rata, es un neuropéptido de 40 aminoácidos distribuido a nivel nervioso en el hipotálamo y la eminencia media (Yajima et al. 2004) y a nivel endocrino en duodeno (Yajima et al. 2004) y páncreas (Tano et al. 2010), y cuya expresión depende del estrés. Recientemente se ha descrito su presencia en varias zonas del sistema auditivo y en las sinapsis del sistema vestibular, que controla el equilibrio y el control espacial, y se ha especulado con la posibilidad de que esté involucrado en algunas afecciones relacionadas con el estrés que afligen al oído, como la sordera súbita o el vértigo de Ménière (Ida-Eto et al., 2012).

1.5.2.- Cromogranina A.-

La cromogranina A es una prohormona de 439 aminoácidos con pequeñas variaciones interespecies en tamaño (431 en bovino, 448 en rata) pero con alta conservación de secuencia, especialmente en los dominios N- y C-terminal, cuyos procesamientos diferenciales dan lugar a una serie bien estudiada de péptidos con actividad biológica. Su gen codificante, situado en humanos en el cromosoma

14, comprende 8 exones y 7 intrones, tres de los cuales son casi idénticos a otros tres de la CgB, a lo largo de unas 11 kB (*Wu et al., 1991*). La existencia de sitios de corte dibásicos en la secuencia proteica es común a la SgII, pero la mayoría de péptidos derivados de esta proteína tienen su origen en sitios de corte múltiple con longitud variable, lo que facilita la actividad procesadora de las enzimas convertasas y hace que varios péptidos distintos compartan gran parte de la secuencia aminoacídica (*Zhao et al., 2009*).

La mayor concentración de la CgA aparece en los gránulos cromafines y las vesículas grandes de núcleo denso de los nervios simpáticos. Su presencia en los tejidos neuroendocrinos varía: el sistema nervioso central y periférico y las glándulas pituitaria y paratiroides también son ricas en ella (*Deftos et al., 1991*), mientras que aparece en menor cantidad en las células productoras de calcitonina C del tiroides, el tejido exocrino y las células productoras de insulina y glucagón del páncreas y en la placenta, así como en muchos tumores neuroendocrinos derivados de la médula adrenal o el tejido neuroendocrino difuso del tracto intestinal (*Louthan, 2011*)

El papel funcional de la CgA es múltiple. En primer lugar, la proteína parece estar involucrada en la granulogénesis. Aunque el mecanismo exacto no se conoce con precisión, parece que las propiedades agregativas de la CgA, junto con su capacidad de unirse a las membranas, permiten que las membranas se envuelvan alrededor de los agregados de la CgA formando así las vesículas. Tanto la proteína completa como varias construcciones truncadas conteniendo 115 residuos desde el extremo N-terminal dieron origen a estructuras granulares que colocalizaban con la SgII en el linaje celular no endocrino COS-1, fueron seleccionados en gránulos secretores en células PC12 y pudieron rescatar la formación de gránulos en células A35C (*Stettler et al., 2009*). En células COS-7, no endocrinas y carentes de gránulos secretores, la transfección con la CgA fue suficiente para inducir la biogénesis de estructuras granulares ricas en la CgA que respondían al calcio y presentaban una dinámica e interacción con el citoesqueleto similar a los gránulos cromafines y distinta de las vesículas de secreción constitutiva (*Elias et al., 2012*). Sin embargo, ratones carentes de la proteína son capaces de generar y mantener gránulos cromafines funcionales, aunque con menor capacidad para acumular y secretar CA y una dinámica de liberación más lenta (*Díaz-Vera et al., 2012*), lo que parece indicar que la CgA es

suficiente pero no necesaria para la génesis y mantenimientos de las vesículas de secreción regulada.

La CgA presenta una configuración de espiral aleatoria y una pequeña contribución de la conformación de α -hélice y de lámina- β plegada. Se ha observado que la adición de Ca^{2+} a la CgA induce considerables cambios conformacionales a diferentes pH (5,5 y 7,4), siendo estos cambios preferentemente en la estructura α -hélice y lámina β -plegada. Así, se ha observado que el grado de agregación de la CgA es dependiente del Ca^{2+} y del pH. Es esta acidificación, junto con la captación de Ca^{2+} desde el citoplasma, lo que permite el proceso de compactación del contenido de las vesículas secretoras. La compactación de los componentes no sólo reduce la presión osmótica de las vesículas, sino que además, facilita la incorporación de nuevas moléculas, y su más que probable papel como acumulador de CA para secreción (*Wen et al., 2004*).

La relación de la CgA con el control de la presión arterial ha sido bien documentada, tanto la proteína completa como varios de sus péptidos (*Vaingankar et al., 2010; Biswas et al., 2008*); varios polimorfismos asociados a la región que contiene el péptido catestatina mostrado menor propensión a padecer hipertensión (*Rao et al., 2007*), y una variante común de la región no codificante 3' del gen aparece fuertemente asociada a la hipertensión extrema, especialmente en hombres (*Chen et al., 2008*).

Fuera de las vesículas, muestra actividad autocrina como inhibidor concentración-dependiente de la secreción de péptidos derivados de la proopiomelanocortina (*Wand et al., 1991*), de la secreción de amilasa inducida por colecistoquinina desde el páncreas exocrino en humanos (*Funakoshi et al., 1988*) y de la secreción ácida de las células parietales en estómago de conejo (*Lewis et al., 1989*). Esta actividad se añade a su valor diagnóstico en tumores neuroendocrinos, como los feocromocitomas, tumores de páncreas y síndromes carcinoides (*Cotesta et al., 2005; Wu et al., 2000; Nikou et al., 2005*).

La relación de la CgA con las enfermedades neurodegenerativas se conoce desde hace dos décadas. Fue la primera granina caracterizada en las placas asociadas a la enfermedad de Alzheimer (*Munoz, 1991*), aproximadamente un 20% de las placas β -amiloides la contienen (*Marksteiner et al., 2002*) y se ha

postulado su rol como potenciador de la neuroinflamación vía inducción de la apoptosis de la microglía (Davenport et al., 2010), lo que podría jugar también un papel en el desarrollo de la esclerosis lateral amiotrófica (Ciesielski-Treska et al., 2001). Asimismo, los niveles de la CgA en el fluido cerebroespinal y el córtex prefrontal de personas afectadas por esquizofrenia se ven disminuidos (Landen et al., 1999; Iwazaki et al., 2004) y sin embargo aumentan en suero (Guest et al., 2010), aunque aún no está claro si como parte de la causa o de la consecuencia, y varios polimorfismos frecuentes en poblaciones asiáticas han sido asociados con una mayor incidencia de la enfermedad (Takahashi et al., 2006).

Recientemente se ha sugerido que la CgA juega un papel importante en la angiogénesis tumoral, bien sea inhibiéndola como proteína entera o como el péptido derivado VS-I (Dondossola et al., 2011), bien fomentándola como el péptido derivado catestatina (Theurl et al., 2010).

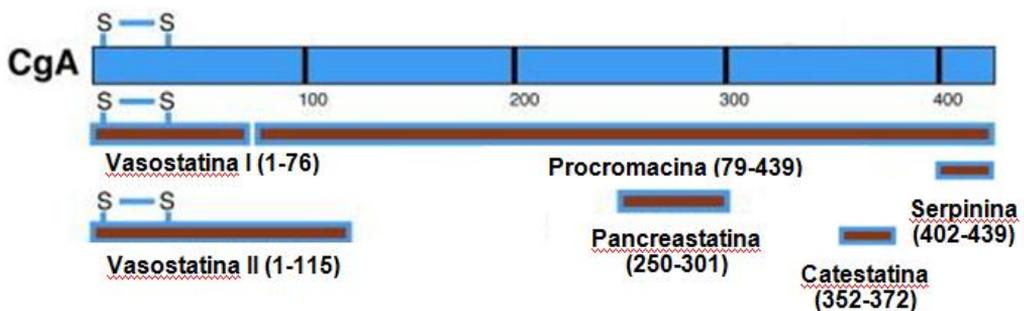


Fig. 5.- Diagrama simplificado de la secuencia proteica de la CgA, incluyendo sus péptidos principales (adaptado de Bartolomucci et al., 2010)

De hecho, gran parte de la actividad biológica de la CgA no la lleva a cabo la proteína completa, sino sus péptidos derivados.

- Las vasostatinas son un grupo de polipéptidos de entre 7 a 22 kD derivados del extremo N-terminal altamente conservado de la CgA y llamados así por su actividad inhibitoria vascular en los vasos sanguíneos humanos (Aardal et al., 1993). Dos tipos principales, VS-I (CgA1-76) y VS-II (CgA1-113), han sido aislados de gránulos cromafines bovinos (Bauer et al., 1997), y varios péptidos cortos de este grupo, tales como CgA1-40, CgA7-57, CgA47-66 y CgA67-76 se almacenan y liberan con las CA (Tota et al., 2007). Estos fragmentos N-terminales presentan capacidad para

inhibir el crecimiento microbiano (*Lugardon et al., 2000*), vasorrelajación (*Aardal et al., 1993*) e influyen la liberación de hormonas y el crecimiento tumoral en el sistema endocrino (*Veschini et al., 2011*).

- La catestatina, CgA352–372 en humanos, se genera a partir del procesamiento del extremo C-terminal de la CgA, y actúa como un inhibidor de la secreción de CA inducida via receptores nicotínicos (*Montero-Hadjadje et al., 2008*). Además de su ya comentada actividad en la angiogénesis tumoral, la catestatina puede disminuir la hipertensión causada por estrés a niveles normales en ratones carentes de la CgA (*Gayen et al., 2009a*), disminuyendo las CA circulantes en plasma y aumentando a niveles normales la sensibilidad barorrefleja, lo que parece indicar un rol importante en el control de la presión arterial. Varios polimorfismos de este péptido han sido identificados como factores de riesgo de hipertensión en poblaciones humanas (*Sahu et al., 2012*).

- La pancreastatina, CgA250-301 en humanos, fue aislada como un inhibidor de la liberación de insulina estimulada por glucosa en el páncreas porcino (*Tatemoto et al., 1986*) y posteriormente identificada como un péptido derivado de la región central poco conservada de la CgA (*Montero-Hadjadje et al., 2008*). Presenta también la capacidad de estimular la lipogénesis inducida por insulina (*Sánchez-Margalet and González-Yanes, 1998*) así como de inhibir la síntesis de glucógeno inducida por insulina (*Sánchez-Margalet, 1999*). Niveles elevados y correlacionados de pancreastatina y CA en mujeres afectadas de diabetes gestacional pueden indicar un potencial efecto regulador del péptido sobre ellas (*Sánchez-Margalet et al., 1998*). Los ratones carentes de la CgA han exhibido un fenotipo de hipersensibilidad hepática a la insulina que se desarrolla con la edad, pero que pudo ser rescatado mediante la adición de pancreastatina (*Gayen et al., 2009b*)

- La procromacina, CgA79-439 en humanos, es el precursor de pancreastatina y catestatina, entre otros. Tiene actividad biológica propia, actuando como antifúngico y bacteriostático (*Strub et al., 1996*) mediante la formación de canales iónicos en la membrana del patógeno.

- La serpinina es un péptido de 26 aminoácidos derivado de la región C-terminal. Fue recientemente aislada y caracterizada como fundamental

para promover rápidamente la formación de vesículas de núcleo denso mediante la inhibición de la degradación de las graninas en el Golgi gracias a una complicada cadena de kinasas celulares dependiente de cAMP (Koshimizu *et al.*, 2010). Se ha propuesto que este mecanismo de forma autocrina / paracrina para garantizar la síntesis rápida de nuevas vesículas y gránulos que sustituyan a las liberadas durante la exocitosis, así como protector frente a la muerte celular y el estrés oxidativo en neurona, pituitaria y corazón. Se la ha encontrado además en al menos dos formas adicionales, una piroglutaminada y otra extendida de forma C-terminal (Loh *et al.*, 2012).

Varios otros péptidos derivados de la CgA han sido descrito y caracterizados, con la lista todavía aumentando, pero poco o nada se sabe de su rol fisiológico más allá de su localización en el organismo: EL35 aparece en la pituitaria y la médula adrenal (Montero-Hadjadje *et al.*, 2002); la parastatina, originalmente generada *in vitro* de la CgA porcina y posteriormente identificada *in vivo* (Fasciotto *et al.*, 2000), inhibe la secreción paratiroidea; WE-14 es otro péptido derivado del extremo C-terminal, ampliamente extendido por el sistema endocrino aunque su papel fisiológico permanece poco conocido, siendo su actividad más documentada el aumento en la liberación de histamina estimulada por inmunoglobulina E en ratas (Forsythe *et al.*, 1997); la β -granina (Lla CgA1–128) parece implicada en la inhibición de la liberación de insulina estimulada por glucosa y potasio (Schmid *et al.* 2007) y la cromacina es un péptido corto, 21 aminoácidos, aislado en bovino y con fuerte acción bacteriostática (Strub *et al.*, 1996)..

1.5.3.- Cromogranina B.-

La cromogranina B es una prohormona, 657 aminoácidos precedidos por un péptido señal de otros 20, con un grado de homología de secuencia entre especies algo menor que la CgA pero centrada también especialmente en los dominios N- y C-terminal, cuya abundancia en péptidos con actividad biológica comparte (Ait-Ali *et al.*, 2002; Helle, 2004; Montero-Hadjadje *et al.*, 2008). Su gen codificante, situado en humanos en el cromosoma 20, comprende 5 exones y 4 intrones, varios de los cuales, como ya se ha mencionado previamente, presentan gran similitud con otros tres de la CgA (Zhang *et al.*, 2002).

La concentración de la CgB en los gránulos cromafines y las vesículas grandes de núcleo denso varía entre especies en relación a la de Lla CgA, con la que también comparte una amplia presencia los tejidos neuroendocrinos y nerviosos: glándulas mamarias (*Grönberg et al., 2010*), páncreas (*Karlsson et al., 2000*), tiroides (*Weiler et al., 1989*), corazón (*Heidrich et al., 2008*), etc.

La CgB es vital para la exocitosis regulada porque participa en la granulogénesis (*Glombik et al., 1999*), y es capaz de inducir el proceso en linajes celulares no endocrinos de forma incluso más eficaz que la CgA en cuanto a número de vesículas grandes de núcleo denso por célula (*Huh et al., 2003*). De nuevo, sin embargo, los estudios con ARN interferente (*Huh et al., 2003*) demostraron que la eliminación de la proteína disminuye pero no elimina por completo el número de gránulos; y un modelo transgénico carente de la CgB ha demostrado ser capaz de llevar a cabo la exocitosis de CA, si bien los gránulos son capaces de almacenar y liberar menor carga de forma análoga a lo sucedido con la CgA (*Díaz-Vera et al., 2012*).

El papel de la CgB en las cascadas de señalización de Ca^{2+} a nivel neuronal parece ser importante. Tanto la CgA como la CgB son capaces de facilitar dichas cascadas mediante su unión al receptor transmembrana del retículo endoplásmico $InsP_3R_1$ desde el lumen reticular (*Thrower et al., 2003*); esa unión permite mejorar el tráfico del segundo mensajero $InsP_3$ e incrementar la respuesta de liberación de calcio. Sin embargo, sólo la CgB es expresada de forma diferencial en varias zonas del hipocampo donde coexiste o no con el receptor, modulando por presencia o ausencia la citada respuesta (*Nicolay et al., 2007*).

También ha sido bien descrito el efecto que la CgB tiene sobre el metabolismo de la glucosa. En ratones carentes de la proteína, la secreción estimulada de insulina, glucagón y somatostatina aparecía disminuida a nivel de los islotes y de la liberación de insulina al plasma, aunque en condiciones basales la concentración de la hormona era mayor que en los controles. Todo ello sin que apreciaran diferencias en la granulogénesis, morfología o funcionalidad de los gránulos de insulina en los islotes β (*Obermüller et al., 2010*).

Hasta una de cada cuatro placas amiloides examinadas en cerebros de personas afectadas por la enfermedad de Alzheimer han resultado contener la CgB (*Marksteiner et al., 2002*), porcentaje que aumenta hasta casi un 60% en

modelos transgénicos que sobreexpresan precursores del péptido β -amiloide (Willis et al., 2008). Algo similar ocurre en relación con la enfermedad de Pick, una rara forma de neurodegeneración caracterizada por la presencia de agregaciones esféricas de proteínas Tau llamadas cuerpos de Pick, ricos en la CgB (Bergmann et al., 1996). Asimismo, la expresión de la CgB aparece fuertemente reducida en determinadas áreas del hipocampo y en el fluido cerebroespinal de personas afectadas por esquizofrenia (Nowakowski et al., 2002; Landen et al., 1999), además de aparecer la proteína en varias listas de genes que pueden conferir propensión a sufrir la enfermedad (Kitao et al., 2000; Wu et al., 2007). Los polimorfismos de la proteína también han arrojado luz sobre su influencia en otras patologías: una variante poco común de la región central de la CgB ha sido identificada como factor de riesgo para la esclerosis lateral amiotrófica capaz además de acelerar la aparición de los síntomas casi una década (Gros-Louis et al., 2009), y otras dos variantes comunes, A296T y A261T, conferirían un riesgo mayor de padecer hipertensión, solo en varones y especialmente frente a situaciones de estrés (Zhang et al., 2010)

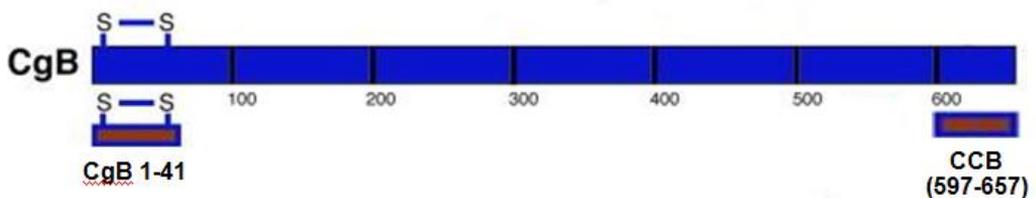


Fig. 6.- Diagrama simplificado de la secuencia proteica de la CgB, incluyendo sus péptidos principales (adaptado de Bartolomucci et al., 2010)

El número de péptidos con actividad biológica identificados como derivados de la CgB es pequeño:

- CgB₁₋₄₁ es un péptido de la región N-terminal que aparece en la CgB bovina y parece tener acción inhibitoria sobre la hormona paratiroidea (Russell et al., 1994).
- CCB, CgB597-657, es un péptido de la región C-terminal que ha sido aislado en varios tumores endocrinos en humanos (Nielsen et al., 1991; Iguchi et al., 1992), y que se sospecha tiene funciones de regulación

neuroendocrina. Su procesamiento adicional produce secretolitina, un péptido muy corto, 12 aminoácidos tan solo, con actividad bacteriostática y posibles efectos endocrinos (*Strub et al., 1995*).

Entre otros péptidos menos documentados destacan BAM-1745, un péptido que pertenece al dominio de la proteína más conservado en mamíferos (*Grandy et al., 1992*), sugiriendo un efecto fisiológico importante, pero del que poco se conoce más allá de su secuencia; GAWK, CgB420-493, un péptido aislado de pituitaria humana y cuyo interés se ha centrado en su valor diagnóstico de tumores endocrinos (*Sekiya et al., 1989*), y PE-11, un péptido muy abundante en cerebro humano al que se ha relacionado con esclerosis lateral amiotrófica y esquizofrénica (*Marksteiner et al., 1999; Bartolomucci et al., 2010*). Además, varios fragmentos centrales de la proteína han podido ser identificados por medio de anticuerpos en el fluido cerebroespinal de pacientes aquejados de esclerosis múltiple (*Bartolomucci et al., 2010*)

1.6.- Estudio de la conducta.-

1.6.1.- Antecedentes históricos

En el libro noveno de su obra “La historia de los animales”, el filósofo griego Aristóteles describe a los animales según una particular clasificación: “De los animales que son comparativamente desconocidos y de vida corta, los caracteres o disposiciones no son tan obvios de reconocimiento como los de aquellos de vida más larga. Estos últimos parecen tener una capacidad natural que corresponde a cada una de las pasiones: astucia o simplicidad, coraje o timidez, temperamento bueno o malo, y otras similares disposiciones de mente. Algunos son también capaces de dar o recibir instrucciones – de recibirlas de otro de su misma clase o del hombre: aquellos que tiene la facultad del oído, por ejemplo; y para no limitar el asunto a los sonidos audibles, aquellos que pueden diferenciar el significado sugerido de una palabra y un gesto”.

Aunque habían transcurrido más de dos mil años desde su redacción, la concepción enunciada por el filósofo griego de la conducta animal como algo intrínsecamente separado si bien similar a la conducta humana seguía estando vigente cuando Darwin publicó su primera versión de “El origen de las especies”

en 1859. Sin embargo, en un acto de coherencia con el resto de su teoría de la evolución por medio de la selección natural, el naturalista británico concluye el capítulo séptimo de su libro, dedicado al instinto, de la siguiente forma: “He dedicado brevemente este capítulo a demostrar que las cualidades mentales de nuestros animales domésticos varían, y que las variaciones son heredables. Aún más brevemente he intentado demostrar que los instintos varían levemente en estado salvaje. Nadie discutirá que los instintos son de la mayor importancia para cada animal. Por lo tanto no veo dificultad alguna, bajo las cambiantes condiciones de la vida, en que la selección natural acumule ligeras modificaciones del instinto en cualquier ámbito y hacia cualquier dirección”.

Esta idea, central al cuerpo teórico de la teoría de la evolución, es desarrollada y extendida al animal humano por el propio Darwin en dos de sus obras posteriores, “El origen del hombre y de la selección en relación al sexo” y “La expresión de las emociones en el hombre y en los animales”, publicadas sucesivamente en 1871 y 1872. El segundo es un tratado ilustrado con fotografías, uno de los primeros jamás escritos, recoge las similitudes y diferencias de la emotividad animal y el valor universal de la expresión facial. El primero, probablemente la obra más comprometida de Darwin, es un detallado estudio psicológico y ético de la sociedad y de las distintas razas humanas conocidas desde la perspectiva de la evolución como hecho biológico. En sus conclusiones finales, en mi opinión uno de los textos capitales del conocimiento humano, afirma: “He provisto la evidencia hasta el límite de mi capacidad; y debemos reconocer, así me parece, que el hombre con todas sus nobles cualidades, con la simpatía que siente por los más desfavorecidos, con la benevolencia que extiende no solo a otros hombres sino también a las más humilde criatura viva, con su intelecto cuasidivino que ha penetrado en los movimientos y la constitución del sistema solar – con todos estos celebrados poderes – **el hombre aún porta en su forma corpórea la indeleble marca de su humilde origen**”

Si bien ambos tratados resultaron ser enormemente populares a pesar de su tamaño abultado y contenido polémico entre el público general, el propio Darwin afirmó a un amigo estar muy impresionado por el acuerdo general con el

que sus puntos de vista sobre el hombre habían sido recibidas³, otros científicos y naturalistas atacaron su obra por ampliar el concepto evolutivo al hombre sin tener en cuenta sus cualidades metafísicas diferenciales. El propio Russel Wallace, amigo y colega de Darwin y descubridor también, de forma independiente, de la selección natural, tenía ideas muy diferentes a las suyas que implicaban una causa no material y un devenir finalista necesarios en el desarrollo de la humanidad como especie.

Sin embargo, a pesar de la visible y progresiva oposición de la comunidad científica de la época a gran parte de su teoría, que condujo al descrédito de la misma hasta la revolución neodarwinista o “síntesis moderna” de la teoría de la evolución a mediados del siglo veinte, la idea de que la conducta humana comparte un origen evolutivo común con la del resto de los animales y por tanto puede y debe ser estudiada con esto en mente, ha permanecido en el centro de la investigación en conducta.

1.6.2.- La ciencia de la conducta animal

En la ceremonia de entrega de los premios Nobel de 1973, el ecléctico científico sueco Börje Cronholm fue el encargado de presentar el premio de Fisiología y Medicina. En su discurso puede leerse: “Los descubrimientos realizados por los laureados de este año se basan en estudios en insectos, peces y pájaros y podrían por tanto parecer de escasa importancia para la fisiología o la medicina humana. Sin embargo, sus descubrimientos han sido un prerrequisito para la investigación comprensiva que ahora se lleva a cabo en mamíferos. (...) Esto es cierto para todas las especies, también para aquella que con desvergonzada vanidad se ha bautizado a sí misma “*Homo sapiens*”⁴. Los galardonados así loados eran los austríacos Karl von Frisch y Konrad Lorenz y el holandés Nikolaas Tinbergen, conocidos conjuntamente como los padres de la etología.

Karl von Frisch dejó la carrera de medicina apenas comenzada para obtener su doctorado en zoología en su Viena natal en 1910, mientras Konrad y Gretl aun

³“The life and letters of Charles Darwin, including an autobiographical chapter, edited by his son, Francis Darwin”, Volúmen 1, página 133; edición de John Murray, 1887.

⁴ http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1973/presentation-speech.html

caminaban por las marismas del Danubio perseguidos por una fila de patos. Obsesionado con la percepción del mundo por los animales, realizó experimentos sobre la audición y la capacidad para distinguir colores en los peces antes de cambiar de modelo experimental a las abejas, a las que dedicó la mayor parte de su labor investigadora.

Merced a un extraordinario ojo para el detalle y una serie de ingeniosos experimentos realizados a lo largo de casi cincuenta años de carrera investigadora, von Frisch demostró que las abejas poseen la capacidad de utilizar el sol como brújula tridimensional incluso en un día nublado mediante su capacidad para percibir la radiación ultravioleta del astro y su patrón de polarización, y pueden comunicar al resto de miembros de la colmena la posición exacta y la distancia a recorrer para encontrar un depósito de alimento mediante variaciones casi imperceptibles en su danza (*von Frisch, 1946*). El grado de detalle de la información comunicada es tal que puede ajustarse el movimiento para incluir variaciones en la velocidad del viento y la posición del sol a lo largo del día. El cuerpo experimental reunido por el científico austriaco fue sin duda el más extenso y exhaustivo existente en su época.

Konrad Lorenz y Nikolaas Tinbergen habían llevado vidas muy parecidas en lo personal y lo profesional: un interés en su juventud por las aves y la vida salvaje que les llevó a convivir con sus objetos de estudio en su hábitat natural, una base en anatomía comparada que ambos extrapolaron a la fisiología y la conducta, una precoz carrera académica, una concepción nativista de la conducta, según la cual esta era resultado de una serie de instintos codificados en los organismos vivos y no de la experiencia y el aprendizaje...

El 28 de noviembre de 1936, el profesor Cornelius van der Klaaw organiza un simposio sobre el instinto en la universidad de Leiden e invita a Lorenz como uno de los oradores principales, en ambos casos gracias a la insistencia de su joven asistente Tinbergen. El encuentro entre ambos no puede resultar más favorable. Lorenz diría casi cuarenta años después: "(...) este fue ciertamente el evento que me trajo las consecuencias más importantes durante el transcurso de aquel simposio. Nuestros puntos de vista coincidían de forma asombrosa, pero

pronto comprendí que era superior a mí en lo concerniente al pensamiento analítico y al diseño de experimentos simples y reveladores”⁵.

Tinbergen pasó el verano siguiente en casa de Lorenz en Altenberg estudiando la conducta de los gansos durante la puesta de huevos, y allí nació una de las amistades más fructíferas de la ciencia contemporánea, que se prolongaría cincuenta años hasta su muerte casi simultánea y sobreviviría incluso a la militancia de ambos en bandos opuestos durante la segunda guerra mundial.

Lorenz había pasado del nativismo a una visión más moderada que integraba la naturaleza propia del organismo, desde el estudio de la anatomía y el comportamiento comparados, y la experiencia adquirida a lo largo de la vida, y por el camino había creado toda una nueva terminología específica y esbozado una serie de teorías y conceptos del comportamiento como los liberadores sociales (*Lorenz, 1935*) y la impronta.

Tinbergen, por su parte, había demostrado la veracidad de los comentarios de Lorenz sobre su inventiva científica mediante una serie de experimentos que confirmaron las predicciones y observaciones previas del austríaco (*Tinbergen, 1948*), pero también aportó algo más: si von Frisch había generado el primer cuerpo de conocimiento riguroso, complementado y aumentado por Lorenz, él mismo y un número cada vez mayor de estudiosos de la conducta, y el propio Lorenz había generado y aportado buena parte del cuerpo teórico, el científico holandés fue más allá. En un artículo dedicado a su amigo en su sesenta cumpleaños, Tinbergen adaptó la idea aristotélica de las cuatro causas y los tres problemas de la biología de Huxley para definir el ámbito de estudio de la nueva ciencia de la conducta, ya por entonces conocida como etología (*Tinbergen, 1963*). De acuerdo con su formulación, todo comportamiento debe poder explicarse en base a cuatro preguntas:

1. ¿Cómo funciona desde un punto de vista operativo?
2. ¿Por qué se produce desde un punto de vista evolutivo?
3. ¿Para qué sirve desde un punto de vista adaptativo?
4. ¿Cómo llega a aparecer desde un punto de vista individual?

⁵ http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1973/lorenz.html

Las cuatro preguntas de Tinbergen, tradicional aunque no exclusivamente asociadas con el estudio de la anatomía, la filogenia, la biología evolutiva y la ontogenia conforman el esqueleto teórico en el cual se debe enmarcar todo estudio científico de la conducta.

1.6.3. Los modelos animales en conducta

Dos conclusiones lógicas de los postulados de Tinbergen relevantes para la biomedicina son: A) Cuanto más próximas estén dos especies evolutivamente (más similares sean su anatomía, historia evolutiva y nicho ecológico), más se parecerán sus conductas. B) Los cambios de conducta que se aprecien entre los miembros de una misma especie deben por tanto estar causadas por diferencias individuales.

En este sentido, puede definirse un modelo animal en su acepción más habitual como “un organismo vivo con un proceso patológico heredado, adquirido naturalmente o inducido que se asemeja en uno o más aspectos a la versión del mismo fenómeno que ocurre en el hombre” *(Wessler, 1976)*, y, por extensión, cualquier modificación realizada en un animal que resulte en un fenotipo similar a una condición humana, patológica o no, y pueda ser utilizada para su estudio.

Dadas las complejidades científicas y filosóficas del empleo de modelos animales, la literatura disponible referida a este concepto desde múltiple enfoques es abundante y variada. Aunque no es el objetivo de esta tesis ahondar en la naturaleza y aplicaciones de los mismos, conviene tener presente una serie de características deseables a la hora de escoger un modelo animal adecuado para la investigación. El Consejo Nacional de Investigación de Estados Unidos definía ya estas directrices hace más de tres décadas⁶: idoneidad como análogo en el caso del fenómeno a estudiar, uniformidad genética de los individuos, amplio trasfondo documental y científico de las propiedades biológicas, buen potencial de generalización de los resultados, facilidad de manipulación experimental y escasas implicaciones éticas y ecológicas del uso del modelo.

En el caso concreto del estudio de la conducta, la principal dificultad de los modelos animales reside en la complejidad de evaluar la misma y sus estados

⁶ http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=6066&page=54

anormales, ya que existe un amplio grado de variación interespecífica debido al nicho ecológico (Woodward *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2007; Weinbeer y Kalko, 2007) así como de variación interespecífica individual (Bergmüller y Taborsky, 2010). Asimismo, muchos de los criterios diagnósticos de las enfermedades mentales en humanos son inaplicables o bien imposibles de determinar en la mayoría de modelos animales. Por poner un ejemplo, de los once síntomas comunes de la depresión definidos por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos⁷ al menos seis (anhedonia, astenia, dificultad para concentrarse, sentimientos de autodesprecio y culpa, desesperación y tendencias suicidas) escapan del ámbito de los modelos existentes

Con el fin de evitar en la medida de lo posible este problema, el procedimiento habitual de estudio de la conducta requiere definir los fenotipos correspondientes a un mismo origen etológico o patológico de forma observable, medible y verificable en el modelo y el ser humano (Gould y Gottesman, 2006), lo que a su vez requiere un conocimiento en profundidad de la biología del modelo en cuestión.

1.6.3.1 El ratón de laboratorio como modelo animal

El ratón de laboratorio más comúnmente empleado pertenece a la especie *Mus musculus*, con varias subespecies definidas; otras especies del género *Mus*, como *M. spretus* o *M. pahari*, así como algunas variantes del género *Peromyscus* también son de uso frecuente. Todas ellas pertenecen al orden Rodentia, generalmente denominados roedores, cuyo último antepasado común con los seres humanos parece haber existido hace unos 60 a 80 millones de años, durante la tercer gran división de los mamíferos placentarios que dio origen a los primates y dermópteros por un lado y los roedores, lagomorfos y escandentios por el otro (Meredith *et al.*, 2011).

Aunque las observaciones de naturalistas sobre el ratón común puede rastrearse hasta la antigua China y la domesticación de variedades para su uso como mascotas era ya frecuente en Extremo Oriente en el siglo XVIII, la

⁷ <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003213.htm>

utilización sistemática de ratones de laboratorio es considerablemente más reciente⁸.

El primer uso documentado de ratones de laboratorio con un propósito de investigación biomédica ha sido rastreado hasta la investigación del francés Lucien Cuénot, autor de varios artículos pioneros sobre la aplicación de las leyes de Mendel en mamíferos (*Cuénot, 1902; Cuénot, 1908*). Posteriormente, tras más de dos décadas de estudios relacionados con la susceptibilidad genética de distintos ratones al cáncer, la necesidad de uniformizar las estirpes de ratones de laboratorio se hace evidente y el genetista americano Clarence Little crea mediante cruces las primeras cepas endogámicas, DBA y C57BL/R, y posteriormente funda un laboratorio en Bar Harbor, Maine, en 1929, que pasará a llamarse The Jackson Laboratories⁹ y se convertirá en el primer generador y vendedor de cepas estables del mundo.

Dadas la facilidad y economía de mantenimiento y reproducción, la existencia de cepas estables disponibles comercialmente y el amplio caudal de conocimiento generado por los estudios de cáncer durante las primeras décadas del siglo XX, el ratón se convirtió en el modelo por excelencia junto a *Drosophyla melanogaster*, hasta tal punto que su genoma fue el segundo de mamíferos en ser secuenciado después del humano (*Chinwalla et al., 2002*).

Fisiológicamente hablando, el ratón de laboratorio es un animal nocturno con actividad moderada en horas de luz, ingesta de comida y agua cíclica, un período fértil de hasta nueve meses de duración que comienza a las ocho semanas de vida (algo antes en hembras) y gestaciones de tres semanas que producen camadas de 6 a 12 crías de media¹⁰; su vista es pobre en comparación a sus agudos olfato y oído (*Green et al., 1966*), y poseen un número variable de vibrisas faciales de hasta 30 mm. de longitud con una elaborada función somatosensorial (*Curtis y Kleinfeld, 2006*).

La estructura social de los ratones en la naturaleza se denomina deme, e incluye un macho dominante, varias hembras reproductoras y un número

⁸ <http://www.genome.gov/10005832>

⁹ <http://web.archive.org/web/20060925162120/http://www.jax.org/about/timeline/1900.html>

¹⁰ http://www.medicine.mcgill.ca/arc/forms/ed_train/Handout%20Mouse%20Module%201-Sept%2009.pdf

variable de machos subordinados sin aparente jerarquía adicional entre ellos. La dominancia se establece mediante luchas violentas entre los machos de edad adecuada en edades tempranas y permanece inalterable durante períodos largos en ausencia de nuevos miembros ajenos al deme (*Reiner y Petras, 1967*); en el laboratorio, suele manifestarse mediante el corte selectivo del pelo facial o corporal, o bien de las vibrisas faciales, por parte del macho dominante ante la pasividad de los subordinados frente al doloroso proceso, un fenómeno sorprendente y robusto conocido como “barbering” o “efecto Dalila” (*Sarna et al., 2000*).

Tanto esta dominancia como la agresión entre machos, así como la conducta sexual de los mismos, está fuertemente determinada por estímulos olfativos (*Wang et al., 2006*); dado que la influencia entre sexos en la conducta del ratón de laboratorio fue ya bien documentada hace más de medio siglo (*Brown, 1953*), y asimismo, las diferencias conductuales entre machos y hembras de idéntico genotipo han cobrado cada vez más relevancia en investigación (*Cahill, 2006*), la segregación de los sexos en el alojamiento y la experimentación es una práctica frecuente en estudios de conducta.

El enriquecimiento ambiental, definido como cualquier condición existente en el alojamiento del animal que facilite una estimulación sensorial, cognitiva y motora frente al alojamiento común (*Nithianantharajah y Hannan, 2006*), también es frecuente en experimentación, y ha demostrado una serie de beneficios desde la disminución de la variabilidad en los resultados experimentales (*Hannan, 2010*) hasta la mejora de la calidad de vida de los sujetos (*Olsson y Dahlborn, 2002*).

En cuanto a la evaluación de la conducta en el animal propiamente dicha como parte de su interés como modelo, el diseño, elección y aplicación de la batería de tests se centra en las características naturales del mismo y la respuesta que se produce al presentarle diversos estímulos.

En este sentido, un estímulo novel ha sido definido clásicamente de forma algo obvia pero necesaria como aquel que no puede ser distinguido de otros por sus propiedades fisicoquímicas sino solamente por su nula interacción anterior con el sujeto (*Hughes, 2006*). Optar por un estímulo novel frente a otro ya experimentado se considera neofilia y rehuir los estímulos noveles frente a los

habituales neofobia (*Barnett, 1958*). Este tipo de respuesta se ha asociado tradicionalmente con el estudio de la ansiedad (*van Haaren, 1993*) y el miedo (*Belzung y Griebel, 2001*)

Si bien los ratones de laboratorio han perdido parte de la neofobia que caracteriza a sus congéneres en la naturaleza (*Kronenberger y Médioni, 1985*), la amplia variedad de expresiones de este fenómeno ha permitido desarrollar una serie de tests para su interpretación y medición.

La reacción frente a un ambiente novel, especialmente la conducta exploratoria del animal, ha sido particularmente explotada mediante dos enfoques distintos: primero, exponer a un animal a un espacio nuevo del que no existe salida posible (campo abierto) permite cuantificar la distancia explorada y una serie de comportamientos y estereotipias (*Walsh y Cummins, 1976*); segundo, presentar al animal la opción de moverse entre distintos espacios cuyo grado de novedad es diferente (caja luz-oscuridad, hole-board, laberinto en T y en Y) permite cuantificar directamente la neofilia del animal (*Bourin y Hascoët, 2003; Thiébot et al., 1973; Mitchell et al., 1984*) como medida directa del tiempo pasado en cada espacio y el comportamiento en ellos.

Los ambientes desagradables al animal de los que no existe una salida posible (test de natación forzada o de Porsolt, test suspensión por la cola) permiten evaluar la conducta depresiva como relación directa del tiempo que el sujeto lucha contra el estímulo adverso (*Cryan et al., 2005; Petit-Demouliere et al., 2005*); adicionalmente, la tendencia del animal a evitar estos estímulos permite, mediante una estrategia adecuada, testar la memoria y el aprendizaje: los laberintos de brazos múltiples (laberinto de brazos radiales) pueden utilizar un estímulo desagradable como la orina de un competidor en determinado brazo y medir cuánto tarda el animal en aprender a evitarlo (*Fitzgerald et al., 1998*); una plataforma de escape oculta que permite salir de un ambiente desagradable como el agua (laberinto acuático de Morris) ofrece al animal una posibilidad rápida de escape si consigue recordar donde se encuentra con el paso de los días (*Vorhees y Williams, 2006*); un indicio que preceda a un estímulo desagradable ayuda a evitar este al animal que aprenda a asociarlos (test de evitación activa) (*Benus et al., 1989*).

La naturaleza del estímulo también ha sido aprovechada con cierto éxito en los estudios de conducta. La reacción a un estímulo auditivo concreto permite evaluar la patología esquizofrénica y otros desórdenes neuropsiquiátricos en humanos y la traslación de la técnica al modelo ha resultado exitosa (*Powell et al., 2009; Geyer et al., 2002*); los estímulos olfativos, como la orina de un competidor o de un predador pueden resultar de interés para el estudio de la ansiedad, la agresión y el miedo (*Stowers et al., 2013*), como se ha comentado previamente; la preferencia por nuevos y más gratos sabores frente a la indiferencia se ha utilizado con éxito en modelos de adicción a sustancias y de depresión como análogo a la anhedonia (*Edwards y Koob, 2012; Strekalova y Steinbusch, 2009*).

Finalmente, la exposición del animal a ejemplares desconocidos de su misma especie también puede aportar información. Los test de interacción social exponen a un sujeto a otro contenido en una jaula especial que permite evaluar cómo se comporta el sujeto en presencia del animal extraño (*Kaidanovich-Beilin et al., 2011*). Los test de residente-intruso permiten evaluar la agresividad del sujeto enfatizando su territorialidad natural mediante el aislamiento en una jaula y/o la privación temporal de comida y agua (*Miczek et al., 2001*).

“El hecho de que patrones complejos de comportamiento puedan ser generados por una minúscula concentración de moléculas navegando por el torrente sanguíneo, y que diferentes animales de la misma especie generen diferentes cantidades de estas hormonas, es algo que merece la pena considerar cuando se llega al momento de juzgar asuntos tales como el libre albedrío, la responsabilidad individual y la ley y el orden”
Carl Sagan y Ann Druyan, “Sombras de antepasados olvidados”

Objetivos

El amplio papel fisiológico de las cromograninas, tanto en forma de proteína sin procesar como por medio de los múltiples péptidos derivados de cada una, indica una gran relevancia de estas moléculas en sistemas clave del organismo.

Habiendo sido caracterizada el efecto de la eliminación de estas proteínas de forma individual a distintos niveles moleculares y fisiológicos, así como de ambas por medio de la electrofisiología, pretendemos extender estos estudios al nivel conductual, metabólico y cardiovascular mediante la caracterización de animales transgénicos.

Para ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Estudiar el comportamiento de los animales en diversas pruebas destinadas a evaluar los fenómenos de actividad, agresividad y ansiedad, dada su relación con las catecolaminas, así como su evolución con la edad.
2. Caracterizar el rendimiento de los animales en pruebas locomotoras y de memoria usadas comúnmente en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas.
3. Determinar en la medida de lo posible la funcionalidad del metabolismo de la glucosa en adultos de los diversos genotipos.
4. Caracterizar el fenotipo estructural de los animales mediante densitometría ósea, así como su evolución con la edad.
5. Determinar la homeostasis cardiovascular y su evolución con la edad mediante mediadas de presión arterial y frecuencia cardíaca.

“Mide lo que es medible y haz medible lo que no lo es“

Galileo Galilei

“Si utilizamos aparatos excesivamente elaborados para examinar simples fenómenos naturales, la naturaleza misma puede escapárseos”

Karl von Frisch

Materiales y métodos

3.1.- Generación, crianza y mantenimiento de los animales

La línea de ratones carentes de la CgA (CgA-KO) fue generada por los doctores O'Connor y Mahata de la universidad de California en San Diego (*Mahapatra et al., 2005*) y graciosamente cedida a nuestro grupo de investigación en un fondo genético mixto 50% cepa 129svJ y 50% cepa c57BL/6.

La línea de ratones carentes de la CgB (CgB-KO), fue generada por los doctores Huttner y Calegari del Instituto de Biología Celular Max Planck en Dresden, Alemania, y graciosamente cedida a nuestro grupo de investigación en un fondo genético cepa c57BL/6.

Una línea de ratones carentes de ambas cromograninas (CgA/B-KO) fue generada en nuestro laboratorio mediante cruzamiento de 3 hembras CgA-KO con 3 machos CgB-KO, así como sus respectivos controles para la generación del control knock-out, en un fondo genético mixto 25% cepa 129svJ y 75% cepa c57BL/6.

Posteriormente, las tres líneas fueron introducidas por cruces sucesivos y retrocruzamiento en la cepa c57BL/6 disponible en el Estabulario de la Universidad de La Laguna con el fin de unificar el fondo genético.

Todas las líneas disponibles han sido y son mantenidas en homocigosis por cruces entre individuos de la misma generación en el citado estabulario.

3.2.- Consideraciones generales en el trabajo con animales.-

Con el fin de reducir al mínimo las posibles fuentes de variabilidad en los resultados experimentales, y en cumplimiento de la normativa vigente para la experimentación con animales de laboratorio en España, se han implementado las siguientes medidas en el trabajo y cuidado de todos los animales utilizados en la presente tesis doctoral:

- Todos los animales permanecieron en las dependencias destinadas a tal efecto en el Estabulario de la Universidad de La Laguna y fueron trasladados al laboratorio de experimentación en conducta de nuestro grupo

de investigación al menos una semana antes de comenzar los experimentos con ellos.

- Una vez allí, los animales fueron alojados en condiciones lo más similares posible a las del estabulario: temperatura constante de 22 °C, las mismas jaulas con enriquecimiento ambiental, el mismo serrín y pienso, agua y alimento *ad libitum* y ciclo luz-oscuridad de 12 horas. La limpieza de las jaulas se llevaba a cabo una vez a la semana e incluía cambiar el serrín sucio por limpio y la reposición de agua y comida. Se realizaron modificaciones puntuales a este régimen de alojamiento sólo en aquellos animales sometidos a protocolos que así lo demandaran, y sólo durante el tiempo necesario para llevarlos a cabo.

- Todos los animales empleados en los experimentos llevados a cabo en la presente tesis eran machos de más de tres meses de edad, y ninguna hembra fue alojada con ellos después de su traslado a nuestro laboratorio.

- Ningún animal fue sometido a más de tres pruebas de caracterización a la semana, siempre que esas pruebas se llevaran a cabo en un solo día, y nunca en días consecutivos. Asimismo, ningún animal sometido a una prueba de caracterización con una duración de cinco días consecutivos fue sometido a otra diaria o de la misma duración esa semana.

- En caso de fallecimiento de un animal, se retiraba el cadáver de la jaula, se cambiaba el serrín y se disponía del cadáver de acuerdo a la normativa vigente (congelación de los restos hasta su posterior incineración en el Estabulario). Los animales que presentaban unas condiciones de vida en sufrimiento intolerable recibieron la eutanasia por dislocación cervical y se dispuso de su cadáver como ya se ha descrito.

- Los animales eran siempre manipulados por la misma persona desde su traslado a nuestro laboratorio, tanto durante los experimentos como durante el mantenimiento y limpieza de las jaulas.

- Todos los experimentos fueron llevados a cabo entre las ocho de la mañana y las doce del mediodía para evitar las influencias del ciclo circadiano en los resultados, salvo aquellos que requerían un horario diferente de acuerdo a su protocolo (ver más adelante). Asimismo, se utilizó un ventilador

durante los experimentos para generar un ruido de fondo constante que amortiguara sonidos repentinos y molestos que pudieran perturbar al animal.

3.3.-Caracterización conductual.-

El conjunto de pruebas y aparatos de conducta usados para la caracterización conductual de los ratones carentes de cromograninas es una adaptación del descrito por Crawley. Los protocolos empleados a su vez para cada prueba y aparato se describen en su apartado particular. La denominación inglesa y/o española de las pruebas conductuales se corresponde con la forma más utilizada en la literatura.

3.3.1.- Caja luz-oscuridad (light-dark box).-

Esta prueba permite evaluar de forma consistente la ansiedad en roedores aprovechando la aversión natural de los animales a las zonas muy iluminadas y su tendencia a explorar nuevos ambientes (*Crawley y Goodwin, 1980; Hascoët et al., 2000*).

3.3.1.1.- Equipo

- Caja de madera de 45 centímetros de largo por 24 centímetros de ancho por 21 centímetros de alto, dividida en un compartimento abierto pintado de blanco de 29 centímetros de largo por 24 centímetros de ancho por 21 centímetros de alto y otro cerrado con tapa retirable pintado de negro de 14'5 centímetros de largo por 24 centímetros de ancho por 21 centímetros de alto, separados por una plancha de madera pintada del color correspondiente a cada lado y conectados por una abertura cuadrada en el centro de la base de la plancha de 5 centímetros de lado

3.3.1.2.- Protocolo

Al comienzo de la fase oscura del ciclo luz – oscuridad se colocan las jaulas con los animales a testar en la habitación de experimentación manteniendo la oscuridad o empleando una luz roja como fuente de iluminación.

Transcurridos 90 minutos, se coloca con cuidado a cada animal en el compartimento abierto de la caja situado a nivel de trabajo bajo luz blanca y con la tapa del compartimento oscuro cerrada. Se registra al animal durante 10 minutos en video y se le devuelve posteriormente a su jaula. Se realiza un máximo de quince pruebas cada noche para evitar las variaciones circadianas producidas más allá de ese tiempo.

Entre cada animal se retiran las heces y se limpia la caja con una toalla de papel húmeda para evitar la neofobia.

3.3.2.- Campo abierto (open field).-

Dentro del catálogo de pruebas conductuales que existen para la evaluación de la actividad y la ansiedad en animales, el campo abierto es quizás la más clásica y comúnmente empleada por su facilidad de diseño y ejecución y la amplia y robusta cantidad de variables que pueden extraerse de ella (*Walsh y Cummings, 1976; Prut y Belzung, 2003*)

3.3.2.1.- Equipo

- Campo abierto circular de madera pintada de blanco, 60 centímetros de diámetro por 50 centímetros de altura

- Software de captación de vídeo Carmelo_Acq2.vi para LabView 8.5 creado en nuestro laboratorio por el Dr. Yézer Morales.

- Software de análisis de campo abierto OpenFieldOffline.vi para LabView 8.5 creado en nuestro laboratorio por el Dr. Yézer Morales.

3.3.2.2- Protocolo

Cada animal es depositado con cuidado en el campo abierto mirando a la pared y registrado en vídeo durante cinco minutos, al final de los cuales se le retira y devuelve a su jaula. Entre cada animal se limpian las heces y la orina del aparato con un paño húmedo sin alcohol para evitar la neofobia.

3.3.3.- Laberinto acuático de Morris (Morris water maze).-

Esta prueba permite evaluar la memoria espacial y el aprendizaje en roedores de forma incruenta.

3.3.3.1.- Equipo

- Piscina circular LE 82090 (Panlab SL. Barcelona) con calefactor y bomba de recircularización de agua.
- Plataforma de plástico transparente de 10 cm de diámetro sobre soporte contrapesado de 46 centímetros de altura.
- Leche en polvo
- Papel charol
- Software de captación de vídeo Carmelo_Acq2.vi para LabView 8.5
- Software de análisis Morris01.vi para LabView 8.5 ambos creados en nuestro laboratorio por el Dr. Yézer Morales.

3.3.3.2.- Protocolo

La noche antes de empezar las sesiones de trabajo se llena la piscina de agua hasta una altura de 47 cm y se enciende la unidad calefactora para colocar el agua a 26-28°C. Una hora antes de comenzar la primera sesión, se añade leche en polvo al agua en cantidad suficiente como para opacar la superficie de la misma, y se coloca la plataforma de plástico en su lugar asignado (la plataforma debe quedar aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie del agua. Con el paso de los días, la evaporación y otros factores hacen bajar el nivel y debe añadirse agua nueva para mantener la profundidad correcta).

Asimismo, la piscina es dividida externamente en 8 sectores considerando la parte central del lado más alejado del experimentador como el norte y siguiendo el patrón de los puntos cardinales, colocándose marcas en el punto correspondiente de la piscina para su identificación. Alrededor de la piscina se colocan hojas de papel charol de distintos colores y formas que sirvan de referencia para el animal

Cada animal es sometido a 4 ensayos diarios durante 5 días consecutivos. Cada ensayo procede como sigue:

1. Con la plataforma de plástico oculta bajo la superficie y colocada en el centro del sector suroeste, se introduce al animal en el agua con cuidado mirando hacia la pared en un punto determinado por la siguiente secuencia

Día 1				Día 2				Día 3				Día 4				Día 5			

2. Con el experimentador de pie en silencio en el mismo lugar desde donde introdujo al animal en el agua, se permite a este nadar durante 1 min o hasta que alcance y suba a la plataforma oculta. Sin el animal no llega en el minuto correspondiente, se le conduce con cuidado hasta la plataforma.
3. Se permite al animal descansar en la plataforma durante 30 s. Si vuelve a introducirse en el agua se le retira de nuevo a la plataforma y se le sujeta por la base de la cola para impedir futuras inmersiones no deseadas.
4. Transcurrido el tiempo de descanso, se vuelve a introducir al animal en la piscina por el punto correspondiente de la secuencia anterior.
5. Finalizados los 4 ensayos del día, se seca cuidadosamente al animal con una toalla de papel y se le devuelve a su jaula hasta el día siguiente.

3.3.4.- RotaRod acelerado.-

Esta prueba permite evaluar de forma robusta y reproducible la coordinación motora de hasta cinco animales de forma simultánea.

3.3.4.1.- Equipo

- RotaRod acelerante Letica LI 8200 (Panlab, SL, Barcelona)

3.3.4.2.- Protocolo

Cada animal es sometido a 3 (cepas antiguas) ó 4 (cepas nuevas) ensayos diarios durante 5 días consecutivos con un descanso de 15 min entre cada ensayo.

El primer día se deposita al animal sobre el cilindro estático durante 10 s antes de comenzar con el movimiento. Todo animal que no sea capaz de aguantar ese tiempo tras cinco intentos es devuelto a su jaula y descartado para el experimento.

Superado ese tiempo, el cilindro comienza a moverse con una velocidad inicial de 4 revoluciones por minuto (rpm) con una aceleración uniforme de $7/2$ rpm en cada min. El tiempo máximo del animal en cada sesión se calcula bien cuando el animal no puede seguir sobre el cilindro y detiene el reloj asociado a su carril individual o bien cuando el animal es incapaz de seguir el ritmo del cilindro y se aferra a él, girando sin moverse. Si el animal es capaz de seguir en el cilindro hasta 5 min desde comenzado el movimiento (40 rpm), se detiene el cilindro, se devuelve el animal a su jaula y se cuentan los 5 min como tiempo máximo.

Entre cada ensayo se limpia el cilindro con una toalla de papel seca y se retiran las heces del carril.

3.3.5.- Test de agresión (Resident-intruder test).-

La agresión en ratones puede ser inducida mediante el aislamiento social y la privación de comida y agua sin poner en peligro la vida del animal con el fin de evaluar su nivel de agresividad natural.

3.3.5.1.- Equipo

- Jaulas para alojamiento individual.
- Software de captación de vídeo Carmelo_Acq2.vi para LabView 8.5, creado en nuestro laboratorio por el Dr. Yézer Morales.

3.3.5.2.- Protocolo

Cinco animales de quince meses de edad de cada cepa son separados y colocados en jaulas individuales con serrín limpio, comida y agua *ad libitum*, y se les mantiene en condiciones estándar de alojamiento durante quince días sin cambiar el serrín.

Transcurrido ese tiempo, se espera una media hora tras el inicio del periodo activo nocturno, se pesa a cada animal, se marca de forma no traumática y a continuación se introduce en su jaula un macho control, de un peso no superior o inferior en más de un 5% al peso del animal residente, durante diez minutos. El proceso se repite con cada animal residente, utilizando siempre animales control que no hayan sido previamente expuestos a un residente.

Finalizado el experimento, los animales residentes y los intrusos son devueltos a su jaula original

3.3.6.- Test de enterramiento de canicas (Marble burying test).-

El comportamiento de excavación en roedores es sencillo de evaluar y ha demostrado su utilidad para la caracterización de fármacos ansiolíticos y para el trastorno obsesivo-compulsivo (*Deacon, 2006a; Deacon, 2006b*).

3.3.6.1.- Equipo

- Canicas de metal negro brillante de 1'5 centímetros de diámetro.

3.3.6.2.- Protocolo

Se llena una jaula para cada animal con una capa uniforme de serrín limpio de 5 centímetros de grosor y se colocan nueve canicas en tres filas de tres a igual distancia unas de otras. Las jaulas se colocan sobre una superficie estable, separadas unas de otras mediante un folio en blanco para impedir que los animales se vean entre sí durante la prueba.

Cada animal es cuidadosamente colocado en una de las jaulas donde permanece 30 min. Transcurrido ese tiempo, cada animal es retirado de la jaula con cuidado de no mover el serrín ni las canicas, y devuelto a la suya. Un observador entrenado e ignorante del genotipo del animal cuenta entonces las canicas enterradas, semienterradas y en superficie.

3.3.7.- Test de Porsolt (Porsolt forced swimming test).-

Dentro de las pruebas para evaluar la conducta depresiva en animales, el test de natación forzada o de Porsolt (*Porsolt et al., 1977*) ha sido ampliamente utilizado por su sensibilidad a los distintos medicamentos antidepresivos y su robustez estadística dentro de la misma cepa (*Petit-Demouliere et al., 2004*).

3.3.7.1.- Equipo

- Vasos de cristal transparente de 20 cm de alto por 10 de ancho
- Separadores plásticos de color blanco de 20 cm de alto por 10 de ancho
- Lámpara de luz roja
- Software de captación de vídeo Carmelo_Acq2.vi para LabView 8.5
- Software de análisis PorsoltOffline3_1.vi para LabView 8.5, ambos creados en nuestro laboratorio por el Dr. Yézer Morales.

3.3.7.2.- Protocolo

Cada vaso se llena de agua a 26°C hasta una altura de 13 cm, suficiente para que cada animal quede sumergido completamente sin que su cola pueda asentarse contra el fondo del vaso, y se coloca sobre una superficie estable. Hasta un máximo de cuatro vasos pueden usarse al mismo tiempo, separados entre sí por los separadores plásticos para evitar que los animales se vean durante la prueba unos a otros. Los animales son cuidadosamente introducidos uno por vaso y se les registra en vídeo durante seis minutos.

Finalizada la prueba, cada animal es cuidadosamente secado con una toalla de papel y colocado durante cinco minutos en una jaula limpia a 50 cm bajo la lámpara de luz infrarroja para después ser devueltos a su jaula. Los vasos se vacían y enjuagan antes de volver a ser utilizados.

3.3.8.- Test de evitación activa (Shuttle-box avoidance test)

Un test de aprendizaje no basado en la memoria visual, distinto por ello del laberinto acuático de Morris, que utiliza el estímulo condicionado mediante un estímulo averso asociado repetidamente a señales luminosas y sonoras.

3.3.8.1.- Equipo

- Caja de atenuación sónica Panlab LE26
- Caja de evitación activa Panlab LE918
- Generador de choque eléctrico para reja electrificable Panlab LE10026
- Software de captación y análisis SHUTAVOID de Panlab

3.3.8.2- Protocolo

Cada animal es sometido durante cinco días consecutivos a una prueba de aprendizaje condicionado dentro de la caja de atenuación sónica. La caja se enciende 10 min antes de comenzar los experimentos para permitir que alcance la temperatura de trabajo estable.

El animal es colocado con cuidado en el compartimento izquierdo de la caja de evitación activa, donde se le permite cada día 1 min de exploración libre con la puerta de separación entre ambos compartimentos abierta para permitir el libre tránsito. Transcurrido ese tiempo, comienza una secuencia de 30 s de exploración seguidos inmediatamente por 10 s de luz y un estímulo sonoro de 3000 Hz. En el momento en que cesa el estímulo, la rejilla electrificable del compartamiento en que se encuentra el animal libera una descarga de 0.5 mA que cesa en 10 s o en el momento en que el animal cambie de compartimento, a partir del cual comienzan de nuevo los 30 s de exploración. La secuencia se repite un total de 40 veces al día.

Una vez concluida la sesión diaria, el animal es devuelto a su jaula. Al finalizar las sesiones con todos los animales, las bandejas que se encuentran bajo las rejillas electrificables se retiran y limpian para el día siguiente.

3.4.- Caracterización metabólica

3.4.1.- Test de tolerancia a la glucosa con ayuno de 6 h

3.4.1.1.- Equipo

- Glucómetro OneTouch Verio Pro de LifeScan (Milpitas, USA)
- Tiras reactivas OneTouch GlucoFilter
- Solución de glucosa 0'25 g/mL
- Jeringuillas de insulina estériles BD Micro-Fine

3.4.1.2.- Protocolo

Cada animal es pesado y colocado en una jaula individual con serrín limpio y agua *ad libitum* en la habitación de experimentación durante seis horas, comenzando a las nueve de la mañana y manteniendo la habitación en silencio y sin actividad.

Transcurrido ese tiempo, se corta la punta de la cola del animal, se descarta la primera gota de sangre y se obtiene una muestra de sangre para el glucómetro. A continuación se inyecta al animal con 8 veces su peso en gramos de μL de la solución de glucosa ip (un animal de de 25 g. recibe una inyección de 200 μL , para una concentración de glucosa de 2 g/kg de peso). La solución de glucosa debe haber sido preparada con doce horas de antelación y mantenida a 37°C para facilitar la rapidez de absorción.

El animal es devuelto a su jaula, se le retira la comida pero no el agua y se repite la toma de muestra de sangre pasados 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min desde la inyección, apretando con cuidado la cola desde la base a la punta para hacer fluir la sangre. En el caso de que la sangre se coagule en la cola y no se pueda obtener una nueva muestra, se puede frotar la punta de la cola cuidadosamente entre los dedos pulgar e índice para disolver el coágulo.

Tras la última toma, se devuelve al animal a su jaula común y se le repone la comida.

Dados los intervalos de toma prescritos se puede trabajar con grupos de hasta doce - quince animales a la vez en función del grado de experiencia con la técnica y el manejo de animales.

3.4.2.- Test de tolerancia a la glucosa con ayuno de 12 h

Se sigue el mismo protocolo descrito en el apartado anterior, con la salvedad de que la separación de los animales en jaulas individuales, el pesaje y el comienzo del ayuno se realizan a las 21 h, y la primera toma y la inyección a las 9 de la mañana siguiente, manteniendo siempre el ciclo de luz-oscuridad.

3.4.3.- Test de tolerancia a la insulina

3.4.3.1.- Equipo

- Glucómetro OneTouch Verio Pro de LifeScan
- Tiras reactivas OneTouch GlucoFilter
- Solución de insulina humana 0'25 U/mL en salino 0'9%
- Jeringuillas de insulina estériles BD Micro-Fine

3.4.3.2.- Protocolo

Cada animal es pesado y colocado en una jaula individual con serrín limpio, comida y agua *ad libitum* en la habitación de experimentación durante seis horas, comenzando a las nueve de las mañana y manteniendo la habitación en silencio y sin actividad.

Transcurrido ese tiempo, se corta la punta de la cola del animal, se descarta la primera gota de sangre y se obtiene una muestra de sangre para el glucómetro. A continuación se inyecta intraperitonealmente al animal con 0'75 UI/kg de peso de la solución de insulina preparada inmediatamente antes de usar y mantenida a 37°C en baño caliente.

El animal es devuelto a su jaula, se le retira la comida pero no el agua y se repite la toma de muestra de sangre pasados 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min desde la inyección, apretando con cuidado la cola desde la

base a la punta para hacer fluir la sangre. En el caso de que la sangre se coagule en la cola y no se pueda obtener una nueva muestra, se puede frotar la punta de la cola cuidadosamente entre los dedos pulgar e índice para disolver el coágulo.

Las consideraciones respecto al número de animales por grupo de trabajo, los intervalos de toma de muestra tras la inyección y el cuidado del animal durante y después del experimento son iguales a las descritas para los dos experimentos anteriores son las mismas que en los dos casos anteriores.

3.4.4.- Jaulas fisiológicas Physiocage

3.4.4.1.- Equipo

- 4 jaulas fisiológicas Physiocage de Panlab.
- Sistema Oxylet para jaulas fisiológicas
- Software de captación y análisis METABOLISM de Panlab

3.4.4.2.- Protocolo

A cada animal se le retira la comida y el agua durante 6 h antes de comenzar el experimento. Transcurrido ese tiempo, se les pesa y se les coloca con cuidado en una de las jaulas fisiológicas. Previamente, se colocan en los puestos previstos para ello un biberón con 25 mL de agua y una cantidad pesada de comida estándar. Cada animal permanece en la jaula durante 24 h, después de lo cual es retirado y devuelto a su jaula con comida y agua *ad libitum*, se mide la cantidad de comida y agua consumidas y se limpia cuidadosamente con agua y un paño húmedo la jaula para su posterior reutilización.

3.4.5.- Cinta de correr (Treadmill)

3.4.5.1.- Equipo

- Cinta de correr Panlab LE8708 de un carril con rejilla electrificable
- Software de captación SEDACOM de Panlab

3.4.5.2.- Protocolo

Cada animal es colocado en la cinta de correr y se le permite calentarse en la misma a una velocidad de carrera continua de 15 cm/s. Previamente, la rejilla electrificable colocada en la parte posterior de la cinta es activada y fijada a un amperaje de 0'5 mA para estimular al animal a correr hasta el agotamiento.

Transcurrido un periodo de calentamiento de 15 minutos, la velocidad de carrera se aumenta hasta 33 cm/s y se permite al animal correr hasta el agotamiento, definido a efectos del experimento como la incapacidad para seguir corriendo durante más de cinco segundos a pesar de recibir el estímulo eléctrico. El animal es entonces cuidadosamente retirado de la cinta y devuelto a su jaula, y el aparato se limpia con agua y alcohol para eliminar las heces y la orina.

3.4.6.- Densitometría

3.4.6.1.- Equipo

- Densitómetro de absorción dual Lunar PixiMus (Fitchburg, USA)
- Clorhidrato de xilacina al 2% Rompun de Bayer
- Clorhidrato de ketamina 50 mg/ml Ketolar de Pfizer
- Vaselina pura Goibi de Cinfa

3.4.6.2.- Protocolo

Se retira al animal la comida durante un período de seis horas. Transcurrido ese tiempo, se inyecta al animal intraperitonealmente con 10 µL/g de peso de una solución 3:1 de ketamina:xilacina y se le coloca en una jaula limpia sin serrín hasta que la anestesia haga efecto. Cuando esto ocurre, se limpian las vías aéreas del animal de cualquier objeto extraño, se le cubren los ojos con vaselina y se coloca en el densitómetro.

Tras la medición, que dura unos 4 min, se devuelve el animal a su jaula con cuidado y se le pone comida en ella. Con el fin de compensar la caída

de temperatura corporal, conviene colocar a los animales de la misma jaula pegados unos a otros hasta que se pasen los efectos de la anestesia.

3.5.- Caracterización cardiovascular

3.5.1.-Tensión arterial y frecuencia cardíaca

3.5.1.1.- Equipo

- Medidor de presión arterial no invasivo Panlab LE 5007
- Unidad calefactora Panlab 5650/6
- Software de captación SeDaCom v. 1.4.00 de Panlab

3.5.1.2.- Protocolo

Cada animal es sometido a un período de habituación durante 4 días sucesivos con la prueba de tensión llevándose a cabo el quinto día.

El primer día se introduce a cada animal en un cepo de restricción de movimiento dentro de la unidad calefactora encendida a 37°C durante 1 h, con el cepo cubierto con una pieza de tela oscura. El segundo y tercer día, se repite el procedimiento anterior pero se coloca con cuidado la cola del animal en el manguito de presión correspondiente durante el mismo tiempo. El cuarto día se realizan mediciones de prueba en el animal cada 10 min a partir de los 20 min de comenzada la sesión de habituación y hasta su finalización. El quinto día se repite el procedimiento anterior y se registran las medidas obtenidas.

Tras cada sesión de habituación y la prueba del quinto día se devuelven los animales a sus jaulas. Entre cada sesión, los cepos de restricción se limpian con una toalla de papel húmeda y se retiran las heces del cepo y de la unidad calefactora.

Cada medición debe producir un valor de presión sistólica, presión diastólica, presión arterial media y frecuencia cardíaca. Si esto no ocurre, se repite la medición un máximo de cinco veces a intervalos de 30 segundos

hasta obtener una medida correcta. Superado ese límite, el animal es devuelto a su jaula inmediatamente y se le descarta del experimento.

“La conducta es el espejo en el cual cada uno muestra su verdadera imagen”

Johann Wolfgang von Goethe

Resultados

4.1.- Fondo genético original

4.1.1.-El control de la glucemia está alterado de forma diferencial en las cepas transgénicas.en la edad adulta

Tanto la cepa CgA-KO como la CgB-KO presentan una hipersensibilidad a la insulina que se hace patente en el test de tolerancia a la glucosa y la insulina, respectivamente, como una menor área bajo la curva de glucemia pero que no afecta a la glucemia basal (fig. 7).

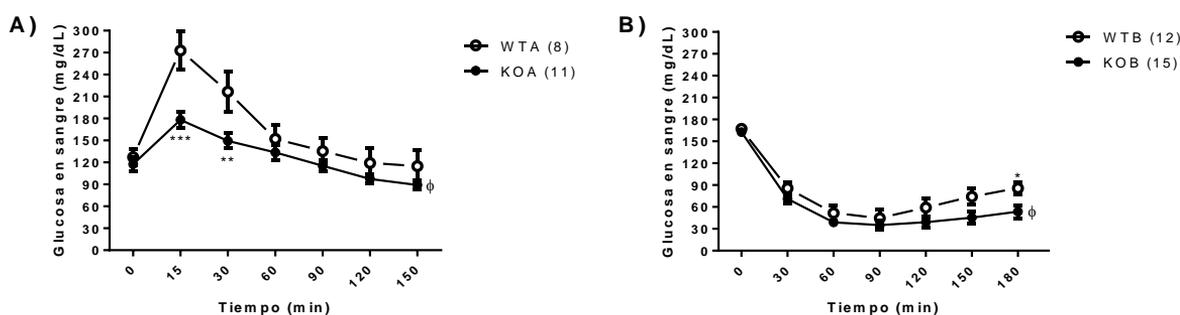


Figura 7. Hipersensibilidad a la insulina en las cepas CgA- y CgB-KO en su fondo genético original. A) test de tolerancia a la glucosa en ratones CgA-KO de 6 meses de edad. **B)** test de tolerancia a la insulina en ratones CgB-KO de 5 meses de edad. En ambos casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos variantes para la comparación de las curvas ($\phi p < 0.05$) con corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples en cada punto temporal de muestreo ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.005$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

Los ratones CgA&B-KO, por el contrario, presenta una resistencia a la insulina algo menos manifiesta en el test de tolerancia a la insulina que sin embargo no aparece en el de glucosa (fig. 8).

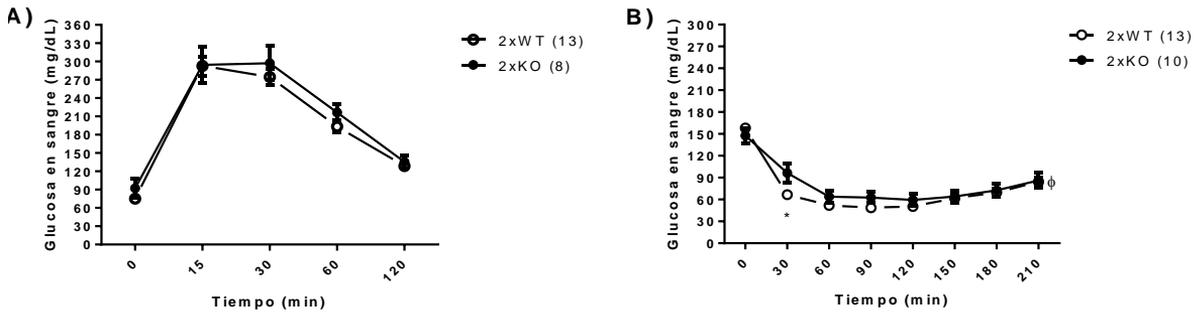


Figura 8. Resistencia a la insulina en la cepa CgA&B-KO en su fondo genético original. A) test de tolerancia a la glucosa en ratones CgA&B-KO de 3 meses de edad. **B)** test de tolerancia a la insulina en ratones CgA&B-KO de 5 meses de edad. En ambos casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos variantes para la comparación de las curvas ($\phi p < 0.05$) con corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples en cada punto temporal de muestreo ($*p < 0.05$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.1.2.- El perfil densitométrico de las cepas transgénicas muestran diferencias significativas en la arquitectura ósea y tisular entre 3 y 6 meses de edad

Los ratones CgA-KO presentan una importante disminución de peso causada por un menor porcentaje de tejido graso y la reducción en la cantidad neta de tejido magro (fig. 9).

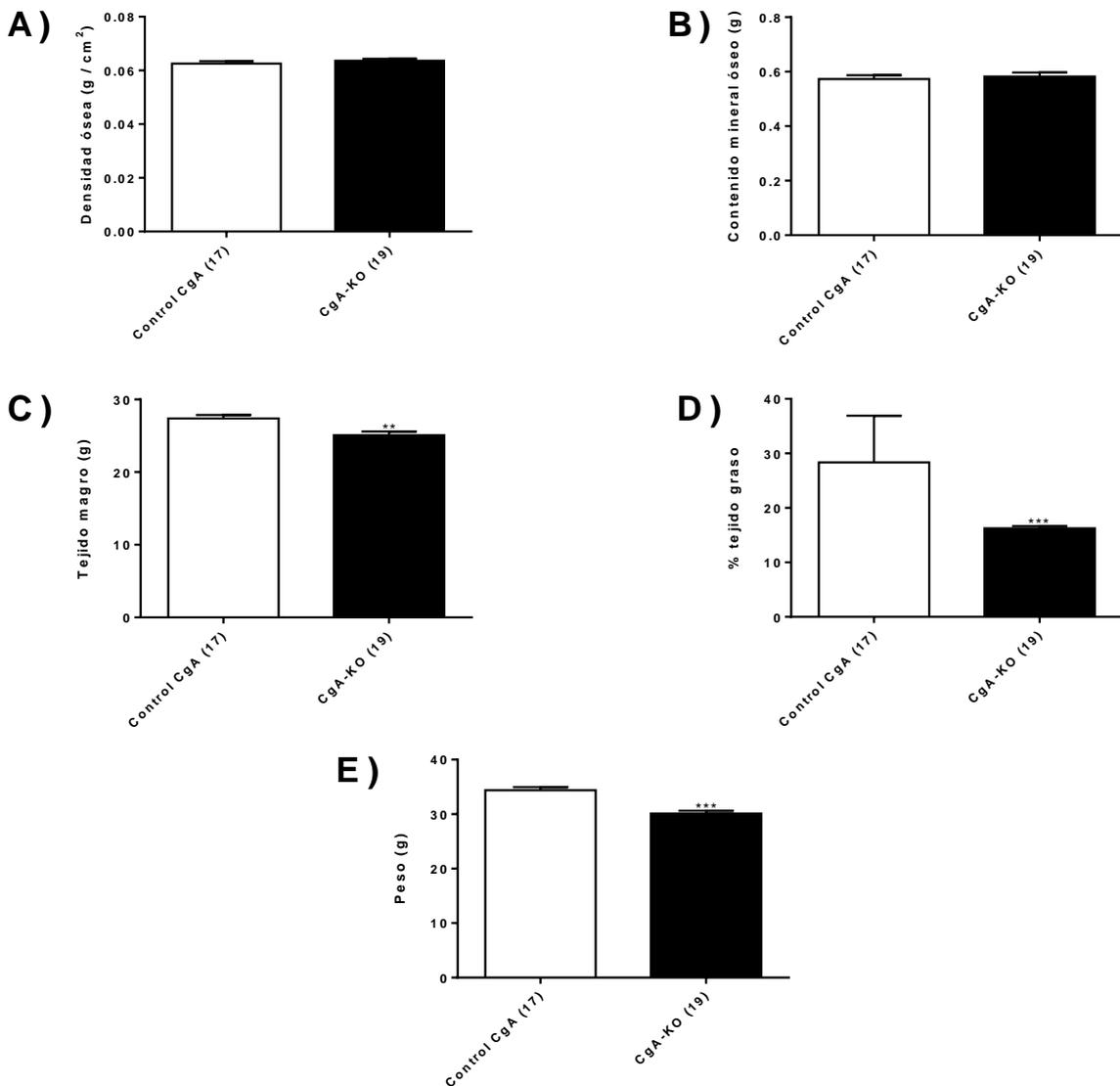


Figura 9. Perfil densitométrico de la cepa CgA-KO en su fondo genético original a los 3 meses de edad incluyendo **A)** la densidad mineral ósea, **B)** el contenido mineral óseo, **C)** el peso absoluto de tejido magro, **D)** el porcentaje de tejido graso frente a masa total del animal y **E)** el peso total del animal. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante una prueba t de Student (**p<0.01, ***p>0.005). (Datos representados como media aritmética ± error estándar).

En los CgB-KO, una disminución análoga de peso aparece correlacionada con un contenido mineral óseo reducido y una menor cantidad de tejido magro (fig 10).

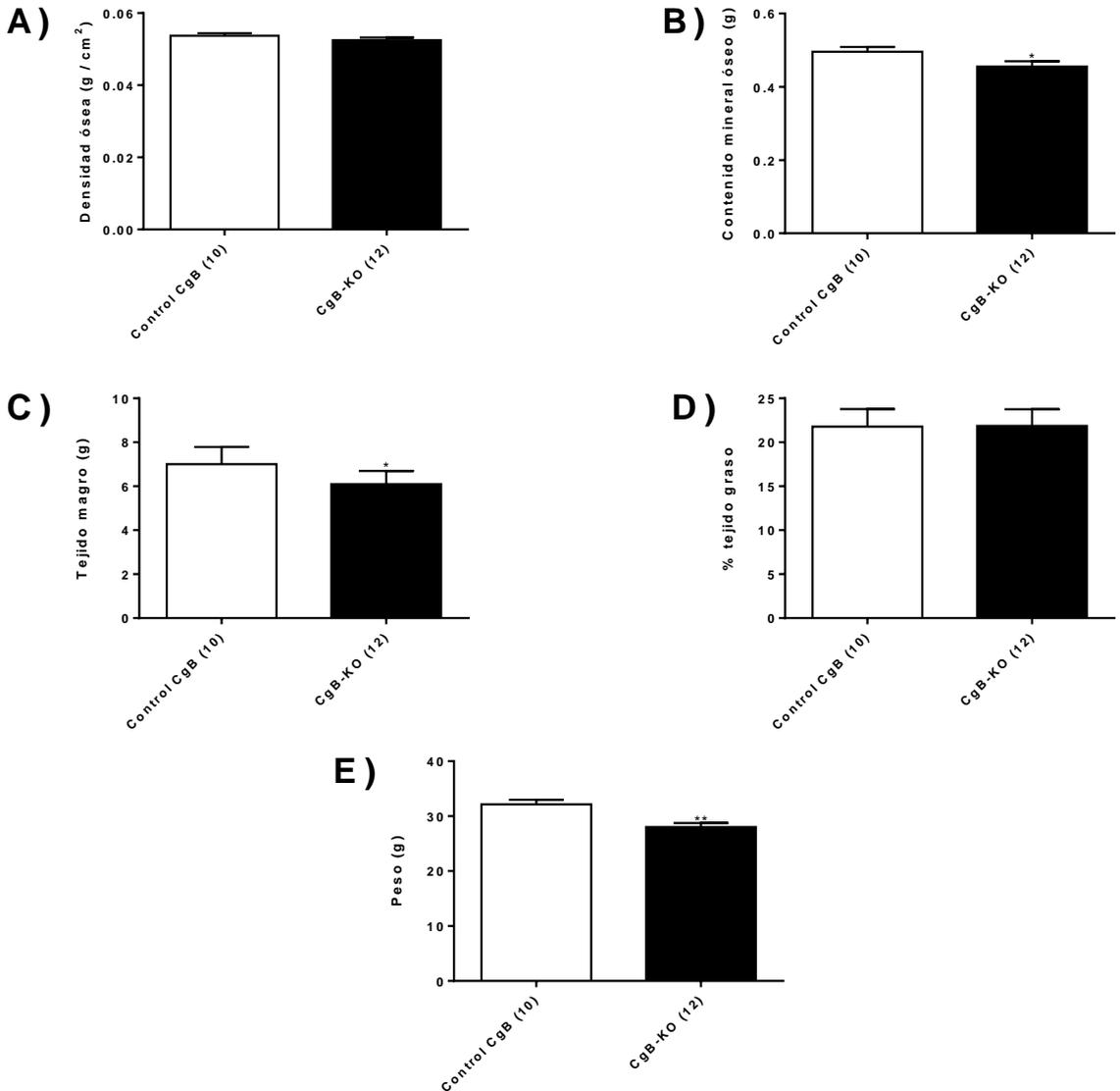


Figura 10. Perfil densitométrico de la cepa CgB-KO en su fondo genético original a los 6 meses de edad incluyendo A) la densidad mineral ósea, B) el contenido mineral óseo, C) el peso absoluto de tejido magro, D) el porcentaje de tejido graso frente a masa total del animal y E) el peso total del animal. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante una prueba t de Student (*p<0.05, **p<0.01). (Datos representados como media aritmética ± error estándar).

Sorprendentemente, la cepa CgA&B-KO muestra un notable sobrepeso asociado a una densidad y contenido mineral óseo disminuidos y a un aumento de tejido magro, pero no de porcentaje de grasa corporal (fig. 11).

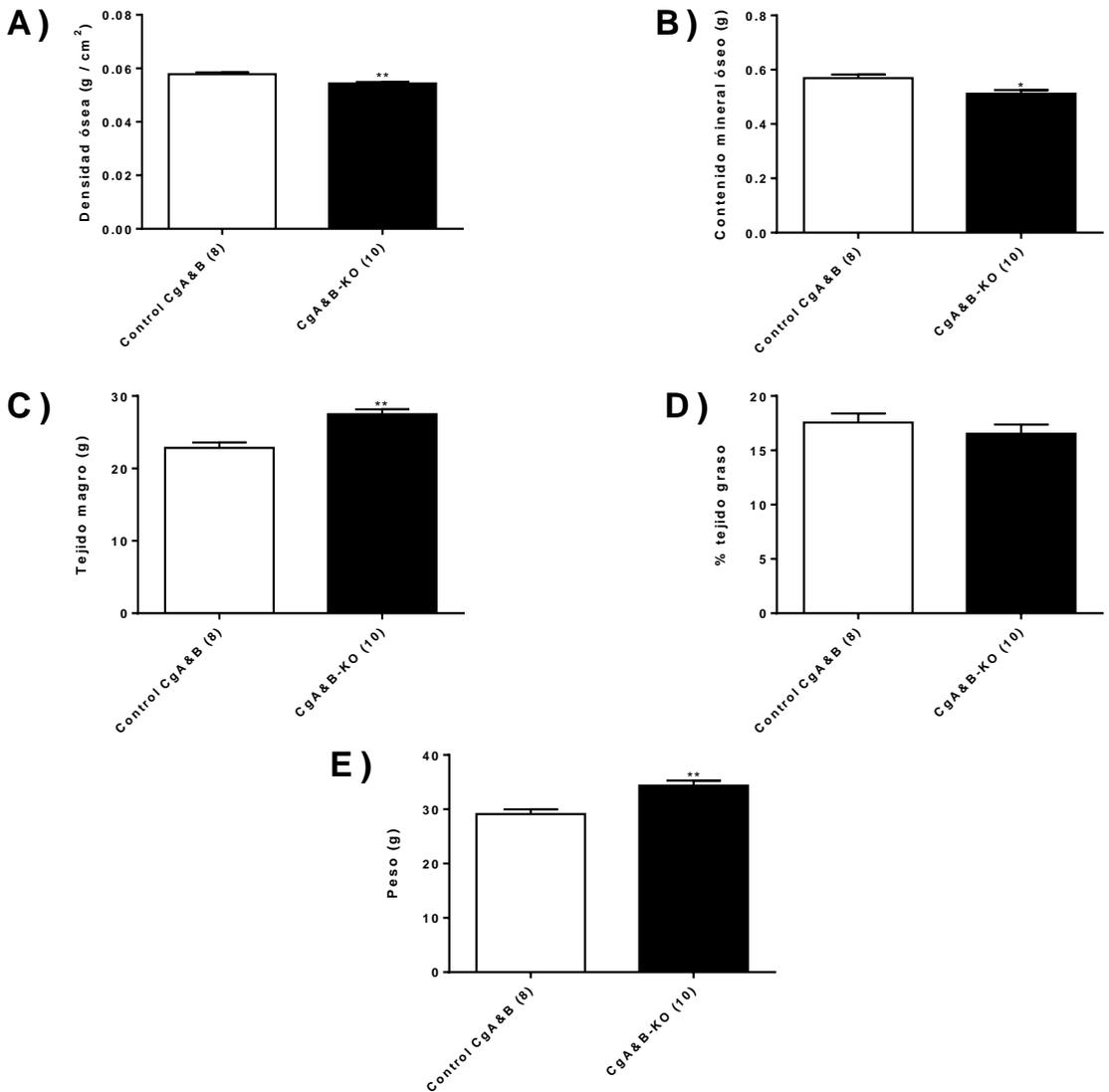


Figura 11. Perfil densitométrico de la cepa CgA&B-KO en su fondo genético original a los 5 meses de edad incluyendo A) la densidad mineral ósea, B) el contenido mineral óseo, C) el peso absoluto de tejido magro, D) el porcentaje de tejido graso frente a masa total del animal y E) el peso total del animal. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante una prueba t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.1.3.- La ingesta de comida y agua no se corresponde con las diferencias de peso descritas

La ingesta de comida y agua de los ratones de las 3 cepas transgénicas y sus controles respectivos muestra que los ratones CgA&B-KO son hiperfágicos e hiperdídpticos, pero no es diferente en las otras 2 (fig. 12).

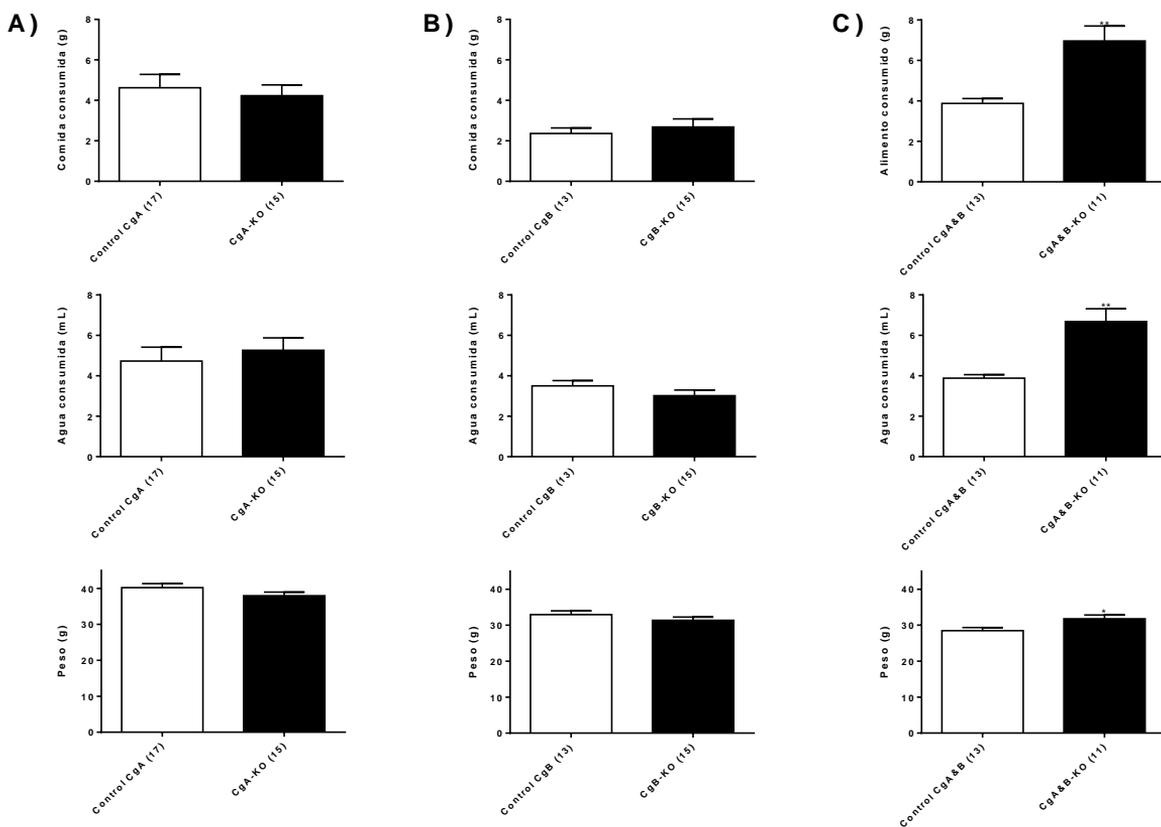


Figura 12. Consumo de comida y agua en jaulas fisiológicas en las tres cepas y sus controles durante 24 horas. A) cepa CgA-KO y su control, **B)** cepa CgB-KO y su control y **C)** cepa CgA&B-KO y su control. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante una prueba t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.1.4.- Las cepas transgénicas muestran una capacidad de ejercicio aeróbica muy diferente

Los ratones CgA-KO son capaces de correr durante más tiempo en las pruebas de resistencia aeróbica, mientras que la cepa CgA&B-KO rinde considerablemente peor que sus controles. No aparecen diferencias significativas en la cepa CgB-KO (fig. 13)

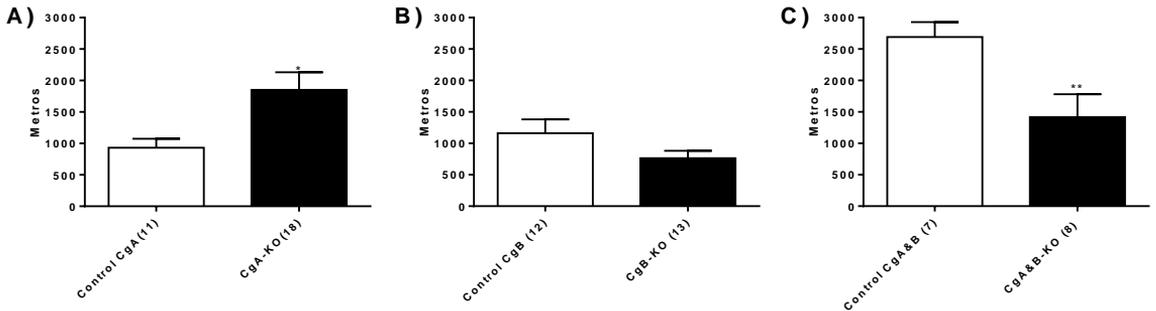


Figura 13. Rendimiento aeróbico de las tres cepas medida como distancia recorrida en una cinta de correr A) cepa CgA-KO y su control, B) cepa CgB-KO y su control y C) cepa CgA&B-KO y su control. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante una prueba t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.1.5.- Las cepas transgénicas muestran una coordinación motora dispar

Mientras que los animales CgA&B-KO parecen mostrar una disminución de la coordinación motora en las pruebas de Rotarod frente a los controles, los CgB-KO presentan un aumento notable, y no existen diferencias en los animales CgA-KO (fig. 14).

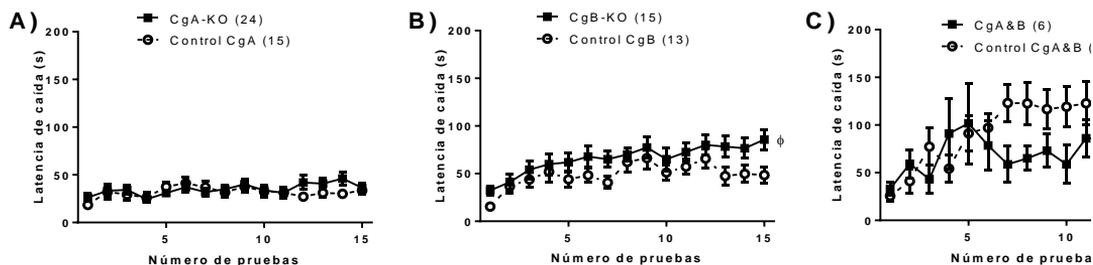


Figura 14. Coordinación motora de las tres cepas medida como tiempo hasta caer de un RotaRod acelerado A) cepa CgA-KO y su control, B) cepa CgB-KO y su control y C) cepa CgA&B-KO y su control. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos variantes para la comparación de las curvas ($p < 0.005$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.1.6.- La evaluación del fenotipo depresivo por el test de natación forzada o Porsolt revela una tendencia a este en los ratones CgA y CgA&B-KO adultos.

Ambas cepas presentan un tiempo de natación considerablemente reducido frente a sus controles, lo que contrasta con la práctica igualdad que se aprecia entre la cepa CgB-KO y su control (fig. 15).

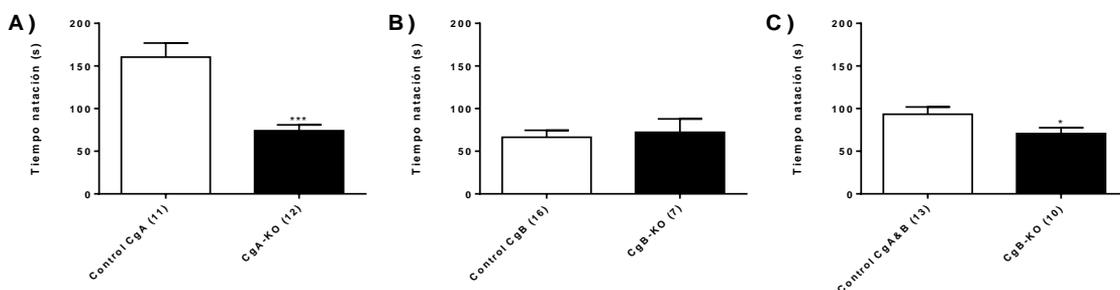


Figura 15. Evaluación del fenotipo depresivo mediante el tiempo de natación en el test de natación forzada o de Porsolt- A) cepa CgA-KO y su control, B) cepa CgB-KO y su control y C) cepa CgA&B-KO y su control. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante una prueba t de Student (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.1.7.- El test de laberinto acuático de Morris permite apreciar las diferencias en la memoria espacial entre las 3 cepas transgénicas.

Aunque los ratones CgA-KO pasan significativamente más tiempo en el agua y con peores porcentajes de acierto que sus controles, esta

diferencia desaparece en los CgB-KO y también virtualmente en los CgA&B-KO (fig. 16).

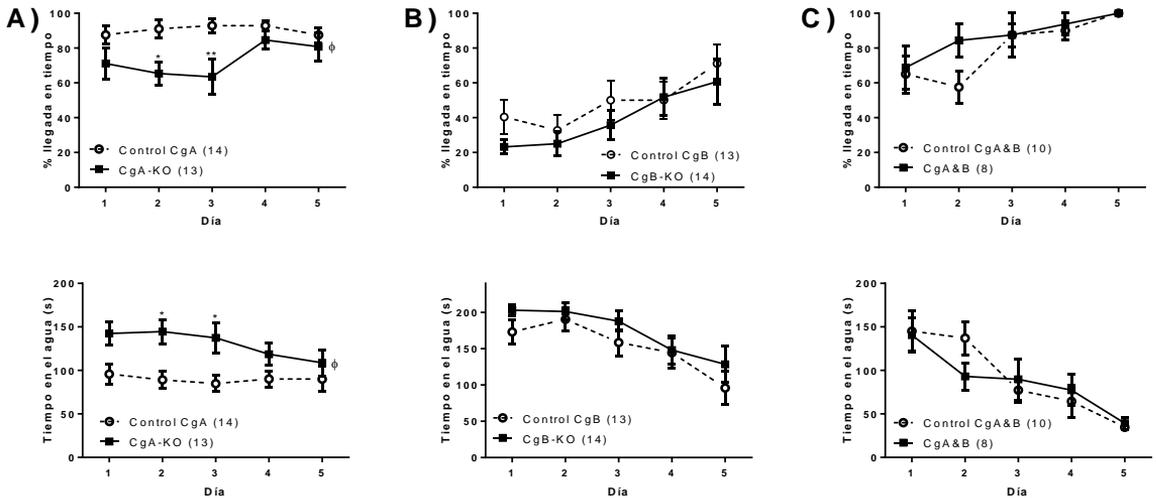


Figura 16. Evaluación de la memoria espacial de las tres cepas mediante el Iberinto acuático de Morris. **A)** cepa CgA-KO y su control, **B)** cepa CgB-KO y su control y **C)** cepa CgA&B-KO y su control. En cada columna, el gráfico superior indica el porcentaje de acierto de los animales al encontrar la plataforma de escape oculta dentro del tiempo destinado a ello, mientras el inferior detalla el tiempo total de natación hasta alcanzar la plataforma cada día de experimentación. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos variantes para la comparación de las curvas ($\phi p < 0.005$) con corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples en cada punto temporal de muestreo ($*p < 0.05$, $*p < 0.01$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.2.- Fondo genético unificado

4.2.1.- El fenotipo alterado en el control de la glucemia observado en las cepas originales se mantiene con el fondo genético unificado

Por un lado, los test de tolerancia a la glucosa realizados en ayuno moderado a los 8 meses de edad y en ayuno prolongado a los 12 muestran una clara desviación de las cepas transgénicas frente al control: con ayuno moderado (6 horas de ayuno en fase diurna a los 8 meses de edad), los niveles basales se mantienen estables pero la curva de respuesta de los ratones CgA-KO manifiesta una clara hipersensibilidad a la insulina (fig. 17).

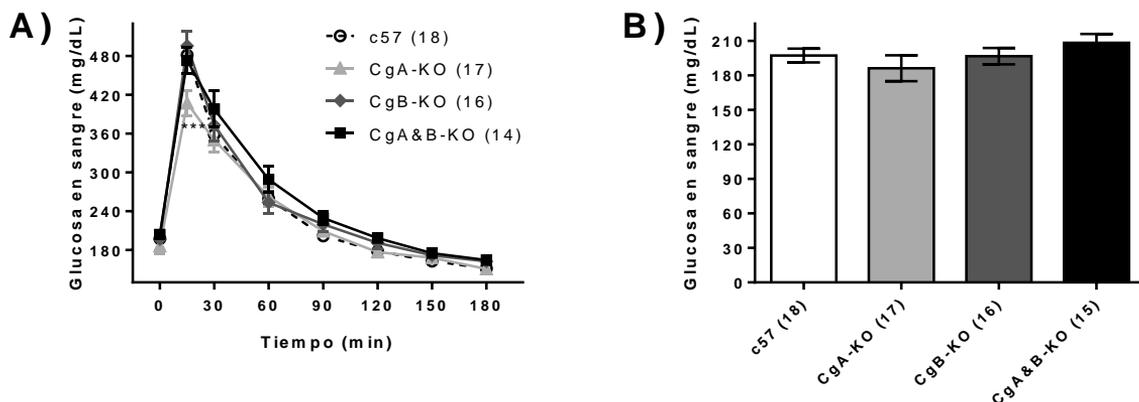


Figura 17. Test de tolerancia a la glucosa realizado a las tres cepas en el fondo genético unificado con ayuno moderado (6 horas, fase luminosa) a los 8 meses de edad. A) curvas de glucosa mostrando la hipersensibilidad a la insulina liberada por la inyección de glucosa en la cepa CgA-KO. **B)** glucemia basal tras el ayuno y previo a la inyección. En ambos casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos variantes para la comparación de las curvas con corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 en cada punto temporal de muestreo (** $p < 0.005$), y ANOVA de una variante para la comparación de la glucemia basal. (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

Al mismo tiempo, un ayuno prolongado (12 horas de ayuno en fase nocturna a los 12 meses de edad) reduce la glucemia basal de las 3 cepas transgénicas, CgA-KO y los CgA&B-KO radicalmente, y estas presentan además un perfil muy similar de resistencia a la insulina (fig. 18).

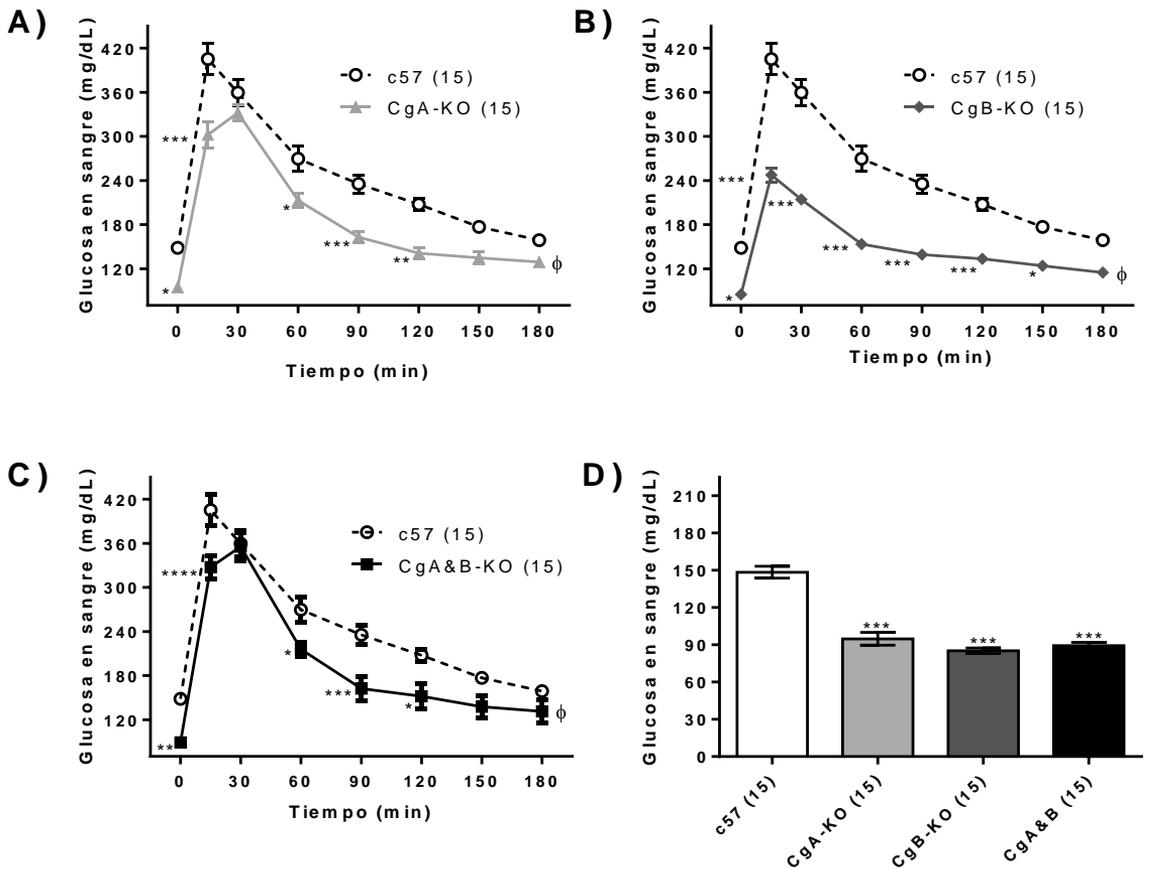


Figura 18. Test de tolerancia a la glucosa realizado a las tres cepas en el fondo genético unificado con ayuno prolongado (12 horas, fase oscura) a los 12 meses de edad. **A)** curva de glucosa mostrando la hipersensibilidad a la insulina liberada por la inyección de glucosa en la cepa CgA-KO. **B)** curva de glucosa mostrando la hipersensibilidad a la insulina liberada por la inyección de glucosa en la cepa CgB-KO. **C)** curva de glucosa mostrando la hipersensibilidad a la insulina liberada por la inyección de glucosa en la cepa CgA&B-KO. **D)** glucemia basal tras el ayuno y previo a la inyección. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos variantes para la comparación de las curvas ($\phi p < 0.01$), y ANOVA de una variante para la comparación de la glucemia basal, seguido en ambos casos por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 en cada punto temporal de muestreo y en la glucemia basal (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

Por otro, los resultados del test de tolerancia a la insulina tras ayuno moderado (6 horas de ayuno en fase diurna a los 12 meses de edad) permite observar una marcada hipersensibilidad a la insulina en las cepas CgB-KO y CgA&B-KO. Sorprendentemente, la cepa CgA-KO no muestra este mismo fenotipo y sus resultados no difieren de los de los controles (fig. 19).

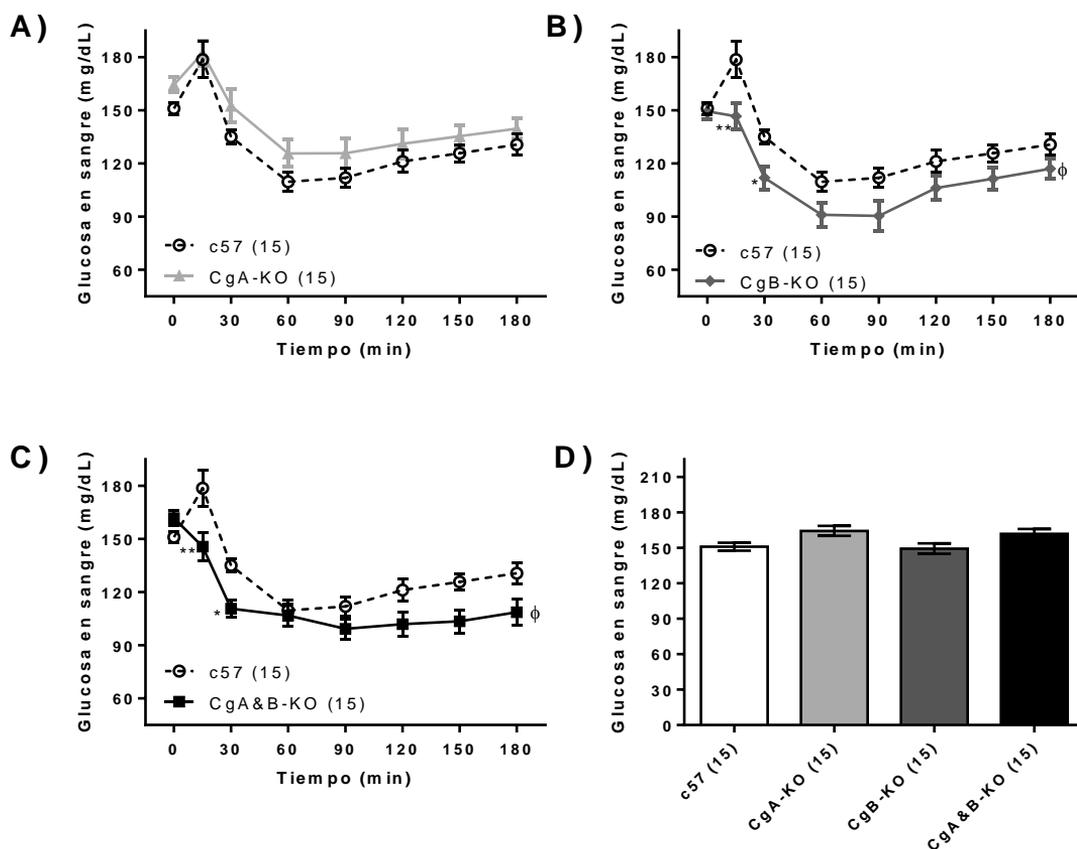


Figura 19. Test de tolerancia a la insulina realizado a las tres cepas en el fondo genético unificado con ayuno moderado (6 horas, fase luminosa) a los 12 meses de edad. A) curva de glucosa mostrando la práctica igualdad en la respuesta de la cepa CgA-KO con la c57. **B)** curva de glucosa mostrando la hipersensibilidad a la insulina inyectada en la cepa CgB-KO. **C)** curva de glucosa mostrando la hipersensibilidad a la insulina inyectada en la cepa CgA&B-KO. **D)** glucemia basal tras el ayuno y previo a la inyección. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos variantes para la comparación de las curvas ($p < 0.01$), y ANOVA de una variante para la comparación de la glucemia basal, seguido en ambos casos por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 en cada punto temporal de muestreo y en la glucemia basal (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.2.2. La evolución temporal de la distribución de la masa corporal revela una importante influencia de las cromograninas en la fisiología.

El contenido y la densidad mineral ósea de los ratones CgA-KO aparece aumentado desde los 4 meses, algo que también se aprecia en los ratones CgA&B-KO de esa edad pero no persiste en el tiempo. El porcentaje de grasa corporal es inferior al de los controles en los CgA-KO de 4 meses, los CgB-KO de 8 y los CgA&B-KO de 4 y 8 meses, normalizándose a los 12, y

la cantidad neta de tejido magro es considerablemente mayor en los CgA-KO desde los 8 meses, con alguna disminución puntual en los CgB-KO de la misma edad (figs. 20, 21 y 22).

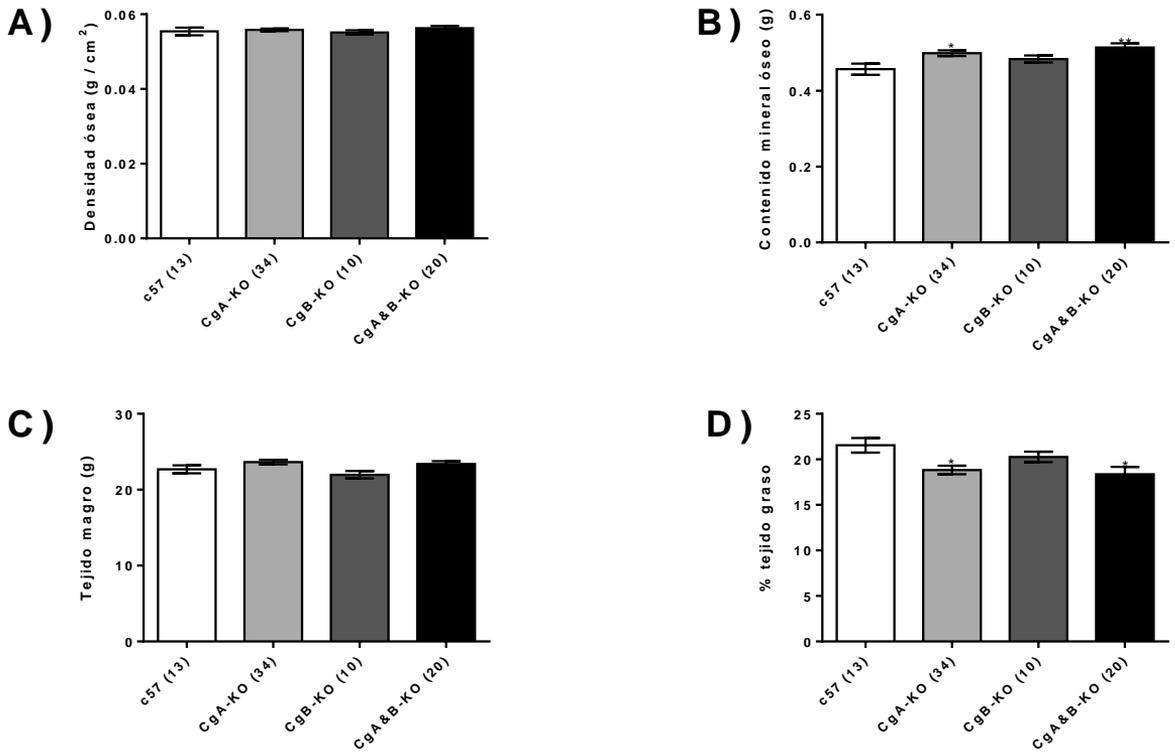


Figura 20. Perfil densitométrico de las tres cepas en el fondo genético unificado a los 4 meses de edad incluyendo A) la densidad mineral ósea, B) el contenido mineral óseo, C) el peso absoluto de tejido magro y D) el porcentaje de tejido graso frente a masa total del animal. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

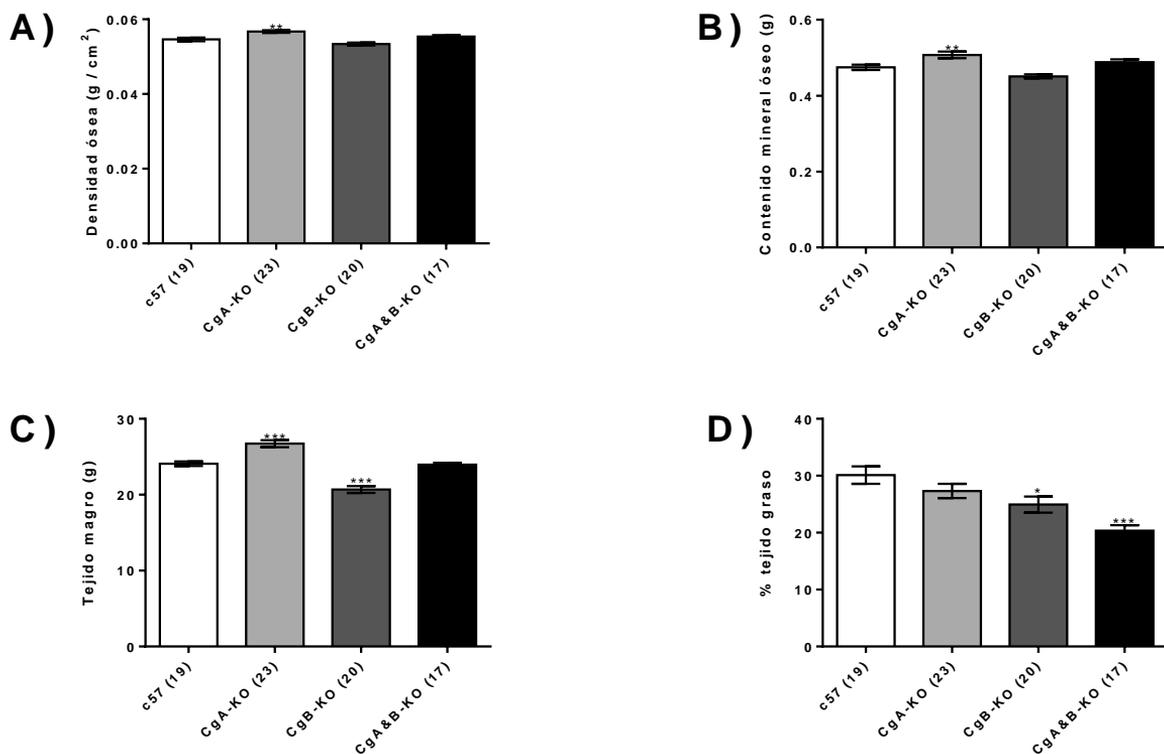


Figura 21. Perfil densitométrico de las tres cepas en el fondo genético unificado a los 8 meses de edad incluyendo **A)** la densidad mineral ósea, **B)** el contenido mineral óseo, **C)** el peso absoluto de tejido magro y **D)** el porcentaje de tejido graso frente a masa total del animal. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

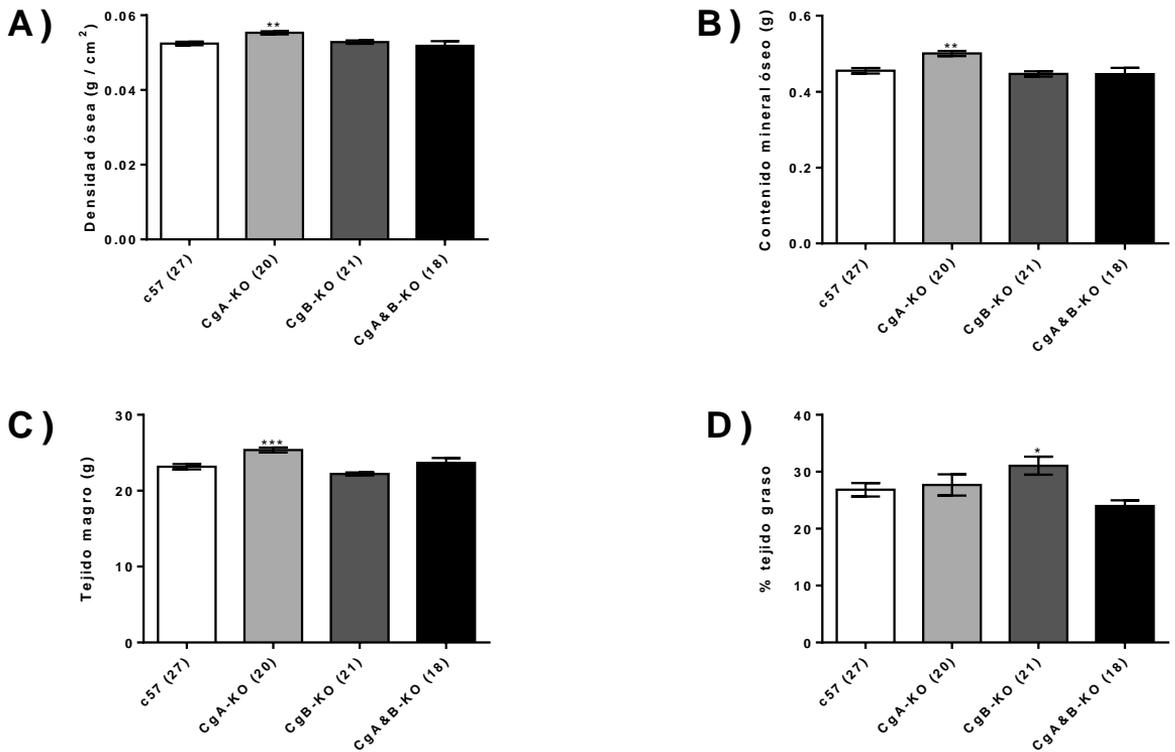


Figura 22. Perfil densitométrico de las tres cepas en el fondo genético unificado a los 12 meses de edad incluyendo A) la densidad mineral ósea, B) el contenido mineral óseo, C) el peso absoluto de tejido magro y D) el porcentaje de tejido graso frente a masa total del animal. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.2.3. Las cepas transgénicas presentan perturbaciones en el control de la frecuencia cardíaca y la presión arterial que se manifiestan a lo largo de la vida del animal

En el caso de los ratones CgA-KO, la cepa muestra hipertensión temprana (diastólica a los 4 y sistólica a los 4 y 8 meses de edad) que se modera al año de vida hasta niveles no significativos. Por su parte, la cepa CGB-KO desarrolla al año de vida una hipertensión sistólica y diastólica que se venía apuntando a los 4 y 8 meses.

Finalmente, los resultados de la cepa CgA&B-KO resultan distintivos por la progresión desde una hipertensión grave a los 4 meses de edad a

una moderada a los 8, y finalmente a un fenotipo normotensivo pero severamente bradicárdico a los 12 (figs. 23, 24 y 25)

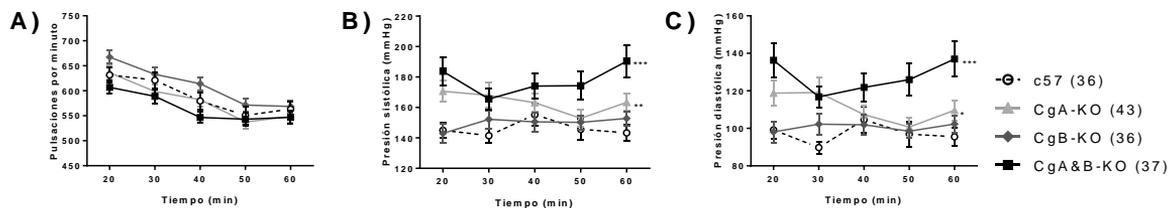


Figura 23. Evaluación cardiovascular de las tres cepas en el fondo genético unificado a los 4 meses de edad incluyendo A) la frecuencia cardíaca, B) la presión arterial sistólica y C) la presión arterial diastólica. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante del área bajo cada curva seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0.005$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

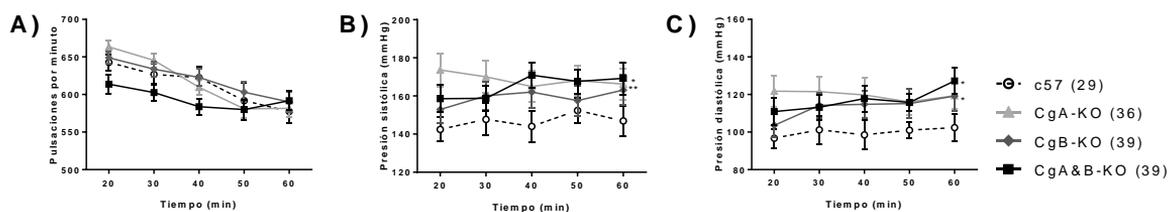


Figura 24. Evaluación cardiovascular de las tres cepas en el fondo genético unificado a los 8 meses de edad incluyendo A) la frecuencia cardíaca, B) la presión arterial sistólica y C) la presión arterial diastólica. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante del área bajo cada curva seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

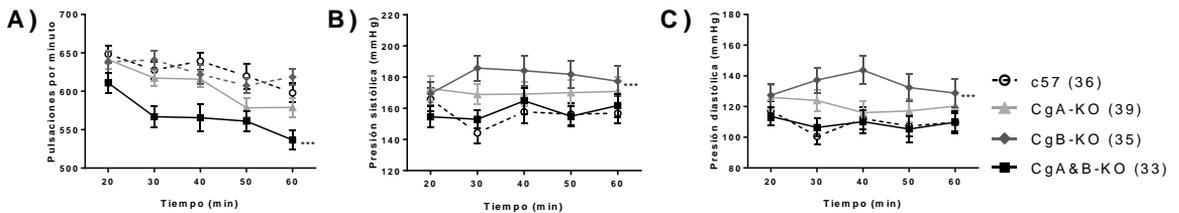


Figura 25. Evaluación cardiovascular de las tres cepas en el fondo genético unificado a los 12 meses de edad incluyendo **A)** la frecuencia cardíaca, **B)** la presión arterial sistólica y **C)** la presión arterial diastólica. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante del área bajo cada curva seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (***) ($p < 0.005$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.2.4.-La coordinación motora en ratones de 12 meses de edad aparece mejorada en las cepas transgénicas CgA- y CgA&B-KO.

Tanto los ratones CgA-KO como los CgA&B-KO muestran una notoria mejora del tiempo de caída en las pruebas de RotaRod acelerado frente al control, y los ratones CgB-KO una ligera y no significativa (fig. 26)

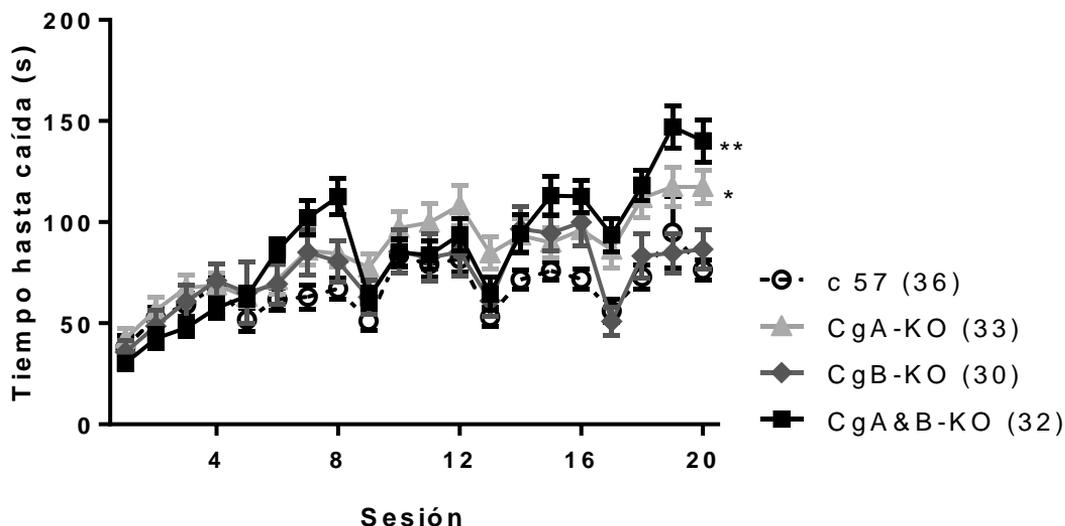


Figura 26. Resultados de la prueba de RotaRod acelerado realizado en las tres cepas transgénicas en el fondo genético unificado a los 12 meses de edad. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante del área bajo cada curva seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.2.5.- La actividad de las 3 cepas medida en un campo abierto varía considerablemente con la edad.

El análisis de la actividad exploratoria se centra en 3 parámetros: las transiciones que lleva a cabo el animal entre los distintos sectores imaginarios del área de exploración, la distancia total recorrida por el animal y los eventos de *rearing*, en los que el animal se alza sobre las patas traseras y apoya contra las paredes del campo abierto con el fin de explorar sus alrededores.

Los ratones CgA-KO deambulan significativamente menos que los c57 a los 4 y 8 meses de edad. Sin embargo, sus resultados a los 12 meses invierten completamente la tendencia en todos los parámetros de análisis. Los ratones CgB-KO, por su parte, sufren una disminución paulatina de la actividad a lo largo de los 3 puntos de la secuencia temporal, con menor distancia y exploración que los controles a los 4 y 12 meses. La cepa CgA&B-KO es particularmente similar a estos, salvo por un marcado aumento de los eventos de rearing a los 12 meses.

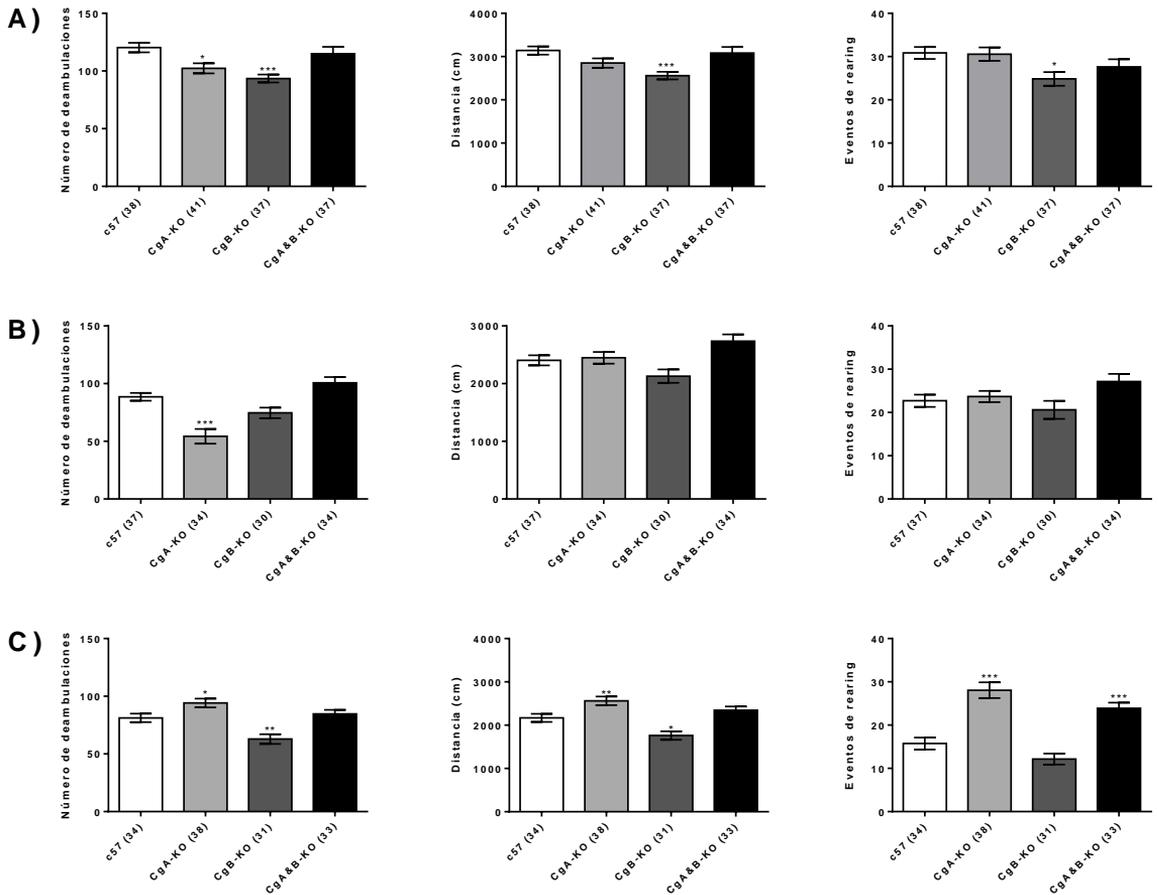


Figura 27. Registro de la actividad de las 3 cepas en el fondo genético unificado en un campo abierto, incluyendo el número de deambulaciones entre sectores (primera columna), la distancia total recorrida (segunda columna) y el número de eventos de *rearing* producidos (tercera columna). A) 4 meses, B) 8 meses y C) 12 meses de edad. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante del área seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.005$.). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).**

4.2.6.- La evaluación del fenotipo depresivo en las 3 cepas transgénicas revela diferencias entre sí y con los controles.

La cepa carente de CgB presenta una muy marcada disminución del tiempo de natación en el test de Porsolt ya desde los 4 meses. La cepa CgA&B-KO muestra una acusada caída del tiempo de natación entre los 4 y los 8 meses, pero se estabiliza a esa edad. En el caso de los CgA-KO, el

tiempo varía mucho menos entre tanda y tanda y en ningún caso de forma significativa (fig. 28)

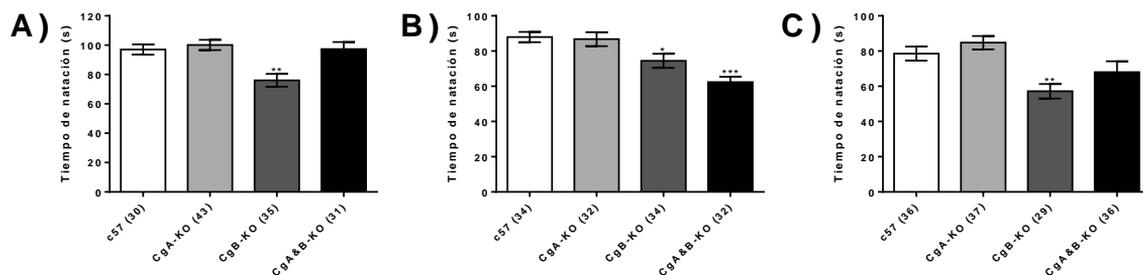


Figura 28. Evaluación del fenotipo depresivo mediante el test de natación forzada o de Porsolt realizada en las tres cepas transgénicas en el fondo genético unificado. A) 4 meses de edad B) 8 meses de edad y C) 12 meses de edad. En todos los casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.005$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).**

4.2.7.- Los resultados del laberinto acuático de Morris en todas las cepas no muestran diferencias en la memoria espacial.

Las curvas de éxito en alcanzar la plataforma son virtualmente idénticas y sólo se aprecia una ligera mejoría de la cepa CgA-KO en el tiempo pasado en el agua antes de encontrar la plataforma de salida (fig. 29).

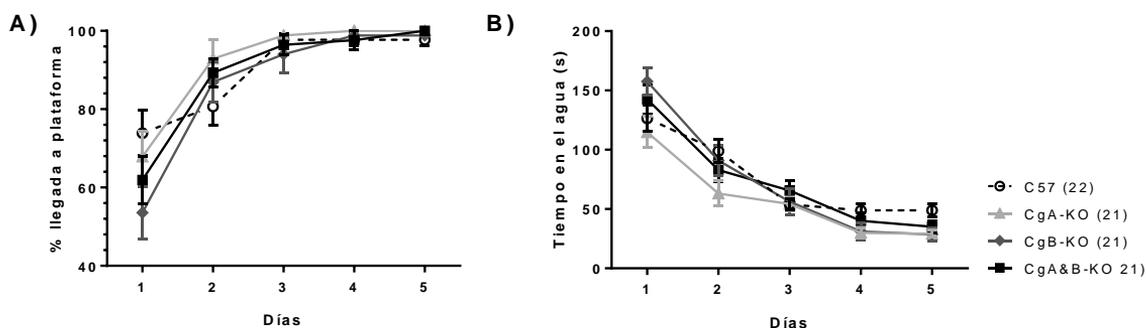


Figura 29. Evaluación de la memoria espacial de las tres cepas a los 12 meses de edad en el fondo genético unificado. A) Porcentaje de éxito en alcanzar la plataforma de escape oculta en cada día de experimentación, B) tiempo de natación de los animales hasta alcanzar la plataforma oculta cada día de experimentación. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos variantes para la comparación de las curvas del área bajo las curvas con corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples en cada punto temporal de muestreo. (Datos representados como media aritmética por animal y día \pm error estándar).

4.2.8.- El aprendizaje condicionado a los 16 meses resulta notablemente más rápido en los ratones CgB-KO

Los resultados del test de aprendizaje condicionado muestran que esta cepa es capaz de aprender antes y con un porcentaje mayor de éxito a evitar el estímulo desagradable que los controles y las cepas CgA- y CgA&B-KO (fig. 30)

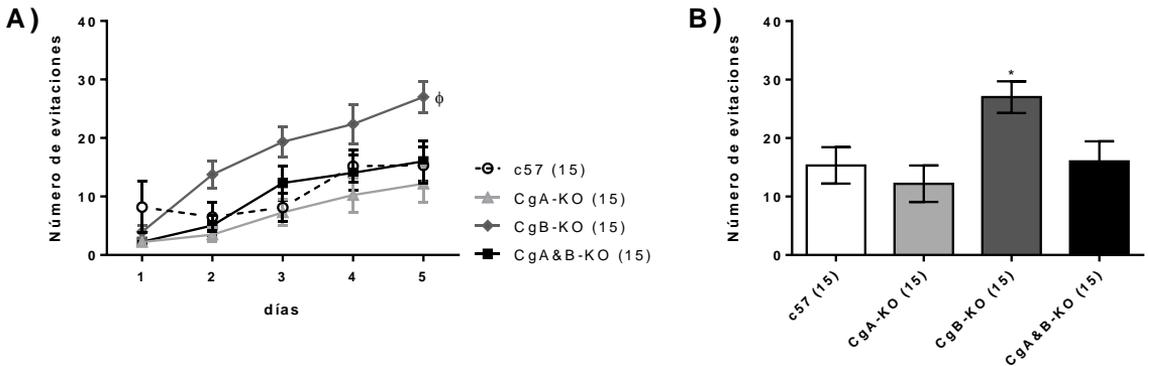


Figura 30. Evolución del aprendizaje condicionado en machos de 16 meses de las 3 cepas transgénicas en el fondo genético unificado. A) Porcentaje de cambio condicionado a lo largo de los 5 días de experimentación y **B)** Porcentaje de cambio condicionado el último día de aprendizaje. En ambos casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante del área bajo cada curva y del porcentaje de cambio condicionado el último día seguidos por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 ($\phi p < 0.05$, $*p < 0.05$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.2.9.- No existe un fenotipo de ansiedad estadísticamente sólido en los ratones de 12 meses.

Ninguna de las 3 cepas presenta diferencias significativas en cuanto a tiempo en la zona iluminada de la caja luz-oscuridad y número de transiciones entre zonas (fig. 31)

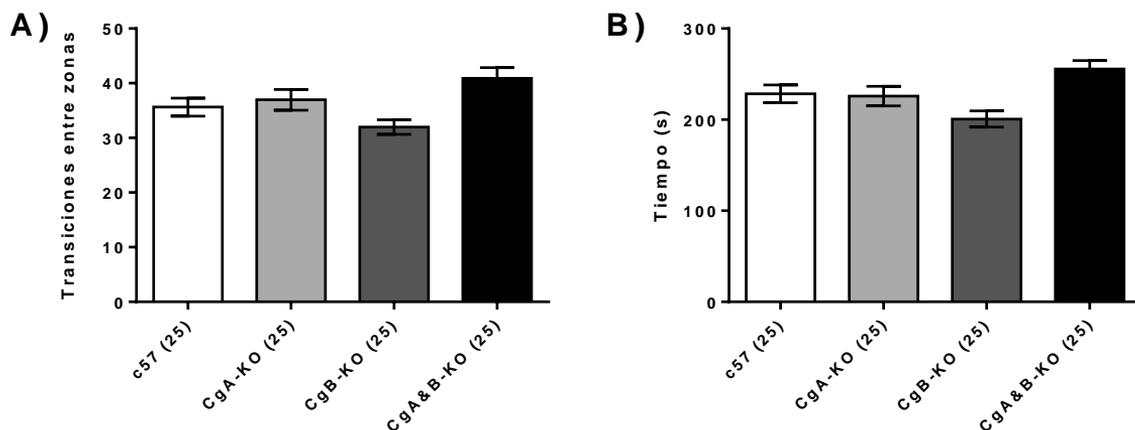


Figura 31. Estudio de la ansiedad en la caja luz-oscuridad en las tres cepas transgénicas del fondo genético unificado a los 12 meses de edad. A) Número de transiciones entre los compartimentos oscuro e iluminado y **B)** Tiempo pasado en el compartimento iluminado. En ambos casos, el número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57. (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.2.10.- Los resultados del test de enterramiento de canicas indican un déficit en este proceso en los ratones carentes de CgB.

La cepa CgB-KO entierra significativamente menos canicas en el tiempo prescrito para la prueba que los controles, mientras que los (fig. 32)

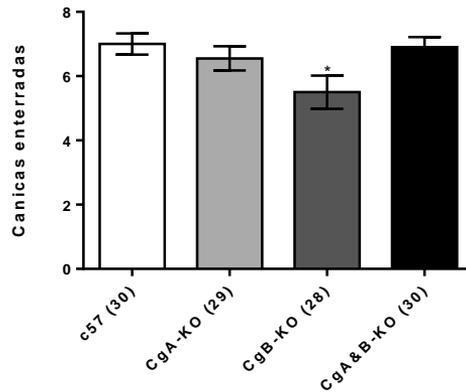


Figura 32. Comportamiento de enterramiento en las tres cepas transgénicas del fondo genético unificado a los 10 meses de edad. El número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (* $p < 0.05$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.2.11.- Los test de residente-intruso muestran una tendencia a la agresividad incrementada en los ratones CgB- y CgA&B-KO.

Los animales de esas dos cepas realizan un número mucho mayor de ataques en el período de interacción descrito con los animales intruso de la cepa c57 (fig. 33).

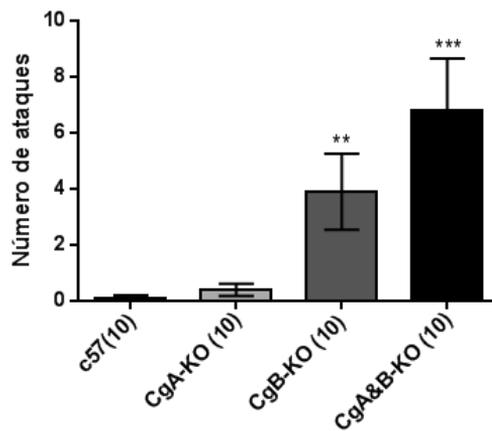


Figura 33. Evaluación de la tendencia a la agresividad en las tres cepas transgénicas del fondo genético unificado a los 12 meses de edad mediante el test residente-intruso. El número de animales empleados se indica entre paréntesis. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de una variante seguido por una corrección post-test de Bonferroni para comparaciones múltiples de cada cepa transgénica con la cepa c57 (** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$). (Datos representados como media aritmética \pm error estándar).

4.2.12.- Las 3 cepas de ratones transgénicos presentan un porcentaje de barbering en el rostro y el pelaje considerablemente mayor que los c57.

El barbering o efecto Dalila es el corte sistemático y repetido de las vibrisas y/o el pelaje de los individuos de una jaula por parte de un individuo dominante, generalmente más pesado (Sarna et al., 2000). Es un proceso doloroso y complejo, prolongado en el tiempo y que requiere la completa sumisión de los ratones dominados.

En el caso de las 3 cepas transgénicas, más de un 40% de las jaulas presentaban barbering en al menos la mitad de los individuos (fig. 34). El patrón de corte se repetía en todos los habitantes de la jaula y era diferente entre jaulas distintas.

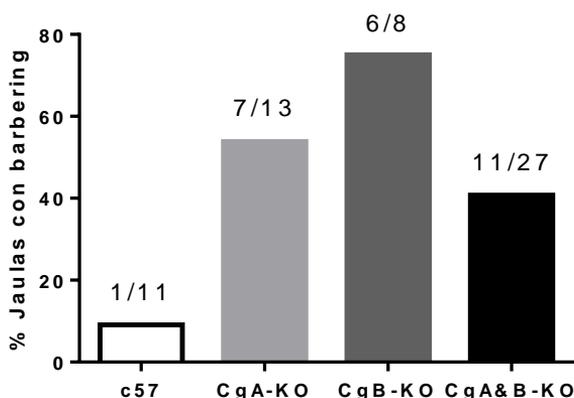


Figura 34. Porcentaje de jaulas con presencia de barbering en las tres cepas transgénicas. Los números sobre cada barra indican el número de jaulas con barbering frente al número total de jaulas de cada genotipo.

“El problema con los hechos es que haya tantos de ellos”

Samuel McChord Crothers , *El lector gentil*,

“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas”

Mario Benedetti

Discusión

La caracterización de los organismos transgénicos a cualquier nivel, tal y como se ha intentado documentar y justificar adecuadamente en la introducción de la presente tesis doctoral, ha sido y es una herramienta poderosa para la investigación en biología y medicina. Sin embargo, conforme nuestro entendimiento de la naturaleza ha ido incrementándose por la empresa conjunta y esencial de la ciencia también lo ha hecho su complejidad y nivel de detalle. Es pues nuestra bendición y nuestra condena como científicos que, en palabras del humanista alemán Albert Schweitzer, “según vamos adquiriendo conocimiento, las cosas no se hacen más comprensibles sino más misteriosas”. Interpretar por tanto una serie de resultados que abarcan la práctica totalidad de funciones fisiológicas de un ser vivo, especialmente un animal altamente social y cercano evolutivamente a los seres humanos, en base a la ausencia de una o dos de entre miles de proteínas podría parecer fútil en el mejor de los casos y arrogante en el peor.

Pero tal es la naturaleza de la ciencia que debe ser posible, mediante el razonamiento y un cuidadoso estudio de los hechos y la documentación existente, encontrar explicaciones a los fenómenos naturales o, al menos, realizar predicciones que nos permitan, mediante su confirmación o refutación, acercarnos a la verdad. En la escasa medida de mis posibilidades, esa es mi intención para este capítulo de mi tesis doctoral

5.1.- Los complejos orígenes de las alteraciones fenotípicas en ratones carentes de cromograninas.

El análisis de cualquier fenotipo alterado observado en los resultados de los experimentos según se han descrito es necesariamente complejo debido a varios factores que ya han sido mencionados brevemente en la introducción de esta tesis: el papel de las cromograninas en el almacenamiento y liberación de catecolaminas, con las múltiples funciones fisiológicas que estas presentan, su función en la granulogénesis y acumulación de otras sustancias no catecolaminas en los gránulos, y su naturaleza como polipéptidos y prohormonas con un número importante de péptidos derivados con actividad fisiológica conocida y desconocida. A estos tres elementos hay que sumarles además otro, del que muy poco se conoce en este caso, y que casi siempre aparece cuando se trabaja con animales transgénicos: posibles mecanismos de compensación fisiológica por la

pérdida de una o las dos cromograninas durante el desarrollo embrionario o a lo largo de la vida de los animales.

Además, la existencia de dos juegos de resultados, uno en cada fondo genético disponible en su momento, que a veces resultan diferentes para la misma prueba cuando no francamente opuestos, indica muy claramente la influencia del mismo en la fisiología del animal y dificulta aún más el extraer conclusiones circunscritas solamente al papel de las cromograninas en la fisiología. Puesta por tanto la venda, vayamos ahora a analizar la herida.

5.2.- Las cromograninas participan en la regulación del metabolismo de la glucosa.

En los test de tolerancia a la glucosa y a la insulina se evalúan fundamentalmente la respuesta del organismo al estímulo en dos fases: primero, la liberación de insulina inducida por el exceso de glucosa; segundo, la capacidad de la insulina para devolver los niveles de glucosa a números cercanos a su nivel basal (GTT) o bien para disminuirlos rápidamente (ITT). En este sentido, un cuidadoso examen de las curvas temporales de respuesta a la inyección en cada prueba revela en primer lugar una crucial diferencia entre los períodos moderado y prolongado de ayuno en el test de glucosa, tanto en la glucemia basal como en las curvas temporales. En primer lugar, los datos experimentales en ayuno moderado nos hablan de una hipersensibilidad a la insulina liberada en la cepa CgA-KO, un resultado que ya había sido descrito en el fondo genético original para los ratones carentes de CgA (Gayen et al., 2009), que aparecía en animales mayores de 6 meses y cuyo fenotipo podía ser rescatado mediante la adición de pancreastatina, un péptido antagonista de la liberación de insulina derivado de la CgA, con lo que se podría considerar explicada dicha reacción.

El fenotipo de los animales CgB- y CgA&B-KO es más llamativo: los ratones CgB-KO habían demostrado presentar una incapacidad para liberar adecuadamente insulina en respuesta a una inyección de glucosa, con una respuesta apenas detectable (Obermüller et al., 2009) en animales de 3 a 6 meses de edad. Aunque en dichas cepas en su fondo genético original se aprecia una leve hipersensibilidad (CgB-KO) y resistencia (CgA&B-KO) a la insulina liberada por inyección de glucosa, en ambos casos de edad igual o inferior a 6 meses, dicho fenotipo no aparece en el fondo genético unificado con ayuno moderado. La

hipersensibilidad a la insulina inyectada (recordemos que la pancreastatina sólo es antagonista de la liberación de insulina, no de la insulina en sí) que si muestran ambas cepas pero no la CgA-KO en tal situación es más difícil de explicar. Una posible solución sería que el organismo haya desarrollado en estas cepas un mecanismo de compensación a la liberación defectuosa de insulina, como un aumento de receptores de la molécula, que se manifieste a edades avanzadas o una modificación de la liberación de glucagón o somatostatina. De hecho, ambas moléculas también presentan perturbaciones en su liberación según la descripción del artículo de Obermüller. Sin embargo, esta es una hipótesis requeriría experimentos adicionales fuera del alcance de esta tesis.

La glucemia basal y las curvas temporales en las tres cepas muestran un desplome frente a los ratones control tras ayuno prolongado. Este hecho resulta muy interesante ya que el control de la glucemia en esta situación pasa a depender, no solo de la insulina, sino de un conjunto de moléculas que podemos definir como hiperglicémicas, que aumentan la glucemia en sangre desde el hígado así como la producción energética del tejido graso, para compensar la falta de alimento como la hormona del crecimiento, los glucocorticoides o, y esto parece decisivo, las catecolaminas. Es factible por tanto que un menor nivel de catecolaminas en plasma, resultado de una menor secreción regulada, produzca en todas las cepas una menor glucemia basal y sin embargo permita una rápida recuperación transitoria al inyectar la sobredosis de glucosa. Mención aparte merece la cepa CgB-KO, sin embargo, cuyo curva temporal muestra una incapacidad para recuperar concentraciones tan elevadas de glucosa como las otras dos y recupera sus niveles basales más rápidamente. El motivo más factible para esta diferencia remite nuevamente al artículo de Obermüller, donde la secreción de glucagón a esas concentraciones de glucosa se reduce prácticamente a la mitad en los animales transgénicos que en los controles, lo que permitiría que la insulina liberada como resultado de la inyección actuara más velozmente sobre la glucemia.

Esta explicación presenta sin embargo dos problemas: 1) la concentración en plasma de catecolaminas para los animales transgénicos en condiciones normales y en estrés no se conoce, y por lo tanto no podemos ir más allá del ámbito de la especulación al respecto de sus efectos fisiológicos (volveré sobre

esto más adelante); 2) a priori, cualquier mecanismo presente en las cepas CgA- o CgB-KO debería también aparecer en el doble mutante, y eso no se da en el caso del ayuno prolongado, donde, de ser cierta la hipótesis del glucagón, la curva de glucosa debería ser igual que la de los ratones CgB-KO. Resulta evidente la necesidad de datos adicionales sobre las concentraciones de glucagón, insulina y catecolaminas en plasma durante los experimentos para poder avanzar en el conocimiento de la relación de las cromograninas con el control fino de la glucemia en sangre.

5.3.- Existe un efecto poco claro de las cromograninas sobre la arquitectura de los animales.

Las pruebas densitométricas presentan cierta variabilidad en los resultados especialmente centrada en el fondo genético. Esto era de esperar, si se tiene en cuenta que las variaciones más inmediatas entre los distintos fondos son morfológicas, de tamaño y color. Si bien las alteraciones de porcentaje de tejido graso, que aparecen dispersas en los varios genotipos, edades y fondos genéticos, pueden de nuevo rastrearse al menos parcialmente hasta la pancreastatina, que además de su mencionado antagonismo a la liberación pancreática de insulina presenta también un antagonismo a la lipogénesis en tejido graso de esta, es imposible con los datos disponibles formular una hipótesis sencilla que explique las variaciones observadas.

Un aspecto interesante que aparece repetidamente en las pruebas es la alteración del contenido y la densidad mineral ósea, y en relación a este fenómeno existe una pequeña cantidad de artículos en la bibliografía que mencionan el papel de las catecolaminas en los huesos a distintos niveles. Recientemente se ha descrito, por ejemplo, una importante presencia de receptores adrenérgicos β_2 en los huesos con la función de estimular la formación de osteoclastos, células multinucleadas encargadas de la remodelación ósea (Aitken et al., 2009), y el bloqueo farmacológico de dichos receptores o la inactivación de los genes que los codifican incrementa la masa ósea (Qin et al., 2010), lo que en principio podría ser coincidente con el efecto causado por un menor nivel de catecolaminas en plasma.

5.4.- Al menos dos mecanismos diferentes implican a las cromograninas en la homeostasis vascular.

En los resultados de la tensión arterial y la frecuencia cardíaca se pueden observar tres claras tendencias asociadas a la edad: 1) la evolución de la cepa CgA&B-KO a bradicárdico; 2) el paso de las cepas CgA- y CgA&B-KO de un fenotipo hipertenso a uno normal y 3) el desarrollo de la hipertensión en los ratones CgB-KO.

En el análisis de estos fenómenos volvemos a contar de nuevo con la ayuda de la bibliografía: un estudio de homeostasis vascular fue realizado en los ratones carentes de CgA en su fondo genético original por parte del equipo de los doctores Mahata y O'Connor (Gayen et al., 2009). En el artículo, la presión arterial y la frecuencia cardíaca estaban elevadas en reposo y durante una situación de estrés, y la sensibilidad barorrefleja se veía claramente disminuída. Ambos fenotipos pudieron ser rescatados con una adición de catestatina, como ya se ha mencionado un péptido derivado de la CgA que inhibe la liberación regulada de catecolaminas, de forma análoga a lo anteriormente comentado para la pancreastatina y la glucemia. Asimismo, los niveles de adrenalina y noradrenalina excedían ampliamente los de los controles en reposo, pero no aumentaban ante el estrés. Nuestros resultados, más limitados en el detalle, corroboran estos en cierto modo, aunque el aumento de la frecuencia cardíaca no aparece en ningún momento, lo que nos permite compartir la hipótesis elegantemente formulada de una inestabilidad global que implica factores simpáticos y parasimpáticos en el fenotipo hipertenso de los ratones CgA-KO.

En el caso de la CgB, un estudio de polimorfismos del gen en humanos y de una cepa de ratones CgB-KO generada por el mismo equipo de investigación (Zhang et al., 2009) muestra también hipertensión en los ratones y, extrañamente, una mayor tendencia a la hipertensión en humanos en aquellos alelos de CgB que se correlacionaban con un mayor nivel circulantes de catecolaminas en plasma. Nuevamente, nuestros resultados corroboran en cierta forma los descritos.

Todo lo anterior indica que ambas cromograninas participan al menos de dos maneras en la homeostasis vascular: 1) la acumulación de catecolaminas y su secreción regulada; 2) la actividad de sus péptidos derivados.

Un número de incógnitas surge de nuestros datos que tienen difícil respuesta con la información disponible: las progresiones invertidas de la presión

arterial observadas en CgA- y CgA&B-KO por un lado y CgB-KO por el otro podrían tener relación tanto con la catestatina como con otros péptidos derivados de CgA como vasostatina I y II, que producen vasorrelajación periférica; sin conocer cómo afecta a los niveles circulantes de catecolaminas la pérdida de cada cromogranina, y sin conocer tampoco si ambas catecolaminas se ven afectadas por igual por esa carencia, es imposible discriminar el efecto real de unas y otras en la homeostasis vascular; por último, queda por explicar la bradicardia de la cepa CgA&B-KO en este mismo contexto.

5.5.- El análisis del fenotipo emotivo y cognitivo en los ratones carentes de Cgs apoya la existencia de una actividad de estas independiente de las catecolaminas en el sistema nervioso central.

La cepa CgB muestra una clara propensión a la depresión y la ansiedad a lo largo de su primer año de vida, además de la agresión incrementada, y rinde peor en el test de enterramiento de canicas, un modelo de comportamiento compulsivo cuyo núcleo fisiológico se asocia al hipocampo (Deacon y Rawlins, 2005), en el conjunto de datos más amplio y sistemático perteneciente al fondo genético unificado. Estos resultados son casi opuestos a los que se encuentran en modelos de sobreabundancia de catecolaminas, como los ratones carentes de las mediáticas MAO-A y -B, dos de las enzimas encargadas de la degradación de estos neurotransmisores (Bortolato et al., 2009; Godar et al., 2011), lo que podría llevar a pensar que una disminución de adrenalina y noradrenalina a nivel del sistema nervioso central estaría detrás de ese fenotipo. Pero ocurren varias circunstancias que me hacen dudar de esto: 1) los extraños perfiles conductuales de las otras dos cepas transgénicas, con los ratones CgA-KO mostrando una pauta de actividad cambiante en el campo abierto y la abundancia de barbering (sobre la que volveremos más adelante) y un CgA&B-KO extremadamente agresivo y aparentemente depresivo en la edad madura pero sin fenotipo ansioso, incluso desinhibido en los comportamientos exploratorios a los doce meses. 2) Las diferencias en coordinación motora observadas en la pruebas de RotaRod, donde una influencia de una menor abundancia de dopamina sería una explicación bien documentada si existiera una menor aptitud en los animales transgénicos, muestran en realidad una mejora en los tiempos para los CgA- y CgA&B-KO. 3) La enorme mejora en aprendizaje condicionado de la cepa CgB-KO. Los casos

estudiados en la literatura de un efecto de las catecolaminas en el aprendizaje condicionado se remontan a finales de los años 50 y todos los que he consultado inciden en la relevancia de la noradrenalina para el establecimiento de la memoria condicionada. De hecho, se ha documentado como el déficit de noradrenalina causa un menor aprendizaje por aversión sin afectar a la memoria espacial (Kobayashi et al., 2000), lo contrario de lo que esperaría encontrar si el amplio fenotipo conductual que aparece en esta cepa fuera causado por una deficiencia catecolaminérgica. 4) El ya mencionado fenómeno del barbering y sus efectos en la conducta. En la modalidad que presentan los animales que hemos empleado, ejercida por un solo macho dominante que elimina de forma violenta las vibrisas sensoriales y/o parte del pelo del animal de forma repetida y consistente, se considera una manifestación extrema de dominación social (Sarna et al., 2000; Kalueff et al., 2006) y un modelo interesante de la tricotilomanía (Kurien et al., 2005). Aunque existen precedentes que hablan de la influencia de las catecolaminas, la dopamina en este caso (Tammimäki et al., 2010), en la aparición del barbering, se da justamente en un modelo transgénico cuyos niveles de dopamina variaban por encima y por debajo de los de los controles en diversas áreas cerebrales de forma que la mera concentración no podría ser la única responsable del fenómeno, debiendo participar también al menos mecanismos de regulación postsináptica.

“Nuestra incapacidad para discernir un bien universal no demuestra una falta de perspectiva o de ingenio, sino meramente que la naturaleza no contiene ningún mensaje moral enmarcado en términos humanos. La moralidad es un asunto de filósofos, teólogos, estudiantes de las humanidades, seguramente de todo ser racional. Las respuestas no se leerán pasivamente de la naturaleza; ni surgen o pueden hacerlo de los datos de la ciencia. La realidad fáctica del mundo no nos enseña como nosotros, con nuestra capacidad para el bien y el mal, debemos alterarlo o preservarlo de la forma más ética”

Stephen Jay Gould. “Dientes de gallina y dedos de caballo”

Conclusiones

1. Las cromograninas A y B son componentes proteicos de la matriz de vesículas de núcleo denso directamente involucrados en la formación de los mismos y en la acumulación de diversas sustancias en su interior.
2. La función fisiológica de estas proteínas excede sin embargo su papel en la matriz intravesicular e incluye la participación en el mantenimiento de la glucemia, la homeostasis vascular y un número de fenotipos conductuales.
3. La implicación de las cromograninas en el mantenimiento de la glucemia se produce al menos de dos maneras diferentes: el péptido pancreostatina, derivado de la cromogranina A, y una función hiperglicémica indirecta durante el ayuno prolongado probablemente mediada por las catecolaminas liberadas de los gránulos.
4. De forma muy similar, el efecto de estas proteínas sobre la homeostasis vascular parece centrarse en los péptidos derivados de la cromogranina A y el efecto de las catecolaminas liberadas.
5. La amplia variedad de perturbaciones conductuales y cognitivas asociadas a la pérdida de una o ambas proteínas, así como el perfil fenotípico tan diferente que presenta cada cepa, apuntan a la existencia de una acción independiente de catecolaminas sobre varios puntos del sistema nervioso central.
6. La determinación de las catecolaminas en plasma en las tres cepas a lo largo de la serie temporal de experimentos es vital para poder establecer más precisamente las funciones específicas de cada proteína.

“Bernardo de Chartes solía decir que nosotros (los Modernos) somos como enanos subidos a los hombros de gigantes (los Antiguos), y así somos capaces de ver más y más lejos que ellos. Y esto no es en absoluto por la agudeza de nuestra visión o la estatura de nuestro cuerpo, sino porque nos sostienen y elevan la magnitud de los gigantes”

John de Salisbury

Bibliografía

- Aardal, S., K. B. Helle, S. Elsayed, R. K. Reed y G. Serck-Hanssen (1993). "Vasostatsins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments." J Neuroendocrinol 5(4): 405-412.
- Acsadi, G., R. A. Anguelov, H. Yang, G. Toth, R. Thomas, A. Jani, Y. Wang, E. Iankova, S. Mohammad, R. A. Lewis y M. E. Shy (2002). "Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy." Hum Gene Ther 13(9): 1047-1059.
- Ait-Ali, D., V. Turquier, D. Alexandre, L. Grumolato, S. Jegou, H. Vaudry y Y. Anouar (2002). "Molecular characterization of frog chromogranin B reveals conservation of selective sequences encoding potential novel regulatory peptides." FEBS Lett 511(1-3): 127-132.
- Aitken, S. J., E. Landao-Bassonga, S. H. Ralston y A. I. Idris (2009). "Beta2-adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation in vitro by direct and indirect mechanisms." Arch Biochem Biophys 482(1-2): 96-103.
- Albillos, A., G. Dernick, H. Horstmann, W. Almers, G. Alvarez de Toledo y M. Lindau (1997). "The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry." Nature 389(6650): 509-512.
- Aloe, L. y R. Levi-Montalcini (1979). "Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effect of antiserum to nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A 76(3): 1246-1250.
- Anouar, Y. y J. Duval (1992). "Direct estradiol down-regulation of secretogranin II and chromogranin A mRNA levels in rat pituitary cells." Mol Cell Endocrinol 88(1-3): 97-104.
- Artalejo, C. R., J. R. Henley, M. A. McNiven y H. C. Palfrey (1995). "Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca²⁺, GTP, and dynamin but not clathrin." Proc Natl Acad Sci U S A 92(18): 8328-8332.

- Arvan, P. y J. D. Castle (1987). "Phasic release of newly synthesized secretory proteins in the unstimulated rat exocrine pancreas." J Cell Biol 104(2): 243-252.
- Baker, P. F. y D. E. Knight (1978). "Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes." Nature 276(5688): 620-622.
- Barnett, S. A. (1958). "Exploratory behaviour." British Journal of Psychology 49(4): 289-310.
- Bartfai, T., K. Iverfeldt, G. Fisone y P. Serfozo (1988). "Regulation of the release of coexisting neurotransmitters." Annu Rev Pharmacol Toxicol 28: 285-310.
- Barth, E., G. Albuszies, K. Baumgart, M. Matejovic, U. Wachter, J. Vogt, P. Radermacher y E. Calzia (2007). "Glucose metabolism and catecholamines." Crit Care Med 35(9 Suppl): S508-518.
- Bartolomucci, A., G. M. Pasinetti y S. R. J. Salton (2010). "Granins as disease-biomarkers: translational potential for psychiatric and neurological disorders." Neuroscience 170(1): 289-297.
- Bartolomucci, A., R. Possenti, S. K. Mahata, R. Fischer-Colbrie, Y. P. Loh y S. R. Salton (2011). "The extended granin family: structure, function, and biomedical implications." Endocr Rev 32(6): 755-797.
- Bauer, S. H., X. Y. Zhang, F. Liang, W. P. De Potter, M. Claeys y M. Przybylski (1997). "Isolation and identification of intact chromogranin A and two N-terminal processing products, vasostatin I and II, from bovine adrenal medulla chromaffin granules by chromatographic and mass spectrometric methods." Neuropeptides 31(3): 273-280.
- Bean, A. J., X. Zhang y T. Hokfelt (1994). "Peptide secretion: what do we know?" Faseb J 8(9): 630-638.
- Beck, J. A., S. Lloyd, M. Hafezparast, M. Lennon-Pierce, J. T. Eppig, M. F. Festing y E. M. Fisher (2000). "Genealogies of mouse inbred strains." Nat Genet 24(1): 23-25.

- Belzung, C. y G. Griebel (2001). "Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review." Behavioural Brain Research 125(1–2): 141-149.
- Benus, R. F., B. Bohus, J. M. Koolhaas y G. A. van Oortmerssen (1989). "Behavioural strategies of aggressive and non-aggressive male mice in active shock avoidance." Behavioural Processes 20(1–3): 1-12.
- Berger, M., J. A. Gray y B. L. Roth (2009). "The Expanded Biology of Serotonin." Annual Review of Medicine 60(1): 355-366.
- Bergmann, M., K. Kuchelmeister, K. W. Schmid, H. A. Kretzschmar y R. Schroder (1996). "Different variants of frontotemporal dementia: a neuropathological and immunohistochemical study." Acta Neuropathol 92(2): 170-179.
- Bergmüller, R. y M. Taborsky (2010). "Animal personality due to social niche specialisation." Trends in ecology & evolution (Personal edition) 25(9): 504-511.
- Biales, B., M. Dichter y A. Tischler (1976). "Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells." J Physiol 262(3): 743-753.
- Biswas, N., S. M. Vaingankar, M. Mahata, M. Das, J. R. Gayen, L. Taupenot, J. W. Torpey, D. T. O'Connor y S. K. Mahata (2008). "Proteolytic cleavage of human chromogranin a containing naturally occurring catestatin variants: differential processing at catestatin region by plasmin." Endocrinology 149(2): 749-757.
- Bittner, M. A. y R. W. Holz (1992). "Kinetic analysis of secretion from permeabilized adrenal chromaffin cells reveals distinct components." J Biol Chem 267(23): 16219-16225.
- Blaschko, H., R. S. Comline, F. H. Schneider, M. Silver y A. D. Smith (1967). "Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation." Nature 215(5096): 58-59.
- Blazquez, M. y K. I. Shennan (2000). "Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway." Biochem Cell Biol 78(3): 181-191.

- Borges, R., J. Diaz, M. Camacho y J. D. Machado (2005). "A simple way to build a grinder for carbon-fibre electrodes for amperometry or voltammetry." Pflugers Arch 450(4): 280-282.
- Borges, R., F. Sala y A. G. Garcia (1986). "Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals." J Neurosci Methods 16(4): 289-300.
- Bortolato, M., S. C. Godar, S. Davarian, K. Chen y J. C. Shih (2009). "Behavioral disinhibition y reduced anxiety-like behaviors in monoamine oxidase B-deficient mice." Neuropsychopharmacology 34(13): 2746-2757.
- Bourin, M. y M. Hascoet (2003). "The mouse light/dark box test." Eur J Pharmacol 463(1-3): 55-65.
- Brandt, B. L., S. Hagiwara, Y. Kidokoro y S. Miyazaki (1976). "Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine." J Physiol 263(3): 417-439.
- Brown, R. Z. (1953). "Social Behavior, Reproduction, and Population Changes in the House Mouse (*Mus musculus* L.)." Ecological Monographs 23(3): 218-240.
- Burgess, T. L. y R. B. Kelly (1987). "Constitutive and regulated secretion of proteins." Annu Rev Cell Biol 3: 243-293.
- Burgoyne, R. D. y A. Morgan (2003). "Secretory granule exocytosis." Physiological Reviews 83(2): 581-632.
- Cahill, L. (2006). "Why sex matters for neuroscience." Nat Rev Neurosci 7(6): 477-484.
- Cannon, W. (1929). "Organization for physiological homeostasis." Physiological Reviews 9(3): 399-431.
- Cannon, W. B. (1915). Bodily changes in pain, hunger, fear and rage, an account of recent researches into the function of emotional excitement. Nueva York y Londres.
- Cavadas, C., D. Cefai, J. Rosmaninho-Salgado, M. A. Vieira-Coelho, E. Moura, N. Busso, T. Pedrazzini, D. Grand, S. Rotman, B. Waeber, J. F. Aubert y E. Grouzmann (2006). "Deletion of the neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor gene

- reveals a regulatory role of NPY on catecholamine synthesis and secretion." Proc Natl Acad Sci U S A 103(27): 10497-10502.
- Ciesielski-Treska, J., G. Ulrich, S. Chasserot-Golaz, J. Zwiller, M. O. Revel, D. Aunis y M. F. Bader (2001). "Mechanisms underlying neuronal death induced by chromogranin A-activated microglia." J Biol Chem 276(16): 13113-13120.
- Combs, S. E., K. Kriegelstein y K. Unsicker (2000). "Reduction of endogenous TGF-beta increases proliferation of developing adrenal chromaffin cells in vivo." J Neurosci Res 59(3): 379-383.
- Cotesta, D., C. Caliumi, P. Alo, L. Petramala, M. G. Reale, R. Masciangelo, A. Signore, R. Cianci, E. D'Erasmus y C. Letizia (2005). "High plasma levels of human chromogranin A and adrenomedullin in patients with pheochromocytoma." Tumori 91(1): 53-58.
- Cotzias, G. C. (1969). "Metabolic modification of some neurologic disorders." JAMA 210(7): 1255-1262.
- Coupland, R. (1965). The Natural History of the Chromaffin Cell. London, Longmans, Green & Co Ltd.
- Crawley, J. y F. K. Goodwin (1980). "Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines." Pharmacol Biochem Behav 13(2): 167-170.
- Crivellato, E., B. Nico, F. Mallardi, C. A. Beltrami y D. Ribatti (2003). "Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism?" Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 274(1): 778-784.
- Crivellato, E., B. Nico y D. Ribatti (2008). "The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle." Anat Rec (Hoboken) 291(12): 1587-1602.
- Cryan, J. F., C. Mombereau y A. Vassout (2005). "The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice." Neurosci Biobehav Rev 29(4-5): 571-625.
- Curtis, J. C. y D. Kleinfeld (2006). "Seeing What the Mouse Sees with Its Vibrissae: A Matter of Behavioral State." Neuron 50(4): 524-526.

- Chen, Y., F. Rao, J. L. Rodriguez-Flores, M. Mahata, M. M. Fung, M. Stridsberg, S. M. Vaingankar, G. Wen, R. M. Salem, M. Das, M. G. Cockburn, N. J. Schork, M. G. Ziegler, B. A. Hamilton, S. K. Mahata, L. Taupenot y D. T. O'Connor (2008). "Naturally occurring human genetic variation in the 3'-untranslated region of the secretory protein chromogranin A is associated with autonomic blood pressure regulation and hypertension in a sex-dependent fashion." J Am Coll Cardiol 52(18): 1468-1481.
- Danino, D. y J. E. Hinshaw (2001). "Dynamin family of mechanoenzymes." Curr Opin Cell Biol 13(4): 454-460.
- Davenport, C. M., I. G. Sevastou, C. Hooper y J. M. Pocock (2010). "Inhibiting p53 pathways in microglia attenuates microglial-evoked neurotoxicity following exposure to Alzheimer peptides." J Neurochem 112(2): 552-563.
- de Almeida, J. y G. Mengod (2008). "Serotonin 1A receptors in human and monkey prefrontal cortex are mainly expressed in pyramidal neurons and in a GABAergic interneuron subpopulation: implications for schizophrenia and its treatment." Journal of Neurochemistry 107(2): 488-496.
- Deacon, R. M. y J. N. Rawlins (2005). "Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice." Behav Brain Res 156(2): 241-249.
- Deacon, R. M. J. (2006). "Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction." Nat Protoc 1(1): 118-121.
- Deacon, R. M. J. (2006). "Digging y marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts." Nat Protoc 1(1): 122-124.
- Delarue, C., F. Leboulenger, M. Morra, F. Hery, A. J. Verhofstad, A. Berod, L. Denoroy, G. Pelletier y H. Vaudry (1988). "Immunohistochemical and biochemical evidence for the presence of serotonin in amphibian adrenal chromaffin cells." Brain Res 459(1): 17-26.
- Di Somma, C., A. Colao, A. Di Sarno, M. Klain, M. L. Landi, G. Faccioli, R. Pivonello, N. Panza, M. Salvatore y G. Lombardi (1998). "Bone Marker and Bone Density Responses to Dopamine Agonist Therapy in Hyperprolactinemic Males." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 83(3): 807-813.

- Diaz-Flores, L., R. Gutierrez, H. Varela, F. Valladares, H. Alvarez-Arguelles y R. Borges (2008). "Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells." Acta Physiol (Oxf) 192(2): 145-163.
- Diaz-Vera, J., M. Camacho, J. D. Machado, N. Dominguez, M. S. Montesinos, J. R. Hernandez-Fernaud, R. Lujan y R. Borges (2012). "Chromogranins A and B are key proteins in amine accumulation, but the catecholamine secretory pathway is conserved without them." FASEB J 26(1): 430-438.
- Dondossola, E., A. M. Gasparri, B. Colombo, A. Sacchi, F. Curnis y A. Corti (2011). "Chromogranin A restricts drug penetration and limits the ability of NGR-TNF to enhance chemotherapeutic efficacy." Cancer Res 71(17): 5881-5890.
- Dopazo, A., T. W. Lovenberg, P. E. Danielson, H. P. Ottiger y J. G. Sutcliffe (1993). "Primary structure of mouse secretogranin III and its absence from deficient mice." J Mol Neurosci 4(4): 225-233.
- Douglas, W. W. (1968). "Stimulus-secretion coupling: the concept y clues from chromaffin and other cells." Br J Pharmacol 34(3): 453-474.
- Douglas, W. W., A. M. Poisner y R. P. Rubin (1965). "Efflux of adenine nucleotides from perfused adrenal glands exposed to nicotine and other chromaffin cell stimulants." J Physiol 179(1): 130-137.
- Douglas, W. W. y R. P. Rubin (1961). "The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine." J Physiol (London) 159: 40-57.
- Doupe, A. J., S. C. Landis y P. H. Patterson (1985). "Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity." J Neurosci 5(8): 2119-2142.
- Drees, B. M. y J. W. Hamilton (1994). "Processing of chromogranin A by bovine parathyroid secretory granules: production and secretion of N-terminal fragments." Endocrinology 134(5): 2057-2063.
- Eder, S., J. Leierer, L. Klimaschewski, A. Wilhelm, W. Volkandt, A. Laslop y R. Fischer-Colbrie (2004). "Secretion and molecular forms of NESP55, a novel genomically imprinted neuroendocrine-specific protein from AtT-20 cells." Neurosignals 13(6): 298-307.

- Edwards, S. y G. F. Koob (2012). Experimental Psychiatric Illness and Drug Abuse Models: From Human to Animal, an Overview. Psychiatric Disorders. 829: 31-48.
- Elias, S., C. Delestre, S. Ory, S. Marais, M. Courel, R. Vazquez-Martinez, S. Bernard, L. Coquet, M. M. Malagon, A. Driouich, P. Chan, S. Gasman, Y. Anouar y M. Montero-Hadjadje (2012). "Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells." Endocrinology 153(9): 4444-4456.
- Euler, U. S. v. (1972). Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves, the effects of drugs. Catecholamines. H. Blaschko and E. Muscholl. Berlin, Springer-Verlag: 186-230.
- Fasciotto, B. H., J. C. Denny, G. H. Greeley Jr y D. V. Cohn (2000). "Processing of chromogranin A in the parathyroid: generation of parastatin-related peptides." Peptides 21(9): 1389-1401.
- Fischer-Colbrrie, R., J. Diez-Guerra, P. C. Emson y H. Winkler (1986). "Bovine chromaffin granules: immunological studies with antisera against neuropeptide Y, [Met]enkephalin and bombesin." Neuroscience 18(1): 167-174.
- Fitzgerald, R. E., M. Berres y U. Schaepfi (1988). "Validation of a radial maze test for assessing learning and memory in rats." Toxicology 49(2-3): 425-432.
- Forsythe, P., W. J. Curry, C. F. Johnston, P. Harriott, J. MacMahon y M. Ennis (1997). "The modulatory effects of WE-14 on histamine release from rat peritoneal mast cells." Inflamm Res 46 Suppl 1: S13-14.
- Fugere, M. y R. Day (2005). "Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition." Trends Pharmacol Sci 26(6): 294-301.
- Fujita, T. (1977). "Concept of paraneurons." Arch Histol Jpn 40 Suppl: 1-12.
- Funakoshi, A., K. Miyasaka, R. Nakamura, K. Kitani, S. Funakoshi, H. Tamamura, N. Fujii y H. Yajima (1988). "Bioactivity of synthetic human pancreastatin on exocrine pancreas." Biochem Biophys Res Commun 156(3): 1237-1242.

- Gayen, J. R., Y. Gu, D. T. O'Connor y S. K. Mahata (2009). "Global disturbances in autonomic function yield cardiovascular instability and hypertension in the chromogranin a null mouse." Endocrinology 150(11): 5027-5035.
- Gayen, J. R., M. Saberi, S. Schenk, N. Biswas, S. M. Vaingankar, W. W. Cheung, S. M. Najjar, D. T. O'Connor, G. Bandyopadhyay y S. K. Mahata (2009). "A novel pathway of insulin sensitivity in chromogranin A null mice: a crucial role for pancreastatin in glucose homeostasis." J Biol Chem 284(42): 28498-28509.
- Gerdes, H. H., P. Rosa, E. Phillips, P. A. Baeuerle, R. Frank, P. Argos y W. B. Huttner (1989). "The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation." J Biol Chem 264(20): 12009-12015.
- Geyer, M. A., K. L. McIlwain y R. Paylor (2002). "Mouse genetic models for prepulse inhibition: an early review." Mol Psychiatry 7(10): 1039-1053.
- Glombik, M. M., A. Kromer, T. Salm, W. B. Huttner y H. H. Gerdes (1999). "The disulfide-bonded loop of chromogranin B mediates membrane binding and directs sorting from the trans-Golgi network to secretory granules." EMBO J 18(4): 1059-1070.
- Godar, S. C., M. Bortolato, R. Frau, M. Dousti, K. Chen y J. C. Shih (2011). "Maladaptive defensive behaviours in monoamine oxidase A-deficient mice." Int J Neuropsychopharmacol 14(9): 1195-1207.
- Goeddel (1979). "Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(1): 5.
- Goeddel, D. V., H. L. Heyneker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakura, D. G. Yansura, M. J. Ross, G. Miozzari, R. Crea y P. H. Seeburg (1979). "Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone." Nature 281(5732): 544-548.
- Gould, T. D. y I. I. Gottesman (2006). "Psychiatric endophenotypes and the development of valid animal models." Genes, Brain and Behavior 5(2): 113-119.

- Grabner, C. P., S. D. Price, A. Lysakowski y A. P. Fox (2005). "Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles." J Neurophysiol 94(3): 2093-2104.
- Grandy, D. K., R. Leduc, H. Makam, T. Flanagan, E. J. Diliberto, Jr., O. Civelli y O. H. Viveros (1992). "Nucleotide and deduced amino acid sequence of bovine adrenal medulla chromogranin B (secretogranin I)." Cell Mol Neurobiol 12(2): 185-192.
- Gronberg, M., R. M. Amini, M. Stridsberg, E. T. Janson y J. Saras (2010). "Neuroendocrine markers are expressed in human mammary glands." Regul Pept 160(1-3): 68-74.
- Gros-Louis, F., P. M. Andersen, N. Dupre, M. Urushitani, P. Dion, F. Souchon, M. D'Amour, W. Camu, V. Meininger, J. P. Bouchard, G. A. Rouleau y J. P. Julien (2009). "Chromogranin B P413L variant as risk factor and modifier of disease onset for amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A 106(51): 21777-21782.
- Gualix, J., M. Abal, J. Pintor, F. Garcia-Carmona y M. T. Miras-Portugal (1996). "Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation." J Biol Chem 271(4): 1957-1965.
- Guest, P. C., L. Wang, L. W. Harris, K. Burling, Y. Levin, A. Ernst, M. T. Wayland, Y. Umrانيا, M. Herberth, D. Koethe, J. M. van Beveren, M. Rothermundt, G. McAllister, F. M. Leweke, J. Steiner y S. Bahn (2010). "Increased levels of circulating insulin-related peptides in first-onset, antipsychotic naive schizophrenia patients." Mol Psychiatry 15(2): 118-119.
- Haaren, F. v. (1993). Methods in behavioral pharmacology. Amsterdam; New York, Elsevier.
- Hannan, A. J. (2010). Environmental enrichment and gene-environment interactions in mouse models of brain disorders. 44: 201-216.
- Harvey (1998). "Expression of GABA_A receptor gamma4 subunit gene: Anatomical distribution of the corresponding mRNA in the domestic chick forebrain and the effect of imprinting training." European journal of neuroscience 10: 5.

- Harvey, R. J., B. J. McCabe, R. O. Solomonia, G. Horn y M. G. Darlison (1998). "Expression of the GABA(A) receptor gamma 4-subunit gene: anatomical distribution of the corresponding mRNA in the domestic chick forebrain and the effect of imprinting training." Eur J Neurosci 10(9): 3024-3028.
- Hascoet, M., M. Bourin y B. A. Nic Dhonnchadha (2001). "The mouse light-dark paradigm: a review." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 25(1): 141-166.
- Heidrich, F. M., K. Zhang, M. Estrada, Y. Huang, F. J. Giordano y B. E. Ehrlich (2008). "Chromogranin B regulates calcium signaling, nuclear factor kappaB activity, and brain natriuretic peptide production in cardiomyocytes." Circ Res 102(10): 1230-1238.
- Helle, K. B. (2004). "The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects." Biol Rev Camb Philos Soc 79(4): 769-794.
- Helle, K. B., A. Corti, M. H. Metz-Boutigue y B. Tota (2007). "The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties." Cell Mol Life Sci 64(22): 2863-2886.
- Helle, K. B., R. K. Reed, K. E. Pihl y G. Serck-Hanssen (1985). "Osmotic properties of the chromogranins and relation to osmotic pressure in catecholamine storage granules." Acta Physiol Scand 123(1): 21-33.
- Holz, R. W., M. A. Bittner, S. C. Peppers, R. A. Senter y D. A. Eberhard (1989). "MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis." J Biol Chem 264(10): 5412-5419.
- Holzwarth, M. A. y M. S. Brownfield (1985). "Serotonin coexists with epinephrine in rat adrenal medullary cells." Neuroendocrinology 41(3): 230-236.
- Hook, V., L. Funkelstein, D. Lu, S. Bark, J. Wegrzyn y S. R. Hwang (2008). "Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones." Annu Rev Pharmacol Toxicol 48: 393-423.
- Horsthemke, B., H. Nazlican, J. Husing, L. Klein-Hitpass, U. Claussen, S. Michel, C. Lich, G. Gillessen-Kaesbach y K. Buiting (2003). "Somatic mosaicism for

- maternal uniparental disomy 15 in a girl with Prader-Willi syndrome: confirmation by cell cloning and identification of candidate downstream genes." Hum Mol Genet 12(20): 2723-2732.
- Hughes, R. N. (2007). "Neotic preferences in laboratory rodents: Issues, assessment and substrates." Neuroscience & Biobehavioral Reviews 31(3): 441-464.
- Huh, Y. H., S. H. Jeon y S. H. Yoo (2003). "Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A." J Biol Chem 278(42): 40581-40589.
- Huttner, W. B., H. H. Gerdes y P. Rosa (1991). "The granin-(chromogranin/secretogranin) family." Trends in Biochemical Sciences 16(0): 27-30.
- Hwang, S. R., C. Garza, C. Mosier, T. Toneff, E. Wunderlich, P. Goldsmith y V. Hook (2007). "Cathepsin L expression is directed to secretory vesicles for enkephalin neuropeptide biosynthesis and secretion." J Biol Chem 282(13): 9556-9563.
- Ida-Eto, M., A. Oyabu, T. Ohkawara, Y. Tashiro, N. Narita y M. Narita (2012). "Existence of manserin, a secretogranin II-derived neuropeptide, in the rat inner ear: relevance to modulation of auditory and vestibular system." J Histochem Cytochem 60(1): 69-75.
- Iguchi, H., S. Bannai, N. Takanashi y Y. Tsukada (1992). "Production of chromogranin A and B derived peptides in human small cell lung carcinoma cell lines." Eur J Cancer 28A(8-9): 1458-1462.
- Inomoto, C. y R. Y. Osamura (2009). "Formation of secretory granules by chromogranins." Med Mol Morphol 42(4): 201-203.
- Ischia, R., P. Lovisetti-Scamihorn, R. Hogue-Angeletti, M. Wolkersdorfer, H. Winkler y R. Fischer-Colbrie (1997). "Molecular cloning and characterization of NESP55, a novel chromogranin-like precursor of a peptide with 5-HT1B receptor antagonist activity." J Biol Chem 272(17): 11657-11662.

- Ito, H., Y. Ishikawa, M. Yoshimoto y N. Yamamoto (2007). "Diversity of brain morphology in teleosts: brain and ecological niche." Brain Behav Evol 69(2): 76-86.
- Iverfeldt, K., P. Serfozo, L. Diaz Arnesto y T. Bartfai (1989). "Differential release of coexisting neurotransmitters: frequency dependence of the efflux of substance P, thyrotropin releasing hormone and [3H]serotonin from tissue slices of rat ventral spinal cord." Acta Physiol Scand 137(1): 63-71.
- Iwazaki, T., I. Shibata, S. Niwa y I. Matsumoto (2004). "Selective reduction of chromogranin A-like immunoreactivities in the prefrontal cortex of schizophrenic subjects: a postmortem study." Neurosci Lett 367(3): 293-297.
- Jankowski, J. A., T. J. Schroeder, E. L. Ciolkowski y R. M. Wightman (1993). "Temporal Characteristics of Quantal Secretion of Catecholamines from Adrenal-Medullary Cells." Journal of Biological Chemistry 268(20): 14694-14700.
- Johnson, R. G. y A. Scarpa (1974). "Catecholamine equilibration gradients of isolated chromaffin vesicles induced by the ionophore X-537 A." FEBS Lett 47(1): 117-121.
- Kaidanovich-Beilin, O., T. Lipina, I. Vukobradovic, J. Roder y J. R. Woodgett (2011). "Assessment of social interaction behaviors." J Vis Exp(48).
- Kajiwara, R., O. Sand, Y. Kidokoro, M. E. Barish y T. Iijima (1997). "Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla." Jpn J Physiol 47(5): 449-464.
- Kalueff, A. V., A. Minasyan, T. Keisala, Z. H. Shah y P. Tuohimaa (2006). "Hair barbering in mice: implications for neurobehavioural research." Behav Processes 71(1): 8-15.
- Karlsson, E., M. Stridsberg y S. Sandler (2000). "Chromogranin-B regulation of IAPP and insulin secretion." Regul Pept 87(1-3): 33-39.
- Kelly, R. B. (1985). "Pathways of protein secretion in eukaryotes." Science 230(4721): 25-32.

- Kieffer, A. E., Y. Goumon, O. Ruh, S. Chasserot-Golaz, G. Nullans, C. Gasnier, D. Aunis y M. H. Metz-Boutigue (2003). "The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities." FASEB J 17(6): 776-778.
- Kim, T., J. H. Tao-Cheng, L. E. Eiden y Y. P. Loh (2001). "Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis." Cell 106(4): 499-509.
- Kirchmair, R., M. Egger, D. H. Walter, W. Eisterer, A. Niederwanger, E. Woell, M. Nagl, M. Pedrini, T. Murayama, S. Frauscher, A. Hanley, M. Silver, M. Brodmann, W. Sturm, R. Fischer-Colbrie, D. W. Losordo, J. R. Patsch y P. Schratzberger (2004). "Secretoneurin, an angiogenic neuropeptide, induces postnatal vasculogenesis." Circulation 110(9): 1121-1127.
- Kirchmair, R., R. Gander, M. Egger, A. Hanley, M. Silver, A. Ritsch, T. Murayama, N. Kaneider, W. Sturm, M. Kearny, R. Fischer-Colbrie, B. Kircher, H. Gaenger, C. J. Wiedermann, A. H. Ropper, D. W. Losordo, J. R. Patsch y P. Schratzberger (2004). "The neuropeptide secretoneurin acts as a direct angiogenic cytokine in vitro and in vivo." Circulation 109(6): 777-783.
- Kitao, Y., T. Inada, T. Arinami, C. Hirotsu, S. Aoki, Y. Iijima, T. Yamauchi y G. Yagi (2000). "A contribution to genome-wide association studies: search for susceptibility loci for schizophrenia using DNA microsatellite markers on chromosomes 19, 20, 21 and 22." Psychiatr Genet 10(3): 139-143.
- Klenchin, V. A. y T. F. Martin (2000). "Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking." Biochimie 82(5): 399-407.
- Kobayashi, H., T. Yanagita, H. Yokoo y A. Wada (2001). "Adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) in adrenal chromaffin cells." Peptides 22(11): 1895-1901.
- Kobayashi, K., Y. Noda, N. Matsushita, K. Nishii, H. Sawada, T. Nagatsu, D. Nakahara, R. Fukabori, Y. Yasoshima, T. Yamamoto, M. Miura, M. Kano, T. Mamiya, Y. Miyamoto y T. Nabeshima (2000). "Modest neuropsychological deficits caused by reduced noradrenaline metabolism in mice heterozygous for a mutated tyrosine hydroxylase gene." J Neurosci 20(6): 2418-2426.

- Koshimizu, H., T. Kim, N. X. Cawley y Y. P. Loh (2010). "Chromogranin A: a new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis." Regul Pept 160(1-3): 153-159.
- Kronenberger, J. P. y J. Médioni (1985). "Food neophobia in wild and laboratory mice (*Mus musculus domesticus*)." Behavioural Processes 11(1): 53-59.
- Kwon, B. S., C. M. Ha, S. Yu, B.-C. Lee, J. Y. Ro y S. Hwang (2012). "Microscopic nodes and ducts inside lymphatics and on the surface of internal organs are rich in granulocytes and secretory granules." Cytokine 60(2): 587-592.
- Landen, M., B. Grenfeldt, P. Davidsson, M. Stridsberg, B. Regland, C. G. Gottfries y K. Blennow (1999). "Reduction of chromogranin A and B but not C in the cerebrospinal fluid in subjects with schizophrenia." Eur Neuropsychopharmacol 9(4): 311-315.
- Laslop, A., T. Wohlfarter, R. Fischer-Colbrie, H. J. Steiner, C. Humpel, A. Saria, K. W. Schmid, G. Sperk y H. Winkler (1989). "Insulin hypoglycemia increases the levels of neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide, but not of chromogranins A and B, in rat chromaffin granules." Regul Pept 26(3): 191-202.
- Leszczyszyn, D. J., J. A. Jankowski, O. H. Viveros, E. J. Diliberto, Jr., J. A. Near y R. M. Wightman (1990). "Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis." J Biol Chem 265(25): 14736-14737.
- Lewis, J. J., J. R. Goldenring, V. A. Asher y I. M. Modlin (1989). "Pancreastatin: a novel peptide inhibitor of parietal cell signal transduction." Biochem Biophys Res Commun 163(2): 667-673.
- Loh, Y. P., H. Koshimizu, N. X. Cawley y B. Tota (2012). "Serpinins: role in granule biogenesis, inhibition of cell death and cardiac function." Curr Med Chem 19(24): 4086-4092.
- Lorenz, K. (1935). "Der Kumpan in der Umwelt des Vogels." Journal für Ornithologie 83(2): 137-213.
- Louthan, O. (2011). "Chromogranin a in physiology y oncology." Folia Biol (Praha) 57(5): 173-181.

- Lugardon, K., R. Raffner, Y. Goumon, A. Corti, A. Delmas, P. Bulet, D. Aunis y M. H. Metz-Boutigue (2000). "Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A." J Biol Chem 275(15): 10745-10753.
- Mahapatra, N. R., M. Mahata, P. P. Hazra, P. M. McDonough, D. T. O'Connor y S. K. Mahata (2004). "A dynamic pool of calcium in catecholamine storage vesicles. Exploration in living cells by a novel vesicle-targeted chromogranin A-aequorin chimeric photoprotein." J Biol Chem 279(49): 51107-51121.
- Mahapatra, N. R., D. T. O'Connor, S. M. Vaingankar, A. P. Hikim, M. Mahata, S. Ray, E. Staite, H. Wu, Y. Gu, N. Dalton, B. P. Kennedy, M. G. Ziegler, J. Ross y S. K. Mahata (2005). "Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog." J Clin Invest 115(7): 1942-1952.
- Malendowicz, L. K. y A. Markowska (1994). "Neuromedins and their involvement in the regulation of growth, structure and function of the adrenal cortex." Histol Histopathol 9(3): 591-601.
- Marksteiner, J., R. Bauer, W. A. Kaufmann, E. Weiss, U. Barnas y H. Maier (1999). "PE-11, a peptide derived from chromogranin B, in the human brain." Neuroscience 91(3): 1155-1170.
- Marksteiner, J., W. A. Kaufmann, P. Gurka y C. Humpel (2002). "Synaptic proteins in Alzheimer's disease." J Mol Neurosci 18(1-2): 53-63.
- Marksteiner, J., A. Saria y H. Hinterhuber (1994). "Distribution of secretoneurin-like immunoreactivity in comparison with that of substance P in the human brain stem." J Chem Neuroanat 7(4): 253-270.
- Marti, E., I. Ferrer y J. Blasi (2001). "Differential regulation of chromogranin A, chromogranin B and secretoneurin protein expression after transient forebrain ischemia in the gerbil." Acta Neuropathol 101(2): 159-166.
- Matteoli, M., C. Haimann, F. Torri-Tarelli, J. M. Polak, B. Ceccarelli y P. De Camilli (1988). "Differential effect of alpha-latrotoxin on exocytosis from small synaptic vesicles and from large dense-core vesicles containing calcitonin gene-related peptide at the frog neuromuscular junction." Proc Natl Acad Sci U S A 85(19): 7366-7370.

- Mbikay, M., N. G. Seidah y M. Chretien (2001). "Neuroendocrine secretory protein 7B2: structure, expression and functions." Biochem J 357(Pt 2): 329-342.
- Meredith (2004). "Amino acid neurotransmitter release and learning: a study of visual imprinting." Neuroscience 126(2): 8.
- Meredith, R. M., B. J. McCabe, K. M. Kendrick y G. Horn (2004). "Amino acid neurotransmitter release and learning: a study of visual imprinting." Neuroscience 126(2): 249-256.
- Meredith, R. W., J. E. Janečka, J. Gatesy, O. A. Ryder, C. A. Fisher, E. C. Teeling, A. Goodbla, E. Eizirik, T. L. L. Simão, T. Stadler, D. L. Rabosky, R. L. Honeycutt, J. J. Flynn, C. M. Ingram, C. Steiner, T. L. Williams, T. J. Robinson, A. Burk-Herrick, M. Westerman, N. A. Ayoub, M. S. Springer y W. J. Murphy (2011). "Impacts of the Cretaceous Terrestrial Revolution and KPg Extinction on Mammal Diversification." Science 334(6055): 521-524.
- Miczek, K. A., S. C. Maxson, E. W. Fish y S. Faccidomo (2001). "Aggressive behavioral phenotypes in mice." Behavioural Brain Research 125(1-2): 167-181.
- Mitchell, D., A. S. Koleszar y R. A. Scopatz (1984). "Arousal and T-maze choice behavior in mice: A convergent paradigm for neophobia constructs and optimal arousal theory." Learning and Motivation 15(3): 287-301.
- Montero-Hadjadje, M., S. Vaingankar, S. Elias, H. Tostivint, S. K. Mahata y Y. Anouar (2008). "Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects." Acta Physiol (Oxf) 192(2): 309-324.
- Montero-Hadjadje, M., H. Vaudry, V. Turquier, J. Leprince, J. L. Do Rego, L. Yon, N. Gallo-Payet, P. F. Plouin y Y. Anouar (2002). "Localization and characterization of evolutionarily conserved chromogranin A-derived peptides in the rat and human pituitary and adrenal glands." Cell Tissue Res 310(2): 223-236.
- Montesinos, M. S., J. D. Machado, M. Camacho, J. Diaz, Y. G. Morales, D. Alvarez de la Rosa, E. Carmona, A. Castaneyra, O. H. Viveros, D. T. O'Connor, S. K. Mahata y R. Borges (2008). "The crucial role of chromogranins in storage

- and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse." J Neurosci 28(13): 3350-3358.
- Munoz, D. G. (1991). "Chromogranin A-like immunoreactive neurites are major constituents of senile plaques." Lab Invest 64(6): 826-832.
- National Heart and Lung Institute of Laboratory Animal (1976). Animal models of thrombosis and hemorrhagic diseases. Washington, United States National Institutes of Health.
- Neher, E. y A. Marty (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(21): 6712-6716.
- Neher, E. y R. S. Zucker (1993). "Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells." Neuron 10(1): 21-30.
- Nicolay, N. H., D. Hertle, W. Boehmerle, F. M. Heidrich, M. Yeckel y B. E. Ehrlich (2007). "Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor and chromogranin B are concentrated in different regions of the hippocampus." J Neurosci Res 85(9): 2026-2036.
- Nielsen, E., B. S. Welinder y O. D. Madsen (1991). "Chromogranin-B, a putative precursor of eight novel rat glucagonoma peptides through processing at mono-, di-, or tribasic residues." Endocrinology 129(6): 3147-3156.
- Nikou, G. C., N. J. Lygidakis, C. Toubanakis, S. Pavlatos, S. Tseleni-Balafouta, E. Giannatou, E. Mallas y M. Safioleas (2005). "Current diagnosis and treatment of gastrointestinal carcinoids in a series of 101 patients: the significance of serum chromogranin-A, somatostatin receptor scintigraphy and somatostatin analogues." Hepatogastroenterology 52(63): 731-741.
- Nisbett, A. (1976). Konrad Lorenz. Londres, Dent.
- Nithianantharajah, J. y A. J. Hannan (2006). "Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system." Nature Reviews Neuroscience 7(9): 697-709.
- Nowakowski, C., W. A. Kaufmann, C. Adlassnig, H. Maier, K. Salimi, K. A. Jellinger y J. Marksteiner (2002). "Reduction of chromogranin B-like immunoreactivity

- in distinct subregions of the hippocampus from individuals with schizophrenia." Schizophr Res 58(1): 43-53.
- Nussdorfer, G. G. (1996). "Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells." Pharmacol Rev 48(4): 495-530.
- O'Connor, D. T., R. P. Frigon y R. L. Sokoloff (1984). "Human chromogranin A. Purification and characterization from catecholamine storage vesicles of human pheochromocytoma." Hypertension 6(1): 2-12.
- Obermuller, S., F. Calegari, A. King, A. Lindqvist, I. Lundquist, A. Salehi, M. Francolini, P. Rosa, P. Rorsman, W. B. Huttner y S. Barg (2010). "Defective secretion of islet hormones in chromogranin-B deficient mice." PLoS One 5(1): e8936.
- Olsson, I. A. S. y K. Dahlborn (2002). "Improving housing conditions for laboratory mice: A review of 'environmental enrichment'." Laboratory Animals 36(3): 243-270.
- Palmiter (1982). "Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes." Nature 300: 5.
- Palmiter, R. D., R. L. Brinster, R. E. Hammer, M. E. Trumbauer, M. G. Rosenfeld, N. C. Birnberg y R. M. Evans (1982). "Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes." Nature 300(5893): 611-615.
- Parsons, T. D., J. R. Coorsen, H. Horstmann y W. Almers (1995). "Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells." Neuron 15(5): 1085-1096.
- Petit-Demouliere, B., F. Chenu y M. Bourin (2005). "Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity." Psychopharmacology 177(3): 245-255.
- Porsolt, R. D., M. Le Pichon y M. Jalfre (1977). "Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments." Nature 266(5604): 730-732.
- Powell, S. B., X. Zhou y M. A. Geyer (2009). "Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia." Behav Brain Res 204(2): 282-294.

- Qin, W., W. A. Bauman y C. P. Cardozo (2010). "Evolving concepts in neurogenic osteoporosis." Curr Osteoporos Rep 8(4): 212-218.
- Rao, F., G. Wen, J. R. Gayen, M. Das, S. M. Vaingankar, B. K. Rana, M. Mahata, B. P. Kennedy, R. M. Salem, M. Stridsberg, K. Abel, D. W. Smith, E. Eskin, N. J. Schork, B. A. Hamilton, M. G. Ziegler, S. K. Mahata y D. T. O'Connor (2007). "Catecholamine release-inhibitory peptide catestatin (chromogranin A(352-372)): naturally occurring amino acid variant Gly364Ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension." Circulation 115(17): 2271-2281.
- Reimer, J. D. y M. L. Petras (1967). "Breeding Structure of the House Mouse, *Mus musculus*, in a Population Cage." Journal of Mammalogy 48(1): 88-99.
- Reinisch, N., R. Kirchmair, C. M. Kahler, R. Hogue-Angeletti, R. Fischer-Colbrie, H. Winkler y C. J. Wiedermann (1993). "Attraction of human monocytes by the neuropeptide secretoneurin." FEBS Lett 334(1): 41-44.
- Roscoe, B. J. M. L. y E. L. Green (1966). Biology of the laboratory mouse : by the staff of the Jackson laboratory. Earl L. Green, editor, Douglas L. Coleman (A.O.), section editors, Eunice U. Fahey, Assistant editor. New York, Blakiston Division, McGraw Hill Book Co.
- Rosjo, H., M. Stridsberg, G. Florholmen, K. O. Stenslokken, A. H. Ottesen, I. Sjaastad, C. Husberg, M. B. Dahl, E. Oie, W. E. Louch, T. Omland y G. Christensen (2012). "Secretogranin II; a protein increased in the myocardium and circulation in heart failure with cardioprotective properties." PLoS One 7(5): e37401.
- Rostrup, M. (1998). "Catecholamines, hypoxia y high altitude." Acta Physiol Scand 162(3): 389-399.
- Russell, J., P. Gee, S. M. Liu y R. H. Angeletti (1994). "Inhibition of parathyroid hormone secretion by amino-terminal chromogranin peptides." Endocrinology 135(1): 337-342.
- Sahu, B. S., J. M. Obbineni, G. Sahu, P. K. Allu, L. Subramanian, P. J. Sonawane, P. K. Singh, B. K. Sasi, S. Senapati, S. K. Maji, A. K. Bera, B. S. Gomathi, A. S. Mulasari y N. R. Mahapatra (2012). "Functional Genetic Variants of the

- Catecholamine-Release-Inhibitory Peptide Catestatin in an Indian Population: allele-specific effects on metabolic traits." J Biol Chem 287(52): 43840-43852.
- Sanchez-Margalet, V. (1999). "Modulation of insulin receptor signalling by pancreastatin in HTC hepatoma cells." Diabetologia 42(3): 317-325.
- Sanchez-Margalet, V. y C. Gonzalez-Yanes (1998). "Pancreastatin inhibits insulin action in rat adipocytes." Am J Physiol 275(6 Pt 1): E1055-1060.
- Sanchez-Margalet, V., J. A. Lobon, A. Gonzalez, M. L. Fernandez-Soto, F. Escobar-Jimenez y R. Goberna (1998). "Increased plasma pancreastatin-like levels in gestational diabetes: correlation with catecholamine levels." Diabetes Care 21(11): 1951-1954.
- Sarna, J. R., R. H. Dyck y I. Q. Wishaw (2000). "The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking." Behav Brain Res 108(1): 39-45.
- Sawada, K., N. Echigo, N. Juge, T. Miyaji, M. Otsuka, H. Omote, A. Yamamoto y Y. Moriyama (2008). "Identification of a vesicular nucleotide transporter." Proc Natl Acad Sci U S A 105(15): 5683-5686.
- Schmid, G. M., P. Meda, D. Caille, E. Wargent, J. O'Dowd, D. F. Hochstrasser, M. A. Cawthorne y J. C. Sanchez (2007). "Inhibition of insulin secretion by betagranin, an N-terminal chromogranin A fragment." J Biol Chem 282(17): 12717-12724.
- Schroeder, T. J., R. Borges, J. M. Finnegan, K. Pihel, C. Amatore y R. M. Wightman (1996). "Temporally resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events." Biophysical Journal 70(2): 1061-1068.
- Sekiya, K., M. A. Ghatel, M. J. Salahuddin, A. E. Bishop, Q. A. Hamid, H. Ibayashi, J. M. Polak y S. R. Bloom (1989). "Production of GAWK (chromogranin-B 420-493)-like immunoreactivity by endocrine tumors and its possible diagnostic value." J Clin Invest 83(6): 1834-1842.
- Stettler, H., N. Beuret, C. Prescianotto-Baschong, B. Fayard, L. Taupenot y M. Spiess (2009). "Determinants for chromogranin A sorting into the regulated secretory pathway are also sufficient to generate granule-like structures in non-endocrine cells." Biochem J 418(1): 81-91.

- Stowers, L., P. Cameron y J. A. Keller (2013). "Ominous odors: olfactory control of instinctive fear and aggression in mice." Current Opinion in Neurobiology 23(3): 339-345.
- Strekalova, T. y H. Steinbusch (2009). Factors of Reproducibility of Anhedonia Induction in a Chronic Stress Depression Model in Mice. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. 42: 153-176.
- Strub, J.-M., Y. Goumon, K. Lugardon, C. Capon, M. Lopez, M. Moniatte, A. Van Dorsselaer, D. Aunis y M.-H. Metz-Boutigue (1996). "Antibacterial Activity of Glycosylated and Phosphorylated Chromogranin A-derived Peptide 173-194 from Bovine Adrenal Medullary Chromaffin Granules." Journal of Biological Chemistry 271(45): 28533-28540.
- Strub, J. M., P. Garcia-Sablone, K. Lonning, L. Taupenot, P. Hubert, A. Van Dorsselaer, D. Aunis y M. H. Metz-Boutigue (1995). "Processing of chromogranin B in bovine adrenal medulla. Identification of secretolytin, the endogenous C-terminal fragment of residues 614-626 with antibacterial activity." Eur J Biochem 229(2): 356-368.
- Strub, J. M., Y. Goumon, K. Lugardon, C. Capon, M. Lopez, M. Moniatte, A. Van Dorsselaer, D. Aunis y M. H. Metz-Boutigue (1996). "Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules." J Biol Chem 271(45): 28533-28540.
- Takahashi, N., R. Ishihara, S. Saito, N. Maemo, N. Aoyama, X. Ji, H. Miura, M. Ikeda, N. Iwata, T. Suzuki, T. Kitajima, Y. Yamanouchi, Y. Kinoshita, N. Ozaki y T. Inada (2006). "Association between chromogranin A gene polymorphism and schizophrenia in the Japanese population." Schizophr Res 83(2-3): 179-183.
- Takamori, S., M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Gronborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brugger, P. Ringler, S. A. Muller, B. Rammner, F. Grater, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmuller, J. Heuser, F. Wieland y R. Jahn (2006). "Molecular anatomy of a trafficking organelle." Cell 127(4): 831-846.

- Tammimaki, A., M. Kaenmaki, O. Kambur, N. Kuleskaya, T. Keisala, E. Karvonen, J. A. Garcia-Horsman, H. Rauvala y P. T. Mannisto (2010). "Effect of S-COMT deficiency on behavior and extracellular brain dopamine concentrations in mice." Psychopharmacology (Berl) 211(4): 389-401.
- Tano, K., A. Oyabu, Y. Tashiro, N. Kamada, N. Narita, F. Nasu y M. Narita (2010). "Manserin, a secretogranin II-derived peptide, distributes in the rat endocrine pancreas colocalized with islet-cell specific manner." Histochem Cell Biol 134(1): 53-57.
- Tatemoto, K., S. Efendic, V. Mutt, G. Makk, G. J. Feistner y J. D. Barchas (1986). "Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion." Nature 324(6096): 476-478.
- Taupenot, L., K. L. Harper y D. T. O'Connor (2003). "The chromogranin-secretogranin family." N Engl J Med 348(12): 1134-1149.
- Theurl, M., W. Schgoer, K. Albrecht, J. Jeschke, M. Egger, A. G. Beer, D. Vasiljevic, S. Rong, A. M. Wolf, F. H. Bahlmann, J. R. Patsch, D. Wolf, P. Schratzberger, S. K. Mahata y R. Kirchmair (2010). "The neuropeptide catestatin acts as a novel angiogenic cytokine via a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism." Circ Res 107(11): 1326-1335.
- Thiébot, M. H., P. Soubrié, P. Simon y J. R. Boissier (1973). "Dissociation de deux composantes du comportement chez le rat sous l'effet de psychotropes." Psychopharmacologia 31(1): 77-90.
- Thrower, E. C., C. U. Choe, S. H. So, S. H. Jeon, B. E. Ehrlich y S. H. Yoo (2003). "A functional interaction between chromogranin B and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ channel." J Biol Chem 278(50): 49699-49706.
- Thureson-Klein, A. (1983). "Exocytosis from large and small dense cored vesicles in noradrenergic nerve terminals." Neuroscience 10(2): 245-259.
- Tinbergen, N. (1948). "Social Releasers and the Experimental Method Required for Their Study." The Wilson Bulletin 60(1): 6-51.
- Tinbergen, N. (1963). "On aims and methods of ethology." Zeitschrift für Tierpsychologie 20(4): 410-433.

- Tischler, A. S. (2002). "Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons." Ann N Y Acad Sci 971: 366-370.
- Tooze, S. A. y W. B. Huttner (1990). "Cell-free protein sorting to the regulated and constitutive secretory pathways." Cell 60(5): 837-847.
- Tooze, S. A., G. J. Martens y W. B. Huttner (2001). "Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE." Trends Cell Biol 11(3): 116-122.
- Tota, B., A. M. Quintieri, V. Di Felice y M. C. Cerra (2007). "New biological aspects of chromogranin A-derived peptides: focus on vasostatin." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 147(1): 11-18.
- Turquier, V., L. Yon, L. Grumolato, D. Alexandre, A. Fournier, H. Vaudry y Y. Anouar (2001). "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates secretoneurin release and secretogranin II gene transcription in bovine adrenochromaffin cells through multiple signaling pathways and increased binding of pre-existing activator protein-1-like transcription factors." Mol Pharmacol 60(1): 42-52.
- Ueta, C. B., G. W. Fernandes, L. P. Capelo, T. L. Fonseca, F. D. Maculan, C. H. Gouveia, P. C. Brum, M. A. Christoffolete, M. S. Aoki, C. L. Lancellotti, B. Kim, A. C. Bianco y M. O. Ribeiro (2012). "beta(1) Adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice." J Endocrinol 214(3): 359-365.
- Unsicker, K., B. Krisch, U. Otten y H. Thoenen (1978). "Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids." Proc Natl Acad Sci U S A 75(7): 3498-3502.
- Vaingankar, S. M., Y. Li, N. Biswas, J. Gayen, S. Choksi, F. Rao, M. G. Ziegler, S. K. Mahata y D. T. O'Connor (2010). "Effects of chromogranin A deficiency and excess in vivo: biphasic blood pressure and catecholamine responses." J Hypertens 28(4): 817-825.
- Veschini, L., L. Crippa, E. Dondossola, C. Doglioni, A. Corti y E. Ferrero (2011). "The vasostatin-1 fragment of chromogranin A preserves a quiescent phenotype in hypoxia-driven endothelial cells and regulates tumor neovascularization." FASEB J 25(11): 3906-3914.

- Vorhees, C. V. y M. T. Williams (2006). "Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory." Nat Protoc 1(2): 848-858.
- Walsh, R. N. y R. A. Cummins (1976). "The Open-Field Test: a critical review." Psychol Bull 83(3): 482-504.
- Wand, G. S., M. Takiyyuddin, D. T. O'Connor y M. A. Levine (1991). "A proposed role for chromogranin A as a glucocorticoid-responsive autocrine inhibitor of proopiomelanocortin secretion." Endocrinology 128(3): 1345-1351.
- Wang, Y., C. Thiele y W. B. Huttner (2000). "Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network." Traffic 1(12): 952-962.
- Wang, Z., C. Balet Sindreu, V. Li, A. Nudelman, G. C.-K. Chan y D. R. Storm (2006). "Pheromone Detection in Male Mice Depends on Signaling through the Type 3 Adenylyl Cyclase in the Main Olfactory Epithelium." The Journal of Neuroscience 26(28): 7375-7379.
- Wegrzyn, J. L., S. J. Bark, L. Funkelstein, C. Mosier, A. Yap, P. Kazemi-Esfarjani, A. R. La Spada, C. Sigurdson, D. T. O'Connor y V. Hook (2010). "Proteomics of dense core secretory vesicles reveal distinct protein categories for secretion of neuroeffectors for cell-cell communication." J Proteome Res 9(10): 5002-5024.
- Weiler, R., S. Cidon, M. D. Gershon, H. Tamir, R. Hogue-Angeletti y H. Winkler (1989). "Adrenal chromaffin granules and secretory granules from thyroid parafollicular cells have several common antigens." FEBS Lett 257(2): 457-459.
- Weinbeer, M. y E. V. Kalko (2007). "Ecological niche and phylogeny: the highly complex echolocation behavior of the trawling long-legged bat, *Macrophyllum macrophyllum*." Behavioral Ecology and Sociobiology 61(9): 1337-1348.
- Wen, G., S. K. Mahata, P. Cadman, M. Mahata, S. Ghosh, N. R. Mahapatra, F. Rao, M. Stridsberg, D. W. Smith, P. Mahboubi, N. J. Schork, D. T. O'Connor y B. A. Hamilton (2004). "Both rare and common polymorphisms contribute

- functional variation at CHGA, a regulator of catecholamine physiology." Am J Hum Genet 74(2): 197-207.
- Willis, M., M. Prokesch, B. Hutter-Paier, M. Windisch, M. Stridsberg, S. K. Mahata, R. Kirchmair, G. Wietzorrek, H. G. Knaus, K. Jellinger, C. Humpel y J. Marksteiner (2008). "Chromogranin B and Secretogranin II in transgenic mice overexpressing human APP751 with the London (V717I) and Swedish (K670M/N671L) mutations and in Alzheimer patients." J Alzheimers Dis 13(2): 123-135.
- Woodward, B. L., J. P. Winn y F. E. Fish (2006). "Morphological specializations of baleen whales associated with hydrodynamic performance and ecological niche." Journal of Morphology 267(11): 1284-1294.
- Wu, H. J., D. J. Rozansky, R. J. Parmer, B. M. Gill y D. T. O'Connor (1991). "Structure and function of the chromogranin A gene. Clues to evolution and tissue-specific expression." J Biol Chem 266(20): 13130-13134.
- Wu, J. T., A. J. Erickson, K. C. Tsao, T. L. Wu y C. F. Sun (2000). "Elevated serum chromogranin A is detectable in patients with carcinomas at advanced disease stages." Ann Clin Lab Sci 30(2): 175-178.
- Wu, S., J. Ma, Q. Xing, Y. Xu, J. Meng, D. Cao, G. Feng y L. He (2007). "Further evidence that the chromogranin B gene confers predisposition to schizophrenia: a family-based association study in Chinese." J Neural Transm 114(5): 641-644.
- Yajima, A., M. Ikeda, K. Miyazaki, T. Maeshima, N. Narita y M. Narita (2004). "Manserin, a novel peptide from secretogranin II in the neuroendocrine system." Neuroreport 15(11): 1755-1759.
- Yamada, Y., F. Ando, N. Niino y H. Shimokata (2003). "Association of a polymorphism of the dopamine receptor D4 gene with bone mineral density in Japanese men." Journal of Human Genetics 48(12): 629-633.
- Yang, Z., H. Li, Z. Chai, M. J. Fullerton, Y. Cao, B. H. Toh, J. W. Funder y J. P. Liu (2001). "Dynamin II regulates hormone secretion in neuroendocrine cells." J Biol Chem 276(6): 4251-4260.

- Yegen, B. C. (2003). "Bombesin-like peptides: candidates as diagnostic and therapeutic tools." Curr Pharm Des 9(12): 1013-1022.
- Yoo, S. H. y J. P. Albanesi (1990). "Ca²⁺-induced conformational change and aggregation of chromogranin A." J Biol Chem 265(24): 14414-14421.
- Yoo, S. H., Y. S. Oh, M. K. Kang, Y. H. Huh, S. H. So, H. S. Park y H. Y. Park (2001). "Localization of three types of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca(2+) channel in the secretory granules and coupling with the Ca(2+) storage proteins chromogranins A and B." J Biol Chem 276(49): 45806-45812.
- Yoshiki, A. y K. Moriwaki (2006). "Mouse phenome research: implications of genetic background." ILAR J 47(2): 94-102.
- You, Z. B., A. Saria, R. Fischer-Colbrie, L. Terenius, M. Goiny y M. Herrera-Marschitz (1996). "Effects of secretogranin II-derived peptides on the release of neurotransmitters monitored in the basal ganglia of the rat with in vivo microdialysis." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 354(6): 717-724.
- Zhang, B., Z. Tan, C. Zhang, Y. Shi, Z. Lin, N. Gu, G. Feng y L. He (2002). "Polymorphisms of chromogranin B gene associated with schizophrenia in Chinese Han population." Neurosci Lett 323(3): 229-233.
- Zhang, K., F. Rao, L. Wang, B. K. Rana, S. Ghosh, M. Mahata, R. M. Salem, J. L. Rodriguez-Flores, M. M. Fung, J. Waalen, B. Tayo, L. Taupenot, S. K. Mahata y D. T. O'Connor (2010). "Common functional genetic variants in catecholamine storage vesicle protein promoter motifs interact to trigger systemic hypertension." J Am Coll Cardiol 55(14): 1463-1475.
- Zhao, E., D. Zhang, A. Basak y V. L. Trudeau (2009). "New insights into granin-derived peptides: evolution and endocrine roles." Gen Comp Endocrinol 164(2-3): 161-174.
- Zouhal, H., C. Jacob, P. Delamarche y A. Gratas-Delamarche (2008). "Catecholamines and the effects of exercise, training and gender." Sports Med 38(5): 401-423.